



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



## Trabajo Final de carrera de Ingeniería Agronómica

“Uso de hongos saprófitos y hongos formadores de micorrizas arbusculares seleccionados para la promoción del crecimiento vegetal y la protección contra nematodos fitopatógenos en cultivos hortícolas.”

**Modalidad:** Investigación en cualquiera de los campos de las Ciencias Agrarias y Forestales

**Área temática:** Fisiología vegetal

**Alumno:** Rukavina, Facundo Gabriel

**N° Legajo:** 27.392/6

**DNI:** 38.443.477

**e-mail:** [facurukavina@gmail.com](mailto:facurukavina@gmail.com)

**Tel:** 221-4544943

**Directora:** Dra. Ing. Ftal. Ruscitti Marcela F. **Filiación:** INFIVE (Conicet – UNLP)

**Codirectora:** Dra. Ing. Agr. Bernardo Valeria F. **Filiación:** INFIVE (Conicet – UNLP)

12 de marzo de 2023

# ÍNDICE

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
HIPÓTESIS .....	14
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS PARTICULARES .....	15
MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
Preparación del inóculo con el hongo micorrícico arbuscular.....	15
Preparación del inóculo con los hongos saprótrofos .....	16
Preparación del inóculo de <i>Nacobbus aberrans</i> .....	17
Tratamientos realizados .....	17
Parámetros evaluados .....	18
➤ Área foliar .....	18
➤ Número de huevos del nematodo extraídos de las raíces mediante el método de Hussey y Barker (1973). .....	19
➤ Factor de reproducción del nematodo (Oostenbrink, 1966). .....	19
➤ Peso fresco y seco aéreo y de raíz: .....	20
➤ Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos según el método de Wellburn (1994). .....	20
➤ Determinación del contenido de proteínas solubles mediante el método de Bradford (1976).....	21
➤ Determinación del contenido de prolina mediante el método de Bates et al. (1973).....	22
➤ Contenido de compuestos fenólicos totales por el método de Singleton y Rossi (1965), con modificaciones. ....	22
➤ Presencia de hongos micorrícicos mediante la tinción de las raíces por el método de Phillips y Hayman, (1970) y porcentaje de micorrización o colonización micorrícica por el método de Trouvelot et al. (1986).....	23
➤ Persistencia de hongos en el suelo .....	24
Diseño experimental.....	25
RESULTADOS .....	25
➤ Área Foliar .....	25
➤ Número de huevos de nematodos extraídos de las raíces mediante el método de Hussey y Barker (1973) y factor de reproducción del nematodo (Oostenbrink, 1966).....	26
➤ Peso fresco y seco aéreo y de raíz .....	27

➤ Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos según el método de Wellburn (1994) .....	29
➤ Determinación del contenido de proteínas solubles mediante el método de Bradford, (1976).....	31
➤ Determinación del contenido de prolina mediante el método de Bates et al. (1973).....	31
➤ Contenido de compuestos fenólicos totales por el método de Singleton y Rossi, (1965), con modificaciones .....	33
➤ Presencia de hongos micorrícicos mediante la tinción de las raíces por el método de Phillips y Hayman, (1970) y porcentaje de micorrización o colonización micorrícica por el método de Trouvelot et al. (1986).....	35
➤ Persistencia de hongos en el suelo .....	36
DISCUSIÓN.....	36
CONCLUSIONES Y/O RECOMENDACIONES .....	39
BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	40

## RESUMEN

El Cinturón Hortícola Platense (CHP) provee la mayor proporción de hortalizas frescas consumidas por el Área Metropolitana de Buenos Aires. El pimiento (*Capsicum annuum* L.) se encuentra dentro de las principales especies cultivadas bajo cubierta en el CHP. Producto de la forma de intensificación de la producción, se generan debilitamientos en los mecanismos de control biológico de plagas. *Nacobbus aberrans* es un nematodo nodulador de la raíz, y es considerado la principal adversidad fitosanitaria bajo cubierta del CHP. El principal síntoma visible que produce es la formación de agallas en el sistema radical, dificultando la absorción de agua y nutrientes, lo que se traduce en pérdidas productivas que pueden alcanzar la totalidad del cultivo.

El objetivo de este trabajo fue comprobar el efecto del hongo micorrízico arbuscular *Septoglomus deserticola* y los hongos saprótrofos *Pleurotus ostreatus* y *Corioloopsis rigida*, de forma individual y combinados, en la promoción del crecimiento de plantas de pimiento y en la reducción de la población de *Nacobbus aberrans*.

Se realizó un ensayo con diseño completamente aleatorizado, en condiciones semicontroladas. Se inocularon las plantas de pimiento (variedad "Fyuco"), con los tres hongos por separado y combinados, dichos tratamientos a su vez se realizaron bajo las situaciones con y sin nematodos, y con sus respectivos testigos. Los datos se analizaron por ANOVA y las medias se compararon usando LSD ( $P < 0,05$ ).

Se determinaron parámetros morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, como área foliar, peso fresco y seco, contenido de compuestos fotosintéticos y proteínas solubles, parámetros de estrés como prolina y compuestos fenólicos; además de la población final de nematodo, porcentaje de micorrización y persistencia de los hongos saprótrofos en el suelo al finalizar el ensayo.

Se determinó que *S. deserticola* junto con *C. rigida* y *P. ostreatus*, aplicados como bioinsumos, actúan promoviendo el crecimiento en las plantas de pimiento. El nematodo *Nacobbus aberrans* afecta el crecimiento de las plantas de pimiento. Sin embargo, la asociación entre *S. deserticola* con *C. rigida* y *P. ostreatus* morigera la actividad fitopatógena de *N. aberrans*, mitigando los daños provocados sobre plantas de pimiento.

# INTRODUCCIÓN

La producción de hortalizas se extiende a lo largo de todo el país debido a la diversidad de ambientes ecológicos. La mayor producción de hortalizas para consumo fresco se localiza en las cercanías a los grandes centros urbanos, en los denominados “Cinturones Verdes”. Buenos Aires, cuenta con la mayor proporción relativa: 20% de superficie total implantada con hortalizas en Argentina y 22% de la producción total del país (Fernández Lozano, 2012).

El Cinturón Hortícola Platense (CHP) está ubicado en la periferia de la ciudad de La Plata. Su importancia radica en que es el área de mayor producción del Cinturón Verde Bonaerense. Cuenta con una superficie de 11.853 ha en las cuales se realizan producciones agrícolas, florícolas, hortícolas a campo y hortícolas bajo cubierta; ésta última se desarrolla en una superficie de 4.370,4 ha (Baldini, 2020). Se estima que el CHP provee entre el 60% y el 90% de las hortalizas frescas que consumen los 13.985.794 de habitantes del Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA) (Baldini, 2020; INDEC, 2022).

El pimiento o morrón (*Capsicum annuum* L) es un cultivo originario de Perú y Bolivia y, desde allí se expandió hacia América Central y el resto de América del Sur. Sus frutos son consumidos de distintas maneras: desde crudos a cocidos, como también industrializados para elaborar condimentos, conservas en vinagre, congelados, entre otros (del Pino, 2020).

Pertenece a la familia Solanáceas, es una planta herbácea, perenne, de cultivo generalmente anual y de porte que varía entre 0,5 y 2 metros según se lo cultive al aire libre o en invernáculo. Tiene un sistema radicular pivotante y profundo que puede llegar hasta 1,2 m y provisto de un número elevado de raíces adventicias superficiales. El patrón de crecimiento es simpodial que se mantiene mientras las condiciones ambientales lo permitan. El tallo es circular en la base y anguloso en las partes más altas, con costillas en los ángulos; es glabro y adquiere consistencia semileñosa en la base que le otorga un porte erecto o semierecto. Las hojas son glabras, enteras lanceoladas o aovadas, de borde liso, con largos pecíolos. Las flores son solitarias, de tamaño mediano, ubicadas en las bifurcaciones de las ramificaciones, hermafroditas. La polinización es principalmente autógama, aunque puede presentar distintas situaciones entre la autogamia y la alogamia. El fruto es una baya

semicartilaginosa, de estructura hueca, llena de aire, con forma de cápsula. La baya está conformada por un pericarpio grueso y un tejido placentario al que se unen las semillas. El color del pericarpio más difundido en Argentina es el que vira al rojo y en segundo lugar al amarillo, pero hay pimientos muchos menos frecuentes que viran al blanco o morado. La forma, el tamaño y el peso del fruto muestran una gran diversidad (del Pino, 2020).

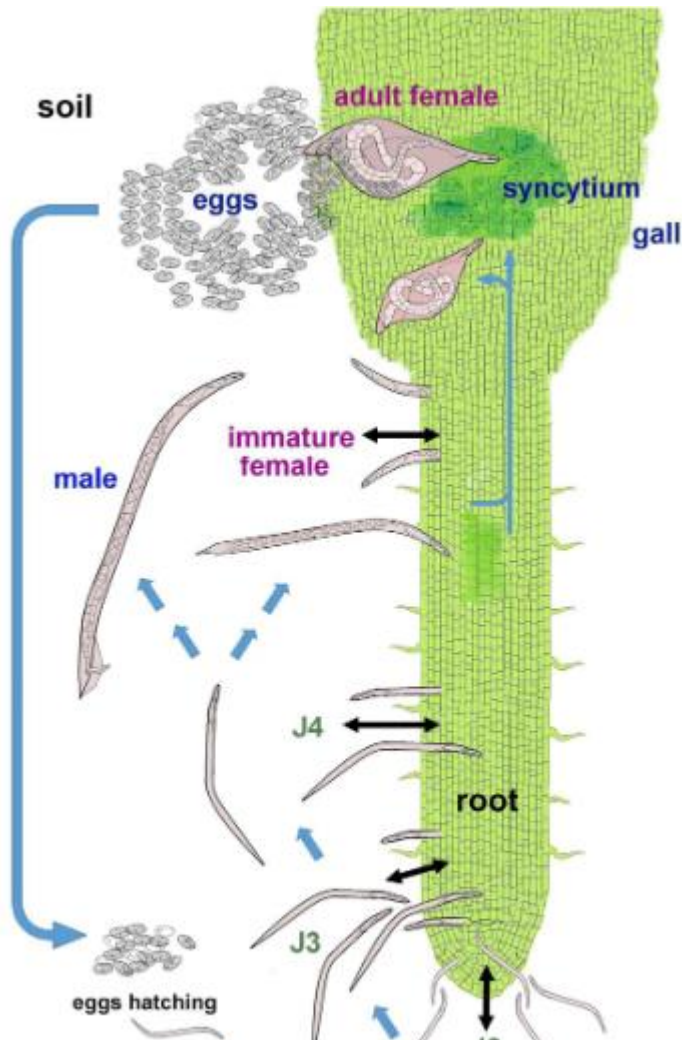
La incorporación de invernáculos en el CHP, si bien se remonta desde mediados de los '80, en las últimas décadas sucedió a tasas exponenciales (Baldini, 2020). Esto es debido a que el cultivo bajo cubierta trae aparejado ciertos beneficios respecto a la producción a campo, como la diferenciación competitiva a nivel tanto local como fuera del CHP, un mayor periodo de oferta de hortalizas, obtención de productos de mejor calidad comercial, eficiencia económica por optimización de los factores de producción (tierra, capital y trabajo), eficacia técnica, y mayor producción en relación a la superficie y tiempo (García, 2015). Esta diferenciación cuali y cuantitativa da como resultado un aumento en el número de quintas, más productores, mejor calidad del producto ofertado, mayor competitividad, tecnología e innovaciones, posicionándose así como la región hortícola más importante del país (García, 2012). Este modelo de producción, además de invernáculos utiliza semillas de alto potencial de rendimiento, alta cantidad de agroquímicos, equipos de riego localizados, fertirriego, polietilenos y mallas anti trips (Selis, 2012). Si bien es un modelo más rentable económicamente, se utilizan prácticas intensivas de manejo, que impactan de manera más agresiva sobre los recursos naturales y sociales (Blandi et al., 2015). En este sentido, el incremento en el uso de agroquímicos genera un debilitamiento en los mecanismos de control biológico de plagas, favoreciendo la resurgencia de las mismas, como ocurre con los nematodos fitoparásitos, y la consecuente necesidad de intensificar el uso de fitosanitarios (Sarandón et al., 2013), sumado a esto se observan problemas de contaminación por hiperfertilización y de salinización de los suelos (Hurtado et al., 2006), inundaciones cada vez más frecuentes agravadas por la impermeabilización generada por los invernáculos (Karol y San Juan, 2018) y contaminación por agroquímicos de agua, suelo y alimentos (Sarandón et al., 2013).

Los nematodos noduladores de la raíz afectan a una gran diversidad de cultivos de importancia económica, incluyendo los cultivos hortícolas. Son organismos multicelulares que se encuentran presentes en los agroecosistemas, donde pueden

encontrarse en densidades superiores a 30 millones/m<sup>2</sup> (Andrés, 2003). Suelen ser un factor limitante en la producción de tomate y pimiento, y su incidencia se incrementó en los últimos años fundamentalmente en los cultivos bajo invernáculo (Lax et al., 2011; Radwan et al., 2012). Los géneros de nematodos más habituales en el CHP son *Meloidogyne* y *Nacobbus*, considerados por Jones et al. (2013) como dos de los diez géneros de mayor relevancia mundial por su distribución y pérdidas económicas; siendo el segundo, el responsable del 80% de los síntomas de agallamiento, convirtiéndose en la principal adversidad fitosanitaria de dicha región (Nico, 2014, en Bernardo, 2022; Garita, 2020).

*Nacobbus aberrans* es una especie originaria de América del Sur, perteneciente a la familia *Pratylenchidae*, es reconocida como plaga cuarentenaria en Estados Unidos, Perú, Bolivia, Argentina, Chile, México, Ecuador y la región euromediterránea (EFSA Panel on Plant Health (PLH) et al., 2018; EPPO, 2023). Se destacan ciertas características que dificultan el control como su polifagia, un elevado potencial reproductivo y una notable capacidad de adaptación (anhidrobiosis), motivos por los que se encuentra ampliamente distribuido en el continente americano (Jones et al., 2013), y en particular abarcando diferentes regiones geográficas de nuestro país (Doucet y Lax, 2005, en Bernardo 2022). Estudios recientes realizados por (Lax et al., 2021) comparando datos morfométricos y moleculares apoyan la identificación de tres especies nominales: *N. aberrans sensu stricto*, distribuida principalmente en México y Ecuador; *N. bolivianus*, presente en Bolivia y Perú; *N. celatus*, un nuevo taxón ampliamente distribuido en las tierras bajas de Argentina. A pesar de ello, el complejo aún no se ha resuelto exhaustivamente porque hay muchas poblaciones, especialmente en América del Sur, que podrían representar nuevos taxones (Lax et al., 2021, 2022). En el presente trabajo, cuando se refiera a *N. aberrans* será en su forma *sensu lato*.

Este nematodo presenta un marcado dimorfismo sexual. Su ciclo de vida (Figura 1) dura de 25 a 59 días, variando en función de las poblaciones específicas, el tipo de hospedante y las condiciones ambientales; comprende cuatro estadios juveniles y los adultos. El primer estadio (J1) se desarrolla en el interior del huevo. Al eclosionar el huevo, muda a juvenil de segundo estadio (J2). El J2 se desplazará en



**Figura 1:** Ciclo de vida de *Nacobbus* spp. Las flechas azules indican el desarrollo de las diferentes etapas a lo largo del ciclo de vida; las flechas negras representan el movimiento de las etapas infecciosas, tanto en el suelo como en las raíces (Lax et al., 2022).

el suelo en busca de un hospedador adecuado. Los juveniles se alimentan del citoplasma de células del parénquima cortical perforando las paredes con ayuda de su estilete. A medida que el nematodo se alimenta, muda pasando por el tercer (J3) y cuarto estadio juvenil (J4) (Figura 2) (Manzanilla-López et al., 2002). *Nacobbus* spp. es, por el momento, el único fitoparásito conocido con un ciclo inusual que incluye fases endoparasitarias infecciosas y migratorias (J2-J4 y hembra inmadura), y una fase sedentaria (hembra madura). El J2-J4 y la hembra migratoria pueden encontrarse en el suelo y también en la raíz, donde se desplazan intracelularmente y

destruyen los tejidos, causando lesiones necróticas. Estos estadios abandonan y vuelven a invadir las raíces del huésped, produciendo daños adicionales (Lax et al., 2022). La hembra inmadura penetra en el interior de la raíz y se fija en la proximidad del cilindro central en donde induce el desarrollo de su sitio de alimentación (sincitio) (Doucet y Lax, 2005, en Bernardo, 2022). Esto da lugar a una serie de alteraciones histológicas y fisiológicas particulares en esa zona del sistema radical del hospedador (Figura 3). Con el transcurso del tiempo, el nematodo pierde su aspecto filiforme y se



torna voluminoso con apariencia de huso o cigarro (hembra madura) y se convierte en sedentaria, momento donde ocurriría la fecundación (Inserra et al., 1983). Una vez fecundada, la hembra genera una matriz gelatinosa en la que se depositan entre 400-800 huevos (masa de huevos) que queda sobre la superficie de la agalla, en contacto con el suelo. Los huevos eclosionarán de forma escalonada a medida que se den condiciones favorables, iniciando así un nuevo ciclo del patógeno (Doucet y Lax, 2005, en Bernardo, 2022).



**Figura 2:** Juvenil 4 de *Nacobbus aberrans*. Imagen propia.



**Figura 3:** Raíces de pimiento con agallas causadas por *Nacobbus aberrans*. Imagen propia.

Los síntomas observables en la parte aérea incluyen una reducción del crecimiento, clorosis, enrollado de los márgenes foliares y marchitez, y menor tamaño de frutos (Doucet y Lax, 2005; Garita et al., 2021; Lax et al., 2022). En el sistema radical, el principal síntoma visible es la presencia de agallas, producto de la hiperplasia e hipertrofia que induce el nematodo, dificultando la absorción de agua y nutrientes (N, P, K, Ca y Mg), lo que se traduce en pérdidas productivas que pueden alcanzar la totalidad del cultivo (Lax et al., 2013; Tordable et al., 2018).

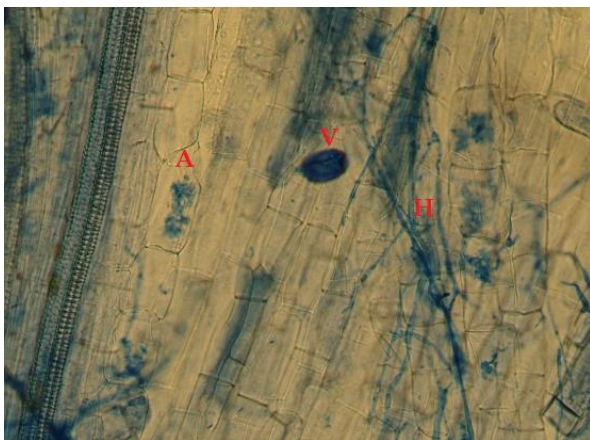
El control de esta plaga se basa en el uso de desinfectantes de suelo (i.e. bromuro de metilo) y otros nematicidas químicos. El uso del fumigante bromuro de metilo ( $\text{CH}_3\text{Br}$ ) se generalizó debido a su gran poder biocida y a la practicidad para su aplicación. De acuerdo con lo establecido en el protocolo de Montreal en 1987 y ratificado por Argentina en 1990, se acordó que este producto debía ser retirado del mercado en el año 2015 por ser un gas que contribuye a la destrucción de la capa de

ozono y tóxico para la salud humana (Adlercreutz et al., 2007, en Bernardo, 2022). El uso indiscriminado de este producto derivó en una presión de selección muy alta, y la suspensión de este fumigante trajo aparejada la reaparición de nematodos noduladores, entre otras plagas importantes para los cultivos del CHP (Bernardo, 2022). Actualmente, se trabaja en diseñar programas de bajo impacto ambiental, utilizando agentes de control biológico. El control biológico es un método eficiente, económico y no contaminante que consiste en la aplicación de microorganismos para regular la densidad poblacional de plagas y/o reducir el daño (Lax et al., 2022). Los mismos pueden actuar contra el patógeno de forma directa (como la antibiosis, competencia por los nutrientes o el espacio, etc.) o indirecta (como en la inducción de resistencia) (Poveda et al., 2020), estando solos, combinados o dentro de un programa de manejo integrado de plagas, y además utilizando dosis reducidas de agroquímicos. Los agentes de control biológico estudiados para controlar *Nacobbus aberrans* s.l. y *Nacobbus celatus* son bacterias, bacterias simbióticas, nematodos entomopatógenos, hongos micorrícicos, hongos nematófagos; sumándoles metabolitos bacterianos, aceites esenciales, extractos acuosos y fitohormonas (Lax et al., 2022); siendo de particular interés el estudio de los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) y los hongos saprótrofos (HS) por su respuesta ante la presencia del nematodo y la promoción del crecimiento vegetal en las plantas de pimiento.

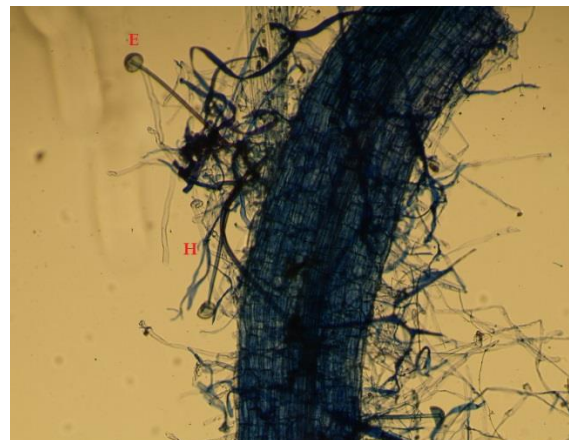
Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) pertenecen al gran grupo de las endomicorrizas, ya que las hifas de los hongos crecen tanto inter como intracelularmente en la raíz, es decir, por vía apoplástica y simplástica. Las micorrizas arbusculares, además, pertenecen al Phylum Glomeromycota (Redecker, 2002), y constituyen una parte esencial de los ecosistemas ya que forman simbiosis mutualistas con más del 95% de las plantas vasculares terrestres.

Los HMA son biótros obligados y colonizan las células radicales desarrollando estructuras típicas como vesículas y arbusculos (Figura 4). Las vesículas son formadas a partir de las hifas intra o intercelulares en la corteza radical y constituyen estructuras de reserva que contienen lípidos y una numerosa cantidad de núcleos (Barker et al., 1998). Por otro lado, las hifas penetran en las células ubicándose en el espacio periplasmático y se diferencian en estructuras terminales altamente ramificadas denominadas arbusculos. Los arbusculos constituyen el sitio donde se

realiza el intercambio bidireccional, a partir de transportadores específicos, de señales, nutrientes, agua y compuestos orgánicos entre los dos simbios (Smith y Read, 2008, en Bernardo, 2022). Los HMA por su parte dependen completamente de la planta hospedante para obtener los carbohidratos que requieren para su desarrollo (Quilambo, 2003; Sarabia Ochoa et al., 2010). Una parte de su ciclo de vida lo llevan a cabo en el suelo donde desarrollan esporas (Figura 5), las cuales germinan dando lugar a hifas que en su conjunto forman el micelio. El micelio cumple la función de explorar el perfil edáfico para absorber agua y nutrientes, y es capaz de interconectar plantas de diferentes especies y estadios de crecimiento (Smith y Read, 2008, en Bernardo, 2022).



**Figura 4:** Arbúsculo (A), vesícula (V) e hifas (H) de *Septoglomus deserticola* teñido con azul de Tripán en plantas de pimiento. Imagen tomada por Bernardo Valeria.



**Figura 5:** Espora germinada (E) e hifas (H) de *Septoglomus deserticola* teñido con azul de Tripán en plantas de pimiento. Imagen tomada por Bernardo Valeria.

La simbiosis estimula el crecimiento de la planta hospedadora, a través de la modificación física y/o química de la rizósfera, lo cual se traduce en una mayor disponibilidad de nutrientes, especialmente fósforo y zinc, y mayor tolerancia al estrés (Cantrell y Linderman, 2001; Gómez y Villate, 2010).

Los HMA pueden conferir tolerancia a patógenos a través de diferentes mecanismos de acción entre los que se encuentran el micoparasitismo, la lisis enzimática, la antibiosis, la competencia por espacio o por nutrientes, y la inducción de resistencia en la planta (Baum et al., 2015). También se ha investigado el efecto de los HMA sobre el incremento de la tolerancia de las plantas al estrés hídrico, salino, por deficiencia de nutrientes, exceso de metales pesados y sustancias fitotóxicas (Beltrano et al., 2013; Ruscitti et al., 2017; Bernardo et al., 2018).

*Septoglomus deserticola* (Trappe, Bloss y J.A. Menge) G.A. Silva, Oehl y Sieverd es el HMA usado en este trabajo, del cual se conoce muy poco sobre su interacción y simbiosis con especies hortícolas, como su posible mecanismo de acción contra patógenos, en especial contra nematodos. En este sentido, es de gran interés su estudio como posible promotor de crecimiento del pimiento y biocontrolador del nematodo *N. aberrans*.

Se sabe también que algunos hongos saprótrofos estimulan el crecimiento vegetal, al degradar la materia orgánica, participar en la formación del humus e intervenir en la dinámica de nutrientes. Respecto a esto último, pueden sintetizar y liberar al medio diferentes metabolitos como sideróforos o compuestos que actúan en la movilización del P, incrementando su disponibilidad para la absorción de la planta (Saparrat et al., 2020).

Los hongos del género *Pleurotus* pertenecen al orden Agaricales de la división Basidiomycota. Son hongos lignocelulolíticos que en ambientes naturales son encontrados creciendo en raíces, ramas y troncos, ya sean vivos o muertos, por lo que son considerados saprófitos o parásitos débiles (Martínez et al., 2005; Yildiz et al., 2002). Estos hongos son conocidos con el nombre de girgolas y tienen gran difusión por su uso culinario.

Las especies de este género crecen en un rango de temperaturas entre 15 y 31 °C y pueden colonizar sustratos como papel, cartón, residuos de la industria maderera, pajas y bagazos. Para la etapa de crecimiento miceliar requieren oscuridad y para la etapa de fructificación requieren iluminación con longitudes de onda corta (Sánchez, 1994, en Garita, 2020).

Mas allá de la relevancia ecológica por su capacidad de degradar materiales orgánicos, y su importancia culinaria por su alto valor nutricional, *Pleurotus spp.* produce importantes biomoléculas como lectinas, proteínas, enzimas y ácidos orgánicos, que resultan de interés por su actividad biológica (Papaspyridi et al., 2011). El material residual del sustrato sobre el que fructifica es un subproducto que puede tener diversas aplicaciones como abono orgánico para el sector hortícola y florícola, sustrato nematicida (debido a la capacidad de las hifas de producir toxinas), bactericida y para la biorremediación *in-situ* de agua y suelo contaminados con xenobióticos (Chang y Miles, 2004).

La mayoría de las especies del género *Pleurotus* son antagonistas de nematodos (Bernardo et al., 2023; Genier et al., 2015). Entre los mecanismos implicados en la actividad nematocida, el hongo descomponedor de madera *Pleurotus ostreatus* produce enzimas quitinasas y proteasas que actúan como toxinas nematocidas. La capacidad nematocida de estas toxinas y la expresión de los síntomas varía dependiendo de la cepa de hongo y del tiempo de exposición. *P. ostreatus* produce hifas vegetativas que generan una potente toxina: ácido trans-2 decenodioico (Kwok et al., 1992). Los nematodos en contacto con los exudados del hongo conteniendo las toxinas muestran una inmediata respuesta y se vuelven más o menos inmóviles. Estimuladas por productos excretados por el huésped inmóvil, algunas hifas direccionales convergen en los orificios del cuerpo del nematodo, lo colonizan y lo digieren (Barron y Thorn, 1987), utilizando su contenido como fuente de nitrógeno (Sierra Monroy, 2015).

Otro hongo ligninolítico de interés es el hongo modelo de la pudrición blanca, *Coriolopsis rigida* LPSC 232, perteneciente al Orden *Polyporales* y Phylum *Basidiomycota* (Hibbett et al., 2007), sin embargo, su posición taxonómica sigue en discusión.

La mayoría de los hongos de la podredumbre blanca degradan la lignina por medio de un sistema oxidativo inespecífico que incluye varias oxidorreductasas extracelulares, metabolitos de baja masa molecular y especies activas de oxígeno (Isikhuemhen y Mikiashvili, 2009; Mendonça et al., 2008; Saparrat et al., 2008, 2014). *C. rigida* 232 tiene solo dos lacasas extracelulares que aparentemente son los componentes principales y únicos de su maquinaria ligninolítica (Saparrat et al., 2002). Los principales estudios vinculados a *C. rigida* 232 se centran en su capacidad para degradar lignina, esteroides, así como varios contaminantes peligrosos como colorantes y fracciones alifáticas y aromáticas del petróleo crudo, incluidos los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Colombo et al., 1996, en Saparrat et al., 2014). Sin embargo, se ha registrado que puede formar parte de relaciones tritróficas, con diversos hongos micorrízicos y plantas; por ejemplo con *Glomus deserticola* y *Eucalyptus globulus*, *Glomus deserticola* y alfalfa y tomate, *Gigaspora rosea* y *Quillaja saponaria* Mol, *Glomus intraradices* y arándano; registrando aumentos de peso seco, mayor tamaño de plantas y en ciertos ensayos tolerancia de las plantas a Cu y Zn (Saparrat et al., 2014). A pesar de que se ha sugerido que la mejora en el crecimiento vegetal por la actividad de estos hongos saprotrofos es debida a la producción de

metabolitos promotores del crecimiento vegetal o cambios en la regulación génica, todavía se desconocen los mecanismos implicados y las bases fisiológicas de dichas interacciones (Saparrat et al., 2014).

En un contexto de necesidad por aumentar la productividad de los cultivos y disminuir el uso de agroquímicos, el empleo de microorganismos benéficos adquiere gran importancia, especialmente si pueden usarse sustratos gastados derivados de otras producciones de modo de favorecer una economía circular.

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, el estudio de las interacciones entre los HMA y HS, y sus mecanismos de acción, permitirá incorporarlos como bioinsumos, ya sea para la promoción del crecimiento vegetal, como en programas de control de nematodos fitoparásitos; como una alternativa sustentable que podría contribuir a la generación de biofertilizantes y nematicidas más inocuos y disponibles para los productores hortícolas de la zona.

## **HIPÓTESIS**

1. Los hongos micorrícicos arbusculares y hongos saprótrofos, aplicados como bioinsumos, actúan en la promoción del crecimiento vegetal sobre plantas de pimiento.
2. La presencia del nematodo *Nacobbus aberrans* en el suelo afecta el crecimiento de las plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivadas bajo cubierta.
3. La asociación con hongos micorrícicos arbusculares y hongos saprótrofos morigera la actividad fitopatógena de *N. aberrans*, mitigando los daños provocados sobre plantas de pimiento.

## **OBJETIVO GENERAL**

Comprobar el efecto de diferentes hongos benéficos y su sinergismo en el crecimiento de plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) y en la reducción de la población de *Nacobbus aberrans*, para mantenerla por debajo del umbral de daño económico en el cultivo de estas plantas.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar las respuestas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que produce la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares y hongos saprótrofos solos o combinados, en plantas de pimiento afectadas por *N. aberrans*.
2. Cuantificar la multiplicación y el daño de *N. aberrans* en raíces de pimiento inoculadas y no inoculadas con microorganismos benéficos.
3. Evaluar la actividad de la co-inoculación de los hongos micorrícicos arbusculares y saprótrofos bajo estudio, en la promoción del crecimiento y la protección vegetal utilizando plantines de pimiento como modelo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en un invernáculo del Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE) perteneciente al CONICET y UNLP, bajo condiciones semicontroladas, con iluminación natural y control de temperatura por ventilación forzada.

Se utilizaron semillas de pimiento variedad "Fyuco", las cuales se sembraron en speedlings plásticos, previa desinfección con NaOCl (10 %) durante 5 minutos. Para la siembra se utilizó como sustrato una mezcla de perlita:vermiculita (1:1 v/v), previamente autoclavada; en este momento se inoculó con el HMA. Las bandejas fueron mantenidas en cámara de cultivo durante treinta días hasta el trasplante. El mismo se realizó a macetas de 800 ml conteniendo una mezcla de tierra y arena (1:1 v/v) tinalizada durante tres días consecutivos. Tanto la inoculación con nematodos como la de los hongos saprótrofos, se realizó al momento del trasplante, en forma individual y combinada.

### ***Preparación del inóculo con el hongo micorrícico arbuscular***

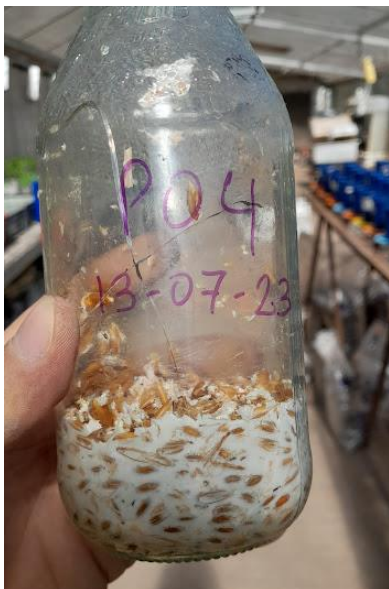
Se utilizó el hongo micorrícico *Septoglomus deserticola* (Trappe, Bloss y J.A. Menge) G.A. Silva, Oehl y Sieverd (colección del Instituto Carlos Spegazzini (UNLP). La multiplicación se realizó con trébol blanco (*Trifolium repens* L.) y lotus (*Lotus tenuis* L.), como plantas trampa en cámara de cultivo con condiciones controladas de luz y

temperatura, que se cultivaron en un sustrato compuesto por perlita-vermiculita-arena (1:1:1 v/v), previamente tinalizado (100°C durante 1 hora por día, tres días consecutivos). Las plantas se mantuvieron en cámaras de crecimiento (25 ±2 °C, fotoperíodo de 16 horas y 350 μmoles. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup> de irradiancia) durante 90 días. Al cabo de ese tiempo, las plantas se dejaron secar para luego eliminar la parte aérea. Las raíces se cortaron en fragmentos pequeños en forma homogénea con el sustrato, constituyendo el inóculo, una mezcla de sustrato, hifas, esporas y fragmentos de raíces de trébol y lotus micorrizadas en un 90%, con una densidad de 60 esporas.g<sup>-1</sup> de sustrato.

Las plantas que se utilizaron en el ensayo se inocularon a la siembra con 30% v/v de este inóculo.

### **Preparación del inóculo con los hongos saprótrofos**

Se utilizó una cepa de *Pleurotus ostreatus* (PO4), proveniente del Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles y Medicinales (LBHCyM) del Centro de Recursos Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS-CONICET), y una cepa de *Corioloopsis rigida* (232) proveniente del Instituto Carlos Spegazzini (UNLP). Para la



multiplicación del inóculo se repicaron los hongos en cajas de Petri con medio de cultivo agar papa glucosado (APG) 1,5%, pH 6. Se incubaron en oscuridad a 28-30°C aproximadamente durante 7-10 días hasta que el medio de cultivo se observó completamente colonizado. Luego ese medio se utilizó para inocular botellas de vidrio con sustrato constituido por semillas de avena previamente autoclavadas (Figura 6) (Chang y Miles, 2004). La incubación de los cultivos bajo condiciones de fermentación en estado sólido se realizó en cámara de cultivo a 28°C y en oscuridad (Inalbon et al., 2015).

**Figura 6:** Botella de vidrio con semillas de avena colonizadas por el micelio de *Pleurotus ostreatus*. Imagen propia.



### **Preparación del inóculo de *Nacobbus aberrans***

Se utilizó un aislado de *N. aberrans* obtenido de la localidad de Los Hornos, La Plata, a partir de plantas de tomate infectadas, sabiendo que este aislado es capaz de reproducirse también en pimiento (Lax et al., 2011). Para la preparación del inóculo se utilizó el método de flotación de Coolen (1979), siguiendo esta metodología se extrajeron los huevos procesando las raíces con una mezcla de agua e NaOCl (1 %) en una licuadora durante 1 minuto a máxima velocidad, posteriormente se tamizó (poro de 37 µm) y se centrifugó con caolín y sacarosa. Se retiró el sobrenadante donde se encuentran los huevos y se enjuagaron con agua. La suspensión obtenida de huevos en agua se incubó en oscuridad, a 25 °C y por 72hs para producir la eclosión de los mismos. Luego la suspensión se pasó por embudos Baermann dónde el filtro permite el paso de los juveniles vivos. Finalmente fueron recolectados y cuantificados por observación microscópica para la inoculación de las plantas.

Como se mencionó anteriormente la inoculación se realizó al momento del trasplante, con una concentración de 200 juveniles por maceta, realizando un orificio de 2 cm de profundidad en el sustrato, próximo a la plántula. La aplicación de la suspensión de juveniles (J2) se realizó con el uso de una micropipeta.

### **Tratamientos realizados**

El ensayo tuvo un diseño completamente al azar con 6 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos fueron:

Sin nematodos (SN):

- Control, no inoculado con hongos (C)
- Inoculado con *S. deserticola* (SD)
- Inoculado con *P. ostreatus* (PO4)
- Inoculado con *C. rigida* (CR)
- Inoculado con *S. deserticola* y *P. ostreatus* (SDPO4)
- Inoculado con *S. deserticola* y *C. rigida* (SDCR)

Inoculado con *N. aberrans* (CN):

- Control, no inoculado con hongos (C)
- Inoculado con *S. deserticola* (SD)
- Inoculado con *P. ostreatus* (PO4)
- Inoculado con *C. rigida* (CR)
- Inoculado con *S. deserticola* y *P. ostreatus* (SDPO4)
- Inoculado con *S. deserticola* y *C. rigida* (SDCR)

### **Parámetros evaluados**

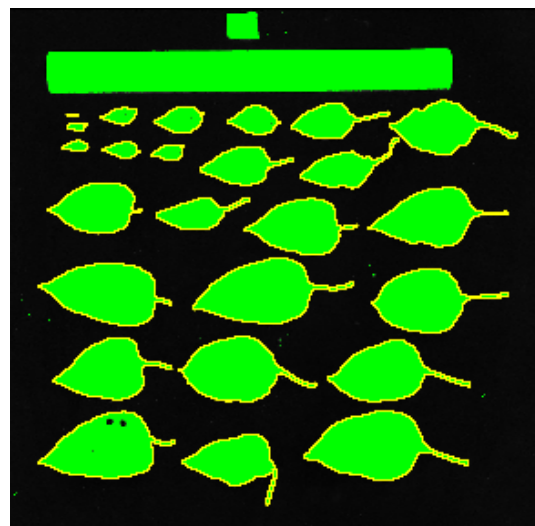
Una vez finalizado el ensayo, 60 días después del trasplante, se tomaron muestras de la parte aérea y de la raíz para determinar los siguientes parámetros:

#### ➤ **Área foliar**

Para la determinación del área foliar, se tomaron fotografías de las hojas de cada una de las plantas de pimiento (Figura 7). Posteriormente se utilizó el programa ImageJ (Figura 8) para seleccionar la superficie correspondiente a cada hoja y obtener por sumatoria el área foliar de cada planta.



**Figura 7:** Fotografía de la planta N° 20, correspondiente al tratamiento inoculado con *Septoglomus deserticola* y *Nacobbus aberrans*.



**Figura 8:** Fotografía de la planta N° 20, procesada con el programa ImageJ. Se observa en amarillo el contorneado de cada hoja.

➤ **Número de huevos del nematodo extraídos de las raíces mediante el método de Hussey y Barker (1973).**

El objetivo de esta técnica es extraer y disolver las masas de huevos que se encuentran en las raíces. Para ello las raíces se cortaron con tijera en segmentos de 10 cm de largo y se las colocó en una licuadora. Se agregó una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% hasta cubrir la totalidad de las raíces y se licuó a la velocidad máxima durante un minuto (Figura 9). Se vertió la suspensión sobre dos tamices superpuestos, colocando en la parte superior el tamiz de 150 µm de apertura de malla y en la inferior, el de 37µm (Figura 10). Se enjuagó el tamiz inferior y se recolectó el material donde se encontraban los huevos. Esta técnica se combinó con la técnica de centrifugación – flotación de Coolen (1979) para clarificar la suspensión y facilitar el recuento de huevos con el microscopio óptico.



**Figura 9:** Licuadora en funcionamiento procesando la raíz de una planta de pimiento. Imagen propia.



**Figura 10:** Tamiz con apertura de malla de 37µm con raíces procesadas. Imagen propia.

➤ **Factor de reproducción del nematodo (Oostenbrink, 1966).**

Se calculó en base a la siguiente fórmula:

$$Fr = \frac{Pf}{Pi}$$

Donde: *Fr*: Factor de reproducción, *Pf*: Población final, *Pi*: Población inicial inoculada.

Siendo que plantas con  $Fr = 1$  son consideradas inmunes; con  $Fr < 1$  resistentes; y  $Fr > 1$  susceptibles.

➤ **Peso fresco y seco aéreo y de raíz:**

Se determinó el peso seco aéreo y de raíz, luego de secar el material en estufa a 80°C hasta peso constante (Figura 11).



**Figura 11:** Balanza de precisión para la determinación del peso seco. Imagen propia.

➤ **Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos según el método de Wellburn (1994).**

El contenido de clorofila y carotenoides se determinó a partir de un disco de hoja de 1 cm de diámetro (Figura 12). Se utilizó N, N-Dimetilformamida como solvente de extracción, determinando la absorbancia de la solución a las longitudes de onda 647, 664 y 480 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160 A. El cálculo del contenido de pigmentos se realizó de acuerdo a Wellburn, (1994) con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) = 12 \times \text{Ab}_{663,8} - 3,11 \times \text{Ab}_{646,8}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) = 20,78 \times \text{Ab}_{646,8} - 4,88 \times \text{Ab}_{663,8}$$

$$C \text{ total a + b } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) = 17,67 \times \text{Ab646,8} + 7,12 \times \text{Ab663,8}$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) = (1000 \times \text{Ab480} - 1,12 \text{ Ca} - 34,07 \text{ Cb}) / 245$$



**Figura 12:** Gradillas con tubos Eppendorf de cada una de las muestras analizadas. Imagen propia.

➤ **Determinación del contenido de proteínas solubles mediante el método de Bradford (1976).**

El contenido de proteínas solubles se determinó a partir de 100 mg de la última hoja completamente expandida, de acuerdo al método de Bradford (1976). Los tejidos se homogeneizaron en un mortero (Figura 13) con 1 ml del buffer de extracción (TRIS 50 mM, EDTA 1mM, PVPP insoluble 1%, MeSH 0,1% a pH 7,5) a 4°C (Figura 14). El homogeneizado resultante se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C. Se tomaron 100 µl del sobrenadante y se le agregó 5 ml del reactivo Azul Brillante de Coomassie, se agitó en vórtex y se leyó la absorbancia a 595 nm. El cálculo de la concentración de proteínas se efectuó empleando una curva patrón preparada con distintas concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA, SiFMa Chemical Co).



**Figura 13:** Mortero con homogeneizado de una muestra de hoja de pimiento. Imagen propia.



**Figura 14:** Mesada de trabajo. Se aprecia el mortero, gradilla, tubos Eppendorf con material vegetal en recipientes con hielo, micropipeta y buffer de extracción. Imagen propia.

➤ **Determinación del contenido de prolina mediante el método de Bates et al. (1973).**

Para la determinación de prolina se homogeneizaron 100 mg de material fresco de hoja y de raíz con 2 ml de una solución acuosa al 3% de ácido sulfosalicílico. El homogeneizado se centrifugó a 12000 g por 15 minutos y se tomó 1 ml del extracto obtenido. Se lo hizo reaccionar con 1 ml del reactivo Ninhydrina ácida y 1 ml de ácido acético glacial en un tubo de 15 ml, en baño maría a 100 °C durante una hora. Al cabo de ese lapso la reacción se interrumpió enfriando el tubo rápidamente. A la mezcla reaccionante anterior se le agregó 2 ml de tolueno y se agitó durante 15 a 20 segundos en vórtex. Se dejaron separar las fases y se tomó la fase acuosa conteniendo el cromóforo tolueno-prolina y se leyó la absorbancia a 520 nm usando tolueno como blanco.

Se calculó el contenido de prolina por unidad de peso fresco según:

$$\mu\text{mol prolina} / g PF = \left( \frac{\mu\text{g prolina/ml} \times \text{ml tolueno}}{115,5 \mu\text{g}/\mu\text{moles}} \right) / \left( \frac{g PF}{5} \right)$$

➤ **Contenido de compuestos fenólicos totales por el método de Singleton y Rossi (1965), con modificaciones.**

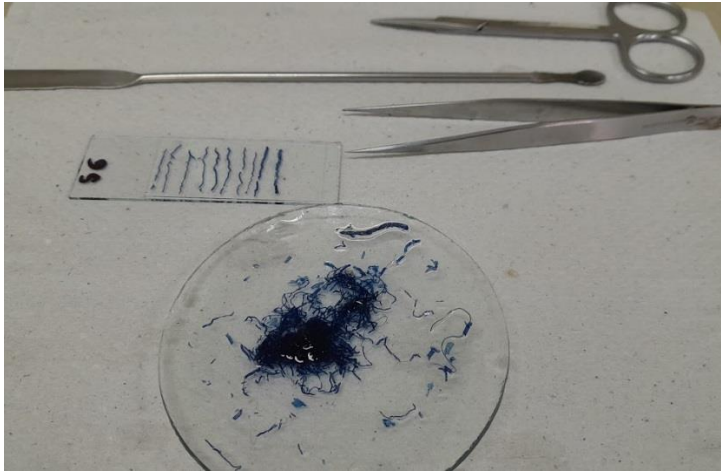
Se determinó por el método colorimétrico que emplea el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se homogeneizaron 500 mg de tejido foliar fresco en etanol. La mezcla se agitó y se centrifugó a 10.000 x g durante 15 min a 4 °C. Se tomó una alícuota de la

muestra y se mezcló con agua destilada y el reactivo de Folin 1 N. Luego de 3 min a 25 °C se agregó la solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 % (p/v) en NaOH 0,1 N. Se incubó durante 90 minutos a 25 °C y se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro. Se realizó una curva patrón en base a distintas concentraciones de ácido gálico. Las lecturas de absorbancia se efectuaron a 760 nm y los resultados finales se expresaron como µg. mg<sup>-1</sup> de tejido fresco.

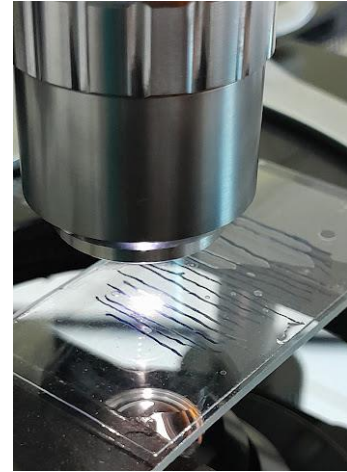
➤ **Presencia de hongos micorrícicos mediante la tinción de las raíces por el método de Phillips y Hayman, (1970) y porcentaje de micorrización o colonización micorrícica por el método de Trouvelot et al. (1986).**

Las raíces se aclararon con KOH al 10% (p/v) (10 minutos, 100 °C). Luego se lavaron tres veces con agua destilada y se aplicó una solución de HCl 0,1N (5 minutos a temperatura ambiente). Finalmente se tiñeron con azul de Tripán (5 minutos a 95°C). El colorante tiñe de color azul las estructuras del hongo que contienen quitina, principal componente de las paredes celulares de los HMA. Luego las raíces se conservaron en una solución de lacto-glicerol.

Para su observación y posterior cuantificación, los fragmentos de raíces teñidas, de aproximadamente 1cm de longitud, se montaron en portaobjetos añadiendo gotas de ácido láctico (Figura 15) y se cubrieron con un cubreobjeto observándose al microscopio óptico (Figura 16). Se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento, analizando 30 fragmentos de raíces por planta. De cada muestra se observó la presencia de campos negativos (sin presencia de estructuras fúngicas) y positivos (con presencia de estructuras fúngicas). En los campos positivos se tuvo en cuenta el tipo de estructuras (arbúsculos, vesículas, hifas) presentes dentro de la raíz. El porcentaje de micorrización (M%) se calculó como la proporción de raíces infectadas sobre el número total de fragmentos de raíz analizados.



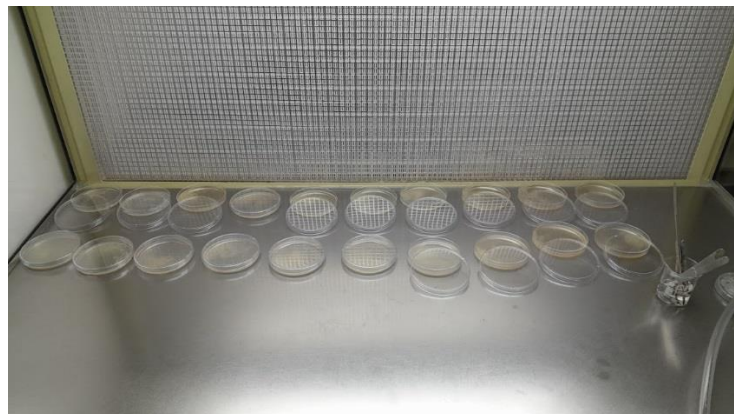
**Figura 15:** Selección de raíces de pimiento teñidas con azul de Tripán. Imagen propia.



**Figura 16:** Portaobjetos sobre el microscopio óptico listo para observar las raíces. Imagen propia.

### ➤ **Persistencia de hongos en el suelo**

Una vez finalizado el ensayo, se realizó un muestreo del suelo para observar la persistencia de los hongos. Para ello se tomaron muestras de 100 gr de las macetas. De cada muestra se tomó un gramo de suelo y se colocó en tubos Falcon de 10 ml. Las muestras se lavaron 10 veces con agua destilada. El suelo lavado se colocó en cajas de Petri con papel filtro y se llevó a estufa por 24 hs. Una vez seco, se colocaron cinco partículas de suelo en cajas de Petri con medio de cultivo agar papa glucosado con 1 ml de solución de antibiótico (cloranfenicol 1 gr + estreptomicina 0,5 gr en 200 ml de agua destilada) (Figura 17). Se prepararon 3 muestras por tratamiento y 10 repeticiones por muestra. Se dejaron incubar por 7 días en oscuridad a 28°C para luego observar la formación de colonias.





**Figura 17:** Cajas de Petri en el flujo laminar, listas para ser inoculadas. Imagen propia.

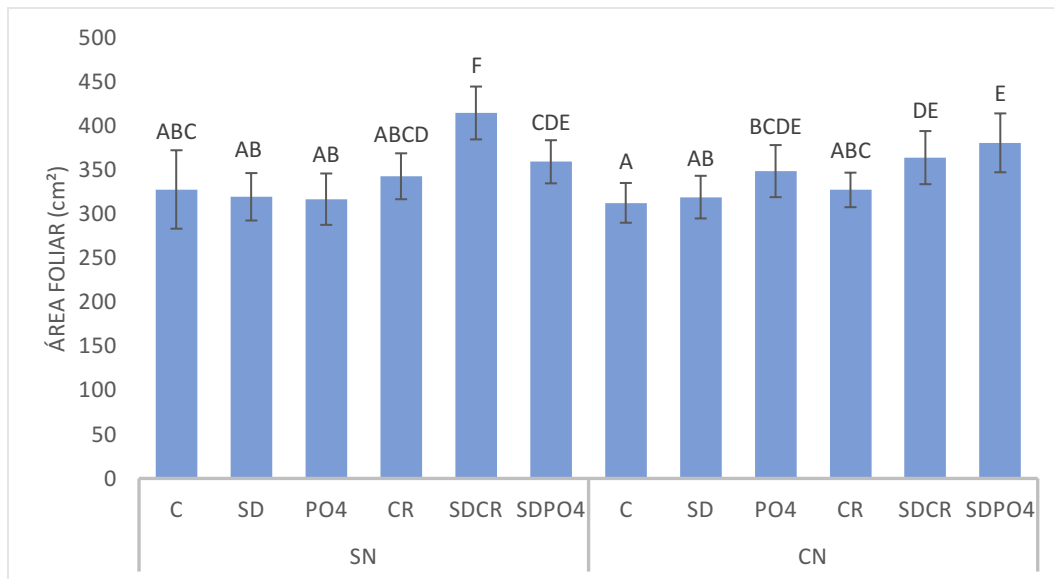
### ***Diseño experimental***

El ensayo se realizó siguiendo un diseño experimental completamente aleatorizado, con 6 repeticiones. Los datos se analizaron por ANOVA y las medias se compararon usando LSD ( $P < 0,05$ ). Para analizar las interacciones se siguió un diseño factorial 2k y se analizó con el programa InfoStat 2020.

## **RESULTADOS**

### **➤ Área Foliar**

En ausencia del nematodo, la presencia de *S. deserticola* combinado con *C. rigida* y *P. ostreatus* aumentó de manera significativa el área foliar de las plantas de pimiento respecto al control (Figura 18), siendo la primera combinación la de mayor valor; mientras que no se observaron diferencias entre el testigo y los tratamientos con *S. deserticola*, *P. ostreatus* y *C. rigida* inoculados de forma individual. Con respecto a los tratamientos infectados con nematodos se observó la misma tendencia, las combinaciones del hongo micorrícico con los saprótrofos presentaron los mayores valores de área foliar de manera significativa.



**Figura 18:** Área foliar. Tratamiento control (C), e inoculados con *Septogloium deserticola* (SD), *Pleurotus ostreatus* (PO4), *Corioloopsis rigida* (CR); y combinaciones entre *Septogloium deserticola* y *Corioloopsis rigida* (SDCR), y *Septogloium deserticola* y *Pleurotus ostreatus* (SDPO4), sin (SN) y con (CN) *Nacobbus aberrans*. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas según el test LSD de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

➤ **Número de huevos de nematodos extraídos de las raíces mediante el método de Hussey y Barker (1973) y factor de reproducción del nematodo (Oostenbrink, 1966).**

Todos los tratamientos disminuyeron de manera significativa el número de huevos de nematodos por gramo de raíz (Tabla 1). Las menores reducciones se obtuvieron con la inoculación de *C. rigida* y *P. ostreatus*, mientras que con la incorporación de *S. deserticola* sólo o combinado con los otros microorganismos, las reducciones fueron mucho mayores. En cuanto al factor de reproducción, todos los tratamientos son susceptibles al nematodo, teniendo un mejor comportamiento los inoculados con *S. deserticola* sólo y combinado con los demás hongos; así mismo, *P. ostreatus* también disminuyó significativamente dicho parámetro.

**Tabla 1:** Número de huevos por cada gramo de raíz y factor de reproducción (FR) para cada uno de los tratamientos evaluados. Tratamiento control (C), e inoculados con *Septogloium deserticola* (SD), *Pleurotus ostreatus* (PO4), *Corioloopsis rigida* (CR); y combinaciones entre *Septogloium deserticola* y *Corioloopsis rigida* (SDCR), y *Septogloium deserticola* y *Pleurotus ostreatus* (SDPO4), sin (SN) y con (CN) *Nacobbus aberrans*.

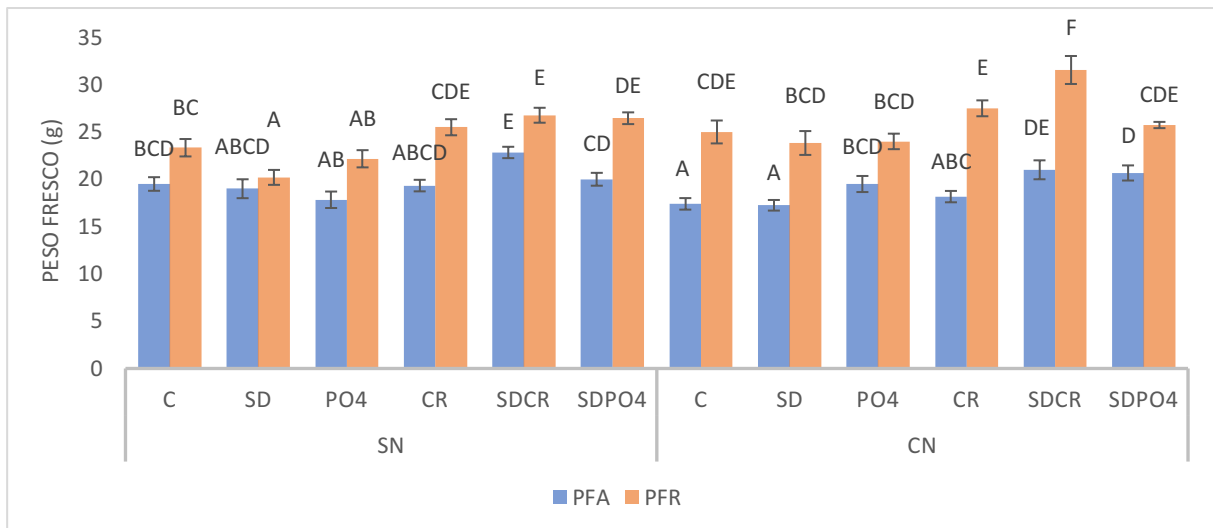
Tratamiento	Huevos/gr raíz	FR
C CN	133,7 A	20,5 A
SD CN	16,1 D	6,8 C
CR CN	74,1 B	12,9 B
PO4 CN	48,2 C	7,7 C
SDCR CN	24,7 D	6,8 C
SDPO4 CN	18,8 D	4,7 C

Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas según LSD de Fisher ( $p < 0,05$ )

### ➤ **Peso fresco y seco aéreo y de raíz**

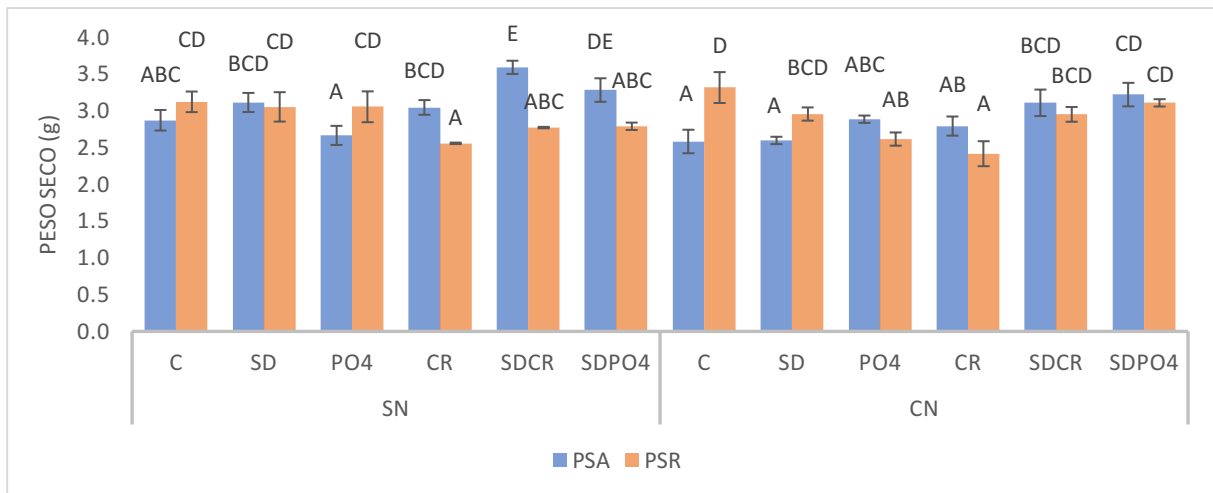
Al evaluar el peso fresco aéreo (Figura 19) no se observaron mayores diferencias entre los tratamientos sin nematodos, salvo en la combinación de *S. deserticola* con *C. rigida*. Los tratamientos con nematodos siguen la misma tendencia, los mayores pesos fueron obtenidos en los tratamientos inoculados con el hongo micorrícico en combinación con *C. rigida* y *P. ostreatus*.

En cuanto al peso fresco radical (Figura 19), tanto con y sin nematodos la tendencia observada es similar a lo anteriormente descrito de parte aérea. En ambos casos los mayores pesos se observan cuando se combina a *S. deserticola* con *C. rigida* y *P. ostreatus*, así mismo las plantas inoculadas con *C. rigida*, con y sin nemátodos, igualmente mostraron valores de peso superiores a los respectivos testigos, siendo el hongo que presentó el mejor comportamiento al ser inoculado en forma individual, en este parámetro. Por otro lado, todos los tratamientos con nematodos superaron a su análogo sin nematodos.



**Figura 19:** Peso fresco aéreo y peso fresco radical. Tratamiento control (C), e inoculados con *Septoglo mus deserticola* (SD), *Pleurotus ostreatus* (PO4), *Coriolopsis rigida* (CR); y combinaciones entre *Septoglo mus deserticola* y *Coriolopsis rigida* (SDCR), y *Septoglo mus deserticola* y *Pleurotus ostreatus* (SDPO4), sin (SN) y con (CN) *Nacobbus aberrans*. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas según el test LSD de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

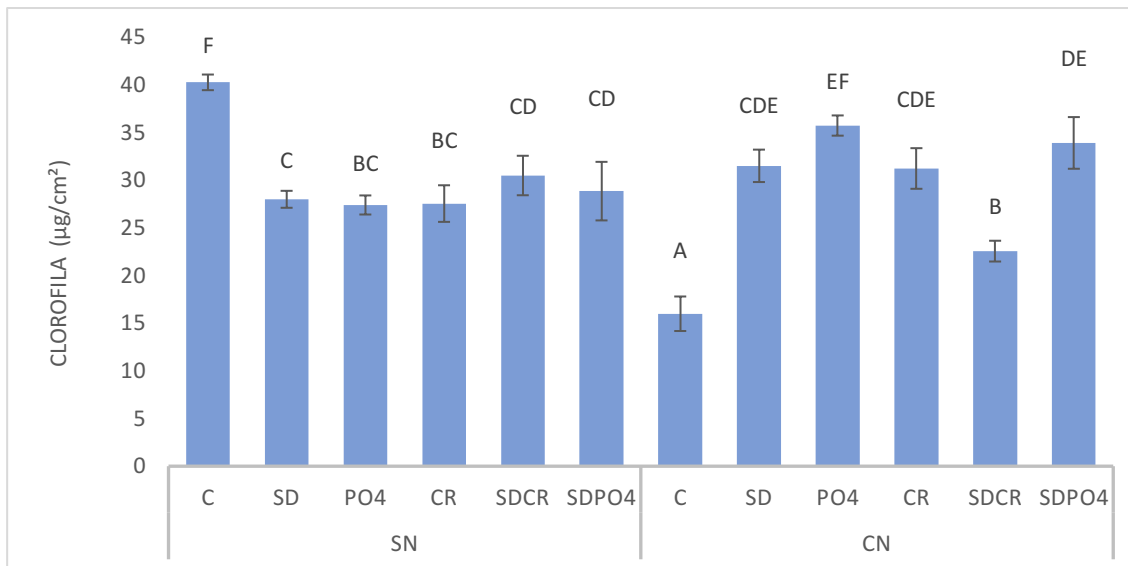
Los mayores valores de peso seco aéreo, tanto con y sin nematodos, fueron los obtenidos de los tratamientos con *S. deserticola* junto con *C. rigida* y *P. ostreatus* (Figura 20). El resto de los tratamientos no mostraron diferencias significativas. En el peso seco de las raíces (Figura 20) sin nematodos, se observó una reducción en los tratamientos CR, SDCR y SDPO4, mientras que con *S. deserticola* y *P. ostreatus* no presentaron diferencias significativas con el testigo. Con nematodos la situación es diferente, a pesar que el mayor peso sigue siendo el tratamiento control, a él le siguen las combinaciones de microorganismos SDCR y SDPO4, y presentaron menores valores los hongos inoculados individualmente.



**Figura 20:** Peso seco aéreo y peso seco radical. Tratamiento control (C), e inoculados con *Septogloium deserticola* (SD), *Pleurotus ostreatus* (PO4), *Corioloopsis rigida* (CR); y combinaciones entre *Septogloium deserticola* y *Corioloopsis rigida* (SDCR), y *Septogloium deserticola* y *Pleurotus ostreatus* (SDPO4), sin (SN) y con (CN) *Nacobbus aberrans*. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas según el test LSD de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

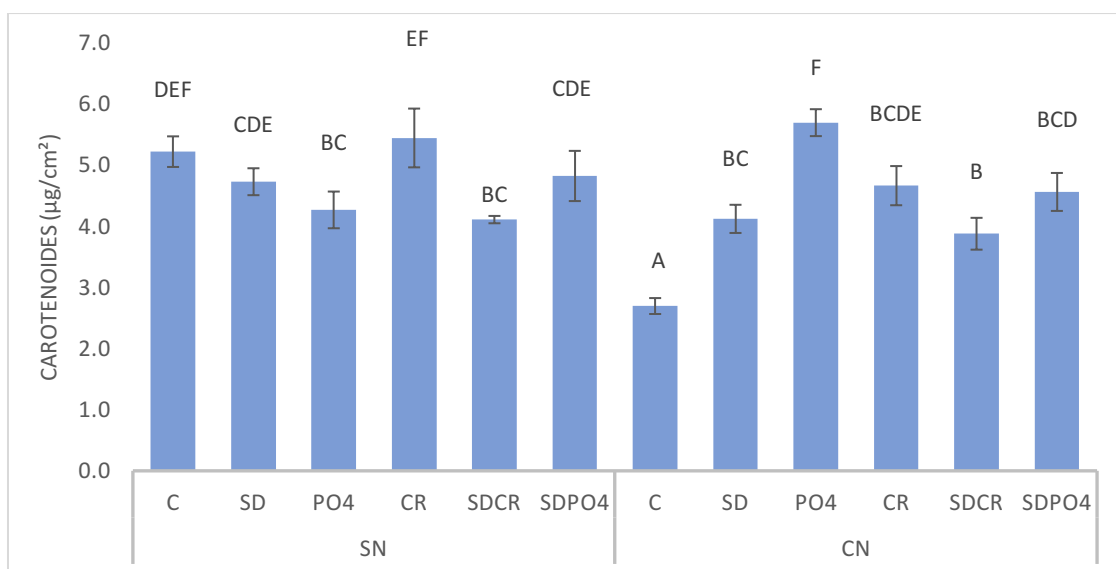
➤ **Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos según el método de Wellburn (1994)**

En ausencia de nematodos, el tratamiento control presentó el mayor contenido de clorofila, además se observaron (Figura 21) dos grupos de resultados, cuando los hongos fueron inoculados individualmente presentaron menores valores de clorofila, y sin diferencia significativa entre ellos, en comparación con el otro grupo de resultados correspondiente a la inoculación combinada entre ellos. En presencia de nematodos, el valor de clorofila más bajo se registró en el control y se observó un aumento significativo en todos los tratamientos inoculados con microorganismos respecto al control, siendo el mayor valor el correspondiente al tratamiento inoculado con PO4.



**Figura 21:** Contenido de clorofila. Tratamiento control (C), e inoculados con *Septogloium deserticola* (SD), *Pleurotus ostreatus* (PO4), *Corioloipsis rigida* (CR); y combinaciones entre *Septogloium deserticola* y *Corioloipsis rigida* (SDCR), y *Septogloium deserticola* y *Pleurotus ostreatus* (SDPO4), sin (SN) y con (CN) *Nacobbus aberrans*. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas según el test LSD de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

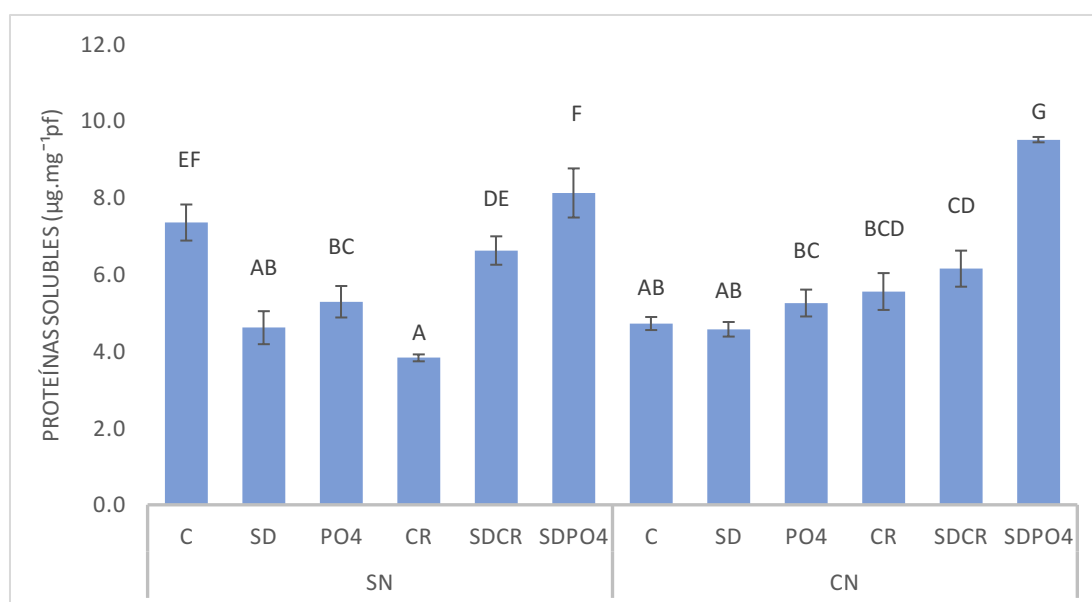
La concentración de carotenoides en hoja (Figura 22) aumentó con la inoculación de *Corioloipsis rigida*, mientras que en los tratamientos PO4 y SDCR la concentración disminuyó significativamente respecto al control. Con la inoculación de nematodos, todos los tratamientos presentaron concentraciones mayores al testigo, y se destacó el inoculado con PO4 quien obtuvo la mayor concentración de carotenoides.



**Figura 22:** Contenido de carotenoides. Tratamiento control (C), e inoculados con *Septoglossum deserticola* (SD), *Pleurotus ostreatus* (PO4), *Corioloipsis rigida* (CR); y combinaciones entre *Septoglossum deserticola* y *Corioloipsis rigida* (SDCR), y *Septoglossum deserticola* y *Pleurotus ostreatus* (SDPO4), sin (SN) y con (CN) *Nacobbus aberrans*. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas según el test LSD de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

➤ **Determinación del contenido de proteínas solubles mediante el método de Bradford, (1976)**

Los tratamientos sin nematodos SDCR y SDPO4 no obtuvieron diferencias significativas con el testigo en cuanto al contenido de proteínas solubles (Figura 23), sin embargo, las plantas de pimiento inoculadas individualmente con *Septoglossum deserticola*, *Pleurotus ostreatus* y *Corioloipsis rigida* redujeron significativamente su concentración. En presencia de nematodos, la concentración de proteínas solubles de los distintos tratamientos es igual o superior al tratamiento testigo, siendo SDPO4 el tratamiento que se destaca por sobre el resto con la mayor concentración.

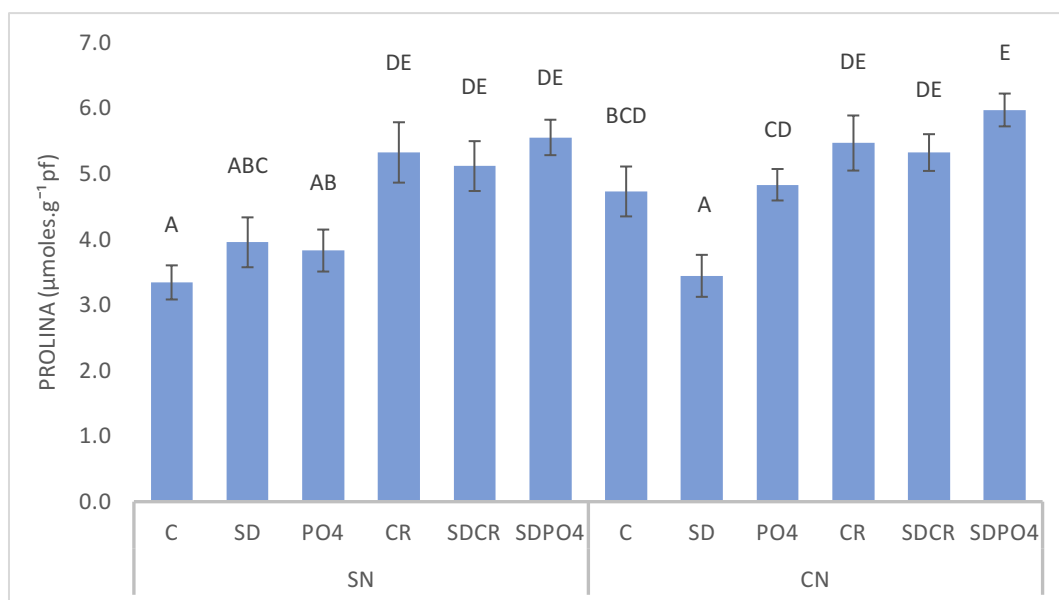


**Figura 23:** Contenido de proteínas solubles. Tratamiento control (C), e inoculados con *Septoglossum deserticola* (SD), *Pleurotus ostreatus* (PO4), *Corioloipsis rigida* (CR); y combinaciones entre *Septoglossum deserticola* y *Corioloipsis rigida* (SDCR), y *Septoglossum deserticola* y *Pleurotus ostreatus* (SDPO4), sin (SN) y con (CN) *Nacobbus aberrans*. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas según el test LSD de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

➤ **Determinación del contenido de prolina mediante el método de Bates et al. (1973)**

La concentración de prolina en hoja se incrementó respecto al control en todos los tratamientos sin nematodos (Figura 24), siendo significativo el aumento en los

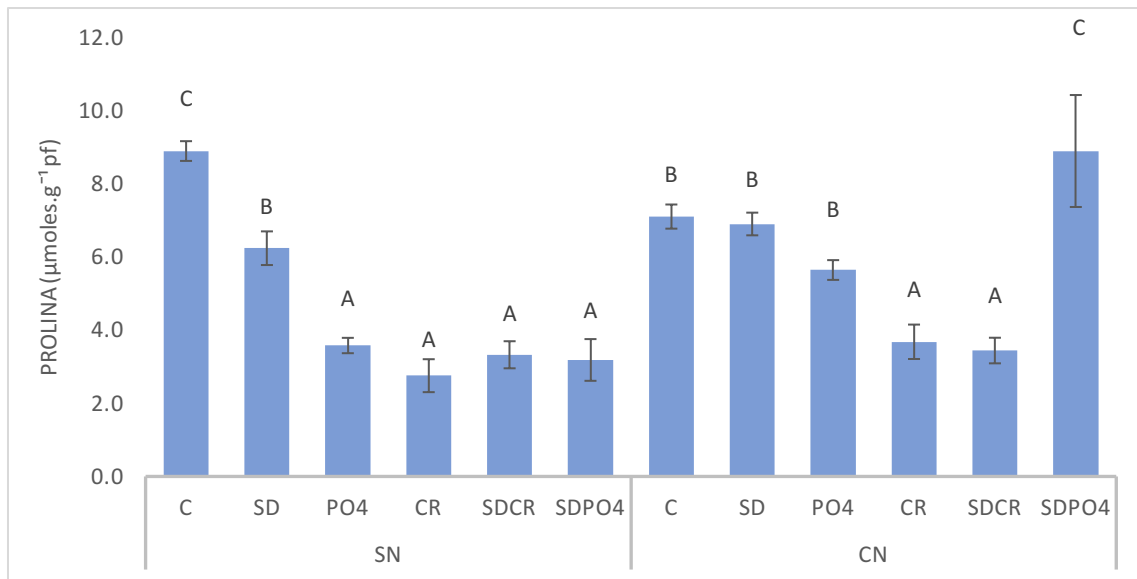
tratamientos CR, SDCR y SDPO4. En cuanto a los tratamientos con nematodos, se observó la misma tendencia, aunque sólo fue significativo el aumento en el tratamiento SDPO4. *Septogloium deserticola* inoculado individualmente presentó una reducción significativa de la concentración de dicho aminoácido, mientras que al ser inoculado junto a *Corioloipsis rigida* y *Pleurotus ostreatus* los valores superaron al testigo.



**Figura 24:** Contenido de prolina en hoja. Tratamiento control (C), e inoculados con *Septogloium deserticola* (SD), *Pleurotus ostreatus* (PO4), *Corioloipsis rigida* (CR); y combinaciones entre *Septogloium deserticola* y *Corioloipsis rigida* (SDCR), y *Septogloium deserticola* y *Pleurotus ostreatus* (SDPO4), sin (SN) y con (CN) *Nacobbus aberrans*. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas según el test LSD de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

En todos los tratamientos sin *Nacobbus aberrans* se redujo significativamente la concentración de prolina en las raíces de pimiento (Figura 25), las mayores reducciones se observaron en los tratamientos PO4, CR, SDCR y SDPO4. Los tratamientos con nematodos siguieron la misma tendencia excepto SDPO4, donde se observó un incremento significativo por encima del tratamiento testigo.

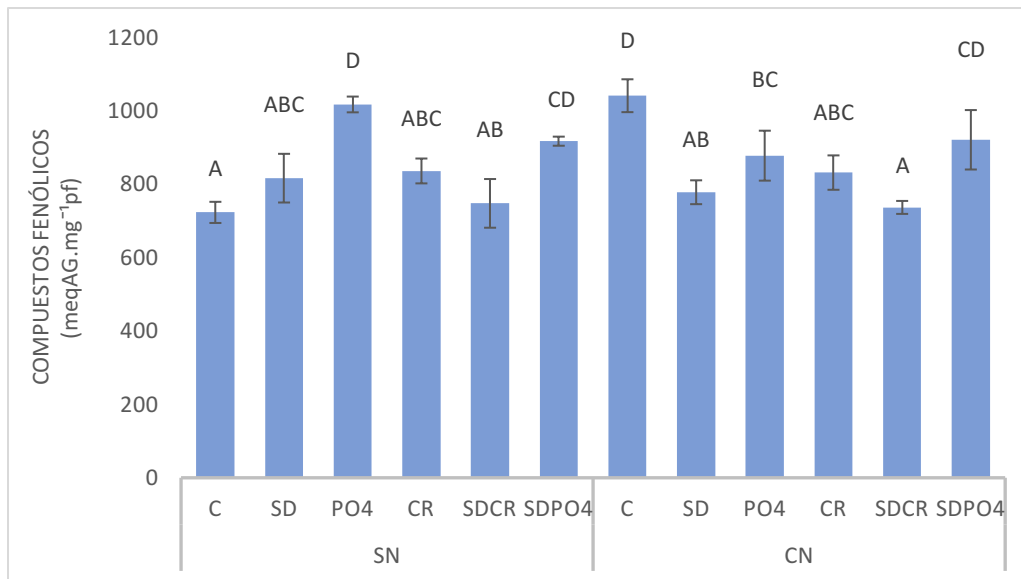




**Figura 25:** Contenido de prolina en raíz. Tratamiento control (C), e inoculados con *Septogloium deserticola* (SD), *Pleurotus ostreatus* (PO4), *Corioloopsis rigida* (CR); y combinaciones entre *Septogloium deserticola* y *Corioloopsis rigida* (SDCR), y *Septogloium deserticola* y *Pleurotus ostreatus* (SDPO4), sin (SN) y con (CN) *Nacobbus aberrans*. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas según el test LSD de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

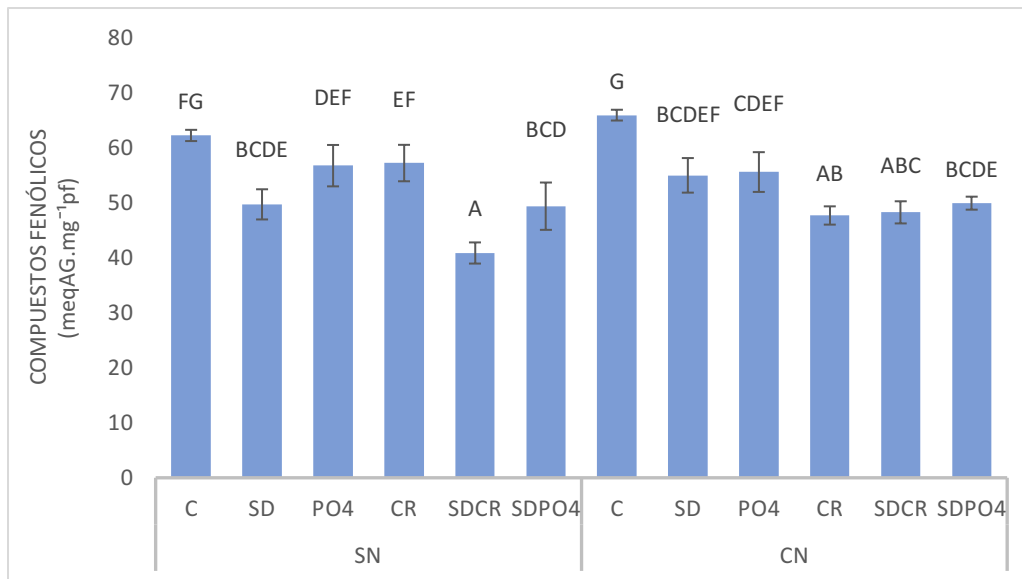
➤ **Contenido de compuestos fenólicos totales por el método de Singleton y Rossi, (1965), con modificaciones**

El contenido de compuestos fenólicos en hojas de pimiento se incrementó en los tratamientos sin nematodos, siendo significativo cuando se inoculó con PO4 en forma individual o combinado con SD (Figura 26). Con la incorporación de nematodos, todos los tratamientos presentaron un menor contenido de compuestos fenólicos que el control, sólo la combinación SDPO4 no presentó diferencias significativas con el control.



**Figura 26:** Contenido de compuestos fenólicos totales en hoja. Tratamiento control (C), e inoculados con *Septoglomus deserticola* (SD), *Pleurotus ostreatus* (PO4), *Corioloopsis rigida* (CR); y combinaciones entre *Septoglomus deserticola* y *Corioloopsis rigida* (SDCR), y *Septoglomus deserticola* y *Pleurotus ostreatus* (SDPO4), sin (SN) y con (CN) *Nacobbus aberrans*. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas según el test LSD de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

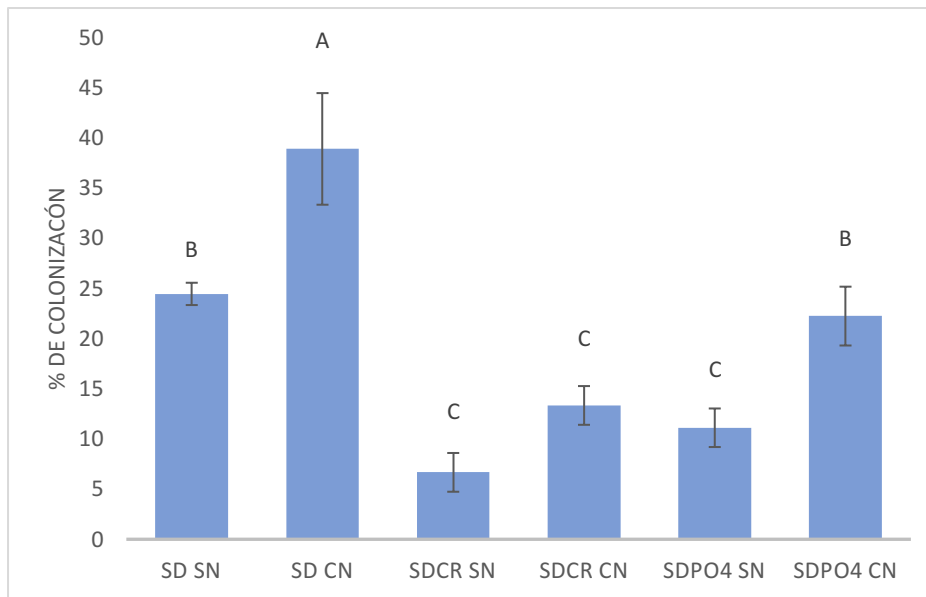
Al evaluar el contenido de compuestos fenólicos en raíz, tanto en los tratamientos con y sin nematodos, se obtuvieron menores valores comparado con sus respectivos testigos (Figura 27). En ausencia de *Nacobbus aberrans*, *Septoglomus deserticola* inoculado en forma individual o con los otros dos microorganismos presentó diferencias significativas con el control. En cuanto a los tratamientos con nematodos, todos los tratamientos inoculados con los hongos en estudio, solos o combinados, presentaron una disminución significativa del contenido de fenoles en sus raíces.



**Figura 27:** Contenido de compuestos fenólicos totales en raíz. Tratamiento control (C), e inoculados con *Septogloium deserticola* (SD), *Pleurotus ostreatus* (PO4), *Coriolopsis rigida* (CR); y combinaciones entre *Septogloium deserticola* y *Coriolopsis rigida* (SDCR), y *Septogloium deserticola* y *Pleurotus ostreatus* (SDPO4), sin (SN) y con (CN) *Nacobbus aberrans*. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas según el test LSD de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

- **Presencia de hongos micorrícicos mediante la tinción de las raíces por el método de Phillips y Hayman, (1970) y porcentaje de micorrización o colonización micorrícica por el método de Trouvelot et al. (1986).**

El porcentaje de colonización (Figura 28) de *Septogloium deserticola* se vio significativamente disminuido con la incorporación de los hongos *Coriolopsis rigida* y *Pleurotus ostreatus*. Por otro lado, todos los tratamientos con nematodos tuvieron mayor micorrización que sus tratamientos análogos sin *Nacobbus aberrans*.



**Figura 28:** Porcentaje de colonización micorrícica. Tratamiento inoculado con *Septoglomus deserticola* (SD), y combinaciones entre *Septoglomus deserticola* y *Coriolopsis rigida* (SDCR), y *Septoglomus deserticola* y *Pleurotus ostreatus* (SDPO4), sin (SN) y con (CN) *Nacobbus aberrans*. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas según el test LSD de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

### ➤ Persistencia de hongos en el suelo

Al finalizar el ensayo no se observó en las placas cultivadas ningún crecimiento de colonias fúngicas.

## DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio indican que un manejo adecuado de los microorganismos de la rizósfera puede jugar un rol fundamental en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las relaciones benéficas entre microorganismos y la planta hospedera incrementan el crecimiento y la resistencia a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico (Smith y Read, 2010).

La simbiosis micorrícica arbuscular puede proporcionar a la planta varios beneficios como mejorar la absorción de agua (Barea et al., 2016), nutrientes (Azcón-Aguilar y Barea, 2015) y producir hormonas que estimulan el crecimiento de la planta (Ruiz-Lozano et al., 2016), mejorando su condición fisiológica a pesar de no modificar la población final de patógenos. Todo ello se traduce en un mayor crecimiento vegetal, demostrado en el presente trabajo a través de los pesos frescos y secos tanto aéreos

como radicales que aumentaron en la mayoría de los tratamientos con la incorporación de *S. deserticola*. En este trabajo la combinación con *S. deserticola* y *C. rigida* tuvo un efecto positivo en el peso fresco y seco de las plantas como en el área foliar. Resultados similares obtuvieron (Arriagada et al., 2014) y Chávez et al. (2014) al combinar *C. rigida* y *S. deserticola* en plantas de eucalipto y *Pinus radiata* respectivamente sobre la altura y biomasa demostrando un sinergismo entre estos hongos en cuanto a la promoción del crecimiento.

Por otro lado, en este ensayo se obtuvieron resultados variables al analizar los tratamientos donde *Pleurotus ostreatus* estaba implicado, en contraposición con Okorie et al. (2011) quienes observaron mayor peso fresco y seco de los brotes de soja inoculados con este hongo en presencia del nematodo *Meloidogyne incognita*.

Los parámetros fisiológicos como el contenido de clorofila, carotenoides y proteínas solubles disminuyeron en presencia de *N. aberrans* al igual que Bernardo et al. (2020) donde observaron que, en plantas de pimiento, frente a la inoculación con *N. aberrans*, estos parámetros disminuyeron. A su vez se pudo observar que las plantas inoculadas con los microorganismos individualmente obtuvieron mayor contenido de clorofila y carotenoides que las inoculaciones combinadas.

Se han registrado alteraciones en las células vegetales, como hiperplasia e hipertrofia en respuesta a la infección por nematodos, lo que conduce a la ruptura del xilema y floema (Hewezi y Baum, 2013). En consecuencia, se reduce el flujo de sustancias a través de los tejidos de conducción y se detecta un aumento sistémico de sustancias, que pueden utilizarse como “marcadores” de estrés hídrico (Moreno, 2009). Bajo estas condiciones limitantes, la prolina se acumula al desencadenarse la producción de enzimas claves en la ruta de síntesis de los osmolitos como respuesta al estrés hídrico (Masoudi-Sadaghiani et al., 2011). Javot y Maurel (2002) indican que frente a situaciones de estrés las plantas pueden experimentar procesos de degradación proteica a fin de proveer de aminoácidos para la construcción de nuevos compuestos o bien para ser utilizados como osmolitos como el caso de la prolina. Ruscitti et al. (2015) mostraron cómo las plantas de tomate no inoculadas se vieron más afectadas por el estrés hídrico que las inoculadas con *F. mosseae* y *R. intraradices*, como se evidencia en sus mayores valores de prolina, lo que coincide con lo observado en la parte aérea en este trabajo, mientras que en raíces el contenido de prolina disminuyó en los tratamientos CR y SDCR, probablemente debido a que

los hongos seleccionados produjeron una compensación mitigando el estrés causado en las plantas ya sea por tener mayor superficie de absorción de agua por las hifas o por el efecto que se produjo sobre la población de nematodos y su penetración en las raíces (Azcón-Aguilar & Barea, 1996).

Los compuestos fenólicos juegan un papel clave en los mecanismos involucrados en la interacción planta-nematodo, dado que un aumento en su contenido se asocia con resistencia sistémica a nematodos migratorios y sedentarios (Arias et al., 2009). Estos compuestos se acumulan en los sitios de localización de los nematodos y el contenido en los órganos no afectados por la infección puede aumentar varias veces (efecto sistémico), ya que pueden translocarse a través de los tejidos principalmente a través del floema (Arias et al., 2009). En este trabajo se observó una menor acumulación de estos compuestos en plantas inoculadas con la micorriza y *C. rigida*, tanto en hojas como en raíces. Esto se relaciona con la capacidad de los hongos para aumentar la tolerancia del huésped al ataque de patógenos y plagas, a través de mecanismos como la absorción de agua y nutrientes y, en consecuencia, el normal funcionamiento de los procesos fisiológicos de las plantas y al efecto que tiene sobre la movilidad de los nematodos impidiendo la entrada de los mismos en la raíz (Vos et al., 2012).

Las plantas que crecieron con el nematodo presentaron un mayor porcentaje de micorrización en comparación con sus respectivos tratamientos sin nematodos. Según Azcón-Aguilar y Barea (1996), la alta micorrización en presencia de nematodos fitoparásitos puede deberse a la compensación del daño causado por los nematodos en las raíces, aumentando la formación de hifas y otras estructuras fúngicas.

Como sugieren los resultados de este trabajo, las plantas de pimiento inoculadas con *S. deserticola*, *C. rigida* y *P. ostreatus* de forma individual o combinados, son menos afectadas por *N. aberrans*, debido a la disminución del factor de reproducción y el número de huevos del nematodo. Probablemente el efecto bioprotector causado por *P. ostreatus* radique en su capacidad de producir y liberar toxinas que paralizan al nematodo y posteriormente sus hifas lo colonizan. Genier et al. (2015) evaluaron dicho hongo contra el nematodo de vida libre *Panagrellus spp.*, y obtuvieron *in vitro* reducciones de su población, al primer día de ensayo de un 50%, alcanzando valores superiores al 90% al tercer día, atribuyendo sus resultados al mecanismo anteriormente mencionado. Por otra parte, numerosos estudios de *C.*

*rigida* dan cuenta de las lacasas producidas y liberadas extracelularmente y la actividad catalítica que poseen (Díaz Rodríguez, 2010; Saparrat et al., 2002, 2014). Si bien, es probable que dichas enzimas no actúen directamente contra *N. aberrans*, sí lo podrían hacer indirectamente debido a que en el proceso de lignólisis se generan especies reactivas de oxígeno y radicales aromáticos. Dichos compuestos pueden producir reacciones no enzimáticas como, por ejemplo, la ruptura de enlaces tipo éter, fragmentación de anillos aromáticos, ruptura de enlaces C $\alpha$ -C $\beta$ , demetoxilación, entre otros; y probablemente también los nematodos sean afectados por ellos (Díaz Rodríguez, 2010). En este ensayo los tratamientos SD, SDCR y SDPO4 mostraron una mayor reducción de la población de nematodos comparado con los demás tratamientos.

Por todo lo dicho, se demuestra que la inoculación con *S. deserticola* y los hongos saprótrofos en plantas de pimiento reduce la población de nematodos. También se pudo observar que la combinación de *S. deserticola* y *C. rigida* no solo produjo un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, sino también sobre la defensa de las mismas evidenciado por la disminución en el contenido de prolina y compuestos fenólicos. Estos resultados pueden indicar que hay una interacción positiva entre estos microorganismos, una interacción de sinergismo. A su vez, pueden contribuir a profundizar el estudio de la inoculación combinada de hongos micorrícicos y *C. rigida* como prácticas para introducir en la producción de cultivos hortícolas como biofertilizantes y para el control de nematodos fitopatógenos.

## CONCLUSIONES Y/O RECOMENDACIONES

*S. deserticola* junto con *C. rigida* y *P. ostreatus*, aplicados como bioinsumos, actúan promoviendo el crecimiento en las plantas de pimiento, reflejado en el aumento de pesos frescos y secos tanto aéreos como radicales.

La presencia del nematodo *Nacobbus aberrans* en el suelo afecta el crecimiento de las plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivadas bajo cubierta, reflejándose en una disminución del contenido de clorofila, carotenoides y proteínas solubles.

La asociación del hongo micorrícico arbuscular *S. deserticola* con hongos saprótrofos como *C. rigida* y *P. ostreatus* morigera la actividad fitopatógena de *N. aberrans*, mitigando los daños provocados sobre las plantas de pimiento.

Se destaca el tratamiento con *C. rigida* y la combinación entre *S. deserticola* y *C. rigida* por promover el crecimiento de las plantas de pimiento y provocar un efecto positivo en la defensa ante *N. aberrans*.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Andrés, M. F. (2003). Nematodos parásitos de plantas en suelos agrícolas. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, 149, 33-42.
- Arias, Y., González, I., Rodríguez, M., Rosales, C., Suárez, Z., & Peteira, B. (2009). ASPECTOS GENERALES DE LA INTERACCIÓN TOMATE (*Solanum lycopersicon* L.) \_ *Meloidogyne incognita*. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 1-13.
- Arriagada, C., Almonacid, L., Cornejo, P., Garcia-Romera, I., & Ocampo, J. (2014). Influence of an organic amendment comprising saprophytic and mycorrhizal fungi on soil quality and growth of *Eucalyptus globulus* in the presence of sewage sludge contaminated with aluminium. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 60(9), 1229-1248. <https://doi.org/10.1080/03650340.2013.878455>
- Azcón-Aguilar, C., & Barea, J. M. (1996). Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens—An overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*, 6(6), 457-464. <https://doi.org/10.1007/s005720050147>
- Azcón-Aguilar, C., & Barea, J. M. (2015). Nutrient cycling in the mycorrhizosphere. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15(2), 372-396. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162015005000035>
- Baldini, C. (2020). *Territorio en movimiento: Las transformaciones territoriales del Cinturón Hortícola Platense en los últimos 30 años* [Tesis, Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.35537/10915/90102>
- Barea, J. M., Pozo, M. J., & Azcón-Aguilar, C. (2016). Significado y aplicación de las micorrizas en la agricultura. *Revista Agricultura*, 999, 746-751.



- Barker, S. J., Tagu, D., & Delp, G. (1998). Regulation of Root and Fungal Morphogenesis in Mycorrhizal Symbioses. *Plant Physiology*, 116(4), 1201-1207. <https://doi.org/10.1104/pp.116.4.1201>
- Barron, G. L., & Thorn, R. G. (1987). Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. *Canadian Journal of Botany*, 65(4), 774-778. <https://doi.org/10.1139/b87-103>
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Baum, C., El-Tohamy, W., & Gruda, N. (2015). Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: A review. *Scientia Horticulturae*, 187(13), 131-141. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.002>
- Beltrano, J., Ruscitti, M., Arango, M. C., & Ronco, M. (2013). Effects of arbuscular mycorrhiza inoculation on plant growth, biological and physiological parameters and mineral nutrition in pepper grown under different salinity and p levels. *Journal of soil science and plant nutrition*, 13(1), 123-141. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162013005000012>
- Bernardo, V. (2022). *Caracterización de interacciones planta-microorganismos beneficiosas para el control de Nacobbus aberrans en pimiento* [Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.35537/10915/140520>
- Bernardo, V., Collado, F., Arango, M. C., Garita, S. A., & Ruscitti, M. F. (2018). La inoculación con hongos micorrícicos y la aplicación de ácido salicílico aumentan la tolerancia a cobre en plantas de pimiento. *Ciencias Agronómicas*, no. 31. <https://doi.org/10.35305/agro31.229>
- Bernardo, V. F., Garita, S. A., Arango, M. C., Ripodas, J. I., Saparrat, M. C. N., & Ruscitti, M. F. (2020). Arbuscular mycorrhizal fungi against the false root-knot nematode activity in *Capsicum annuum*: Physiological responses in plants. *Biocontrol Science and Technology*, 31(2), 119-131. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1833304>
- Bernardo, V., Gonzalez, M. A., Garita, S. A., Lopez, R. O., Arango, M. C., Saparrat, M. C. N., & Ruscitti, M. F. (2023). Evaluation of two nematophagous fungi for the control of false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* in pepper crops. *Journal of General Plant Pathology*, 89(6), 339-346. <https://doi.org/10.1007/s10327-023-01145-1>

- Blandi, M. L., Rigotto, M. R., & Sarandón, S. J. (2015). Impactos de la modernización tecnológica sobre dimensiones contextuales en el cinturón hortícola platense. *La Agroecología, un nuevo paradigma para redefinir la investigación, la educación y la extensión para una agricultura sustentable*. V Congreso Latinoamericano de Agroecología - SOCLA (La Plata, 2015). <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/57652>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cantrell, I. C., & Linderman, R. G. (2001). Preinoculation of lettuce and onion with VA mycorrhizal fungi reduces deleterious effects of soil salinity. *Plant and Soil*, 233(2), 269-281. <https://doi.org/10.1023/A:1010564013601>
- Chang, S.-T., & Miles, P. G. (2004). *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. CRC Press.
- Chávez, D., Pereira, G., & Machuca, Á. (2014). Estimulación del crecimiento en plántulas de *Pinus radiata* utilizando hongos ectomicorrícicos y saprobios como biofertilizantes. *Bosque (Valdivia)*, 35(1), 57-63. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002014000100006>
- Coolen, W. A. (1979). Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. And other nematodes from roots and soil. in F. Lamberti and C.E. Taylor, eds. *Root-knot Nematodes (Meloidogyne species) Systematics, Biology and Control*. Academic Press, New York, NY, U.S.A., 317-330.
- del Pino, M. (2020). *Guía didáctica: Cultivo y Manejo del Pimiento*. Horticultura y Floricultura. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata.
- Díaz Rodríguez, R. (2010). *Caracterización y papel biorremediador de la lacasa producida por el hongo ligninolítico Corioloopsis rigida en alpeorujó* [Tesis doctoral]. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias.
- Doucet, M. E., & Lax, P. (2005). *El Género Nacobbus Thorne & Allen, 1944 en la Argentina*. 6. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/29191>
- EFSA Panel on Plant Health (PLH), Jeger, M., Bragard, C., Caffier, D., Candresse, T., Chatzivassiliou, E., Dehnen-Schmutz, K., Gilioli, G., Grégoire, J.-C., Jaques Miret, J. A., MacLeod, A., Navajas Navarro, M., Parnell, S., Potting, R., Rafoss, T., Rossi, V., Urek, G., Van Bruggen, A., Van der Werf, W., ... Niere, B. (2018).

- Pest categorisation of *Nacobbus aberrans*. *EFSA Journal*, 16(4), e05249. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5249>
- EPPO. (2023). *Nacobbus aberrans sensu lato*. *Fichas técnicas de la Fiscalía Europea sobre plagas recomendadas para su regulación*. <https://gd.eppo.int/taxon/NACOBBA>
- Fernández Lozano, J. (2012). La producción de hortalizas en Argentina. Gerencia de Calidad y Tecnología. *Mercado Central de Bs. As.* [https://www.academia.edu/23974120/La\\_produccion\\_de\\_hortalizas\\_en\\_argentina](https://www.academia.edu/23974120/La_produccion_de_hortalizas_en_argentina)
- García, M. (2012). *Análisis de las transformaciones de la estructura agraria hortícola platense en los últimos 20 años. El rol de los horticultores bolivianos*. [Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales]. <https://doi.org/10.35537/10915/18122>
- García, M. (2015). *Horticultura de La Plata (Buenos Aires): Modelo productivo irracionalmente exitoso*. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/55084>
- Garita, S. A. (2020). *Herramientas biológicas: Un aporte para elaboración de un plan de manejo de Nacobbus aberrans* [Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales]. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/144735>
- Garita, S. A., Bernardo, V. F., Gonzalez, M., Ripodas, J. I., Arango, M. C., & Ruscitti, M. (2021). "The false root-knot nematode: Modification of the root anatomy and alteration of the physiological performance in tomato plants". *Rhizosphere*, 20, 100424. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100424>
- Genier, H. L. A., Soares, F. de F., Queiroz, J. de, Gouveia, A. de S., Araújo, J. V., Braga, F. R., Pinheiro, I. R., & Kasuya, M. C. M. (2015). Activity of the fungus *Pleurotus ostreatus* and of its proteases on *Panagrellus* sp. Larvae. *African Journal of Biotechnology*, 14(17), Article 17. <https://doi.org/10.4314/ajb.v14i17>
- Gómez, M. R., & Villate, A. R. (2010). Señales de reconocimiento entre plantas y hongos formadores de micorrizas arbusculares. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(1), Article 1. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol11\\_num1\\_art:195](https://doi.org/10.21930/rcta.vol11_num1_art:195)
- Hewezi, T., & Baum, T. J. (2013). Manipulation of Plant Cells by Cyst and Root-Knot Nematode Effectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 26(1), 9-16. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-12-0106-FI>

- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., ... Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, *111*(5), 509-547. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>
- Hurtado, M. A., Giménez, J. E., & Cabral, M. G. (2006). *Análisis ambiental del partido de La Plata: Aportes al Ordenamiento Territorial*. Consejo Federal de Inversiones, La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/27046>
- Hussey, R. S., & Barker, K. R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Report*, *57*, 1025-1028.
- Inalbon, M. C., Mocchiutti, P., Zanuttini, M. A., Balatti, P. A., Rajchenberg, M., & Saparrat, M. C. N. (2015). Applying Ligninolytic Fungi on *Eucalyptus grandis* Wood for Pulping Pretreatment or Fractionation. *Procedia Materials Science*, *8*, 1099-1107. <https://doi.org/10.1016/j.mspro.2015.04.173>
- INDEC. (2022). *Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2022. Resultados provisionales*. [https://censo.gob.ar/index.php/datos\\_provisionales/](https://censo.gob.ar/index.php/datos_provisionales/)
- Inserra, R. N., Vovlas, N., Griffin, G. D., & Anderson, J. L. (1983). Development of the False Root-knot Nematode, *Nacobbus aberrans*, on Sugarbeet. *Journal of Nematology*, *15*(2), 288-296.
- Isikhuemhen, O. S., & Mikiashvilli, N. A. (2009). Lignocellulolytic enzyme activity, substrate utilization, and mushroom yield by *Pleurotus ostreatus* cultivated on substrate containing anaerobic digester solids. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *36*(11), 1353-1362. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0620-1>
- Javot, H., & Maurel, C. (2002). The Role of Aquaporins in Root Water Uptake. *Annals of Botany*, *90*(3), 301-313. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf199>
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J. E., Wesemael, W. M. L., & Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, *14*(9), 946-961. <https://doi.org/10.1111/mpp.12057>

- Karol, J. L., & San Juan, G. A. (2018). *Saber qué hacer: Construcción de un sistema para la gestión integrada del riesgo hídrico en la región del Gran La Plata*. (1a edición especial). Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Arquitectura y Urbanismo. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/67730>
- Kwok, O. C. H., Plattner, R., Weisleder, D., & Wicklow, D. T. (1992). A nematicidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. *Journal of Chemical Ecology*, *18*(2), 127-136. <https://doi.org/10.1007/BF00993748>
- Lax, P., Becerra, A. G., Soteras, F., Cabello, M., & Doucet, M. E. (2011). Effect of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* in tomato plants. *Biology and Fertility of Soils*, *47*(5), 591-597. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0514-4>
- Lax, P., Gonzalez-Iltig, R. E., Rondan Dueñas, J. C., Andrade, A. J., Gardenal, C. N., Franco, J., & Doucet, M. E. (2021). Decrypting species in the *Nacobbus aberrans* (Nematoda: Pratylenchidae) complex using integrative taxonomy. *Zoologica Scripta*, *50*(5), 667-688. <https://doi.org/10.1111/zsc.12494>
- Lax, P., Passone, M. A., Becerra, A. G., Sosa, A. L., Ciancio, A., Finetti-Sialer, M. M., & Rosso, L. C. (2022). Sustainable strategies for management of the “false root-knot nematode” *Nacobbus* spp. *Frontiers in Plant Science*, *13*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.1046315>
- Lax, P., Tordable, M. del C., Macagno, J., Bima, P., & Doucet, M. E. (2013). RESPONSE OF DIFFERENT POTATO CULTIVARS TO THE PRESENCE OF NACOBBUS ABERRANS. *Nematropica*, *43*(1), 83-90.
- Manzanilla-López, R. H., Costilla, M. A., Doucet, M., Franco, J., Inserra, R. N., Lehman, P. S., Prado-Vera, I. C. del, Souza, R. M., & Evans, K. (2002). THE GENUS NACOBBUS THORNE & ALLEN, 1944 (NEMATODA: PRATYLENCHIDAE): SYSTEMATICS, DISTRIBUTION, BIOLOGY AND MANAGEMENT. *Nematropica*, *32*(2), 149-228.
- Martínez, Á. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M. J., Gutiérrez, A., & Río, J. C. del. (2005). Biodegradación de la lignocelulosa: Aspectos microbiológicos, químicos y enzimáticos del ataque fúngico a la lignina. *International Microbiology*, *8*(3), 195-204.
- Masoudi-Sadaghiani, F., Babak, A. M., Zardoshti, M. R., Hassan, R.-S. M., & Tavakoli, A. (2011). Response of Proline, Soluble Sugars, Photosynthetic Pigments and Antioxidant Enzymes in Potato (*Solanum tuberosum* L.) to Different Irrigation

- Regimes in Greenhouse Condition. *Australian Journal of Crop Science*, 5(1), 55-60. <https://doi.org/10.3316/informit.834571763803137>
- Mendonça, R. T., Jara, J. F., González, V., Elissetche, J. P., & Freer, J. (2008). Evaluation of the white-rot fungi *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispora* in biotechnological applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(11), 1323. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0414-x>
- Moreno F., L. P. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 27(2), 179-191.
- Okorie, C. C., Ononuju, C. C., & Okwujiako, I. A. (2011). Management of *Meloidogyne incognita* with *Pleurotus ostreatus* and *P. tuberregium* in Soybean. *International Journal of Agriculture & Biology*, 13(3).
- Oostenbrink, M. (1966). Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Major Characteristics of the Relation between Nematodes and Plants*, 66(4).
- Papaspyridi, L.-M., Aligiannis, N., Christakopoulos, P., Skaltsounis, A.-L., & Fokialakis, N. (2011). Production of bioactive metabolites with pharmaceutical and nutraceutical interest by submerged fermentation of *Pleurotus ostreatus* in a batch stirred tank bioreactor. *Procedia Food Science*, 1, 1746-1752. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.257>
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158-IN18. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)
- Poveda, J., Abril-Urias, P., & Escobar, C. (2020). Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes by Filamentous Fungi Inducers of Resistance: *Trichoderma*, Mycorrhizal and Endophytic Fungi. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00992>
- Quilambo, O. A. (2003). The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), Article 12. <https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1105>
- Radwan, M. A., Farrag, S. A. A., Abu-Elamayem, M. M., & Ahmed, N. S. (2012). Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato

- using bioproducts of microbial origin. *Applied Soil Ecology*, 56, 58-62. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.02.008>
- Redecker, D. (2002). Molecular identification and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi. En S. E. Smith & F. A. Smith (Eds.), *Developments in Plant and Soil Sciences* (Vol. 94, pp. 67-73). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1284-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1284-2_7)
- Ruiz-Lozano, J. M., Aroca, R., Zamarreño, Á. M., Molina, S., Andreo-Jiménez, B., Porcel, R., García-Mina, J. M., Ruyter-Spira, C., & López-Ráez, J. A. (2016). Arbuscular mycorrhizal symbiosis induces strigolactone biosynthesis under drought and improves drought tolerance in lettuce and tomato. *Plant, Cell & Environment*, 39(2), 441-452. <https://doi.org/10.1111/pce.12631>
- Ruscitti, M., Arango, M., & Beltrano, J. (2017). Improvement of copper stress tolerance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 29, 37-49. <https://doi.org/10.1007/s40626-016-0081-7>
- Ruscitti, M. F., Garita, S., Arango, M. C., & Beltrano, J. (2015). Inoculación con aislamientos seleccionados de hongos vesículoarbusculares como alternativa para moderar el estrés hídrico en plantas de tomate platense bajo condiciones de invernáculo. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*, 114(2), 219-229.
- Saparrat, M. C. N., Balatti, P. A., Arambarri, A. M., & Martínez, M. J. (2014). *Corioloopsis rigida*, a potential model of white-rot fungi that produce extracellular laccases. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(4), 607-617. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1408-5>
- Saparrat, M. C. N., Guillén, F., Arambarri, A. M., Martínez, A. T., & Martínez, M. J. (2002). Induction, Isolation, and Characterization of Two Laccases from the White Rot Basidiomycete *Corioloopsis rigida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1534-1540. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1534-1540.2002>
- Saparrat, M. C. N., Mocchiutti, P., Liggieri, C. S., Aulicino, M. B., Caffini, N. O., Balatti, P. A., & Martínez, M. J. (2008). *Ligninolytic enzyme ability and potential biotechnology applications of the white-rot fungus Grammothele subargentea*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.12.016>

- Saparrat, M. C. N., Ruscitti, M. F., & Arango, M. C. (2020). *Micorrizas arbusculares*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/99599>
- Sarabia Ochoa, M., Madrigal Pedraza, R., Martínez Trujillo, M., & Carreón Abud, Y. (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: Su compleja red de interacciones. *Biológicas*, 12(1), 65-71.
- Sarandón, S. J., Flores, C. C., Abbona, E., Iermanó, M. J., Blandi, M. L., Oyhamburu, M., & Presutti, M. (2013). Subproyecto «Análisis del uso de agroquímicos asociado a las actividades agropecuarias de la provincia de Buenos Aires». En: Relevamiento de la utilización de agroquímicos en la Provincia de Buenos Aires. Mapa de situación e incidencias sobre la salud. *Defensor del Pueblo de la Provincia de Buenos Aires y UNLP*. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/54451>
- Selis, D. (2012). Análisis de la institucionalidad asociada a los procesos de innovación tecnológica en el sector hortícola del Gran La Plata. *Mundo agrario*, 12(24), 01-25.
- Sierra Monroy, J. A. (2015). *Evaluación de la acción nematocida in vitro e in vivo de especies de Pleurotus spp., sobre los nematodos Meloidogyne spp. Y Radopholus spp. Asociados a los cultivos de tomate y plátano*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/53911>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2010). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press.
- Tordable, M. del C., Andrade, A. J., Doucet, M. E., & Lax, P. (2018). Histopatología de variedades de batata andina (*Solanum tuberosum* grupo Andigenum) parasitadas pelo falso nematóide das galhas, *Nacobbus aberrans*. *Brazilian Journal of Biology*, 78, 679-685. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.172401>
- Trouvelot, A., Kough, J. L., & Gianinazzi-Pearson, V. (1986). Measure du taux de mycorrhization d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. INRA, Paris, 101-109.



- Vos, C., Claerhout, S., Mkandawire, R., Panis, B., De Waele, D., & Elsen, A. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungi reduce root-knot nematode penetration through altered root exudation of their host. *Plant and Soil*, 354(1-2), 335-345. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1070-x>
- Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Yildiz, S., Yildiz, Ü. C., Gezer, E. D., & Temiz, A. (2002). Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. *Process Biochemistry*, 38(3), 301-306. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00040-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00040-7)