



**Tesis Doctoral**

**Aislamiento, selección y estudio de cepas de *Trichoderma* spp. y hongos entomopatógenos nativos para el control de *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* (Helotiales: Sclerotinaceae) y *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) en cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*).**

**Ing. Agr. Ricardo Arturo Varela Pardo**

**Director: Dr. Eduardo Roberto Wright**

**Codirectora: Dra. Claudia Cristina López Lastra**

**Codirectora: Dra. Cecilia Mónaco**

**Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales**

**Universidad Nacional de La Plata**

**- 2023 -**



***A mi familia, por brindarme la confianza necesaria para crecer.***

## **Agradecimientos.**

Agradezco profundamente a mis directores y guías de tesis Dra. Claudia López Lastra, Dra. Cecilia Mónaco y Dr. Eduardo Roberto Wright, por confiar en mis capacidades y brindarme las herramientas necesarias para poder desarrollar el trabajo de tesis. Su acompañamiento fue esencial para mi crecimiento profesional y personal.

A los/as agricultores/as agroecológicos/as por su lucha en la producción de alimentos sanos.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata por permitirme realizar este trabajo de investigación enmarcado en un doctorado.

A la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires y sus integrantes, por ser mi lugar de trabajo y estudio y por acompañarme en este proceso.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por brindarme apoyo económico mediante una beca doctoral para poder realizar un doctorado.

Al Centro de Estudios Parasitológico y de Vectores (CEPAVE) y todas las personas que componen los equipos de trabajos que aportaron significativamente en mi formación como profesional y me brindaron apoyo técnico cada vez que necesité. En especial quisiera agradecer a Romina Guadalupe Manfrino, Alejandra Gutierrez, Darío Balcazar y Luis Alberto Giambelluca.

A Laura E. Puhl y Graciela M. Minardi, por su guía en ámbitos estadísticos.

A mis compañeros de ruta; Bruno Varsallona, Nicolás Pablo Borrelli y Patricio Iván Wigdorovitz, que la vida nos otorgó la posibilidad de aprender juntos.

A todo el equipo técnico y no docentes de las universidades en que se desarrolló mi proyecto de investigación e hicieron posible la finalización de la misma.

### **Publicaciones y presentaciones derivadas de esta tesis.**

Varela Pardo, R. A.; Wright E. R. y López Lastra, C. C. 2019. Aislamiento, selección y estudios de cepas de *Trichoderma* spp. y de hongos entomopatógenos nativos para el control de *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Bemisia tabaci* en el cultivo de tomate. Congreso Argentino de Agroecología. 1er Congreso Argentino de Agroecología. Diseño y manejo de agroecosistemas de base agroecológica. libro de resúmenes / compilado por María Flavia Filippini; Silvina Greco. - 1a ed. adaptada. - Mendoza: Universidad Nacional de Cuyo. Secretaría de Ciencia, Técnica y Posgrado, 2020. Libro digital. ISBN: 978-987-575-210-8

Varela Pardo, R. A., López Lastra, C., Mónaco, C. y Wright, E. R. Aislamiento, selección y estudio de cepas de *Trichoderma* spp. y hongos entomopatógenos nativos para el control de *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Bemisia tabaci* en cultivo de tomate. V Congreso Argentino de Fitopatología. 59th Meeting of the APS Caribbean Division (Virtual). 22-23 Setiembre 2021. Libro de Resúmenes pag. 421.

## Índice

Hipótesis generales del estudio.....	22
Objetivo General.....	22
Objetivos Específicos.....	22
Resumen.....	23
Capítulo 1: Reseña histórica.....	24
Resumen.....	24
Historia y antecedentes agropecuarios mundiales.....	24
Paradigma agropecuario de Argentina.....	27
Agroecología como herramienta de cambio.....	29
Búsqueda de microorganismos benéficos para la agricultura.....	31
Bibliografía.....	32
Capítulo 2: Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ), <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Bemisia tabaci</i> : Antecedentes.....	38
Resumen.....	38
Taxonomía del tomate.....	38
Hábito de crecimiento del tomate.....	38
Requerimientos edafoclimáticos del cultivo de tomate.....	38
Centro de origen del tomate.....	39
Importancia económica del cultivo del tomate.....	39
Principales enfermedades e insectos herbívoros en el cultivo de tomate.....	40
Principales enfermedades fúngicas del cultivo de tomate en Argentina.....	41
Principales enfermedades bacterianas del cultivo de tomate en Argentina.....	41
Principales enfermedades virósicas del cultivo de tomate en Argentina.....	41
Principales plagas de insectos del cultivo de tomate en Argentina.....	41
Principales enfermedades e insecto plaga del cultivo del tomate en Argentina seleccionadas para este estudio.....	41

<b>Antecedentes, taxonomía e importancia de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i></b> .....	<b>42</b>
<b>Antecedentes, taxonomía e importancia de <i>Botrytis cinerea</i></b> .....	<b>43</b>
<b>Antecedentes, taxonomía e importancia de <i>Bemisia tabaci</i></b> .....	<b>44</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>46</b>
<b>Capítulo 3: Hongos Ascomicetes, antagonistas y simbiosis</b> .....	<b>52</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>52</b>
<b>Agentes de Control Biológico</b> .....	<b>52</b>
<b>Antecedentes de <i>Trichoderma spp</i></b> .....	<b>53</b>
<b>Características morfológicas del género <i>Trichoderma</i></b> .....	<b>54</b>
Figura 1. Imágenes de las estructuras de <i>Trichoderma gamsii</i> Samuels y Druzhinina, (2006) en medio de cultivo SNA (Synthetic Nutrient-Poor Agar) .....	56
<b>Antecedentes de <i>Metarhizium spp</i></b> .....	<b>58</b>
<b>Características morfológicas del género <i>Metarhizium</i></b> .....	<b>58</b>
Figura 2. <i>Metarhizium koreanum</i> Kepler, S.A. Rehner y Humber, (2015) y <i>Metarhizium brasiliense</i> Kepler, S.A. Rehner y Humber, (2015) .....	59
<b>Bibliografía</b> .....	<b>61</b>
<b>Capítulo 4: Obtención de microorganismos</b> .....	<b>66</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>66</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>66</b>
<b>Perfil de cada producción visitada</b> .....	<b>66</b>
<b>Suelo y rizosfera como fuente de microorganismos</b> .....	<b>70</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>71</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>71</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>71</b>
<b>Procedimiento de muestreo</b> .....	<b>71</b>
<b>Aislamiento de hongos incluidos en el género <i>Metarhizium</i></b> .....	<b>72</b>

<b>Aislamiento de hongos incluidos en el género <i>Trichoderma</i></b> .....	<b>72</b>
<b>Observación microscópica</b> .....	<b>72</b>
<b>Microcultivo</b> .....	<b>73</b>
Figura 3. Ordenamiento de las partes de un microcultivo, modificado de Lacey 2012.....	73
<b>Cultivos monospóricos y métodos de conservación</b> .....	<b>74</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>74</b>
<b>Muestras recolectadas de los predios visitados para el aislamiento de microorganismos</b> .....	<b>74</b>
Tabla 1. Información de muestras de suelo obtenidas en la Provincia de Buenos Aires.....	75
Figura 4. esporulaciones características del género <i>Metarhizium</i> en cadáveres de <i>Tenebrio molitor</i> .....	76
Tabla 2. Aislamientos de hongos entomopatógenos obtenidos.....	76
Figuras 5. Imágenes de repiques de aislamientos de <i>Trichoderma</i> , en proceso de re-aislamiento y purificación de otros hongos y bacterias.....	77
Figura 6. Microcultivo de aislamiento incluido en el género <i>Trichoderma</i> ; estructuras características del género, hifa, conidióforo, fiálides y conidios.....	77
Tabla 3. Aislamientos de hongos incluidos en el género <i>Trichoderma</i> obtenidos de muestras de suelo de cultivos hortícolas.....	78
<b>Preservación en Colección Micológica</b> .....	<b>78</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>78</b>
<b>Conclusión</b> .....	<b>79</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>79</b>
<b>Capítulo 5: Selección de aislamientos de los géneros <i>Metarhizium</i> y <i>Trichoderma</i> a través de cultivos duales</b> .....	<b>83</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>83</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>83</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>84</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>84</b>

<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>84</b>
<b>Pruebas de laboratorio en cultivos duales de los aislamientos de los géneros <i>Metarhizium</i> y <i>Trichoderma</i> frente a los patógenos <i>B. cinerea</i> y <i>S. sclerotiorum</i>.....</b>	<b>84</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>85</b>
<b>Resultados de ensayo con cultivo dual de aislamientos del género <i>Trichoderma</i> y <i>Metarhizium</i> frente a <i>B. cinerea</i> y <i>S. sclerotiorum</i>.....</b>	<b>85</b>
Tabla 4. Medidas resumen del crecimiento de los testigos de <i>Botrytis cinerea</i> .....	85
Tabla 5. Medidas resumen del crecimiento de los testigos de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	85
Figura 7. Gráfico de barras para la variante de crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> durante seis días... <b></b>	<b>86</b>
Figura 8. Gráfico de barras para la variante de crecimiento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> durante cinco días.....	86
<b>Comparación de las medias referentes al crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigo (<i>Trichoderma</i> spp.).....</b>	<b>87</b>
Figura 9. Análisis de varianza y comparaciones de medias referente al crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigo de aislamientos del género <i>Trichoderma</i> estudiados en el ensayo con <i>Botrytis cinerea</i> en el cuarto día posterior a la inoculación del sustrato.....	88
Figura 10. Gráfico de barras de medias observadas referentes al crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigo de aislamientos del género <i>Trichoderma</i> estudiados en el ensayo con <i>Botrytis cinerea</i> en el cuarto día posterior a la inoculación del sustrato.....	88
Figura 11. Análisis de varianza y comparaciones de medias referente al crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigo de aislamientos del género <i>Trichoderma</i> estudiados en el ensayo con <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> en el cuarto día posterior a la inoculación del sustrato.....	89
Figura 12. Gráfico de barras de medias referente al crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigo de aislamientos del género <i>Trichoderma</i> estudiados en el ensayo con <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> en el cuarto día posterior a la inoculación del sustrato.....	90
<b>Análisis del porcentaje de inhibición de crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> para cada tratamiento estudiado.....</b>	<b>90</b>
Figura 13. Análisis de varianza y comparaciones de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> por cada tratamiento de aislamientos del género <i>Trichoderma</i> .....	91
Figura 14. Gráfico de barras de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> por cada tratamiento de aislamientos del género <i>Trichoderma</i> ....	92

Figura 15. Análisis de varianza y comparaciones de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* por cada tratamiento de aislamientos del género *Trichoderma*.....93

Figura 16. Gráfico de barras de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* por cada tratamiento de aislamientos del género *Trichoderma*.....93

**Imágenes de referencia de los estudios de cultivo dual realizados para los aislamientos del género *Trichoderma*, frente a los fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*.....94**

Figuras 17. Desarrollo de los cultivos duales y tratamientos testigos. Imágenes tomadas al finalizar el ensayo.....95

**Medidas resumen del crecimiento de microorganismos patógenos *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*, ensayo de cultivo dual frente a hongos del género *Metarhizium*.....96**

Tabla 6. Medidas resumen del crecimiento de los testigos de *Botrytis cinerea* .....96

Tabla 7. Medidas resumen del crecimiento de los testigos de *Sclerotinia sclerotiorum*.....96

Figura 18. Gráfico de barras para la variante de crecimiento de *Botrytis cinerea* desde el cuarto al séptimo día de haber sido sembrado el sustrato .....97

Figura 19. Gráfico de barras para la variante de crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* desde el cuarto al séptimo día de haber sido sembrado el sustrato .....97

**Comparación de las medias referentes al crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigo (*Metarhizium spp.*).....98**

Figura 20. Análisis de varianza y comparaciones de medias referente al crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigo de aislamientos del género *Metarhizium* estudiados en el ensayo con *Botrytis cinerea* en el séptimo día posterior a la inoculación del sustrato .....98

Figura 21. Análisis de varianza y comparaciones de medias referente al crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigo de aislamientos del género *Metarhizium* estudiados en el ensayo con *Botrytis cinerea* en el séptimo día posterior a la inoculación del sustrato .....99

Figura 22. Análisis de varianza y comparaciones de medias referente al crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigo de aislamientos del género *Metarhizium* estudiados en el ensayo con *Sclerotinia sclerotiorum* en el séptimo día posterior a la inoculación del sustrato.....100

Figura 23. Gráfico de barras de medias referente al crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigo de aislamientos del género *Metarhizium* estudiados en el ensayo con *Sclerotinia sclerotiorum* en el séptimo día posterior a la inoculación del sustrato.....100

<b>Análisis del porcentaje de inhibición de crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> para cada tratamiento.....</b>	<b>101</b>
Figura 24. Análisis de varianza y comparaciones de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> por cada tratamiento de aislamientos del género <i>Metarhizium</i> .....	101
Figura 25. Gráfico de barras de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> por cada tratamiento de aislamientos del género <i>Metarhizium</i> .....	102
Figura 26. Análisis de varianza y comparaciones de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por cada tratamiento de aislamientos del género <i>Metarhizium</i> .....	102
Figura 27. Gráfico de barras de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por cada tratamiento de aislamientos del género <i>Metarhizium</i> .....	103
<b>Imágenes de referencia de los estudios de cultivo dual realizados para los aislamientos del género <i>Metarhizium</i>, frente a los fitopatógenos <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>.....</b>	<b>103</b>
Figura 28. Desarrollo de los cultivos duales y tratamientos testigos. Imágenes tomadas al finalizar el ensayo.....	105
<b>Discusión.....</b>	<b>106</b>
<b>Conclusión.....</b>	<b>108</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>108</b>
<b>Capítulo 6. Pruebas promoción de crecimiento de aislamientos de los géneros <i>Metarhizium</i> y <i>Trichoderma</i> seleccionados como controladores biológicos de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>.....</b>	<b>112</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>112</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>112</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>113</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>113</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>113</b>

<b>Pruebas de laboratorio de promoción de crecimiento en plantas de tomate var. platense (<i>S. lycopersicum</i>) inoculadas con suspensión de esporas de aislamientos de <i>Metarhizium</i> spp. y <i>Trichoderma</i> spp.....</b>	<b>113</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>114</b>
Figura 29. Análisis de la varianza, comparaciones de medias referente al diámetro de tallos de plantines de tomate inoculados con 6 aislamientos del género <i>Trichoderma</i> 49 días posteriores a su siembra.....	115
Figura 30. Gráfico de barras referente al diámetro de tallos de plantines de tomate inoculados con 6 aislamientos del género <i>Trichoderma</i> 49 días posteriores a su siembra.....	115
Figura 31. Análisis de la varianza y comparaciones de medias referente a la longitud de tallo de plantines de tomate inoculados con 6 aislamientos del género <i>Trichoderma</i> 49 días posteriores a su siembra.....	116
Figura 32. Gráfico de barras referente a la longitud de tallo de plantines de tomate inoculados con 6 aislamientos del género <i>Trichoderma</i> 49 días posteriores a su siembra.....	117
Figura 33. Análisis de la varianza y comparaciones de medias referente al peso aéreo de plantines de tomate inoculados con 6 aislamientos del género <i>Trichoderma</i> 49 días posteriores a su siembra.....	118
Figura 34. Gráfico de barras referente al peso aéreo de plantines de tomate inoculados con 6 aislamientos del género <i>Trichoderma</i> 49 días posteriores a su siembra.....	118
Figura 35. Análisis de la varianza y comparaciones de medias referente al diámetro de tallos de plantines de tomate inoculados con 5 aislamientos del género <i>Metarhizium</i> 37 días posteriores a su siembra.....	119
Figura 36. Gráfico de barras referente al diámetro de tallos de plantines de tomate inoculados con 5 aislamientos del género <i>Metarhizium</i> 37 días posteriores a su siembra.....	119
Figura 37. Análisis de la varianza y comparaciones de medias referente a la longitud de tallo de plantines de tomate inoculados con 5 aislamientos del género <i>Metarhizium</i> 37 días posteriores a su siembra.....	120
Figura 38. Gráfico de barras referente a la longitud de tallo de plantines de tomate inoculados con 5 aislamientos del género <i>Metarhizium</i> 37 días posteriores a su siembra.....	121
Figura 39. Análisis de la varianza y comparaciones de medias referente al peso aéreo de plantines de tomate inoculados con 5 aislamientos del género <i>Metarhizium</i> 37 días posteriores a su siembra.....	121

Figura 40. Gráfico de barras referente al peso aéreo de plantines de tomate inoculados con 5 aislamientos del género <i>Metarhizium</i> 37 días posteriores a su siembra.....	122
<b>Discusión.....</b>	<b>122</b>
<b>Conclusión.....</b>	<b>123</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>124</b>
<b>Capítulo 7. Identificación de los aislamientos CEP-722, CEP-723, CEP-753 y CEP-754 seleccionados de los géneros <i>Metarhizium</i> y <i>Trichoderma</i>.....</b>	<b>127</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>127</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>127</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>129</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>129</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>129</b>
<b>Identificación morfológica de los aislamientos CEP-722, CEP-723, CEP-753 y CEP-754.....</b>	<b>129</b>
<b>Identificación molecular de los aislamientos CEP-722, CEP-723, CEP-753 y CEP-754.....</b>	<b>129</b>
<b>Análisis filogenético de los aislamientos secuenciados.....</b>	<b>130</b>
<b>Programación del termociclador para los productos de PCR obtenidos.....</b>	<b>131</b>
Tabla 8. Procesos de termociclados para la región ITS 1 y 2.....	131
Tabla 9. Procesos de termociclados para la región TEF1 $\alpha$ .....	132
Tabla 10. Base de datos de secuencias de genes ITS1 y TEF1 $\alpha$ para el género <i>Metarhizium</i> . Se presenta la especie, el código de cepa, el sustrato hospedero, la localización y los códigos de referencia para las regiones ITS1 y TEF1 $\alpha$ .....	132
Tabla 11. Base de datos de secuencias de genes ITS1 y TEF1 $\alpha$ para el género <i>Trichoderma</i> . Se presenta la especie, el código de cepa y los códigos de referencia para las regiones ITS1 y TEF1 $\alpha$ .....	133
<b>Resultados.....</b>	<b>133</b>
<b>Características microscópicas de los aislamientos CEP-722, CEP-723, CEP-753 y CEP-754.....</b>	<b>133</b>
Tabla 12. Valor promedio de las mediciones de estructuras reproductivas de los aislamientos CEP-722, CEP-723, CEP-753 y CEP-754. (n=25) .....	134

Figura 41. Imágenes de referencia de la identificación morfológica de los aislamientos CEP-722, CEP-723, CEP-753 y CEP-754.....	135
<b>Identificación molecular de los aislamientos CEP-722, CEP-723, CEP-753 y CEP-754.....</b>	<b>135</b>
<b>Árboles filogenéticos de los aislamientos CEP-722, CEP-723, CEP-753 y CEP-754.....</b>	<b>136</b>
Figura 42. Árbol filogenético de las regiones ITS1 y TEF1 $\alpha$ de los aislamientos CEP-722 y CEP-723. Los valores entre las diagonales representan el valor de probabilidad de máxima verosimilitud.....	137
Figura 43. Árbol filogenético de las regiones ITS1 y TEF1 $\alpha$ de los aislamientos CEP-753 y CEP-754. Los valores entre las diagonales representan el valor de probabilidad de máxima verosimilitud.....	138
<b>Discusión.....</b>	<b>138</b>
<b>Conclusión.....</b>	<b>139</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>140</b>
<b>Capítulo 8. Estudios de patogenicidad en <i>Bemisia tabaci</i> con los aislamientos <i>Metarhizium taii</i> CEP-722 y <i>Trichoderma afroharzianum</i> CEP-753.....</b>	<b>144</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>144</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>144</b>
Figura 44. Huevos de <i>Bemisia tabaci</i> .....	145
Figura 45. Colonia y ninfa de <i>Bemisia tabaci</i> en primer instar.....	146
Figura 46. Colonia y ninfa de <i>Bemisia tabaci</i> en segundo estadio.....	146
Figura 47. ninfa de <i>Bemisia tabaci</i> en tercer estadio.....	147
Figura 48. Ultimo estado ninfal de <i>Bemisia tabaci</i> .....	148
Figura 49. Adultos de <i>Bemisia tabaci</i> .....	149
<b>Enemigos naturales de la mosca blanca.....</b>	<b>150</b>
Figura 50. <i>Eretmocerus</i> sp. incubándose y emergiendo desde el cadáver de ninfa de <i>Bemisia tabaci</i> .....	151
<b>Hipótesis.....</b>	<b>152</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>152</b>

<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>152</b>
<b>Preparación de suspensión de esporas</b> .....	<b>153</b>
<b>Pruebas de patogenicidad de los aislamientos <i>Metarhizium taii</i> CEP-722 y <i>Trichoderma afroharzianum</i> CEP-754 en estadios inmóviles de <i>Bemisia tabaci</i></b> .....	<b>153</b>
<b>Análisis estadísticos</b> .....	<b>153</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>154</b>
Tabla 13. Prueba de hipótesis marginales (Wald) para los efectos fijos .....	154
Tabla 14. Inversa de la función enlace para los distintos tratamientos .....	155
Figura 51. Gráfico del porcentaje promedio de ninfas de <i>B. tabaci</i> afectadas por infección fúngica y/o con esporulación visible .....	155
Figura 52. Ninfas de distintos estadios y huevos de <i>Bemisia tabaci</i> en disposición circular en el tratamiento control.....	155
Figura 53. Huevos y ninfas de todos los estadios de <i>Bemisia tabaci</i> en el tratamiento con suspensión de conidios de la cepa <i>Trichoderma afroharzianum</i> CEP-754.....	155
Figura 54. Cadáver de ninfa de <i>Bemisia tabaci</i> en segundo estadio con esporulación de <i>Metarhizium taii</i> CEP-722.....	156
Figura 55. Colonia de <i>Bemisia tabaci</i> con infestación de <i>Metarhizium taii</i> CEP-722 y ninfas de <i>Bemisia tabaci</i> sanas e infectadas.....	156
<b>Discusión</b> .....	<b>156</b>
<b>Conclusión</b> .....	<b>157</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>157</b>
<b>Conclusión final</b> .....	<b>163</b>
<b>Anexo 1</b> .....	<b>165</b>
<b>Tablas de los valores observados en los ensayos de cultivo dual de aislamientos del género <i>Trichoderma</i> frente a <i>B. cinerea</i> y <i>S. sclerotiorum</i></b> .....	<b>165</b>
Crecimiento en placas de Petri de tratamientos testigos de <i>Botrytis cinerea</i> .....	165
Crecimiento en placas de Petri de tratamientos testigos de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	165
Datos crudos de tratamientos testigos de aislamientos del género <i>Trichoderma</i> para el ensayo con <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	166

Datos crudos de tratamientos testigos de aislamientos del género <i>Trichoderma</i> para el ensayo con <i>Botrytis cinerea</i> .....	169
Datos crudos de los cultivos duales y porcentajes de inhibición de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> frente a aislamientos del género <i>Trichoderma</i> .....	172
Datos crudos de los cultivos duales y porcentajes de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> frente a aislamientos del género <i>Trichoderma</i> .....	181
<b>Pruebas formales e informales de supuestos de normalidad y de homocedasticidad de varianza.....</b>	<b>190</b>
<b>Testigos de aislamientos del género <i>Trichoderma</i> para el cuarto día de haber sido sembrados en placas de Petri para el ensayo de cultivo dual con el patógeno <i>Botrytis cinerea</i>.....</b>	<b>190</b>
Prueba formal de normalidad de varianza, Kolmogorov.....	190
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene.....	190
Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma.....	191
<b>Testigos de aislamientos del género <i>Trichoderma</i> para el cuarto día de haber sido sembrados en placas de Petri para el ensayo de cultivo dual con el patógeno <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>.....</b>	<b>191</b>
Prueba formal de normalidad de varianza, Kolmogorov.....	191
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene.....	191
Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma.....	192
<b>Cultivo dual: Inhibición de crecimiento en placas de Petri de <i>Botrytis cinerea</i> frente a aislamientos del género <i>Trichoderma</i> para el cuarto día de haber sido sembrados.....</b>	<b>192</b>
Prueba formal de normalidad de varianza, Kolmogorov.....	192
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene.....	192
Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma.....	193
<b>Cultivo dual: Inhibición de crecimiento en placas de Petri de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> frente a aislamientos del género <i>Trichoderma</i> para el cuarto día de haber sido sembrados.....</b>	<b>193</b>
Prueba formal de normalidad de varianza, Kolmogorov.....	193
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene.....	193
Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma.....	194

<b>Valores observados en los ensayos de cultivo dual aislamientos del género <i>Metarhizium</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>.....</b>	<b>194</b>
Crecimiento en placas de Petri de tratamientos testigos de <i>Botrytis cinerea</i> .....	194
Crecimiento en placas de Petri de tratamientos testigos de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	194
Datos crudos de tratamientos testigos de aislamientos del género <i>Metarhizium</i> para el ensayo con <i>Botrytis cinerea</i> .....	195
Datos crudos de tratamientos testigos de aislamientos del género <i>Metarhizium</i> para el ensayo con <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	196
Datos crudos de los cultivos duales y porcentajes de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> frente a aislamientos del género <i>Metarhizium</i> .....	197
Datos crudos de los cultivos duales y porcentajes de inhibición de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> frente a aislamientos de hongos incluidos en el género <i>Metarhizium</i> .....	200
<b>Pruebas formales e informales de supuestos de normalidad y de homocedasticidad de varianza.....</b>	<b>202</b>
<b>Testigos de aislamientos del género <i>Metarhizium</i> para el cuarto día de haber sido sembrados en placas de Petri para el ensayo con el patógeno <i>Botrytis cinerea</i>.....</b>	<b>202</b>
Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks.....	202
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene.....	202
Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma.....	203
<b>Testigos de aislamientos del género <i>Metarhizium</i> para el cuarto día de haber sido sembrados en placas de Petri para el ensayo con el patógeno <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>.....</b>	<b>203</b>
Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks.....	203
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene.....	203
Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma.....	204
<b>Inhibición de crecimiento en placas de Petri de <i>Botrytis cinerea</i> frente a aislamientos del género <i>Metarhizium</i> para el cuarto día de haber sido sembrados.....</b>	<b>204</b>
Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks.....	204
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene.....	204
Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma.....	205

<b>Inhibición de crecimiento en placas de Petri de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> frente a del género <i>Metarhizium</i> para el cuarto día de haber sido sembrados.....</b>	<b>205</b>
Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks.....	205
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene.....	205
Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma.....	206
<b>Anexo 2.....</b>	<b>207</b>
<b>Tablas de valores observados en ensayo promoción de crecimiento de plantines de tomate inoculados con aislamientos del género <i>Trichoderma</i>.....</b>	<b>207</b>
Diámetro de tallo (mm) .....	207
Longitud de tallo (mm) .....	207
Peso de tallo (g) .....	207
<b>Valores observados en ensayo promoción de crecimiento de plantines de tomate inoculados con aislamientos del género <i>Trichoderma</i>.....</b>	<b>208</b>
Diámetro de tallo (mm) .....	208
Longitud de tallo (mm) .....	208
Peso de tallo (g) .....	209
<b>Análisis de varianza, comparaciones de medias, gráfico de barras, pruebas formales e informales de supuestos de normalidad y de homocedasticidad de varianza primer ensayo promoción de crecimiento.....</b>	<b>209</b>
Análisis de varianza y comparaciones de medias y gráfico de barras para diámetro de tallo .....	209
Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para diámetro de tallo.....	209
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para diámetro de tallo.....	210
Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para diámetro de tallo.....	210
Análisis de varianza y comparaciones de medias y gráfico de barras para longitud de tallo.....	210
Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para longitud de tallo.....	211
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para longitud de tallo.....	211

Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para longitud de tallo.....	211
Análisis de varianza y comparaciones de medias y gráfico de barras para peso aéreo.....	212
Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para peso aéreo.....	212
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para peso aéreo.....	212
Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para peso aéreo.....	213
<b>Pruebas formales e informales de supuestos de normalidad y de homocedasticidad de varianza segundo ensayo.....</b>	<b>213</b>
Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para diámetro de tallo.....	213
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para diámetro de tallo.....	213
Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para diámetro de tallo.....	214
Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para longitud de tallo.....	214
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para longitud de tallo.....	214
Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para longitud de tallo.....	215
Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para peso aéreo.....	215
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para peso aéreo.....	215
Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para peso aéreo.....	216
<b>Valores observados en el primer ensayo de promoción de crecimiento de plantines de tomate inoculados con aislamientos del género <i>Metarhizium</i>.....</b>	<b>216</b>
Diámetro de tallo (mm) .....	216
Longitud de tallo (mm) .....	216
Peso de tallo (g) .....	217
<b>Tablas de valores observados en el segundo ensayo de promoción de crecimiento de plantines de tomate inoculados con aislamientos del género <i>Metarhizium</i>.....</b>	<b>217</b>
Diámetro de tallo (mm) .....	217

Longitud de tallo (mm) .....	217
Peso de tallo (g) .....	218
<b>Análisis de varianza, comparaciones de medias, gráfico de barras, pruebas formales e informales de supuestos de normalidad y de homocedasticidad de varianza en el primer ensayo de promoción de crecimiento.....</b>	<b>218</b>
Análisis de varianza y comparaciones de medias y gráfico de barras para diámetro de tallo.....	218
Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para diámetro de tallo.....	219
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para diámetro de tallo .....	219
Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para diámetro de tallo.....	219
Análisis de varianza y comparaciones de medias y gráfico de barras para longitud de tallo.....	220
Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para longitud de tallo.....	220
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para longitud de tallo.....	220
Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para longitud de tallo.....	220
Análisis de varianza y comparaciones de medias y gráfico de barras para peso aéreo.....	221
Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para peso aéreo.....	221
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para peso aéreo.....	221
Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para peso aéreo.....	222
Pruebas formales e informales de supuestos de normalidad y de homocedasticidad de varianza en el segundo ensayo.....	222
Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para diámetro de tallo.....	222
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para diámetro de tallo.....	222
Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para diámetro de tallo.....	223
Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para longitud de tallo.....	223
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para longitud de tallo .....	223

Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para longitud de tallo.....	224
Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para peso aéreo.....	224
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para peso aéreo.....	224
Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para peso aéreo.....	225
<b>Anexo 3.....</b>	<b>226</b>
<b>Resultados y salidas del programa R, para el primer y segundo ensayo de parasitismo con cepas de hongos.....</b>	<b>226</b>
Modelos lineales generalizados mixtos.....	226
Especificación del modelo en R.....	226
Resultados para el modelo: mlgm.modelo.004_muertes_ML.....	226
General.....	226
Medidas de ajuste del modelo.....	226
Pruebas de hipótesis marginales (Wald) para los efectos fijos.....	226
Efectos fijos.....	227
Parámetros de los efectos aleatorios.....	227
Muertes - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento.....	227
Gráfico de barras de la media de muertes por infección fúngica .....	227
Modelos lineales generalizados mixtos.....	228
Especificación del modelo en R.....	228
Resultados para el modelo: mlgm.modelo.000_Muertes_ML.....	228
General.....	228
Medidas de ajuste del modelo.....	228
Pruebas de hipótesis marginales (Wald) para los efectos fijos.....	228
Efectos fijos.....	228
Parámetros de los efectos aleatorios.....	229

Muertes - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento.....	229
Gráfico de barras de la media de muertes por infección fúngica.....	229

### **Hipótesis generales del estudio.**

En producciones agroecológicas de la Provincia de Buenos Aires, existen cepas nativas o naturalizadas del género *Trichoderma* y de hongos entomopatógenos con buenas características como agentes de control biológico.

Algunas cepas nativas o naturalizadas del género *Trichoderma* son patógenos de insectos y hongos entomopatógenos podrían ser antagonistas de fitopatógenos.

Algunas cepas nativas o naturalizadas de hongos entomopatógenos y hongos del género *Trichoderma* generan promoción del crecimiento de las plantas de tomate incidiendo en gran medida en el rendimiento de su cultivo.

### **Objetivo General.**

Avanzar en el conocimiento y desarrollo de insumos biológicos en base a cepas nativas y/o naturalizadas del género *Trichoderma* y de hongos entomopatógenos promisorios como agentes de control biológicos, para poder ser incorporados dentro de un Manejo Integrado de Plagas.

### **Objetivos Específicos.**

Aislar hongos del género *Trichoderma* presentes en producciones agropecuarias del área fruti-hortícola de la provincia de Buenos Aires.

Aislar hongos entomopatógenos a partir de cultivos presentes en el área fruti-hortícola de la provincia de Buenos Aires.

Seleccionar aislamientos de hongos del género *Trichoderma* y de hongos entomopatógenos presentes en la provincia de Buenos Aires, para su posible uso como agentes de control biológico.

Caracterizar morfológica y molecularmente los aislamientos del género *Trichoderma* que manifiesten el mejor desempeño en las pruebas de promoción de crecimiento de tomate (*Solanum lycopersicum* Linneaus (1753)) y de inhibición del desarrollo de *Botrytis cinerea* Pers. (1797) y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (1884).

Caracterizar morfológica y molecularmente a los aislamientos de hongos entomopatógenos que presenten el mejor desempeño en las pruebas de promoción de crecimiento de tomate (*Solanum lycopersicum*) y de inhibición del desarrollo de *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

Analizar la capacidad que presenten cepas del género *Trichoderma* y de hongos entomopatógenos como patógenos de mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius, (1889)).

## Resumen.

El objetivo de este trabajo fue seleccionar microorganismos promisorios como Agentes de Control Biológico (ACB). Se visitaron predios florihortícolas ubicados en Buenos Aires, Argentina, de los cuales se obtuvo un total de 41 muestras de suelo. Se utilizaron las técnicas de insecto trampa y diluciones seriadas de suelo para la obtención de aislamientos de los géneros *Metarhizium* y *Trichoderma* respectivamente. Se obtuvieron un total de 20 aislamientos, cinco pertenecientes al género *Metarhizium* y 15 correspondientes al género *Trichoderma*. Los aislamientos fueron liofilizados y depositados como cultivos de referencia en la Colección Micológica del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE). Se realizaron estudios de cultivos duales de los aislamientos frente a los patógenos *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Se seleccionaron 11 aislamientos para la realización de estudios de promoción de crecimiento en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*). Los aislamientos de *Metarhizium taii* Liang & Liu (1991) CEP-722, CEP-723 y de *Trichoderma afroharzianum* Chaverri, Rocha, Degenkolb & Druzhinina (2015) CEP-753 y CEP-754, identificados molecularmente por medio de la amplificación de las zonas ITS y TEF1 $\alpha$ , presentaron los mejores resultados en las pruebas de cultivo dual y promoción de crecimiento. La cepa CEP-722 de la especie *Metarhizium taii* y la cepa CEP-754 de la especie *Trichoderma afroharzianum* fueron sometidas a pruebas de patogenicidad en estados inmaduros de *Bemisia tabaci*. La cepa CEP-722 presentó capacidad patogénica sobre ninfas de *B. tabaci* con un porcentaje de muertes por infección fúngica cercano al 30%.

## Capítulo 1: Reseña histórica.

### Resumen.

En este capítulo se presentan antecedentes en relación con la historia de la agricultura mundial. Se hace referencia al paradigma agropecuario imperante en Argentina. Se mencionan algunas características de la Agroecología como herramienta de cambio del paradigma agropecuario actual y antecedentes para la búsqueda de microorganismos benéficos para la agricultura.

### Historia y antecedentes agropecuarios mundiales.

Uno de los acontecimientos más importantes en la historia humana ha sido el cambio de una economía sustentada en la caza y la recolección de plantas a una basada en la agricultura (Smith, 1998; 2005). Las plantas cultivadas constituyen la principal herencia que recibimos del hombre primitivo y este patrimonio contribuyó en buena medida al desarrollo de la humanidad. Se propusieron numerosas hipótesis sobre el origen de la agricultura. MacNeish (1992) enumera 41 teorías que agrupa en un diagrama de la historia de las teorías sobre el origen de la agricultura. Entre otras, 21 elaboradas por arqueólogos, 8 por biólogos, 7 por geógrafos y 6 por antropólogos (Krapovickas, 2010). Así, en un largo proceso prehistórico, los pequeños grupos nómades, inicialmente recolectores-cazadores se fueron transformando paulatinamente en sociedades sedentarias, primero reunidas en villorrios y pueblos y luego modificando radicalmente el medio natural por medio de la instalación de cultivos, sistemas de riego y de almacenaje y generando y conservando excedentes de alimentos (Leguizamón, 2018). Se ha planteado que este cambio ocurrió de manera independiente en por lo menos seis regiones del mundo, entre 11000 y 5000 A.P. (Antes del Presente) en áreas tropicales y subtropicales con alta biodiversidad; a partir del él, los grupos recolectores-cazadores cubrieron sus necesidades de supervivencia diaria e iniciaron un largo proceso de manejo y selección que condujo a la agricultura y a la domesticación de plantas y animales (Smith, 2005; Gepts, 2008).

En 1926, Vavilov establece cinco centros de origen fundamentales de las plantas cultivadas y propuso un nuevo método botánico-geográfico diferencial para determinar los lugares donde las especies cultivadas presentan su mayor variabilidad. Más tarde, en 1935, aumentó el número a ocho centros primarios: 1) China, 2) India, 3) Asia Central, 4) Cercano Oriente, 5) Mediterráneo, 6) Abisinia, 7) Sud México y América Central, 8) Perú y Bolivia, y tres centros secundarios: 2a) Indo-Malayo, 8a) Chiloé y 8b) Brasil-Paraguay. (Krapovickas, 2010).

Los hallazgos de cultígenos en yacimientos arqueológicos sudamericanos indican que entre 8000 y 2500 años a.C. se ubican los primeros indicios de la mayoría de los cultivos de importancia económica que posibilitaron el desarrollo de las diversas culturas precolombinas. En esta zona, entre 8000 y 7000 años a.C., se crearon gran parte de los cultígenos de mayor importancia económica: ají, oca, porotos, papa y maíz. Hace 6000 años a.C. se agregan quinoa, zapallos, yerba mate, y guayaba, y a los 2500 a.C., ya estaba prácticamente completo el elenco de cultivos, con el

agregado de maní, achira, algodón, batata y mandioca (Persall, 1992). Las dataciones directas en restos arqueobotánicos indican que las calabazas fueron las primeras plantas domesticadas en Mesoamérica. Hacia 7900 AP (Smith, 1997; 2005).

El lugar o centro de origen de los cultígenos es difícil de establecer. En algunos casos como el del maíz (*Zea mays* L, subsp. *mays*) se ha podido aclarar (Krapovickas, 2010). Todos los taxones silvestres conocidos del género *Zea* viven en el Sur de México y en Guatemala, y su domesticación parece haber ocurrido en un área reducida en el valle del río Balsas, en el sur de México, donde vive su antecesor más probable, *Z. mays* subsp. *parviglumis* Iltis y Doebley, entre 400 y 1700 m.s.n.m. y con precipitaciones entre 1250 y 2000 mm (Doebley, 1990).

La diversidad geográfica de los orígenes de los principales cultivos y animales está bien ilustrada, dentro de los principales cultivos, los más antiguos registrados por cada centro de origen según Atkins *et al.*, (1998) son: Sudoeste de Asia: Trigo (8000), cebada (8000), higo (7800), guisante (7800), lenteja (7800), garbanzo (7500), lino (7500), haba (6500), fecha (4000), oliva (3700), vid (3200), centeno (3000), también coliflor, col rizada, ajo, nabo, mostaza, colza, arveja amarga, pera, cidra, granada, almendra, pistacho. Perro (12,000), oveja (9000), cabra (7500), dromedario (2000). Asia Central: Alforfón, zanahoria, rábano, manzana, cereza, nuez, alfalfa, cáñamo. Caballo (4000), camello bactriano (1500), yak. América Central: Calabaza (8000), frijol común (8000), aguacate (7200), maíz (5700), amaranto (5200), calabaza (5000), habichuela (4000), tomate, frijol sieva, papaya, agave, cacao, vainilla. Pato. Sudamérica: Frijol común (8500), pimienta (8500), papa (8000-6000), frijol Lima (6500), oca (6000), quinua, cañihua, guayaba, maní, piña, tabaco, caucho. Llama (4000), alpaca (4000), conejillo de indias (1500). América del Norte: Girasol, arándano, arándano, pecan. Pavo. África: Arroz africano, sorgo, mijo perla, teff, okra, lechuga, sandía, judía, ricino, café, sésamo, kola, palma aceitera. Burro, gallina de Guinea. India Palomitas, frijol polilla, frijol arroz, gramo de caballo, espárragos, berenjena, pepino, pimienta, limón, yute, añil. China: Arroz (6000), mijo de cola de zorro (5500), melocotón (4000), soja (1000), frijol mungo, adzuki, mostaza de hoja, rábano picante, col china, espinaca, jengibre, naranja, mora, loto, castaña de agua. Sureste de Asia: Mango (7200), taro (7000), plátano, lima, satsuma / mandarina, té, clavo, nuez moscada. Pacífico Sur / Australasia: Coco (3000), arrurruz, fruta de pan, nuez de macadamia. Europa: Avena, remolacha, ciruela, cereza, frambuesa, fresa. Reno. (todos los valores expresados en años a.C.).

Resulta necesario enfatizar la enorme significancia de la revolución agrícola: ya no solo se producían alimentos para cubrir las necesidades del presente, sino que también se generaban excedentes que se conservaban para años posteriores. Ello cimentó las bases para que los pueblos se convirtieran gradualmente en ciudades con alta densidad de habitantes. Y en ellas la mano de obra se diversificó, se inventaron y ampliaron los sistemas comerciales, de intercambio y de almacenaje, mientras florecía el arte, la arquitectura y la cultura. También se crearon administraciones centralizadas, estructuras políticas y un sistema despersonalizado del conocimiento (con regímenes de propiedad y de escritura). Junto con los procesos de domesticación de plantas silvestres y el nacimiento de estructuras sociales complejas, se evidencia el surgimiento de diversas tecnologías agropecuarias, principalmente en el aumento de la superficie disponible para cultivos y el aumento de la fertilidad de los suelos. De estos avances e invenciones tecnológicas se pueden nombrar como ejemplo: la

agricultura de roza y quema, donde los árboles y arbustos se cortaban y quemaban para luego disponer de los nutrientes en las cenizas e incorporarlos al suelo; la asociación de cultivos denominada “milpa” donde la interacción entre el maíz, el poroto y la calabaza, generan beneficios mutuos; la construcción de terrazas a lo largo de las laderas montañosas de los valles para aumentar la superficie apta para cultivos (Mesoamérica, Sudamérica y Asia); la creación de “parcelas flotantes” en las áreas pantanosas, que se fabricaban con barro y tierra colocado encima de una base de vegetación espesa (que en el caso de los aztecas se denominaban “chinampas”); La utilización de los *pet-kot*, huertos mixtos de bajo mantenimiento e incluían árboles frutales (nogales), enredaderas y cultivos perennes, cuyos frutos servían para su consumo directo. Estos “jardines agroforestales” constituyen probablemente la forma más antigua y de mayor resiliencia que puede exhibir un agroecosistema. Hacia el Medioevo (476-1789) en toda Europa, las sociedades feudales estaban caracterizadas por un sistema de jerarquías muy estricto, basado en el poder que ejercía el señor feudal, propietario de las tierras. La producción era llevada a cabo por sus vasallos, quienes recibían parte de los recursos que esta proveía a cambio de luchar junto con sus señores, en último caso responsables de su seguridad. El poder estaba en manos de linajes perpetuos, mientras que las familias campesinas servían a los señores por sucesivas generaciones. Entre 1492 y 1789 el sistema económico-social feudal empieza a fallar y es paulatinamente reemplazado por las sociedades industriales, donde los avances tecnológicos constituyen el corazón de cambios portentosos. En la actualidad, la sociedad posindustrial debate fuertemente la sustentabilidad económica, social y ambiental de la agricultura industrial esencialmente basada en el desarrollo del conocimiento científico anclado en las ideas de la iluminación y el positivismo desde los siglos XVI y XVII (Leguizamón, 2018).

Otro acontecimiento que generó un cambio rotundo en el sistema productivo moderno es la llamada “Revolución Verde”. El término “Revolución Verde” fue acuñado en 1968 por William Gaud, (administrador de la Agencia Estadounidense para el Desarrollo Internacional-USAID), para referirse al incremento sorprendente y repentino de la producción de granos que ocurrió en varios países en vías de desarrollo a mediados de los años ‘60. Este aumento fue producto, entre otras cosas, de la difusión de variedades de trigo y arroz de alto potencial de rendimiento desarrolladas después de la Segunda Guerra Mundial, con el objetivo de solucionar el problema de hambre en el mundo. Las semillas “milagrosas” se difundieron rápidamente gracias al importante apoyo de los Centros Internacionales de Investigación Agrícola (entre ellos el Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y Trigo (CIMMYT)) creados por las Fundaciones Ford y Rockefeller, y al poco tiempo también se desarrollaron nuevos tipos de arroz y de maíz. Esto significó un cambio sustancial del paradigma agrícola imperante hasta el momento: la disponibilidad y el uso de numerosas variedades (ecotipos, o razas locales) adaptadas a la variabilidad natural de los agroecosistemas, se sustituyó por algunas pocas variedades de alto potencial de rendimiento, las cuales brindaban una promesa teórica de alta productividad por unidad de área (rendimiento), en tanto y en cuanto el ambiente se adaptará a sus requerimientos. Es decir, necesitaban que se les suministraran las condiciones necesarias para expresar este potencial de rendimiento. Este intento por brindarles el ambiente adecuado a las nuevas variedades implicó que, paulatinamente, se incorporaran masivamente fertilizantes,

agroquímicos para el control de plagas, enfermedades y malezas, maquinarias, combustibles y riego tecnificado (Sarandón y Flores, 2014).

### **Paradigma agropecuario de Argentina.**

El concepto de paradigma es utilizado para remarcar un cambio en la forma en que una determinada sociedad organiza e interpreta la realidad. Un “paradigma Dominante” se refiere a valores o sistemas de pensamiento hegemónicos en una sociedad, en un momento determinado (vinculado a la denominada revolución verde) (Goites, 2022).

La política pública vinculada al sector rural en la Argentina de los últimos 25 años ha institucionalizado un sistema insumo-dependiente, anclado en la demanda externa y sustentado en un acentuado proceso de sojización cuya matriz de rentabilidad se asocia a un sostenido aumento de escala productiva (Pérez y Díaz, 2020). Desde la Organización Nacional hasta fines de la segunda década del siglo XX el sector agropecuario argentino creció intensamente, y la Argentina se convirtió en uno de los exportadores de granos, carnes, lanas y aceites más importantes del mundo. A partir de los años treinta del siglo pasado y durante las siguientes décadas, el sector atravesó un largo período de muy escaso progreso lindando con el estancamiento. Por ejemplo, el área cultivada en 1952 fue similar a la de 1904. A fines del siglo XX comenzó otro período de fuerte expansión que se prolonga hasta la fecha. A diferencia del primer gran crecimiento, sustentado por el aumento de las áreas cultivadas, en la presente coyuntura las mayores producciones resultan tanto del aumento de las áreas como de inversiones en tecnología que se reflejan en rendimientos unitarios más altos (Reca, 2006). En 1952, la producción agrícola argentina inició un proceso de recuperación. Hacia fines de la década de 1960, la agricultura experimentó una expansión que empezó con el trigo para luego, durante la década de 1970, trasladarse a la soja (Barsky y Gelman, 2008). En la última década, los cereales y oleaginosas se extendieron a 29.861.673 hectáreas de las cuales tres cultivos (trigo, soja y maíz) representaron el 77,1% (23.029.958 ha). Tres fenómenos explican principalmente este aumento general de la producción. Por un lado, la ampliación de superficie destinada a estos tres cultivos. En segundo lugar, hacia fines de 1970, aplicar la rotación trigo-soja-maíz que implicó poder efectuar 3 cosechas en 2 años, aumentando en un tercio la superficie aprovechada por los cultivos, que culmina con la doble cosecha de soja en la década de 1990. Por último, la incorporación del paquete tecnológico y los avances técnicos. Estos cambios repercutieron en los rendimientos por hectárea de cada cultivo. Los rendimientos por hectárea de soja, trigo maíz y girasol no dejaron de aumentar en los últimos 50 años, con particularidades. El maíz fue el cultivo que más aumentó su rinde por hectárea en este período. Este cultivo pasó de 2.709 kg por hectárea promedio, durante la década de 1970, a 6.517 kg como promedio en los últimos diez años. Mientras que la soja creció de 1.724 kg promedio en la década 1970 a 2.618 kg en la década de 2000, el trigo pasó de 1.537 a 2.456 kg por hectárea, respectivamente. Por su parte, el girasol comenzó el período con 768 kg, tuvo su pico en la década de 1990 con 1717 kg y los siguientes 10 años se ubicó en 1.669 kg promedio por ha. En síntesis, la superficie aumentó un 69,38% y el rendimiento por ha de cereales y oleaginosas un 161,26% (Cominiello, 2012). Este importante proceso de cambio tecnológico, particularmente impulsado inicialmente en la Región Pampeana, se dio en el agro-argentino,

generando cambios en el manejo, formas de producción, de apropiación de los recursos, del uso de la tierra y los recursos naturales, de cambio tecnológico, de intensificación en el uso de insumos, de nuevo conocimiento de gestión agropecuaria, de manejo del capital económico y financiero, de los recursos humanos y ciertamente de impactos y “*trade-offs*” ambientales y sociales pobremente evaluados, más allá de la escala creciente en la producción anual de los cultivos de exportación (Pengue, 2014).

Hubo un proceso agudo de adopción de tecnología, en un periodo de menos de 5 años, donde toda la producción sojera pasó a ser transgénica, con crecientes volúmenes exportables, llegando a la actualidad con la incursión de un nuevo estilo de difusión tecnológica con las nuevas sojas RR. Como resultado del proceso de introducción del cultivo de soja transgénica, se pasó de aproximadamente siete millones de hectáreas en 1996 a casi 20 millones en la campaña 2015-2016. Según la declaración del 3° Congreso Nacional de Médicos de Pueblos Fumigados, publicado en noviembre del 2015, en los últimos 25 años el consumo de agroquímicos aumentó un 983% (de 38 a 370 millones de kilos), mientras que la superficie cultivada aumentó un 50% (de 20 millones de ha a 30 millones de ha). En gran parte, este crecimiento se ha dado a costa de desplazar otras actividades productivas, como la lechería, la horticultura, la apicultura y la ganadería, entre otras, con un creciente impacto socioambiental (Spaggi *et al.*, 2016). Es cierto que la tecnificación de la agricultura ha incrementado, a través de un mayor rendimiento (por unidad de área) de los cultivos, la producción de alimentos en el mundo, pero no es menos cierto también, que esto ha estado basado en el uso de dosis masivas de insumos costosos y/o escasos: combustibles fósiles, plaguicidas, fertilizantes, semillas híbridas, maquinarias, agua para riego, etc. A su vez, este modelo de agricultura tampoco ha logrado solucionar el problema del hambre en la población mundial: actualmente hay 1.200 millones de personas desnutridas, con dietas que no cumplen el mínimo necesario de calorías (Sarandón y Flores, 2014).

Como características principales de este sistema productivo se pueden mencionar: dependencia creciente de agroquímicos (insecticidas, herbicidas, fungicidas, fertilizantes); contaminación de alimentos, aguas, suelos y personas por pesticidas y productos derivados del uso de fertilizantes sintéticos (nitratos y P en las aguas); desarrollo de resistencia a los plaguicidas de ciertas plagas y patógenos; pérdida de la capacidad productiva de los suelos, debido a la erosión, degradación, salinización y desertificación de los mismos.; pérdida de nutrientes de los suelos debida a la falta de reposición, junto con lixiviación y baja eficiencia en el uso de fertilizantes; colmatación de cuerpos de agua (sedimentos); eutrofización de embalses; disminución de los acuíferos en zonas de regadío; dependencia creciente de combustibles fósiles y la disminución de la eficiencia productiva en términos energéticos (cada vez se requiere más energía para mantener o aumentar la productividad de los cultivos); pérdida de biodiversidad: efecto de agroquímicos y simplificación de hábitats; pérdida de variabilidad genética de los principales cultivos (erosión génica); el desplazamiento de algunas técnicas de cultivo propias de agricultores/as tradicionales por la tecnología “moderna” supuestamente de aplicación universal (erosión cultural); contribución al calentamiento global del planeta y disminución de la capa de ozono; no ha sido aplicable a todos los agricultores/as; no ha solucionado el problema de la pobreza rural; entre otras (Sarandón y Sarandón, 1993). Los

problemas de resistencia de moléculas por parte de las plagas están bien documentados y existen varios casos conocidos. Para el año 1989, ya se contabilizaban 504 especies de insectos que habían desarrollado resistencia a uno o más pesticidas (PNUMA, 1990). En Salta, Argentina, en el año 2005, apareció un biotipo de sorgo de Alepo resistente al glifosato. La aplicación de un único herbicida (glifosato) durante un largo período de tiempo en grandes superficies (actualmente 20 millones de hectáreas de monocultivo de soja transgénica RR) ejerció una enorme presión de selección que favoreció la rápida selección de ecotipos resistentes (Sarandón y Flores, 2014).

En las últimas décadas la dinámica exhibida por el patrón hegemónico ha profundizado la fragmentación social en el seno del ámbito rural. Sin embargo, conjuntamente con este escenario aparecen dinámicas sociales movilizadoras protagonizadas por sujetos campesinos que intentan el tránsito hacia otras relaciones de producción basadas en la sostenibilidad, la redistribución, la justicia y la equidad (Pérez y Díaz, 2020). Lo anterior es remarcado por Cáceres *et al.* (2023) quienes en un estudio de análisis socio-productivo señalan que, durante las últimas dos décadas en la Provincia de Córdoba se ha producido un notable crecimiento de las actividades productivas vinculadas a la agroecología, y que tal vez, la medida más elocuente de este cambio lo representa la gran cantidad de ferias agroecológicas que se han creado durante los últimos años.

En el contexto anterior, la proliferación de un sistema agrícola productivo uniforme hace más limitada, pero no imposible, la posibilidad de hallar en el territorio nacional, explotaciones agropecuarias que difieran de esta tendencia productiva.

### **Agroecología como herramienta de cambio.**

La distribución de la tierra en América Latina es la más desigual del mundo y sigue agudizándose hasta niveles alarmantes en un contexto de crisis globales, entre ellas la alimentaria, que presiona enormemente la explotación de los recursos. Algunos datos señalan que en el conjunto de la región el 1% de las fincas acapara más de la mitad de la superficie productiva mientras que en el extremo opuesto, el 80% de las unidades agropecuarias son pequeñas fincas familiares situadas en áreas marginales que apenas utilizan el 13% del territorio (Oxfam, 2016). La presión sobre tierras y territorios ricos en recursos biodiversos es consecuencia, asimismo, de cuatro tipos de inversión de capital: una destinada a los agronegocios para el cultivo de materias primas alimentarias (*commodity*), otra a la forestación, basada en plantaciones para la producción de madera y papel; una tercera orientada a la extracción de minerales e hidrocarburos, y la cuarta vinculada con los agronegocios que, frente a la crisis energética, se orienta a la producción en monocultivo de agrocombustibles (Wiener, 2011).

Lo anterior, unido a la incidencia de las políticas neoliberales, los procesos fallidos de descentralización de la administración gubernamental y a los cambios en las estructuras estatales, está generando muchos conflictos sociales y eco-territoriales ya que aún hoy el problema de la tierra de los pueblos indígenas “Tiene sus raíces en el régimen de propiedad de la tierra” (Mariátegui, 1928). Son principalmente los territorios de los pueblos indígenas, para los cuales la tierra es fuente

de vida y parte esencial de su identidad, los que se han visto más fuertemente vulnerados por la irrupción de las concesiones para las industrias extractivas (minería, petróleo), los agronegocios y los megaproyectos (Dorrego, 2018). En Argentina existen al menos 9,3 millones de hectáreas de campesinos e indígenas que son pretendidas por el sector privado y estatal, según lo revela el primer informe oficial sobre conflictos rurales. La tierra en disputa equivale a 455 veces la superficie de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, son 857 casos y afecta a 63.843 familias. En la mitad de los casos, las familias campesinas e indígenas sufrieron violencia para que abandonen sus campos, el 64% de los conflictos comenzó en las últimas dos décadas y tiene relación con el modelo agropecuario (Spaggi *et al.*, 2016). Generalmente, el campesinado no es partícipe de los procesos de ordenamiento del territorio: es ignorado, desautorizado o desplazado de sus tierras sin previo aviso. También algunos campesinos tienen más acceso y control sobre los derechos a la tierra que otros. Los grupos minoritarios (incluyendo la población indígena) tienen menos poder sobre la tierra, al igual que sucede con las mujeres, quienes de forma general tienen menos acceso a la propiedad de la tierra y menos influencia a la hora de la toma de decisiones sobre el control y uso de esta (Dorrego, 2018).

Así, a partir de la década de 1980, la agroecología emergió, principalmente en América Latina, como una alternativa al modelo agrícola dominante, sirviendo de referencia a las ONG y a los agricultores más empobrecidos al permitirles comprender que los conocimientos y la formación de los agrónomos eran inadecuados para la realidad de la mayoría de los agricultores de los países de la región (Flores y Sarandón, 2014). La agroecología es considerada como una ciencia transformadora que debe implementarse en estrecho diálogo e interacción con las organizaciones de agricultores, en un constante proceso de innovación cognitiva, tecnológica y sociopolítica, íntimamente vinculada a los escenarios políticos y a movimientos de resistencia campesina e indígena (Altieri, 2016). Después de más de 30 años, la lucha de estos diferentes sectores, incluyendo a científicos e investigadores comprometidos, ha contribuido de manera decisiva en afirmar a escala mundial el carácter multifuncional, de identidad múltiple y plural, de la agricultura familiar, lo que motivó a que 2014 fuese declarado por la FAO como el Año Internacional de la Agricultura Familiar. Al año siguiente, en 2015, organizaciones sociales de todos los continentes se reunieron en el Foro Internacional sobre Agroecología y establecieron la Declaración de Nyéléni, referencia de ámbito mundial que expresa la visión, los principios y las estrategias comunes de la agroecología (Colin *et al.*, 2015).

La agroecología es hoy entendida y practicada en América Latina como el enfoque para la unificación de las banderas del movimiento campesino y de la lucha por la tierra, constituyendo un movimiento de organización política, de recuperación de la autoestima y de afirmación de identidades socioculturales. Es vista también como una estrategia de manejo técnico de los agroecosistemas para conservar los suelos, el agua y la biodiversidad; y para enfrentar las plagas por medio de la diversificación, la rotación y la integración de cultivos, árboles y animales y de la producción local de insumos. Por otra parte, la agroecología es entendida y practicada como una estrategia para la producción de comida sana y de alimentos saludables, para el incremento del autoconsumo y para la realización del derecho humano a la alimentación adecuada. También es una estrategia de

organización de las economías agrícolas para la generación de ingresos estables y de mercados sin intermediarios. Es el método de conservación y de libre intercambio de semillas nativas en la lucha contra los transgénicos. Es el camino para minimizar los riesgos climáticos a los que la agricultura es cada vez más susceptible. Es también un enfoque para la investigación participativa y el conocimiento y educación contextualizados, para el diálogo de saberes y para el intercambio de experiencias de campesino a campesino. La agroecología es una práctica, una ciencia y un movimiento (Wezel *et al.*, 2009). Por otro lado, la emergencia e institucionalización de la agroecología en Argentina forma parte de las respuestas frente a los procesos de transformación en los sistemas agroalimentarios que vienen ocurriendo hace tiempo (Pérez y Gracia, 2021).

### **Búsqueda de microorganismos benéficos para la agricultura.**

La búsqueda de microorganismos benéficos se dificulta en predios en que se utilizan agroquímicos. La utilización de agroquímicos en los sistemas de producción intensivos tiene una clara acción sobre la microbiota del suelo, afectando directamente las numerosas poblaciones de microorganismos nativos de interés biológico expuestas a este tipo de sustancias (Rivera *et al.*, 2010). Los agroquímicos son fuente de carbono y nitrógeno y se degradan principalmente por la actividad microbiana. La entrada continua de estos compuestos en el ecosistema del suelo puede afectar los microorganismos y su actividad, lo que ocasiona modificación de los procesos biológicos esenciales para la fertilidad y la productividad de los cultivos (Alvear *et al.*, 2006; Cycoñ *et al.*, 2010). La persistencia y dispersión de estos compuestos en el suelo depende de las propiedades físicoquímicas del agroquímico, de las características del suelo y las condiciones climáticas (Caldiz *et al.*, 2007; Hernández-Soriano *et al.*, 2007; Sawunyama y Bailey, 2001). Los pesticidas disminuyen la actividad de enzimas del suelo y pueden influir en la mayoría de las reacciones bioquímicas, entre ellas: la mineralización de la materia orgánica, la nitrificación, la desnitrificación, la amonificación, las reacciones redox, y la metanogénesis (Hussain *et al.*, 2009).

El suelo, y en especial la rizósfera, son los ambientes donde existe la mayor biodiversidad, debido a que es una región altamente favorable para la proliferación y actividad metabólica de numerosos microorganismos (Nannipieri *et al.*, 2003). El término rizósfera fue introducido por Hiltner en 1904 quien lo definió como la parte del suelo que es influenciada por el sistema radical (Hartman, 2005). Otra definición es la desarrollada por Foster en 1998; la rizósfera es el volumen de suelo influenciado por la presencia de raíces de una planta viva, cuya extensión puede variar de acuerdo con el tipo de suelo, la especie de planta, su edad y otros factores. Alrededor del 15% del área de las raíces se considera cubierta por microorganismos específicos (Sylvia *et al.*, 2005). La microflora de la rizosfera es dinámica, y presenta variación temporal y espacial (Shivanna y Vasanthakumari, 2011). Su estructura puede variar según las características del suelo, el tipo de fertilización, la especie vegetal y el área de la raíz considerada (Marschner *et al.*, 2004, Berg *et al.*, 2005). Burbano en 1989 aduce que la influencia de la rizósfera se extiende hasta 2 cm del rizoplaneo. Se estima que los exudados rizosféricos pueden llegar a contener entre 10 y 44% del carbono asimilado y otra serie de compuestos, lo que contribuye generalmente a un incremento de las densidades poblacionales de los microorganismos (Primavesi, 1984). La rizósfera es un nicho rico en nutrientes como resultado

de secreciones orgánicas constituidas por monómeros como glucosa y aminoácidos, polímeros como polisacáridos y proteínas, y restos de raíces (Hawes *et al.*, 2002) y excreciones (Uren, 2007). Como consecuencia, se pueden detectar niveles elevados de poblaciones de ácaros, nematodos y microorganismos (Bazin *et al.*, 1990), protozoos (Darbyshire y Greaves, 1973; Griffiths *et al.*, 2007) y algas (Saharan y Nehra, 2011).

Entre los microorganismos habitantes del suelo las bacterias, incluidos los Actinomicetos, son los más abundantes pues se les encuentra presentes en un rango aproximado de  $10^6$  y  $10^8$  células por gramo de suelo pesando aproximadamente 10.000 kg/ha, que representa el 5% del total de materia orgánica seca presente en el suelo (Rivera y Wright, 2013). La abundancia de bacterias en la rizósfera en comparación con otros microorganismos se puede deber a su rápido crecimiento y la habilidad que presentan de utilizar un amplio rango de sustratos como fuentes de carbono o nitrógeno (Glick, 1995). En cuanto a los hongos, dado su mayor tamaño, aunque menor abundancia, tienen la biomasa más significativa (Alexander, 1994; Tate, 1995), representando un 10 a 20 % de la microbiota total, esto es aproximadamente  $10^5$  a  $10^6$  organismos/g de suelo (Calvo-Vélez *et al.*, 2008).

En la biota benéfica se encuentran microorganismos que solubilizan y fijan nutrientes, producen sustancias promotoras del crecimiento vegetal, inducen la resistencia de las plantas a enfermedades o se comportan como antagonistas de agentes fitopatógenos (Rivera y Wright, 2013). En un sentido amplio, los microorganismos benéficos de la rizosfera incluyen simbiosis (ciertos Actinomicetes y hongos micorrízicos) y saprófitos de vida libre (Schippers *et al.*, 1987). También se encuentran hongos patógenos y simbióticos asociados a la rizosfera, en concentraciones de alrededor de  $10^5$  a  $10^6$  unidades formadoras de colonias por gramo de suelo rizosférico. Especies de Zygomycetes e Hyphomycetes son las que se establecen con mayor facilidad, dada su capacidad de metabolizar azúcares simples (Sylvia *et al.*, 2005). Entre las numerosas interacciones entre organismos benéficos y fitopatógenos en la rizosfera, se encuentran las que se establecen entre éstos últimos y sus antagonistas, fenómeno enmarcado en lo que se denomina control biológico, que según la definición clásica enunciada por Cook y Baker (1983) es la reducción de la cantidad de inóculo o de la actividad del patógeno capaz de producir enfermedad, obtenida por acción de uno o más organismos, distintos del hombre (Rivera y Wright, 2013).

### **Bibliografía.**

- Alexander, M. 1994. Introducción a la Microbiología del Suelo (2a. reimp.). México: AGT Editor, SA.
- Altieri, M. 2016. Impactos de la agroecología en algunos países latinoamericanos: una aproximación histórica. *LEISA. Revista de Agroecología*, 32(3), 5-9.
- Alvear, M. L., López, R., Rosas, A., y Espinoza, N. 2006. Efecto de la aplicación de herbicidas en condiciones de campo sobre algunas actividades biológicas. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*, 6(1), 64-76.

- Atkins, P. J., Simmons, I. G. y Roberts, B. K. 1998. People, land and time: an historical introduction to the relations between landscape, culture and environment. London: Edward Arnold. Routledge, 288pp.
- Barsky, O. y Gelman, J. 2008. Historia del agro argentino. Patrones en la ruta. El conflicto agrario y los enfrentamientos en el seno de la burguesía. Sudamericana - Ediciones RyR.
- Bazin, M. J., Markham, P., Scott, E. M. y Lynch, J. M. 1990. Population dynamics and rhizosphere interactions. Lynch, J.M. (Editor). Wiley & Sons. Chichester. *The Rhizosphere*, 99-127.
- Berg, G., Zachow, C., Lottmann, J., Götz, M., Costa, R. y Smalla, K. 2005. Impact of plant species and site on rhizosphere-associated fungi antagonistic to *Verticillium dahliae* Kleb. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4203-4213.
- Burbano, H. 1989. El Suelo: Una visión de sus componentes Biorgánicos. Colciencias-Universidad de Nariño. Pasto. Serie investigaciones, (1).
- Cáceres, D. M., Soto, G., Cabrol, D. y Estigarribia, L. 2023. La agroecología como modelo emergente en la producción agropecuaria: heterogeneidades, conflictos y cambios socioproductivos en la Provincia de Córdoba (Argentina). *Población y sociedad*, 30(1), 13-39.
- Caldiz, D. O., Rolon, D. A., Di Rico, J., y Andreu, A. B. 2007. Performance of dimethomorph + mancozeb applied to seed potatoes in early management of late blight (*Phytophthora infestans*). *Potato Research*, 50, 59-70.
- Calvo-Vélez, P., Reymundo-Meneses, L. y Zúñiga-Dávila, D. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altandinas. Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú. *Ecología Aplicada*, 7(1-2), 141-148.
- Cook, R. J. y Baker, K. F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul. Minnesota, USA. *The American Phytopathological Society*.
- Colin, A., Pimbert, M., Kiss, C. 2015. Construir, defender y fortalecer la agroecología: una lucha mundial por la soberanía alimentaria. Países Bajos: Ileia; *Center for Agroecology, Water and Resilience*.
- Cominiello, S. 2012. Cambios en los procesos de trabajo en la producción de cereales y oleaginosas, Argentina, 1970-2007. En *VII Jornadas de Sociología de la UNLP 5 al 7 de diciembre de 2012 La Plata, Argentina. Argentina en el escenario latinoamericano actual: Debates desde las ciencias sociales*. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación. Departamento de Sociología.
- Cycoń, M., Piotrowska Seget, Z.; y Kozdrój, J. 2010. Responses of indigenous microorganisms to a fungicidal mixture of mancozeb and dimethomorph added to sandy soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(4), 316-323.

- Darbyshire, J. F. y Greaves, M. P. 1973. Bacteria and protozoa in the rhizosphere. *Pesticide science*, 4(3), 349-360.
- Doebley, J. F. 1990. Molecular systematic of *Zea (Gramineae)*". *Maydica*, 35(2), 143-150.
- Dorrego, A. 2018. La situación actual de la tierra en América Latina: elementos para la reflexión. *Revista de Agroecología LEISA*, 34(4), 5-6.
- Foster, R. C. 1998. Microenvironments of soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*. 6, 189-203.
- Gepts, P. 2008. Tropical environments, biodiversity and the origin of crops. En: Moore P, Ming R (eds). *Genomics of tropical crop plants*, Springer, 1-20
- Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by freeliving bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(2), 109-117.
- Goites, E. D. 2022. Agroecología: Hitos hacia un nuevo paradigma alimentario en Argentina. *Eutopía: Revista de Desarrollo Económico Territorial*, (22), 142-154.
- Griffiths, B. S., Christensen, S. y Bonkowski, M. 2007. Microfaunal interactions in the rhizosphere, how nematodes and protozoa link above-and belowground processes. In *The Rhizosphere* (pp 57-71). Academic Press.
- Hartman, A. 2005. Prof. Dr. Lorenz Hiltner, a Pioneer in soil bacteriology and rhizosphere research. Hartman A, M. Schmid, WW Wenzel, P Hinsinger (Editores). *Rhizosphere: Perspectives and challenges, a tribute to lorenz hiltner*, 1-4
- Hawes, M. C., Bengough, G., Cassab, G. y Ponce, G. 2002. Root caps and rhizosphere. *Journal of plant growth regulation*, 21, 352-367.
- Hernández-Soriano, M. C., Mingorance, M. D., y Peña, A. 2007. Interaction of pesticides with a surfactant-modified soil interface: Effect of soil properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 306(1-3), 49-55.
- Hussain, S.; Siddique, T.; Saleem, M.; Arshad, M. y Khalid, A 2009. Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions. *Advances in agronomy*, 102, 159-200.
- Krapovickas, A. 2010. The domestication and origin of agriculture. *Bonplandia*, 19(2), 193-199.
- MacNeish, R. S. 1992. The origins of agriculture and settled life. *University of Oklahoma Press*, 365-403.
- Mariátegui, J. C. 1928. El proceso de la literatura. *7 ensayos de interpretación de la realidad peruana*, 191-296.

- Marschner, P., Crowley, D. y Yang, C. H. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and soil*, 261(1-2), 199-208.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi L., Pietramellara, G. y Renella, G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal Soil Science*, 54(4), 655-670.
- Leguizamón, E. S. 2018. Historia de la Horticultura. 1ra. Edición. Ediciones INTA.
- Oxfam. 2016. Desterrados: Tierra, poder y desigualdad en América Latina. Oxfam América. Disponible en: [http://209.177.156.169/libreria\\_cm/archivos/pdf\\_1485](http://209.177.156.169/libreria_cm/archivos/pdf_1485). Consultado: Junio 2019.
- Pengue, W. 2014. Cambios y escenarios en la agricultura argentina del Siglo XXI. Buenos Aires: GEPAMA.
- Pérez, A. E. y Díaz, J. R. 2020. La lógica alternativa en el sector rural argentino: el campesinado en los últimos 25 años (1990-2015). *Revista Americana de Emprendedorismo e Inovação*, 2(1), 142-155.
- Perez, D. y Gracia, M. A. 2021. Sentidos en disputa: el proceso de institucionalización de la agroecología en Argentina. *Revista Latinoamericana de estudios rurales*, 6 (12), 29.
- Persall, D. M. 1992. The origins of plant cultivation in South America. En: Wesley Cowan, C. y Watson, P. J. (Editores), *The origins of agriculture, An international perspective*. *Smithsonian Institution Press*, 173-205.
- PNUMA. 1990. Reseña del PNUMA. Programa de las Naciones Unidas Para el Medio Ambiente. Nairobi, Kenia. 48.
- Primavesi, A. 1984. Manejo Ecológico del Suelo. Editorial El Ateneo. Buenos Aires, Argentina.
- Reca, L. R. 2006. Aspectos del desarrollo agropecuario argentino 1875 -2005. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. *Sesión Pública Extraordinaria del 10 de Agosto de 2006*.
- Rivera, D., Camelo, M., Estrada, G., Obando, M. y Bonilla, R. 2010. Efecto de diferentes plaguicidas sobre el crecimiento de *Azotobacter chroococcum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 94-102.
- Rivera, M. C. y Wright, E. R. 2013. Interacciones entre fitopatógenos y microorganismos benéficos en la rizósfera. Capítulo 2. García de Salamone, I. E.; Vázquez, S.; Penna, C. y Cassán, F. (Editores). *Publicación Electrónica del Taller Internacional sobre Rizosfera, Biodiversidad y Agricultura Sustentable*.
- Saharan, B. S. y Nehra, V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Science Medical Research*, 21(1), 30.
- Sarandón, S. J. y Flores, C. C. 2014. Agroecología: bases teóricas para el diseño y manejo de agroecosistemas sustentables. 1a ed. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).

- Sarandón, S. J. y Sarandón, R. 1993. Un enfoque ecológico para una agricultura sustentable En: Goin, F. y Goñi, C. (Editores.) Bases para una política ambiental de la R. Argentina, Sección III, *Diputados de la Provincia de Buenos Aires*. 19, 279-286.
- Sawunyama, P. y Bailey, G. W. 2001. Modeling the interaction of agrochemicals with environmental surfaces: pesticides on rutile and organo-rutile surfaces. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 541(1-3), 119-129.
- Schippers, B., Bakker, A. W. y Bakker, P. A. H. M. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology*. 25(1), 339–358.
- Shivanna, M. B. y Vasanthakumari, M. M. 2011. Temporal and spatial variability of rhizosphere and rhizoplane fungal communities in grasses of the subfamily Chloridoideae in the Lakkavalli region of the Western Ghats in India. *Mycosphere*, 2, 255-271.
- Spaggi, E., Ottmann, G., Miretti, A., Alesio, C. y Frattin, M. 2016. Agroecología en la región pampeana argentina: indicadores para la evaluación y sistematización. *Revista de Agroecología LEISA*, 32(3), 26-28.
- Smith, B. D. 1997. The initial domestication of *Cucurbita pepo* in the Americas 10 000 years ago. *Science*, 276(5314), 932-934.
- Smith, B. D. 1998. The emergence of agriculture. Freeman Press, New York.
- Smith, B. D. 2005. Reassessing Coxcatlan cave and the early history of domestication plants in Mesoamerica. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(27), 9438-9445.
- Sylvia, D., Fuhrmann, J., Hartel, P. y Zuberer, D. 2005. Principles and Applications of Soil Microbiology. *Pearson Education*, 640.
- Tate R. L. 1995. Soil microbiology. John Wiley & Sons, New York, EEUU.
- Uren, N. C. 2007. Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. Pinton, R; Varanini, Z. y Nannipieri, P. (Editores). The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil Plant Interface. Taylor and Francis. Boca Raton. pp. 1-21.
- Vavilov, N. I. 1926. Studies on the origin of cultivated plants. *Institut de Botanique Appliquée et d'Amélioration des Plantes*.
- Wezel, A., Bellon, S., Doré, T., Francis, C. y Vallod, D. 2009. Agroecology as a science, a movement and a practice. A review. *Agronomy for sustainable development*, 29, 503-515.
- Wiener, E. 2011. La concentración de la propiedad de la tierra en América Latina: Una aproximación a la problemática actual. Coalición Internacional para el Acceso a la Tierra. Disponible en:

[http://www.landcoalition.org/sites/default/files/documents/resources/LA\\_Regional\\_ESP\\_web\\_16.03.11.pdf](http://www.landcoalition.org/sites/default/files/documents/resources/LA_Regional_ESP_web_16.03.11.pdf) Consultado: abril 2018.

## **Capítulo 2: Tomate (*Solanum lycopersicum*), *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Bemisia tabaci*: Antecedentes.**

### **Resumen.**

En este capítulo se presenta información detallada sobre el cultivo de tomate, su taxonomía, hábitos de crecimiento, requerimientos edafoclimáticos, centro de origen, importancia económica y principales plagas. Así mismo se presenta información sobre los fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* y sobre el insecto *Bemisia tabaci*.

### **Taxonomía del tomate.**

El tomate, *Solanum lycopersicum* L. o su denominación anterior *Lycopersicon esculentum* Mill., que aún es ampliamente utilizada, pertenece a la familia Solanaceae (Allende, 2017). Esta familia, es una de las más grandes e importantes entre las angiospermas, comprende unas 2.300 especies agrupadas en 96 géneros (Arcy, 1979).

De acuerdo con el Código Internacional de Nomenclatura Botánica del año 2000, al tomate se le ubica dentro del Reino *Plantae*, Subreino *Tracheobionta*, División *Magnoliophyta*, Clase *Magnoliopsida*, Subclase *Asteridae*, Orden *Solanales*, Familia Solanaceae, Subfamilia *Solanoidea*, Tribu *Solanea*. De igual manera, hay investigadores que han pretendido ubicar al tomate dentro del género *Solanum* y la especie *lycopersicum* (Child, 1990; Olmstead *et al.*, 1999; Peralta y Spooner 2001; Spooner *et al.*, 2005).

### **Hábito de crecimiento del tomate.**

Chamarro (1995) indica que el tomate es una especie que posee crecimiento simpodial, cuyo tallo forma cinco hojas antes que la yema principal se transforme en inflorescencia. Además, el crecimiento puede ser determinado e indeterminado. El primero de ellos, tiene los tallos terminados en ramillete floral con un período limitado de floración y son usados principalmente para cultivo industrial al aire libre. Las variedades con crecimiento indeterminado producen inflorescencias de forma continua y son cultivadas en invernadero y usadas principalmente para consumo fresco (Kinet y Peet 1997).

### **Requerimientos edafoclimáticos del cultivo de tomate.**

La temperatura óptima de desarrollo del cultivo oscila entre 20° C y 30° C durante el día y entre 10° C y 17° C durante la noche. Temperaturas superiores a los 30° C reducen la fructificación y la fecundación de los óvulos, afectan el desarrollo de los frutos y disminuyen el crecimiento y la biomasa de la planta. Las plantas de tomate se desarrollan mejor con temperaturas de entre 18° C y 24° C. Temperaturas diurnas inferiores a 12-15° C pueden originar problemas en el desarrollo de

la planta, mientras que temperaturas diurnas superiores a 30° C e inferiores a 12° C afectan la fecundación (Díaz, 2007).

La Humedad Relativa (HR) óptima, que se ubica entre 60 % y 80 %, favorece el desarrollo normal de la polinización y garantiza una buena producción. El exceso o déficit de HR produce desórdenes fisiológicos y favorece la presencia de enfermedades. Una humedad relativa superior al 80 % favorece la permanencia de enfermedades aéreas, el agrietamiento del fruto y dificulta la fecundación, ya que el polen se humedece y hay aborto floral. Una alta humedad relativa y una baja iluminación reducen la viabilidad del polen y pueden limitar la evapotranspiración, disminuir la absorción del agua y los nutrientes, generar déficit de elementos como el calcio e inducir desórdenes fisiológicos. Una humedad relativa menor al 60 % dificulta la polinización. Cuando la luminosidad es reducida, ello puede afectar en forma negativa a los procesos de floración, fecundación y desarrollo vegetativo de la planta. Durante los periodos críticos del desarrollo vegetativo de la planta la interrelación entre la temperatura diurna, nocturna y la luminosidad es fundamental (Infoagro Systems S. L., 2016). Por tal motivo se recomienda no cultivar tomate en sitios que permanecen nublados, ya que los rendimientos disminuyen considerablemente (INTA, 2014). En el ámbito mundial las zonas donde más se ha adaptado esta especie son las de clima templado, ubicadas entre 1000 y 2000 m s. n. m. en ambientes protegidos (Vallejo, 1999). En la actualidad se encuentran cultivares adaptados a rangos de altitudes más amplios. Su cultivo no es muy exigente en términos de suelo, excepto en lo que respecta al drenaje; no obstante, se obtienen mejores resultados en suelos profundos (de 1 m o más de profundidad), de texturas medias, permeables y sin impedimentos físicos en su perfil. Tolera la acidez y crece adecuadamente en pH de 5,0 a 6,8. Es medianamente tolerante a la salinidad, con valores máximos de 6400 ppm (10 mmho) (Infoagro Systems S. L., 2016).

### **Centro de origen del tomate.**

El centro de origen del tomate se encuentra en la zona Andina ahora rodeada por Colombia, Perú, Chile, Bolivia y Ecuador. El lugar y tiempo en el cual fue domesticado no se conoce con exactitud, aunque se estima que la zona de domesticación fue el sur de México y el norte de Guatemala donde existe el mayor grado de variabilidad de la planta (Sims, 1980).

### **Importancia económica del cultivo del tomate.**

Estimaciones de la FAO indican que el tomate es la hortaliza más cultivada e importante en el mundo, alcanzando en 2013; 4,7 millones de hectáreas y una producción de 164 millones de toneladas (Allende, 2017). En los últimos años, las exportaciones mundiales de tomate fresco refrigerado promedian un volumen cercano a 6 millones de toneladas. Esta cantidad representa apenas el 0,04% de la producción mundial (Vitieri *et al.*, 2013). El 52 % la superficie destinada a su cultivo en 2013 (fresco e industrializado) se concentró en cuatro países: China (20.9 %), India (18.8 %), Turquía (6.6 %) y Nigeria (5.8 %). Según la Secretaría de Alimentos y Bioeconomía (2018), aproximadamente el 90% de la producción mundial para industria se destina a la elaboración de

pasta y el 10% restante a tomate pelado. Los principales países productores son Estados Unidos, Italia, China y España. El aumento de la producción mundial de tomates se debe principalmente a aspectos tecnológicos, y en menor medida al incremento de la superficie total cultivada (15%) (Vitieri *et al.*, 2013).

En América, México contribuye 19% de volumen de las exportaciones a nivel mundial, ubicándolo como el principal país exportador por arriba de España (14%) y Países Bajos (13%) (FAO, 2020). En Sudamérica, el principal productor es Brasil, seguido de Chile y Argentina (FAO, 2022). La producción argentina asciende a 767.000 t y 11.800 ha, con un rendimiento promedio de 67 t ha<sup>-1</sup>. Las principales regiones productivas de esta hortaliza se encuentran en la provincia de Buenos Aires: La Plata, Florencio Varela, Mar del Plata, entre otras localidades, en el noroeste argentino (Región NOA): Salta, Jujuy y Tucumán, en el noreste argentino (Región NEA): Corrientes y en Cuyo: Mendoza y San Juan (Suazo-Castro, *et al.*, 2023). Dentro de Buenos Aires, la principal zona productiva está ubicada en la localidad de La Plata y alrededores (Cinturón Hortícola Platense). Este Cinturón abarca unas 7.000 ha, representando la mayor superficie de la provincia destinada a la producción de hortalizas; concentrando una de las mayores áreas de superficie cubierta por invernaderos, la que se estimó en 2016 en 5.462 ha (Miranda, 2018).

Según informes de La Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (2023), la balanza comercial del sector industrial desde el año 2010 hasta el 2022 fue deficitaria para cada año. El 42% de las exportaciones argentinas (en volumen) correspondieron a "Tomates preparados o conservados s/vinagre o Ácido acético, excluidos enteros, trozos o jugos", y un 31% a "Kétchup" y otras salsas de tomate en envases <= a 1kg. Las exportaciones tienen como principal destino Paraguay, Uruguay y Brasil. El 81% de las importaciones se correspondieron a "tomates preparados o conservados s/vinagre o ácido acético, excluidos enteros, trozos o jugos" y un 12% de "tomates enteros o trozos, preparados o conservados, s/vinagre o ácido acético". Los principales proveedores del mercado argentino son Chile, China e Italia.

### **Principales enfermedades e insectos herbívoros en el cultivo de tomate.**

El cultivo del tomate es afectado por factores bióticos y abióticos que influyen directamente en rendimiento y los costos productivos. Entre los problemas bióticos más comunes e incidentes en el cultivo, se encuentran el ataque por insectos herbívoros y enfermedades causadas por hongos, pseudohongos (Reino Straminipila), bacterias, Mollicutes, nematodos y virus. El ataque de insectos herbívoros genera no sólo un daño directo, sino que también un daño secundario al transmitir enfermedades virósicas. La mayoría de los virus vegetales son transmitidos de planta en planta por agentes vectores: insectos (pulgonos, mosquitas blancas, trips), nematodos, ácaros y hongos. Estos agentes vectores son capaces de provocar heridas que hacen posible la diseminación horizontal de los virus fitopatógenos (Sepúlveda, 2011).

### **Principales enfermedades fúngicas del cultivo de tomate en Argentina.**

Tizón temprano (*Alternaria solani* Sorauer, (1896)); Mancha gris (*Stemphylium solani* G.F. Weber, (1930)); Marchitez por fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* Schldt., (1824)); oidiopsis (*Leveillula taurica* Lév., (1842)); Mal de los almácigos (damping off): *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp.; y *Phytium* spp.; Moho gris (*Botrytis cinerea*); Podredumbre por colletotrichum (*Colletotrichum* spp.); Moho de la hoja (*Fulvia fulva* (Cooke) Cif., (1954)); Moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum*); Marchitez por verticillium (*Verticillium dahliae* Klebahn, (1913)); Tizón tardío del tomate (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, (1876)); podredumbre basal (*Sclerotium rolfsii* Sacc., (1911)) (Colombo, 2002.; Sandoval, 2004; Flores, 2012; Martinez-Ruiz *et al.*, 2016).

### **Principales enfermedades bacterianas del cultivo de tomate en Argentina.**

Marchitamiento bacteriano (*Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi *et al.* (1996)); Médula hueca (*Pseudomonas corrugata* Roberts and Scarlett (1981) emend. Sutra *et al.* (1997)); Cancro Bacteriano (*Clavibacter michiganensis* (Smith 1910) Davis *et al.* (1984)); Mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.); Podredumbre blanda (*Pectobacterium carotovora* subsp. *Carotovora* (Jones (1901) Hauben *et al.* 1999 emend. Gardan *et al.* 2003) (Colombo, 2002; Flores, 2012).

### **Principales enfermedades virósicas del cultivo de tomate en Argentina.**

Begomovirus (Especies de begomovirus); Hojas cordón de zapato (Cucumber mosaic virus); Peste negra "Groundnut ringspot virus", "Tomato spotted wilt virus" y "Tomato chlorotic spot virus" (Colombo, 2002; Flores, 2012).

### **Principales plagas de insectos del cultivo de tomate en Argentina.**

Mosca Blanca (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood, (1856) y *Bemisia tabaci*); Trips (*Frankiniella occidentalis* Pergande, (1895)); Arañita roja (*Tetranychus urticae* C.L. Koch, (1836)); Polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick (1917)) (Mitidieri y Polack, 2012).

### **Principales enfermedades e insecto plaga del cultivo del tomate en Argentina seleccionadas para este estudio.**

En este trabajo se seleccionaron 2 de las principales enfermedades fúngicas del cultivo del tomate en Argentina; *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* y el insecto vector en tomate de Begomovirus *Bemisia tabaci*. Estas fueron seleccionadas por ser de las plagas que causan mayores

pérdidas en las producciones de este cultivo, así como también la frecuencia de aparición entre temporadas.

#### **Antecedentes, taxonomía e importancia de *Sclerotinia sclerotiorum*.**

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, (1884) agente causal de podredumbres húmedas del tallo, hoja, es un hongo extremadamente polífago (Boland y Hall, 1994) que causa podredumbre y muerte de plantas en cultivos intensivos y extensivos, malezas y especies silvestres. A nivel mundial (Purdy, 1979; Bolton *et al.*, 2006; Saharan y Mehta, 2008) y nacional (Mitidieri, 1975; 1980) está entre los patógenos de mayor importancia económica.

La clasificación taxonómica de este hongo (teleomorfo), dada por el Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas (SINAVIMO) (2019) es: Eucariota, Reino: Fungi; Phylum: Ascomycota; Clase: Leotiomycetes; Orden: Helotiales; Familia: Sclerotiniaceae; Género: *Sclerotinia*; Especie: *Sclerotinia sclerotiorum*.

Los síntomas causados por *S. sclerotiorum* en los hospedantes estudiados son muy diversos. Por lo general incluyen marchitamiento, detención del crecimiento y frecuentemente muerte de plantas y destrucción de los órganos cosechados. Los tejidos invadidos por el hongo muestran una podredumbre de consistencia blanda a semiblanda, de color pardo claro a castaño, a veces con tintes rojizos. Ésta, por último, puede terminar con la total destrucción del tejido parenquimático perdurando sólo los elementos lignificados, tales como los haces vasculares, en forma de un enriado (capítulos de girasol, tallos de diversas plantas). Con frecuencia se observan anillos concéntricos pardos en la superficie de tallos y ramas afectados. En tomate (*S. lycopersicum*), se ha registrado infección basal y aérea en frutos observada en el campo y en invernadero (Dehley, *et al.*, 2009).

Todas las especies de *Sclerotinia* poseen en su ciclo de vida un estado asexual y un estado sexual. El primero está caracterizado por el micelio tabicado de color blanco y los esclerocios, estructuras de resistencia de color negro. También pueden producirse microconidios hialinos y globosos que se forman superficialmente sobre el micelio aéreo en cultivo, sobre la superficie de los apotecios o sobre la superficie de los esclerocios (Kohn, 1979b). El estado sexual se caracteriza por la formación de apotecios que llevan ascos y ascosporas (Kohn, 1979a). En particular *S. sclerotiorum* posee ascosporas cuya relación largo/ancho es mayor que 2 y suelen ser binucleadas. El esclerocio es relativamente grande en comparación a los formados por las otras dos especies del género, suele poseer forma irregular, algunos pueden medir entre 1y 5 cm (Kohn, 1979b). Las especies de *Sclerotinia* producen esclerocios en el material de la planta infectada y en el cultivo. Las dimensiones de estos esclerocios fue un posible criterio para separar las especies de *Sclerotinia*. La presencia de pequeños esclerocios separa fácilmente a *Sclerotinia minor* Jagger, (1920) de *S. sclerotiorum* y *Sclerotinia trifoliorum* Eriksson, (1880), que tienen esclerocios más grandes (Letham *et al.*, 1978; Kohn, 1979a; Wong, 1979; Petersen *et al.*, 1982; Tariq *et al.*, 1985).

La formación del esclerocio involucra la acumulación de hifas que forman una masa suave de color blanco, que luego de la maduración, pasa a ser una masa compacta y dura como consecuencia de

la melanización de la capa más externa que suele poseer hasta tres células de espesor (Jones, 1970). Esta capa externa constituye la corteza y está formada por hifas de paredes melanizadas, oscuras y muy engrosadas que rodean a la médula pseudoparenquimotosa laxa, embebida en una matriz fibrilar (Lamarque, 1976) que suele formar un continuo con las gotas de la superficie del esclerocio (Colotelo, 1974; Saito, 1974). Al madurar, la pared original quitinosa de las hifas internas se cubre con una delgada capa fibrilar. En presencia de nutrientes se produce la germinación de los esclerocios que llevará a la infección del hospedante. La germinación puede ser miceliogénica o carpogénica. En la germinación miceliogénica los esclerocios dan origen a micelio que infecta directamente las raíces y base del tallo de los hospedantes produciendo marchitamiento (Huang y Dueck, 1980; Huang y Hoes, 1980). En la germinación carpogénica, que suele verse favorecida con menor disponibilidad de nutrientes, los esclerocios producen apotecios que originan los ascos que contienen las ascosporas, que podrán infectar las partes aéreas causando podredumbre en diversos tejidos del vástago de los hospedantes (Le Torneau, 1979). Se ha observado que la germinación del esclerocio depende de diversos factores entre los que pueden mencionarse el grado de madurez de estos, que es afectado por las condiciones presentes durante su formación, el lugar donde quedaron ubicados y las condiciones ambientales en el momento de la germinación (Pereyra y Bazzalo, 1991). Algunos autores consideran que en condiciones de baja humedad se produce el ataque por crecimiento de micelio infectando tallos jóvenes directamente. Se ha observado que, luego de una etapa de frío como un período invernal, los esclerocios pueden germinar o bien permanecer en dormición por años (Coley-Smith y Cooke 1971; Cook *et al.*, 1975; Adams y Ayers, 1979).

#### **Antecedentes, taxonomía e importancia de *Botrytis cinerea*.**

*Botrytis cinerea* Pers.: Fr (teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel), agente causal de la “podredumbre gris”, infecta más de 200 especies vegetales distintas, determinando serias pérdidas económicas antes y después de la cosecha (Jarvis, 1977). Este hongo se encuentra entre los patógenos más importantes de los cultivos intensivos y ocasiona síntomas tales como manchas, pudrición y tizón sobre los órganos aéreos (hojas, brotes, flores, frutos) de numerosas especies hortícolas, florícolas y frutícolas (Nome *et al.*, 2016; Petrone *et al.*, 2016).

La clasificación taxonómica de este hongo (teleomorfo), dada por el Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas (SINAVIMO) (2019) es: Eucariota, Reino: Fungi; Phylum: Ascomycota; Clase: Leotiomycetes; Orden: Helotiales; Familia: Sclerotiniaceae; Genero: *Botryotinia*; Especie: *Botryotinia fuckeliana* - *Botrytis cinerea* (Anamorfo).

*Botrytis cinerea* es difícil de controlar satisfactoriamente con fungicidas porque el hongo es genéticamente variable y ha desarrollado cepas resistentes a muchos de los químicos utilizados en los últimos 20 años. El control químico de las enfermedades causadas por *B. cinerea* ha dependido en gran medida del uso de los fungicidas con los ingredientes activos benzimidazol y dicarboximida. Sin embargo, hoy en día es común detectar aislamientos de *B. cinerea* resistentes a la dicarboximida (Sansone *et al.*, 2005). La diversidad somática, metabólica y genética reportada por este hongo ha sido atribuida a la heterocariosis y aneuploidia. También es aceptado que la recombinación sexual

juega algún rol, pero esta fase sexual es raramente observada en el campo (Williamsom *et al.*, 2007). *B. cinerea* aparece compuesto por dos genotipos, *B. transposa* y *B. vacuma* los cuales son considerados especies (Giraud *et al.*, 1999).

En el ciclo de infección las esporas de *B. cinerea* pueden ser producidas sobre cualquier material vegetal y transportadas a grandes distancias por corrientes de aire (Jarvis, 1977). Es un hongo cosmopolita, ubicuo y sumamente polífago, que sobrevive como saprófito en restos vegetales en forma pasiva como esclerocios negros, los cuales pueden formarse en los diferentes tejidos afectados o en postcosecha. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección (SINAVIMO 2019). Las temperaturas óptimas para el desarrollo de *B. cinerea* son entre 15-25° C (Janisiewicz y Korsten, 2002), sin embargo, el patógeno también es activo a temperaturas más bajas, pudiendo germinar y desarrollarse el conidio a temperaturas tan bajas como 0° C. En condiciones favorables el ciclo de infección completo puede ocurrir en 3 a 4 días dependiendo del tipo de hospedante y tejido atacado. Se requiere una humedad relativa superior a 95 % para el desarrollo de la enfermedad (Barnes y Shaw, 2002).

Las pérdidas mundiales de este hongo representan el 20 % de la cosecha de los cultivos afectados y el costo generado se estima en 10-100 millones de euros por año. El tamaño de mercado de los productos químicos anti-botrytis (Botryticidas) ha sido aproximadamente de 15 a 25 millones de dólares en los últimos 3 años (Zhao *et al.*, 2009). Algunas de las razones que explican la dificultad para su control son: a) es un patógeno sumamente polífago, b) algunos cultivos y partes de plantas son altamente susceptibles, c) tiene una alta capacidad saprófita, d) es común la aparición de fenómenos de resistencia a los fungicidas, e) el ambiente del invernáculo, con alta humedad relativa y agua libre, favorece el rápido desarrollo y la esporulación prolífica y f) esporula rápidamente sobre tejidos enfermos y senescentes. La acción mecánica asociada con la cosecha y transporte de las flores libera y dispersa conidios en el ambiente del invernáculo. Las gotas de agua provenientes del riego o de la aplicación de pesticidas dispersan los conidios, que pueden permanecer en dormición al menos 3 semanas antes de germinar. Es una especie altamente variable, capaz de adaptarse a muchas condiciones ambientales, y también produce infecciones asintomáticas (Hausbeck y Moorman, 1996).

#### **Antecedentes, taxonomía e importancia de *Bemisia tabaci*.**

*Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889): Conocida comúnmente como “mosca blanca”, es un hemíptero hemimetábolo perteneciente a la familia de los Aleyroideae, capaz de parasitar una gran cantidad de cultivos (Cuthbertson *et al.*, 2005). *B. tabaci* presenta cuatro estadios: huevo, ninfa y adulto (Byrne y Bellows, 1991). Los adultos suelen colonizar los brotes tiernos de las plantas, permaneciendo las ninfas en el mismo lugar hasta completar su desarrollo. *B. tabaci* ocupa generalmente las hojas de los estratos bajos o medios con distribuciones irregulares (Gill, 1990). La hembra adulta deposita sus huevos pedicelados verticalmente sobre la superficie de la hoja, generalmente en el envés. Los huevos suelen disponerse de forma aislada o agrupadas y

habitualmente están recubiertos de una secreción cerosa blanca. La ninfa presenta cuatro estadios: La ninfa 1 (que es el único estadio móvil) emerge del huevo, se desplaza sobre la hoja y finalmente se fija a ella con el pico de su aparato bucal. Generalmente se instalan cerca de alguna nervadura foliar, perdiendo desde ese momento su capacidad de movimiento. El resto de los estadios ninfales son sésiles, elípticos y aplanados. El cuerpo de la ninfa 1 mide 0,3 mm de longitud y 0,15 mm de ancho, en este estadio es donde se presenta la mayor mortalidad. Las ninfas de segundo y tercer estadio son casi idénticas entre sí, más amarillas y grandes que el primer estadio. El cuerpo de la ninfa 2 mide 0,4 mm de largo y 0,2 mm de ancho, y el cuerpo de la ninfa 3 presenta 0,54 mm de largo y 0,3 mm de ancho. La ninfa 4 o pseudo-pupa, se distingue por su color amarillo más intenso y porque se pueden apreciar los ojos del adulto como dos pequeñas manchas rojizas laterales. El cuarto estadio de la ninfa se subdivide en temprano, medio y tardío según la presencia o ausencia de alimentación y los cambios morfológicos. La ninfa 4 recién formada presenta un cuerpo ovalado y aplanado de color translucido, pero a medida que avanza su desarrollo se torna opaca y su cuerpo se engrosa. La emergencia del adulto del pupario se produce a través de una hendidura en forma de “T”, quedando dicho pupario vacío en la hoja (Mound y Halsey, 1978; Gill, 1990; Byrne y Bellows, 1991).

*Bemisia tabaci* es el único vector reportado para *Begomovirus*. De todas las especies de moscas blancas, sólo *B. tabaci* transmite algunos virus de la familia *Geminiviridae* (*Begomovirus*) de manera persistente. Si bien otros tipos de moscas blancas transmiten otros virus, como *Crinivirus* e *Ipomovirus* de manera semipersistente y los *Carlavirus*, *Nepovirus* y algunos *Ipomovirus* de manera no persistente, se estima que éstos no constituyen grupos virales de importancia que causan pérdidas significativas en cultivos hortícolas. Por otro lado, los *Begomovirus* sí causan pérdidas significativas en muchos países (Bedford *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995; Wahyono, *et al.*, 2023; Varma y Singh, 2024.).

Si bien no existe certeza del momento exacto en que la mosca blanca ingresó a Argentina, se registraron tanto *B. tabaci* como *T. vaporariorum* en la década de 1980-1990 (Viscarret y Botto, 1996; Botto, 1999). Se encontró a *B. tabaci* como plaga predominante en plantaciones de soja, algodón y cultivos hortícolas, mientras que *T. vaporariorum* se registró mayoritariamente en cultivos hortícolas bajo cubierta (Viscarret y Botto 1996; Viscarret, 2000). Además, a partir del año 2000 se registró la transmisión de virus por *B. tabaci* en Bella Vista, Corrientes, provocando importantes daños en los cultivos de esa zona (Cáceres *et al.*, 2005a; 2005b). Desde 2001 se ha convertido en una de las principales plagas de cultivos hortícolas en todo el país (Chacón-Castro y López, 2010). En San Juan se ha detectado su presencia afectando cultivos de melón desde 2005 (Cortez, 2008). Se pensaba que las poblaciones de mosca blanca en la Argentina pertenecían al biotipo MEAM 1 (Middle East-Asia Minor 1), pero se ha observado la presencia de un complejo críptico de especies nativas de *B. tabaci* afectando cultivos de algodón y soja denominadas complejo “New World 2” en la Región Pampeana (Alemandri *et al.*, 2012). Este nuevo complejo, junto con el MEAM1, ha sido detectado también en zonas centrales del país, como Córdoba (Alemandri *et al.*, 2014).

## Bibliografía.

- Adams P. B. y Ayers, W. A. 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. Symposium of *Sclerotinia*. *Phytopathology*, 69(8), 896-899.
- Allende, M. 2017. Manual de cultivo de tomate riñón bajo invernadero. Importancia y consideraciones del cultivo de tomate. Santiago, Chile: INIA. Boletín Técnico, (12).
- Arcy, W. G. 1979. The classification of the Solanaceae. En: "Hawkes, J. G.; Lester, R. N.; Skelding, A. D. (Eds). The Biology and Taxonomy of the Solanaceae. Academic Press, New York & London". 3-48.
- Alemandri, V., De Barro, P., Bejerman, N., Argüello Caro, E. B., Dumón, A. D., Mattio, M. F., Rodriguez, M. S. y Truol, G. 2012. Species within the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) complex in soybean and bean crops in Argentina. *Journal of Economic Entomology*, 105(1), 48-53.
- Alemandri, V., Martino, J. A., Di Feo, L. y Truol, G. 2014. Indigenous and introduced species of the *Bemisia tabaci* complex in sweet potato crops from Argentina. *Agriscientia*, 31(2), 103-107.
- Barnes, S. E. y Shaw, M. W. 2002. Factors affecting symptom production by latent *Botrytis cinerea* in *Primula polyantha*. *Plant Pathology*, 51(6), 746-754.
- Bedford, I. D., Briddon, R. W., Markham, P. G., Brown, J. K. y Rosell, R. C. 1994. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Annals of Applied Biology*, 125(2), 311-325.
- Boland, G. J. y Hall, R. 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16(2), 93-108.
- Bolton, M. L., Thomma, B. P. H. J. y Nelson, B. D. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 7(1), 1-16.
- Botto, E. 1999. Control biológico de plagas hortícolas en ambientes protegidos. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 58(1-2), 58-64.
- Brown, J. K., Frohlich, D. R. y Rosell, R. C. 1995. The sweet- potato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a new species complex?. *Annual Review of Entomology*, 40(1), 511-534.
- Byrne, D. N. y Bellows, T. S. 1991. Whitefly Biology. *Annual Review of Entomology*, 36(1), 431-57.
- Cáceres, S., Aguirre, M. R. A. y Miño, V. S. 2005a. El parasitoide *Eretmocerus mundus* Mercet controla mosca blanca *Bemisia tabaci* biotipo B en pimiento de Corrientes. XII Congreso Latinoamericano de Horticultura General Roca, Río Negro Argentina, 6-8 /9/05. *Libro resúmenes*, p. 310.
- Cáceres, S.; Aguirre, M. R. A. y Miño, V. S. 2005b. Evolución de *Bemisia tabaci* biotipo B en pimiento en invernadero en Bella Vista, Corrientes. XII Congreso Latinoamericano de Horticultura General Roca, Río Negro, Argentina, 6-8 /9/05. *Libro resúmenes*, p. 310.

- Chacón-Castro, Y. y López, S. N. 2010. Biología de *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoide del complejo *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae), en condiciones de laboratorio. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 69(1-2), 45-56.
- Chamarro, J. 1995. Situación anatomía y fisiología de la planta. En: El cultivo del tomate. F. Nuez (Editor). *Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España*. 43-91.
- Child, A. 1990. A synopsis of *Solanum* subgenus Potatoe (G. Don) D' Arcy (Tuberatum (Du) Bitter (s. 1.)). *Feddes Repertorium*, 101(5-6), 209-235.
- Coley Smith, J. R. y Cooke, R. C. 1971. Survival and germination of fungal sclerotia. *Annual review of phytopathology*, 9(1), 65-92.
- Cook, G., Steadman, Y. y Boosalis, M. 1975. Survival of *Whetzelinia sclerotiorum* and initial infection of dry edible beans in Western Nebraska. *Phytopathology*, 65, 250-255.
- Colombo, M. H. 2002. Manejo de enfermedades en cultivos protegidos de tomate. *Publicación Técnica INTA N° 04*.
- Colotelo, N. 1974. A scanning electron microscope study of developing sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany*, 52(5), 1127-1130.
- Cortez, S. 2008. Cultivo de melón: Mosca blanca. Producción Agropecuaria. *EEA INTA San Juan Boletín N° 17*.
- Cuthbertson, A.; Walters, K. y Deppe, C. 2005. Compatibility of the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* and insecticides for eradication of sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Mycopathologia*, 160, 35-41.
- Dehley, R., Kiehr, M., Allievi, M. I., Lusto, J., Frayssinet, S., Sidoti Hartmann, B., Kröger, I., Paoloni, P. J., Zappacosta, D., Servera, A. 2009. *Sclerotinia sclerotiorum* en plantas cultivadas e invasoras del sur pampeano y norte patagónico, Argentina. *Phyton*, 78(2), 111-115.
- Díaz, C. 2007. Caracterización Agro cadena de Tomate. Dirección Regional Central Occidental. MAG Grecia, Costa Rica.
- FAO. 2019. Agricultural Data, <http://faostat3.fao.org>. Consultado: Diciembre 2019.
- FAO. 2020. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Estadísticas. <http://www.fao.org/faostat/es/#home>.
- FAO. 2022. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Estadísticas. <http://www.fao.org/faostat/es/#home>.
- Flores, C. 2012. Enfermedades de tomate: guía de consulta (1a ed.). *Ediciones INTA*.

- Gill, R. J. 1990. The morphology of whiteflies. En: Whiteflies: their Bionomics, Pest Status and Management. Gerling, D. (Editor). *Intercept Limeitd. Wimborne, United Kingdom*. 13-46.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., Lobuglio, K. y Brygoo, Y. 1999. Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuina*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology*, 89(10), 967-973.
- Hausbeck, M. K. y Moorman, G. W. 1996. Managing *Botrytis cinerea* in greenhouse grown flower crops. *Plant Disease*, 80, 1212-1219.
- Huang, H. C. y Dueck, J. 1980. Wilt of Sunflower from infection by mycelial germinating sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2(2), 47-52.
- Huang, H. C. y Hoes, J. A. 1980. Importance of plant spacing and sclerotial position to development of *Sclerotinia* wilt of sunflower. *Plant Disease*, 64(1), 81-84.
- Infoagro Systems S. L. 2016. El cultivo de tomate: Parte I. (en línea). Madrid, España. s.p. Consultado 27 de febrero de 2019. Disponible en: [http://www.infoagro.com/documentos/el\\_cultivo\\_del\\_tomate\\_\\_parte\\_i\\_.asp](http://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_del_tomate__parte_i_.asp)
- INTA (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria). 2014. Manejo integrado de plagas. Cultivo de tomate: Guía MIP (en línea). 66 p. Consultado 27 de febrero de 2019. Disponible en <http://www.inta.gob.ni/biblioteca/index.php/component/booklibrary/101/view/58/Gu%C3%ADas%20t%C3%A9cnicas%20INTA/243/manejo-integrado-de-plagas-cultivo-del-tomate-guia-mip>
- Janisiewicz, W. y Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), 411-441.
- Jarvis, W. R. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology and pathogenicity-A guide to the literature. *Canada Departament of Agriculture*. Monografía XV.
- Jones, D. 1970. Ultra structure and composition of the cell walls of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 54(3), 351-360.
- Kinet, J. M y Peet, M. 1997. Tomato. En: The physiology of vegetable crops. CABI. Wallingford, UK. 207-259.
- Kohn, L. M. 1979a. Delimitation of the economically important plantpathogenic *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69, 881-886.
- Kohn, L. M. 1979b. A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. *Mycotaxon*, 9, 365-444.
- Martinez-Ruiz, F. E., Cervantes-Díaz, L., Aíl-Catzím, C. H., Hernández-Montiel, L. G., Del Toro-Sánchez, C. L. y Rueda-Puente, E. O. 2016. Hongos Fitopatógenos Asociados Al Tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) En La Zona Árida Del Noroeste De México: La Importancia De Su Diagnóstico. *European Scientific Journal*, 12(18).

- Miranda, M. 2018. Superficie de cultivo bajo cubierta en el Gran La Plata, análisis espacial con Sistemas de Información Geográfica – SIG. P. 75. En: Tittone, P. y Giobellina, B. (Eds.). Periurbanos hacia el consenso. Resúmenes cortos. Libro 2. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina. Disponible en:  
[https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_periurbanos\\_hacia\\_el\\_consenso\\_libro\\_2\\_resumenes\\_cortos.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_periurbanos_hacia_el_consenso_libro_2_resumenes_cortos.pdf)
- Mitidieri, I. Z. M. 1975. Podredumbre del tallo del tomate. *EEA San Pedro, Horticultura*, 4(1-2).
- Mitidieri, I. Z. M. 1980. Antecedentes y observaciones de la podredumbre del tallo de la soja *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *IDIA-Informativo de investigaciones agrícolas (Argentina)*. (Ene-Feb 1980). (385-386), 16-20.
- Mitidieri, M. S. y Polack, L. A. 2012. Guía de monitoreo y reconocimiento de plagas, enfermedades y enemigos naturales de tomate y pimentón. 2ª edición. San Pedro: Ediciones INTA.
- Mound, L. A. y Halsey, S. H. 1978. Whitefly of the World: A systematic catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with Host plant and Natural Enemy data. British Museum (Natural History).
- Nome, S., Docampo, D. y Conci, M. 2016. Atlas Fitopatológico Argentino. Sitio web: <http://rian.inta.gov.ar/atlas/> Consulta: 04 enero 2019.
- Lamarque, C. 1976. Elements de Biologie du *Sclerotinia sclerotiorum* sur tournesol a *S. sclerotiorum*. *Annual Amélior Plantes (París)*, 23, 279-286.
- Letham, D. B., Huett, D. O. y Trimboli, D. S. 1978. The control of *Sclerotinia* rot. *Agricultural Gazette N.S.W. June*, 31-32.
- Le Tourneau, D. 1979. Morphology, cytology and physiology of *S. sclerotiorum* species in culture. Symposium on *Sclerotinia* (Whetzelinia): taxonomy, biology and pathology. *Phytopathology*, 69(8): 887-890.
- Olmstead, R. G., Sweere, J. A., Spangler, R. E., Bohs, L., y Palmer, J. D. 1999. Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. *Solanaceae IV. Royal Botanic Gardens*, 1(1),1-137.
- Peralta I. E. y Spooner D. M. 2001. Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. Section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst. Subsection *Lycopersicon*). *American Journal of Botany*, 88(10), 1888-1902.
- Pereyra, V. R. y Bazzalo, M. E. 1991. Comportamiento del girasol frente a la podredumbre del capítulo provocada por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum*. *Informations Techniques N° 19, agosto*. E.E.A. Balcarce. INTA.
- Petersen, G. R., Russo, G. M., Van Etten, J. L. 1982. Identification of major proteins in sclerotia of *Sclerotinia minor* and *Sclerotinia trifoliorum*. *Experimental Mycology*, 6(3), 268-273.

- Petrone, M. E., Wright, E. R., Di Silvestro, G. y Rivera, M. C. 2016. Limitantes para la implementación de las BPA en producciones periurbanas. Evaluación de enfermedades en lotes de producción comercial de especies florales. *Jornada Buenas prácticas en producciones horti-florícolas en áreas periurbanas. Universidad de Luján.*
- Purdy, L. H. 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology*, 69(8), 875-880.
- Rick C. M. 1979. Byosystematic study in *Lycopersicon* and closely related species *Solanum*. En: The biology and taxonomy of Solanaceae. Hawkes, J. G., Layster, R. N. y Skelting A. D. (Editores). *Academic Press. London, UK.* 268-273.
- Saharan, G. S. y Mehta, N. 2008. *Sclerotinia* diseases of crop plants: Biology, ecology and disease management. *Springer Science & Business Media.*
- Saito, I. 1974. Ultrastructural aspects of the maturation of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 15, 384-400.
- Sandoval, B. C. 2004. Manejo Integrado de Enfermedades en Cultivos Hidropónicos Agricultura y la Alimentación. FAO, Oficina Regional Para América Latina y el Caribe. *Manual Técnico.*
- Sansone, G., Rezza, I., Calvente, V., Benuzzi, D., Maria, I. y Sanz, de T. 2005. Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. *Postharvest Biological Technology*, 35(3), 245-251.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. 2023. Ministerio de Economía. Producción de tomate en Argentina. Evolución del cultivo hasta la temporada 2021/22. 21 pp. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/produccion-tomate-en-argentina-hasta-2021-2022.pdf>
- Secretaría de Alimentos y Bioeconomía - Dirección Nacional de Alimentos y Bebidas Dirección de Cadenas Alimentarias (DCA). Ministerio de Agroindustria. 2018. Cadena del Tomate para industria. Disponible: <https://www.argentina.gob.ar>
- Sepúlveda, R. P. 2011. Virus transmitidos por insectos vectores en tomate en la Región de Arica y Parinacota: situación actual y manejo. *Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA. Centro de Investigación Agropecuaria del Desierto y Altiplano, Ururi. Arica, Chile. Boletín INIA N° 224.*
- Sims W. L. 1980. History of tomato production around the world. *Acta Horticulturae*, 100, 211-215.
- SINAVIMO, Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas. 2019. Consultada el 27 de febrero de 2019. <https://www.sinavimo.gov.ar/plaga/athelia-rolfsii>
- Spooner D. M., Peralta I. E. y Knapp S. 2005. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomato (*Solanum* L. Section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.). *Taxon*, 54(1), 43-61.

- Suazo-Castro, B. R., Martínez, S. B., Puig, M. L., Maiale, S. J. y Garbi, M. 2023. Periodo de cosecha y producción de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) injertado y conducido a más de un eje, bajo invernadero. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 39(1), 23-34.
- Symon D. E. 1985. The Solanaceous of New Guinea Journal of the Adelaide. *Botanic Gardens*, 8, 1-177.
- Tariq, V. N., Gutteridge, C. S. y Jeffries, P. 1985. Comparative studies of cultural and biochemical characteristics used for distinguishing species within *Sclerotinia*. *Transactions British Mycological Society*, 84(3), 381-397.
- Taylor I. B. 1986. Byosystematic of tomato. In: The tomato Crop. A scientific basis of improvement. Atherton and Rouch (Editorial). *Champan and Hall. London, UK*. 1-34.
- Vallejo, F. 1999. Mejoramiento genético y producción de tomate en Colombia. Palmira, Colombia.
- Varma, A. y Singh, M. K. 2024. The Role of Satellites in the Evolution of Begomoviruses. *Viruses*, 16(6), 970.
- Viscarret, M. M. 2000. Estudios biológicos sobre *Aleyrodidae* (Insecta: Hemiptera) con especial énfasis en el complejo *Bemisia tabaci* y su posible control biológico. *Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*.
- Viscarret, M. M. y Botto, E. N. 1996. Descripción e identificación de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y *Bemisia tabaci* (Gennadius), (Homoptera: Aleyrodidae), para la Argentina. *Revista Chilena de Entomología*, 23, 51-58.
- Viteri, M. V., Ghezán, G. y Iglesias, D. 2013. Tomate y lechuga: Producción, Comercialización y Consumo. *INTA Boletín N° 14*.
- Wahyono, A., Murti, R. H., Hartono, S., Nuringtyas, T. R., Wijonarko, A., Mulyantoro, M., ... y Purnama, I. C. G. 2023. Current status and complexity of three begomovirus species in pepper plants in lowlands and highlands in java island, Indonesia. *Viruses*, 15(6), 1278.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. y Van Kan, I. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561-580.
- Wong, J. A. L. 1979. Lettuce drop or *Sclerotinia* drop. *Journal of Agriculture*, 50, 107-108.
- Zhao, M., Zhou, J. Y., Li, Z. D., Song, W. W., Tan, Y. J. y Tan, H. 2009. Boty-II, a novel LTR retrotransposon in *Botrytis cinerea* B05.10 revealed by genomic sequence. *Electro Journal Biotechnology*, 12(3), 2-3.

### **Capítulo 3: Hongos Ascomicetes, antagonistas y simbioses.**

#### **Resumen.**

En este capítulo se presenta información sobre hongos ascomicetes, antagonistas y simbioses, con énfasis en las características biológicas de hongos de los géneros *Metarhizium* y *Trichoderma* y su uso como agentes de control biológico.

#### **Agentes de Control Biológico.**

El uso de agentes de control biológicos (ACB) aparece como una forma viable para controlar plagas que afectan a los productores agrícolas temporada tras temporada. En la actualidad son múltiples los estudios que evidencian los beneficios del uso de agentes biológicos para el control de plagas de artrópodos y enfermedades de los cultivos (Wright *et al.*, 1988; Bélanger *et al.*, 1995; Lecuona, 1996; Zimand *et al.*, 1996; Arismendy y Orduz, 2002; Cáceres *et al.*, 2005; Wright, 2007; Bettioli y Morandi, 2009; Alemandri *et al.*, 2012). Según la NIMF (Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias, 2005), un agente de control biológico es un enemigo natural, antagonista o competidor u otro organismo utilizado para el control de plagas. La tendencia del uso de hongos antagonistas para el control de fitopatógenos permite la consolidación del interés hacia la investigación, ampliando los microorganismos de naturaleza fúngica de uso contra especies plagas en la agricultura. Los mecanismos de acción a través de los cuales los ACB afectan a los organismos fitopatógenos son: la antibiosis, micoparasitismo y competencia (Altieri, 1995). En lo que respecta a los fitopatógenos de las partes aéreas se pueden considerar al micoparasitismo y la antibiosis (Bélanger *et al.*, 1995). La antibiosis es el proceso de secreción de compuestos antimicrobianos por hongos antagonistas para suprimir y / o matar a los hongos patógenos en la proximidad de su área de crecimiento (Schirmbock *et al.*, 1994). La competencia por espacio o nutrientes, ya que muchos microorganismos viven tanto dentro (endofíticas) como sobre (epifíticas) los tejidos de las plantas, y su presencia evita que los patógenos puedan germinar y/o desarrollarse (Hernández *et al.*, 2021).

Entre los antagonistas más estudiados se encuentran microorganismos pertenecientes a los géneros *Streptomyces* (Bacteria: Actinomycetales: Streptomycetaceae), *Pseudomonas* (Bacteria: Pseudomonadales: Pseudomonadaceae), *Agrobacterium* (Bacteria: Rhizobiales: Rhizobiaceae), *Bacillus* (Bacteria: Bacillales: Bacillaceae), *Ampelomyces* (Fungi: Pleosporales: Phaeosporiaceae); *Trichoderma* (Fungi: Hypocreales: Hypocraceae) y *Gliocladium* (Fungi: Hypocreales: Hypocraceae) (Consuegra, 2003). *Metarhizium* (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) (Zimmermann, 2007).

El phylum Ascomycota está conformado por hongos que presentan hifas septadas que se diferencian en conidióforos, células conidiógenas y conidios, siendo estos últimos las estructuras reproductivas asexuales. También presentan una estructura de saco que contiene las ascosporas (esporas sexuales). Dentro del Phylum Ascomycota se encuentra el grupo más ampliamente

representado entre los patógenos de insectos (hongos entomopatógenos). Los hongos entomopatógenos son microorganismos capaces de infectar y provocar la muerte de diferentes grupos de artrópodos. La unidad infectiva es el conidio, que se forma a partir de las células conidiógenas o fiálides, estos se adhieren al tegumento del hospedador. Los conidios están rodeados de una capa de proteínas hidrofobinas que facilitan la adhesión de forma pasiva a superficies hidrofóbicas como lo es la cutícula (Holder y Keyhani, 2005), emiten un tubo germinativo, en algunos casos con formación de un apresorio, degradando y penetrando la cutícula por medio de la presión mecánica ejercida y de la secreción de enzimas tales como lipasas, proteasas y quitinasas, ingresando en el hospedador, (Clarkson y Charnley, 1996). Este proceso generalmente ocurre en las partes más débiles de la cutícula del hospedador tales como membranas intersegmentales, zonas de inserción de las patas y mandíbula. Una vez en el interior del insecto, el hongo se multiplica por gemación dando formas unicelulares llamadas blastosporas, similares a cuerpos hifales, proliferan rápidamente por gemación y circulan a través de la hemolinfa. A diferencia de los conidios, estas presentan propiedades hidrofílicas. Este crecimiento en forma levaduriforme posee características en la pared celular que le permite evadir la respuesta inmune del hospedador (Wanchoo *et al.*, 2009). A su vez las hifas invaden el hemocele, órganos y tejidos, causando la muerte del insecto debido a que progresivamente se va deteniendo su circulación y el sistema de órganos del hospedador comienza a fallar. En algunos casos estos hongos pueden producir toxinas que intervienen en la muerte del insecto hospedador. Luego se produce la emersión del hongo y la esporulación externa, tomando un color característico según cada especie, para reiniciar de esta forma el ciclo de infección (Lecuona, 1996).

#### **Antecedentes de *Trichoderma* spp.**

La clasificación taxonómica de este hongo (Teleomorfo), dada por el Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas (SINAVIMO) es: Eucariota, Reino: Fungi, División: Ascomycota, Subdivisión: Pezizomycotina, Clase: Sordariomycetes, Orden: Hypocreales, Familia Hypocreaeae, Género: Hypocrea, Especie: (ejemplo) *Hypocrea lixii*; *Trichoderma harzianum* Persoon, (1969) (Anamorfo). Este hongo está presente en la mayoría de los suelos cultivados, es un hongo simbiote de las plantas y saprófito facultativo, también se lo conoce como hiperparasitoide de otros hongos (Bissett *et al.*, 2015; Monte, 2015; Rahimi-Tamandegani *et al.*, 2020).

Las especies de *Trichoderma* son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucano. Se reproducen asexualmente por conidios. Presentan conidióforos hialinos ramificados, fiálides simples o en grupos, conidios de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, generalmente ovalados, unicelulares, coloreados (usualmente verdes); de rápido desarrollo en medios sintéticos y tiene la capacidad de producir clamidosporas en sustratos naturales, estas estructuras son de vital importancia para la sobrevivencia del género en el suelo bajo condiciones adversas (Blaszczyk *et al.*, 2014; Sandle, 2014; Qiao *et al.*, 2018). El organismo crece y se ramifica desarrollando típicas hifas, de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho (Martinez *et al.*, 2013). La temperatura óptima para su crecimiento en agar y producción de micelio está entre 20 y 28° C, aunque crece bien entre 6 y 32° C. El contenido mínimo de humedad para su crecimiento vegetativo es del 92% y para su esporulación es de 93 al 95%. Tiene cierta respuesta a

la luz, especialmente azul y violeta que promueve la formación de esporas, el crecimiento de micelio y la coloración (Hidalgo, 1989; Domsch *et al.*, 1993).

El género *Trichoderma* fue descrito por Persoon. Posteriormente 1969, Rifai hizo el primer agrupamiento en especies agregadas que se utiliza hasta el presente, a pesar de las dificultades que se presentan para la identificación de especies por este método (caracterización visual), debido a la cercanía morfológica y la evolución de estas. Propuso nueve especies agregadas: *T. piluliferum* Webster y Rifai, (1969), *T. polysporum* (Link ex Pers) Rifai, (1969), *T. hamatum* (Bon) Bain, (1969), *T. koningii* Rifai, (1969), *T. aureoviride* Rifai, (1969), *T. harzianum* Rifai, (1969), *T. longibrachiatum* Rifai, (1969), *T. pseudokoningii* Rifai, (1969) y *T. viride* Pers ex S. F Gray, (1969). Estas especies se identificaron teniendo en cuenta diferencias morfológicas y fisiológicas, como tipo de ramificación del conidióforo, forma del conidio, crecimiento y coloración de la colonia, entre otras (Martinez *et al.*, 2013). Hasta el presente se han descrito cerca de 40 taxones de *Trichoderma* spp., basados en la morfología del anamorfo. Del orden de los Hypocreales, el número real podría ser más de 200 taxones. La nomenclatura de estos hongos es compleja debido a su pleiomorfismo, es decir, algunos de ellos pueden existir en dos etapas morfológicas y fisiológicamente diferentes. La fase sexual (telemorfo) se conoce por el nombre genérico *Hypocrea*, mientras que la etapa asexual (anamórfico o mitospórico) se denomina *Trichoderma* (Druzhina *et al.*, 2011).

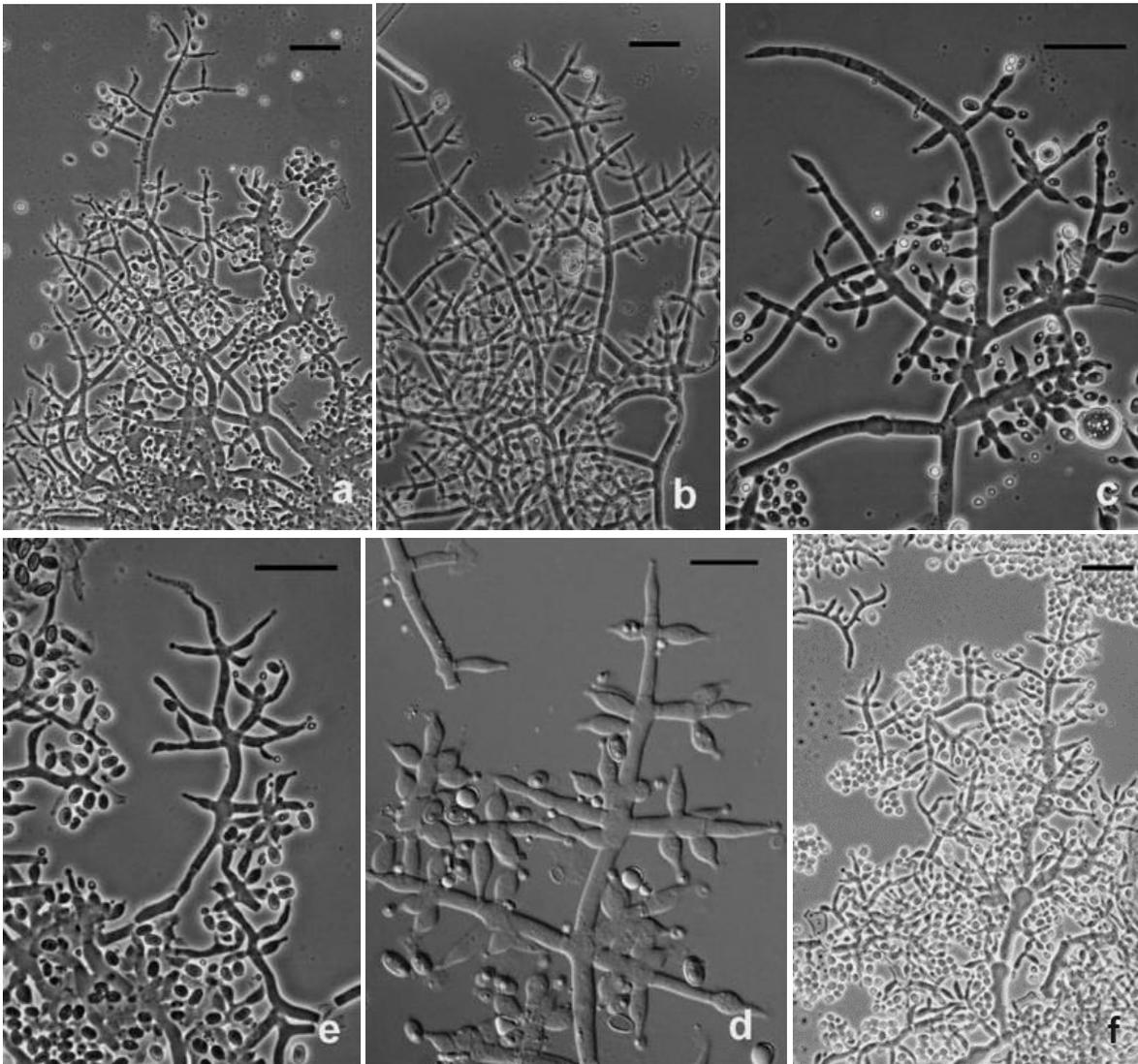
#### **Características morfológicas del género *Trichoderma*.**

Características macroscópicas: las colonias por lo general crecen rápidamente, crece con micelio sumergido en el medio de cultivo y eventualmente con micelio aéreo hialino variado, flocoso, lanoso o aracnoideo, dependiendo de la cepa y el medio de cultivo. Al reverso, puede no presentar color o de color amarillo claro, amarillo, ámbar, opaco rojizo o amarillo verdoso. Olor en su mayoría pronunciado o débil, característico del género, sugiriendo coco o alcanfor. Características microscópicas: los conidióforos son erectos, hialinos, en su mayoría ramificados, no verticilados, pueden ser solitarios o en grupos. Las fiálides son en forma de botella, únicas o en grupos, hinchadas en la región central pero delgadas hacia el ápice; son hialinas y en ángulo recto respecto a los conidióforos. Los conidios son unicelulares subglobosos y oblongos, lisos o equinulados, hialinos o verdes y ocurren en masas en los ápices de las fiálides (Barnett y Hunter, 1972; Arango *et al.*, 1988).

Las siguientes características se tomaron de Jaklitsch *et al.* (2006):

Conidióforos: en la mayoría de las especies presentan un amplio eje principal ramificado a intervalos regulares, generalmente con ramas sucesivas apicales y distales progresivamente más cortas y más estrechas; ramas más o menos divergentes, solitarias, pareadas o en verticilos; la ramificación vertical repetitiva puede dar como resultado una estructura piramidal altamente ramificada; en algunas especies, la ramificación es menos regular con ramas solitarias o emparejadas y no se vuelve a ramificar ampliamente. Fiálides de células conidiógenas: típicamente dispuestas en verticilos divergentes en el extremo de las ramas del conidióforo, o en espirales directamente debajo de septos a lo largo del conidióforo y ramas, por lo demás pareadas o solitarias e irregularmente dispuestas; cilíndrica, subulada, lageniforme, ampulliforme o subglobosa; Por lo general, se atenúa

a un cuello estrecho, cilíndrico corto, que contiene un conidio. Conidios: unicelulares de 3 a 5µm de largo, típicamente verdes o incoloros, grisáceos o pardos; de paredes lisas a claramente rugosas, o con sinates, proyecciones abombadas o en forma de alas desde la pared exterior; subglobosa, obovoide, elipsoide, oblonga o semicilíndrica; acumulando en cabezas gloeoides, a veces encerradas en una vaina en forma de saco visible a grandes aumentos. Clamidosporas: Las clamidosporas suelen estar presentes y abundan a menudo, especialmente en el micelio sumergido; Intercalar, o terminal en ramas laterales cortas de hifas vegetativas; globosas a elipsoides, incoloras a pálido amarillento o verdoso, de paredes lisas y a veces gruesas (hasta 4 µm). Hifas: Las hifas vegetativas suelen ser hialinas, de pared lisa, 2 a 10 µm de ancho, con menos frecuencia (o en el micelio sumergido) de color amarillo pálido, con engrosamientos irregulares de las paredes y hasta 16 µm de ancho (ver figura 1).



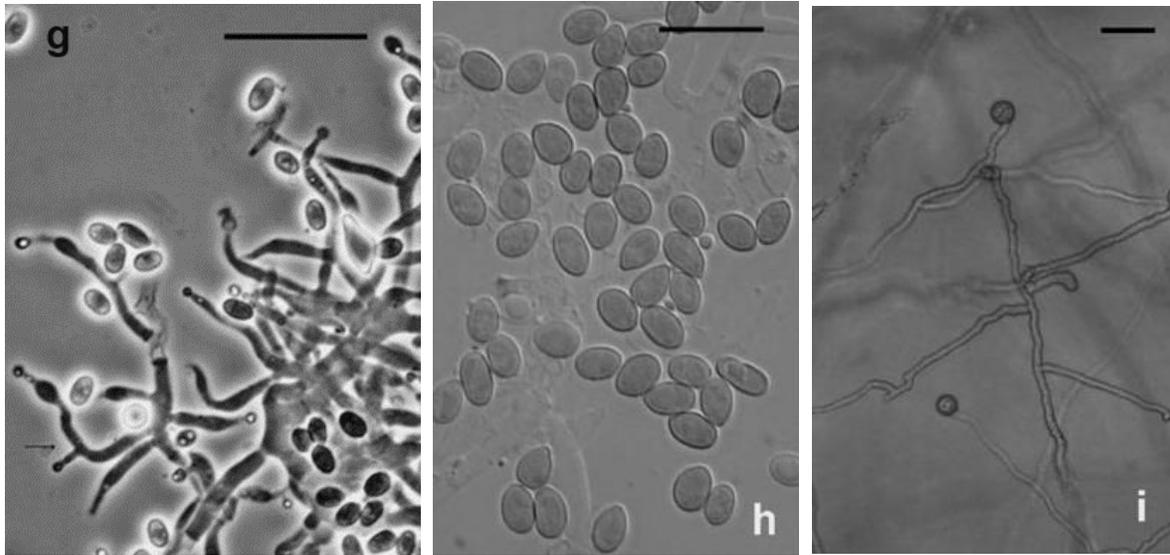


Figura 1. Imágenes de las estructuras de *Trichoderma gamsii* Samuels y Druzhinina, (2006) en medio de cultivo SNA (Synthetic Nutrient-Poor Agar). A - G: Conidióforos. H: Conidia. I: Clamidosporas. Escala visual: A - G, I = 20  $\mu$ m, H = 10  $\mu$ m. Fuente de las imágenes: Jaklitsch *et al.* (2006).

Muchas especies de *Trichoderma* han sido desarrolladas como eficientes agentes de control biológico de enfermedades y muchas cepas se han registrado con un uso comercial en la protección de plantas tales como *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. virens*, *T. hamatum*, *T. asperellum*, *T. asperelloides* y *T. gamsii* (Lorito *et al.*, 2010). Otras especies tal como *T. reesei* son usadas como productoras de enzimas para su aplicación en la biotecnología (Penttila *et al.*, 2004). Son siete las especies de *Trichoderma* con la secuenciación de su genoma publicado y analizado (Martinez *et al.*, 2008; Mukherjee *et al.*, 2010; Kubicek *et al.*, 2011). Algunas cepas de *Trichoderma* spp. son conocidas por interactuar con las plantas generando efectos benéficos como la estimulación de las defensas de las plantas, aumento en el desarrollo de las raíces, promoción del crecimiento, activación de la germinación de las semillas, incremento de los contenidos de clorofila en las células fotosintéticas y consiguiente aumento en la eficiencia fotosintética, atenuador de estreses abióticos en la planta y aumentando la eficiencia de toma en la absorción de nutrientes (Shoresh *et al.*, 2010; Hermosa *et al.*, 2012). Algunos de estos efectos benéficos podrían ser transferidos a las plantas por medio de la integración de genes del hongo dentro del genoma de la planta (Lorito *et al.*, 1998). Algunas especies poseen habilidades para incrementar la tasa de crecimiento y desarrollo de las plantas, en especial de su sistema radicular. Este controlador biológico secreta más de 70 metabolitos, entre ellos sustancias estimuladoras del crecimiento y desarrollo de las plantas (Harman *et al.*, 2004). El mismo autor encontró que una cepa de *Trichoderma* sp. contribuye al crecimiento en la profundidad de las raíces de maíz y otras gramíneas haciendo que estos cultivos sean más resistentes a la sequía (Harman, 2001). Otros estudios demostraron aumentos en la tasa de germinación de semillas que fueron inoculadas previamente con esporas (Chet *et al.*, 1997).

Los efectos de *Trichoderma* spp. sobre enfermedades aéreas que ocasionan daño en follaje y frutos de diversas plantas han sido documentados en numerosos estudios con distintas cepas. Se logró

inhibir la esporulación de *B. cinerea* en flores y vainas de alfalfa (Li *et al.*, 2004) y reducir el alargamiento del tubo germinal o germinación de conidios del patógeno en hojas de haba (Zimand *et al.*, 1996). En la Argentina, un aislado de *T. harzianum* redujo el crecimiento del patógeno y disminuyó la germinación de los conidios (Mónaco *et al.*, 2006, 2009) y en pulverizaciones de tallos de rosal con *T. atroviride*, se logró el control del tizón ocasionado por *B. cinerea* (Wright, 2007). El género *Trichoderma* tiene la capacidad de producir compuestos orgánicos volátiles y no volátiles, que juegan un papel importante inhibiendo el crecimiento y desarrollo de microorganismos fitopatógenos. Las interacciones micoparasitarias fueron descritas por (Cook, 1993) como: sustitución (antagonismo unilateral), estancamiento (antagonismo mutuo), y entremezcla (sin antagonismo). El micoparasitismo de *Trichoderma* spp. es un proceso complejo que involucra una serie de eventos que resulta en la muerte de las hifas de los fitopatógenos. Este proceso inicia con el crecimiento trófico del agente de control biológico hacia el fitopatógeno, posteriormente las hifas se enrollan sobre las del huésped y disuelven su pared celular, por la activación de enzimas hidrolíticas, las cuales están asociadas con la penetración física de la pared celular (Chet *et al.*, 1997). El micoparasitismo concluye con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula hospedante, mostrando síntomas de disgregación. Diferentes interacciones hifales están involucradas en el micoparasitismo, tales como: enrollamiento, penetración, vacuolización, granulización, coagulación, desintegración y lisis. En cultivos duales se observó que el crecimiento de *Trichoderma* sobre el patógeno no es garantía de alta capacidad parasítica, ya que las hifas de ambos pueden compartir espacios en el sustrato sin parasitar uno al otro (Martínez *et al.*, 2013).

La competencia por espacio y/o nutrientes ha sido considerada uno de los mecanismos clásicos de control biológico de este género. Especies de *Trichoderma* tienen una rápida tasa de desarrollo, lo que hace que sea un fuerte competidor por espacio a la hora de colonizar la rizósfera. Por otra parte, tiene una capacidad superior para movilizarse y tomar los nutrientes del suelo, siendo muy versátil para utilizar sustratos como fuente de carbono y nitrógeno, lo que permite colonizar un medio rápidamente, evitando la proliferación de otros microorganismos en el mismo hábitat. Podrían competir y secuestrar los iones de hierro presentes en el suelo mediante la liberación de compuestos conocidos como sideróforos (Srinivasan *et al.*, 1992).

Ciertas cepas tienen la capacidad de sintetizar enzimas que degradan la pared celular de los hongos y de otras sustancias que inducen resistencia (Abdo *et al.*, 2008). La resistencia inducida es la respuesta de la planta, provocada por microorganismos que estimulan una defensa ante ciertos patógenos, a los que la planta antes era sensible. Se observó que, de manera similar a hongos micorrícicos, *Trichoderma* spp. coloniza las raíces de las plantas y estimula las defensas de estas. La producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) y compuestos de bajo peso molecular con propiedades antimicrobianas (fitoalexinas), son algunas de las moléculas desencadenantes de la defensa de la planta (Harman *et al.*, 2004).

La capacidad que tienen las especies de *Trichoderma* para producir metabolitos secundarios que degradan la pared celular de hongos fitopatógenos como quitinasas, proteasas y glucanasas podrían ser efectivos para degradar la cutícula de los insectos, siendo el género *Trichoderma* un organismo “multifacético” capaz de ser implementado en distintos usos sobre el manejo integrado de plagas.

Actualmente se encuentran registradas varias cepas del género aisladas de insectos de los órdenes: Hemiptera, Hymenóptera, Isóptera, Lepidóptera y Thysanóptera (USDA-ARSEF, 2014).

### **Antecedentes de *Metarhizium* spp.**

El género *Metarhizium* Sorokin, (1879) incluye a un grupo de hongos filamentosos que presentan coloración verdosa cuando esporulan. Según el Sistema de Información de Biodiversidad Argentino (SIB) la clasificación taxonómica (Anamorfo) corresponde a: Eucariota, Reino: Fungi, División: Ascomycota, Clase: Sordariomycetes, Orden: Hypocreales, Familia: Cordycipitaceae, Género: *Metarhizium*, Especies:(ejemplos) *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, (1883); *Metarhizium* cf. *flavoviride* W. Gams y Rozsypal, (1973) (teleomorfo: sospecha en *Metacordyceps*). La primera, ha sido nombrada de varias formas con el pasar de los años como: *Isaria anisopliae* (Mestch.) R.H. Pettit, (1895); *Penicillium anisopliae* (Metsch.) Vuill, (1904); *Metarhizium album* Petch; *Metarhizium brunneum* Petch y *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*, (1976).

### **Características morfológicas del género *Metarhizium*.**

Conidiogénesis ocurre en himenio denso. Forman esporodoquios o sinemas. Los conidióforos se ramifican repetidamente en ángulos amplios y se asemejan a los candelabros (aunque la observación de conidióforos individuales es difícil). Células conidiogénicas claviformes o cilíndricas, con un ápice redondeado a cónico, sin cuello evidente; la pared apical se engrosa progresivamente a medida que se producen los conidios. Conidios producidos en cadenas largas; las cadenas a menudo se adhieren lateralmente para formar columnas prismáticas o placas sólidas (Luangsa-ard *et al.*, 2007).

En el género *Metarhizium* se han reportado nueve especies: *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum*, *M. lepidiotae*, *M. majus*, *M. globosum*, *M. robertsii* y *M. brunneum* (Bischoff *et al.*, 2009). *Metarhizium anisopliae*, se caracteriza por presentar conidióforos ramificados en forma de candelabro y densamente entrelazados. Las células conidiógenas forman una estructura de himenio, el esporodoquio. Los conidios, de color verde, son ovalados dispuestos en forma de cadenas que se adhieren entre si lateralmente (Humber, 2012). *Metarhizium anisopliae* posee dos variedades que se diferencian principalmente por el tamaño de sus conidios: la variedad más común *anisopliae* de conidios pequeños (3,5-9,0 μm) y la variedad *major* de conidios grandes (9,0-18 μm) (Domsch y Gams, 1980; Kirk *et al.*, 2001) (ver figura 2).

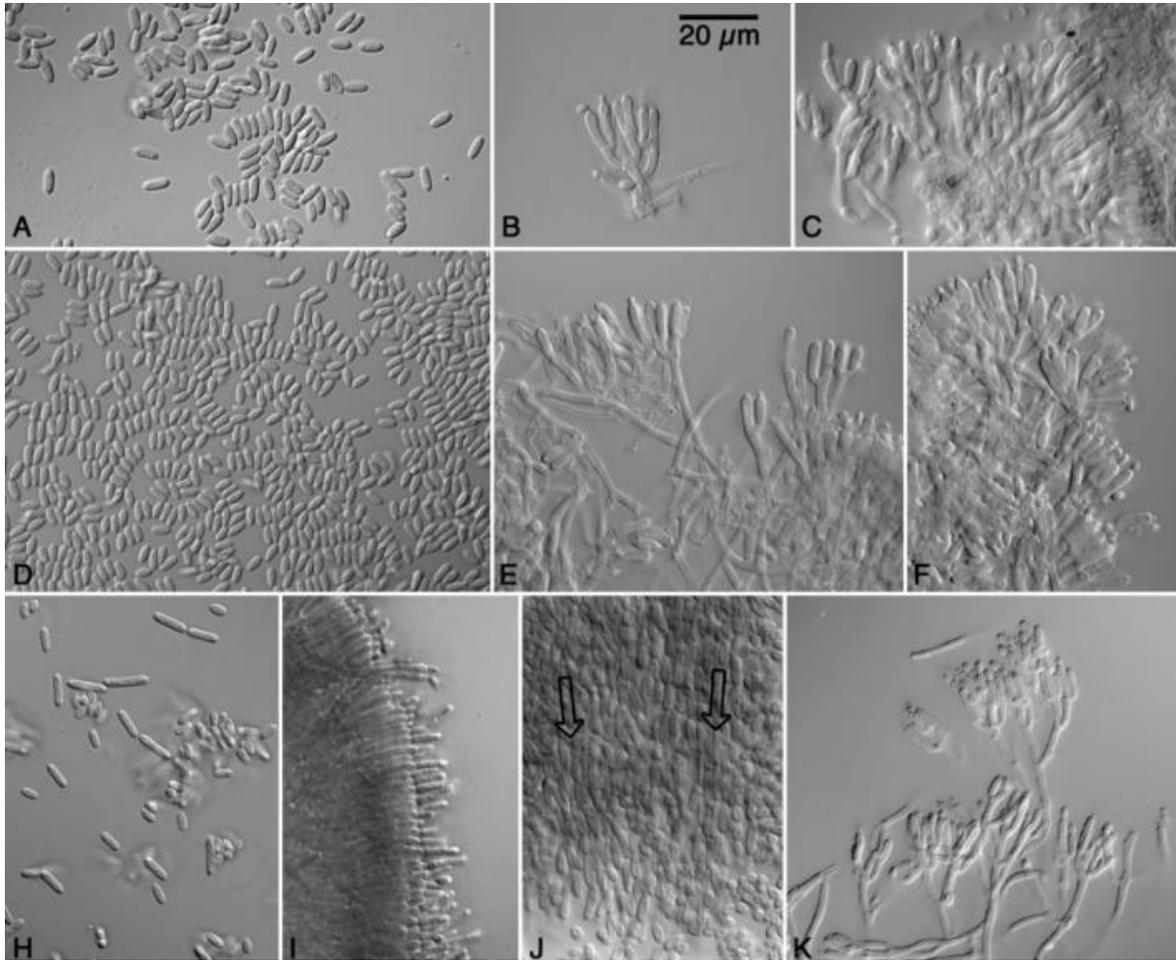


Figura 2. *Metarhizium koreanum* Kepler, S.A. Rehner y Humber, (2015) y *Metarhizium brasiliense* Kepler, S.A. Rehner y Humber, (2015). A-F. *M. koreanum*. A, D. Conidios. B, C, E, F. Conidióforos ramificados y células conidiógenas cortas y en bloque. H-K. *M. brasiliense*. H. Población mixta de tipos conidiales cortos y largos. I. Presentación de la superficie del himenio, - producción entremezclada de conidios cortos y largos. J. Células conidiógenas individuales que forman principalmente sólo uno de los dos tipos de conidios (cortos y largos); Los fascículos de cadenas de conidios largos se indican con flechas. K. Conidióforos ramificados y células conidiógenas cortas y en bloque. Fuente de las imágenes: Kepler *et al.*, (2014)

Los hospedadores de *M. anisopliae* usualmente están cubiertos con una trama de micelio blanco con conidios verdes, lo que le da una apariencia pulverulenta. Micelio septado, ramificado y de paredes lisas y hialina. En agar papa glucosado, el hongo crece muy rápidamente, alcanza un diámetro de 50 a 60 mm en 14 días a 25° C. Los conidióforos se pueden dividir en longitud y ancho dependiendo de la edad, en forma peniciliada, en forma de empalizada, formando apicalmente una capa de esporas en columna. Filiades cilíndricas, alargados, ligeramente pubescentes con un ápice cónico, cuello ausente de 5-7 x 2 µm. Conidios en cadenas que se agrupan en columnas, ampliamente elipsoidal a cilíndrica, de paredes lisas, de una sola lámina, apiculadas, hialinas al principio, en masa de verde a verde oscuro. *M. anisopliae* es otra especie que ha migrado desde el

ecosistema natural hasta el agrícola. Se ha estudiado para el control de plagas de insectos en la agricultura (Luangsa-ard *et al.*, 2007).

Por otro lado, los insectos hospedantes de *Metarhizium flavoviride* W. Gams & Rozsypal, (1973) son en su mayoría hemípteros (ninfa y adultos). Presentan micelio flocoso que tiene conidios de color verde pálido, a veces concentrados alrededor del tórax o las patas del insecto. En agar papa glucosado, las colonias tienen un crecimiento relativamente rápido, alcanzando un diámetro de 30 - 40 mm dentro de los 14 días a 25° C. Las colonias a simple vista se tornan de color verde amarillo pálido al inicio de la esporulación. Conidios alargados o cilíndricos, 5 - 7 x 2 µm, soportados en cadenas en fiálides cilíndricas de 4 - 8 x 2 µm. Conidióforos poco agregados (Luangsa-ard *et al.*, 2007).

Entre los entomopatógenos, los hongos Hypocreales (Ascomycota) son considerados como patógenos facultativos, infectando un amplio rango de órdenes de insectos. La muerte del hospedador está asociada comúnmente a la producción de toxinas, a diferencia de los hongos Entomophthorales en los que la muerte del insecto hospedador ocurre debido a la colonización de tejidos existiendo pocas referencias de la participación de toxinas (Humber, 1984). La barrera defensiva de los insectos contra las infecciones fúngicas puede estar dada a nivel cuticular, inmunológico o de comportamiento, el rango de especificidad puede variar desde una especie, como *Massospora cicadina* Peck, (1878) (Zygomycota) que crece únicamente en la cavidad abdominal de las cigarras (Hemiptera: Cicadidae), hasta una amplia diversidad de especies hospedadoras como es el caso del hongo *M. anisopliae* que infecta diferentes órdenes de insectos (Boucias y Pendland, 2012).

Aproximadamente el 80% de los productos de EPF (Hongos entomopatógenos con sus siglas en inglés) comercialmente disponibles se basan en los géneros *Metarhizium* y *Beauveria* (de Faria y Wright, 2007). Para el control biológico de plagas de artrópodos, los miembros del género fúngico entomopatógeno *Metarhizium* se encuentran entre los candidatos más prometedores (Zimmermann, 2007). *Metarhizium* spp. tienen una distribución mundial, una amplia gama de hospedantes y han demostrado ser eficaces contra muchas plagas agrícolas importantes, incluyendo: saltamontes, langostas, mosquitos, salivazos, trips, moscas blancas e incluso garrapatas. (Roberts y St. Leger, 2004; Zimmermann, 2007). Algunas investigaciones han destacado su importante papel como colonizadores de raíces con potencial para ayudar en la adquisición de nutrientes y en la promoción del crecimiento de las plantas. (Sasan y Bidochka, 2012; Behie y Bidochka 2014). Los hongos entomopatógenos producen una amplia variedad de enzimas hidrolíticas extracelulares que incluyen lipasas, proteasas, quitinasas, fosfolipasa C y catalasa (Santi *et al.*, 2010). Algunas enzimas que degradan la cutícula son determinantes de la virulencia (Nunes, *et al.*, 2010; St. Leger *et al.*, 1998).

## Bibliografía.

- Abdo, G., Alvarez, S., Bonillo, M., Rolle, R. y Tapia, S. 2008. Producción hortícola sustentable: Estado de su problemática actual relacionada al manejo de plagas y alternativas para una horticultura saludable en sistemas familiares de producción. Ediciones INTA.
- Alemandri, V., De Barro, P., Bejerman, N., Argüello Caro, E. B., Dumón, A. D., Mattio, M. F., Rodriguez, M. S. y Truol, G. 2012. Species within the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) complex in soybean and bean crops in Argentina. *Journal of Economic Entomology*, 105(1), 48–53.
- Altieri, M. A. 1995. Agroecology. *The Scientific Basis of Alternative Agriculture*, p 5.
- Arango, M., Castañeda, N. O. E. y Restrepo, A. 1988. Manual hongos contaminantes del laboratorio. *Bogotá: Instituto Nacional de Salud y Corporación para Investigaciones Biológicas*.
- Arismendy, E. L. y Peralta, S. O. 2002. *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma viride* controlan colonias de *Atta cephalotes* en campo mejor que un insecticida químico. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 4(1), 71-78.
- Barnett, H. y Hunter, B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. *Illustrated genera of imperfect fungi.*, (3rd ed).
- Behie, S. W. y Bidochka, M. J. 2014. Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. *Applied and environmental microbiology*, 80(5), 1553-1560.
- Bélanger, R. R., Dufour, N., Caron, J. y Benhamou, N. 1995. Chronological events associated with the antagonistic properties *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. *Biocontrol Science and Technology*, 5(1), 41-54.
- Bettiol, W. y Morandi, M. A. V. 2009. *Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas*. EMBRAPA, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente.
- Bischoff, J. F., Rhener, S. A. y Humber, R. A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4), 512-530.
- Bissett, J., Gams, W., Jaklitsch, W. y Samuels, G. J. 2015. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus 2015*, 6, 263-295.
- Blaszczyk, L., Siwulski, M., Sobieralski, K., Lisiecka, J. y Jedryczka, M. 2014. *Trichoderma* spp.— Application and prospects for use in organic farming and industry. *Journal of plant protection research*, 54(4), 309-317.
- Boucias, D. y Pendland, J. C. 2012. *Principles of insect pathology*. Springer Science & Business Media.

- Cáceres, S., Aguirre, M. R. A. y Miño, V. S. 2005. El parasitoide *Eretmocerus mundus* controla mosca blanca *Bemisia tabaci* biotipo B en pimiento de Corrientes. En *Congreso Latinoamericano de Horticultura. 12. Congreso Argentino de Horticultura. 28. 2005 09 7-8, 7-8 de setiembre de 2005. General Roca, Río Negro. AR*
- Chet, I., Inbar, J. y Hadar. I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. *The mycota IV: environmental and microbial relationships. Springer-Verlag, Berlin, 165-184.*
- Consuegra, N. P. 2003. Agricultura orgánica, bases para el manejo ecológico de plagas. CEDAR, Cuba.
- Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual review of phytopathology, 31(1), 53-80.*
- Clarkson, J. M. y Charnley, A. K. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology, 4(5), 197-203.*
- de Faria, M. R. y Wraight, S. P. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control, 43(3), 237-256.*
- Domsch, H. y Gams, W. 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press Ltd. New York, U.S.A.
- Domsch, H., Gams, W. y Anderson, T. 1993. Compendium of soil fungi. Academic Press, London.
- Druzhinina, I. S., Seidl Seiboth, V., Herrera Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Igor, V.; Grigoriev, I. V. y Kubicek, C. P. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology, 9(10), 749-759.*
- Harman, G. E. 2001. Microbial tools to improve crop performance and profitability and to control plant diseases. In *Proceedings of International Symposium on Biological Control of Plant Diseases for the New Century--Mode of Action and Application Technology* (pp. 71-84). Taichung City, Taiwan: National Chung Hsing University.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. y Lorito, M. 2004. *Trichoderma* spp. opportunistic avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology, 2(1), 43-56.*
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. y Monte, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology, 158(1), 17-25.*
- Hernández, C., López, L., y Sánchez, L. 2021. Agentes de control biológico de la roya del café ¿Cómo funcionan y qué tan efectivos son? *Bio Tecnología, 25(1), 21-30.*
- Hidalgo, A. 1989. Comparación de dos métodos para la selección de aislamientos de *Trichoderma* para el combate biológico de *Fusarium* y *Rhizoctonia* en clavel (disertación doctoral. Tesis para optar por el grado de Licenciado en Agronomía. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica).

- Holder, D. J. y Keyhani, N. O. 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (*Cordyceps*) *bassiana* to substrata. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5260-5266.
- Humber, R. A. 1984. Foundations for an evolutionary classification of the Entomophthorales (Zygomycetes). En: Wheeler Q, Blackwell M, eds. *Fungus-insect relationships*. New York: Columbia University Press.
- Humber R. A. 2012. Identification of entomopathogenic fungi. En Lacey, L. A. (Ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, 2ª ed., capítulo VI (pp. 151-187). Academic Press (Elsevier Ltd.), Great Britain.
- Jaklitsch, W. M., Samuels, G. J., Dodd, S. L., Lu, B. S. y Druzhinina, I. S. 2006. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies in Mycology*, 56(1), 135-177.
- Kepler, R. M., Humber, R. A., Bischoff, J. F. y Rehner, S. A. 2014. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*, 106(4), 811-829.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C. y Stalpers, J. A. 2001. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi* (No. Ed. 9). CABI publishing.
- Kubicek, C. P., Herrera Estrella, A., Seidl Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., ... y Grigoriev, I. V. 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome biology*, 12, 1-15.
- Lacey, L. A. 2012. *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Segunda edición. ACADEMIC PRESS.
- Lecuona, R. E. 1996. *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*.
- Li, G. Q., Hung, H. C, Acitarya, S. N. y Ericksom, S. 2004. Biological control of blossom blight of alfalfa caused by *Botrytis minerva* under environmentally controlled and held conditions. *Plant Disease*, 88(11), 1246-1251.
- Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E. y Monte, E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. *Annual review of phytopathology*, 48, 395-417.
- Lorito, M., Woo, S. L., Fernandez, I. G., Colucci, G., Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A., ... y Scala, F. 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(14), 7860-7865.
- Luangsa-ard, J. J., Tسانathai, K., Mongkolsamrit, S. y Hywel-Jones, N. L. 2007. Atlas of invertebrate-pathogenic fungi of Thailand. *Biotec*. NSTDA Thailand.

- Martínez, B., Infante, D. y Reyes, Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista Protección Vegetal*, 28(1), 1-11.
- Martinez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S. E., ... y Brettin, T. S. 2008. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature biotechnology*, 26(5), 553-560.
- Mónaco, C., Dal Bello, G., Rollán, M. C., Ronco, L., Lampugnani, G., Arteta, N., ... y Stocco, M. 2009. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato using naturally occurring fungal antagonists. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 42(8), 729-737.
- Mónaco, C., Moreno, V., Stenglein, S. A., Martínez Alcántara, V., Saparrat, M., Bonfiglio, C. y Balatti, P. A. 2006. *Trichoderma virens*. Caracterización molecular con ISSR y RAPD y control de patógenos causantes de damping-off en especies hortícolas. *Jornada de Enfermedades en Cultivos Bajo Cubierta. Resúmenes*, 78-79.
- Monte, E. 2015. Apuntes de curso: principios generales y aplicación de biofungicidas en la agricultura, Escuela Para Graduados Alberto Soriano. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
- Mukherjee, D., Sen, A. y Aguilar, R. C. 2010. Analysis of the development of a morphological phenotype as a function of protein concentration in budding yeast. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (37).
- NIMF. Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias. 2005. Glosario de términos fitosanitarios, N°5.
- Nunes, A. R. F., Martins, J. N., Furlaneto, M. C. y Barros, N. M. D. 2010. Production of cuticle-degrading proteases by *Nomuraea rileyi* and its virulence against *Anticarsia gemmatalis*. *Ciência Rural*, 40, 1853-1859.
- Penttilä, M., Limón, C. y Nevalainen, H. 2004. Molecular biology of *Trichoderma* and biotechnological applications. *Mycology, Handbook of Fungal Biotechnology*. Volume, 20.
- Qiao, M., Du, X., Zhang, Z., Xu, J. y Yu, Z. 2018. Three new species of soil-inhabiting *Trichoderma* from southwest China. *MycKeys*, (44), 63.
- Rahimi-Tamandegani, P., Marik, T., Zafari, D., Balázs, D., Vágvölgyi, C., Szekeres, A., y Kredics, L. 2020. Changes in peptaibol production of *Trichoderma* species during *in vitro* antagonistic interactions with fungal plant pathogens. *Biomolecules*, 10(5), 730.
- Roberts, D. W. y St Leger, R. J. 2004. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in applied microbiology*, 54(1), 1-70.
- Sandle, T. 2014. *Trichoderma*. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2<sup>nd</sup> edition; Batt, C.A., Tortorello, M.L., Editores.; Academic Press: Cambridge, MA, USA. 644–646.

- Santi, L., da Silva, W. O. B., Berger, M., Guimarães, J. A., Schrank, A. Vainstein, M. H. 2010. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon*, 55(4), 874-880.
- Sasan, R. K. y Bidochka, M. J. 2012. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American Journal of Botany*, 99(1),101-107.
- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., Scala, F., ... y Kubicek, C. P. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied and environmental microbiology*, 60(12), 4364-4370.
- Shoresh, M., Harman, G. E. y Mastouri, F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual review of phytopathology*, 48, 21-43.
- Sistema de Información de Biodiversidad Argentino (SIB). <https://sib.gob.ar>
- SINAVIMO. Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas. <https://www.sinavimo.gov.ar/plagas?populate=trichoderma>. Consultado: febrero de 2019.
- Srinivasan, U., Staines, H. J. y Bruce, A. 1993. Influence of media type on antagonistic modes of *Trichoderma* spp. against wood decay basidiomycetes. *Material und Organismen (Germany)*.
- St. Leger, R. J., Joshi, L. y Roberts, D. 1998. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 709-713.
- USDA-ARSEF. 2014. Collection of entomopathogenic fungal cultures, catalog of strains. Biological Integrated Pest Management Research Robert W. Holley Center for Agriculture & Health.
- Wanchoo, A., Lewis, M. W. y Keyhani, N. O. 2009. Lectin mapping reveals stage-specific display of surface carbohydrates *in vitro* and haemolymph-derived cells of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology*, 155(9), 3121-3133.
- Wright, E. R., Zapata, R. L., De Delfino, O. S., López, M. V., y Senlle, M. 1988. Eficiencia *in vitro* de antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 9(3), 109-116.
- Wright, E. R. 2007. Atizonomiento del rosal: determinación de los agentes causales y control biológico de *Botrytis cinerea*. Tesis Doctor en Ciencias Biológicas UBA.
- Zimand, G., Elad, Y. y Chet, I. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology*, 86(11), 1225-1260.
- Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(9-10): 879-920.

## Capítulo 4: Obtención de microorganismos.

### Resumen.

En este capítulo se presenta la metodología utilizada para el aislamiento de microorganismos promisorios como Agentes de Control Biológico. Se realizó un trabajo de búsqueda de producciones agropecuarias, así como de vinculación y coordinación entre productores florihortícolas e instituciones públicas. Se presenta una breve reseña del contexto social en el que se encontraban los productores visitados y se mencionan, en algunos casos, el contexto por el cual los productores deciden hacer un trabajo de transición agroecológica, sin la utilización de agroquímicos. De un total de 41 muestras de suelo recolectadas, se logró obtener un total de 5 aislamientos del género *Metarhizium* y 15 aislamientos del género *Trichoderma*, por medio de 2 métodos de aislamiento (diluciones seriadas e insecto trampa).

### Introducción.

Para la recolección de muestras de suelo, se contactó a agricultores y/o producciones agropecuarias que no utilizan agroquímicos en su esquema productivo, para poder aislar la mayor variedad de microorganismos de interés en las muestras recolectadas. Si bien todas las fincas visitadas se diferenciaban ampliamente unas de otras en los métodos productivos, todas se vinculaban bajo una misma premisa: *“No utilizar agroquímicos para la producción de alimentos”*.

Las muestras de suelo fueron recolectadas de predios que seguían una tendencia productiva agroecológica durante el transcurso del año 2018. Los predios visitados fueron: Producción agroecológica de Bernardo Castillo (Calle 519, s/n, El Pato, Buenos Aires.), Organización 1610 (Calle 1610, La Capilla, Buenos Aires.), Huerta agroecológica Santa Elena de Elena Senattori (Camino Parque Pereyra Iraola s/n, Pereyra, Buenos Aires.), Producción Agroecológica M. G. (Camino s/nombre, Esteban Echeverría, Buenos Aires.), Cooperativa U.T.T. agrupación Jáuregui. (Camino s/nombre, Luján, Buenos Aires) y del campo experimental de la Cátedra de Horticultura Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (Av. San Martín 4453, Ciudad Autónoma de Buenos Aires). Información detallada de las muestras recolectadas se pueden observar en la Tabla 1. Cada agricultor o conjunto de agricultores se volcó hacia esta forma productiva por diversas razones. A continuación, se resume en parte, el perfil y/o historia de cada caso en particular.

### Perfil de cada producción visitada.

M. G. Agroecológico: Este predio productivo está ubicado en Monte Grande provincia de Buenos Aires y es administrado y trabajado por sus dueños; Mariana y Guillermo. Ellos viven en el predio de 3 ha., en el que desde hace 10 años realizan tareas de recuperación de fertilidad y estructura del suelo, debido a que anteriormente la región había sido habitada por personas que se dedicaban a la producción de ladrillos, para lo cual fue removida la capa superficial del suelo como material

básico de la fabricación de los mismos. Tanto Mariana como Guillermo son Ingenieros Zootecnistas, lo que implica un conocimiento del rubro agropecuario técnico. En un comienzo realizaban agricultura de manera convencional (utilización y dependencia de insumos externos de síntesis química para el control de plagas y el manejo de la fertilidad del suelo principalmente). Luego de enfrentar problemas de salud derivados del uso de agroquímicos, decidieron comenzar a producir alimentos de manera agroecológica. En una primera instancia, realizaron pruebas de transición en la huerta familiar, para luego expandir esas estrategias productivas a todo el predio. Los fertilizantes químicos fueron los insumos externos que mayor dependencia les generaba, hasta que aproximadamente desde el 2015, en asociación con otros productores, realizaron un convenio con un frigorífico local el cual les entrega en forma gratuita y periódica, cargas de camión con contenido intra-ruminal. Este residuo de la industria ganadera se mezcla con tierra, viruta y algún otro tipo de materia orgánica disponible en el momento (restos de poda, rastrojo, paja, otros.) y se composta por al menos 30 días. Luego de ese periodo es incorporado al suelo productivo donde se deja reposar unas semanas antes de la siembra o plantación. Gracias a esta acción cooperativista con otros productores y con un frigorífico de la zona, lograron despojarse del uso de fertilizantes químicos y mantener los rendimientos productivos. M.G. Agroecológico, comercializa sus productos por medio de la venta de bolsones en Zona Sur de Buenos Aires y en ferias locales incluyendo la feria “Del productor al consumidor” de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires y son miembros del Sistema Participativo de Garantías de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

Organización 1610: De la organización 1610 se recolectaron muestras del predio de 3 hectáreas trabajadas por Victor Vicente Mamani y sus 2 hermanos Luis y Simón Mamani, ubicado en La Capilla, provincia de Buenos Aires. Estos agricultores de nacionalidad boliviana están radicados en Argentina hace varios años y el predio donde realizan agricultura lo alquilan hace 18 años. Si bien trabajan el mismo predio hace varios años, la condición de arrendatarios siempre es incierta, así como también los aumentos en los valores de la renta de terreno.

Estos productores iniciaron una transición productiva fomentada por los consumidores, quienes al buscar alimentos que se producen libres de agroquímicos, moldearon en parte, la manera en que la organización 1610 fue produciendo alimentos. Hoy en día realizan práctica de manejo terapéuticos, pero con preparados caseros y naturales (preparados con alcohol y ajo, purín de flor del paraíso, incorporación al suelo de guano de pollo), y en menor medida manejos de diseño espacial (asociación de cultivos, corredores biológicos, rotación espacial y temporal de cultivos, entre muchos otros posibles). Venden su producción en distintas Ferias y nodos de bolsones, entre ellos la Feria “Del productor al consumidor” y “El Bolsón Soberano” en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, y son miembros del Sistema Participativo de Garantías de la misma facultad.

Cooperativa U.T.T. Jáuregui: Un grupo de pequeños productores hortícolas y florícolas de la cuenca Abasto de La Plata, nucleados en la Cooperativa Unión de Trabajadores de la Tierra (U.T.T.), en búsqueda de acceso a la tierra y mejores condiciones socio-productivas, en diciembre del año 2015 lograron obtener un predio como usufructo, donde está previsto se radiquen 50 familias (hasta el

2018 eran 20 familias radicadas en el predio, las cuales trabajan de 15 a 18 hectáreas). Este predio en desuso por varios años y cedido de por el Estado Nacional, es el predio del ex – Instituto Nacional “Ramayón López Valdivieso”, ubicado en la cercanía de Jauregui, partido de Luján, Buenos Aires. Cuenta con aproximadamente 80 hectáreas. Actualmente los productores se enfrentan a una transición productiva, en la que realizan prácticas de manejo basadas en tecnología de proceso y en la utilización de insumos naturales de fabricación casera. Estos productores realizan venta directa de sus productos a través de ferias libres, nodo de bolsones y mercados agropecuarios de la organización U.T.T.

Santa Elena Agroecológica: Esta producción agroecológica de hortalizas pertenece a Elena Senattori, queda ubicada dentro de los límites del Parque Pereyra Iraola, provincia de Buenos Aires. Esta agricultora produce hortalizas anuales, como tomate (*Solanum lycopersicum*), lechuga (*Lactuca sativa* L. (1753)), acelga (*Beta vulgaris* var. *Cicla* L. (1753)), puerro (*Allium ampeloprasum* var. *Porrum* L. (1753)), brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica* L. (1753)), espinaca (*Spinacia oleracea* L. (1753)), zanahoría (*Daucus carota* L. (1753)), berenjena (*Solanum melongena* L. (1753)), zapallo (*Cucurbita pepo* L. (1753)), otros, bajo cubierta y en descubierto. Estas hortalizas son comercializadas de manera directa por medio de bolsones y puestos en ferias libres. En el año 1949 estas tierras son expropiadas de la Familia Pereyra Iraola (10.248 hectáreas) a través del decreto N°1465, donde pasan a ser tierras destinadas a reservas forestales y fomento de la agricultura. Este territorio abarca un total de 1.200 hectáreas cedidas para la explotación de tierras y su producción, donde actualmente 1.000 hectáreas están dedicadas al cultivo de alimentos y divididas entre 159 quintas, que manejan entre dos y cinco hectáreas cada una. (Fuente: Ministerio de Asuntos Agrarios de la provincia de Buenos Aires, 2007). En el año 1998 el gobierno provincial decidió desalojar a los productores con la acusación de que utilizaban agroquímicos altamente contaminantes, donde según el gobierno provincial el desalojo era la solución y no un acompañamiento técnico dentro de un programa estatal de conversión productiva. Muchos productores coinciden en que los fines que perseguía el gobierno provincial no era un fin conservacionista, si no que un fin lucrativo donde buscaba la ampliación de terreno para la construcción de barrios privados y “countries”. Bajo la presión del gobierno provincial y la inminente amenaza de desalojo de las tierras, es que los productores nucleados en el Parque Pereyra Iraola se vieron envueltos en una transición agroecológica abrupta, apoyada por el programa Cambio Rural Bonaerense y técnicos especializados en agroecología. Dicha transición se basa principalmente en la utilización de preparados caseros para el control terapéutico de plagas, diversificación temporal y espacial de los cultivos, inclusión de plantas aromáticas para repeler insectos plagas y atraer controladores biológicos (depredadores, parasitoides, competidores por recursos), reciclado de los desechos, manejo de la fertilidad del suelo por medio de abonos naturales y preparados biológicos, trabajo justo para los empleados, comercialización directa de productor a consumidor, entre otras variables de manejo posibles.

La situación en particular de la producción agroecológica de Santa Elena en términos de conversión de sistema productivo es un proceso complejo y digno de ser ampliamente estudiado. Ejemplos de estudios como el de Ávila (2013), “Desalojo agrotóxicos: Agricultura ecológica en el Parque Pereyra

Iraola” o el de Manfrino *et al.*, 2018 “Alternativas agroecológicas para el control de insectos en cultivos hortícolas en el Parque Pereyra Iraola” son trabajos que retratan en parte la historia vivida por la producción de Santa Elena Agroecológica y la situación productiva actual de la zona.

Bernardo Castillo: Bernardo Castillo es un productor hortícola de nacionalidad boliviana que produce verduras en la zona de El Pato, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Hace más de 15 años que se dedica a la agricultura en ese sector y es dueño de aproximadamente 3 hectáreas que trabaja con ayuda de 2 familiares (hermano y sobrino). En un principio Bernardo era un productor florícola que realizaba prácticas convencionales de manejo, con gran utilización de insecticidas, fungicidas, fertilizantes químicos y hasta luz artificial para modificar el ciclo fenológico de sus crisantemos (*Chrysanthemum* spp.). Él mismo se encargaba de las aplicaciones de estos productos sintéticos, lo que condujo al deterioro de su salud y posteriormente a un cuadro de intoxicación severo que le significó daños irreversibles. Tras este episodio Bernardo realizó un cambio rotundo y drástico en la conversión de una mono producción de flores de corte altamente subsidiada por insumos de gran impacto ambiental, a una producción agropecuaria poli específica, resiliente y sin uso de agroquímicos. El proceso de transición agroecológica de la finca productiva de Bernardo ha estado influenciado y apoyado por instituciones públicas y ONGs, que promueven la formación de agricultores en este ámbito. Hoy Bernardo casi no produce flores de corte y se dedica a la producción de alimentos de manera agroecológica, además de estar constantemente en contacto con sus pares agricultores, transmitiéndoles sus saberes y acompañándolos en la transición productiva. Cabe destacar que la necesidad que tiene el sector de contar con productores experimentados en agroecología y que difundan sus conocimientos con otros agricultores, es de suma importancia. De todos los predios visitados para realizar el muestreo de suelo, el campo de Bernardo era el más diverso en especies productivas y asociadas, con mayores estrategias agroecológicas para el manejo de la producción y comercialización, como por ejemplo, la utilización de preparados terapéuticos caseros para el manejo de plagas, cuando fuese necesario (fermentado de ortiga, sulfo cálcico, otros), uso de corredores biológicos, preparación de “Bokashi” (compostaje) para la nutrición de los cultivos, cooperativismo con otros productores, utilización de semillas propias, venta de sus productos en forma directa en ferias y por medio de bolsones, entre otras. Es miembro de la organización UTT (Unión de Trabajadores de la Tierra).

Campo Experimental de la Cátedra de Horticultura. Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires: Este campo experimental es a la vez demostrativo, donde los alumnos de grado interactúan y participan en el manejo de los cultivos. El campo experimental cuenta con dos invernaderos y abarca alrededor de 10.000 m<sup>2</sup> de terreno plano. En algunas partes del campo hay parcelaciones en barbecho o descanso con sucesión de plantas espontáneas, principalmente gramíneas. Dentro de las variedades hortícolas que se cultivan en el campo se pueden nombrar: acelga, tomate, pimiento morrón, kale, zanahoria, lechuga, berenjenas, apio, calabaza, cebolla, puerro, perejil, pepino, entre otros.

## **Suelo y rizosfera como fuente de microorganismos.**

Para los procesos de selección de microorganismos como agentes de control biológico, es fundamental realizar un correcto muestreo de sustratos o ambientes donde se encuentren los microorganismos con mejores características para dicho fin. En este trabajo se utilizó el suelo como reservorio de microorganismos, específicamente suelo de producciones agropecuarias que no utilizan agroquímicos. El suelo, y en especial la rizosfera, son los ambientes donde existe la mayor biodiversidad, debido a que es una región altamente favorable para la proliferación y actividad metabólica de numerosos microorganismos (Nannipieri *et al.*, 2003). La mayor abundancia de hongos se halla en las capas u horizontes superficiales del suelo, donde el microclima, ambiente y disponibilidad de recursos nutricionales son favorables para el desarrollo y crecimiento de hongos (Lavelle y Spain, 2001). El término rizósfera fue introducido por Hiltner en 1904 quien lo definió como la parte del suelo que es influenciada por el sistema radical (Hartman, 2005). La rizósfera es el volumen de suelo influenciado por la presencia de raíces de una planta viva, cuya extensión puede variar de acuerdo con el tipo de suelo, la especie de planta, su edad y otros factores (Foster, 1998). Alrededor del 15% del área de las raíces se considera cubierta por microorganismos específicos (Sylvia *et al.*, 2005). La microflora de la rizosfera es dinámica, y presenta variación temporal y espacial (Shivanna y Vasanthakumari, 2011). Su estructura puede variar según las características del suelo, el tipo de fertilización, la especie vegetal y el área de la raíz considerada (Marschner *et al.*, 2004, Berg *et al.*, 2005). Burbano- Orjuela en 1989 aduce que la influencia de la rizósfera se extiende hasta 2 cm. del rizoplano. Se estima que los exudados rizosféricos pueden llegar a contener entre 10 y 44 % del carbono asimilado y otra serie de compuestos, lo que contribuye generalmente a un incremento de las densidades poblacionales de los microorganismos (Primavesi, 1984). La rizósfera es entonces, un nicho rico en nutrientes como resultado de secreciones orgánicas constituidas por monómeros como glucosa y aminoácidos, polímeros como polisacáridos y proteínas, y restos de raíces (Hawes *et al.*, 2003) y excreciones (Uren, 2007). Como consecuencia, se pueden detectar niveles elevados de poblaciones de ácaros, nematodos y microorganismos (Bazin *et al.*, 1990). Protozoos (Darbyshire y Greaves 1973; Griffiths *et al.*, 2007) y algas (Saharan y Nehra, 2011).

Entre los microorganismos habitantes del suelo las bacterias, incluidos los Actinomicetos, son los más abundantes pues se les encuentran presentes en un rango aproximado de  $10^6$  y  $10^8$  células por gramo de suelo pesando aproximadamente 10.000 kg/ha, que representa el 5 % del total de materia orgánica seca presente en el suelo (Rivera y Wright, 2013). La abundancia de bacterias en la rizósfera en comparación con otros microorganismos se puede deber a su rápido crecimiento y la habilidad que presentan de utilizar un amplio rango de sustratos como fuentes de carbono o nitrógeno (Glick, 1995). En cuanto a los hongos, dado su mayor tamaño, aunque menor abundancia, tienen la biomasa más significativa (Alexander, 1994; Tate, 1995), representando un 10 a 20 % del microbiota total, esto es aproximadamente  $10^5$  a  $10^6$  organismos/gramo de suelo (Calvo-Vélez *et al.*, 2008).

En la biota benéfica se encuentran microorganismos que solubilizan y fijan nutrientes, producen sustancias promotoras del crecimiento vegetal, inducen la resistencia de las plantas a enfermedades

o se comportan como antagonistas de agentes fitopatógenos (Rivera y Wright, 2013). En un sentido amplio, los microorganismos benéficos de la rizosfera incluyen simbiosis (ciertos Actinomicetes y hongos micorrízicos) y saprófitos de vida libre (Schippers *et al.*, 1987). También se encuentran hongos patógenos y simbióticos asociados a la rizosfera, en concentraciones de alrededor de  $10^5$  a  $10^6$  unidades formadoras de colonias por gramo de suelo rizosférico. Las especies de Zygomycetes e Hyphomycetes son las que se establecen con mayor facilidad, dada su capacidad de metabolizar azúcares simples (Sylvia *et al.*, 2005).

Entre las numerosas interacciones entre organismos benéficos y fitopatógenos en la rizosfera, se encuentran las que se establecen entre éstos últimos y sus antagonistas, fenómeno enmarcado en lo que se denomina control biológico, que según la definición clásica enunciada por Cook y Baker (1983) es la reducción de la cantidad de inóculo o de la actividad del patógeno capaz de producir enfermedad, obtenida por acción de uno o más organismos, distintos del hombre (Rivera y Wright, 2013).

A continuación, se presenta el proceso por el cual fue realizado el muestreo de suelos, para el posterior aislamiento de microorganismos con potencial para su uso como agentes de control biológico de los fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* y el insecto herbívoro *Bemisia tabaci*.

### **Hipótesis.**

En producciones agropecuarias agroecológicas, donde no se aplican agroquímicos, existen microorganismos fúngicos del género *Trichoderma* y hongos entomopatógenos.

### **Objetivos.**

Aislar hongos del género *Trichoderma* y hongos entomopatógenos para ser seleccionados como promisorios agentes de control biológico.

### **Materiales y métodos.**

#### **Procedimiento de muestreo.**

Las muestras recolectadas se tomaron de predios hortícolas que no utilizan agroquímicos. Por cada muestra, se recolectó un total de cinco submuestras aleatorias de los primeros 20 cm de la superficie de suelo y de la zona radicular de los cultivos presentes, las cuales se mezclaron formando una sola muestra homogénea de 500 g aproximadamente. Dichas muestras se dispusieron en una bolsa plástica la cual se rotuló indicando la fecha, cultivo y predio a que pertenece. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en un recipiente cerrado de poliestireno expandido, las cuales fueron procesadas en un periodo de tiempo no superior a 24 horas. Las muestras se separaron e

identificaron por productor y dentro de éste, separado por el cultivo de donde se extrajeron.

#### **Aislamiento de hongos incluidos en el género *Metarhizium*.**

Para la obtención de hongos entomopatógenos provenientes de muestras de suelo, se utilizaron larvas de *Tenebrio molitor* Linnaeus, (1758) de tercer a cuarto estado larval (2,0 – 3,5 cm), como insectos trampa levemente modificado de (Aguilera-Sammaritano *et al.*, 2016), dichas larvas fueron provistas por el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE). Cada muestra recolectada se tamizó a través de un tamiz de 2mm de diámetro de poro, colocando 300 g de ese suelo humedecido en recipientes plásticos de 500 ml de capacidad con la tapa agujereada, junto con cinco larvas de *T. molitor*. Estos se depositaron en una incubadora o cámara bajo condiciones controladas “BRIKET NPR 121” a 18° C y 65% de humedad relativa y un fotoperíodo de 14:10 h Luz:Oscuridad. La prospección de los cadáveres se realizó posterior a 7 días de incubación, donde las larvas muertas con presencia de micosis externas fueron lavadas con agua destilada estéril y el signo del hongo removido con punta de ansa esterilizada y repicado en un medio de cultivo con Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) (Merck, Alemania) más 5 ml/100ml de cloranfenicol (figura 4). Los aislamientos de *Metarhizium* spp. fueron observados con ayuda de una lupa binocular “LEICA EZ4” observando las características distintivas del género y comprobando que no hubiese contaminantes.

#### **Aislamiento de hongos incluidos en el género *Trichoderma*.**

De las muestras de suelo (500g aproximadamente) se tomaron 5 g de suelo y se suspendieron en 100 ml de agua destilada estéril en un Erlenmeyer y se agitaron durante 1 hora en Vórtex. Luego se tomaron alícuotas de la suspensión madre con una micropipeta y se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a una concentración de  $\times 10^{-6}$ , siendo cada una de las diluciones sembradas en placas de Petri de 90 mm de diámetro con APG (Agar Papa Glucosa 2 %), pH 6 y adicionando 0,2 ml estreptomycin para evitar contaminación bacteriana. Las placas se incubaron en estufa a 20-22° C por 72 horas, cuando se desarrollaron colonias de *Trichoderma* spp. se repicaron sucesivas veces a placas de Petri de 90 mm de diámetro con APG hasta su purificación. Luego se realizó una prospección visual de los aislamientos observando las características distintivas del género y comprobando que no hubiese contaminantes (figura 5).

#### **Observación microscópica.**

Se observaron microscópicamente los aislamientos de manera identificarlos a nivel de género. Se observaron las formas reproductivas de los hongos, determinando su forma, tamaño, agrupamiento y color, las características de las hifas como presencia de tabiques, grosor y forma. Tal observación se realizó a partir de cultivos en placas de Petri de 90 mm de diámetro con la ayuda de un microscopio trinocular “Arcano XSZ107BNT” 160X. Luego se realizaron observaciones tomando una pequeña muestra de micelio en pleno desarrollo, la que se colocó en una gota de líquido de montaje (azul de algodón y agua destilada estéril) coloreando las estructuras y favoreciendo el contraste.

Este preparado se observó en microscopio trinocular “Arcano XSZ107BNT” 160X (figura 6).

### Microcultivo.

Posterior a la observación en medio líquido de contraste se utilizó la técnica de cultivo en portaobjetos o microcultivo, ya que permite observar las características del aislamiento sin modificar su desarrollo y el arreglo y acomodo de sus partes permanecen intactos. Para esta técnica se ubicó un trozo de papel filtro esterilizado en el fondo de una placa de Petri de 90 mm de diámetro sobre este papel se colocaron dos pequeños portaobjetos de vidrio esterilizados como material de soporte de los portaobjetos que contienen APG y que éstos no quedaran en contacto directo con el papel filtro en el fondo de la placa de Petri. Con un bisturí esterilizado se cortó un trozo del medio de cultivo respectivo (1,5x 1,5 mm de APG-Merck, Alemania, adicionando 0,2 ml estreptomicina) y se colocó sobre un portaobjetos esterilizado, donde se inocularon en 2 sitios diferentes. Luego se puso encima un cubreobjetos esterilizado, se humedeció con agua destilada estéril el papel filtro que se encuentra en el fondo y se tapó con la caja de la placa de Petri (similar a figura 3). Se incubaron en estufa a 20-22° C durante 24, 48 o 72 horas dependiendo de la tasa de crecimiento del hongo. Luego de este periodo se dispuso el microcultivo en un microscopio trinocular “Arcano XSZ107BNT” 160X y se observaron las estructuras características del género.

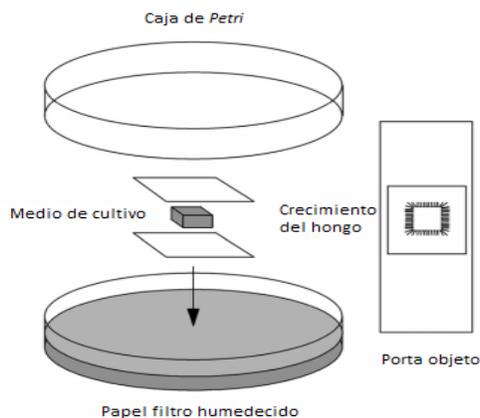


Figura 3. Ordenamiento de las partes de un Microcultivo. Fuente de la imagen: Lacey 2012.

Todos estos procedimientos anteriormente descritos se realizaron bajo condiciones de esterilidad, bajo cámara de flujo laminar horizontal. Todos los utensilios y materiales fueron envueltos en papel de aluminio y esterilizados en autoclave a 120° C, durante 25-30 minutos. Se utilizó alcohol 70° para la desinfección de utensilios, mesadas y superficies. Las ansas fueron esterilizadas por flameado “al rojo vivo” en mechero de Bunsen durante 3 segundos previo y posterior a cada siembra del microcultivo.

### **Cultivos monospóricos y métodos de conservación.**

Para establecer una colección de cepas que garantice la autenticidad y pureza de cada aislado y para contar con material homogéneo de cada cepa de *Trichoderma* spp. y de *Metarhizium* spp., se realizaron cultivos monospóricos de todos los aislamientos obtenidos, usando la metodología descrita por Navarro-Barranco (2006) citado por Brunner *et al.* (2013). De cada aislado de hongos obtenidos, se obtuvo una suspensión de  $1 \times 10^{-4}$  conidios/ml. Se depositaron 20  $\mu$ l de la suspensión para cada caja de Petri con APG (Merck, Alemania) adicionando 0,2 ml estreptomina para los aislamientos de *Trichoderma* spp. y cajas de Petri con SDYA (Merck, Alemania) para los aislamientos de *Metarhizium* spp. Esta suspensión fue esparcida en la placa de Petri de 90 mm de diámetro con una espátula de vidrio esterilizada en autoclave durante 30 minutos a 120° C, la que fue incubada en estufa por 24 horas a 20-22° C. Posterior a este periodo y utilizando una lupa estereoscópica binocular (LEICA, led 20x 40x, Alemania) se localizó un conidio en crecimiento aislado y se levantó con punta de ansa estéril. El conidio en crecimiento se dispuso en una caja de Petri con medio de cultivo respectivo y se incubó a 20-22° C. Se realizó una prospección diaria de los cultivos monospóricos para constatar la aparición de una colonia a partir del conidio sembrado.

Todos los aislamientos fueron conservados por dos métodos de preservación, conservación en papel filtro y por liofilizado. El primero se realizó siguiendo las pautas del procedimiento descrito por López-Lastra y Lecuona (2019) levemente modificado de Fong *et al.* (2000). El cual consiste en colocar tiras de papel filtro (Whatmn N° 4 de 2mm x 50 mm, Reino Unido) (previamente esterilizados en autoclave por 20 minutos a 120° C y secadas en estufa), sobre los cultivos esporulados en placas de Petri durante 60 minutos. Posteriormente se dejan secar bajo cámara de flujo laminar, una vez secos se guardan en sobres de papel (1,5 ml) esterilizados previamente. Se conservan en heladera a 4° C. Se liofilizaron todos los aislamientos recolectados, mediante el método descrito por López-Lastra y Lecuona (2019). Se utilizó un Liofilizador (Rifacor, L-A-E50-CRT, Argentina) con crioprotectores; leche y mioinositol (OneLab, Argentina).

### **Resultados.**

#### **Muestras recolectadas de los predios visitados para el aislamiento de microorganismos.**

En la tabla 1 se presentan las muestras de suelo recolectadas separadas por establecimiento productivo, fecha de muestreo, cultivo y localización de la producción. A cada muestra se le asignó un código de anotación.

N.º	Establecimiento	Fecha	Cultivo	Muestra	Recolector	Referencia
1	M. G. Agroecológico	16/04/2018	Repollo blanco	M.G. - 1	R. A. Varela Pardo	-34.8672710, -58.4608800
2	M. G. Agroecológico	16/04/2018	Albahaca	M.G. - 2	R. A. Varela Pardo	-34.8672710, -58.4608800
3	M. G. Agroecológico	16/04/2018	Maíz	M.G. - 3	R. A. Varela Pardo	-34.8672710, -58.4608800
4	M. G. Agroecológico	16/04/2018	Lechuga crespita verde	M.G. - 4	R. A. Varela Pardo	-34.8672710, -58.4608800
5	M. G. Agroecológico	16/04/2018	Lechuga crespita morada	M.G. - 5	R. A. Varela Pardo	-34.8672710, -58.4608800
6	M. G. Agroecológico	16/04/2018	Tomate perita	M.G. - 6	R. A. Varela Pardo	-34.8672710, -58.4608800
7	M. G. Agroecológico	16/04/2018	Zapallito morado	M.G. - 7	R. A. Varela Pardo	-34.8672710, -58.4608800
8	M. G. Agroecológico	16/04/2018	Pimentón	M.G. - 8	R. A. Varela Pardo	-34.8672710, -58.4608800
9	M. G. Agroecológico	16/04/2018	Tomate cherry	M.G. - 9	R. A. Varela Pardo	-34.8672710, -58.4608800
10	Organización 1610	18/04/2018	Lechuga criollita	1610 - 1	R. A. Varela Pardo	-34.9046857, -58.2666433
11	Organización 1610	18/04/2018	Lechuga manteca	1611 - 2	R. A. Varela Pardo	-34.9046857, -58.2666433
12	Organización 1610	18/04/2018	Verdeo	1610 - A	R. A. Varela Pardo	-34.9046857, -58.2666433
13	Organización 1610	18/04/2018	Puerro	1610 - B	R. A. Varela Pardo	-34.9046857, -58.2666433
14	Organización 1610	18/04/2018	Repollo blanco	1610 - C	R. A. Varela Pardo	-34.9046857, -58.2666433
15	Organización 1610	18/04/2018	Hinojo	1610 - D	R. A. Varela Pardo	-34.9046857, -58.2666433
16	Organización 1610	18/04/2018	Betarraga	1610 - F	R. A. Varela Pardo	-34.9046857, -58.2666433
17	Organización 1610	18/04/2018	Brócoli	1610 - G	R. A. Varela Pardo	-34.9046857, -58.2666433
18	Prod. Berno Castillo	18/04/2018	Repollo de Bruselas	Berno - 7	R. A. Varela Pardo	-34.905505, -58.200043
19	Prod. Berno Castillo	18/04/2018	Acelga	Berno - 8	R. A. Varela Pardo	-34.905505, -58.200043
20	Prod. Berno Castillo	18/04/2018	Zanahoria	Berno - 9	R. A. Varela Pardo	-34.905505, -58.200043
21	Prod. Berno Castillo	18/04/2018	Alcachofa	Berno - 10	R. A. Varela Pardo	-34.905505, -58.200043
22	Prod. Berno Castillo	18/04/2018	Haba	Berno - 11	R. A. Varela Pardo	-34.905505, -58.200043
23	Prod. Berno Castillo	18/04/2018	Nabo	Berno - 12	R. A. Varela Pardo	-34.905505, -58.200043
24	FAUBA	15/05/2018	Tomate platense	Horti - 1	R. A. Varela Pardo	-34.594101, -58.484467
25	FAUBA	06/06/2018	Tomate redondo	Tripa - 1	R. A. Varela Pardo	-34.594101, -58.484467
26	FAUBA	06/06/2018	Tomate redondo	Tripa - 2	R. A. Varela Pardo	-34.594101, -58.484467
27	Coop. U.T.T. Jauregui	02/07/2018	Betarraga	Jauregui - 1	R. A. Varela Pardo	-34.6204249, -59.1764168
28	Coop. U.T.T. Jauregui	02/07/2018	Lechuga manteca	Jauregui - 2	R. A. Varela Pardo	-34.6204249, -59.1764168
29	Coop. U.T.T. Jauregui	02/07/2018	Puerro	Jauregui - 3	R. A. Varela Pardo	-34.6204249, -59.1764168
30	Coop. U.T.T. Jauregui	02/07/2018	Verdeo	Jauregui - 4	R. A. Varela Pardo	-34.6204249, -59.1764168
31	Coop. U.T.T. Jauregui	02/07/2018	Acelga	Jauregui - 5	R. A. Varela Pardo	-34.6204249, -59.1764168
32	Coop. U.T.T. Jauregui	02/07/2018	Maíz	Jauregui - 6	R. A. Varela Pardo	-34.6204249, -59.1764168
33	Coop. U.T.T. Jauregui	02/07/2018	Kale	Jauregui - 7	R. A. Varela Pardo	-34.6204249, -59.1764168
34	Sta. Elena Agroecológica	08/08/2018	Lechuga manteca	Sta. Elena - 1	R. A. Varela Pardo	-34.83699, -58.093384
35	Sta. Elena Agroecológica	08/08/2018	Hinojo	Sta. Elena - 2	R. A. Varela Pardo	-34.83699, -58.093384
36	Sta. Elena Agroecológica	08/08/2018	Arveja	Sta. Elena - 3	R. A. Varela Pardo	-34.83699, -58.093384
37	Sta. Elena Agroecológica	08/08/2018	Puerro	Sta. Elena - 4	R. A. Varela Pardo	-34.83699, -58.093384
38	Sta. Elena Agroecológica	08/08/2018	Apio	Sta. Elena - 5	R. A. Varela Pardo	-34.83699, -58.093384
39	Sta. Elena Agroecológica	08/08/2018	Betarraga	Sta. Elena - 6	R. A. Varela Pardo	-34.83699, -58.093384
40	Sta. Elena Agroecológica	08/08/2018	Rúcula	Sta. Elena - 7	R. A. Varela Pardo	-34.83699, -58.093384
41	Sta. Elena Agroecológica	08/08/2018	Verdeo	Sta. Elena - 8	R. A. Varela Pardo	-34.83699, -58.093384

Tabla 1. Información de muestras de suelo obtenidas en la Provincia de Buenos Aires.

Se observaron esporulaciones características del género *Metarhizium* en cadáveres de *T. molitor* (ver figura 4).

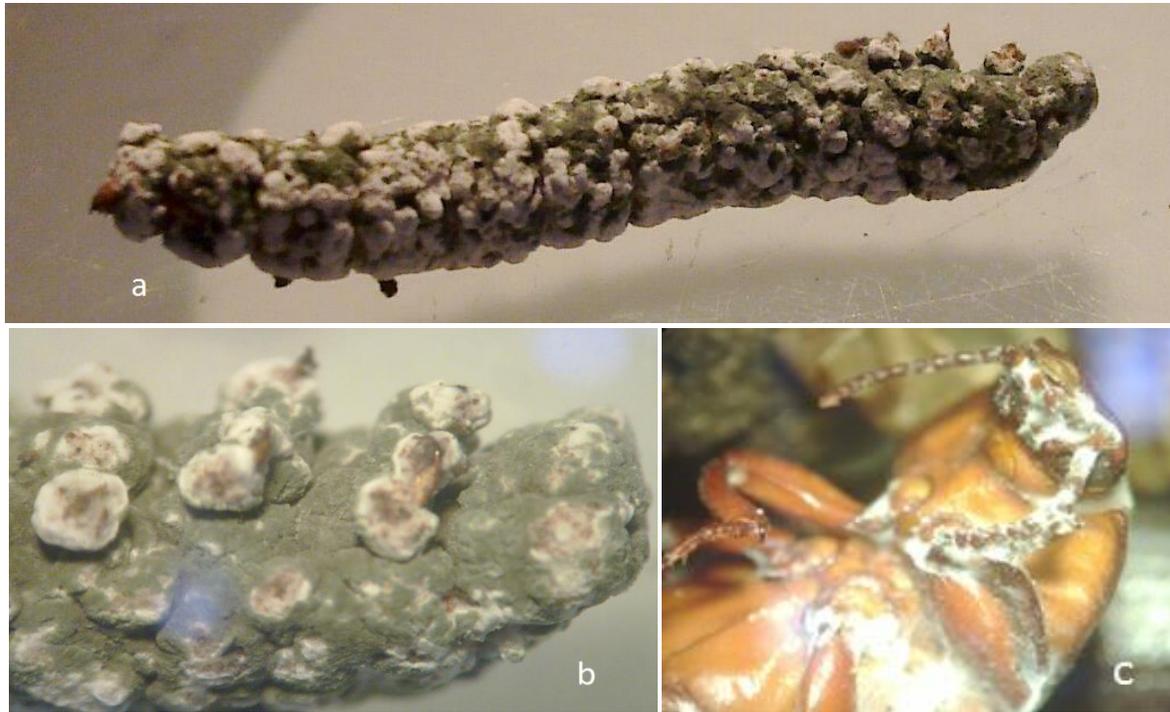


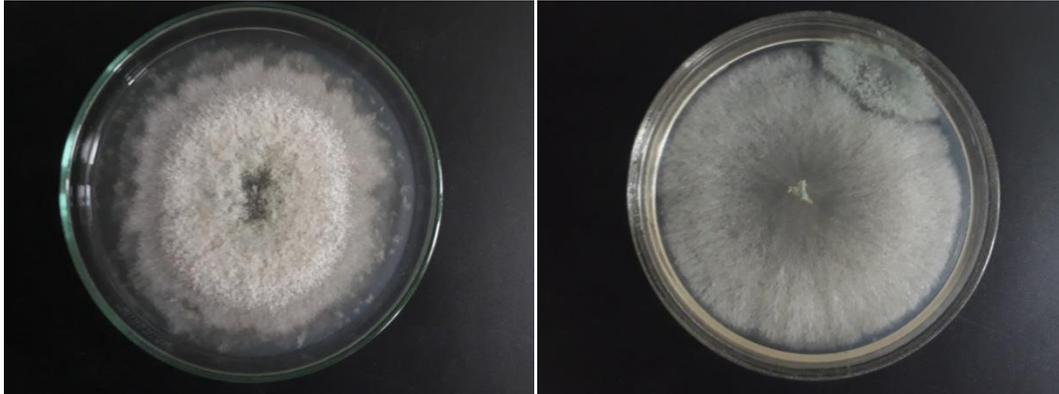
Figura 4. esporulaciones características del género *Metarhizium* en cadáveres de *Tenebrio molitor*. a) Esporulación formando esporodoquios (en empalizada) de *Metarhizium* sp. sobre cadáver de larva de *Tenebrio molitor*. (b) Detalle; cabeza y patas de cadáver de larva de *Tenebrio molitor* con esporulación y micelio de *Metarhizium* sp. (c) Cadáver de adulto de *Tenebrio molitor* con signo de *Metarhizium* sp. Imágenes fotografiadas con lupa (Leica EZ4 10X, Alemania) en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE, CONICET-UNLP), por autor de tesis.

Se obtuvo un total de 5 aislamientos de hongos entomopatógenos por medio de la técnica de insecto trampa empleada para este estudio. Los datos de los aislamientos se presentan en la tabla 2.

Nº	Establecimiento	Cod. Liof.	Fecha de rec.	Cultivo	Referencia geográfica
1	Coop. U.T.T. Jauregui	<b>Ma 722</b>	02/07/2018	Remolacha	-34.6204249, -59.1764168
2	Coop. U.T.T. Jauregui	<b>Ma 723</b>	02/07/2018	Acelga	-34.6204249, -59.1764168
3	Prod. Bernardo Castillo	<b>Ma 724</b>	18/04/2018	Alcaucil	-34.905505, -58.200043
4	Prod. Bernardo Castillo	<b>Ma 725</b>	18/04/2018	Haba	-34.905505, -58.200043
5	Prod. Bernardo Castillo	<b>Ma 726</b>	18/04/2018	Nabo	-34.905505, -58.200043

Tabla 2. Aislamientos de hongos entomopatógenos obtenidos.

Luego de sucesivos repiques y prospecciones visuales se logró el aislamiento completo de microorganismos del género *Trichoderma* (ver figura 5).



Figuras 5. Imágenes de repiques de aislamientos de *Trichoderma*, en proceso de re-aislamiento y purificación de otros hongos y bacterias. A la izquierda: aislamiento puro, a la derecha: aislamiento contaminado.

Tras a prospección visual de estructuras características del género *Trichoderma* de los aislamientos obtenidos (ver figura 6), se procedió su conservación.

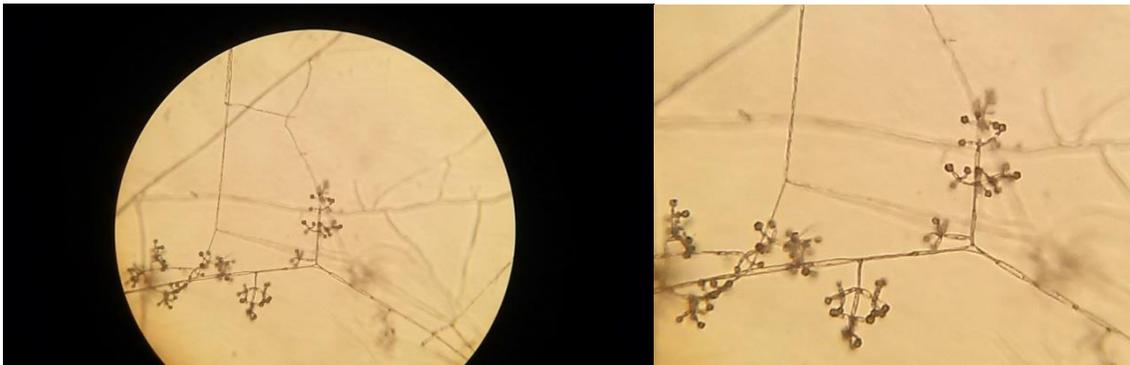


Figura 6. Microcultivo de aislamiento incluido en el género *Trichoderma*; estructuras características del género, hifa, conidióforo, fiálides y conidios. Microscopio trinocular (Arcano XSZ107BNT" 160X, China).

Se obtuvo un total de 15 aislamientos del género *Trichoderma*, estos fueron conservados en papel y liofilizados para su conservación. En la tabla 3 se presentan los aislamientos obtenidos.

Nº	Establecimiento	Cod. Liof.	Fecha de rec.	Cultivo	Referencia geográfica
1	Coop. U.T.T. Jauregui	<b>CEP-745</b>	02/07/2018	Puerro	-34.6204249, -59.1764168
2	FAUBA	<b>CEP-747</b>	06/06/2018	Tomate redondo	-34.594101, -58.484467
3	Organización 1610	<b>CEP-748</b>	18/04/2018	Repollo blanco	-34.9046857, -58.2666433
4	Coop. U.T.T. Jauregui	<b>CEP-749</b>	02/07/2018	Lechuga Manteca	-34.6204249, -59.1764168
5	Santa Elena Agroecológica	<b>CEP-750</b>	08/08/2018	Arveja	-34.83699, -58.0933384
6	Santa Elena Agroecológica	<b>CEP-751</b>	08/08/2018	Lechuga Manteca	-34.83699, -58.0933384
7	FAUBA	<b>CEP-752</b>	15/05/2018	Tomate platense	-34.594101, -58.484467
8	M.G. Agroecológico	<b>CEP-753</b>	16/04/2018	Lechuga crespita mor.	-34.8672710, -58.4608800
9	Organización 1610	<b>CEP-754</b>	18/04/2018	Lechuga criolla	-34.9046857, -58.2666433
10	M.G. Agroecológico	<b>CEP-755</b>	16/04/2018	Maíz	-34.8672710, -58.4608800
11	Organización 1610	<b>CEP-756</b>	18/04/2018	Remolacha	-34.9046857, -58.2666433
12	M.G. Agroecológico	<b>CEP-757</b>	16/04/2018	Albahaca	-34.8672710, -58.4608800
13	Coop. U.T.T. Jauregui	<b>CEP-758</b>	02/07/2018	Remolacha	-34.6204249, -59.1764168
14	FAUBA	<b>CEP-759</b>	06/06/2018	Tomate redondo	-34.594101, -58.484467
15	M.G. Agroecológico	<b>CEP-760</b>	16/04/2018	Tomate perita	-34.8672710, -58.4608800

Tabla 3. Aislamientos de hongos incluidos en el género *Trichoderma* obtenidos de muestras de suelo de cultivos hortícolas.

### Preservación en Colección Micológica.

Los aislamientos fueron depositados y preservados como cultivos de referencia en la Colección Micológica del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina y Agregados a la colección de cepas de hongos y bacterias de la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires con los códigos de referencia Ma-722, Ma-723, Ma-724, Ma-725 y Ma-726 para los aislamientos del género *Metarhizium* y CEP-745, CEP-747, CEP-748, CEP-749, CEP-750, CEP-751, CEP-752, CEP-753, CEP-754, CEP-755, CEP-756, CEP-757, CEP-758, CEP-759 y CEP-760 para los aislamientos del género *Trichoderma*.

### Discusión.

La agricultura es una práctica disruptiva de ambientes óptimos para el desarrollo de microorganismos. La intensa actividad humana en suelos cultivables ha generado desordenes en la composición de la microbiota presente en diversos agroecosistemas, estos muchas veces han sido degradados hasta el punto de hacer inviable la producción agropecuaria. En muchos casos, los problemas de enfermedades de los cultivos son el resultado de la acción humana, acciones que modifican rasgos estructurales o funcionales del agroecosistema (García-Espinosa, 2010). La intensa mano de obra y el intenso uso de agroquímicos para contrarrestar las pérdidas en los rendimientos por la falta de nutrientes y la presencia de plagas agrícolas, ha favorecido la aparición de plagas en los cultivos (Clin *et al.* 2022; Ratnadass *et al.*, 2021). Los aislamientos fúngicos recolectados en este trabajo permiten avanzar en el desarrollo de tecnologías que eviten la disminución de la biodiversidad por medio del uso de agroquímicos y exceso de maquinaria. El hecho de que estos microorganismos fúngicos hayan sido aislados de muestras de suelo de una zona determinada del

territorio nacional argentino, otorga cierta confiabilidad de que dichos microorganismos podrían tener un buen desempeño como agentes de control biológico en zonas con características medioambientales similares.

Investigaciones proponen que una mayor diversidad de vegetación espacial y temporal, así como una mayor heterogeneidad de los paisajes es más favorable para la vida de los antagonistas o enemigos naturales reduciendo los problemas asociados a las epidemias (Altieri y Nicholls, 2017). Diferentes hongos y bacterias rizosféricas, filosféricas y endófitos que dependen de los metabolitos liberados por las plantas y reducen la infección de patógenos han sido identificados (Chen *et al.*, 2020). Es por lo anterior que se espera encontrar una mayor cantidad de microorganismos promisorios como agentes de control biológico en ambientes menos disturbados, que en aquellos que presentan un alto grado de intervención humana, así como también en ambientes con una mayor riqueza específica de plantas cultivadas y asociadas. En todos los predios visitados fue posible aislar al menos un microorganismo de géneros reconocidos como controladores biológicos, ya sea de enfermedades, como de insectos. De un total de 41 muestras de suelo, se logró obtener un total de 5 aislamientos del género *Metarhizium* y 15 aislamientos del género *Trichoderma*, por medio de 2 métodos de aislamiento (diluciones seriadas e insecto trampa). Ambos géneros son conocidos por tener miembros con capacidad controladora de enfermedades e insectos.

### **Conclusión.**

En fincas agroecológicas de la Provincia de Buenos Aires, es posible encontrar microorganismos promisorios para ser incorporados dentro de un manejo de plagas agrícolas.

### **Bibliografía.**

- Aguilera-Sammaritano, J. A., López-Lastra, C. C., Leclerque, A., Vazquez, F., Toro, M. E., D'Alessandro, C. P., Cuthbertson, A. G. S. y Lechner, B. E. 2016. Control of *Bemisia tabaci* by entomopathogenic fungi isolated from arid soils in Argentina. *Biocontrol Science and Technology*, 26(12), 1668-1682.
- Alexander M. 1994. Introducción a la Microbiología de Suelos. Editor S. A. México.
- Altieri, M. A. y Nicholls, C. I. 2017. Agroecological foundations for pest management in the tropics: Learning from traditional farmers. In *Integrated Pest Management in Tropical Regions*, eds. Rapisarda Carmelo, Cocuzza Giuseppe E. Massimino, 6-11. Boston, MA: CABI.
- Ávila, N. 2013. Desalojando agrotóxicos: Agricultura ecológica en el parque Pereyra Iraola. *Theomai*, (27-28), 147-156.

- Bazin, M. J., Markham, P., Scott, E. M. y Lynch, J. M. 1990. Population dynamics and rhizosphere interactions. *The rhizosphere.*, 99-127.
- Berg, G., Zachow, C., Lottmann, J., Götz, M., Costa, R. y Smalla, K. 2005. Impact of plant species and site on rhizosphere-associated fungi antagonistic to *Verticillium dahliae* Kleb. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4203-4213.
- Brunner, C., Navarro Barranco, H., Ayala Zermeño, M., Mellin Rosas, M. A. y Toriello, C. 2013. Obtención y caracterización de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) para genotipificación. In *Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Control Biológico* (pp. 52-55).
- Burbano-Orjuela, H. 1989. El suelo: una visión sobre sus componentes biorgánicos. *Serie investigaciones 1*.
- Calvo-Vélez, P., Reymundo-Meneses, L. y Zúñiga-Dávila, D. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada*, 7(1-2), 141-148.
- Chen, D., Wang, X., Zhang, W., Zhou, Z., Ding, C., Liao, Y. y Li, X. 2020. Persistent organic fertilization reinforces soil-borne disease suppressiveness of rhizosphere bacterial community. *Plant and Soil*, 452, 313-328.
- Clin, P., Grogard, F., Andrivon, D., Mailleret, L. y Hamelin, F. M. 2022. Host mixtures for plant disease control: Benefits from pathogen selection and immune priming. *Evolutionary Applications* 15 (6),967-975.
- Cook, R. J. y Baker, K. F. 1983. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. St. Paul. Minnesota, USA. The American Phytopathological Society.
- Darbyshire, J. F. y Greaves, M. P. 1973. Bacteria and protozoa in the rhizosphere. *Pesticide science*, 4(3), 349-360.
- Fong, Y. K., Anuar, S., Lim, H. P., Tham, F. Y. y Sanderson, F. R. 2000. A modified filter paper technique for long-term preservation of some fungal cultures. *Mycologist*, 14(3), 127-130.
- Foster, R. C. 1998. Microenvironments of soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*, 6, 189-203.
- Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by freeliving bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(2), 109-117.
- Griffiths, B. S., Christensen, S. y Bonkowski, M. 2007. Microfaunal interactions in the rhizosphere, how nematodes and protozoa link above-and belowground processes. In *The Rhizosphere* (pp. 57-71). Academic Press.

- Hartman, A. 2005. Prof. Dr. Lorenz Hiltner, a Pioneer in soil bacteriology and rhizosphere research. Hartman A, M. Schmid, WW Wenzel, P Hinsinger (Editores). *Rhizosphere 2005: perspectives and challenges – a tribute to Lorenz Hiltner*. GSF-Forschungszentrum, Bericht. Neurenberg. 1-4.
- Hawes, M. C., Bengough, G., Cassab, G. y Ponce, G. 2003. Root caps and rhizosphere. *Journal Plant Growth Regulation*, 21, 352-367.
- Lavelle, P. y Spain, A. V. 2001. *Soil ecology*. Dordrecht, NL. Kluwer Academic Publishers.
- López-Lastra, C. C. y Lecuona, R. E. 2019. *Micopatología de artrópodos: hongos entomopatógenos para ser usados como bioinsumos en el control microbiano de plagas* (No. 632.96). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA (Argentina).
- Manfrino, R. G., Gutierrez, A. C., Glenza, F., Padín, S. B., D'Alessandro, C. P., Tito, G., Cap, G., Úngaro, P., Lattari, M. y López-Lastra, C. 2018. Alternativas agroecológicas para el control de insectos en los cultivos hortícolas en el Parque Pereyra Iraola. *Revista LEISA* 34(1).
- Marschner, P., Crowley, D. y Yang, C. H. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and soil*, 261(1-2), 199-208.
- Ministerio de Asuntos Agrarios de la provincia de Buenos Aires. 2007. <https://www.argentina.gob.ar/>
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G. y Renella, G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European journal of soil science*, 54(4), 655-670.
- Primavesi, A. 1984. *Manejo ecológico del suelo: La agricultura en zonas tropicales*. Editorial El Ateneo. Buenos Aires, Argentina.
- Ratnadass, A., Fernandes, P., Avelino, J. y Habib, R. 2012. Plant species diversity for sustainable management of crop pests and diseases in agroecosystems: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(1), 273-303.
- Rivera, M. C. y Wright, E. R. 2013. Interacciones entre fitopatógenos y microorganismos benéficos en la rizosfera. *RIZOSFERA, BIODIVERSIDAD Y AGRICULTURA SUSTENTABLE*, p. 33.
- Saharan, B. S. y Nehra, V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, 21(1), 30.
- Schippers, B., Bakker, A. W. y Bakker, P. A. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual review of Phytopathology*, 25(1), 339-358.
- Shivanna, M. B. y Vasanthakumari, M. M. 2011. Temporal and spatial variability of rhizosphere and rhizoplane fungal communities in grasses of the subfamily Chloridoideae in the Lakkavalli region of the western ghats in India. *Mycosphere*, 2, 255-271.

- Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G. y Zuberer, D. A. 2005. *Principles and applications of soil microbiology* (No. QR111 S674 2005). Pearson.
- Tate, R. L. 1995. *Soil microbiology*. John Wiley & sons, New York, EEUU.
- Uren, N. C. 2007. *Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants*. Pinton, R; Varanini, Z. y Nannipieri, P. (Editores). *The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil Plant Interface*. Taylor and Francis. Boca Raton, 1-21.

## Capítulo 5: Selección de aislamientos de los géneros *Metarhizium* y *Trichoderma* a través de cultivos duales.

### Resumen.

La selección de aislamientos para su uso como Agentes de Control Biológico (ACB) requiere de una serie de estudios que, por su naturaleza, han sido conducidos en diferentes etapas y con distintos microorganismos. En este capítulo se presentan los ensayos *in vitro* en placas de Petri realizados con los fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*, en una primera instancia, frente a 15 aislamientos del género *Trichoderma* y posteriormente frente a 5 aislamientos del género *Metarhizium* obtenidos de las muestras de suelo recolectadas previamente. Se seleccionaron los aislamientos del género *Metarhizium* CEP-722, CEP-723, CEP-724, CEP-725 y CEP-726 y los aislamientos del género *Trichoderma* CEP-745; CEP-749; CEP-751; CEP-752; CEP-753 y CEP-754 por presentar los mejores resultados en los estudios realizados en este capítulo.

### Introducción.

El género *Trichoderma* incluye a las especies antagonistas más relevantes para el biocontrol de hongos fitopatógenos, utilizado principalmente por productores orgánicos y de buenas prácticas agrícolas para el manejo de enfermedades y potenciador de compost (Romero-Arenas *et al.*, 2017; Launio *et al.*, 2020). El éxito y usos en las prácticas agrícolas, se debe a sus mecanismos de acción como la competencia por espacio y recursos, micoparasitismo, antibiosis (Nawrocka *et al.*, 2018) y la producción de compuestos volátiles (Hernández-Melchor *et al.*, 2019; García *et al.*, 2022). You *et al.* (2022) encontraron que, los componentes volátiles de *Trichoderma* Samuels, C. Suarez & H.C. Evans, (2006) cepa T-51 redujeron hasta en un 73,78 y 43,68 % el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum* respectivamente. Miguel-Ferrer *et al.* (2021) reportaron que, las cepas *Trichoderma harzianum* (TH-4) y *T. koningiopsis* (T-K11), mostraron antagonismo clase II y III respectivamente, sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., (1881) en la escala de Bell y un 53 % de inhibición de crecimiento radial sobre *F. solani* MX-MIC 798 en condiciones *in vitro*. García *et al.* (2022) reportaron que, *Trichoderma viride* y *T. harzianum* presentaron un efecto antagónico significativo contra el crecimiento *in vitro* de *Phytophthora cinnamomi* causante de la marchitez radicular en plantaciones de aguacate.

En el uso de agentes de control biológico para el manejo de fitopatógenos está ampliamente citado el género *Trichoderma*, es más escasa la información referente al uso de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico de patógenos vegetales. Pérez-Portilla *et al.* (2018) determinaron mediante pruebas de micoparasitismo *in vitro* de *Lecanicillium lecanii* (*Akanthomyces lecanii* (Zimm.) Spatafora, Kepler & B. Shrestha, (2017)) frente a la roya del café (*Hemileia vastatrix*) que entre las 96 y 120 horas después de la inoculación, el hongo *L. lecanii* presentó valores medios entre  $49.19 \pm 13$  -  $68.10 \pm 12$  en el número de uredosporas parasitadas. Gothandapani *et al.* (2014) evaluaron *in vitro* tres hongos entomopatógenos diferentes, *Beauveria bassiana* (Bals. Criv.) Vuill., (1912), *Metarhizium anisopliae* y *Verticillium lecanii* (*L. lecanii*), contra *Alternaria porri* (Ellis) Cif.,

(1930). Los tres hongos entomopatógenos mostraron efecto inhibitorio contra *A. porri* sometidos a estudios *in vitro* bajo la técnica de cultivo dual, germinación de esporas (conidios), intoxicación alimentaria (germinación de micelios) y germinación de semillas. El desarrollo de insumos biológicos basados en hongos entomopatógenos requiere seleccionar los aislamientos más eficaces, que puedan jugar un papel importante en la regulación de la plaga (Barrios *et al.*, 2016).

### **Hipótesis.**

Aislamientos de hongos de los géneros *Metarhizium* y *Trichoderma*, obtenidos de muestras de suelo de fincas agroecológicas ubicadas en la provincia de Buenos Aires, presentan buena capacidad como controladores biológicos de *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

### **Objetivos.**

Evaluar *in vitro* y seleccionar los aislamientos de los géneros *Metarhizium* y *Trichoderma* obtenidos de las muestras de suelo de fincas agroecológicas visitadas, como inhibidores del desarrollo de *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

### **Materiales y métodos.**

#### **Pruebas de laboratorio en cultivos duales de los aislamientos de los géneros *Metarhizium* y *Trichoderma* frente a los patógenos *B. cinerea* y *S. sclerotiorum*.**

Los ensayos se realizaron bajo condiciones controladas de laboratorio utilizando la metodología descrita por Wright *et al.* (1988) con los 5 aislamientos de *Metarhizium* spp. y 15 aislamientos de *Trichoderma* spp. obtenidos.

Se utilizaron placas de Petri de 90 mm de diámetro, donde se volcaron 12 ml de agar papa glucosado (APG), pH 7 (Merck, Alemania) o 12 ml de sabouraud dextrosa agar, pH 7 (SDYA) (Merck, Alemania), para los ensayos con *Trichoderma* y *Metarhizium* respectivamente. Una vez solidificado el medio de cultivo, se ubicaron sobre el mismo dos discos de 10 mm de diámetro con desarrollo de micelio de 7 días, a 70 mm de distancia entre ambos, uno con desarrollo de *Trichoderma* spp. o *Metarhizium* spp. y el otro con desarrollo de *B. cinerea* o de *S. sclerotiorum* dependiendo del estudio a realizar. Se inocularon como testigos un disco de cada aislamiento (patógeno y antagonista) frente a un disco de APG y/o SDYA sin desarrollo alguno. Las placas de Petri fueron incubadas a 22° C y mantenidas con luces fluorescentes con un fotoperíodo de 14:10 hs luz:oscuridad, en un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA), con 8 réplicas para cada tratamiento. Los datos fueron analizados mediante ANOVA y se utilizó la prueba de Tukey ( $p > 0,05$ ) con ayuda del software InfoStat (versión 2016e).

Para *Trichoderma* frente a los hongos fitopatógenos, se midió el radio de crecimiento de las colonias con una regla milimétrica, a los 1, 2, 3, 4, 5 y 6 días desde la siembra con *B. cinerea* y a los 1, 2, 3, 4

y 5 días desde la siembra con *S. sclerotiorum*. Para *Metarhizium* frente a los hongos fitopatógenos se midió el radio de desarrollo de las colonias a los 4, 5, 6 y 7 días desde la siembra en ambos casos.

Se calculó el porcentaje de inhibición del patógeno (I), usando la fórmula de Joshi *et al.* (2010):  $I = (C-T)/C \times 100$ . Donde: (I) = Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio; C = Crecimiento del patógeno en placas de control; T = Crecimiento del patógeno en placas de cultivo dual.

En el ensayo con los aislamientos de *Trichoderma* spp. se tomaron como referencia los valores de las medias al cuarto día para ser analizados estadísticamente, dado que este día fue en el que se observaron los valores de inhibición del crecimiento de patógenos más altos debido a las condiciones físicas de la placa de Petri. Para el ensayo con los aislamientos de *Metarhizium* spp. se utilizaron los valores de media del séptimo día desde la siembra. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

## Resultados.

### Resultados de ensayo con cultivo dual de aislamientos del género *Trichoderma* y *Metarhizium* frente a *B. cinerea* y *S. sclerotiorum*.

En las tablas 4 y 5 se presentan las medidas resúmenes de los testigos de *B. cinerea* y *S. sclerotiorum* observadas en los ensayos de cultivo dual frente a aislamientos del género *Trichoderma*.

#### Medidas resumen

Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	E.E.	Mín	Máx	Mediana
B.c.mm/día 1	8	1,75	0,46	0,21	0,16	1,00	2,00	2,00
B.c.mm/día 2	8	14,75	0,71	0,50	0,25	14,00	16,00	15,00
B.c.mm/día 3	8	27,88	0,83	0,70	0,30	27,00	29,00	28,00
B.c.mm/día 4	8	39,38	2,33	5,41	0,82	37,00	43,00	39,50
B.c.mm/día 5	8	50,75	3,45	11,93	1,22	47,00	57,00	50,00
B.c.mm/día 6	8	71,38	1,51	2,27	0,53	70,00	74,00	71,00

Tabla 4. Medidas resumen del crecimiento de los testigos de *Botrytis cinerea*.

#### Medidas resumen

Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	E.E.	Mín	Máx	Mediana
S.s.mm/día 1	8	1,88	0,83	0,70	0,30	1,00	3,00	2,00
S.s.mm/día 2	8	21,88	3,00	8,98	1,06	18,00	25,00	22,50
S.s.mm/día 3	8	47,50	4,63	21,43	1,64	42,00	54,00	47,50
S.s.mm/día 4	8	71,38	7,07	49,98	2,50	60,00	80,00	73,00
S.s.mm/día 5	8	80,00	0,00	0,00	0,00	80,00	80,00	80,00

Tabla 5. Medidas resumen del crecimiento de los testigos de *Sclerotinia sclerotiorum*.

El crecimiento en placas de Petri de *S. sclerotiorum* observados en este estudio fue más acelerado que el crecimiento de *B. cinerea*. *S. sclerotiorum* cubrió la totalidad de la placa de Petri en 5 días

posterior a la inoculación del sustrato, al contrario de *B. cinerea* que logró abarcar la totalidad de la placa de Petri recién al día 6 posterior a la inoculación del sustrato. En las figuras 7 y 8 se presentan los gráficos de barras referentes al crecimiento en placas de Petri de los testigos de *B. cinerea* y *S. sclerotiorum* durante 4 y 5 días de haber sido sembrados respectivamente.

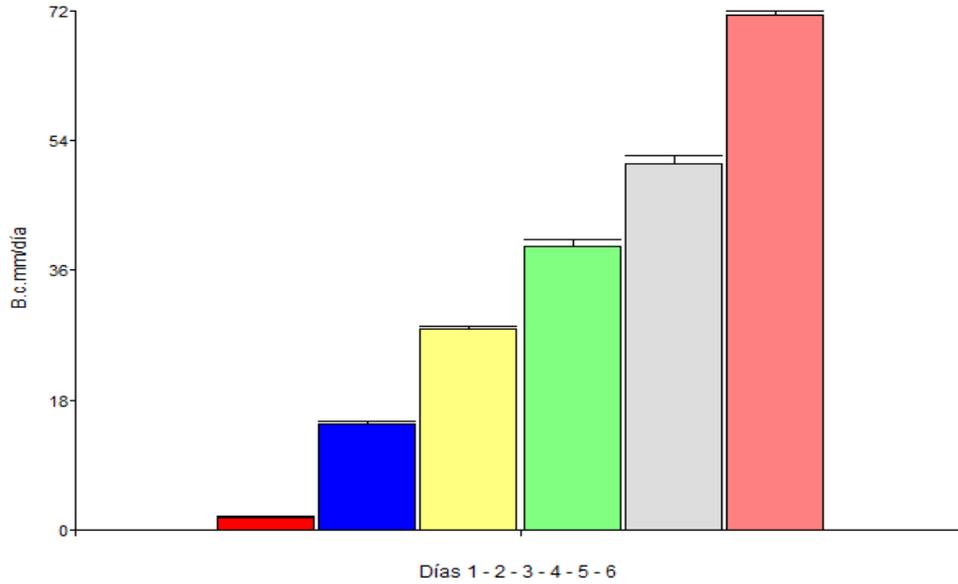


Figura 7. Gráfico de barras para la variante de crecimiento de *Botrytis cinerea* durante seis días.

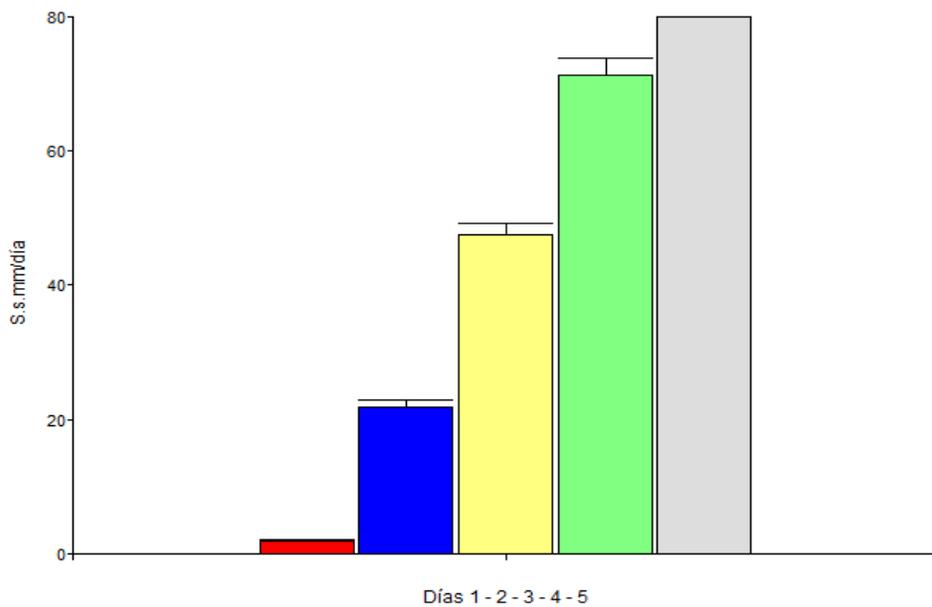


Figura 8. Gráfico de barras para la variante de crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* durante cinco días.

### **Comparación de las medias referentes al crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigo (*Trichoderma spp.*).**

Fueron tomados como referencia los valores de medias observados en el día 4 para ser analizados estadísticamente, dado que ese día fue el más incidente en el porcentaje de inhibición de crecimiento de los patógenos. A partir del día 5 de medición no se presentaron variaciones entre los valores de media de los tratamientos estudiados, pues todos llegaron al mayor valor posible (80 mm) debido a las condiciones físicas de la placa de Petri. Los tratamientos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 son equivalentes a los aislamientos CEP-745, CEP-747, CEP-748, CEP-749, CEP-750, CEP-751, CEP-752, CEP-753, CEP-754, CEP-755, CEP-756, CEP-757, CEP-758, CEP-759 y CEP-760 respectivamente. El tratamiento testigo fue sometido a las mismas condiciones de incubación y medición que los tratamientos con aislamientos fúngicos enfrentados con fitopatógenos. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes entre sí, ( $p > 0,05$ ). En la figura 9 se presenta el análisis de varianza y las comparaciones de medias del crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigos de aislamientos del género *Trichoderma* en el ensayo con *B. cinerea*. En la figura 10 se presenta el gráfico de barras de las medias observadas para cada tratamiento testigo de aislamientos del género *Trichoderma*. Ambas figuras son referentes al ensayo con *B. cinerea* al cuarto día posterior a la inoculación del sustrato.

En la figura 11 se presenta el análisis de varianza y las comparaciones de medias del crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigos de aislamientos del género *Trichoderma* en el ensayo con *S. sclerotiorum*. En la figura 12 se presenta el gráfico de barras de las medias observadas para cada tratamiento testigo de aislamientos del género *Trichoderma*. Ambas figuras son referentes al ensayo con *S. sclerotiorum* al cuarto día posterior a la inoculación del sustrato. Para más detalles consultar Anexo 1.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
mm/día 4	4	120	0,91	0,89	2,88

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3118,17	14	222,73	72,04	<0,0001
Tratamiento	3118,17	14	222,73	72,04	<0,0001
Error	324,63	105	3,09		
Total	3442,79	119			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,05393

Error: 3,0917 gl: 105

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
10	51,38	8	0,62	A
15	52,75	8	0,62	A B
3	54,50	8	0,62	B
14	57,75	8	0,62	C
2	58,63	8	0,62	C D
4	59,38	8	0,62	C D
1	60,25	8	0,62	C D
8	61,63	8	0,62	D E
13	63,88	8	0,62	E F
5	64,13	8	0,62	E F
11	64,50	8	0,62	E F G
9	65,00	8	0,62	F G
6	66,25	8	0,62	F G H
12	67,38	8	0,62	G H
7	68,25	8	0,62	H

Figura 9. Análisis de varianza y comparaciones de medias referente al crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigo de aislamientos del género *Trichoderma* estudiados en el ensayo con *Botrytis cinerea* en el cuarto día posterior a la inoculación del sustrato.

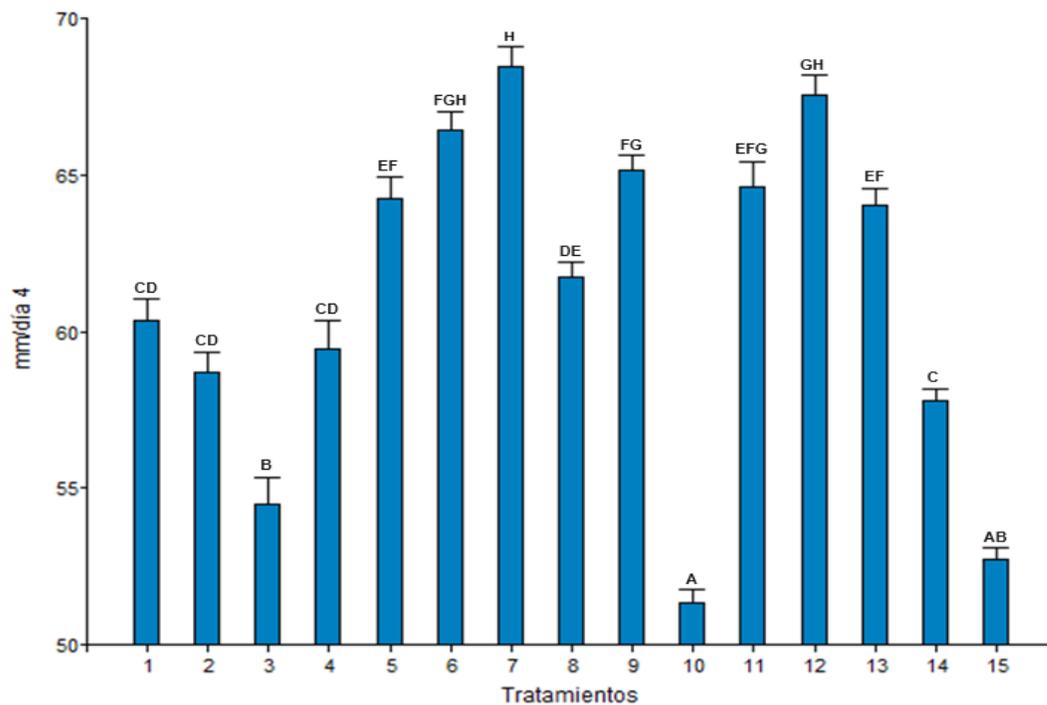


Figura 10. Gráfico de barras de medias observadas referentes al crecimiento en placas de Petri de

los distintos tratamientos testigo de aislamientos del género *Trichoderma* estudiados en el ensayo con *Botrytis cinerea* en el cuarto día posterior a la inoculación del sustrato.

En el análisis de la varianza y comparaciones de medias del crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigos de aislamientos incluidos en el género *Trichoderma* para el ensayo con *B. cinerea*, se observa que, el tratamiento 10 (CEP-755) obtuvo el valor más bajo registrado para este estudio, siendo este de 51,38 %. Los tratamientos que obtuvieron los valores de media más altos registrados fueron los tratamientos 5, 6, 7, 9, 11 y 12, (CEP-750, CEP-751, CEP-752, CEP-754, CEP-756 y CEP-757 respectivamente) los cuales presentaron los siguientes valores: 64,13; 66,25; 68,25; 65,00; 64,50 y 67,38 % respectivamente.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
mm/día	4	120	0,93	0,92
				3,47

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5916,75	14	422,63	101,84	<0,0001
Tratamiento	5916,75	14	422,63	101,84	<0,0001
Error	435,75	105	4,15		
Total	6352,50	119			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,53823**

Error: 4,1500 gl: 105

Tratamiento	Medias	n	E.E.				
3	45,50	8	0,72	A			
14	50,50	8	0,72		B		
10	51,63	8	0,72		B	C	
13	53,00	8	0,72		B	C	
15	53,13	8	0,72		B	C	
2	54,38	8	0,72			C	D
4	57,00	8	0,72				D E
12	58,63	8	0,72				E
11	62,25	8	0,72				F
5	62,75	8	0,72				F
6	64,25	8	0,72				F
1	64,75	8	0,72				F
8	64,75	8	0,72				F
7	68,38	8	0,72				G
9	70,38	8	0,72				G

Figura 11. Análisis de varianza y comparaciones de medias referente al crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigo de aislamientos del género *Trichoderma* estudiados en el ensayo con *Sclerotinia sclerotiorum* en el cuarto día posterior a la inoculación del sustrato.

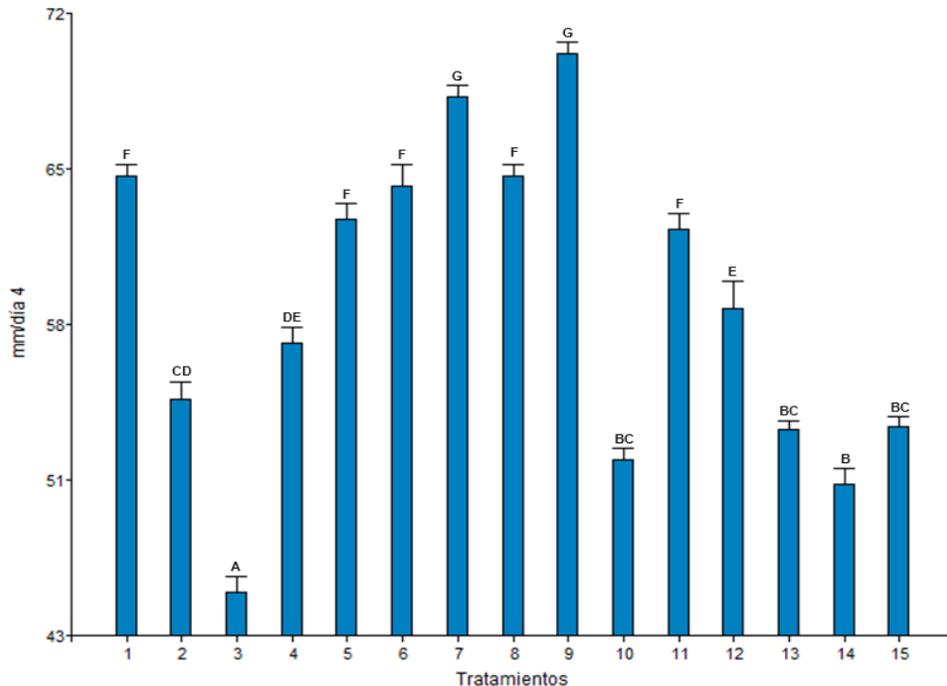


Figura 12. Gráfico de barras de medias referente al crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigo de aislamientos del género *Trichoderma* estudiados en el ensayo con *Sclerotinia sclerotiorum* en el cuarto día posterior a la inoculación del sustrato.

En el análisis de la varianza y comparaciones de medias del crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigos de aislamientos incluidos en el género *Trichoderma* para el ensayo con *S. sclerotiorum*, se observa que, el tratamiento 3 presenta el valor de media más bajo, siendo este de 45,50 %, seguido por los tratamientos 10 y 14 (CEP-755 y CEP-759 respectivamente) con valores de media de 51,63 y 50,50 % respectivamente. Los tratamientos mejor evaluados en este análisis fueron los tratamientos 1, 5, 6, 7, 8 y 9 (CEP-745, CEP-750, CEP-751, CEP-752, CEP-753 y CEP-754 respectivamente) con valores de media de 64,75; 62,75; 64,25; 68,38; 64,75 y 70,38 % respectivamente.

#### **Análisis del porcentaje de inhibición de crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* para cada tratamiento estudiado.**

De acuerdo con los valores de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento para cada día de medición, se decidió trabajar con los valores del día 4 considerado como el más significativo, debido a que es el momento en que la inhibición se estabiliza por limitaciones físicas impuestas por el diámetro de las placas de Petri. En la figura 13 se presenta el análisis de varianza y comparaciones de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* por cada tratamiento utilizado. En la figura 14 se presenta el gráfico de barras de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* por cada tratamiento. En la figura 15 se presenta el análisis de varianza y comparaciones de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de *S. sclerotiorum* por cada tratamiento. En la figura 16 se presenta el

gráfico de barras de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de *S. sclerotiorum* por cada tratamiento.

Las medias con una letra común no son significativamente diferentes entre sí, ( $p > 0,05$ ).

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% de inhib. día 4	120	0,70	0,66	15,99

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8534,61	14	609,61	17,56	<0,0001
Tratamientos	8534,61	14	609,61	17,56	<0,0001
Error	3645,15	105	34,72		
Total	12179,76	119			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=10,23353  
 Error: 34,7158 gl: 105

Tratamientos	Medias	n	E.E.
7	22,54	8	2,08 A
3	24,13	8	2,08 A
15	26,99	8	2,08 A B
2	27,94	8	2,08 A B C
14	31,75	8	2,08 A B C D
12	36,83	8	2,08 B C D E
5	36,83	8	2,08 B C D E
10	37,46	8	2,08 C D E
8	37,78	8	2,08 C D E
13	38,73	8	2,08 D E
11	43,18	8	2,08 E F
6	45,40	8	2,08 E F
9	45,40	8	2,08 E F
1	46,04	8	2,08 E F
4	51,75	8	2,08 F

Figura 13. Análisis de varianza y comparaciones de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* por cada tratamiento de aislamientos del género *Trichoderma*.

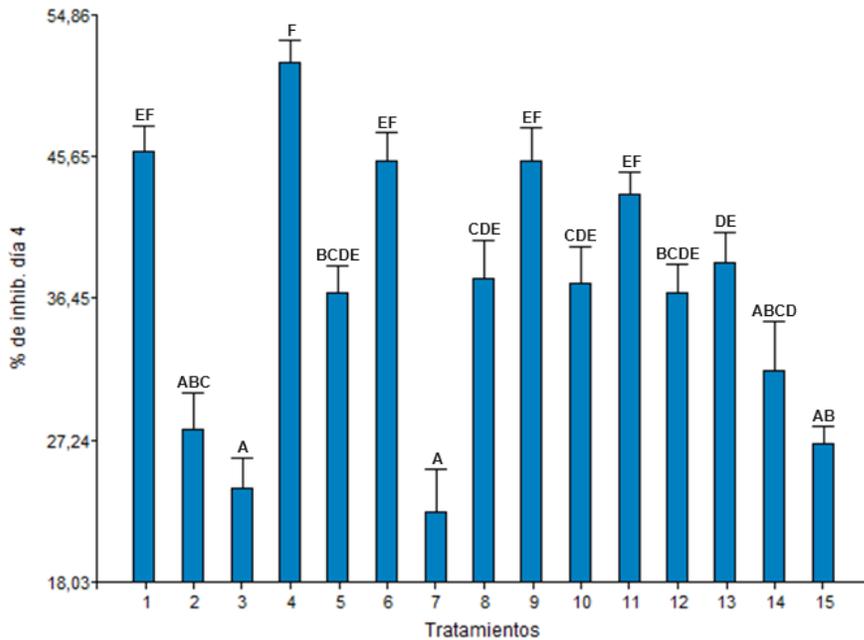


Figura 14. Gráfico de barras de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* por cada tratamiento de aislamientos del género *Trichoderma*.

En la figura 13, se observa que el tratamiento 7 (CEP-752) obtuvo el valor de media más bajo para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* en el día 4 posterior a la inoculación del sustrato, siendo este valor de 22,54 %. Seguido por el tratamiento 3 (CEP-748) el cual obtuvo un valor de media de 24,13 %. Los tratamientos que presentaron los valores de media más altos fueron los tratamientos 1, 4, 6, 9 y 11, (CEP-745, CEP-749, CEP-751, CEP-754 y CEP-756 respectivamente) siendo estos de 46,04; 51,75; 45,40; 45,40 y 43,18 % respectivamente.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% de inhibición día 4	120	0,70	0,66	7,35

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3241,45	14	231,53	17,75	<0,0001
Tratamientos	3241,45	14	231,53	17,75	<0,0001
Error	1369,88	105	13,05		
Total	4611,33	119			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=6,27347

Error: 13,0464 gl: 105

Tratamientos	Medias	n	E.E.		
3	40,63	8	1,28	A	
15	41,13	8	1,28	A	
12	43,88	8	1,28	A	B
14	43,88	8	1,28	A	B
8	46,88	8	1,28	A	B C
11	48,13	8	1,28		B C
6	48,63	8	1,28		B C
5	49,00	8	1,28		B C
2	49,50	8	1,28		B C
1	51,25	8	1,28		C D
13	51,75	8	1,28		C D
10	52,13	8	1,28		C D E
4	55,88	8	1,28		D E
7	56,75	8	1,28		D E
9	58,25	8	1,28		E

Figura 15. Análisis de varianza y comparaciones de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* por cada tratamiento de aislamientos del género *Trichoderma*.

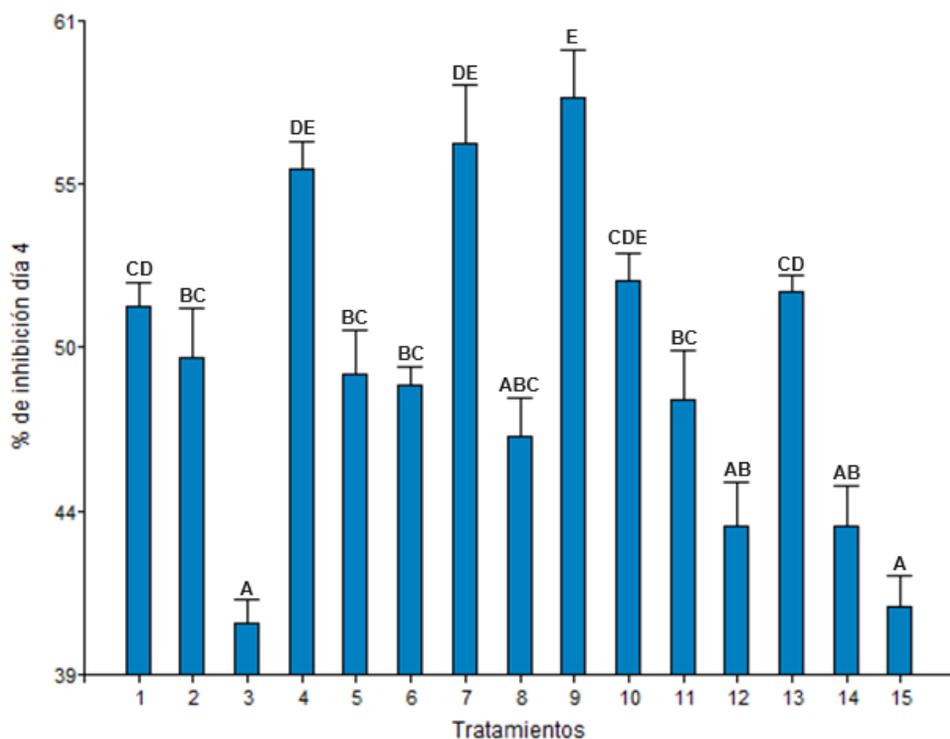


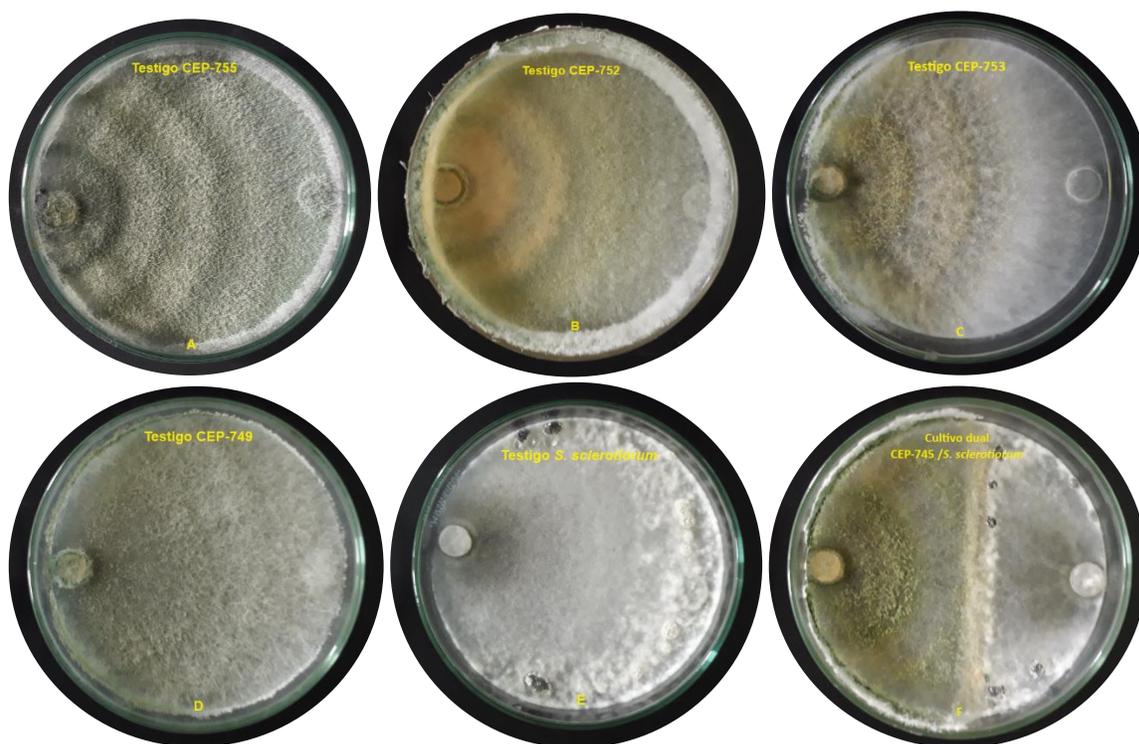
Figura 16. Gráfico de barras de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del

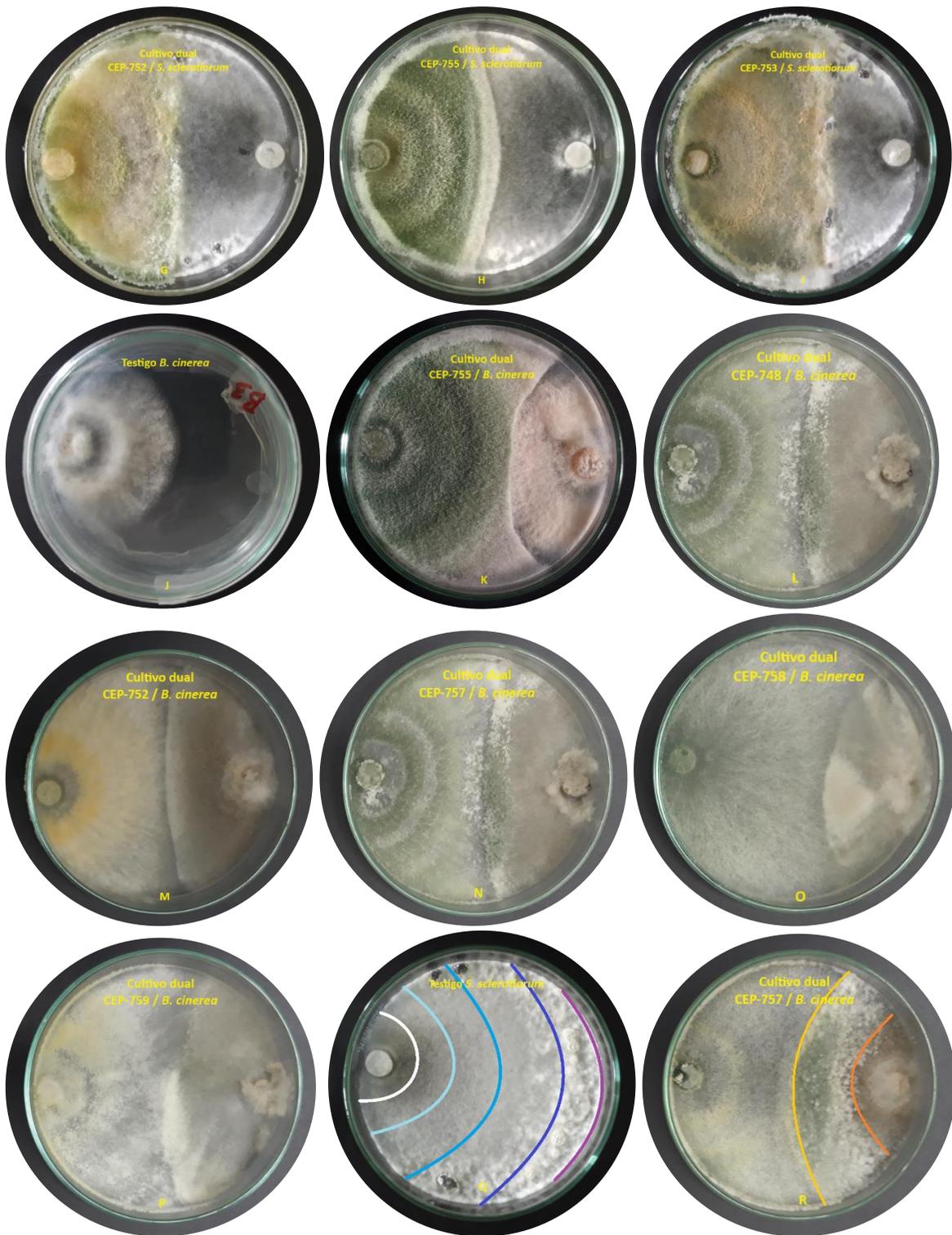
crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* por cada tratamiento de aislamientos del género *Trichoderma*.

En el cuadro de comparaciones de media para el porcentaje de inhibición del crecimiento de *S. sclerotiorum* en placas de Petri al cuarto día de haber sido inoculado el sustrato, se observa que el tratamiento 3 (CEP-748), presenta el valor de media más bajo registrado, siendo este de 40,63 %, seguido del tratamiento 15 (CEP-760) el cual presentó un valor de media de 41,13 %. Los tratamientos 4, 7, 9, 10 y 13 (CEP-749, CEP-752, CEP-754, CEP-755 y CEP-758 respectivamente) presentaron los valores de media más altos, siendo estos de 55,88; 56,75; 58,25; 52,13 y 51,75 % respectivamente.

**Imágenes de referencia de los estudios de cultivo dual realizados para los aislamientos del género *Trichoderma*, frente a los fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*.**

En la figura 17, se presentan algunas de las imágenes tomadas de los ensayos con ambos fitopatógenos para el quinto día de medición. En las imágenes se puede apreciar la interacción entre los microorganismos y el crecimiento de los tratamientos testigos, así como la coloración variada y característica del género *Trichoderma*.





Figuras 17. Desarrollo de los cultivos duales y tratamientos testigos. Imágenes tomadas al finalizar el ensayo. (A) Testigo CEP-755, (B) Testigo CEP-752, (C) Testigo CEP-753, (D) Testigo CEP-749, (E) Testigo *Sclerotinia sclerotiorum*, (F) Cultivo dual CEP-745 frente a *Sclerotinia sclerotiorum*, (G)

Cultivo dual CEP-752 frente a *Sclerotinia sclerotiorum*, (H) Cultivo dual CEP-755 frente a *Sclerotinia sclerotiorum*, (I) Cultivo dual CEP-753 frente a *Sclerotinia sclerotiorum*, (J) Testigo *Botrytis cinerea*, (K) Cultivo dual CEP-755 frente a *Botrytis cinerea*, (L) Cultivo dual CEP-748 frente a *Botrytis cinerea*, (M) Cultivo dual CEP-752 frente a *Botrytis cinerea*, (N) Cultivo dual CEP-757 frente a *Botrytis cinerea*, (O) Cultivo dual CEP-758 frente a *Botrytis cinerea*, (P) Cultivo dual CEP-759 frente a *Botrytis cinerea*, (Q) Testigo de *Sclerotinia sclerotiorum*, mediciones diarias, (R) Cultivo dual CEP-757 frente a *Botrytis cinerea*, contacto hifal entre microorganismos y superposición de hifas.

**Medidas resumen del crecimiento de microorganismos patógenos *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*, ensayo de cultivo dual frente a hongos del género *Metarhizium*.**

En las tablas 6 y 7 se presentan las medidas resúmenes de los testigos de *B. cinerea* y *S. sclerotiorum* observadas en los ensayos de cultivo dual frente a aislamientos del género *Metarhizium*.

**Medidas resumen**

Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	E.E.	Mín	Máx	Mediana
B.c.mm/día 4	8	42,75	2,96	8,79	1,05	39,00	46,00	44,00
B.c.mm/día 5	8	56,25	3,24	10,50	1,15	53,00	60,00	56,50
B.c.mm/día 6	8	68,75	5,04	25,36	1,78	61,00	74,00	69,50
B.c.mm/día 7	8	80,00	0,00	0,00	0,00	80,00	80,00	80,00

Tabla 6. Medidas resumen del crecimiento de los testigos de *Botrytis cinerea*.

**Medidas resumen**

Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	E.E.	Mín	Máx	Mediana
S.s.mm/día 4	8	36,88	4,49	20,13	1,59	31,00	44,00	36,00
S.s.mm/día 5	8	59,00	9,02	81,43	3,19	47,00	69,00	57,50
S.s.mm/día 6	8	74,13	8,18	66,98	2,89	62,00	80,00	80,00
S.s.mm/día 7	8	80,00	0,00	0,00	0,00	80,00	80,00	80,00

Tabla 7. Medidas resumen del crecimiento de los testigos de *Sclerotinia sclerotiorum*.

En las figuras 18 y 19 se presentan los gráficos de barra referentes al crecimiento en placas de Petri de los testigos de *B. cinerea* y *S. sclerotiorum* respectivamente desde el cuarto al séptimo día de haber sido sembrado el sustrato.

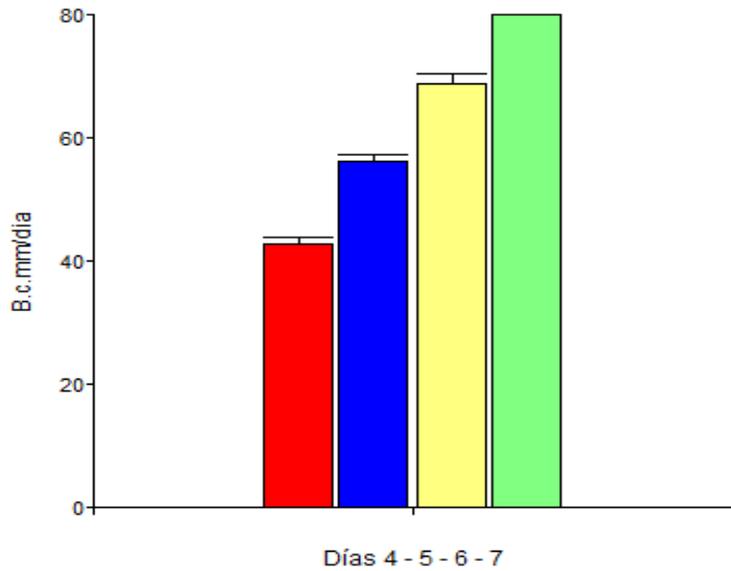


Figura 18. Gráfico de barras para la variante de crecimiento de *Botrytis cinerea* desde el cuarto al séptimo día de haber sido sembrado el sustrato.

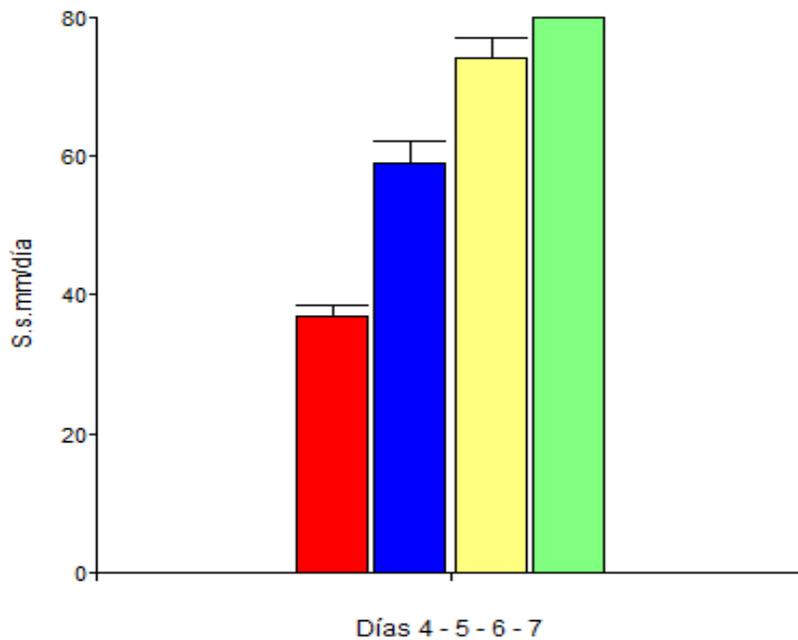


Figura 19. Gráfico de barras para la variante de crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* desde el cuarto al séptimo día de haber sido sembrado el sustrato.

En los gráficos de barra se observa que a pesar de que ambos patógenos cubrieron la totalidad de la placa de Petri al séptimo día posterior a la inoculación del sustrato, *S. sclerotiorum* presenta un crecimiento levemente más acelerado que *B. cinerea*.

**Comparación de las medias referentes al crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigo (*Metarhizium* spp.).**

Fueron tomados como referencia los valores de media observados en el día 7 de haber sido sembrados en placas de Petri, los aislamientos incluidos en el género *Metarhizium* con ambos fitopatógenos (*B. cinerea* y *S. sclerotiorum*). Los tratamientos 1, 2, 3, 4 y 5 son equivalentes a los aislamientos CEP-722, CEP-723, CEP-724, CEP-725 y CEP-726 respectivamente. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes entre sí, ( $p > 0,05$ ). En la figura 20 se presenta el análisis de varianza y las comparaciones de medias del crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigos de aislamientos del género *Metarhizium* en el ensayo con *B. cinerea*. En la figura 21 se presenta el gráfico de barras de las medias observadas para cada tratamiento testigo de aislamientos del género *Metarhizium*. Ambas figuras son referentes al ensayo con *B. cinerea* al séptimo día posterior a la inoculación del sustrato.

En la figura 22 se presenta el análisis de varianza y las comparaciones de medias del crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigos de aislamientos del género *Metarhizium* en el ensayo con *S. sclerotiorum*. En la figura 23 se presenta el gráfico de barras de las medias observadas para cada tratamiento testigo de aislamientos del género *Metarhizium*. Ambas figuras son referentes al ensayo con *S. sclerotiorum* al séptimo día posterior a la inoculación del sustrato. Para más detalles consultar Anexo 1.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
mm/día	7	40	0,94	0,94
				5,17

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	232,85	4	58,21	142,98	<0,0001
tratamiento	232,85	4	58,21	142,98	<0,0001
Error	14,25	35	0,41		
Total	247,10	39			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,91726

Error: 0,4071 gl: 35

tratamiento	Medias	n	E.E.	
5	8,25	8	0,23	A
1	11,75	8	0,23	B
3	12,75	8	0,23	C
4	13,38	8	0,23	C
2	15,63	8	0,23	D

Figura 20. Análisis de varianza y comparaciones de medias referente al crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigo de aislamientos del género *Metarhizium* estudiados en el ensayo con *Botrytis cinerea* en el séptimo día posterior a la inoculación del sustrato.

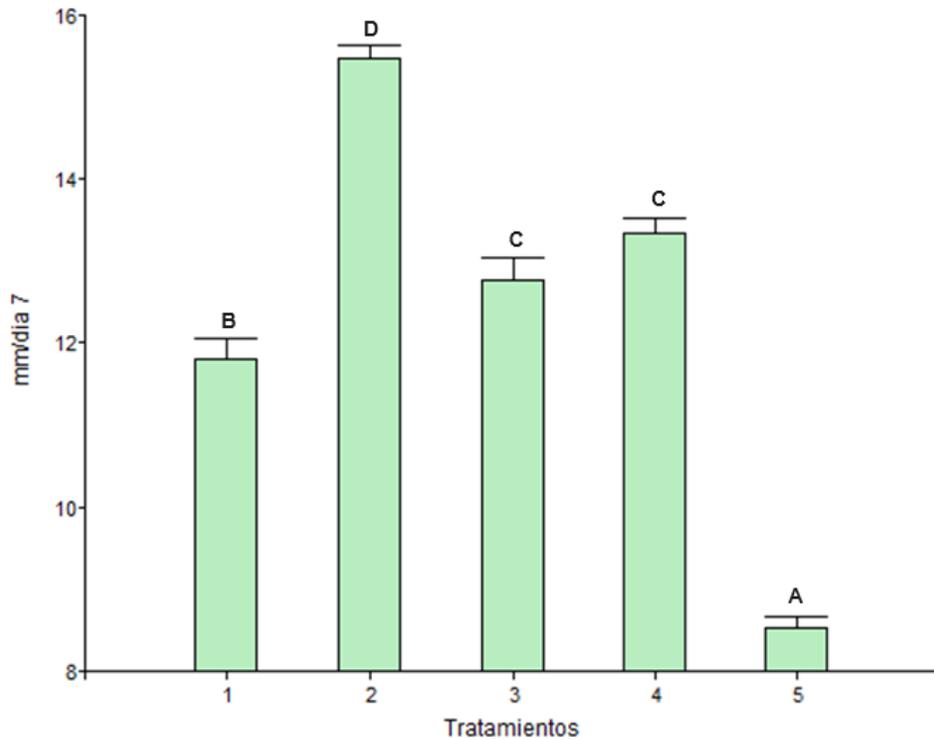


Figura 21. Análisis de varianza y comparaciones de medias referente al crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigo de aislamientos del género *Metarhizium* estudiados en el ensayo con *Botrytis cinerea* en el séptimo día posterior a la inoculación del sustrato.

Los distintos tratamientos testigos de aislamientos incluidos en el género *Metarhizium* presentaron distintas velocidades de crecimiento, siendo el tratamiento 2 (CEP-723) el que mayor velocidad de crecimiento presentó en comparación a los otros cuatro tratamientos, alcanzando un valor de media de 15,63 mm/día para el día 7 de haber sido inoculado el sustrato. Los tratamientos 3 y 4 (CEP-724 y CEP-725) presentaron valores de medias similares, siendo éstos de 12,75 y 13,38 respectivamente.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
mm/día7	40	0,88	0,86	6,58

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	162,75	4	40,69	62,60	<0,0001
tratamiento	162,75	4	40,69	62,60	<0,0001
Error	22,75	35	0,65		
Total	185,50	39			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,15897

Error: 0,6500 gl: 35

tratamiento	Medias	n	E.E.	
5	9,00	8	0,29	A
1	11,63	8	0,29	B
3	12,63	8	0,29	B
4	12,75	8	0,29	B
2	15,25	8	0,29	C

Figura 22. Análisis de varianza y comparaciones de medias referente al crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigo de aislamientos del género *Metarhizium* estudiados en el ensayo con *Sclerotinia sclerotiorum* en el séptimo día posterior a la inoculación del sustrato.

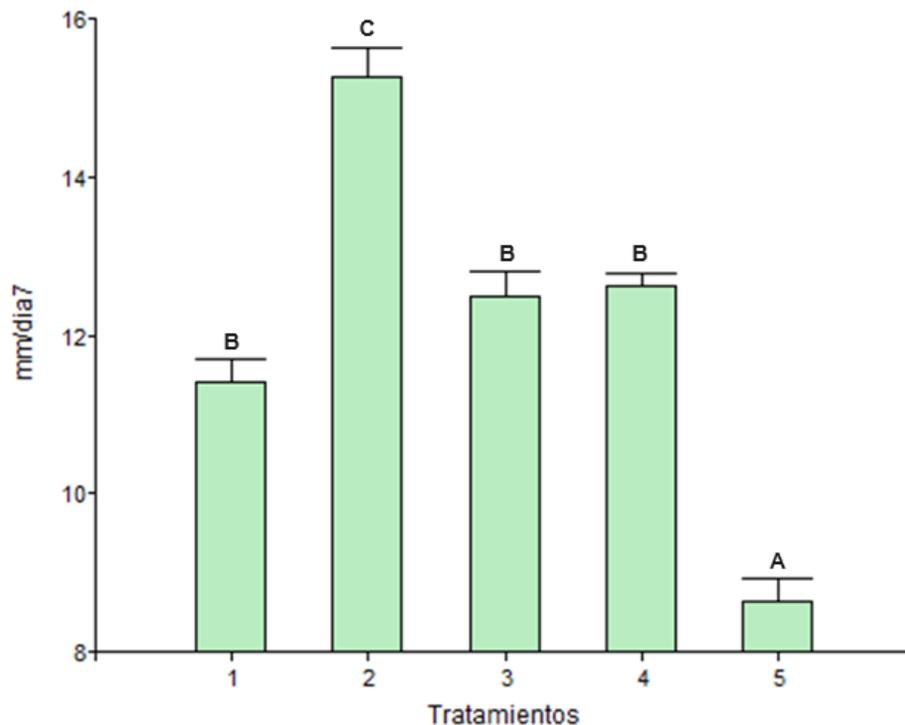


Figura 23. Gráfico de barras de medias referente al crecimiento en placas de Petri de los distintos tratamientos testigo de aislamientos del género *Metarhizium* estudiados en el ensayo con *Sclerotinia sclerotiorum* en el séptimo día posterior a la inoculación del sustrato.

Los distintos tratamientos testigos de aislamientos incluidos en el género *Metarhizium* en el ensayo con *S. sclerotiorum* presentaron distintas velocidades de crecimiento, pero similares a los registrados en el ensayo con *B. cinerea*. siendo el tratamiento 2 (CEP-723) el que mayor velocidad de crecimiento presentó en comparación a los otros cuatro tratamientos, alcanzando un valor de media de 15,25 mm/día para el día 7 de haber sido inoculado el sustrato. Los tratamientos 3 y 4 (CEP-724 y CEP-725) presentaron valores de medias similares, siendo éstos de 12,63 y 12,75 respectivamente.

**Análisis del porcentaje de inhibición de crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* para cada tratamiento.**

De acuerdo con los valores de medias del porcentaje inhibición del crecimiento para cada día de medición, se decidió trabajar con el día 7 posterior a la inoculación del sustrato, considerado el día más significativo. A continuación, se presentan los análisis de variancia y gráficos de barras del porcentaje de inhibición del crecimiento de los fitopatógenos estudiados en el día 7 posterior a la inoculación del sustrato. En la figura 24 se presenta el análisis de variancia y comparaciones de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* por cada tratamiento. En la figura 25 se presenta el gráfico de barras de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* por cada tratamiento. En la figura 26 se presenta el análisis de variancia y comparaciones de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de *S. sclerotiorum* por cada tratamiento. En la figura 27 se presenta el gráfico de barras de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de *S. sclerotiorum* por cada tratamiento. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes entre sí, ( $p > 0,05$ ).

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
%Inhib.día7	40	0,07	0,00	8,88

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	20,86	4	5,21	0,66	0,6271
Tratamientos	20,86	4	5,21	0,66	0,6271
Error	278,52	35	7,96		
Total	299,38	39			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,05516

Error: 7,9576 gl: 35

Tratamientos	Medias	n	E.E.
5	31,09	8	1,00 A
4	31,25	8	1,00 A
3	31,25	8	1,00 A
2	32,19	8	1,00 A
1	32,97	8	1,00 A

Figura 24. Análisis de variancia y comparaciones de medias observadas referente al porcentaje de

inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* por cada tratamiento de aislamientos del género *Metarhizium*.

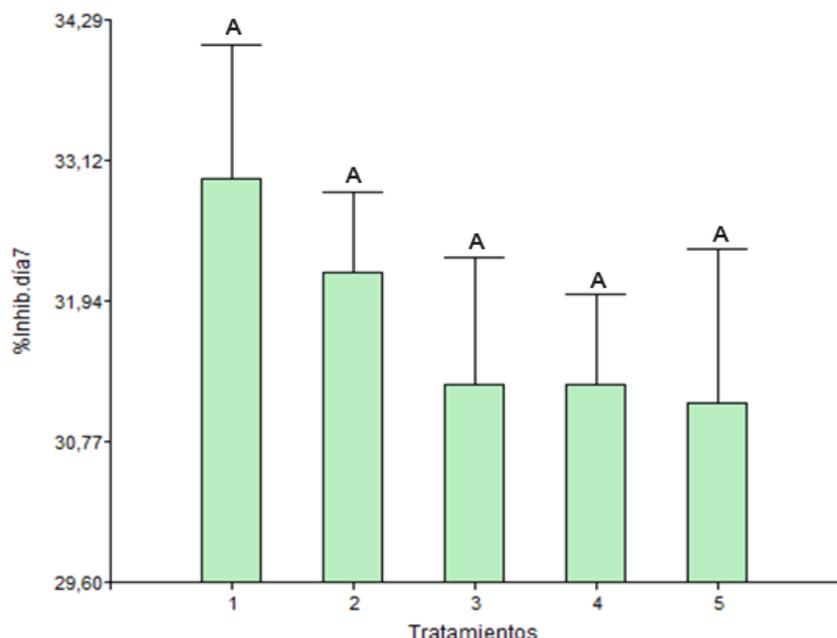


Figura 25. Gráfico de barras de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* por cada tratamiento de aislamientos del género *Metarhizium*.

Si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* entre los distintos tratamientos aplicados para el día 7 posterior a la inoculación del sustrato, los valores de medias más altos fueron observados en los tratamientos 1 y 2 (CEP-722 y CEP-723), siendo estos valores de 32,97 y 32,19 respectivamente.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% Inhib.día 7	40	0,30	0,22	8,74

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	75,55	4	18,89	3,80	0,0114
Tratamiento	75,55	4	18,89	3,80	0,0114
Error	173,83	35	4,97		
Total	249,38	39			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,20363

Error: 4,9665 gl: 35

Tratamiento	Medias	n	E.E.
5	23,59	8	0,79 A
2	24,38	8	0,79 A B
3	25,63	8	0,79 A B
4	26,56	8	0,79 A B
1	27,34	8	0,79 B

Figura 26. Análisis de varianza y comparaciones de medias observadas referente al porcentaje de

inhibición del crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* por cada tratamiento de aislamientos del género *Metarhizium*.

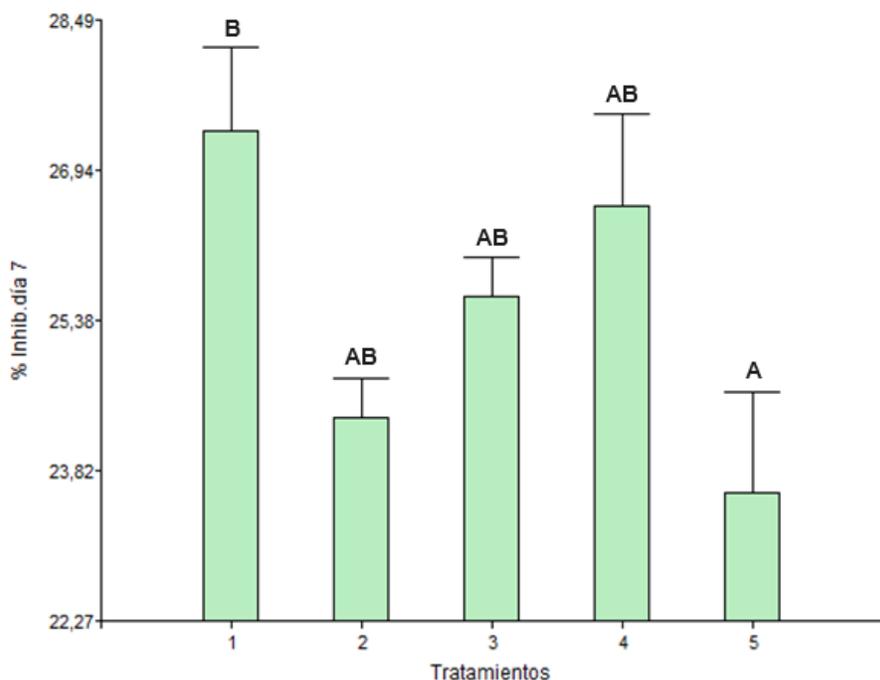
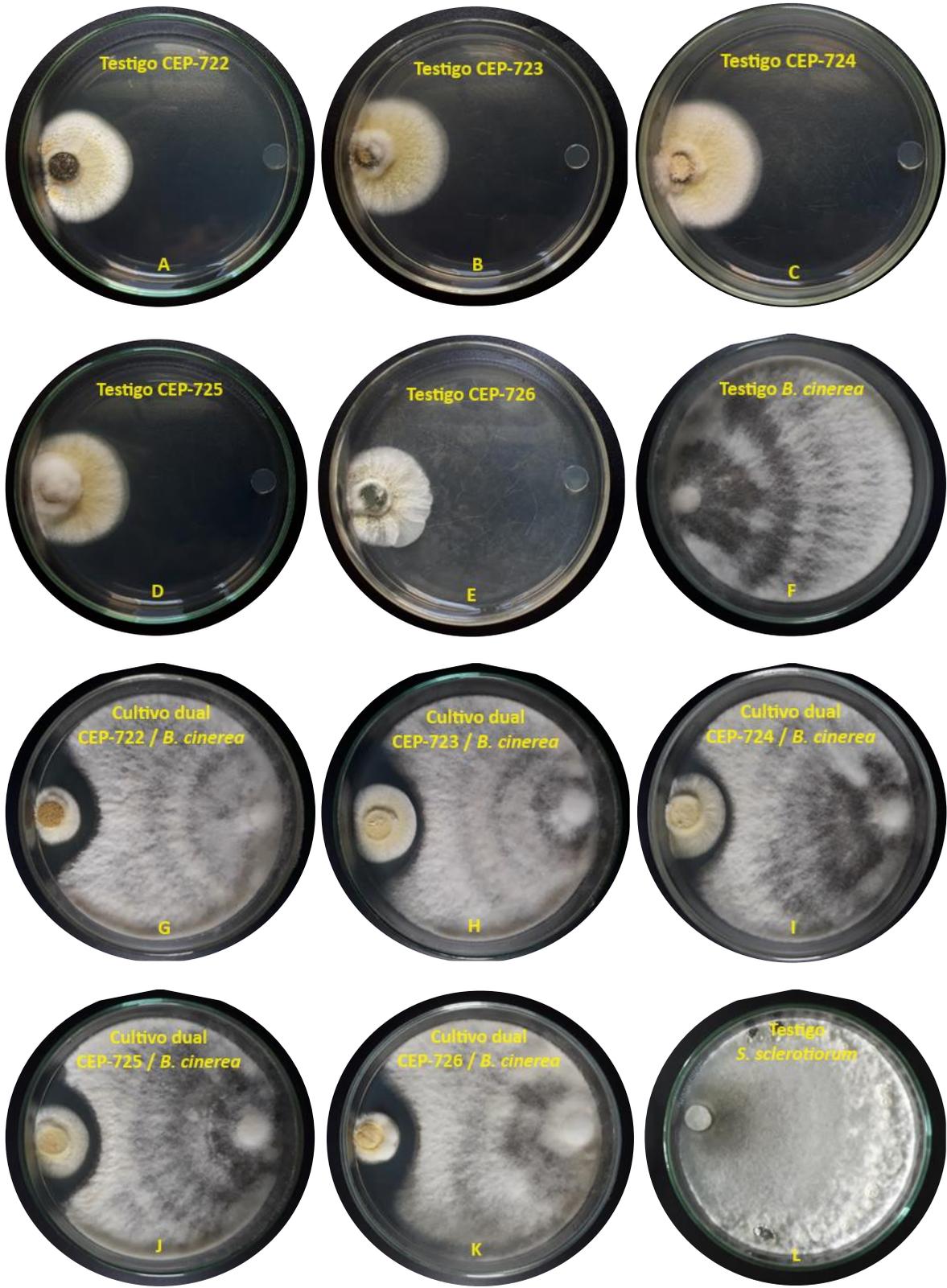


Figura 27. Gráfico de barras de medias observadas referente al porcentaje de inhibición del crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* por cada tratamiento de aislamientos del género *Metarhizium*.

El tratamiento que presentó los valores más altos en el porcentaje de inhibición de *S. sclerotiorum* en el día 7 posterior a la inoculación del sustrato, fue el tratamiento 1 (CEP-722) alcanzando un valor de media de 27,34, presentando diferencias estadísticamente significativas unicamente con el tratamiento 5 (CEP-726), el cual que presentó un valor de media de 23,59.

**Imágenes de referencia de los estudios de cultivo dual realizados para los aislamientos del género *Metarhizium*, frente a los fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*.**

En la figura 28 se presentan algunas de las imágenes tomadas de los ensayos con ambos fitopatógenos para el sexto día de medición en placas de Petri de 90 mm. En las imágenes se puede apreciar la interacción entre los microorganismos, el crecimiento de tratamientos testigos, la coloración variada y característica del género *Metarhizium*, así como halos de inhibición del desarrollo de los patógenos estudiados.



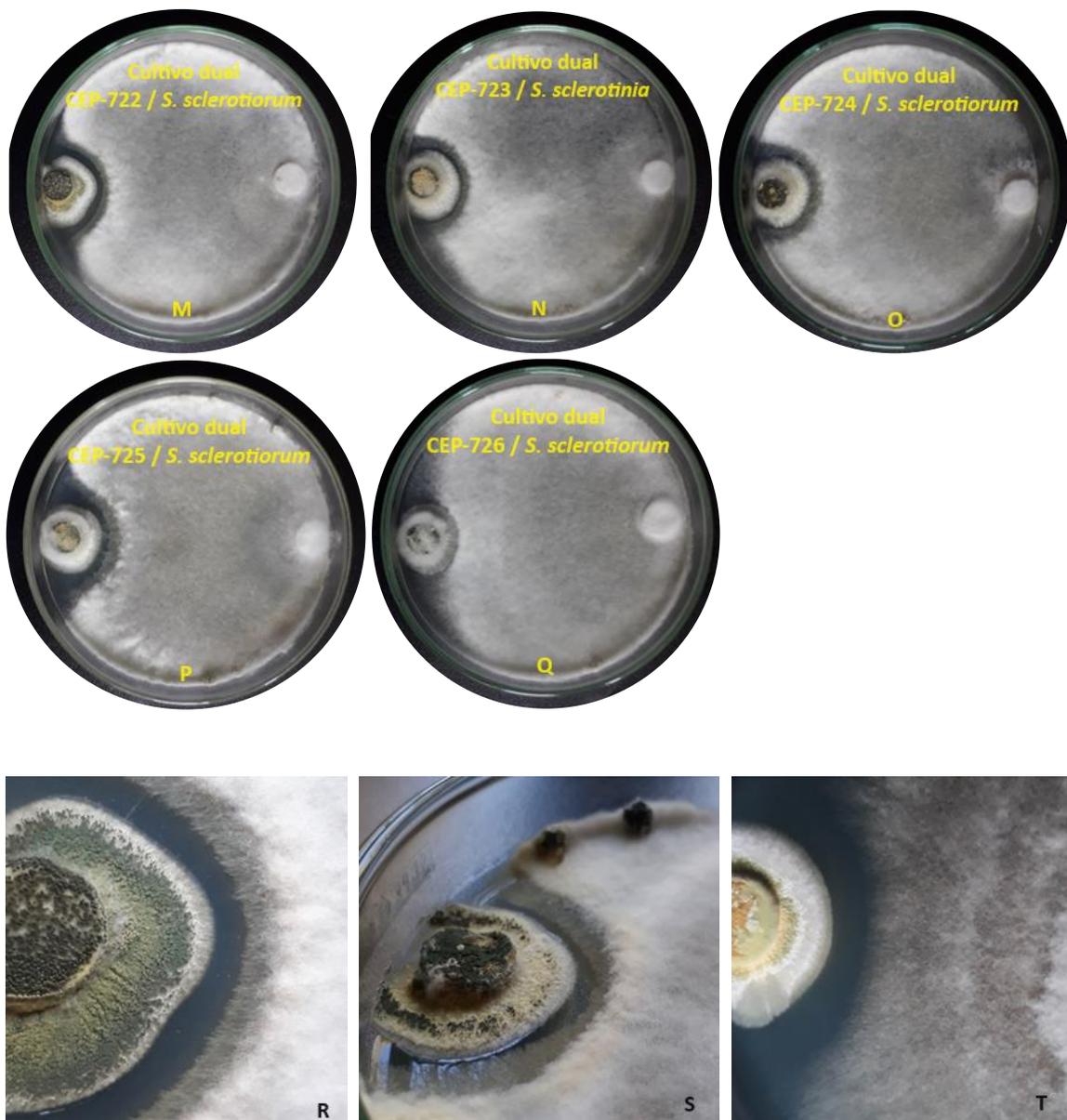


Figura 28. Desarrollo de los cultivos duales y tratamientos testigos. Imágenes tomadas al finalizar el ensayo. (A) Testigo CEP-722; (B) Testigo CEP-723; (C) Testigo CEP-724; (D) Testigo CEP-725; (E) Testigo CEP-726; (F) Testigo *Botrytis cinerea*; (G) Cultivo dual *Botrytis cinerea* con CEP-722; (H) Cultivo dual *Botrytis cinerea* con CEP-723; (I) Cultivo dual *Botrytis cinerea* con CEP-724; (J) Cultivo dual *Botrytis cinerea* con CEP-725; (K) Cultivo dual *Botrytis cinerea* con CEP-726; (L) Testigo *Sclerotinia sclerotiorum*; (M) Cultivo dual *Sclerotinia sclerotiorum* con CEP-722; (N) Cultivo dual *Sclerotinia sclerotiorum* con CEP-723; (O) Cultivo dual *Sclerotinia sclerotiorum* con CEP-724; (P) Cultivo dual *Sclerotinia sclerotiorum* con CEP-725; (Q) Cultivo dual *Sclerotinia sclerotiorum* con CEP-726; (R) Detalle halo de inhibición, *Sclerotinia sclerotiorum* frente CEP-722; (S) Detalle halo de inhibición, *Sclerotinia sclerotiorum* frente a CEP-724; (T) Detalle halo de inhibición, *Botrytis cinerea* frente CEP-722.

## Discusión.

La aplicación de agentes de control biológico es una herramienta prometedora para mitigar daños causados por fitopatógenos. Los tratamientos de control biológico para patógenos vegetales transmitidos por el suelo deben proporcionar niveles elevados de supresión de las enfermedades y/o consistencia en el control sobre diversos tipos de suelos antes de su aplicación a gran escala y/o escala comercial (Hu *et al.*, 2019). El aislamiento y posterior selección de antagonistas sustenta todo programa de control biológico y determina su éxito (Bettiol y Morandi, 2009).

*Trichoderma* spp. es el hongo antagonista más utilizado en formulaciones de productos biológicos comercializado en Brasil (país con mayor producción de bioinsumos en América del Sur) para el control de patógenos de plantas transmitidos por el suelo, especialmente *S. sclerotiorum* (Bettiol *et al.*, 2019). Los efectos de *Trichoderma* spp. frente a distintos patógenos son variados según la cepa y/o aislamiento que se estudie. Aoki *et al.* (2020) observaron que la cepa SANA20 perteneciente al género *Trichoderma*, ejerció inhibición de crecimiento del micelio de *B. cinerea*, pero no presentó micoparasitismo tras observaciones en microscopio. Redda *et al.* (2018), en un estudio de cultivo dual donde se evaluaron 380 aislamientos de *Trichoderma* spp frente a los fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, (1858) y *B. cinerea*, reportaron porcentajes de inhibición diversos que van en rangos de 10.12 - 70.70 %, 35.07 - 88.07 % y 44.18 - 82.98 % respectivamente. En otro estudio sobre 2 cepas de *Trichoderma* (T25 y T42), frente a 9 aislamientos del fitopatógeno *S. sclerotiorum*, Sumida *et al.* (2018) reportaron que ambas cepas inhibieron el crecimiento de los nueve aislamientos de *S. sclerotiorum* analizados e inclusive la cepa T25 exhibió las puntuaciones más bajas según la clasificación de la escala de Bell (1982). *Calificación de la escala de Bell: Grado 1: cepa de Trichoderma que crece el 100% de la placa; Grado 2: cepa de Trichoderma creciendo en el 75% de la placa; Grado 3: cepa de Trichoderma que crece en el 50 % de la placa; Grado 4: cepa de Trichoderma que crece en el 25% de la placa; Grado 5: cepa de Trichoderma no creció y el patógeno S. sclerotiorum ocupó el 100% de la superficie de la placa.* Estos resultados concuerdan con lo expuesto por Hidayah *et al.* (2020) quienes observaron en ensayos *in vitro* de cultivos duales de 15 aislamientos del género *Trichoderma* enfrentados a una cepa agresiva de *S. sclerotiorum* SS12, que todos los aislamientos estudiados generaron inhibición del crecimiento del micelio del fitopatógeno entre un 46 y 60%.

Los agentes de control biológico del género *Trichoderma*, utilizan varios mecanismos contra los patógenos, incluida la producción de compuestos antifúngicos, la competencia por nutrientes, el parasitismo o la inhibición de patógenos, la antibiosis y la producción de enzimas líticas (Marra *et al.* 2006; González-Estrada *et al.*, 2018) y generan Resistencia Sistémica (Pieterse *et al.*, 2014; O'Brien, 2017). Compuestos peptaiboles generados por *Trichoderma harzianum* y gliotoxinas de *Gliocladium virens* J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster, (1958) inhiben la germinación de conidios de *B. cinerea* (Schirmbock *et al.*, 1994). La L-AA oxidasa producida por *T. harzianum* produce muerte celular programada en *B. cinerea* (Cheng *et al.*, 2012). Los componentes orgánicos volátiles, producidos por algunos hongos, tienen diversas funciones y juegan un rol importante en las

interacciones planta-microorganismo (Liarzi *et al.*, 2016) incluyendo propiedades antifúngicas y antibacterianas (Bojke *et al.*, 2018).

La búsqueda de agentes de control biológico con efectos múltiples lleva al estudio de diversos tipos de hongos en los que, los hongos entomopatógenos cobran especial relevancia por sus características biológicas. El número de interacciones biológicas posibles entre fitopatógenos y hongos entomopatógenos es muy amplio. La presencia de estos últimos en diversos ambientes y nichos ecológicos no está del todo dimensionada. Otros estudios reportan que el hongo *M. anisopliae* inhibe el crecimiento del micelio y la germinación de conidios del fitopatógeno *B. cinerea* (Kang *et al.*, 1996). Guigon-López *et al.* (2021) en un estudio *in vitro* de cultivo dual observaron que la cepa Ma70 de la especie *M. anisopliae*, redujo el crecimiento de *B. cinerea* entre un 60 - 63 %. Sarven *et al.* (2020) evaluaron *in vitro* la acción de *M. anisopliae* frente a *B. cinerea*, observando halos de inhibición del crecimiento del micelio del fitopatógeno. Los mismos autores demostraron que los compuestos orgánicos volátiles generados por *M. anisopliae* son los que generan el efecto inhibitorio del crecimiento micelial, reduciendo en un 41 % la severidad de la enfermedad en postcosecha.

En esta etapa de selección de aislamientos de hongos incluidos en el género *Trichoderma* y *Metarhizium*, se buscó reducir el número de aislamientos con los cuales seguir realizando otros estudios referentes a su capacidad como microorganismos promisorios para ser utilizados en el manejo de plagas de interés agrícola. Para ello se evaluó la capacidad que presentan dichos aislamientos para inhibir el crecimiento de *B. cinerea* y *S. sclerotiorum* en placas de Petri, y también se tomó como criterio de selección la velocidad de crecimiento de los tratamientos testigos en el caso de los aislamientos incluidos en el género *Trichoderma*. Todos los aislamientos recolectados se encuentran preservados como cultivos de referencia en la Colección Micológica del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina, para poder realizar estudios posteriores en caso de requerirlo.

Tras el análisis estadístico de los datos observados fueron seleccionados 4 tratamientos con los valores de media más altos en el estudio de porcentaje de inhibición de ambos fitopatógenos y 2 tratamientos que presentaron valores de media altos referentes al crecimiento de tratamientos testigos en placas de Petri en el ensayo con *S. sclerotiorum*. El código de aislamiento ingresado en la colección micológica del CEPAVE para los tratamientos seleccionados (1, 4, 6, 7, 8 y 9) son: CEP-745; CEP-749; CEP-751; CEP-752; CEP-753 y CEP-754.

De acuerdo con los resultados del análisis estadístico de los ensayos de cultivo dual en placas de Petri bajo condiciones de laboratorio, para determinar la capacidad antagónica que presentan aislamientos de hongos entomopatógenos incluidos en el género *Metarhizium* frente a dos fitopatógenos de importancia mundial, como lo son *B. cinerea* y la *S. sclerotiorum*, se determinó que todos los aislamientos evaluadas (CEP-722, CEP-723, CEP-724, CEP-725 y CEP-726) tienen velocidades de crecimiento distintas y presentan capacidad antagonista frente a los dos fitopatógenos evaluados. Los aislamientos CEP-722 y CEP-723 (tratamientos 1 y 2) presentaron los valores de medias más altos en el porcentaje de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* en el último

día de evaluación (siete días posteriores a la inoculación del sustrato), siendo éstos de 32,97 % y 32,19 % respectivamente, aunque estos tratamientos no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí y entre los demás tratamientos evaluados. Por otro lado, las cepas CEP-722 y CEP-725 (tratamientos 1 y 4) presentaron los valores de medias más altos en el porcentaje de inhibición del crecimiento de *S. sclerotiorum* en el último día de medición (siete días posteriores a la inoculación del sustrato), siendo éstos de 27,34% y 26,56 % respectivamente. Se observaron halos de inhibición en todos los tratamientos evaluados frente a *B. cinerea* y *S. sclerotiorum*, que se hicieron notorios a partir del quinto día de medición. No se observó contacto micelial entre los aislamientos incluidos en el género *Metarhizium* y los fitopatógenos, lo que evidencia una clara producción de metabolitos con características fungistáticas.

Los datos expuestos en este capítulo permiten avanzar en el conocimiento de las características biológicas que presentan estos microorganismos y su función en las dinámicas poblacionales de los agroecosistemas, dinámica que, por cierto, no sólo es basada en la supresión de micro y macroorganismos, sino que abarca un sinnúmero de interacciones entre distintos seres vivos de diversos reinos. Este estudio pretende ser un aporte en el intento de dilucidar las interacciones biológicas posibles entre microorganismos agentes de control biológico y fitopatógenos de gran importancia agrícola presentes en el cinturón fruti-hortícola de Buenos Aires, como lo son *B. cinerea* y *S. sclerotiorum*.

### **Conclusión.**

Los resultados obtenidos en los estudios de cultivo dual demuestran la capacidad que tienen algunos de los aislamientos obtenidos de los géneros *Trichoderma* y *Metarhizium*, como agentes de control biológico de los fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

Los aislamientos seleccionados del género *Metarhizium* CEP-722, CEP-723, CEP-724, CEP-725 y CEP-726 presentaron buenos resultados en las pruebas *in vitro* de cultivo dual y serán sometidos a otras pruebas de selección.

Los aislamientos seleccionados del género *Trichoderma* CEP-745; CEP-749; CEP-751; CEP-752; CEP-753 y CEP-754 presentaron buenos resultados en las pruebas *in vitro* de cultivo dual y en la velocidad de crecimiento en tratamientos testigos, los mismos serán sometidos a otras pruebas de selección.

### **Bibliografía.**

- Aoki, Y., Haga, S. y Suzuki, S. 2020. Direct antagonistic activity of chitinase produced by *Trichoderma* sp. SANA20 as biological control agent for grey mould caused by *Botrytis cinerea*. *Cogent Biology*, 6(1), 1747903.
- Barrios, C., Bustillo, A., Ocampo, K., Reina, M. y Alvarado, H. 2016. Eficacia de hongos entomopatógenos en el control de *Leptopharsa gibbicarina* (Hemiptera: Tingidae) en palma de aceite. *Revista Colombiana de Entomología*, 42(1), 22-27.

- Bell, D. K., Wells, H. D., Markhabell, D. K. y Wells, C. R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72, 379-382.
- Bettioli, W. y Morandi, M. A. V. 2009. Biocontrol de doenças de plantas: Uso e perspectivas. EMBRAPA, Jaguariúna.
- Bettioli, W., Pinto, Z. V., Silva, J. C., Forner, C., Faria, M. R., Pacífico, M. G. y Costa, L. S. A. S. 2019. Produtos comerciais à base de *Trichoderma* [Commercial *Trichoderma*-based products]. In: Meyer, M.C., Mazaro, S.M. y Silva, J.C. (Editores) *Trichoderma: uso na agricultura* [*Trichoderma: use in agriculture*]. Brasília, *Embrapa*, 45-160.
- Bojke, A., Tkaczuk, C., Stepnowski, P. y Gołębiowski, M. 2018. Comparison of volatile compounds released by entomopathogenic fungi. *Microbiology Research*, 214, 129-136.
- Cheng, C.H., Yang, C.A. y Peng, K.C., 2012. Antagonism of *Trichoderma harzianum* ETS 323 on *Botrytis cinerea* mycelium in culture conditions. *Phytopathology*, 102(11), 1054-1063.
- García, A. B., Cordero, A. F. P. y Chamorro, L. M. A. 2022. Especies nativas de *Trichoderma* aisladas de plantaciones de aguacate con actividad inhibitoria contra *Phytophthora cinnamomi*. *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. BSAA, 20(2), 102-116.
- González-Estrada, R., Blancas-Benítez, F., Montañón-Leyva, B., Moreno-Hernández, C., Romero-Islas, L. D. C., Romero-Islas, J., ... y Gutierrez-Martinez, P. 2018. A review study on the postharvest decay control of fruit by *Trichoderma*. *Trichoderma - The Most Widely Used Fungicide*. pp. 63 -77.
- Gothandapani, S., Boopalakrishnan, G., Prabhakaran, N., Chethana, B. S., Aravindhan, M., Saravanakumar. M. y Ganeshan, G. 2014. Evaluation of entomopathogenic fungus against *Alternaria porri* (Ellis) causing purple blotch disease of onion. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 48(2), 135-144.
- Guigon-López, C., Holguín-Ibarra, P. D., Torres-Zapien, J. H., García-Cruz, I., Villapando, I. y Salas-Salazar, N. A. 2021. *Metarhizium anisopliae* reduces conidial germination and mycelium growth of the apple gray mold *Botrytis cinerea*. *Biological Control*. 160, 104660.
- Hernández-Melchor, D.J., Ferrera-Cerrato, R. y Alarcón, A. 2019. *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences*, 35(1), 98-112.
- Hu, X., Roberts, D. P., Xie, L., Qin, L., Li, Y., Liao, X., Han, P., Yu, C. y Liao, X. 2019. Seed treatment containing *Bacillus subtilis* BY-2 in combination with other *Bacillus* isolates for control of *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape. *Biological Control*, 133, 50-57.
- Hidayah, B. N., Khangura, R. y Dell, B. 2022. Biological control potential of *Trichoderma* species and bacterial antagonists against *Sclerotinia sclerotiorum* on canola in western Australia. *International Journal Agriculture and Biology*, 27(3), 215-227.

- Joshi, B. B., Bhatt, R. P. y Bahukhandi, D. 2010. Antagonistic and plant growth activity of *Trichoderma* isolates of Western Himalayas. *Journal of Environmental Biology*, 31, 921-928.
- Kang, S. C., Bark, Y. G., Lee, D. G., Kim, Y. H., 1996. Antifungal activity of *Metarhizium anisopliae* against *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* and *Alternaria solani*. *The Korean Journal of Mycology*, 24, 49-55.
- Launio, C. C., Labon, K. O., Bañez, A. A. y Batani, R. S. 2020. Adoption and economic analysis of using biological control in Philippine highland farms: Case of *Trichoderma koningii* strain KA. *Crop protection*, 136, 105177.
- Liarzi, O., Bar, E., Lewinsohn, E., Ezra, D. y Jones, J. 2016. Use of the Endophytic Fungus *Daldinia* cf. *concentrica* and its volatiles as bio-control agents. *PLoS ONE*, 11(12), e0168242.
- Marra, R., Ambrosino, P., Carbone, V., Vinale, F., Woo, S. L., Ruocco, M., Ciliento, R., Lanzuise, S., Ferraioli, S., Soriente, I., et al. 2006. Study of the Three-Way Interaction between *Trichoderma atroviride*, Plant and Fungal Pathogens by Using a Proteomic Approach. *Current Genetics*, 50, 307-321.
- Miguel-Ferrer, L., Romero-Arenas, O., Andrade-Hoyos, P., Sánchez-Morales, P., Rivera-Tapia, J. A. y Fernández-Pavía, S. P. 2021. Antifungal activity of *Trichoderma harzianum* and *T. koningiopsis* against *Fusarium solani* in seed germination and vigor of Miahuateco chili seedlings. *Mexican Journal of Phytopathology*, 39(2), 228-247.
- Nawrocka, J., Małolepsza, U., Szymczak, K. y Szczech, M. 2018. Involvement of metabolic components, volatile compounds, proteins, and mechanical strengthening in multilayer protection of cucumber plants against *Rhizoctonia solani* activated by *Trichoderma atroviride* TRS25. *Protoplasma*, 255(1), 359-373.
- O'Brien, P. A. 2017. Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, 46, 293-304.
- Pérez-Portilla, E., Escamilla-Prado, E., Martínez-Bolaños, M., Carrión-Villarnovo, G. L. L. y Hernández-Leal, T. I. 2018. Selection *in vitro* of mycoparasites with potential for biological control on Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*). *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 172-183.
- Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. y Bakker, P. A. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 1-5.
- Redda, E. T., Ma, J., Mei, J., Li, M., Wu, B. y Jiang, X. 2018. Antagonistic potential of different isolates of *Trichoderma* against *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, and *Botrytis cinerea*. *European Journal of Experimental Biology*.
- Romero-Arenas, O., Amaro, L. J., Damián, H. M., Valencia de Ita, M. A., Rivera, A. y Huerta, L. M. 2017. Bio-preparados de *Trichoderma* spp., para el control biológico de *Phytophthora capsici* en el cultivo de tomate de Puebla, México. *ITEA*, 113(4), 313-324.

- Sarven, M. S., Hao, Q., Deng, J., Yang, F., Wang, G., Xiao, Y. y Xiao, X. 2020. Biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Pathogens*, 9(3), 213.
  
- Schirmbock, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, K. C., Arisan, A. I., Scala, F., Harman, G. E., Kubicek, P. C. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4364-4370.
  
- Sumida, C. H., Daniel, J. F. S., Araujod, A. P. C. S., Peitl, D. C., Abreu, L. M., Dekker, R. F. H. y Canteri, M. G. 2018. *Trichoderma asperelloides* antagonism to nine *Sclerotinia sclerotiorum* strains and biological control of white mold disease in soybean plants. *Biocontrol Science and Technology*, 28(2), 142-156.
  
- Wright, E. R., Zapata, R., de Delfino O. S. F., López, M. V. y Senlle, M. 1988. Eficiencia *in vitro* de antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*. *Revista Facultad de Agronomía*, 9, 109-116.
  
- You, J., Li, G., Li, C., Zhu, L., Yang, H., Song, R., y Gu, W. 2022. Biological control and plant growth promotion by volatile organic compounds of *Trichoderma koningiopsis* T-51. *Journal of Fungi*, 8(2), 131.

## Capítulo 6. Pruebas promoción de crecimiento de aislamientos de los géneros *Metarhizium* y *Trichoderma* seleccionados como controladores biológicos de *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

### Resumen.

Este trabajo no sólo se basa en la selección de Agentes de Control Biológico (ACB) por medio de estudios enfocados a su capacidad biocontroladora ya sea de enfermedades o de insectos, sino que plantea la selección de aislamientos con múltiples mecanismos de acción. La promoción de crecimiento de las plantas por medio de la inoculación con microorganismos puede ser de ayuda para reducir la utilización de fertilizantes e insumos externos al agroecosistema y generar un efecto de control de enfermedades y de plagas animales indirecto, al disminuir su incidencia. Este capítulo presenta el trabajo realizado para evaluar la capacidad promotora del crecimiento que presentan los aislamientos de mejor comportamiento en las pruebas de cultivo dual en plantas de tomate variedad platense (*Solanum lycopersicum*). Se seleccionaron dos aislamientos del género *Metarhizium* (CEP-722 y CEP-723) y dos aislamientos del género *Trichoderma* (CEP-753 y CEP-754), que presentaron los mejores resultados en las pruebas realizadas. Los ensayos fueron realizados por separado, siendo el criterio de separación el género de los aislamientos.

### Introducción.

Es conocida la capacidad promotora del crecimiento de las plantas que pueden ejercer varias especies del género *Trichoderma*. La promoción de crecimiento de las plantas por parte de estos ascomicetes es hoy en día, eje central de las investigaciones a nivel mundial. Diversos autores han complementado los estudios de antagonismo de especies del género *Trichoderma* con pruebas de promoción de crecimiento en diversos hospedantes: ajo (*Allium sativum* L. (1753)), soja (*Glycine max* (L.) Merr, (1975)), (Zapata-Narváez, y Gómez-Marroquín, 2022) ají (*Capsicum chinense* Jacq., (1776)) (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2021) yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., (1822)) (López *et al.*, 2021) tomate (*S. lycopersicum* cv. Ulises) (Santana-Baños *et al.*, 2021), maní (*Arachis hypogaea* L., (1753)) (Illa *et al.*, 2019), pimentón (*Capsicum annum* L., (1753)) (Peña-Tovar, y Pavone-Maniscalco, 2020), entre otros.

Los estudios relacionados con la promoción de crecimiento de las plantas de interés agrícola generada por hongos del género *Metarhizium* son menos comunes en la literatura actual, La mayoría de los trabajos se centra en el estudio de la patología en insectos. Sin embargo, existen algunos artículos en la literatura científica actual, referentes a la acción promotora del crecimiento de las plantas, ejercida por estos conocidos hongos entomopatógenos. Ortiz-Espinoza *et al.* (2021) reportaron efectos de la promoción del crecimiento de *M. anisopliae* y otros hongos entomopatógenos en plantas de pimentón (*C. annum*). Gran parte de los estudios realizados son de carácter *in vitro* o en condiciones controladas de crecimiento dada la complejidad que presenta el análisis de variantes en sistema *in vivo* o a campo. González-Guzmán (2020) observó que las respuestas de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (cepa EABb 04/01–Tip) y *M.*

*brunneum* (cepa 01/58-Su) inoculadas en trigo cultivado en suelos naturales no estériles, fueron positivas mostrando potencialidad como biofertilizantes y bioestimulantes pero condicionadas a factores ambientales y métodos de aplicación que deben ser analizados.

### **Hipótesis.**

Los aislamientos del género *Metarhizium* CEP-722, CEP-723, CEP-724, CEP-725 y CEP-726 y los aislamientos del género *Trichoderma* CEP-745, CEP-749, CEP-751, CEP-752, CEP-753 y CEP-754 poseen capacidad como promotores del crecimiento de plantas de tomate (*S. lycopersicum*) y esta capacidad varía según cada microorganismo.

### **Objetivos.**

Evaluar la capacidad promotora del crecimiento de plantas de tomate (*S. lycopersicum*) de los aislamientos de los géneros *Metarhizium* y *Trichoderma* mejor evaluados en las pruebas de inhibición del crecimiento de los fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

Seleccionar aislamientos de los géneros *Metarhizium* y *Trichoderma* para ser identificados morfológica y molecularmente.

### **Materiales y métodos.**

**Pruebas de laboratorio de promoción de crecimiento en plantas de tomate var. platense (*S. lycopersicum*) inoculadas con suspensión de esporas de aislamientos de *Metarhizium* spp. y *Trichoderma* spp.**

Se realizaron estudios de promoción de crecimiento de plantas de tomate var. platense inoculándolas con una suspensión de esporas de los aislamientos de *Metarhizium* sp. CEP-722, CEP-723, CEP-724, CEP-725 y CEP-726 y de los aislamientos de *Trichoderma* sp. CEP-745, CEP-749, CEP-751, CEP-752, CEP-753 y CEP-754, seleccionados por presentar los mejores resultados en las pruebas *in vitro* de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* y *S. sclerotiorum*. El ensayo fue conducido en una cámara bioterio bajo condiciones controladas a una temperatura promedio de 24° C, humedad relativa promedio de 70 % y un fotoperiodo de 18:6 hs luz:oscuridad, mediante el uso de lámparas de vapor de sodio de alta presión (Philips Son T Agro 250 W, China). Se sembraron semillas de tomate variedad platense (*S. lycopersicum*) otorgados por el programa "ProHuerta" dirigido por el instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en sustrato comercial (Grow Mix Multipro, Argentina) en bandejas de almácigo con orificios de 50 x 50 mm y fueron regadas con agua destilada estéril.

Para preparar las suspensiones de esporas de *Trichoderma* spp. y de *Metarhizium* spp., los aislamientos fueron cultivados en placas de Petri de 90 mm de diámetro con 12 ml de agar papa

glucosado (APG), pH 7 (Merck, Alemania). A los 7 días cuando los cultivos estaban esporulados, se realizó la remoción de conidios con un bisturí previamente esterilizado, se obtuvieron suspensiones con 250 ml de agua destilada estéril y se estandarizaron mediante cámara de Neubauer a una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas/ml.

Las plantas de tomate (*S. lycopersicum*) fueron inoculadas en tres ocasiones con 2 ml de la suspensión de esporas sobre el sustrato. La primera inoculación fue al momento de la emergencia de las plántulas a los 7 días de iniciado el ensayo, la segunda a los 21 y la tercera a los 35 para el caso de *Trichoderma* spp. y 31 días para *Metarhizium* spp. La diferencia en los días de la última inoculación para los ensayos de los géneros *Trichoderma* y *Metarhizium* fue estipulada por los distintos comportamientos de crecimiento observados en ambos ensayos. Luego de 2 días de la última inoculación, las plantas fueron trasplantadas a macetas de polietileno de un litro de capacidad con sustrato (Grow Mix Multipro, Argentina). Las mediciones se realizaron a los 49 días a partir de la siembra en el caso de *Trichoderma* spp. y 37 para *Metarhizium* spp. El riego fue suministrado hasta llegar a capacidad de campo durante todo el transcurso del estudio con agua destilada estéril. Se realizó un Diseño en Bloques Completos Aleatorizados (DBCA) con un total de 7 repeticiones (7 plantas) para cada tratamiento.

Las variables analizadas fueron: longitud de tallo (mm), diámetro de tallo a la altura de cotiledones (mm) y peso fresco de la parte aérea de la planta (g), utilizando una regla milimétrica, calibre metálico graduado y balanza de precisión respectivamente. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias con el estadístico de Tukey ( $p > 0,05$ ), utilizando el software InfoStat (versión 2016e). Los ensayos fueron realizados por duplicado. Para más información consultar Anexo 2.

## **Resultados.**

Para el ensayo con aislamientos del género *Trichoderma*, en la variante diámetro de tallo (ver figura 29) los tratamientos 4, 5, 6 y 7 (CEP-751, CEP-752, CEP-753 y CEP-754 respectivamente) presentaron valores de medias superiores a los tratamientos 1, 2 y 3 (tratamiento control, CEP-745, CEP-749, CEP-751 respectivamente). El tratamiento 4 (CEP-751) presentó el valor de media más alto registrado para esta variante, siendo de 6,21 mm, seguido por los tratamiento 6 y 7 (CEP-753 y CEP-754 respectivamente) con valores de medias de 6,14 y 6,07 mm respectivamente. El tratamiento control (tratamiento 1) fue el que presentó el valor de media más bajo registrado en este ensayo, siendo de 5,29 mm. Se observan 2 grupos estadísticos distintos, los tratamientos 1 y 2 (tratamiento control y CEP-745) se establecieron en ambos grupos. En la figura 30 se observa la diferencia de los tratamientos mejor evaluados 4, 6 y 7 (CEP-751, CEP-753 y CEP-754 respectivamente), estos aislamientos ejercieron un mayor aumento en el crecimiento de tallos de plantas de tomate.

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Diám. tallo (mm)	49	0,42	0,34	6,54

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,55	6	0,76	5,13	0,0005
Tratamientos	4,55	6	0,76	5,13	0,0005
Error	6,21	42	0,15		
Total	10,77	48			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,63646

Error: 0,1480 gl: 42

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
1	5,29	7	0,15	A
2	5,64	7	0,15	A B
3	5,79	7	0,15	A B
5	6,00	7	0,15	B
7	6,07	7	0,15	B
6	6,14	7	0,15	B
4	6,21	7	0,15	B

Figura 29. Análisis de la varianza, comparaciones de medias referente al diámetro de tallos de plantines de tomate inoculados con 6 aislamientos del género *Trichoderma* 49 días posteriores a su siembra.

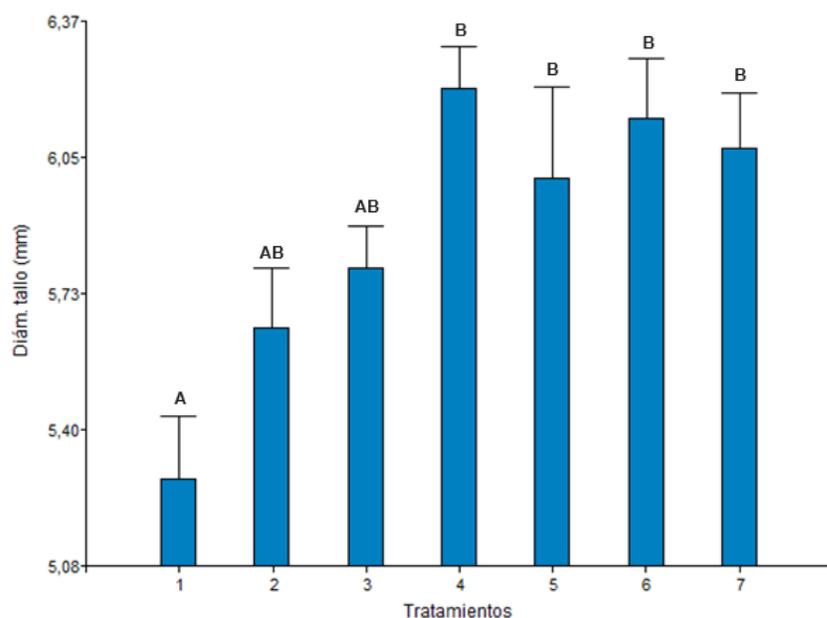


Figura 30. Gráfico de barras referente al diámetro de tallos de plantines de tomate inoculados con 6 aislamientos del género *Trichoderma* 49 días posteriores a su siembra.

Para la variable longitud de tallo de plantines de tomate, el control (tratamiento 1) presentó valores de media muy por debajo de los demás tratamientos, siendo éste de 175,57 mm y ubicándose como único tratamiento en el grupo estadístico "A". Los demás tratamientos se ubicaron en el grupo estadístico "B", presentando diferencias estadísticamente significativas respecto del control (ver figura 31). El aislado CEP- 754 (tratamiento 7) presentó el valor más alto observado, registrándose

una media en la longitud de tallo de plantas de tomate de 213,71 mm. El aislado CEP-745 (tratamiento 2) presentó un valor de media de 212,43 mm, siendo el segundo tratamiento con mayor longitud de tallo reflejado en valores de media. En el gráfico de barra (figura 32) se puede apreciar la gran diferencia de los valores de media registrados entre el control y los demás tratamientos aplicados (aislamientos: CEP-745, CEP-749, CEP-751, CEP-752, CEP-753 y CEP-754).

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Long. tallo (mm)	49	0,64	0,59	4,72

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6788,49	6	1131,41	12,42	<0,0001
Tratamientos	6788,49	6	1131,41	12,42	<0,0001
Error	3824,57	42	91,06		
Total	10613,06	48			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=15,78956

Error: 91,0612 gl: 42

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
1	175,57	7	3,61	A
5	200,43	7	3,61	B
4	202,86	7	3,61	B
6	205,29	7	3,61	B
3	205,43	7	3,61	B
2	212,43	7	3,61	B
7	213,71	7	3,61	B

Figura 31. Análisis de la varianza y comparaciones de medias referente a la longitud de tallo de plantines de tomate inoculados con 6 aislamientos del género *Trichoderma* 49 días posteriores a su siembra.

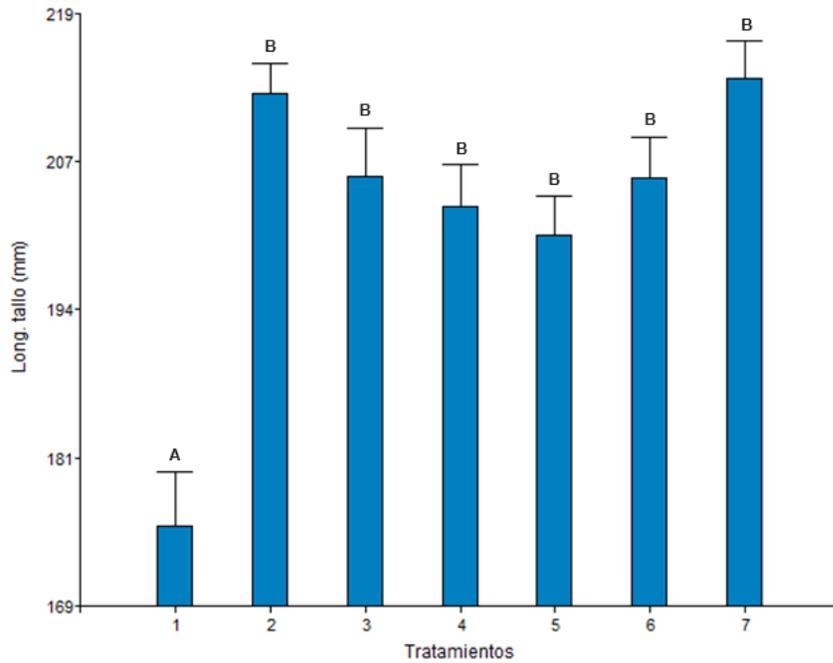


Figura 32. Gráfico de barras referente a la longitud de tallo de plantines de tomate inoculados con 6 aislamientos del género *Trichoderma* 49 días posteriores a su siembra.

En la variable peso aéreo de plantines de tomate, se presentan 2 grupos según sus diferencias estadísticas. Los aislados CEP-753 y CEP-754 (tratamientos 6 y 7 respectivamente) presentaron los valores de media más altos, siendo de 13,02 g y 12,59 g respectivamente (ver figuras 33 y 34). Y presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto del control (tratamiento 1), el cual presentó un valor de media de 9,20 g.

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso aéreo (g)	49	0,42	0,34	12,92

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	65,17	6	10,86	5,11	0,0005
Tratamientos	65,17	6	10,86	5,11	0,0005
Error	89,32	42	2,13		
Total	154,49	48			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,41298

Error: 2,1267 gl: 42

Tratamientos	Medias	n	E.E.
1	9,20	7	0,55 A
5	10,89	7	0,55 A B
4	11,09	7	0,55 A B
2	11,10	7	0,55 A B
3	11,13	7	0,55 A B
7	12,59	7	0,55 B
6	13,02	7	0,55 B

Figura 33. Análisis de la varianza y comparaciones de medias referente al peso aéreo de plantines de tomate inoculados con 6 aislamientos del género *Trichoderma* 49 días posteriores a su siembra.

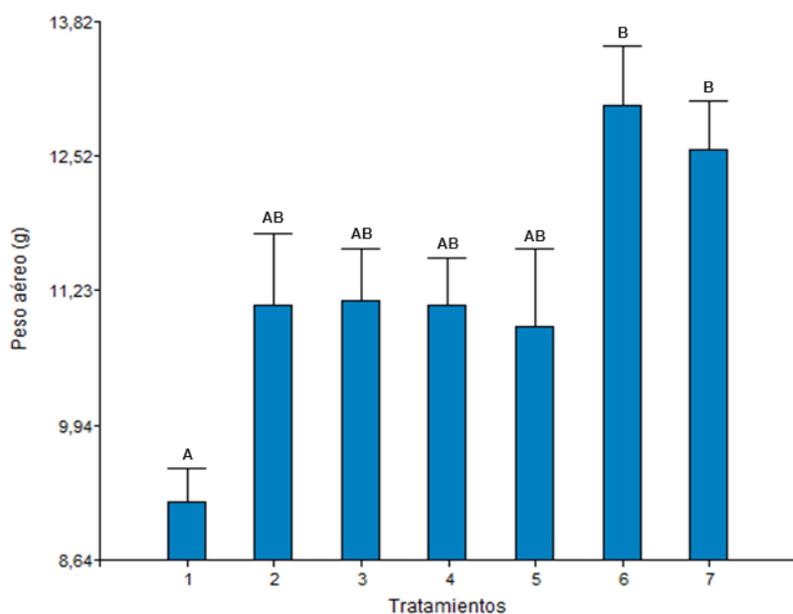


Figura 34. Gráfico de barras referente al peso aéreo de plantines de tomate inoculados con 6 aislamientos del género *Trichoderma* 49 días posteriores a su siembra.

Para el ensayo con aislamientos del género *Metarhizium*, en el cuadro de análisis de la varianza (figura 35) se observa que en la variable diámetro de tallo todos los tratamientos se diferencian del control (tratamiento 1) el cual presenta un valor de media de 4,79 mm. Los aislamientos CEP-722, CEP-724 y CEP-726 (tratamientos 2, 4 y 6 respectivamente) presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto del control, con valores correlativos de media de 5,71 mm, 5,50 mm y 5,57 mm. El aislado CEP-723 (tratamiento 3) obtuvo un valor de media de 5,36 mm,

superando la barrera de los 5, 20mm en el diámetro de plantas de tomate (*S. lycopersicum*) medidos 37 días posterior a la siembra (ver figura 36).

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Diam. Tallo	42	0,39	0,30	8,05

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,19	5	0,84	4,54	0,0026
Tratamientos	4,19	5	0,84	4,54	0,0026
Error	6,64	36	0,18		
Total	10,83	41			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,69080

Error: 0,1845 gl: 36

Tratamientos	Medias	n	E.E.
1,00	4,79	7	0,16 A
5,00	5,07	7	0,16 A B
3,00	5,36	7	0,16 A B
4,00	5,50	7	0,16 B
6,00	5,57	7	0,16 B
2,00	5,71	7	0,16 B

Figura 35. Análisis de la varianza y comparaciones de medias referente al diámetro de tallos de plantines de tomate inoculados con 5 aislamientos del género *Metarhizium* 37 días posteriores a su siembra.

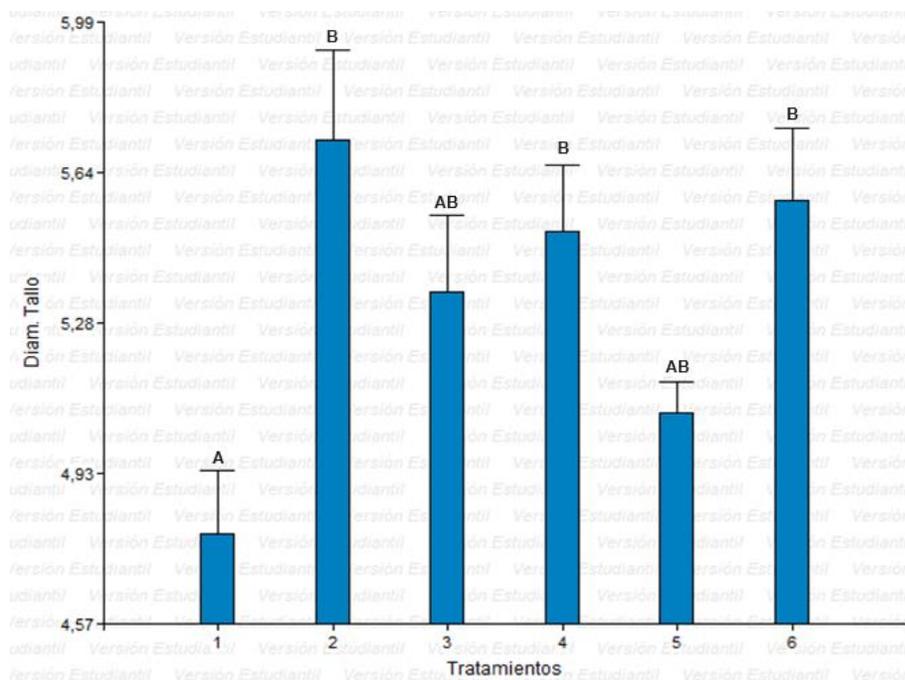


Figura 36. Gráfico de barras referente al diámetro de tallos de plantines de tomate inoculados con 5 aislamientos del género *Metarhizium* 37 días posteriores a su siembra.

Para la variable longitud de tallo, se observa que todos los tratamientos presentan diferencias estadísticamente significativas respecto del control, el cual presentó un valor de media de 281,86 mm. En el gráfico de barras (figura 38) se observa que los aislamientos CEP-722, CEP-723, CEP-724, CEP-725 y CEP-726 (tratamientos 2, 3, 4, 5 y 6) se ubican en el estrato superior de dicho gráfico, el aislado CEP-722 (tratamiento 2) presentó el valor de media más bajo de este grupo, siendo de 321,29 mm (ver figura 37).

El aislado CEP-724 (tratamiento 4) se destaca por sobre los demás con un valor de la media de 335,43 mm, seguido de por los aislamientos CEP-723 y CEP-726 (tratamientos 3 y 6 respectivamente) que presentaron valores correlativos de media de 328,43 y 324,43 mm.

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Long. Tallo	42	0,42	0,33	6,92

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	12480,50	5	2496,10	5,12	0,0012
Tratamientos	12480,50	5	2496,10	5,12	0,0012
Error	17548,29	36	487,45		
Total	30028,79	41			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=35,50527

Error: 487,4524 gl: 36

Tratamientos	Medias	n	E.E.
1,00	281,86	7	8,34 A
2,00	321,29	7	8,34 B
5,00	322,14	7	8,34 B
6,00	324,43	7	8,34 B
3,00	328,43	7	8,34 B
4,00	335,43	7	8,34 B

Figura 37. Análisis de la varianza y comparaciones de medias referente a la longitud de tallo de plantines de tomate inoculados con 5 aislamientos del género *Metarhizium* 37 días posteriores a su siembra.

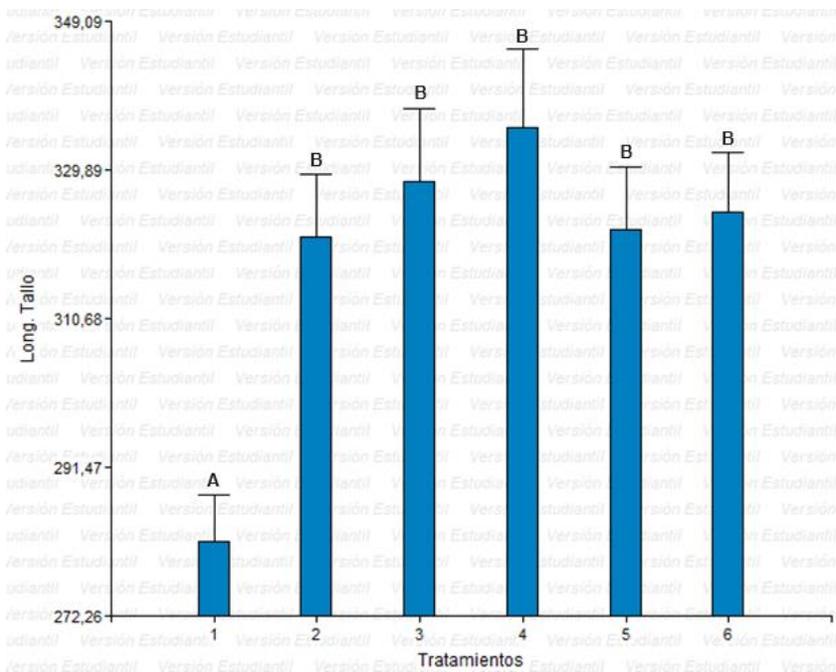


Figura 38. Gráfico de barras referente a la longitud de tallo de plantines de tomate inoculados con 5 aislamientos del género *Metarhizium* 37 días posteriores a su siembra.

En la variable peso aéreo de plantas de tomate (*S. lycopersicum*), tras la aplicación de suspensión de conidios de aislamientos del género *Metarhizium* se observa que, los tratamientos no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí. No obstante, hay diferencia en los valores de media registrados entre el control y los demás tratamientos. El valor de media del control (tratamiento 1) fue de 10,28 g siendo el más bajo registrado en esta variante. El aislado CEP-726 (tratamiento 6) presentó el valor de media más alto, siendo de 12,15 g (ver figuras 39 y 40).

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso Aéreo	42	0,20	0,09	12,39

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	17,72	5	3,54	1,81	0,1350
Tratamientos	17,72	5	3,54	1,81	0,1350
Error	70,37	36	1,95		
Total	88,09	41			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,24832

Error: 1,9546 gl: 36

Tratamientos	Medias	n	E.E.
1,00	10,28	7	0,53 A
4,00	10,74	7	0,53 A
3,00	11,18	7	0,53 A
2,00	11,41	7	0,53 A
5,00	11,95	7	0,53 A
6,00	12,15	7	0,53 A

Figura 39. Análisis de la varianza y comparaciones de medias referente al peso aéreo de plantines de tomate inoculados con 5 aislamientos del género *Metarhizium* 37 días posteriores a su siembra.

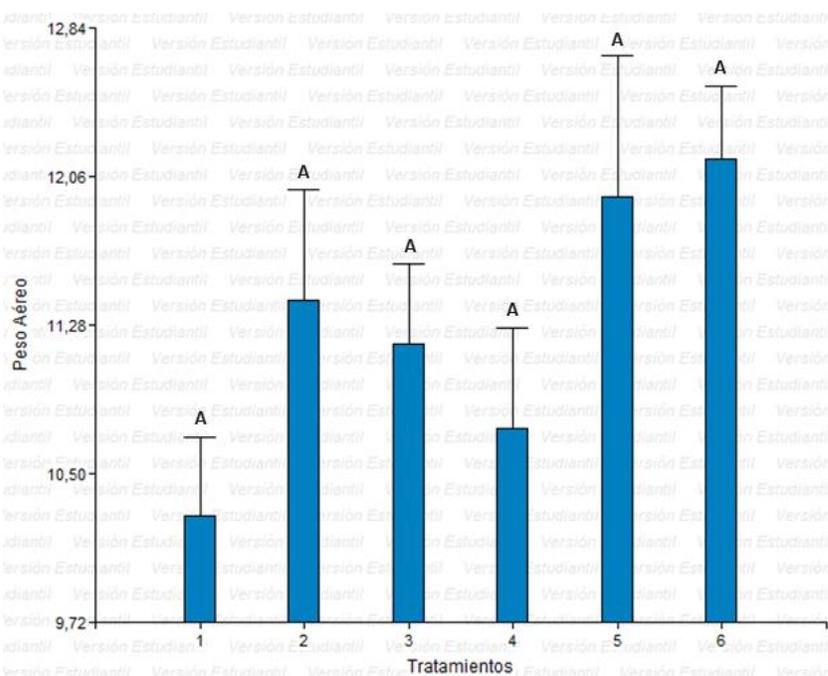


Figura 40. Gráfico de barras referente al peso aéreo de plantines de tomate inoculados con 5 aislamientos del género *Metarhizium* 37 días posteriores a su siembra.

## Discusión.

La selección de microorganismos con múltiples beneficios es hoy en día la base del manejo biológico de enfermedades e insectos. Esta búsqueda ha impulsado en parte al ámbito académico/científico a ahondar en el estudio del complejo Plantas-Microorganismos-Insectos, generando importantes avances en su entendimiento. El estudio de diferentes mecanismos de acción de los microorganismos (directos e indirectos) y el análisis de nichos cada vez más diversos propone un desafío que en este trabajo se pretende abordar.

Los aislamientos del género *Trichoderma* CEP-753 y CEP-754 son habitantes nativos o naturalizados de huertos de la provincia de Buenos Aires, siendo un microorganismo dominante del suelo, esto coincide con lo expuesto por distintos autores que describen el género *Trichoderma* como un componente dominante en la microbiota de varios ecosistemas, tales como; tierras de cultivo, praderas, bosques, marismas y desiertos, y está presente en todas las zonas climáticas, incluidas las regiones templadas, tropicales, la Antártida y la tundra (Kamala *et al.*, 2015; Ghorbanpour *et al.*, 2018).

El género *Trichoderma* es conocido por su intensiva absorción de exudados de la raíz y la interacción no sólo con microorganismos fitopatógenos, sino que también, por la interacción con toda la microbiota del suelo (Gajera *et al.*, 2013; Jaroszuk-Scisiel *et al.*, 2019). Esto puede ser una de las razones por la que plantas de tomate (*S. lycopersicum*) inoculadas con suspensiones de conidios de los aislamientos del género *Trichoderma* CEP-753 y CEP-754 presentan un aumento en el

crecimiento vegetativo cuando son comparadas con tratamientos testigos. Otros autores proponen que el efecto estimulador del crecimiento de las plantas es probablemente generado por su participación en la sintonía entre hormonas del crecimiento sintetizadas por *Trichoderma* y las hormonas de defensas producidas por la planta elicitadas por la presencia de este hongo (Grant y Jones, 2009; Carná *et al.*, 2014). Los resultados expuestos en este trabajo son un antecedente más que ayuda a la comprensión de la interacción del género *Trichoderma* con las plantas, varios estudios previos demuestran la capacidad promotora del crecimiento vegetativo de diversas especies, ejercida por *Trichoderma* spp. Mao *et al.*, 2020; Shang, *et al.*, 2020; Santana-Baños *et al.*, 2021; Ayyandurai *et al.*, 2021; Bridziuviene, *et al.*, 2022.

Las comparaciones de la capacidad promotora del crecimiento de plantas de tomate (*S. lycopersicum*) variedad platense que generaron los aislamientos CEP-745, CEP-749, CEP-751, CEP-752, CEP-753 y CEP-754 del género *Trichoderma* son un antecedente útil no sólo para el manejo de la nutrición de este cultivo, sino que también un antecedente que permite proponer estrategias en el control de enfermedades. Los aislamientos del género *Metarhizium* CEP-722, CEP-723, CEP-724, CEP-725 y CEP-726 estudiados en este trabajo podrían tener la capacidad de promover el crecimiento de las plantas de tomate (*S. lycopersicum*) a través del abastecimiento de nutrientes de distintas fuentes, que estos hongos podrían ofrecer a la planta por medio de relaciones simbióticas, esto coincide con lo expuesto por distintos autores que señalan que el género *Metarhizium* está compuesto por un grupo diverso de hongos comunes del suelo que exhiben estilos de vida multifuncionales con diversos grados de modos de adquisición de nutrientes ya sea como saprófitos, endófitos y/o patógenos de insectos (Ahmad *et al.*, 2019; Stone y Bidochka, 2020). Esta capacidad ya ha sido descrita por algunos autores como diversa y ha sido atribuida a varios factores de selección (tipo de hábitat, condiciones climáticas y según el tipo de asociaciones con plantas e insectos huéspedes) (Brunner-Mendoza *et al.*, 2018; Moonjely y Bidochka, 2019).

Los estudios sobre la promoción del crecimiento de las plantas ejercida por microorganismos son generalmente realizados sobre plantas tipo o sobre variedades de híbridos comerciales (Siqueira *et al.*, 2020; González-Pérez *et al.*, 2022), por lo que los antecedentes expuestos en este trabajo sobre la promoción del crecimiento vegetativo de plantas de tomate (*S. lycopersicum*) variedad platense, son parte de la revalorización de cultivos “criollos” de la provincia de Buenos Aires, los cuales están mejor adaptados a las condiciones edafoclimáticas de la zona, pero representan una baja cantidad de la superficie cultivada en la provincia de Buenos Aires.

## **Conclusión.**

La promoción de crecimiento de plantines de tomate inoculados con 6 aislamientos de hongos del género *Trichoderma* y 5 aislamientos del género *Metarhizium*, se puede evidenciar la capacidad promotora de crecimiento que presentan todos los aislamientos estudiados en ambos géneros.

Los aislamientos del género *Trichoderma* CEP-753 y CEP-754 presentaron valores de media altos en todas las variantes estudiadas (diámetro de tallo, longitud de tallo y peso aéreo). Los demás aislamientos lograron valores de media superiores al testigo, sin embargo, fueron menos estables

en los valores de media registrados para las 3 variables estudiadas (diámetro de tallo, longitud de tallo y peso aéreo de plantas de tomate (*S. lycopersicum*)).

Todos los aislamientos del género *Metarhizium* estudiados tienen diferentes capacidades como promotores del crecimiento vegetativo. El aislado CEP-722 presentó un comportamiento estable en las 3 variantes estudiadas (diámetro de tallo, longitud de tallo y peso aéreo), y el valor de media más alto para la variable diámetro de tallo.

Comparando los resultados obtenidos en este estudio y los resultados presentados en el capítulo anterior, se concluye que los aislamientos CEP-722 y CEP-723 son los que presentaron mejores aptitudes como agentes de control biológico de las enfermedades causadas por *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* y destacando el aislamiento CEP-722 con los mejores resultados como promotor del crecimiento vegetativo de plantas de tomate.

### **Bibliografía.**

- Ahmad, I., del Mar Jiménez-Gasco, M., Luthe, D. S., Shakeel, S. N. y Barbercheck, M. E. 2020. Endophytic *Metarhizium robertsii* promotes maize growth, suppresses insect growth, and alters plant defense gene expression. *Biological Control*, vol. 144, p. 104167.
- Alejo, J. C., Koh, F. A. M., Suárez, J. M. T., Ramírez, A. R. y Angulo, M. G. 2021. Efecto de la interacción dual de especies de *Trichoderma* en el crecimiento de *Capsicum chinense* Jacq. *Agrociencia*, 55(8), 681-693.
- Ayyandurai, M., Akila, R., Manonmani, K., Theradimani, M. y Vellaikumar, S. 2021. Phytostimulation and growth promotion activities of *Trichoderma* spp. on groundnut (*Arachis hypogaea* L.) crop. *Journal of Applied and Natural Science*, 13(4), 1172-1179.
- Bridžiuviene, D., Raudonienė, V., Švedienė, J., Paškevičius, A., Baužienė, I., Vaitonis, G., ... y Kačergius, A. 2022. Impact of Soil Chemical Properties on the Growth Promotion Ability of *Trichoderma ghanense*, *T. tomentosum* and Their Complex on Rye in Different Land-Use Systems. *Journal of Fungi*, 8(1), 85.
- Brunner-Mendoza, C., Reyes-Montes, M. D. R., Moonjely, S., Bidochka, M. J. y Toriello, C. 2019. A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. *Biocontrol Science and Technology*, 29(1), 83-102.
- Carná, M., Repka, V., Skupa, P. y Sturdík, E. 2014. Auxins in defense strategies. *Biologia*, 69(10), 1255-1263.
- Gajera, H., Domadiya, R., Patel, S., Kapopara, M. y Golakiya, B. 2013. Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system—a review. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 1(4), 133-142.

- Ghorbanpour, M., Omidvari, M., Abbaszadeh-Dahaji, P., Omidvar, R. y Kariman, K. 2018. Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biological Control*, 117, 147-157.
- González-Guzmán, A. 2020. Respuesta del trigo a los hongos entomopatógenos: efecto del método de inoculación, cultivo y suelo. Tesis doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes (ETSIAM). Departamento de Agronomía. Universidad de Córdoba, España.
- González-Pérez, E., Ortega-Amaro, M. A., Bautista, E., Delgado-Sánchez, P. y Jiménez-Bremont, J. F. (2022). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* enhances Arabidopsis, tomato, and maize plant growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 176, 34-43.
- Grant, M.R. y Jones, J.D. 2009. Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science*. 324, 750–752.
- Illa, C., Torassa, M., Pérez, M. A. y Pérez, A. A. 2020. Effect of biocontrol and promotion of peanut growth by inoculating *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* under controlled conditions and field. *Revista mexicana de fitopatología*, 38(1), 119-131.
- Jaroszuk-Ścisieł, J., Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., Majewska, M., Hanaka, A., ... y Janusz, G. 2019. Phytohormones (auxin, gibberellin) and ACC deaminase *in vitro* synthesized by the mycoparasitic *Trichoderma* DEMTkZ3A0 strain and changes in the level of auxin and plant resistance markers in wheat seedlings inoculated with this strain conidia. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4923.
- Kamala, T., Devi, S. I., Sharma, K. C. y Kennedy, K. 2015. Phylogeny and taxonomical investigation of *Trichoderma* spp. from Indian region of Indo-Burma biodiversity hot spot region with special reference to Manipur. *BioMed research international*, 2015.
- Lopez, A. C., Alvarenga, A. E., Zapata, P. D., Luna, M. F. Villaba, L. L. 2021. Caracterização de isolamento de *Trichoderma* endofítico de raiz de yerba mate como microrganismos potenciais que promovem o crescimento de planta.
- Mao, T., Chen, X., Ding, H., Chen, X. y Jiang, X. 2020. Pepper growth promotion and *Fusarium* wilt biocontrol by *Trichoderma hamatum* MHT1134. *Biocontrol Science and Technology*, 30(11), 1228-1243.
- Moonjely, S. y Bidochka, M. J. 2019. Generalist and specialist *Metarhizium* insect pathogens retain ancestral ability to colonize plant roots. *Fungal Ecology*, 41, 209-217.
- Ortiz-Espinoza, E., Villegas-Rodríguez, F., Ramírez-Tobías, H. M., Hernández-Arteaga, L. E. D. S. y Marín-Sánchez, J. 2020. La inoculación con hongos endófitos entomopatógenos en semilla genera una respuesta fisiológica y promueve el crecimiento vegetal en plantas de chile poblano en invernadero. *Nova scientia*, 12(25).

- Peña-Tovar, E. y Pavone-Maniscalco, D. 2020. Efecto de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de plántulas de *Capsicum annuum* L.(pimentón) y el biocontrol del hongo fitopatógeno *Sclerotium* sp. *AGROBIOLOGÍA*, pp. 45.
- Santana-Baños, Y., Hernández, A. A., Guamche, L. H., Regalado, Y. R. y del Busto Concepción, A. (2021). Respuesta de plántulas de tomate a la aplicación de *Trichoderma viride* y extracto acuoso de nim. *Manglar*, 18(4), 375-379.
- Shang, J., Liu, B. y Xu, Z. 2020. Efficacy of *Trichoderma asperellum* TC01 against anthracnose and growth promotion of *Camellia sinensis* seedlings. *Biological Control*, 143, 104205.
- Siqueira, A. C. O., Mascarin, G. M., Gonçalves, C. R., Marcon, J., Quecine, M. C., Figueira, A. y Delalibera Jr, Í. 2020. Multi-trait biochemical features of *Metarhizium* species and their activities that stimulate the growth of tomato plants. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 137.
- Stone, L. B. y Bidochka, M. J. 2020. The multifunctional lifestyles of *Metarhizium*: Evolution and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 104, 9935-9945.
- Zapata-Narváez, Y. A. y Gómez-Marroquín, M. R. (2022). Control de *Sclerotium cepivorum* y promoción del crecimiento en ajo (*Allium sativum*) con microorganismos antagonistas. *Agronomy Mesoamerican*, 46462-46462.

## Capítulo 7. Identificación de los aislamientos CEP-722, CEP-723, CEP-753 y CEP-754 seleccionados de los géneros *Metarhizium* y *Trichoderma*.

### Resumen.

En este capítulo se presentan los estudios moleculares de los aislamientos CEP-722, CEP-723, CEP-753 y CEP-754. Para ello se realizó la extracción de ADN de micelio de cada aislamiento, luego una secuenciación de las regiones genómicas ITS1 y TEF1 $\alpha$ , las secuencias obtenidas fueron comparadas con una base de datos de organismos afines para cada aislamiento. Posteriormente, se realizó un análisis filogenético de los aislamientos secuenciados dando como resultado 2 árboles filogenéticos, uno para aislamientos del género *Metarhizium* y otro para aislamientos del género *Trichoderma*.

### Introducción.

El manejo de plagas agrícolas supone el desarrollo de tecnologías que permitan mitigar el daño generado en las producciones agropecuarias que, en gran medida, son afectadas por la aplicación de numerosos plaguicidas de origen químico generando la degradación de suelos, pérdida de biodiversidad y efectos contaminantes del medio ambiente. Entre las tecnologías con gran potencial de acción en el manejo fitosanitario se encuentra el control biológico de plagas por medio de microorganismos nativos. Esta tecnología permite controlar los daños generados por las plagas sin producir un efecto contaminante del ambiente y disminuir los efectos adversos que puede propiciar el ejercicio del control biológico neoclásico (uso de agentes de control biológico exógenos). Su desarrollo requiere de una minuciosa búsqueda, análisis y una consecuente selección de microorganismos con alto potencial biológico. Muchos microorganismos han sido utilizados como Agentes de Control Biológico (ACB) de enfermedades de las plantas. Especies de *Trichoderma* son ampliamente reconocidas (Contreras-Cornejo *et al.*, 2011; Hermosa *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2016; Köhl *et al.*, 2019). *Trichoderma* spp. actúa contra los fitopatógenos directamente por micoparasitismo, antibiosis por medio de metabolitos volátiles y difusibles, e indirectamente por competencia de nutrientes, de espacio o por desencadenar mecanismos de defensa de las plantas (Amira *et al.*, 2017; Pascale *et al.*, 2017). Además, las especies de *Trichoderma* generan promoción de crecimiento e inducción de resistencia (RSI) en la planta huésped (Infante, 2009).

El género *Trichoderma* fue reconocido por primera vez por el micólogo Persoon en 1794, dentro de los principales géneros de hongos, entre los cuales se encuentran los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* y *Penicillium* (Samuels y Hebbbar, 2015). La primera clasificación del género *Trichoderma* comprendió nueve especies: *T. aureoviride*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. piluliferum*, *T. polysporum*, *T. pseudokoningii* y *T. viride* (Rifai, 1969). No obstante, su taxonomía es polifásica, por lo tanto, la identificación debe integrarse considerando la morfología y la identificación molecular. Martínez *et al.*, (2015), consideran que la taxonomía basada en caracteres morfológicos no es suficiente para diferenciar las especies del género *Trichoderma*, debido a la gran similitud que existe entre ellas. El análisis morfológico es altamente propenso a

errores a nivel de especies y aproximadamente el 50 % de los aislamientos de *Trichoderma* clasificados por análisis morfológico está erróneamente realizado (Kubicek *et al.*, 2003). Por lo tanto, la aplicación de técnicas moleculares es necesaria para la identificación y clasificación de este género. Actualmente, de acuerdo con la identificación molecular, las principales especies de *Trichoderma* se agrupan en cinco clados: *Viride*, *Virens*, *Strictipile*, *Longibrachiatum* y *Harzianum* (del Carmen H. Rodríguez *et al.*, 2021). Para la detección y cuantificación de hongos del género *Trichoderma* diversos *primers* o cebadores han sido diseñados para diferentes especies, con el objetivo de monitorear las cepas habitantes del suelo y las cepas promisorias como ACB (Rubio *et al.*, 2005; Hagn *et al.*, 2007; Kim y Knudsen, 2008; Savazzini *et al.*, 2008; López-Mondéjar *et al.*, 2010).

La mayoría de los cebadores diseñados para la detección y cuantificación de especies de *Trichoderma* se basan en el ribosoma nuclear ADN (ADNr). El DNAr es la región más utilizada para la identificación de muchos organismos a nivel de especie debido a sus regiones altamente variables, así como sus secuencias altamente conservadas. Esta región contiene los genes ribosómicos 18S, 5.8S y 28S separados por los espaciadores transcritos internos, ITS1 e ITS2, y la región espaciadora intergénica (IGS). La región ITS ha sido extensamente secuenciada y numerosas secuencias de DNAr de referencia se encuentran actualmente disponibles en bases de datos, lo que permite el diseño de conjuntos de primers. Numerosos conjuntos de primers han sido diseñados para este género que amplifican las regiones ITS1 e ITS2 (White *et al.*, 1990; Maymon *et al.*, 2004; Rubio *et al.*, 2005; Druzhinina *et al.*, 2006; Savazzini *et al.*, 2008; Siddiquee *et al.*, 2007; López-Mondéjar *et al.*, 2010). La diferenciación de especies con la amplificación únicamente de la región ITS, relacionada a ciertos grupos taxonómicos como es el caso de Hipocreales, está limitada debido a la homología de secuencias (Samuels, 2006; Gazis *et al.*, 2011; Chaverri *et al.*, 2015; Montoya-Vidaurre *et al.*, 2016; Raja *et al.* 2017). El Factor de Elongación de Traslación 1-alfa (TEF1- $\alpha$ ) es un marcador filogenético más informativo, ya que el contiene mayor variabilidad de secuencias que el DNAr, así como más caracteres filogenéticos informativos que otras regiones (Samuels, 2006; Chaverri *et al.*, 2015). Esta variabilidad aumenta la capacidad de diferenciar dentro de grupos de especies estrechamente relacionados (Samuels, 2006). Las herramientas moleculares utilizadas para la identificación basada en la secuenciación del ADN son los marcadores ITS1- 5,8S - ITS2, una secuencia parcial de las proteínas que codifican la traducción del gen del factor de elongación (EF-1 $\alpha$ ) y la ARN polimerasa subunidad II (RPB2) que han permitido resolver la confusión en la taxonomía de *Trichoderma* (Bouregghda *et al.*, 2008).

Por otro lado, la búsqueda y evaluación de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos adaptados a las condiciones locales es una de las actividades a considerar dentro del desarrollo de un micoinsecticida (Ruiz- Sánchez *et al.*, 2013). Los aislamientos fúngicos obtenidos en campo a partir de insectos infectados con hongos posiblemente presentan un sin número de genotipos, los cuales pueden variar en virulencia, esta versatilidad puede ser regulada a través de la obtención de cultivos monoclonia formados a partir de una spora, lo cual disminuye la variabilidad genotípica y mantiene las características requeridas para la selección y/o mejoramiento de los hongos (Ayala-Zermeño *et al.*, 2005; Toriello *et al.*, 2008).

El género *Metarhizium* (Metschn.) Sorokin fue originalmente descrito basado en su estado anamorfo. Liang *et al.* (1991), fueron los primeros en confirmar la relación entre ambas formas sexuales. Esta relación a nivel de género entre anamorfo y teleomorfo fue respaldada por estudios filogenéticos realizados por Liu *et al.* (2002). Kepler *et al.* (2014), realizaron estudios moleculares para establecer la relación de este género con otras especies. En las últimas décadas se ha dado importancia a la aplicación de técnicas moleculares para la detección e identificación de hongos. Bischoff *et al.* (2009) evaluaron la filogenia del complejo *M. anisopliae* e identificaron nueve especies mediante la morfología y secuencias de los genes EF-1, RPB1, RPB2.

### **Hipótesis.**

Los aislamientos CEP-722 y CEP-723 son especies del género *Metarhizium* y pueden ser identificadas morfológica y molecularmente.

Los aislamientos CEP-753 y CEP-754 son especies del género *Trichoderma* y pueden ser identificadas morfológica y molecularmente.

### **Objetivos.**

Identificar morfológica y molecularmente a nivel de especie los aislamientos seleccionados CEP-722, CEP-723, CEP-753 y CEP-754.

### **Materiales y Métodos.**

#### **Identificación morfológica de los aislamientos CEP-722, CEP-723, CEP-753 y CEP-754.**

Los aislamientos fúngicos fueron identificados a nivel de género con observaciones microscópicas y bajo las claves taxonómicas descritas por Humber y Lacey (2012) para los aislamientos del género *Metarhizium*, y bajo las claves taxonómicas descritas por Bissett (1984) para los aislamientos del género *Trichoderma*. Las estructuras microscópicas se obtuvieron del material montado en lactofenol/azul de algodón (0,01 % p/v) y se observaron bajo microscopio óptico de campo claro (OLYMPUS BX51, Japón). Las características observadas fueron la forma y tamaño de los conidios, células conidiógenas y micelio. Estas características fueron fotografiadas con una cámara digital (Sony DSCP73, Japón). Las mediciones se basaron en 25 observaciones por cada microestructura y se usaron para calcular el promedio del tamaño de las estructuras, todo en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ).

#### **Identificación molecular de los aislamientos CEP-722, CEP-723, CEP-753 y CEP-754.**

Para el análisis e identificación molecular de los aislamientos fúngicos a nivel de especie se realizó una producción de micelio en 3 placas de Petri de 90 mm de diámetro con APG (Merck, Alemania) como medio de cultivo para los aislamientos del género *Trichoderma* y SDYA (Merck, Alemania) para

los aislamientos del género *Metarhizium*. Se incubaron a  $23 \pm 1^\circ \text{C}$  por un periodo de 7 y 14 días respectivamente. Una vez obtenida una cantidad de micelio suficiente, se procedió a la remoción de este desde las placas de Petri hacia tubos de microcentrifuga tipo Eppendorf de 1,5 ml con la ayuda de un bisturí cuidando de no remover medio de cultivo y bajo estrictas condiciones de asepsia en cámara de flujo laminar. Fue congelado 1 g de micelio de cada aislamiento a secuenciar en recipiente con nitrógeno líquido durante 8 minutos y se procedió a la extracción de ADN siguiendo la metodología dispuesta por el fabricante (Qiagen, Alemania). Posteriormente, se realizó una cuantificación de la concentración del ADN extraído, por medio de un espectrofotómetro de microvolúmenes (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y el ADN se almacenó en un congelador a  $-20^\circ \text{C}$  hasta su posterior análisis.

Los ensayos PCR fueron dirigidos contra 2 regiones nucleares diferentes:

1) La región del ADN ribosómico comprendiendo el extremo 3' del gen 18S (small subunit ribosomal, SSU). La secuencia espaciadora interna ITS1 (internal transcribed spacer 1), el gen 5.8S, la secuencia espaciadora interna ITS2 (internal transcribed spacer 2) y el extremo 5' del gen 28S (long subunit ribosomal), mediante los cebadores/primers universales ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.*, 1990);

2) La región 5' del gen del Factor de Elongación 1-Alpha (TEF1 $\alpha$ ) con los cebadores/primers EF1983F (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3') y el EF'' 2218R (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3') (Rehner y Buckley, 2005; O'Donnell *et al.*, 2015).

El ADN previamente extraído, debió ser diluido en una proporción de 1:10 (5  $\mu\text{l}$  de ADN en 45  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas). Las 2 reacciones de amplificación se llevaron a cabo en volumen final de 50  $\mu\text{l}$ , conteniendo 25  $\mu\text{l}$  de Mastermix Promega 2x (GoTaq, Estados Unidos), 17  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas, 2  $\mu\text{l}$  de PRIMER-F, 2  $\mu\text{l}$  de PRIMER-R y 4  $\mu\text{l}$  de ADN por cada aislamiento a secuenciar (CEP-722, CEP-723, CEP-753, CEP-754). El par de primers a utilizar se ajustó de acuerdo con la región a amplificar. El éxito de las reacciones se controló por medio de electroforesis en geles de agarosa (Productos Biológicos UNQ, Argentina) al 1 % en Buffer TBE 0,5x (Roti-Gelstain, Alemania) aplicándose un voltaje de 90 V durante 50 min. Se sembraron 5  $\mu\text{l}$  de cada reacción junto con 1  $\mu\text{l}$  de Buffer de carga (Productos Biológicos UNQ, Argentina). Y se agregó un marcador de peso molecular (Ladder 100 pb, PB-L) que sirvió como patrón de comparación para determinar el tamaño de los productos de PCR obtenidos. En el caso de la región ribosómica, se esperaba obtener un tamaño cercano a los 530 pb, mientras que para el gen Tef1 $\alpha$ , el tamaño esperado era de 620 pb. Las reacciones positivas fueron conservadas a  $-20^\circ \text{C}$  y hasta su envío a la empresa Macrogen (Corea del Sur), donde fueron purificadas y secuenciadas en ambos sentidos (forward y reverse) con los mismos primers de amplificación.

#### **Análisis filogenético de los aislamientos secuenciados.**

Para la limpieza de las secuenciaciones obtenidas se utilizó el software de acceso libre Chromas (<https://chromas.software.informer.com/2.5/>), en el cual se eliminaron las zonas de baja calidad.

Luego las secuencias limpias de cada muestra se alinearon por medio del software en línea Clustal-Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Se verificó la concordancia entre los pares de base replicados por los cebadores de inicio y retroceso de los 4 aislamientos analizados por medio del software de acceso libre Genedoc (<https://genedoc.software.informer.com/2.7/>). Las secuenciaciones de ADN fueron sometidas al software de herramienta para la búsqueda de alineamiento local básico (BLAST) para identificar las secuencias depositadas en Genbank que tuvieran similitudes significativas (Altschul *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000).

Las secuencias fueron alineadas con 16 homólogos y 1 contraste de las cepas de referencia del género *Metarhizium* que contaban con la secuenciación de las zonas ITS y Tef1 $\alpha$  obtenidos de la base de datos de Gutierrez *et al.* (2019) y con las secuencias de 15 especies homólogas y 1 contraste con el software de datos “Trichokey” (<https://www.trichokey.com/>) (Cai y Druzhinina, 2021) para el género *Trichoderma*. Los datos se presentan en las tablas 10 y 11.

Para la construcción del árbol filogenético se empleó el software Mr. Bayes (versión 3.2.7), en donde se eligió GTR (nst= 6 + Gamma + Invariant Sites) como modelo evolutivo. La inferencia evolutiva se realizó mediante 2 corridas de MCMC en paralelo. La mayoría de los parámetros de corridas se mantuvieron en sus valores de default, salvo por el número de generaciones que se estableció en 1 millón, y el muestreo cada 200 generaciones. Se corroboró que el desvío estándar promedio de las frecuencias de las biparticiones (average standard deviation of split frequencies) estuviera por debajo de 0.01. Al mismo tiempo, Mr. Bayes calculó la distribución de probabilidades posteriores de cada parámetro evolutivo y de la topología del árbol; aunque al momento de analizarlos, se eliminó el 10% del inicio (burn-in) de ambas corridas. El programa Tracer (versión 1.7.2) se usó para corroborar que todos estos parámetros hayan alcanzado la fase estacionaria, y que en la misma el tamaño muestral efectivo (ESS) sea mayor a 200, indicando un muestreo adecuado dado a una baja autocorrelación de los datos. El árbol final obtenido se visualizó con FigTree (versión 1.4.4), en donde la robustez de cada clado se evaluó teniendo en cuenta una probabilidad posterior (PP)  $\geq$  0.95.

### Programación del termociclador para los productos de PCR obtenidos.

Los procesos del termociclador para cada aislamiento y región amplificada se observan en las tablas 8 y 9.

ITS1-ITS4 ITS5 32 ciclos	CEP-722	CEP-723	CEP-753	CEP-754
Desnaturalización inicial	95°C – 5 min.			
Desnaturalización	94°C – 1,30 min.			
Alineamiento	60°C – 1 min.	56°C – 1 min.	58°C – 1 min.	60°C – 1 min.
Elongación	72°C – 50 seg.	72°C – 1,30 min.	72°C – 1,3 min.	72°C – 50 seg.
Elongación final	72°C – 5 min.			
Hold	10°C	10°C	10°C	10°C

Tabla 8. Procesos de termociclados para la región ITS 1 y 2.

TEF $\alpha$ 983F_2218R 32 ciclos	CEP-722	CEP-723	CEP-753	CEP-754
Desnaturalización inicial	94°C – 2 min.			
Desnaturalización	94°C – 30 seg.			
Alineamiento	53°C – 40 seg.	54°C – 40 seg.	54°C – 40 seg.	54°C – 40 seg.
Elongación	72°C – 30 seg.			
Desnaturalización 35 ciclos	94°C – 30 seg.			
Elongación final	72°C – 10 min			
Hold	8 °C.	8 °C.	8 °C.	8 °C.

Tabla 9. Procesos de termociclados para la región TEF1 $\alpha$ .

\*El ADN del aislamiento CEP-753 se diluyó en razón de 1:100 y se modificó la solución final a secuenciar, agregando 1,5 $\mu$ l de ADN en vez de 4 $\mu$ l.

\*El ADN del aislamiento CEP-722 se diluyó en razón de 1:100 y se modificó la solución final a secuenciar, agregando 1,5 $\mu$ l de ADN en vez de 4 $\mu$ l.

Especie	Cepa	Sustrato Hospedero	Localización	ITS1	TEF1 $\alpha$
<i>Metarhizium</i> sp.	NHJ11597	-	-	HQ165703/AY646375	HQ165683
<i>Metarhizium</i> sp.	NHJ11618	-	-	HQ165704/AY646376	HQ165684
<i>Metarhizium</i> sp.	MY00896	-	-	HQ165697	HQ165678
<i>Metarhizium argentinense</i>	CEP414/ARSEF13509	Blattodea	Argentina	MF784813	MF966620
<i>Metarhizium argentinense</i>	CEP424/ARSEF13510	Blattodea	Argentina	MF784814	MF966624
<i>Metarhizium blattodeae</i>	IP414	Blattodea	Brasil	KU182915	KU182917
<i>Metarhizium flavoviride</i>	ARSEF2025	Suelo	Alemania	AF138269	KJ398804
<i>Metarhizium frigidum</i>	ARSEF 4124	Coleoptera	Australia	HM055448	DQ464002
<i>Metarhizium minus</i>	ARSEF 1764	Hemiptera	I. Solomon	HM055453	KJ398800
<i>Metarhizium album</i>	ARSEF 1942	Hemiptera	Filipinas	HM055452	KJ398802
<i>Metarhizium taii</i>	ARSEF 5714	Lepidoptera	China	JN049829	AF543775
<i>Metarhizium owariense</i>	NBRC33258	-	-	JN049883	JF416017
<i>Metarhizium kusanagiense</i>	TNS-F18494	-	-	JN049873	JF416014
<i>Metarhizium martiale</i>	HMAS 197472	-	-	JN049881	JF416015
<i>Metarhizium pseudoatrovirens</i>	TNS-F 16380	-	-	JN049870	KJ398785
<i>Metarhizium koreanum/anisopliae</i>	ARSEF 2038	Hemiptera	Corea	HM055431	KJ398805
<i>Beauveria bassiana</i>	ARSEF 751	Coleoptera	Vietnam	AY532045	AY531954

Tabla 10. Base de datos de secuencias de genes ITS1 y TEF1 $\alpha$  para el género *Metarhizium*. Se presenta la especie, el código de cepa, el sustrato hospedero, la localización y los códigos de referencia para las regiones ITS1 y TEF1a.

Especie	Cepa (ITS1/TEF1)	ITS1	TEF1a
<i>Trichoderma afroharzianum</i>	GJS 04-186/TRS835	FJ442265	KP008787.1
<i>Trichoderma arundinaceum</i>	GJS 05-180/MSX70741	EU330928.1	KY630170.1
<i>Trichoderma asperellum</i>	CBS 433.97/TRS705	AY380912	KP009011.1
<i>Trichoderma atroviride</i>	DAOM 165779/CBS 693.94	Z48817	KJ786838.1
<i>Trichoderma bissetii</i>	UTHSC 08-2443/SZMC 1158	KJ174235.1	MH249948.1
<i>Trichoderma dorotheopsis</i>	HZA8/HZA5	MH624143	MK850827.1
<i>Trichoderma gamsii</i>	GJS 04-09/TW20050	DQ315459	KU523895.1
<i>Trichoderma harzianum</i>	CBS 226.95/T18	AY605713	KX632606.1
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	GJS 93-20/18ASMA001	NR_131281	MT671922.1
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	CBS 816.68/S328	NR120298	JQ685867.1
<i>Trichoderma ochroleucum</i>	CBS 119502/GJS 01-265	NR134401	DQ835494.1
<i>Trichoderma pollinicola</i>	LC11682/LC11686	MF939592	MF939620.1
<i>Trichoderma reesei</i>	ATCC 26921/QM6a	KU729028	XM006963994.1
<i>Trichoderma virens</i>	CBS 249.59/Tvien3	MH857855	MT081441.1
<i>Trichoderma viride</i>	CBS 119327/GJS 89-127	DQ677657	AF534585.1
<i>Hypomyces aurantius</i>	GJS 74-69/TFC 95-171	FJ442642.1	FN868743.1

Tabla 11. Base de datos de secuencias de genes ITS1 y TEF1 $\alpha$  para el género *Trichoderma*. Se presenta la especie, el código de cepa y los códigos de referencia para las regiones ITS1 y TEF1a.

## Resultados.

### Características microscópicas de los aislamientos CEP-722, CEP-723, CEP-753 y CEP-754.

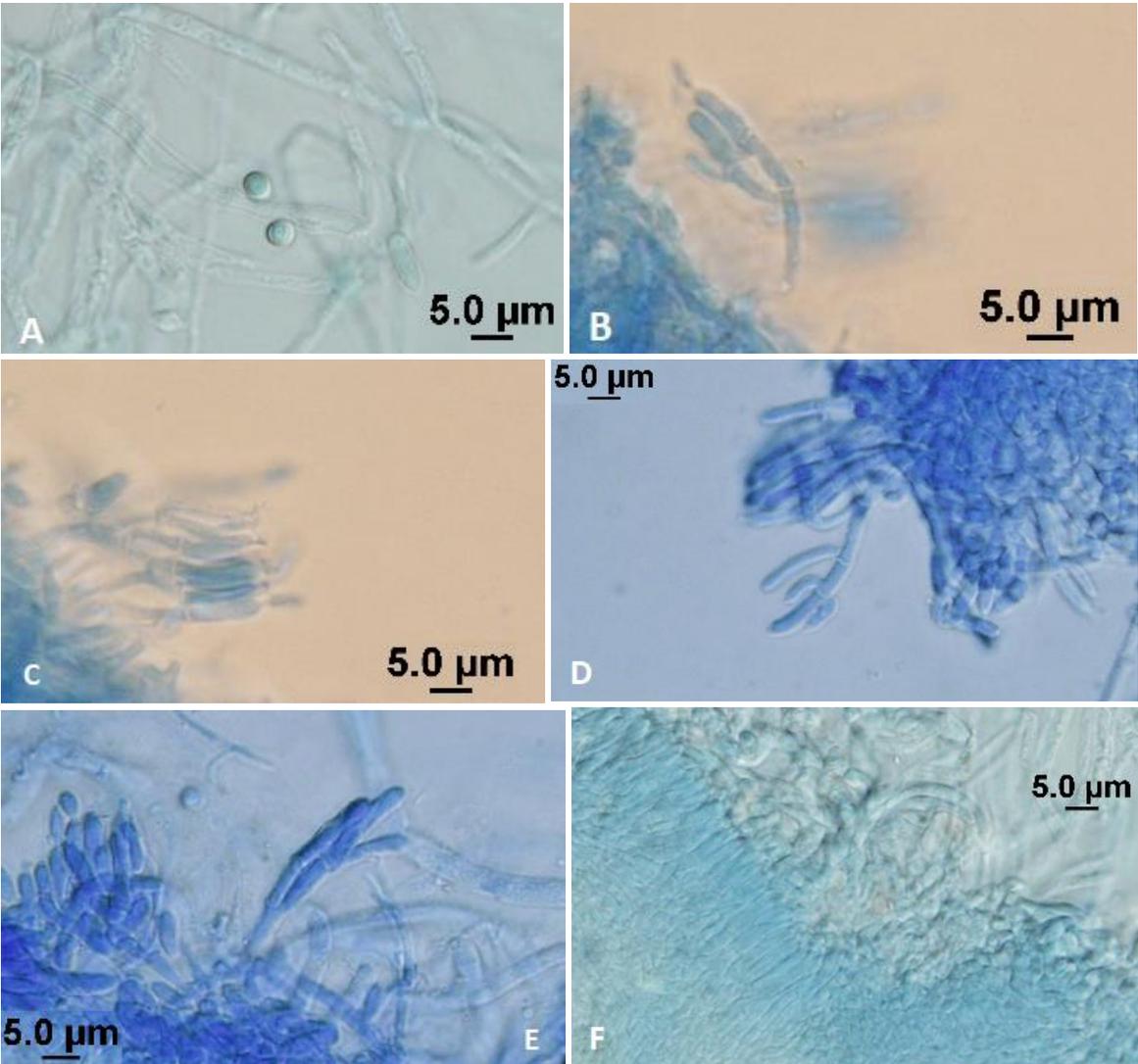
Características microscópicas de CEP-722 y CEP-723: La conidiogénesis ocurre en una himenio densa; los conidióforos se ramifican repetidamente en ángulos amplios y se asemejan a candelabros; las células conidiógenas clavadas o cilíndricas, con un ápice redondeado a cónico, sin cuello evidente; la pared apical se engrosa progresivamente a medida que se producen los conidios; los conidios son producidos en cadenas largas; las cadenas se adhieren lateralmente para formar columnas prismáticas (empalizada). CEP-722 fue el único aislamiento en que se observó la presencia de clamidosporas. Características microscópicas de CEP-753 y CEP-754: Los conidióforos son hialinos, de paredes lisas, de hasta 5  $\mu$ m de ancho cerca de la base, estrechándose gradualmente hasta unos 2  $\mu$ m de ancho cerca del ápice, con septos conspicuos y relativamente distantes; ramas laterales nacidas en ángulo recto, solas o en verticilos de 2 o 3, aumentando gradualmente en longitud. Las fiálides se presentan en verticilos de 2-5, o solitarias y alternas, o más irregularmente

dispuestas particularmente hacia el ápice del conidióforo; las fiálides terminales son más alargadas y generalmente no constreñidas en la base, de color verde diluido, de paredes lisas, cilíndricos cortos y casi oblongo, con el ápice obtusamente redondeado. El promedio de las mediciones de cada una de las microestructuras se presenta en la tabla 12.

Aislamiento CEP-722	Conidio Largo/Ancho (µm)	Fiálide Largo/Ancho (µm)	Clamidospora Diámetro (µm)
Promedio	6,45/2,83	9,12/2,66	3
Aislamiento CEP-723	Conidio Largo/Ancho (µm)	Fiálide Largo/Ancho (µm)	Clamidospora Diámetro (µm)
Promedio	6,99/3,07	8,76/2,20	-
Aislamiento CEP-753	Conidio Largo/Ancho (µm)	Fiálide Largo/Ancho (µm)	Clamidospora Diámetro (µm)
Promedio	3,16/2,58	10,24/2,88	-
Aislamiento CEP-754	Conidio Largo/Ancho (µm)	Fiálide Largo/Ancho (µm)	Clamidospora Diámetro (µm)
Promedio	3,22/2,52	11,04/2,78	-

Tabla 12. Valor promedio de las mediciones de estructuras reproductivas de los aislamientos CEP-722, CEP-723, CEP-753 y CEP-754. (n=25).

Imágenes de las estructuras reproductivas de los aislamientos CEP-722, CEP-723, CEP-753 y CEP-754 se presentan en la figura 41.



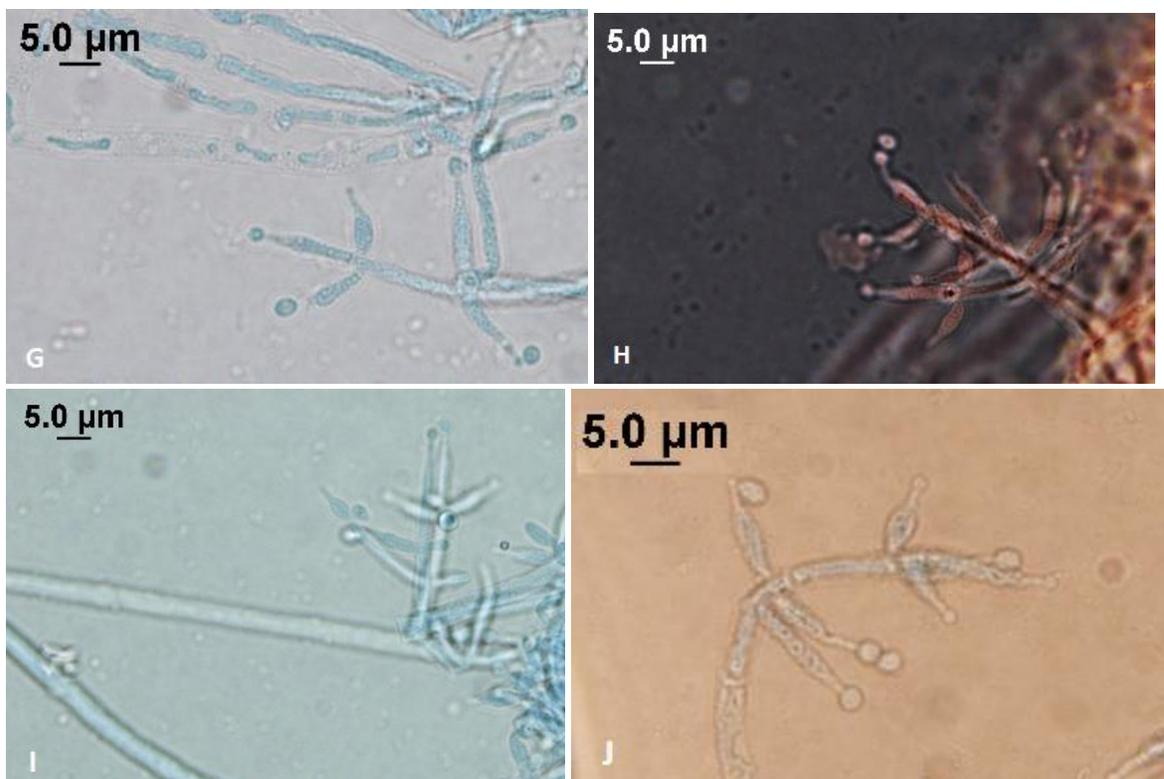


Figura 41. Imágenes de referencia de la identificación morfológica de los aislamientos CEP-722, CEP-723, CEP-753 y CEP-754. A) Clamidopsporas del aislamiento CEP-722, B y C) Conidióforos individuales, fiálides y conidios del aislamiento CEP-722, D y E) Conidióforos individuales, fiálides y conidios del aislamiento CEP-723, F) Conidióforos en empalizada del aislamiento CEP-722, G y H) Conidióforos, fiálides y conidios del aislamiento CEP-753, I y J) Conidióforos, fiálides y conidios del aislamiento CEP-754.

#### Identificación molecular de los aislamientos CEP-722, CEP-723, CEP-753 y CEP-754.

Los aislamientos CEP-722 y CEP-723 presentaron un porcentaje de 100 % de homología con secuencias correspondientes a regiones ITS y Tef1 $\alpha$  de otras especies de hongos entomopatógenos. Por lo tanto, en el análisis resultó que los aislamientos CEP-722 y CEP-723 corresponden al género *Metarhizium* y presentan 0 % de variabilidad genética con la especie *Metarhizium taii*. La clasificación final para los aislamientos CEP-722 y CEP-723 con códigos de referencia en GENBANK OP792040 y OP792039 respectivamente, es de la siguiente forma: Fungi; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreales; Clavicipitaceae; *Metarhizium* (Sorokin, 1883): *Metarhizium taii* (figura 42).

Los aislamientos CEP-753 y CEP-754, presentaron un porcentaje de 100% de homología con secuencias correspondientes a regiones ITS y Tef1 $\alpha$  de especies de hongos del género *Trichoderma* previamente identificadas. Por lo tanto, el análisis filogenético da como resultado que los aislamientos CEP-753 y CEP-754 corresponden al género *Trichoderma* y presentan 0 % variabilidad genética con la especie *Trichoderma afroharzianum*. La clasificación final para los aislamientos CEP-

753 y CEP-754 con códigos de referencia en GENBANK OP792041 y OP792042 respectivamente, es de la siguiente forma: Fungi; Ascomycota; Euascomycetes; Hypocreales; Hypocreaceae; *Trichoderma* e *Hypocrea* (Rifai, 1969): *Trichoderma afroharzianum* (figura 43).

#### Árboles filogenéticos de los aislamientos CEP-722, CEP-723, CEP-753 y CEP-754.

Por medio del software MrBayes (versión 3.2.7), se realizaron “corridas” analíticas de las secuencias de los microorganismos seleccionados y las bases de datos fueron confeccionadas en relación con la bibliografía científica publicada. Se presentan en las figuras 42 y 43, los árboles filogenéticos obtenidos del software MrBayes (versión 3.2.7) y editados con el programa FigTree (versión 1.4.4), para los aislamientos del género *Metarhizium* CEP-722 y CEP-723 y para los aislamientos del género *Trichoderma* CEP-753 y CEP-754 respectivamente.

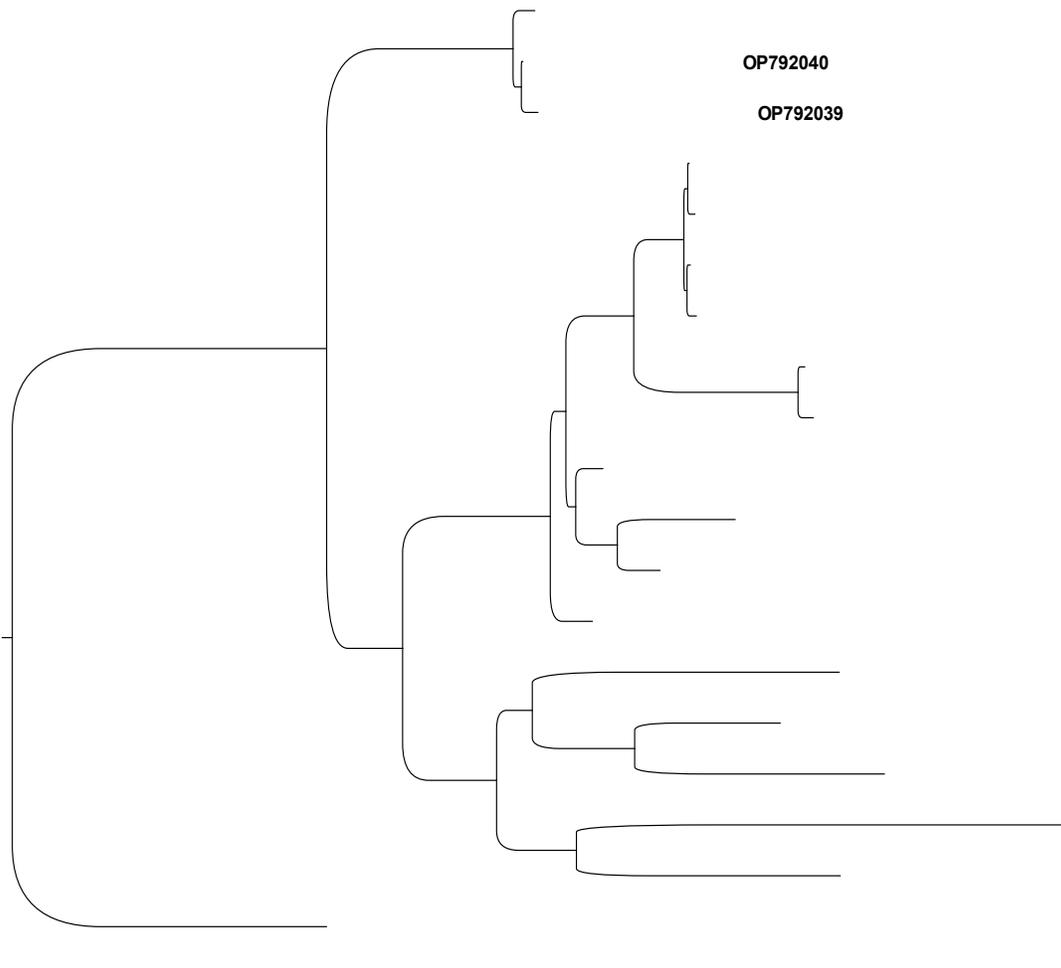


Figura 42. Árbol filogenético de las regiones ITS1 y TEF1 $\alpha$  de los aislamientos CEP-722 y CEP-723. Los valores entre las diagonales representan el valor de probabilidad de máxima verosimilitud.

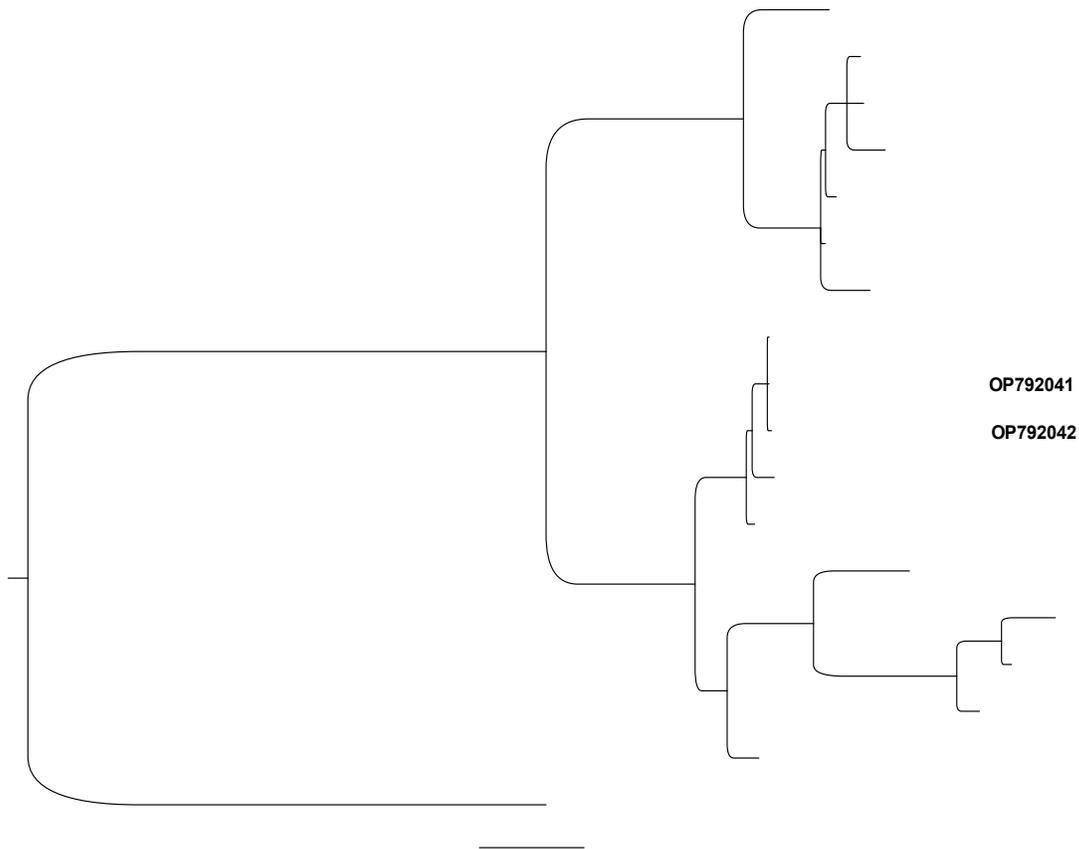


Figura 43. Árbol filogenético de las regiones ITS1 y TEF1 $\alpha$  de los aislamientos CEP-753 y CEP-754. Los valores entre las diagonales representan el valor de probabilidad de máxima verosimilitud.

### Discusión.

En la provincia de Buenos Aires, más específicamente en el cinturón hortícola bonaerense, es posible encontrar microorganismos fúngicos promisorios como agentes de biocontrol para ser utilizados en un manejo fitosanitario agrícola. La necesidad de disminuir los problemas asociados a las contaminaciones producidas por la utilización de agroquímicos en el manejo de plagas agrícolas impulsa en parte la investigación de herramientas biológicas que pudiesen suplir a los agroquímicos en el manejo fitosanitario. La obtención de aislamientos de estos microorganismos dentro del mismo predio productivo puede señalar una gran ventaja para los agricultores, ya que, al estar naturalizados, podría inferirse que dichos microorganismos son elementos constantes del agroecosistema local, por lo que en algunos casos se podría aumentar la presencia de éstos, a través de prácticas culturales como el aumento de materia orgánica en el suelo por medio de la incorporación de restos vegetales al mismo. Esto podría implicar una disminución drástica en el uso

de agroquímicos, tanto para el control de plagas, como también para el aumento del rendimiento por medio del uso de fertilizantes.

La identificación morfológica de especies fúngicas está cada vez más relegada a un rol descriptivo que a un rol taxonómico debido al polimorfismo de muchas especies de microorganismos fúngicos que cuentan con estados teleomorfos y anamorfos. El género *Metarhizium* es un taxón genéticamente diverso, y el color de la colonia, la dimensión y las mediciones de los conidios de diferentes especies no son factores de identificación fiables (Bridge *et al.*, 1993; Lomer *et al.*, 2001). Por otro lado, la identificación molecular permite determinar de forma más precisa el género y la especie, dilucidando qué microorganismos son los que están presentes en los suelos agrícolas argentinos. En este estudio se determinó que en fincas agroecológicas de la provincia de Buenos Aires existen cepas de la especie *Metarhizium taii* y *Trichoderma afroharzianum* y las cuales presentan aptitudes promisorias como agentes de control biológico de *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*. No existen reportes previos de la presencia de *Metarhizium taii* en fincas agroecológicas de la provincia de Buenos Aires, por lo que este trabajo supone un avance en el entendimiento de esta especie. Estudios recientes han reportado la presencia de *Trichoderma afroharzianum* en Argentina (Barrera *et al.*, 2021), mientras otros estudios en la Argentina se han enfocado en la capacidad antagonista de esta especie frente al hongo patógeno *Rhizoctonia solani* (Melignani *et al.*, 2023).

La información presentada en este trabajo constituye una herramienta útil para la confección de estrategias locales de manejo de plagas agrícolas que mitiguen tanto las pérdidas económicas de los productores generada por el ataque de plagas, como también los daños ambientales derivados del uso de agroquímicos. Esta tecnología sugiere un desafío en la estandarización de los métodos y materiales a utilizar, puesto que a nivel mundial no hay un método único con el que realizar identificación molecular y con ello poder desarrollar sistemas unificados de información al respecto. Este trabajo fue basado en el análisis de las regiones genéticas ITS y TEF1 $\alpha$  ya que en este sentido Cai y Druzhinina (2020) establecen que como consecuencia de la vasta literatura citada referente a la taxonomía de *Trichoderma*, solo los *loci*; ITS, rpb2 y TEF1 $\alpha$  pueden usarse para análisis molecular e identificación de la diversidad contemporánea de *Trichoderma*.

## **Conclusión.**

Los aislamientos CEP-722 y CEP-723 seleccionados como antagonistas de *Botrytis cinerea* y de *Sclerotinia sclerotiorum* y como promotores del crecimiento de plantas de tomate (*S. lycopersicum*) pertenecen a la especie *Metarhizium taii*.

Los aislamientos CEP-753 y CEP-754 seleccionados como antagonistas de *Botrytis cinerea* y de *Sclerotinia sclerotiorum* y como promotores del crecimiento de plantas de tomate (*S. lycopersicum*) pertenecen a la especie *Trichoderma afroharzianum*.

## Bibliografía.

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.
- Amira, M. B., Lopez, D., Mohamed, A. T., Khouaja, A., Chaar, H., Fumanal, B., ... y Venisse, J. S. 2017. Beneficial effect of *Trichoderma harzianum* strain Ths97 in biocontrolling *Fusarium solani* causal agent of root rot disease in olive trees. *Biological Control*, 110, 70-78.
- Ayala-Zermeño, M. A., Mier, T., Robles, J. S. y Toriello, C. 2005. Variabilidad intraespecífica del crecimiento de *Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*) por efecto de la temperatura. *Scientia Fungorum*, (20), 93-97.
- Barrera, V. A., Iannone, L., Romero, A. I. y Chaverri, P. 2021. Expanding the *Trichoderma harzianum* species complex: Three new species from Argentine natural and cultivated ecosystems. *Mycologia*, 113(6), 1136-1155.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A. y Humber, R. A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4), 512-530.
- Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Canadian journal of botany*, 62(5), 924-931.
- Bouregghda, H., Bouznad, Z. y Decock, C. 2008. Cultural and molecular characterizations of some isolates of *Trichoderma* spp. *Arab Journal of Plant Protection*, 26, 75-80.
- Bridge, P. D., Williams, M. A. J., Prior, C. y Paterson, R. R. M. 1993. Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Microbiology*, 139(6), 1163-1169.
- Cai, F. y Druzhinina, I. S. 2021. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. *Fungal Diversity*, 107, 1-69.
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T. y Samuels, G. J. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107(3), 558-590.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Del-Val, E. K. y Larsen, J. 2016. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS microbiology ecology*, 92(4).
- del Carmen H. Rodríguez, M., Evans, H. C., de Abreu, L. M., de Macedo, D. M., Ndacnou, M. K., Bekele, K. B. y Barreto, R. W. 2021. New species and records of *Trichoderma* isolated as

mycoparasites and endophytes from cultivated and wild coffee in Africa. *Scientific reports*, 11(1), 5671.

- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G. y Kubicek, C. P. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47(2), 55-64.

- Gazis, R., Rehner, S. y Chaverri, P. 2011. Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. *Molecular Ecology*, 20(14), 3001-3013.

- Gutierrez, A. C., Leclerque, A., Manfrino, R. G., Luz, C., Ferrari, W. A., Barneche, J., ... & Lastra, C. C. L. (2019). Natural occurrence in Argentina of a new fungal pathogen of cockroaches, *Metarhizium argentinense* sp. nov. *Fungal biology*, 123(5), 364-372.

- Hagn, A., Wallisch, S., Radl, V., Munch, J. C. y Schloter, M. 2007. A new cultivation independent approach to detect and monitor common *Trichoderma* species in soils. *Journal of Microbiological Methods*, 69(1), 86-92.

- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. y Monte, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158(1), 17-25.

- Humber, R. A. y Lacey, L. A. 2012. Manual of techniques in invertebrate pathology. by LA Lacey, *Academic Press, London*, (1), 151-187.

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

- Kepler, R. M., Humber, R. A., Bischoff, J. F. y Rehner, S. A. 2014. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*, 106(4), 811-829.

- Kim, T. G. y Knudsen, G. R. 2008. Quantitative real-time PCR effectively detects and quantifies colonization of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma* spp. *Applied Soil Ecology*, 40(1), 100-108.

- Köhl, J., Kolnaar, R. y Ravensberg, W. J. 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in plant science*, 845.

- Liang, Z. Q.; Liu, A. Y. y Liu, J. L. 1991. A new species of the genus *Cordyceps* and its *Metarhizium* anamorph. *Acta Mycologica*, 10(4), 257-262.

- Liu, Z. Y., Liang, Z. Q., Liu, A. Y., Yao, Y. J., Hyde, K. D. y Yu, Z. N. 2002. Molecular evidence for teleomorph-anamorph connections in *Cordyceps* based on ITS-5.8S rDNA sequences. *Mycological Research*, 106(9), 1100-1108.

- Lomer, C. J., Bateman, R. P., Johnson, D. L., Langewald, J. y Thomas, M. 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual review of entomology*, 46(1), 667-702.
- López-Mondéjar, R., Antón, A., Raidl, S., Ros, M. y Pascual, J. A. 2010. Quantification of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* with real-time TaqMan PCR and its potential extrapolation to the hyphal biomass. *Bioresource technology*, 101(8), 2888-2891.
- Martínez, B., Infante, D. y Peteira, B. 2015. Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Revista de Protección Vegetal*.
- Maymon, M., Minz, D., Barbul, O., Zveibil, A., Elad, Y. y Freeman, S. 2004. Identification of *Trichoderma* biocontrol isolates to clades according to ap-PCR and ITS sequence analyses. *Phytoparasitica*, 32, 370-375.
- Malignani, E., Martin, M. E., Mema, V. Y., Taibo, C. B., García, J. V. S. Y. y Barrera, V. A. 2023. Mycoparasitic interaction between *Trichoderma afroharzianum* strain Th2RI99 and *Rhizoctonia solani*. *Revista Argentina de microbiología*, S0325-7541.
- Montoya, Q. V., Meirelles, L. A., Chaverri, P. y Rodrigues, A. 2016. Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109, 633-651.
- O'Donnell, K., Ward, T. J., Robert, V. A., Crous, P. W., Geiser, D. M. y Kang, S. 2015. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions. *Phytoparasitica*, 43, 583-595.
- Pascale, A., Vinale, F., Manganiello, G., Nigro, M., Lanzuise, S., Ruocco, M., ... y Lorito, M. 2017. *Trichoderma* and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. *Crop protection*, 92, 176-181.
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J. y Oberlies, N. H. 2017. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal of natural products*, 80(3), 756-770.
- Rehner, S. A. y Buckley, E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97(1), 84-98.
- Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, 116, 1-56.
- Rubio, M. B., Hermosa, M. R., Keck, E. y Monte, E. 2005. Specific PCR assays for the detection and quantification of DNA from the biocontrol strain *Trichoderma harzianum* 2413 in soil. *Microbial ecology*, 49, 25-33.
- Ruiz-Sánchez, E., Chan-Cupul, W., Cristóbal-Alejo, J., Tun-Suárez, J. M., Pérez-Gutiérrez, A. y Lara-Reyna, J. 2013. Virulencia de aislados monospóricos de *Isaria fumosorosea* sobre inmaduros de *Bemisia tabaci*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(3), 381-392.

- Samuels, G. J. 2006. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 96(2), 195-206.
- Samuels, G. J., & Hebbbar, P. K. (2015). *Trichoderma: identification and agricultural applications*. APS Press.
- Savazzini, F., Longa, C. M. O., Pertot, I. y Gessler, C. 2008. Real-time PCR for detection and quantification of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* strain SC1 in soil. *Journal of microbiological methods*, 73(2), 185-194.
- Siddiquee, S., Abdullah, F., Tan, S. G. y Emila, R. A. 2007. Phylogenetic relationships of *Trichoderma harzianum* based on the sequence analysis of the internal transcribed spacer region-1 of the rDNA. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(9), 896-903.
- Toriello, C., Montoya-Sansón, E., Zavala-Ramírez, M., Navarro-Barranco, H., Basilio-Hernández, D., Hernández-Velázquez, V. y Mier, T. 2008. Virulence and thermotolerance of monospore cultures of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* isolated from spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae). *Revista Mexicana de Micología*, 28, 57-66.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T. y Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Zhang, F., Ge, H., Zhang, F., Guo, N., Wang, Y., Chen, L., ... y Li, C. 2016. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*, 100, 64-74.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. y Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational biology*, 7(1-2), 203-214.

## Capítulo 8. Estudios de patogenicidad en *Bemisia tabaci* con los aislamientos *Metarhizium taii* CEP-722 y *Trichoderma afroharzianum* CEP-753.

### Resumen.

En este capítulo se presenta el desarrollo y los resultados de los ensayos realizados para evaluar la patogenicidad que presentaron los aislamientos *Metarhizium taii* CEP-722 y *Trichoderma afroharzianum* CEP-754 sobre estados inmaduros de *Bemisia tabaci*. Los ensayos fueron conducidos en cámaras de bioetario (bajo condiciones controladas), replicando las condiciones óptimas de crecimiento de *B. tabaci*, posterior a la prospección, recolección, identificación y cría masiva de adultos en jaulas entomológicas. *M. taii* CEP-722 generó una mortalidad en estados inmaduros de *B. tabaci* cercana al 30%, mientras que *T. afroharzianum* CEP-754 no generó mortalidad en *B. tabaci* bajo la metodología implementada.

### Introducción.

Se estima que la familia Aleyrodidae cuenta con más de 1200 especies descritas; las mosquitas blancas (Hemiptera: Aleyrodidae) son pequeños insectos fitófagos de plantas herbáceas, arbustos, árboles, plantas silvestres y cultivos de importancia económica; en ocasiones se convierten en un serio problema, debido en primera instancia a daños directos provocados al succionar la savia y por la transmisión de virus. Dos especies de importancia económica presentan una alta similitud, no obstante que se encuentran en géneros diferentes, éstas son *Bemisia tabaci* (Gennadius) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Carapia-Ruiz y Castillo-Gutiérrez, 2013).

La enfermedad virósica del tabaco TLCV (Tobacco Leaf Curl Virus) es transmitida por *Bemisia tabaci* y no *T. vaporariorum*. Estas especies tienen diferencias de fácil visualización, como es el caso de los cepillos de las tibia media y posterior, las sensilas primarias y cono sensorial en el sexto segmento de las antenas (Hill, 1969).

Algunos científicos sugieren que *B. tabaci* puede ser originaria de África tropical, desde donde se dispersó a Europa y Asia, y fue posteriormente introducida al Neotrópico, principalmente por transporte de material de plantas (Brown y Bird 1992; Campbell *et al.* 1996). Sin embargo, otros trabajos sugieren que esta especie puede ser nativa de India o Pakistán, donde se ha encontrado la mayor diversidad de especies de sus enemigos naturales (Brown *et al.* 1995).

A continuación, se presenta la biología y ciclo de vida y diferencias morfológicas de *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*, reportadas por Carapia-Ruiz y Castillo-Gutiérrez, 2013.

Las hembras adultas depositan huevos en la planta hospedera. Los huevos eclosionan en 6-7 días y las ninfas de primer instar se arrastran (ninfa móvil) en las hojas y se alimentan. Las ninfas mudan después de 2-3 días y pasan por 2 mudas más. Las “ninfas de ojos rojos” o el estadio de pupa es parte del cuarto instar que dura 5-6 días. Los adultos alados emergen de la abertura en forma de “T” en el exoesqueleto del cuarto instar.

Huevo: *Trialeurodes vaporariorum*: Dimensiones: 200-250  $\mu\text{m}$  de longitud y 100  $\mu\text{m}$  de ancho. Generalmente son puestos en círculos o semicírculos sobre la superficie de la hoja; sin embargo, cuando la infestación es alta esto es muy difícil de apreciar; de color blanco amarillento cuando son puestos, tornándose castaño oscuro a casi negro cuando están próximos a eclosionar; el corion del cual emergió la ninfa se aplana lateralmente y se dobla con el ápice dirigido hacia abajo.

*Bemisia tabaci*: Dimensiones: 190-200  $\mu\text{m}$  de longitud y de 100-129  $\mu\text{m}$  de ancho. Ovipositados individualmente o en grupos sobre la superficie de la hoja, raramente son puestos en círculo; de color blanco amarillento, tornándose marrón dorado en su etapa final. Al emerger la ninfa el corión del huevo permanece erecto (ver figura 44).



Figura 44. Huevos de *Bemisia tabaci*. Fuente: autor de tesis.

Primer estadio ninfal: *Trialeurodes vaporariorum*. Dimensiones: 240-270  $\mu\text{m}$  de largo y 150  $\mu\text{m}$  de ancho. Estado de desarrollo activo en locomoción y se desplaza en busca de un lugar adecuado para alimentación por lo que sus patas y antenas son relativamente grandes; presenta 17 pares de sedas marginales muy aparentes; sedas marginal anterior, marginal posterior, cefálica, primera abdominal octava abdominal y caudal presentes; tubérculos cefálicos bien desarrollados, semirectangulares abiertos hacia la parte media; orificio vasiforme cuadrangular posteriormente.

*Bemisia tabaci*. Dimensiones: 250-300  $\mu\text{m}$  de largo y 155  $\mu\text{m}$  de ancho. Como en *Trialeurodes vaporariorum*, es un estado de desarrollo activo en locomoción y se desplaza en busca de un lugar adecuado para alimentación por lo que sus patas y antenas son relativamente grandes; presenta 16 pares de sedas marginales aparentes; sedas marginales anterior, marginal posterior, cefálica, primera abdominal, octava abdominal y caudal presentes; tubérculos cefálicos poco desarrollados, semielípticos hacia la parte lateral; orificio vasiforme curvo posteriormente (ver figura 45).



Figura 45. Colonia y ninfa de *Bemisia tabaci* en primer instar. Fuente: autor de tesis.

Ninfas de segundo estadio: *Trialeurodes vaporariorum*: Dimensiones: 420  $\mu\text{m}$  de largo y 330  $\mu\text{m}$  de ancho. Cuerpo redondeado, no agudo posteriormente; sedas marginales anterior, marginal posterior, cefálica, primera abdominal, octava abdominal y caudal presentes; seda dorsal del segmento cefálico bien desarrollada; pliegues torácicos traqueales no indicados ventralmente; orificio vasiforme semicordiforme; llingula con dos lóbulos laterales.

*Bemisia tabaci*: Dimensiones: 380  $\mu\text{m}$  de largo por 240  $\mu\text{m}$  de ancho. Cuerpo ovoide, agudo posteriormente; sedas marginales anterior, marginal posterior, cefálica, primera abdominal, octava abdominal y caudal presentes; pliegues torácico traqueales indicados ventralmente por una cutícula punteada; orificio vasiforme triangular, abierto posteriormente; llingula ensanchada y puntiaguda distalmente pero no lobulada (ver figura 46).

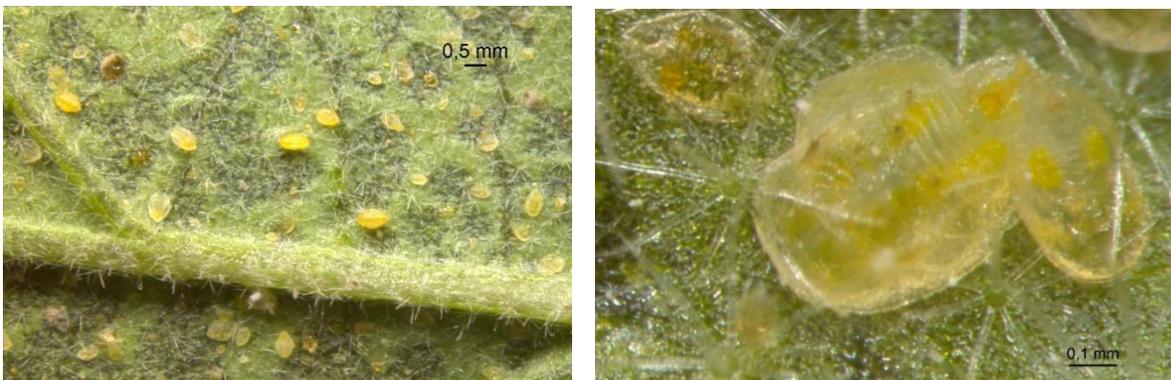


Figura 46. Colonia y ninfa de *Bemisia tabaci* en segundo estadio. Fuente: autor de tesis.

Ninfas de tercer estadio: *Trialeurodes vaporariorum*: Dimensiones: 560-600  $\mu\text{m}$  de largo y 400  $\mu\text{m}$  de ancho. Margen del cuerpo uniformemente granulado; pliegue torácico traqueal no indicado ventralmente; sedas marginales anterior, marginal posterior, cefálica, primera abdominal, octava abdominal y caudal presentes. Orificio vasiforme semicordiforme con una muesca en la parte media posterior a la llingula; llingula lobulada lateralmente, con dos pares de lóbulos.

*Bemisia tabaci*: Dimensiones: 500-540  $\mu\text{m}$  de largo y 360  $\mu\text{m}$  de ancho. Margen irregularmente granulado; pliegue torácico traqueal indicado por una cutícula punteada ventralmente; sedas marginales anterior, marginal posterior, cefálica, primera abdominal, octava abdominal y caudal

presentes; orificio vasiforme triangular; l ngula ensanchada y puntiaguda distalmente pero no lobulada (ver figura 47).



Figura 47. Ninfa de *Bemisia tabaci* en tercer estadio. Fuente: autor de tesis.

Ninfas de cuarto estadio (pupario): *Trialeurodes vaporariorum*: Dimensiones: 780-800  $\mu\text{m}$  de largo y 510  $\mu\text{m}$  de ancho. Ultimo estado ninfal con la superficie dorsal elevada por la palizada de la superficie ventral, la cual está sobre la superficie de la hoja; superficie dorsal con cubierta y varillas de cera blanquecina, área submarginal con filamentos cortos de cera; superficie ventral y lateral con cubierta de cera. Los especímenes son de forma elíptica, redondeados posteriormente; papilas dorsales y submarginales presentes; margen uniformemente granulado; área porosa traqueal torácica y caudal se diferencian distintivamente en el margen; antenas situadas lateralmente de las patas protor cicas; sedas marginal anterior, marginal posterior, cefálica, primera abdominal, octava abdominal y caudal presentes; pliegue torácico traqueal no indicado ventralmente; orificio vasiforme semicordiforme; l ngula lobulada.

*Bemisia tabaci*. Dimensiones: 750-850  $\mu\text{m}$  de largo y 620  $\mu\text{m}$  de ancho. Ultimo estado ninfal sin palizada de cera y también las varillas de cera están ausentes, son de color amarillento. Especímenes montados de forma semioval, agudos posteriormente; series de papilas submarginales ausentes; puede presentar sedas dorsales largas y bien desarrolladas especialmente en especímenes que se desarrollaron en hojas con pubescencia como es reportado previamente por Russell (1947, 1948). Margen irregularmente granulado; poros traqueales no diferenciados en el margen; pliegues torácicos traqueales distintivamente en la superficie ventral por una cutícula punteada; antenas situadas al lado de las patas protor cicas. Sedas marginal anterior, marginal posterior, cefálica, primera abdominal, octava abdominal y caudal, presentes; orificio vasiforme triangular; l ngula ensanchada y puntiaguda distalmente (ver figura 48).



Figura 48. Último estado ninfal de *Bemisia tabaci*. Fuente: autor de tesis.

Adulto: *Trialeurodes vaporariorum*. Dimensiones: 0.75 a 1.10 mm de largo. Los adultos vivos tienen el cuerpo de un color amarillo pálido, con dos pares de alas blancas immaculadas. Los ojos compuestos están divididos y no hay algún omatidio que forme un puente entre los dos grupos de facetas. Las antenas con una sensila primaria en los segmentos 3, 5 y 7. Un cono sensorial, está presente en los segmentos 3, 6 y 7, es similar a las de *B. tabaci* pero en esta última especie hay una sensila primaria en el segmento cuatro. Las antenas de *T. vaporariorum*, son ligeramente y en forma consistente más grandes que las de *B. tabaci*; también las antenas de la hembra y macho en ambas especies son muy similares en tamaño, sólo que en algunos especímenes las de las hembras son ligeramente más largas. Alas anteriores con el margen anterior curvado y redondeado distalmente; el margen de las alas anteriores “perillada”. Las espinas gruesas en la tibia meso y metatorácica son distintivamente arregladas en dos cepillos, uno opuesto al otro en las tibias medias y uno opuesto al peine en la tibia posterior. Las placas cerosas están presentes en la superficie ventral abdominal, dos para hembras y cuatro para los machos, la superficie de estas estructuras es semirreticulada. La placa supra genital está bien desarrollada y claramente definida en la hembra; en el macho está modificada en un cuello en forma de tubo que es fuertemente esclerosada y oscuramente pigmentada. El abdomen del macho presenta cinco bandas de poros de 2-4  $\mu\text{m}$  de diámetro, en la superficie dorsal. El orificio vasiforme está situado en la placa supragenital y es similar en tamaño y forma en ambas especies. El edeago del macho de *T. vaporariorum* es ligeramente más largo que en *B. tabaci* y más ancho sobre todo en la mitad basal; el borde ventral es casi recto.

*Bemisia tabaci*. Tamaño de 0.70 a 0.95 mm de largo. Los adultos vivos tienen el cuerpo de color amarillo oscuro, con dos pares de alas blancas immaculadas. Ojos compuestos divididos y cada ojo consiste en dos grupos de omatidias con un omatidio que forma un puente entre los dos grupos. Para el ojo compuesto. La parte superior está formada por 45 omatidias y la porción inferior por 31 omatidias, arregladas en forma hexagonal, en grupos interconectados de 6 omatidias alrededor de una omatidia relativamente un poco menor y generalmente de color más claro. Las antenas constan de siete segmentos con una sensila primaria en los segmentos 3, 5 y 7. Cono sensorial, está presente en el segmento 3, 6 y 7 (Lima *et al.*, 2001). Las alas son membranosas y desnudas, presentando textura semejante, margen anterior de las alas anteriores recto, redondeado distalmente, con venación notablemente reducida, mantenidas ligeramente separadas, formando una especie de techo a dos aguas muy inclinadas sobre el abdomen, dejando parte del abdomen visible. El margen

de las alas anteriores y posteriores es “perillada” con setas diminutas originándose de cada estructura. Las tibias de las patas mesotorácicas presentan espinas fuertes que se disponen en forma aleatoria. Patas metatorácicas con un único grupo lineal de setas; las cuales son normalmente más pequeñas, menos gruesas y esclerotizadas y más juntas que otras setas sobre el mismo segmento de la pata. Lima *et al.* (2001) reportan una imagen de un peine de setas con 17 unidades, las cuales pueden variar ligeramente en número. En la superficie ventral del abdomen de las hembras están presentes dos pares de placas cerosas en los segmentos tres y cuatro, en el caso de los machos se presentan cuatro pares en los segmentos tres a seis. La superficie de las placas cerosas del abdomen es semirreticulada con figuras similares a rombos ocupando cada uno aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de la superficie; la placa supra genital es débilmente desarrollada en la hembra y en el macho esta modificada en un cuello en forma de tubo que es proyectado del ápice del abdomen y lleva los genitales del macho distalmente. El edeago del macho en *B. tabaci* es ligeramente más corto que en *T. vaporariorum* y más delgado y un poco sinuoso (Carapia-Ruiz y Castillo-Gutiérrez, 2013) (ver figura 49).

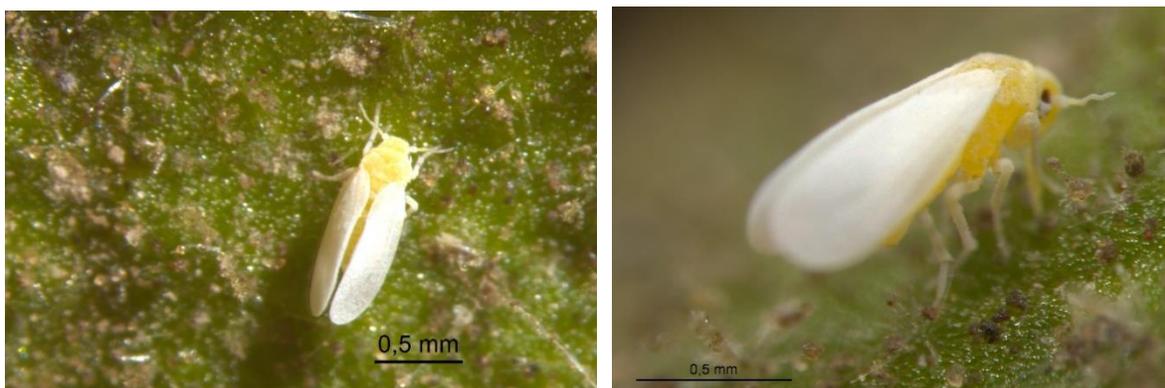


Figura 49. Adultos de *Bemisia tabaci*. Fuente: autor de tesis.

### Importancia económica de la mosca blanca.

La “mosca blanca de los invernaderos”, (*Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci*) es considerada una de las principales plagas asociadas a cultivos hortícolas en ambientes protegidos, siendo el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) uno de los cultivos más afectados (Mound y Halsey, 1978; Evans, 2007; Rehman *et al.*, 2020). Su importancia económica está relacionada con una amplia distribución geográfica, el gran número de especies cultivadas afectadas, el rango amplio de hospederos, su potencial de daño, bien como plaga (caso de *T. vaporariorum*), o como vector de virus y causante de alteraciones fisiológicas (caso de *B. tabaci*), o por los daños indirectos que suelen ocasionar al favorecer el desarrollo de fumagina causada por el hongo *Capnodium* spp. (Byrne, 1990; Osborne y Landa, 1992; Faria y Wraight, 2001; Varma y Malathi, 2003; Mugiira *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2010).

*Bemisia tabaci* es un insecto polífago que se alimenta de alrededor de 300 especies de plantas dentro de 63 familias (Mound y Halsey, 1978), y es vector de 111 virus de plantas (Jones, 2003). *B. tabaci* transmite virus pertenecientes a por lo menos cuatro géneros. De éstos, los begomovirus (Begomovirus: Geminiviridae) se constituyen en el grupo más importante de patógenos que están

causando pérdidas significativas en cultivos alimenticios e industriales en agroecosistemas tropicales y subtropicales a nivel mundial (Polston y Anderson 1999; Morales y Anderson 2001; Oliveira *et al.*, 2001). América Latina ha sido la región más afectada en términos de número total de begomovirus transmitidos por la mosca blanca, número de cultivos afectados, pérdidas en rendimiento y el área agrícola devastada por estos patógenos. Millones de hectáreas de tierra apta para la agricultura en 20 países sufren el ataque de más de treinta begomovirus (Morales y Anderson 2001).

Otras razones que hacen que estas dos especies de moscas blancas sean catalogadas como las más importantes, son su capacidad de desarrollar resistencia, en un tiempo relativamente corto a los insecticidas usados para su control y la aparición del biotipo B de *B. tabaci*, registrado por algunos taxónomos como una nueva especie a la que denominaron *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring, (1993) la cual ha demostrado tener un mayor potencial biótico que tiende a desplazar el biotipo A de las áreas en donde antes se había señalado como especie predominante (Bellows *et al.*, 1994).

El daño económico causado por *B. tabaci* varía de leve a severo, con pérdidas anuales globales que alcanzan miles de millones de dólares estadounidenses en muchos cultivos (Mascarín *et al.*, 2013; Hasan *et al.*, 2019).

Morfológicamente no se pueden distinguir los biotipos de *B. tabaci* sin embargo, el biotipo B presenta características que lo distinguen del biotipo A como son el mayor espectro de hospedantes, las mayores densidades de población, la mayor capacidad para adquirir resistencia a insecticidas y la inducción de desórdenes fisiológicos como la maduración desigual de frutos tomate y plateado de las hojas en cucurbitáceas (Perring, 2001).

### **Enemigos naturales de la mosca blanca.**

El control de *B. tabaci* y *T. vaporariorum* es principalmente realizado por medio del uso de insecticidas convencionales. El control químico ha favorecido el desarrollo de poblaciones resistentes de dichos insectos, y el impacto negativo al medio ambiente que genera el uso de este tipo de tecnología, ha impulsado el desarrollo de estrategias de manejo alternativas, donde el control microbiológico podría jugar un rol importante (Faria y Wraight, 2001; Mantzoukas y Eliopoulos, 2020; Huang *et al.*, 2010; Cuthbertson *et al.*, 2011).

Los enemigos naturales parasitoides asociados a esta plaga pertenecen básicamente a los géneros *Encarsia* y *Eretmocerus* (Hymenoptera: Aphelinidae). En particular *Encarsia formosa* Gahan, (1924), es una especie mundialmente comercializada para el control de *B. tabaci* y *T. vaporariorum* en cultivos hortícolas bajo invernáculo (Hoddle *et al.*, 1998; Cuellar y Morales, 2006). *E. formosa* mata al 75% de su huésped de mosca blanca sondeando a las ninfas con su ovipositor y depositando huevos en sus cuerpos. Las larvas de *E. formosa* luego se alimentan del contenido interno de la mosca blanca parasitada, se comen todos los órganos y dejan solo la armadura exterior en la que pupan después (Kos *et al.*, 2009) (ver figura 50).

Todas las especies conocidas del género *Eretmocerus* Haldeman, (1908) son parasitoides primarios solitarios de las ninfas de moscas blancas (Hemiptera: Aleyrodidae). La mayoría son arrenotocos aunque se han registrado algunas especies telitocas. Las hembras colocan sus huevos debajo de la ninfa, la larva de primer estadio es la que penetra en el huésped y los dos siguientes estadios larvales se desarrollan endoparasíticamente. El parasitoide completa el desarrollo pupal en el interior de la ninfa momificada, y el adulto emerge a través de un orificio circular hecho en el dorso del huésped. Además de parasitoides, los adultos también son predadores ya que se alimentan directamente de los fluidos internos de las ninfas (*host-feeding*) (Gerling, 1990). Existen 57 especies descritas de *Eretmocerus* en todo el mundo (Rose y Zolnerowich, 2003). Para la Argentina, se han citado tres especies: *Eretmocerus paulistus* Hempel, (1904), *Eretmocerus corni* Haldeman, (1850) (De Santis, 1967; Viscarret *et al.*, 2000) y *Eretmocerus mundus* Mercet, (1931) (Cáceres *et al.*, 2005).

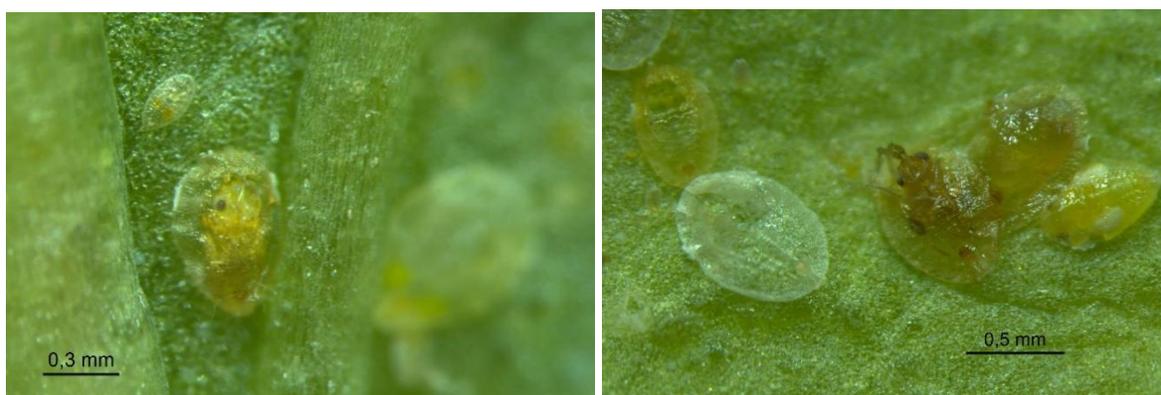


Figura 50. *Eretmocerus* sp. incubándose y emergiendo desde el cadáver de ninfa de *Bemisia tabaci*. Fuente: autor de tesis.

El hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* también es una alternativa eficaz para el control de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) (Islam *et al.*, 2014, 2016; Malsam *et al.*, 1998; Singh y Kaur, 2020; Oreste *et al.*, 2016; Norhelina *et al.*, 2013; Flores *et al.*, 2012). Otros miembros del género también son frecuentemente citados en el control y manejo de plagas agrícolas, *M. brunneum* (Petch), *M. robertsii* (J.F. Bischoff, Rehner y Humber), *M. rileyi* ((Farlow) Kepler, S.A. Rehner y Humber), *M. flavoviride* (W. Gams y Rozsypal 1973) (Tóthné-Bogdányi *et al.*, 2019).

*Paecilomyces fumosoroseus* Wize, (1904) y *Lecanicillium lecanii* han sido registrados como agentes de control biológico de mosquita blanca (Quesada-Moraga *et al.*, 2006; Faria y Wraight, 2001; Ravensberg *et al.*, 1990; Wright, 1992). Formulaciones basadas en el hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* son comercializadas desde la década del 90 para el manejo de mosquita blanca (Cuthbertson *et al.*, 2011; Faria y Wraight, 2001).

*Trichoderma* actúa directamente como entomopatógeno a través del parasitismo y la producción de metabolitos secundarios insecticidas, compuestos anti-alimentarios y metabolitos repelentes. Del mismo modo en que ha sido reportado para otros diferentes hongos entomopatógenos, *Trichoderma* es capaz de parasitar activamente los cuerpos de los insectos, usándolos como fuente de nutrientes para la formación de estructuras reproductivas (Sharma *et al.*, 2022). *Trichoderma* puede liberar una gran variedad de compuestos que inducen respuestas de resistencia sistémica en

plantas, y esto explica su falta de fitopatogenicidad (Leelavathi *et al.*, 2014). *Trichoderma longibrachiatum* ha sido reportado infectando *Leucinodes orbonalis* Guenee, (1854) (Gosh y Pal, 2016), *B. tabaci* y Chinche de las camas (*Cimex hemipterus* L., (1753)) (Anwar *et al.*, 2016). Diferentes especies de *Trichoderma* provocan porcentajes cercanos al 100% de mortalidad en coleópteros adultos de Escarabajo rinoceronte de la palma (*Oryctes rhinoceros* L., (1753)) (Nasution *et al.*, 2018). *Trichoderma* también puede producir 6-pentyl-apyrone, metabolito secundario capaz de causar 100% de mortalidad en araña roja (*Tetranychus urticae* C.L. Koch, (1836)) en 48 h (Sharma *et al.*, 2022). La especie más estudiada en este sentido es *Trichoderma harzianum*, por producir metabolitos como peptaiboles, capaces de causar tasas de mortalidad del 100% en 15 días en Gusano de la harina (*Tenebrio molitor*) (Shakeri y Foster, 2007)

En su interacción con la planta, *Trichoderma* principalmente se comporta como un endófito de la raíz, colonizando sólo las capas más externas de la raíz, debido a la respuesta de la planta ante la penetración de agentes exógenos mediada por ácido salicílico, que impide que el hongo llegue a los haces vasculares y se comporte como un patógeno sistémico (Alonso-Ramírez *et al.*, 2014). De esta manera, *Trichoderma* también es capaz de activar las defensas sistémicas de la planta contra el ataque de plagas (Poveda, 2020).

### **Hipótesis.**

Los aislamientos *Metarhizium taii* CEP-722 y *Trichoderma afroharzianum* CEP-754 tienen capacidad patogénica sobre ninfas de *Bemisia tabaci*.

### **Objetivos.**

Evaluar la capacidad patogénica de los aislamientos *Metarhizium taii* CEP-722 y *Trichoderma afroharzianum* CEP-754 sobre ninfas de *Bemisia tabaci*.

### **Materiales y Métodos.**

Se capturó una población uniforme de los estados: huevos, ninfas y adultos de la mosca blanca (*B. tabaci*) en cultivos de berenjena (*Solanum melongena* L.) en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, ubicado en Los Hornos, Provincia de Buenos Aires (-34.985191, -57.993469).

Se procedió a la cría masiva *B. tabaci*. Para ello, adultos de *B. tabaci* se introdujeron en jaulas entomológicas de dimensiones 40 x 70 x 30, con plantas de tomate (*S. lycopersicum*) en su interior con 10 hojas verdaderas y en pleno crecimiento vegetativo, luego de 72 horas las plantas fueron removidas y colocadas en jaulas entomológicas sin presencia de insectos. Se verificó la presencia de huevos en el haz y envés de las hojas. Dichas jaulas fueron mantenidas en un bioterio a una

temperatura promedio de 28° C, humedad relativa 85% y un fotoperiodo de 18:6 h, luz: oscuridad.

#### **Preparación de suspensión de esporas.**

En una incubadora a 25° C, se cultivaron en placas de Petri de 90 mm de diámetro con medio SDYA (MERCK, Alemania) los aislamientos *M. taii* CEP-722 y con medio APG (MERCK, Alemania) *T. afroharzianum* CEP-754. Posterior a 10 días de haber realizada la siembra y detectada la presencia de esporulación de los aislamientos, se procedió a la remoción de conidios por medio de una espátula metálica estéril, los cuales fueron suspendidos en 150 ml de agua destilada estéril, almacenada en un matraz de tipo Erlenmeyer de 250 ml de capacidad (HDA, Estados Unidos de América). Se agitó en vortex durante 30 minutos y fue medida y estandarizada una suspensión de  $1 \times 10^7$  conidios/ml para ambos géneros.

#### **Pruebas de patogenicidad de los aislamientos *Metarhizium taii* CEP-722 y *Trichoderma afroharzianum* CEP-754 en estadios inmóviles de *Bemisia tabaci*.**

Se introdujeron plantas de tomate en jaulas entomológicas junto con plantas infestadas de adultos de *B. tabaci*. Las plantas permanecieron por un periodo de 20 días y luego fueron llevadas a una cámara bioterio a una temperatura promedio de 28° C, humedad relativa 85% y un fotoperiodo de 18:6 h, luz: oscuridad. Las plantas de tomate con presencia de todos los estados inmaduros de *B. tabaci* fueron inoculadas con suspensiones de conidios de los hongos *M. taii* CEP-722 o *T. afroharzianum* CEP-754 ambas en una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml. Se aplicó agua destilada estéril para el tratamiento control. Fueron sometidas a ensayo 5 plantas por cada tratamiento. Los tratamientos fueron aplicados una vez, por medio de un pulverizador de polietileno (100 ml, genérico, China) hasta punto de goteo (0,5 ml por hoja aproximadamente). Las plantas inoculadas se mantuvieron en bioterios con las condiciones previamente descritas durante 14 días. Posterior a este periodo se recolectaron 7 hojas al azar por cada planta tratada (5 plantas por cada tratamiento), las hojas fueron puestas en cámaras húmedas dentro de placas de Petri de 90 mm de diámetro durante 24 horas y en una superficie de 10 x 10 mm del lóbulo central y del envés de las hojas, se determinó un porcentaje de mortalidad de ninfas de *B. tabaci* por cada tratamiento a través de un conteo simple de ninfas con indicio de muerte por infección fúngica y/o con esporulación visible.

Las plantas tratadas fueron dispuestas en 3 bioterios distintos. Este estudio se realizó por duplicado.

#### **Análisis estadísticos.**

Los datos de porcentaje de mortalidad fueron analizados mediante un modelo mixto generalizado (Zuur *et al.*, 2009) debido a que la respuesta no presentó distribución Normal. Se consideró al tratamiento como efecto fijo con tres niveles (T0, T1 y T2) y a la planta y la hoja como efectos aleatorios. Se utilizó la distribución Poisson para modelar la respuesta ya que se trata de conteos de individuos muertos por unidad de superficie. Las diferencias entre las medias de los tratamientos se

contrastaron a posteriori con la prueba LSD de Fisher. El nivel de significación fue de 5%. Se utilizó el paquete InfoStat (versión 4.2.1). (Di Rienzo *et al.*, 2020) para realizar los análisis estadísticos. Para mayor detalle consultar Anexo 3.

## Resultados.

En el tratamiento control no se observaron cadáveres de huevos ni de estados ninfales de *B. tabaci*. El comportamiento de las colonias no se vio afectado, inclusive se logró apreciar la disposición circular de huevos característica de la especie (ver figura 52). El desarrollo de ninfas no se vio afectado en las colonias del tratamiento con suspensión de conidios del aislado *T. afroharzianum* CEP-754 (ver figura 53). Por otro lado, en el tratamiento con suspensión de conidios del aislado *Metarhizium taii* CEP-722 se observaron muertes en todos los estados inmaduros de *B. tabaci*, exceptuando huevos. En dicho tratamiento se observó micelio en pleno crecimiento y esporulación con colores característicos del género *Metarhizium* (ver figura 54 y 55). Los porcentajes promedios obtenidos de las mediciones del ensayo de patogenicidad con suspensiones de conidios de *Metarhizium taii* CEP-722 y *Trichoderma afroharzianum* CEP-754 demuestran que la cepa *M. taii* CEP-722 tiene capacidad parasítica de estados ninfales de *B. tabaci*, el cual presentó un valor promedio cercano al 30 % (ver figura 51), en contraste con la cepa *T. afroharzianum* CEP-754 y el tratamiento control que no presentó actividad patogénica sobre estados inmaduros de *B. tabaci*.

Tras el análisis de datos de modelos lineales generalizados mixtos, utilizando la variable dependiente; muertes por infección fúngica se determinó que los datos tienen una distribución de Poisson, se realizó una prueba de hipótesis marginales (Wald) para los efectos fijos (tabla 13). La comparación entre medias ajustadas y errores estándares de los distintos tratamientos se presentan en la tabla 14. El aislado *M. taii* CEP-722 presenta diferencias significativas respecto de los otros dos tratamientos (*T. afroharzianum* y testigo).

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
tratamiento	2	102	78,02	<0,0001

Tabla 13. Prueba de hipótesis marginales (Wald) para los efectos fijos.

*Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0*

*LSD Fisher (Alfa=0,05)*

*Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
T1	3,38	0,06	29,31	1,89	A
T2	-2,87	0,71	0,06	0,04	B
T3	-2,87	0,71	0,06	0,04	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*

Tabla 14. Inversa de la función enlace para los distintos tratamientos.

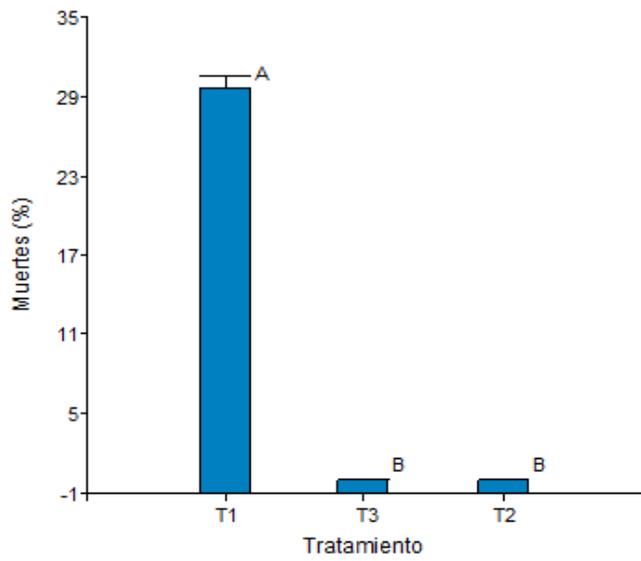


Figura 51. Gráfico del porcentaje promedio de ninfas de *B. tabaci* afectadas por infección fúngica y/o con esporulación visible.

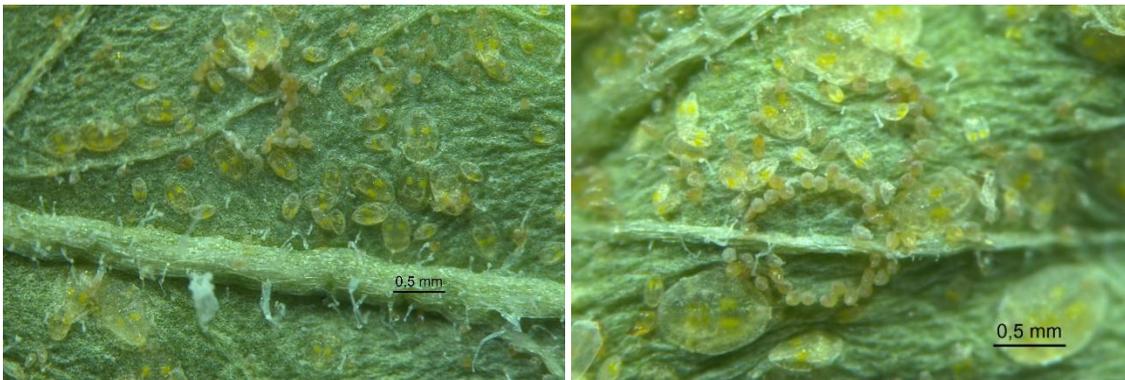


Figura 52. Ninfas de distintos estadios y huevos de *Bemisia tabaci* en disposición circular en el tratamiento control.

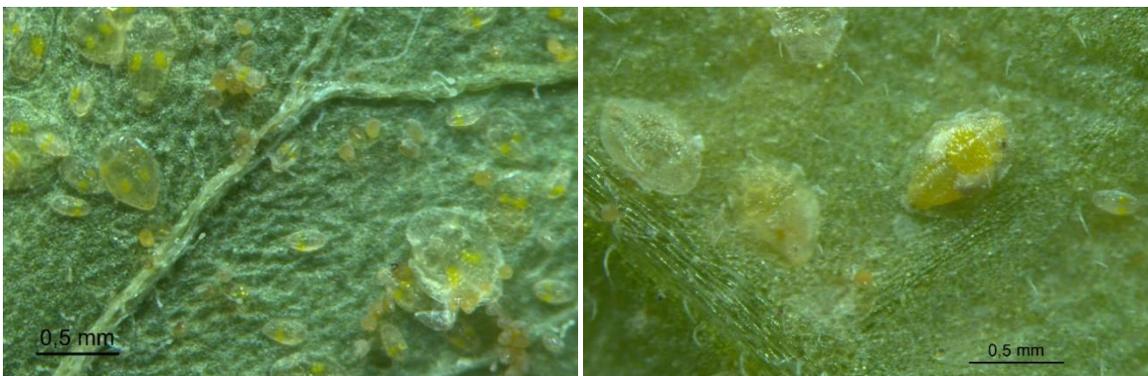


Figura 53. Huevos y ninfas de todos los estadios de *Bemisia tabaci* en el tratamiento con suspensión de conidios de la cepa *Trichoderma afroharzianum* CEP-754.

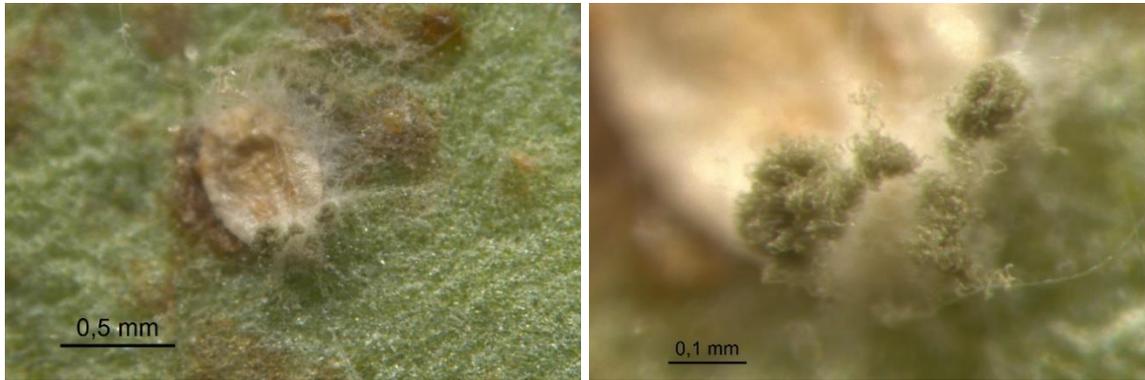


Figura 54. Cadáver de ninfa de *Bemisia tabaci* en segundo estadio con esporulación de *Metarhizium taii* CEP-722.



Figura 55. Colonia de *Bemisia tabaci* con infestación de *Metarhizium taii* CEP-722 y ninfas de *Bemisia tabaci* sanas e infectadas.

### Discusión.

Si bien aislamientos del género *Trichoderma* han presentado capacidad patogénica sobre insectos en estudios previos (Shakeriy Foster, 2007; Anwar *et al.*, 2016; Nasution *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2022), no todas las especies de este género tienen dicha capacidad. La cepa *T. afroharzianum* CEP-754 no presentó patogenicidad en estados inmaduros de *Bemisia tabaci*, pero sería interesante realizar otros estudios con esta cepa cambiando la metodología implementada y las especies de insecto blanco. En un estudio sobre aislamientos fúngicos promisorios como entomopatógenos Barasa *et al.* (2021) reportaron una mortandad de  $37.8 \pm 3.9\%$  de adultos de *Frankliniella occidentalis* y un  $33.3 \pm 3.1\%$  de ninfas de la misma especie, diez días posteriores a la aplicación de suspensiones de conidios de *T. afroharzianum*. En los sistemas agropecuarios convencionales, donde se aplican constantemente insecticidas de síntesis química, la implementación de insectos depredadores y/o parasitoides como agentes de control supone un desafío ya que la eficiencia de éstos puede verse afectada por la presencia de residuos de aplicaciones previas con insecticidas. Tóthné Bogdányi *et al.* (2019) proponen que el uso de hongos entomopatógenos puede ser favorable frente a este escenario, dado que, por su biología son más resistentes a la presencia de residuos insecticidas.

Como alternativa a los productos químicos, el uso de micoinsecticidas se considera un método ecológicamente amigable en el control de plagas de artrópodos. Cada vez más cepas y aislamientos de hongos están en camino de convertirse en productos comerciales disponibles para el mercado, su uso en el control sostenible de plagas está en expansión. Steenberg y Humber, ya en 1999 mencionan que más de 20 diferentes especies de hongos entomopatógenos han sido reportadas como patógenos de *B. tabaci*. En este sentido el aislado *M. taii* CEP-722, el cual presentó buenos resultados previos tanto en las pruebas *in vitro* de cultivo dual frente a los fitopatógenos *B. cinerea* y *S. sclerotiorum*, como también en las pruebas de promoción del crecimiento de plantas de tomate (*S. lycopersicum*), podría ser implementado dentro de un plan de manejo de *B. tabaci* en producciones convencionales de dicho cultivo, realizando estudios en laboratorio y a campo sobre formulados con este microorganismo. La capacidad patogénica sobre estados inmaduros de *B. tabaci* que presenta el aislado de *M. taii* CEP-722 probablemente está dada por las características como saprófitos facultativos que presentan algunas especies del género *Metarhizium*. Trabajos científicos previos aluden que dicha capacidad les permite atacar a los artrópodos y crecer como parásitos en sus cuerpos, y en ausencia de un huésped adecuado los miembros de este género, debido a su metabolismo lábil, pueden vivir libremente en la rizosfera, en plantas o sobrevivir en partículas no vivas dentro del suelo (Kepler *et al.*, 2014; Skinner *et al.*, 2014).

### **Conclusión.**

Tras los análisis estadísticos de los datos obtenidos en las pruebas de patogenicidad, se puede concluir que la cepa CEP-722 de la especie *Metarhizium taii* es patógeno de todos los estadios ninfales de *Bemisia tabaci*, mientras que la cepa CEP-754 de *Trichoderma afroharzianum* no lo es bajo las metodologías implementadas.

### **Bibliografía.**

- Ahmed, M. Z., Ren, S. X., Mandour, N. S., Maruthi, M. N., Naveed, M. y Qiu, B. L. 2010. Phylogenetic analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) populations from cotton plants in Pakistan, China, and Egypt. *Journal of Pest Science*, 83, 135-141.
- Alonso-Ramírez, A., Poveda, J., Martín, I., Hermosa, R., Monte, E. y Nicolás, C. 2014. Salicylic acid prevents *Trichoderma harzianum* from entering the vascular system of roots. *Molecular Plant Pathology*, 15(8), 823-831.
- Anwar, W., Subhani, M. N., Haider, M. S., Shahid, A. A., Mushatq, H., Rehman, M. Z., ... y Javed, S. 2016. First record of *Trichoderma longibrachiatum* as entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* in Pakistan. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 28(2), 287-294.
- Barasa, M. W., Kahuthia-Gathu, R., Mwangi, M. y Wanjohi, W. 2021. *In vitro* efficacy of native entomopathogenic fungi against western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) of tomato in Kenya. *International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research*, 5(2), 194-202.

- Bellows Jr, T. S., Perring, T. M., Gill, R. J. y Headrick, D. H. 1994. Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 87(2), 195-206.
- Brown, J. K. y Bird, J. 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Disease*, 76(3), 220-225.
- Brown, J. K., Frohlich, D. E. y Rosell, R. C. 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex?. *Annual review of entomology*, 40(1), 511-534.
- Byrne, D. 1990. Whiteflies in agricultural systems. In. *Whiteflies: their bionomics, pest status and management*, 227-261.
- Cáceres, S., Aguirre, M. R. A. y Miño, V. S. 2005. El parasitoide *Eretmocerus mundus* Mercet controla mosca blanca *Bemisia tabaci* biotipo B en pimiento de Corrientes. In *Congreso Latinoamericano de Horticultura. 12. Congreso Argentino de Horticultura. 28. 2005 09 7-8, 7-8 de setiembre de 2005. General Roca, Río Negro. AR.*
- Campbell, B. C., Steffen-Campbell, J. D. y Gill, R. J. 1996. Origin and radiation of whiteflies: an initial molecular phylogenetic assessment. *Bemisia: 1995, taxonomy, biology, damage, control and management*.
- Carapia-Ruiz, V. E. y Castillo- Gutiérrez, A. 2013. Estudio comparativo sobre la morfología de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Hemiptera: Aleyrodidae). *Acta zoológica mexicana*, 29(1), 178-193.
- Cuellar, M. E. y Morales, F. J. 2006. La mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) como plaga y vectora de virus en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Colombiana de Entomología*, 32(1), 1-9.
- Cuthbertson, A. G., Blackburn, L. F., Eyre, D. P., Cannon, R. J., Miller, J. y Northing, P. 2011. *Bemisia tabaci*: The current situation in the UK and the prospect of developing strategies for eradication using entomopathogens. *Insect Science*, 18(1), 1-10.
- De Santis, L. 1967. *Catálogo de los himenópteros argentinos de la serie Parasítica, incluyendo Bethyloidea*.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C. W. 2020. InfoStat Ver. 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Evans, G. A. 2007. The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of the world and their host plants and natural enemies. Disponible en: <http://www.sel.barc.usda.gov:591/1WF/World-Whitefly-Catalog.pdf>, Fecha de revisión: 10 abril 2007.
- Faria, M. y Wraight, S. P. 2001. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop protection*, 20(9), 767-778.

- Flores, M., Pucheta, D., Rodriguez, N., Torre, M. y Ramos, L. 2012. Mycoinsecticide effects of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Isaria fumosorosea* on the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in different strata of bean. *African Journal of Microbiology Research*, 6(45), 7246-7252.
- Gerling, D. 1990. Natural enemies of whiteflies: predators and parasitoids. *Whiteflies: their bionomics, pest status and management*, 147-185.
- Ghosh, S. K. y Pal, S. 2016. Entomopathogenic potential of *Trichoderma longibrachiatum* and its comparative evaluation with malathion against the insect pest *Leucinodes orbonalis*. *Environmental monitoring and assessment*, 188, 1-7.
- Hasan, I., Rasul, S., Malik, T. H., Qureshi, M. K., Aslam, K., Shabir, G. y Manzoor, H. 2019. Present status of cotton leaf curl virus disease (CLCUVD): A major threat to cotton production. *International Journal of Cotton Research and Technology*, 1(1), 1-13.
- Hill, B. G. 1969. A morphological comparison between two species of whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westw.) and *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae) which occur on tobacco in the Transvaal. *Phytophylactica*, 1(3\_4), 127-146.
- Hoddle, M. S., Van Driesche, R. G. y Sanderson, J. P. 1998. Biology and use of the whitefly parasitoid *Encarsia formosa*. *Annual review of entomology*, 43(1), 645-669.
- Huang, Z., Ali, S., Ren, S. X. y Wu, J. H. 2010. Effect of *Isaria fumosoroseus* on mortality and fecundity of *Bemisia tabaci* and *Plutella xylostella*. *Insect Science*, 17(2), 140-148.
- Islam, M. T., Omar, D. y Shabanimofrad, M. 2014. Molecular identification and virulence of six isolates of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to *Bemisia tabaci* Q biotype. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17(3), 237-241.
- Islam, M. T., Omar, D., Shah, A. A. y Hasan, M. F. 2016. Virulence of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* to Sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) under osmotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 86, 617-622.
- Jones, D. R. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *European journal of plant pathology*, 109, 195-219.
- Kepler, R. M., Humber, R. A., Bischoff, J. F. y Rehner, S. A. 2014. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*, 106(4), 811-829.
- Kos, K., Tomanovic, Z., Rojht, H., Vidrih, M. y Trdan, S. 2009. First massive occurrence of greenhouse whitefly parasitoid, *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera: Aphelinidae) on greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* [Westwood] (Homoptera: Aleyrodidae) in Slovenia. *Acta Agriculturae Slovenica*, 93(3), 285.

- Leelavathi, M. S., Vani, L. y Reena, P. 2014. Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 3(1), 96-103.
- Lima, A. C., Lara, F. M. y Santos, J. M. 2001. Morfologia da mosca branca, *Bemisia tabaci* biótipo "B"(Hemiptera: Aleyrodidae), encontrada em jaboticabal, SP, com base em eletron-micrografias de varredura. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 27(3), 315-322.
- Malsam, O., Kilian, M. y Dehne, H. W. 1998. *Metarhizium anisopliae*-biological control of the greenhouse white fly (*Trialeurodes vaporariorum*). *IOBC WPRS BULLETIN*, 21, 125-128.
- Mantzoukas, S. y Eliopoulos, P. A. 2020. Endophytic entomopathogenic fungi: A valuable biological control tool against plant pests. *Applied Sciences*, 10(1), 360.
- Mascarin, G. M., Kobori, N. N., Quintela, E. D. y Delalibera Jr, I. 2013. The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. *Biological control*, 66(3), 209-218.
- Mugiira, R. B., Liu, S. S. y Zhou, X. 2008. Tomato yellow leaf curl virus and Tomato leaf curl Taiwan virus Invade South-east Coast of China. *Journal of Phytopathology*, 156(4), 217-221.
- Morales, F. J. y Anderson, P. K. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of virology*, 146, 415-441.
- Mound, L. A. y Halsey, S. H. 1978. *Whitefly of the world. A systematic catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with host plant and natural enemy data*. John Wiley and Sons.
- Nasution, L., Corah, R., Nuraida, N. y Siregar, A. Z. 2018. Effectiveness *Trichoderma* and *Beauveria bassiana* on larvae of *Oryctes rhinoceros* on palm oil plant (*Elaeis Guineensis* Jacq.) *in vitro*. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 3(1), 239050.
- Norhelina, L., Sajap, A. S., Mansour, S. A. y Idris, A. B. 2013. Infectivity of five *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetales) strains on whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) infesting brinjal, *Solanum melongena* (Solanaceae). *J. Entomol*, 6, 127-132.
- Oliveira, M. R. V., Henneberry, T. E. Anderson, P. 2001. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop protection*, 20(9), 709-723.
- Oreste, M., Bubici, G., Poliseno, M. y Tarasco, E. 2016. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the *Trialeurodes vaporariorum*-*Encarsia formosa* system. *Journal of pest science*, 89, 153-160.
- Osborne, L. S. y Landa, Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida entomologist*, 456-471.
- Perring, T. M. 2001. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop protection*, 20(9), 725-737.

- Polston, J. y Anderson, P. 1999. Surgimiento y distribución de geminivirus transmitidos por mosca blanca en tomate en el Hemisferio Occidental. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*.
- Poveda, J. 2020. *Trichoderma parareesei* favors the tolerance of rapeseed (*Brassica napus* L.) to salinity and drought due to a chorismate mutase. *Agronomy*, 10(1), 118.
- Quesada-Moraga, E. E. A. A., Maranhao, E. A. A., Valverde-García, P. y Santiago-Álvarez, C. 2006. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. *Biological control*, 36(3), 274-287.
- Ravensberg, W. J., Malais, M. y Van der Schaaf, D. A. 1990. Applications of *Verticillium lecanii* in tomatoes and cucumbers to control whitefly and thrips. *Bulletin SROP (France)*.
- Rehman, H., Bukero, A., Ghani Lanjar, A. y Bashir, L. 2020. Investigation of Varietal Characteristics of Tomato Plants for Determining the Diverse Preferences of *Bemisia Tabaci* (Aleyrodidea: Hemiptera). *Gesunde Pflanzen*, 72(2).
- Rose, M. y Zolnerowich, G. 2003. *Eretmocerus picketti* new species (Hymenoptera: Chalcidoidea: Aphelinidae), reared from *Tetraleurodes acaciae* (Quaintance) (Homoptera: Aleyrodidae: Aleyrodinae). *Pan-Pacific Entomologist*, 79(2), 119-127.
- Russell, L. M. 1947. A classification of the whiteflies of the new tribe *Trialeurodini* (Homoptera: Aleyrodidae). *Revista de Entomologia, Rio de Janeiro*, 18, 1-44.
- Russell, L. M. 1948. *The North American species of whiteflies of the genus Trialeurodes* (No. 635). US Department of Agriculture.
- Singh, H. y Kaur, T. 2020. Pathogenicity of entomopathogenic fungi against the aphid and the whitefly species on crops grown under greenhouse conditions in India. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 1-9.
- Sharma, P., Choudhary, S. y Meena, B. S. 2022. Role of *Trichoderma* in Pest Management. *A Monthly Peer Reviewed Magazine for Agriculture and Allied Sciences*, 1.
- Shakeri, J. y Foster, H. A. 2007. Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 961-968.
- Skinner, M., Parker, B. L. y Kim, J. S. 2014. Role of entomopathogenic fungi in integrated pest management. *Integrated pest management*, 169-191.
- Steenberg, T. y Humber, R. A. 1999. Entomopathogenic Potential of *Verticillium* and *Acremonium* Species (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology*, 73(3), 309-314.

- Tóthné-Bogdányi, F., Petrikovszki, R., Balog, A., Putnoky-Csicsó, B., Gódor, A., Bálint, J. y Tóth, F. 2019. Current knowledge of the entomopathogenic fungal species *Metarhizium flavoviride* Sensu Lato and its potential in sustainable pest control. *Insects*, 10(11), 385.
- Varma, A. y Malathi, V. G. 2003. Emerging geminivirus problems: a serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology*, 142(2), 145-164.
- Viscarret, M. M., Botto, E. N. y Polaszek, A. N. D. R. E. W. 2000. Whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of economic importance and their natural enemies (Hymenoptera: Aphelinidae, Signiphoridae) in Argentina. *Revista Chilena de Entomología*, 26, 5-12.
- Wright, J. E. 1992. Whiteflies: Development of Naturalis, a biorational mycoinsecticide for control. In *Proceedings-Beltwide Cotton Production Research Conferences (USA)*.
- Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N. J., Saveliev, A. A. y Smith, G. M. 2009. *Mixed effects models and extensions in ecology with R* (Vol. 574, p. 574). New York: Springer.

## Conclusión final.

Este trabajo doctoral se centró en la búsqueda, análisis, selección e identificación de microorganismos nativos de Argentina promisorios como Agentes de Control Biológico (ACB), el cual se basa en el entendimiento de las dinámicas entre los organismos de los agroecosistemas. Como se expuso en este trabajo los ACB son organismos seleccionados bajo rigurosos métodos de estudio y están presentes en los agroecosistemas con mayor riqueza de biodiversidad. Es preciso recalcar la importancia de los sistemas productivos agroecológicos como reservorios y fuente de biodiversidad y los beneficios a la sociedad que generan los vínculos entre los/as agricultores/as y el ámbito científico-académico, ya que este trabajo solo pudo realizarse gracias a que agricultores/as dispusieron de su tiempo y conocimiento a favor del desarrollo de la ciencia en Argentina.

La selección de ACB mediante el análisis de su efecto como promotores del crecimiento de los cultivos, permite dilucidar las múltiples interacciones entre distintos organismos presentes en los agroecosistemas y lo beneficiosas que pueden ser para la agricultura algunas de estas interacciones. Sumado a ello, la selección de organismos nativos o naturalizados de una zona en particular es una buena estrategia para minimizar el impacto ambiental que genera el aumento poblacional de una especie, permitiendo a las producciones agropecuarias que pasan por un proceso de transición agroecológica, abordar posibles problemas fitosanitarios generando menos disturbios ambientales.

Posterior a la evaluación de los resultados obtenidos en el transcurso del trabajo, se puede determinar que en producciones agroecológicas de la Provincia de Buenos Aires existen cepas nativas o naturalizadas del género *Trichoderma* y de hongos entomopatógenos, las cuales tienen buenas características como agentes de control biológico.

Por medio de los estudios de patogenicidad realizados este trabajo con aislamientos del género *Trichoderma* sobre estadios ninfales de *Bemisia tabaci*, se determinó que *Trichoderma afroharzianum* CEP-754 no tiene capacidad parasítica sobre ninfas de *B. tabaci*.

Por otro lado, los estudios de patogenicidad realizados con aislamientos del género *Metarhizium* sobre estadios ninfales de *B. tabaci*, evidencian que *Metarhizium taii* CEP-722 tiene capacidad parasítica sobre ninfas de *B. tabaci*.

En estudios de cultivo dual sobre aislamientos de *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*, se determinó que todos los aislamientos de los géneros *Trichoderma* y *Metarhizium* obtenidos en este trabajo de muestras de suelo de campos agroecológicos presentan una capacidad antagonista sobre *B. cinerea* y *S. sclerotiorum*.

En este trabajo se concluyó que, los aislamientos seleccionados del género *Trichoderma* CEP-745; CEP-749; CEP-751; CEP-752; CEP-753 y CEP-754 y los aislamientos del género *Metarhizium* CEP-722, CEP-723, CEP-724, CEP-725 y CEP-726, generan una evidente promoción del crecimiento en plantas de tomate (*S. lycopersicum*) variedad platense.

Los resultados expuestos en los estudios previamente presentados permiten avanzar en el desarrollo de insumos biológicos para la agricultura y eventualmente pueden ser incorporados en

un diseño de manejo fitosanitario a pequeña, mediana y gran escala en distintas zonas, tras someterse al desarrollo de formulaciones y evaluaciones a campo. El autor de este trabajo espera que la metodología descrita a través de los distintos capítulos sea un aporte en la estandarización de procesos a seguir para la obtención de ACB.

### Anexo 1.

#### Tablas de los valores observados en los ensayos de cultivo dual de aislamientos del género *Trichoderma* frente a *B. cinerea* y *S. sclerotiorum*.

Crecimiento en placas de Petri de tratamientos testigos de *Botrytis cinerea*.

Testigo	valor							
B-1	2	16	28	37	47	70	80	
B-2	2	14	27	42	52	73	80	
B-3	2	15	27	37	48	71	80	
B-4	2	15	27	37	48	70	80	
B-5	2	15	29	40	51	72	80	
B-6	1	15	29	39	49	70	80	
B-7	2	14	28	43	57	74	80	
B-8	1	14	28	40	54	71	80	

Crecimiento en placas de Petri de tratamientos testigos de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Testigo	valor	valor	valor	valor	valor
S-1	2	18	50	74	80
S-2	1	20	43	62	80
S-3	1	25	47	72	80
S-4	2	18	48	74	80
S-5	1	25	42	60	80
S-6	3	24	53	78	80
S-7	3	24	54	80	80
S-8	2	21	43	71	80

Datos crudos de tratamientos testigos de aislamientos del género *Trichoderma* para el ensayo con *Sclerotinia sclerotiorum*.

Tratamientos	mm/día 1	mm/día 2	mm/día 3	mm/día 4	mm/día 5
1	5	26	45	67	80
1	5	26	45	63	80
1	5	26	46	64	80
1	5	25	45	64	80
1	4	25	44	64	80
1	4	25	43	64	80
1	5	29	48	67	80
1	5	26	45	65	80
2	4	15	35	54	80
2	5	18	39	58	80
2	5	18	39	57	80
2	3	15	33	50	80
2	5	18	31	54	80
2	5	18	32	54	80
2	5	18	32	54	80
2	5	18	39	54	80
3	4	15	32	47	68
3	4	13	32	45	71
3	4	15	30	43	69
3	4	15	30	42	70
3	5	18	34	47	71
3	7	21	35	46	69
3	4	15	32	47	71
3	4	15	32	47	70
4	4	23	40	56	80
4	6	26	42	60	80
4	4	22	39	58	80
4	3	20	38	55	80
4	7	27	42	55	80
4	4	21	39	55	80
4	6	21	42	60	80
4	5	23	40	57	80
5	8	27	47	62	80
5	8	26	42	63	80
5	7	26	47	64	80
5	5	26	46	63	80
5	7	25	44	58	80

5	7	26	46	64	80
5	7	26	47	64	80
5	8	26	47	64	80
6	7	26	48	66	80
6	8	26	48	65	80
6	8	26	50	67	80
6	3	20	47	64	80
6	4	20	43	59	80
6	6	20	44	61	80
6	7	26	48	66	80
6	7	20	48	66	80
7	8	30	49	68	80
7	8	30	49	70	80
7	8	31	50	71	80
7	8	31	50	66	80
7	8	31	50	69	80
7	7	30	49	67	80
7	8	31	50	68	80
7	8	31	50	68	80
8	4	25	45	63	80
8	4	24	44	66	80
8	4	24	44	67	80
8	3	24	44	63	80
8	4	26	45	64	80
8	3	24	44	64	80
8	4	25	44	66	80
8	4	25	44	65	80
9	7	29	49	71	80
9	6	28	48	70	80
9	6	29	48	68	80
9	7	30	50	72	80
9	7	30	49	70	80
9	6	29	50	73	80
9	6	28	47	69	80
9	6	29	49	70	80
10	5	20	35	53	80
10	4	20	34	53	80
10	4	20	35	52	80
10	5	21	36	53	80
10	5	21	35	51	80
10	5	21	35	50	80

10	4	21	35	49	80
10	5	21	35	52	80
11	3	24	43	64	70
11	3	21	41	62	71
11	4	24	42	61	69
11	3	20	38	59	72
11	3	24	44	66	70
11	3	20	39	61	72
11	3	24	44	63	70
11	3	22	42	62	71
12	3	16	45	62	70
12	3	14	36	54	71
12	4	20	43	63	69
12	3	17	40	60	72
12	3	16	36	54	73
12	3	18	40	56	71
12	3	16	40	60	71
12	3	16	40	60	71
13	7	24	42	54	80
13	7	24	42	53	80
13	8	24	40	51	80
13	7	24	40	52	80
13	7	24	40	53	80
13	6	25	42	55	80
13	7	24	42	53	80
13	7	24	42	53	80
14	4	14	33	50	80
14	3	14	32	49	80
14	3	14	33	51	80
14	4	13	31	47	80
14	3	14	33	51	80
14	4	16	34	54	80
14	3	14	33	51	80
14	3	14	33	51	80
15	6	24	39	54	80
15	4	20	35	50	80
15	6	25	39	53	80
15	8	23	38	54	80
15	5	23	38	54	80
15	6	24	39	53	80
15	5	23	38	54	80

15	6	23	38	53	80
----	---	----	----	----	----

Datos crudos de tratamientos testigos de aislamientos del género *Trichoderma* para el ensayo con *Botrytis cinerea*.

Tratamientos	mm/día 1	mm/día 2	mm/día 3	mm/día 4	mm/día 5
1	6	24	43	62	80,0
1	5	20	40	60	80,0
1	5	20	47	58	80,0
1	5	22	41	59	80,0
1	8	27	47	58	80,0
1	6	26	45	60	80,0
1	4	21	41	61	80,0
1	8	26	46	64	80,0
2	3	17	37	57	80,0
2	5	24	35	62	80,0
2	4	19	39	59	80,0
2	4	20	39	57	80,0
2	4	19	39	59	80,0
2	2	17	36	58	80,0
2	3	17	36	57	80,0
2	3	20	41	60	80,0
3	7	23	37	54	80,0
3	5	23	39	57	80,0
3	6	20	36	54	80,0
3	5	20	35	50	80,0
3	6	23	40	57	80,0
3	6	21	37	54	80,0
3	6	22	38	56	80,0
3	4	19	35	54	80,0
4	9	27	45	60	80,0
4	9	27	44	58	80,0
4	8	26	45	60	80,0
4	8	26	46	62	80,0
4	6	24	40	55	80,0
4	7	25	43	57	80,0
4	8	26	45	62	80,0
4	8	26	47	61	80,0
5	7	28	45	64	80,0
5	7	27	46	65	80,0

5	6	28	45	63	80,0
5	6	26	44	64	80,0
5	6	27	46	66	80,0
5	5	29	47	65	80,0
5	6	27	45	60	80,0
5	7	27	46	66	80,0
6	6	25	47	65	80,0
6	6	25	46	67	80,0
6	6	24	45	66	80,0
6	9	28	49	69	80,0
6	7	27	47	67	80,0
6	7	24	45	63	80,0
6	6	25	46	67	80,0
6	7	26	47	66	80,0
7	6	30	49	68	80,0
7	8	28	49	70	80,0
7	8	31	50	71	80,0
7	8	23	45	67	80,0
7	8	25	46	65	80,0
7	7	28	49	68	80,0
7	6	31	45	68	80,0
7	6	26	45	69	80,0
8	5	20	41	61	80,0
8	6	22	45	61	80,0
8	5	22	44	64	80,0
8	5	22	44	62	80,0
8	3	14	35	60	80,0
8	3	19	44	61	80,0
8	6	24	44	61	80,0
8	5	22	43	63	80,0
9	6	24	45	66	80,0
9	5	23	44	64	80,0
9	6	23	45	63	80,0
9	6	25	46	65	80,0
9	9	28	49	65	80,0
9	10	28	49	67	80,0
9	10	28	50	64	80,0
9	6	25	46	66	80,0
10	6	19	34	50	80,0
10	6	20	36	53	80,0
10	6	6	34	51	80,0

10	5	18	35	52	80,0
10	6	18	35	51	80,0
10	6	20	35	51	80,0
10	6	19	36	53	80,0
10	6	16	33	50	80,0
11	4	20	44	63	80,0
11	6	25	45	65	80,0
11	6	25	46	67	80,0
11	5	23	43	64	80,0
11	7	25	46	67	80,0
11	7	24	47	61	80,0
11	3	20	48	63	80,0
11	7	22	48	66	80,0
12	5	22	41	68	80,0
12	8	29	51	70	80,0
12	8	29	51	69	80,0
12	5	22	43	64	80,0
12	4	26	47	66	80,0
12	5	24	45	67	80,0
12	5	25	47	68	80,0
12	5	23	47	67	80,0
13	7	29	49	66	80,0
13	5	27	45	63	80,0
13	6	28	47	65	80,0
13	5	25	44	64	80,0
13	5	26	43	61	80,0
13	6	27	44	63	80,0
13	6	28	46	64	80,0
13	6	27	46	65	80,0
14	3	17	35	56	80,0
14	3	20	37	57	80,0
14	2	17	36	57	80,0
14	3	19	39	59	80,0
14	3	19	39	58	80,0
14	3	20	39	58	80,0
14	3	20	37	58	80,0
14	3	19	39	59	80,0
15	5	24	39	54	80,0
15	5	23	35	51	80,0
15	6	25	38	53	80,0
15	7	21	38	54	80,0

15	5	23	38	52	80,0
15	7	23	38	53	80,0
15	5	24	37	52	80,0
15	6	23	38	53	80,0

Datos crudos de los cultivos duales y porcentajes de inhibición de *Sclerotinia sclerotiorum* frente a aislamientos del género *Trichoderma*.

día 1				día 2		
Trat.	Trich.	Scler.	% de inhibición	Trich.	Scler.	% de inhibición
1	5,0	1,0	46,67	25,0	16,0	27
1	5,0	0,5	73,33	26,0	14,0	36
1	5,0	0,5	73,33	25,0	15,0	31
1	5,0	1,0	46,67	27,0	11,0	50
1	5,0	1,0	46,67	26,0	18,0	18
1	5,0	1,0	46,67	26,0	14,0	36
1	6,0	2,0	-6,67	27,0	22,0	-1
1	5,1	1,0	46,67	26,0	15,7	28
2	5,0	1,0	46,67	19,0	5,0	77
2	5,0	2,0	-6,67	19,0	18,0	18
2	5,0	2,0	-6,67	18,0	23,0	-5
2	4,0	1,0	46,67	16,0	6,0	73
2	5,0	2,0	-6,67	18,0	23,0	-5
2	5,0	2,0	-6,67	22,0	18,0	18
2	5,0	2,0	-6,67	19,0	18,0	18
2	5,0	2,0	-6,67	19,0	18,0	18
3	5,0	1,0	46,67	16,0	21,0	4
3	4,0	2,0	-6,67	15,0	22,0	-1
3	5,0	2,0	-6,67	18,0	22,0	-1
3	2,0	1,0	46,67	11,0	20,0	9
3	3,0	1,0	46,67	13,0	17,0	22
3	4,0	2,0	-6,67	15,0	22,0	-1
3	4,0	2,0	-6,67	15,0	22,0	-1
3	4,0	2,0	-6,67	15,0	22,0	-1
4	6,0	1,0	46,67	23,0	13,0	41
4	4,0	1,0	46,67	28,0	14,0	36
4	5,0	1,0	46,67	26,0	16,0	27
4	3,0	1,0	46,67	20,0	19,0	13
4	3,0	0,5	73,33	13,0	13,0	41
4	5,0	2,0	-6,67	25,0	23,0	-5

4	4,0	1,0	46,67
4	4,3	1,1	42,86
5	6,0	3,0	-60,00
5	7,0	3,0	-60,00
5	5,0	4,0	-113,33
5	4,0	4,0	-113,33
5	7,0	3,0	-60,00
5	7,0	2,0	-6,67
5	7,0	3,0	-60,00
5	6,0	3,0	-60,00
6	6,0	2,0	-6,67
6	8,0	4,0	-113,33
6	7,0	2,0	-6,67
6	8,0	4,0	-113,33
6	7,0	2,0	-6,67
6	5,0	2,0	-6,67
6	7,0	2,0	-6,67
6	7,0	3,0	-60,00
7	6,0	1,0	46,67
7	5,0	2,0	-6,67
7	8,0	2,0	-6,67
7	8,0	1,0	46,67
7	8,0	1,0	46,67
7	8,0	2,0	-6,67
7	8,0	1,0	46,67
7	8,0	1,0	46,67
8	3,0	1,0	46,67
8	3,0	2,0	-6,67
8	2,0	2,0	-6,67
8	4,0	0,5	73,33
8	3,0	1,0	46,67
8	3,0	0,5	73,33
8	5,0	0,5	73,33
8	3,3	1,1	42,86
9	5,0	1,0	46,67
9	5,0	0,5	73,33
9	5,0	1,0	46,67
9	5,0	0,5	73,33
9	5,0	2,0	-6,67
9	5,0	1,0	46,67
9	5,0	1,0	46,67

22,0	22,0	-1
22,4	17,1	22
22,0	22,0	-1
25,0	26,0	-19
22,0	26,0	-19
20,0	26,0	-19
26,0	24,0	-10
26,0	22,0	-1
24,0	22,0	-1
24,0	22,0	-1
24,0	21,0	4
27,0	25,0	-14
26,0	22,0	-1
26,0	26,0	-19
24,0	20,0	9
22,0	22,0	-1
24,0	22,0	-1
24,0	22,0	-1
27,0	16,0	27
25,0	19,0	13
30,0	24,0	-10
30,0	14,0	36
30,0	14,0	36
31,0	25,0	-14
30,0	9,0	59
30,0	9,0	59
19,0	22,0	-1
20,0	23,0	-5
18,0	23,0	-5
25,0	20,0	9
20,0	23,0	-5
22,0	20,0	9
24,0	18,0	18
21,1	21,3	3
27,0	12,0	45
27,0	16,0	27
25,0	21,0	4
28,0	19,0	13
27,0	10,0	54
24,0	16,0	27
27,0	17,0	22

9	5,0	1,0	46,67
10	4,0	2,0	-6,67
10	5,0	1,0	46,67
10	5,0	1,5	20,00
10	4,0	1,0	46,67
10	4,0	1,5	20,00
10	4,0	1,0	46,67
10	5,0	1,0	46,67
10	4,4	1,3	31,43
11	3,0	0,5	73,33
11	3,0	2,0	-6,67
11	3,0	2,0	-6,67
11	4,0	2,0	-6,67
11	3,0	2,0	-6,67
11	4,0	2,0	-6,67
11	3,0	0,5	73,33
11	3,3	1,6	16,19
12	4,0	2,0	-6,67
12	6,0	2,0	-6,67
12	4,0	2,0	-6,67
12	5,0	2,0	-6,67
12	5,0	2,0	-6,67
12	6,0	2,0	-6,67
12	6,0	2,0	-6,67
12	5,0	2,0	-6,67
13	6,0	2,0	-6,67
13	6,0	3,0	-60,00
13	7,0	3,0	-60,00
13	7,0	1,0	46,67
13	7,0	2,0	-6,67
13	7,0	4,0	-113,33
13	7,0	2,0	-6,67
13	7,0	2,0	-6,67
14	3,0	3,0	-60,00
14	4,0	4,0	-113,33
14	4,0	4,0	-113,33
14	3,0	3,0	-60,00
14	4,0	1,0	46,67
14	4,0	1,0	46,67
14	4,0	3,0	-60,00
14	4,0	3,0	-60,00

26,4	15,9	28
20,0	21,0	4
22,0	17,0	22
21,0	17,0	22
20,0	18,0	18
20,0	23,0	-5
20,0	19,0	13
22,0	16,0	27
20,7	18,7	14
22,0	12,0	45
22,0	24,0	-10
20,0	22,0	-1
23,0	25,0	-14
19,0	25,0	-14
25,0	25,0	-14
21,0	17,0	22
21,7	21,4	2
18,0	20,0	9
18,0	21,0	4
21,0	24,0	-10
19,0	22,0	-1
20,0	22,0	-1
20,0	18,0	18
19,0	22,0	-1
19,0	21,0	4
24,0	24,0	-10
24,0	23,0	-5
24,0	25,0	-14
24,0	19,0	13
24,0	18,0	18
23,0	24,0	-10
24,0	24,0	-10
24,0	24,0	-10
15,0	22,0	-1
15,0	25,0	-14
15,0	25,0	-14
15,0	25,0	-14
15,0	15,0	31
17,0	12,0	45
15,0	22,0	-1
15,0	22,0	-1

15	7,0	2,0	-6,67
15	7,0	1,0	46,67
15	7,0	2,0	-6,67
15	8,0	3,0	-60,00
15	7,0	2,0	-6,67
15	6,0	2,0	-6,67
15	5,0	1,0	46,67
15	6,0	3,0	-60,00

16,0	21,0	4
15,0	22,0	-1
18,0	22,0	-1
12,0	20,0	9
13,0	17,0	22
16,0	22,0	-1
16,0	22,0	-1
15,0	22,0	-1

día 3

Trat.	Trich.	Scler.	% de inhibición
1	40,0	35,0	26
1	43,0	33,0	31
1	41,0	34,0	28
1	42,0	33,0	31
1	40,0	35,0	26
1	42,0	38,0	20
1	39,0	36,0	24
1	41,0	34,9	27
2	36,0	20,0	58
2	33,0	37,0	22
2	30,0	42,0	12
2	33,0	26,0	45
2	32,0	39,0	18
2	36,0	34,0	28
2	33,0	36,0	24
2	33,0	36,0	24
3	28,0	41,0	14
3	26,0	42,0	12
3	31,0	38,0	20
3	23,0	45,0	5
3	26,0	42,0	12
3	26,0	44,0	7
3	26,0	42,0	12
3	26,0	42,0	12
4	42,0	25,0	47
4	38,0	29,0	39
4	40,0	29,0	39
4	35,0	35,0	26
4	35,0	29,0	39

día 4

Trich.	Scler.	% de inhibición
40	35	51
43,0	33,0	54
41,0	34,0	52
42,0	33,0	54
40,0	35,0	51
42,0	38,0	47
39,0	36,0	50
41,0	34,9	51
43,0	32,0	55
34,0	37,0	48
32,0	42,0	41
43,0	32,0	55
36,0	39,0	45
40,0	34,0	52
36,0	36,0	50
36,0	36,0	50
33,0	41,0	43
28,0	42,0	41
33,0	41,0	43
25,0	45,0	37
32,0	42,0	41
29,0	44,0	38
28,0	42,0	41
28,0	42,0	41
44,0	31,0	57
42,0	30,0	58
41,0	29,0	59
38,0	35,0	51
41,0	31,0	57

4	34,0	32,0	33
4	35,0	33,0	31
4	37,0	30,3	36
5	33,0	34,0	28
5	34,0	37,0	22
5	32,0	40,0	16
5	30,0	40,0	16
5	34,0	35,0	26
5	34,0	31,0	35
5	34,0	34,0	28
5	34,0	34,0	28
6	31,0	37,0	22
6	31,0	37,0	22
6	31,0	36,0	24
6	33,0	36,0	24
6	30,0	36,0	24
6	30,0	39,0	18
6	31,0	36,0	24
6	31,0	37,0	22
7	42,0	32,0	33
7	41,0	34,0	28
7	39,0	36,0	24
7	42,0	29,0	39
7	46,0	29,0	39
7	38,0	35,0	26
7	46,0	26,0	45
7	46,0	26,0	45
8	33,0	40,0	16
8	34,0	41,0	14
8	31,0	40,0	16
8	37,0	36,0	24
8	36,0	40,0	16
8	35,0	35,0	26
8	39,0	34,0	28
8	35,0	38,0	20
9	34,0	27,0	43
9	40,0	30,0	37
9	35,0	35,0	26
9	39,0	29,0	39
9	45,0	24,0	49
9	39,0	33,0	31

36,0	32,0	55
36,0	33,0	54
39,7	31,6	56
36,0	35,0	51
34,0	38,0	47
32,0	40,0	44
30,0	41,0	43
34,0	36,0	50
34,0	32,0	55
35,0	35,0	51
35,0	35,0	51
36,0	37,0	48
35,0	37,0	48
36,0	36,0	50
35,0	36,0	50
36,0	36,0	50
35,0	39,0	45
36,0	36,0	50
36,0	37,0	48
42,0	32,0	55
41,0	34,0	52
39,0	36,0	50
42,0	29,0	59
46,0	29,0	59
38,0	35,0	51
46,0	26,0	64
46,0	26,0	64
33,0	40,0	44
34,0	41,0	43
31,0	40,0	44
37,0	36,0	50
36,0	40,0	44
36,0	35,0	51
39,0	34,0	52
35,1	38,0	47
34,0	27,0	62
40,0	30,0	58
35,0	35,0	51
39,0	29,0	59
45,0	24,0	66
39,0	33,0	54

9	39,0	30,0	37
9	38,7	29,7	37
10	33,0	36,0	24
10	35,0	33,0	31
10	34,0	33,0	31
10	33,0	33,0	31
10	31,0	37,0	22
10	33,0	36,0	24
10	35,0	32,0	33
10	33,4	34,3	28
11	40,0	31,0	35
11	32,0	38,0	20
11	33,0	38,0	20
11	34,0	38,0	20
11	31,0	43,0	9
11	34,0	37,0	22
11	39,0	35,0	26
11	34,7	37,1	22
12	31,0	44,0	7
12	30,0	40,0	16
12	34,0	39,0	18
12	31,0	40,0	16
12	31,0	43,0	9
12	34,0	34,0	28
12	34,0	40,0	16
12	34,0	40,0	16
13	38,0	35,0	26
13	37,0	34,0	28
13	38,0	35,0	26
13	38,0	31,0	35
13	36,0	34,0	28
13	35,0	31,0	35
13	36,0	34,0	28
13	36,0	34,0	28
14	30,0	41,0	14
14	24,0	41,0	14
14	29,0	43,0	9
14	32,0	43,0	9
14	30,0	32,0	33
14	34,0	34,0	28
14	30,0	41,0	14

39,0	30,0	58
38,7	29,7	58
33,0	36,0	50
35,0	33,0	54
34,0	33,0	54
33,0	33,0	54
31,0	37,0	48
34,0	36,0	50
36,0	32,0	55
33,7	34,3	52
40,0	31,0	57
32,0	38,0	47
33,0	38,0	47
34,0	38,0	47
31,0	43,0	40
34,0	37,0	48
39,0	35,0	51
34,7	37,1	48
35,0	44,0	38
33,0	40,0	44
34,0	39,0	45
32,0	40,0	44
35,0	43,0	40
38,0	34,0	52
36,0	40,0	44
35,0	40,0	44
45,0	36,0	50
45,0	34,0	52
44,0	35,0	51
41,0	32,0	55
39,0	34,0	52
39,0	36,0	50
41,0	34,0	52
41,0	34,0	52
33,0	41,0	43
33,0	41,0	43
34,0	43,0	40
32,0	43,0	40
35,0	37,0	48
41,0	35,0	51
33,0	41,0	43

14	30,0	41,0	14
15	31,0	41,0	14
15	26,0	42,0	12
15	31,0	38,0	20
15	23,0	45,0	5
15	26,0	42,0	12
15	26,0	44,0	7
15	26,0	42,0	12
15	26,0	42,0	12

33,0	41,0	43
33,0	41,0	43
28,0	42,0	41
31,0	38,0	47
25,0	45,0	37
31,0	42,0	41
29,0	44,0	38
28,0	42,0	41
28,0	42,0	41

día 5

Trat.	Trich.	Scler.	% de inhibición
1	40,0	35,0	56,3
1	43,0	33,0	58,8
1	41,0	34,0	57,5
1	42,0	33,0	58,8
1	40,0	35,0	56,3
1	42,0	38,0	52,5
1	39,0	36,0	55,0
1	41,0	34,9	56,4
2	45,0	36,0	55,0
2	45,0	34,0	57,5
2	44,0	35,0	56,3
2	41,0	32,0	60,0
2	39,0	34,0	57,5
2	39,0	36,0	55,0
2	41,0	34,0	57,5
2	41,0	34,0	57,5
3	33,0	41,0	48,8
3	28,0	42,0	47,5
3	33,0	38,0	52,5
3	25,0	45,0	43,8
3	32,0	42,0	47,5
3	29,0	44,0	45,0
3	28,0	42,0	47,5
3	28,0	42,0	47,5
4	44,0	26,0	67,5
4	42,0	30,0	62,5
4	41,0	29,0	63,8
4	38,0	35,0	56,3
4	41,0	31,0	61,3

4	36,0	32,0	60,0
4	36,0	33,0	58,8
4	39,7	30,9	61,4
5	36,0	35,0	56,3
5	34,0	38,0	52,5
5	32,0	40,0	50,0
5	30,0	41,0	48,8
5	34,0	36,0	55,0
5	34,0	32,0	60,0
5	35,0	35,0	56,3
5	35,0	35,0	56,3
6	36,0	37,0	53,8
6	35,0	37,0	53,8
6	36,0	36,0	55,0
6	35,0	36,0	55,0
6	36,0	36,0	55,0
6	35,0	39,0	51,3
6	36,0	36,0	55,0
6	36,0	37,0	53,8
7	42,0	32,0	60,0
7	41,0	34,0	57,5
7	39,0	36,0	55,0
7	42,0	29,0	63,8
7	46,0	29,0	63,8
7	38,0	35,0	56,3
7	46,0	26,0	67,5
7	46,0	26,0	67,5
8	33,0	40,0	50,0
8	34,0	41,0	48,8
8	31,0	40,0	50,0
8	37,0	36,0	55,0
8	36,0	40,0	50,0
8	36,0	35,0	56,3
8	39,0	34,0	57,5
8	35,1	38,0	52,5
9	34,0	27,0	66,3
9	40,0	30,0	62,5
9	35,0	35,0	56,3
9	39,0	29,0	63,8
9	45,0	24,0	70,0
9	39,0	33,0	58,8

9	39,0	30,0	62,5
9	38,7	29,7	62,9
10	33,0	36,0	55,0
10	35,0	33,0	58,8
10	34,0	33,0	58,8
10	33,0	33,0	58,8
10	31,0	37,0	53,8
10	34,0	36,0	55,0
10	36,0	32,0	60,0
10	33,7	34,3	57,1
11	40,0	31,0	61,3
11	32,0	38,0	52,5
11	33,0	38,0	52,5
11	34,0	38,0	52,5
11	31,0	43,0	46,3
11	34,0	37,0	53,8
11	39,0	35,0	56,3
11	34,7	37,1	53,6
12	35,0	44,0	45,0
12	33,0	40,0	50,0
12	34,0	39,0	51,3
12	32,0	40,0	50,0
12	35,0	43,0	46,3
12	38,0	34,0	57,5
12	36,0	40,0	50,0
12	35,0	40,0	50,0
13	33,0	41,0	48,8
13	28,0	42,0	47,5
13	33,0	38,0	52,5
13	25,0	45,0	43,8
13	32,0	42,0	47,5
13	29,0	44,0	45,0
13	28,0	42,0	47,5
13	28,0	42,0	47,5
14	33,0	41,0	48,8
14	33,0	41,0	48,8
14	34,0	43,0	46,3
14	32,0	43,0	46,3
14	35,0	37,0	53,8
14	41,0	35,0	56,3
14	33,0	41,0	48,8

14	33,0	41,0	48,8
15	33,0	41,0	48,8
15	28,0	42,0	47,5
15	31,0	38,0	52,5
15	25,0	45,0	43,8
15	31,0	42,0	47,5
15	29,0	44,0	45,0
15	28,0	42,0	47,5
15	28,0	42,0	47,5

Datos crudos de los cultivos duales y porcentajes de inhibición de *Botrytis cinerea* frente a aislamientos del género *Trichoderma*.

día 1			
Trat.	Trich.	Botr.	% de inhibición
1	9,0	1,0	42,9
1	8,0	2,0	-14,3
1	9,0	2,0	-14,3
1	9,0	1,0	42,9
1	6,0	2,0	-14,3
1	6,0	3,0	-71,4
1	8,0	1,0	42,9
1	7,0	2,0	-14,3
2	4,0	2,0	-14,3
2	4,0	3,0	-71,4
2	4,0	1,0	42,9
2	5,0	1,0	42,9
2	3,0	2,0	-14,3
2	3,0	3,0	-71,4
2	4,0	3,0	-71,4
2	4,0	3,0	-71,4
3	6,0	2,0	-14,3
3	5,0	2,0	-14,3
3	5,0	2,0	-14,3
3	6,0	3,0	-71,4
3	4,0	3,0	-71,4
3	6,0	2,0	-14,3
3	6,0	2,0	-14,3
3	5,0	2,0	-14,3
4	7,0	1,0	42,9
4	6,0	1,0	42,9
4	10,0	1,0	42,9

día 2		
Trich.	Botr.	% de inhibición
27,0	9,0	39,0
26,0	9,0	39,0
26,0	10,0	32,2
27,0	9,0	39,0
27,0	10,0	32,2
24,0	10,0	32,2
24,0	9,0	39,0
24,0	10,0	32,2
20,0	17,0	-15,3
20,0	18,0	-22,0
20,0	18,0	-22,0
24,0	21,0	-42,4
19,0	16,0	-8,5
17,0	18,0	-22,0
25,0	16,0	-8,5
22,0	17,0	-15,3
22,0	21,0	-42,4
18,0	16,0	-8,5
18,0	13,0	11,9
20,0	14,0	5,1
18,0	19,0	-28,8
20,0	17,0	-15,3
21,0	19,0	-28,8
19,0	18,0	-22,0
23,0	11,0	25,4
21,0	10,0	32,2
28,0	10,0	32,2

4	10,0	2,0	-14,3
4	8,0	1,0	42,9
4	11,0	1,0	42,9
4	10,0	2,0	-14,3
4	11,0	2,0	-14,3
5	6,0	2,0	-14,3
5	5,0	2,0	-14,3
5	6,0	3,0	-71,4
5	5,0	2,0	-14,3
5	7,0	2,0	-14,3
5	6,0	1,0	42,9
5	5,0	2,0	-14,3
5	6,0	2,0	-14,3
6	7,0	1,0	42,9
6	7,0	1,0	42,9
6	6,0	2,0	-14,3
6	6,0	3,0	-71,4
6	5,0	1,0	42,9
6	6,0	2,0	-14,3
6	6,0	3,0	-71,4
6	6,0	2,0	-14,3
7	6,0	1,0	42,9
7	5,0	2,0	-14,3
7	8,0	2,0	-14,3
7	7,0	1,0	42,9
7	8,0	1,0	42,9
7	7,0	2,0	-14,3
7	8,0	1,0	42,9
7	8,0	1,0	42,9
8	3,0	2,0	-14,3
8	3,0	2,0	-14,3
8	3,0	2,0	-14,3
8	4,0	1,0	42,9
8	2,0	2,0	-14,3
8	2,0	3,0	-71,4
8	2,0	2,0	-14,3
8	2,0	1,0	42,9
9	7,0	2,0	-14,3
9	7,0	1,0	42,9
9	7,0	1,0	42,9
9	8,0	2,0	-14,3

26,0	10,0	32,2
25,0	10,0	32,2
29,0	10,0	32,2
28,0	11,0	25,4
27,0	10,0	32,2
27,0	18,0	-22,0
24,0	14,0	5,1
26,0	16,0	-8,5
22,0	19,0	-28,8
28,0	15,0	-1,7
27,0	17,0	-15,3
23,0	18,0	-22,0
27,0	17,0	-15,3
27,0	5,0	66,1
28,0	11,0	25,4
26,0	10,0	32,2
24,0	9,0	39,0
23,0	6,0	59,3
25,0	7,0	52,5
25,0	9,0	39,0
26,0	9,0	39,0
27,0	16,0	-8,5
25,0	19,0	-28,8
30,0	24,0	-62,7
29,0	14,0	5,1
29,0	14,0	5,1
31,0	25,0	-69,5
30,0	9,0	39,0
30,0	9,0	39,0
16,0	10,0	32,2
16,0	9,0	39,0
20,0	10,0	32,2
20,0	10,0	32,2
17,0	7,0	52,5
16,0	14,0	5,1
12,0	9,0	39,0
25,0	4,0	72,9
25,0	12,0	18,6
26,0	12,0	18,6
22,0	12,0	18,6
26,0	12,0	18,6

9	7,0	1,0	42,9
9	6,0	2,0	-14,3
9	7,0	3,0	-71,4
9	7,0	1,0	42,9
10	6,0	4,0	-128,6
10	7,0	1,0	42,9
10	6,0	2,0	-14,3
10	4,0	3,0	-71,4
10	6,0	1,0	42,9
10	6,0	2,0	-14,3
10	6,0	1,0	42,9
10	6,0	2,0	-14,3
11	6,0	1,0	42,9
11	3,0	1,0	42,9
11	4,0	2,0	-14,3
11	7,0	2,0	-14,3
11	7,0	1,0	42,9
11	5,0	1,0	42,9
11	4,0	2,0	-14,3
11	3,0	3,0	-71,4
12	5,0	3,0	-71,4
12	4,0	2,0	-14,3
12	4,0	2,0	-14,3
12	5,0	3,0	-71,4
12	5,0	1,0	42,9
12	6,0	2,0	-14,3
12	6,0	2,0	-14,3
12	7,0	2,0	-14,3
13	7,0	2,0	-14,3
13	6,0	2,0	-14,3
13	7,0	2,0	-14,3
13	8,0	3,0	-71,4
13	8,0	2,0	-14,3
13	5,0	3,0	-71,4
13	6,0	2,0	-14,3
13	7,0	2,0	-14,3
14	5,0	2,0	-14,3
14	5,0	2,0	-14,3
14	4,0	2,0	-14,3
14	5,0	2,0	-14,3
14	3,0	2,0	-14,3

25,0	10,0	32,2
26,0	10,0	32,2
26,0	8,0	45,8
25,0	11,0	25,4
20,0	10,0	32,2
20,0	4,0	72,9
20,0	10,0	32,2
17,0	7,0	52,5
18,0	7,0	52,5
20,0	8,0	45,8
19,0	11,0	25,4
19,0	12,0	18,6
26,0	10,0	32,2
18,0	7,0	52,5
24,0	8,0	45,8
26,0	8,0	45,8
25,0	10,0	32,2
22,0	7,0	52,5
26,0	7,0	52,5
26,0	8,0	45,8
23,0	17,0	-15,3
23,0	17,0	-15,3
22,0	19,0	-28,8
23,0	14,0	5,1
27,0	15,0	-1,7
27,0	14,0	5,1
28,0	15,0	-1,7
28,0	16,0	-8,5
28,0	16,0	-8,5
27,0	15,0	-1,7
29,0	16,0	-8,5
31,0	16,0	-8,5
30,0	16,0	-8,5
24,0	18,0	-22,0
28,0	16,0	-8,5
28,0	17,0	-15,3
24,0	13,0	11,9
24,0	13,0	11,9
19,0	15,0	-1,7
23,0	15,0	-1,7
19,0	14,0	5,1

14	3,0	2,0	-14,3
14	3,0	3,0	-71,4
14	4,0	2,0	-14,3
15	7,0	2,0	-14,3
15	6,0	1,0	42,9
15	6,0	2,0	-14,3
15	8,0	3,0	-71,4
15	7,0	2,0	-14,3
15	6,0	2,0	-14,3
15	5,0	1,0	42,9
15	6,0	3,0	-71,4

16,0	18,0	-22,0
17,0	16,5	-11,9
18,0	16,0	-8,5
24,0	14,0	5,1
24,0	15,0	-1,7
24,0	15,0	-1,7
25,0	15,0	-1,7
25,0	16,0	-8,5
25,0	14,0	5,1
24,0	16,0	-8,5
23,0	16,0	-8,5

día 3

Trat.	Trich.	Botr.	% de inhibición
1	45,0	20,0	28,3
1	47,0	22,0	21,1
1	47,0	21,0	24,7
1	46,0	20,0	28,3
1	48,0	21,0	24,7
1	46,0	21,0	24,7
1	47,0	21,0	24,7
1	46,0	22,0	21,1
2	38,0	29,0	-4,0
2	40,0	28,0	-0,4
2	39,0	28,0	-0,4
2	42,0	30,0	-7,6
2	40,0	22,0	21,1
2	35,0	30,0	-7,6
2	42,0	24,0	13,9
2	40,0	27,0	3,1
3	38,0	30,0	-7,6
3	31,0	27,0	3,1
3	32,0	23,0	17,5
3	35,0	26,0	6,7
3	32,0	29,0	-4,0
3	32,0	24,0	13,9
3	35,0	30,0	-7,6
3	33,0	32,0	-14,8
4	41,0	18,0	35,4
4	46,0	19,0	31,8
4	46,0	20,0	28,3

día 4

Trich.	Botr.	% de inhibición
49	19,0	51,7
48	21,0	46,7
48	22,0	44,1
48	23,0	41,6
48	22,0	44,1
50	18,0	54,3
48	23,0	41,6
48	22,0	44,1
50	31,0	21,3
59	29,0	26,3
52	27,0	31,4
59	30,0	23,8
54	24,0	39,0
47	32,0	18,7
53	26,0	34,0
54	28,0	28,9
48	26,0	34,0
44	31,0	21,3
44	29,0	26,3
45	29,0	26,3
45	32,0	18,7
44	29,0	26,3
45	30,0	23,8
40	33,0	16,2
49	19,0	51,7
52	21,0	46,7
51	2,0	94,9

4	43,0	20,0	28,3
4	41,0	12,0	57,0
4	45,0	20,0	28,3
4	46,0	20,0	28,3
4	44,0	18,0	35,4
5	44,0	27,0	3,1
5	41,0	25,0	10,3
5	42,0	25,0	10,3
5	38,0	25,0	10,3
5	44,0	24,0	13,9
5	43,0	26,0	6,7
5	41,0	26,0	6,7
5	41,0	28,0	-0,4
6	48,0	16,0	42,6
6	47,0	23,0	17,5
6	46,0	21,0	24,7
6	45,0	18,0	35,4
6	47,0	18,0	35,4
6	45,0	20,0	28,3
6	46,0	18,0	35,4
6	46,0	21,0	24,7
7	42,0	32,0	-14,8
7	41,0	34,0	-22,0
7	39,0	36,0	-29,1
7	40,0	29,0	-4,0
7	45,0	29,0	-4,0
7	38,0	35,0	-25,6
7	46,0	26,0	6,7
7	46,0	26,0	6,7
8	35,0	24,0	13,9
8	33,0	18,0	35,4
8	40,0	23,0	17,5
8	40,0	23,0	17,5
8	35,0	18,0	35,4
8	35,0	25,0	10,3
8	34,0	22,0	21,1
8	44,0	20,0	28,3
9	46,0	20,0	28,3
9	46,0	20,0	28,3
9	46,0	15,0	46,2
9	46,0	23,0	17,5

48	20,0	49,2
53	18,0	54,3
51	20,0	49,2
52	20,0	49,2
52	18,0	54,3
45	26,0	34,0
47	24,0	39,0
46	25,0	36,5
47	25,0	36,5
52	24,0	39,0
44	27,0	31,4
44	26,0	34,0
46	26,0	34,0
53	18,0	54,3
45	24,0	39,0
49	22,0	44,1
50	19,0	51,7
47	22,0	44,1
49	23,0	41,6
48	21,0	46,7
47	23,0	41,6
42	32,0	18,7
41	31,0	21,3
39	36,0	8,6
42	29,0	26,3
46	29,0	26,3
38	33,0	16,2
46	26,0	34,0
46	28,0	28,9
42	22,0	44,1
45	23,0	41,6
45	25,0	36,5
45	24,0	39,0
45	23,0	41,6
40	29,0	26,3
43	28,0	28,9
50	22,0	44,1
49	21,0	46,7
48	22,0	44,1
49	18,0	54,3
48	23,0	41,6

9	46,0	23,0	17,5
9	46,0	20,0	28,3
9	47,0	21,0	24,7
9	44,0	24,0	13,9
10	36,0	26,0	6,7
10	36,0	24,0	13,9
10	35,0	20,0	28,3
10	33,0	16,0	42,6
10	32,0	9,0	67,7
10	35,0	20,0	28,3
10	35,0	23,0	17,5
10	36,0	26,0	6,7
11	46,0	23,0	17,5
11	38,0	18,0	35,4
11	44,0	15,0	46,2
11	47,0	18,0	35,4
11	46,0	24,0	13,9
11	41,0	21,0	24,7
11	44,0	17,0	39,0
11	46,0	21,0	24,7
12	43,0	25,0	10,3
12	41,0	26,0	6,7
12	41,0	26,0	6,7
12	41,0	25,0	10,3
12	48,0	23,0	17,5
12	46,0	22,0	21,1
12	46,0	24,0	13,9
12	46,0	22,0	21,1
13	45,0	25,0	10,3
13	45,0	25,0	10,3
13	46,0	23,0	17,5
13	46,0	24,0	13,9
13	45,0	24,0	13,9
13	40,0	27,0	3,1
13	45,0	25,0	10,3
13	45,0	26,0	6,7
14	44,0	23,0	17,5
14	44,0	23,0	17,5
14	36,0	26,0	6,7
14	41,0	22,0	21,1
14	37,0	23,0	17,5

47	24,0	39,0
52	18,0	54,3
47	22,0	44,1
45	24,0	39,0
44	27,0	31,4
44	29,0	26,3
44	23,0	41,6
45	23,0	41,6
46	22,0	44,1
46	22,0	44,1
44	26,0	34,0
46	25,0	36,5
45	24,0	39,0
46	23,0	41,6
50	20,0	49,2
51	21,0	46,7
46	24,0	39,0
46	24,0	39,0
49	21,0	46,7
49	22,0	44,1
44	25,0	36,5
43	26,0	34,0
43	27,0	31,4
43	28,0	28,9
50	24,0	39,0
47	22,0	44,1
50	24,0	39,0
51	23,0	41,6
60	25,0	36,5
67	21,0	46,7
63	22,0	44,1
61	24,0	39,0
57	26,0	34,0
52	26,0	34,0
62	22,0	44,1
56	27,0	31,4
57	24,0	39,0
57	23,0	41,6
52	29,0	26,3
47	23,0	41,6
50	25,0	36,5

14	33,0	29,0	-4,0
14	36,0	27,0	3,1
14	35,0	29,0	-4,0
15	39,0	24,0	13,9
15	38,0	26,0	6,7
15	39,0	25,0	10,3
15	38,0	25,0	10,3
15	39,0	26,0	6,7
15	39,0	26,0	6,7
15	38,0	26,0	6,7
15	37,0	25,0	10,3

48	30,0	23,8
51	29,0	26,3
50	32,0	18,7
45	28,0	28,9
49	27,0	31,4
49	29,0	26,3
46	28,0	28,9
45	29,0	26,3
46	28,0	28,9
45	31,0	21,3
48	30,0	23,8

día 5

Trat.	Trich.	Botr.	% inhibición de
1	51	20	60,6
1	51	23	54,7
1	52	22	56,7
1	52	23	54,7
1	51	22	56,7
1	52	23	54,7
1	51	23	54,7
1	51	24	52,7
2	53	31	38,9
2	62	29	42,9
2	55	28	44,8
2	67	31	38,9
2	57	24	52,7
2	60	32	36,9
2	58	26	48,8
2	60	28	44,8
3	53	32	36,9
3	52	31	38,9
3	50	29	42,9
3	55	29	42,9
3	56	32	36,9
3	53	30	40,9
3	47	32	36,9
3	52	35	31,0
4	51	19	62,6
4	54	21	58,6

4	52	21	58,6
4	51	20	60,6
4	55	16	68,5
4	53	20	60,6
4	54	20	60,6
4	54	18	64,5
5	51	26	48,8
5	53	26	48,8
5	52	25	50,7
5	53	26	48,8
5	54	24	52,7
5	47	27	46,8
5	47	26	48,8
5	49	28	44,8
6	55	18	64,5
6	47	24	52,7
6	51	22	56,7
6	50	19	62,6
6	49	22	56,7
6	51	23	54,7
6	50	21	58,6
6	49	23	54,7
7	42	32	36,9
7	41	34	33,0
7	39	36	29,1
7	42	29	42,9
7	46	29	42,9
7	38	35	31,0
7	46	26	48,8
7	46	26	48,8
8	44	22	56,7
8	47	22	56,7
8	47	25	50,7
8	47	25	50,7
8	47	23	54,7
8	42	31	38,9
8	46	28	44,8
8	52	22	56,7
9	52	22	56,7
9	52	22	56,7
9	55	18	64,5

9	49	23	54,7
9	49	24	52,7
9	54	21	58,6
9	50	22	56,7
9	48	24	52,7
10	46	27	46,8
10	46	29	42,9
10	46	23	54,7
10	47	22	56,7
10	48	19	62,6
10	48	23	54,7
10	46	26	48,8
10	46	28	44,8
11	48	24	52,7
11	48	23	54,7
11	53	20	60,6
11	48	18	64,5
11	49	24	52,7
11	49	24	52,7
11	49	21	58,6
11	49	22	56,7
12	57	25	50,7
12	56	26	48,8
12	56	26	48,8
12	55	26	48,8
12	59	24	52,7
12	57	22	56,7
12	57	24	52,7
12	59	24	52,7
13	63	25	50,7
13	68	25	50,7
13	63	23	54,7
13	62	24	52,7
13	58	26	48,8
13	55	26	48,8
13	63	25	50,7
13	58	28	44,8
14	60	24	52,7
14	60	24	52,7
14	56	29	42,9
14	52	24	52,7

14	54	25	50,7
14	54	31	38,9
14	55	29	42,9
14	56	32	36,9
15	50	28	44,8
15	53	28	44,8
15	52	30	40,9
15	51	29	42,9
15	50	29	42,9
15	52	29	42,9
15	51	30	40,9
15	50	30	40,9

**Pruebas formales e informales de supuestos de normalidad y de homocedasticidad de varianza:**

**Testigos de aislamientos del género *Trichoderma* para el cuarto día de haber sido sembrados en placas de Petri para el ensayo de cultivo dual con el patógeno *Botrytis cinerea*.**

Prueba formal de normalidad de varianza, Kolmogorov:

Prueba de bondad de ajuste (Kolmogorov)

Variable	Ajuste	media	varianza	n	Estadistico D	p-valor
RDUO mm/día 4	Normal (0,2,73)	0,00	2,73	120	0,06	0,8098

Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene:

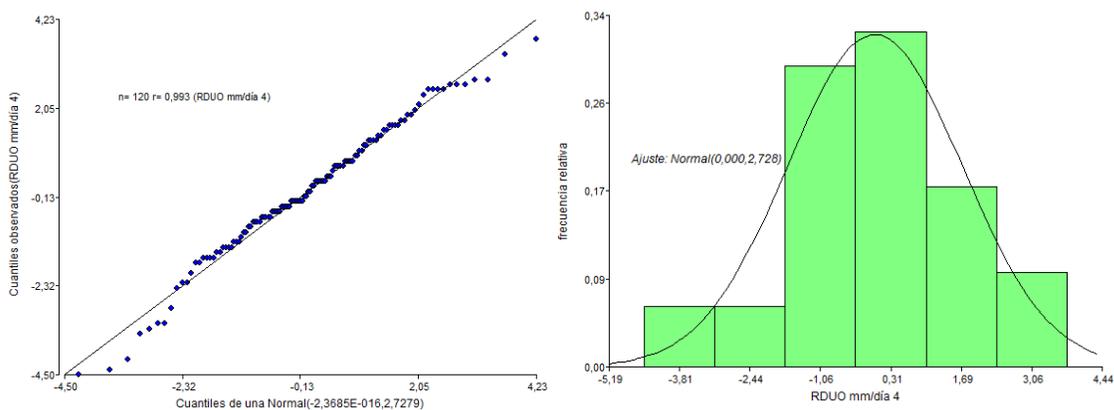
Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS mm/día 4	120	0,11	0,00	78,82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	13,59	14	0,97	0,93	0,5290
Tratamiento	13,59	14	0,97	0,93	0,5290
Error	109,53	105	1,04		
Total	123,12	119			

Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma:



Testigos de aislamientos del género *Trichoderma* para el cuarto día de haber sido sembrados en placas de Petri para el ensayo de cultivo dual con el patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.

Prueba formal de normalidad de varianza, Kolmogorov:

[Prueba de bondad de ajuste \(Kolmogorov\)](#)

Variable	Ajuste	media	varianza	n	Estadistico D	p-valor
RDUO mm/día 4	Normal(0,3,66)	0,00	3,66	120	0,10	0,2039

Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene:

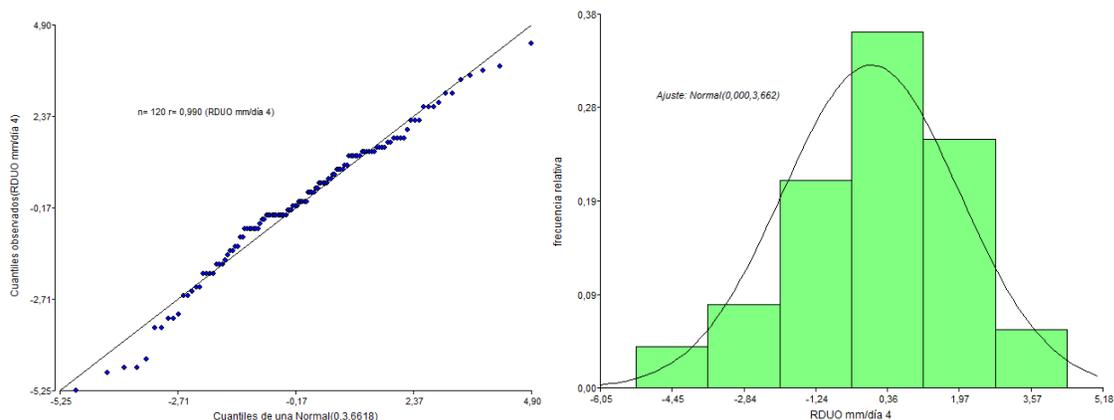
[Análisis de la varianza](#)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS mm/día 4	120	0,19	0,08	78,83

[Cuadro de Análisis de la Varianza \(SC tipo III\)](#)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	32,71	14	2,34	1,73	0,0607
Tratamientos	32,71	14	2,34	1,73	0,0607
Error	141,97	105	1,35		
Total	174,68	119			

Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma:



**Cultivo dual: Inhibición de crecimiento en placas de Petri de *Botrytis cinerea* frente a aislamientos del género *Trichoderma* para el cuarto día de haber sido sembrados.**

Prueba formal de normalidad de varianza, Kolmogorov:

Prueba de bondad de ajuste (Kolmogorov)

Variable	Ajuste	media	varianza	n	Estadístico D	p-valor
RDUO % de inhib. día 4	Normal(0,30,63)	0,00	30,63	120	0,07	0,6773

Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene:

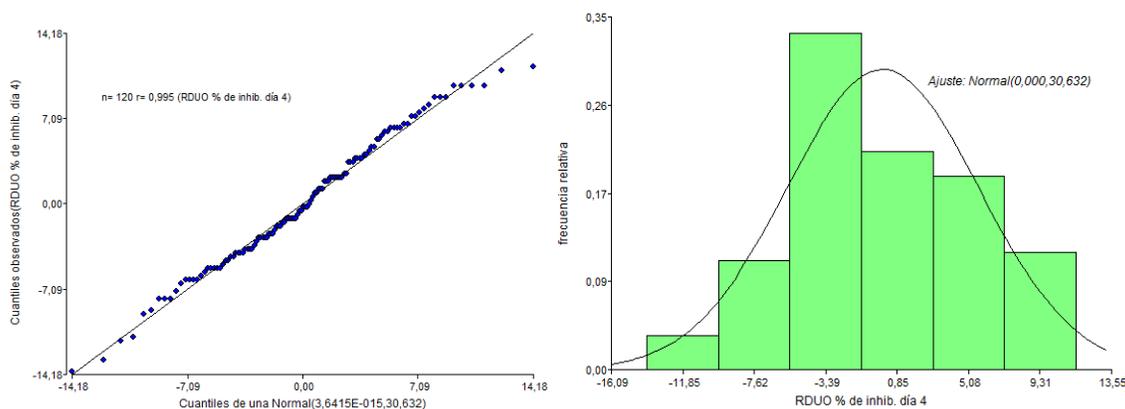
Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS % de inhib. día 4	120	0,19	0,08	64,13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	210,30	14	15,02	1,74	0,0592
Tratamientos	210,30	14	15,02	1,74	0,0592
Error	909,02	105	8,66		
Total	1119,32	119			

Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma:



**Cultivo dual: Inhibición de crecimiento en placas de Petri de *Sclerotinia sclerotiorum* frente a aislamientos del género *Trichoderma* para el cuarto día de haber sido sembrados.**

Prueba formal de normalidad de varianza, Kolmogorov:

[Prueba de bondad de ajuste \(Kolmogorov\)](#)

Variable	Ajuste	media	varianza	n	Estadístico D	p-valor
RDUO % de inhibición día 4..	Normal(0,11,51)	0,00	11,51	120	0,08	0,4017

Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene:

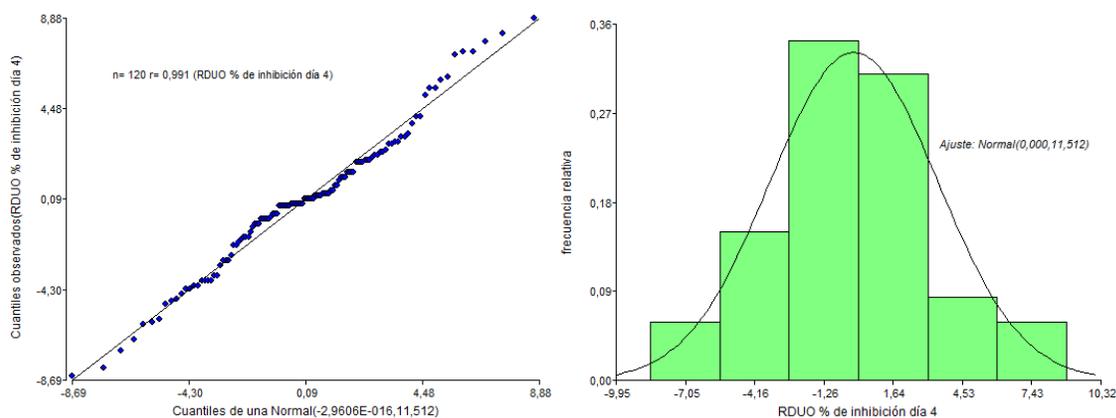
[Análisis de la varianza](#)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS % de inhibición	120	0,18	0,07	87,94

[Cuadro de Análisis de la Varianza \(SC tipo III\)](#)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	110,32	14	7,88	1,63	0,0835
Tratamientos	110,32	14	7,88	1,63	0,0835
Error	508,30	105	4,84		
Total	618,62	119			

Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma:



**Valores observados en los ensayos de cultivo dual aislamientos del género *Metarhizium* frente a *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*.**

Crecimiento en placas de Petri de tratamientos testigos de *Botrytis cinerea*.

Testigo	mm/día 4	mm/día 5	mm/día 6	mm/día 7
Bc 1	39	53	61	80
Bc 2	39	53	66	80
Bc 3	40	53	65	80
Bc 4	43	54	65	80
Bc 5	45	59	73	80
Bc 6	46	60	74	80
Bc 7	45	59	73	80
Bc 8	45	59	73	80

Crecimiento en placas de Petri de tratamientos testigos de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Testigo	mm/día 4	mm/día 5	mm/día 6	mm/día 7
Scl 1	36	56	80	80
Scl 2	31	47	65	80
Scl 3	33	50	62	80
Scl 4	36	53	66	80
Scl 5	36	59	80	80
Scl 6	43	69	80	80
Scl 7	44	69	80	80
Scl 8	36	69	80	80

Datos crudos de tratamientos testigos de aislamientos del género *Metarhizium* para el ensayo con *Botrytis cinerea*.

Ma 722	mm/día 4	mm/día 5	mm/día 6	mm/día 7
Ma 1	6	9	11	13
Ma 2	5	7	9	11
Ma 3	5	7	9	11
Ma 4	5	7	9	11
Ma 5	6	8	10	12
Ma 6	6	8	10	12
Ma 7	6	8	10	12
Ma 8	6	8	10	12

Ma 723	mm/día 4	mm/día 5	mm/día 6	mm/día 7
Ma 1	6	9	12	15
Ma 2	8	11	13	16
Ma 3	8	10	13	15
Ma 4	8	11	14	16
Ma 5	8	11	12	15
Ma 6	8	11	13	16
Ma 7	8	11	13	16
Ma 8	8	11	13	16

Ma 724	mm/día 4	mm/día 5	mm/día 6	mm/día 7
Ma 1	4	6	10	12
Ma 2	4	6	9	11
Ma 3	5	8	11	13
Ma 4	5	8	11	13
Ma 5	6	9	12	13
Ma 6	5	8	10	13
Ma 7	6	9	12	14
Ma 8	5	8	11	13

Ma 725	mm/día 4	mm/día 5	mm/día 6	mm/día 7
Ma 1	5	11	10	14
Ma 2	6	9	12	14
Ma 3	8	10	12	14
Ma 4	5	8	11	13
Ma 5	7	9	11	13
Ma 6	5	7	11	13
Ma 7	5	8	11	13
Ma 8	5	9	11	13

Ma 726	mm/día 4	mm/día 5	mm/día 6	mm/día 7
Ma 1	4	5	7	8
Ma 2	4	6	8	9
Ma 3	5	6	8	9
Ma 4	4	5	6	8
Ma 5	5	6	7	8
Ma 6	4	5	7	8
Ma 7	4	5	7	8
Ma 8	4	5	7	8

Datos crudos de tratamientos testigos de aislamientos del género *Metarhizium* para el ensayo con *Sclerotinia sclerotiorum*.

Ma 722	mm/dia4	mm/dia5	mm/dia6	mm/dia7
Ma 1	5	8	10	13
Ma 2	5	7	9	11
Ma 3	5	6	9	12
Ma 4	5	7	9	11
Ma 5	5	8	9	12
Ma 6	5	6	9	11
Ma 7	5	7	9	12
Ma 8	5	7	9	11

Ma 723	mm/dia4	mm/dia5	mm/dia6	mm/dia7
Ma 1	6	10	12	14
Ma 2	6	10	12	16
Ma 3	7	10	12	15
Ma 4	6	10	12	16
Ma 5	6	9	11	14
Ma 6	6	10	12	15
Ma 7	8	10	13	17
Ma 8	6	10	12	15

Ma 724	mm/dia4	mm/dia5	mm/dia6	mm/dia7
Ma 1	6	8	10	11
Ma 2	7	10	13	14
Ma 3	5	8	10	13
Ma 4	5	8	10	13
Ma 5	5	9	10	12
Ma 6	5	7	9	13

Ma 7	5	10	11	13
Ma 8	5	9	10	12

Ma 725	mm/día4	mm/día5	mm/día6	mm/día7
Ma 1	6	9	11	13
Ma 2	6	10	11	12
Ma 3	5	8	11	13
Ma 4	5	9	11	12
Ma 5	5	8	10	13
Ma 6	6	9	11	13
Ma 7	6	9	11	13
Ma 8	6	9	11	13

Ma 726	mm/día4	mm/día5	mm/día6	mm/día7
Ma 1	4	5	8	8
Ma 2	4	6	7	9
Ma 3	4	6	8	9
Ma 4	4	6	7	8
Ma 5	5	7	9	10
Ma 6	4	7	9	9
Ma 7	5	6	7	9
Ma 8	5	7	9	10

Datos crudos de los cultivos duales y porcentajes de inhibición de *Botrytis cinerea* frente a aislamientos del género *Metarhizium*.

Tratamiento	Meta.	Botr.	% inhib.
	mm/día4	mm/día4	
1 CEP-722	6	42	1,8
	6	40	6,4
	5	39	8,8
	4	45	-5,3
	5	41	4,1
	6	42	1,8
	5	40	6,4
	6	40	6,4

Tratamiento	Meta.	Botr.	% inhib.
	mm/día5	mm/día5	
1 CEP-722	7	54	4,0
	8	50	11,1
	7	50	11,1
	6	57	-1,3
	6	46	18,2
	8	52	7,6
	8	52	7,6
	8	52	7,6

Tratamiento	Meta.	Botr.	% inhib.
	mm/día4	mm/día4	
2	5	42	1,8
	6	38	11,1

Tratamiento	Meta.	Botr.	% inhib.
	mm/día5	mm/día5	
2	8	55	2,2
	9	48	14,7

CEP-723	5	35	18,1
	5	40	6,4
	8	41	4,1
	8	41	4,1
	7	42	1,8
	8	41	4,1

7	43	23,6
7	54	4,0
9	52	7,6
10	52	7,6
10	51	9,3
10	52	7,6

Tratamiento 3 CEP-724	4	36	15,8
	6	44	-2,9
	7	42	1,8
	7	44	-2,9
	7	41	4,1
	7	45	-5,3
	7	43	-0,6
	7	43	-0,6

6	44	21,8
7	46	18,2
10	56	0,4
7	53	5,8
8	50	11,1
9	57	-1,3
9	54	4,0
9	54	4,0

Tratamiento 4 CEP-725	8	48	-12,3
	6	42	1,8
	5	45	-5,3
	6	40	6,4
	5	43	-0,6
	5	45	-5,3
	5	45	-5,3
	5	44	-2,9

9	56	0,4
8	54	4,0
7	53	5,8
9	53	5,8
8	53	5,8
8	52	7,6
7	54	4,0
8	54	4,0

Tratamiento 5 CEP-726	5	39	8,8
	5	46	-7,6
	5	44	-2,9
	4	44	-2,9
	4	42	1,8
	4	45	-5,3
	4	41	4,1
	4	45	-5,3

6	49	12,9
7	54	4,0
6	56	0,4
6	50	11,1
6	56	0,4
6	52	7,6
6	52	7,6
6	52	7,6

	Meta.	Botr.	
	mm/día6	mm/día6	% inhib.
Tratamiento 1 CEP-722	8	55	20,0
	8	50	27,3
	8	51	25,8

	Meta.	Botr.	
	mm/día7	mm/día7	% inhib.
8	55	31,3	
8	50	37,5	
8	51	36,3	

8	58	15,6
8	55	20,0
9	54	21,5
9	53	22,9
9	53	22,9

8	58	27,5
8	55	31,3
9	54	32,5
9	53	33,8
9	53	33,8

Tratamiento  
2  
CEP-723

9	57	17,1
11	54	21,5
9	50	27,3
9	51	25,8
10	52	24,4
12	53	22,9
11	55	20,0
11	54	21,5

9	57	28,8
11	54	32,5
10	55	31,3
10	54	32,5
10	52	35,0
12	53	33,8
11	55	31,3
11	54	32,5

Tratamiento  
3  
CEP-724

7	49	28,7
9	56	18,5
11	57	17,1
10	53	22,9
10	58	15,6
10	57	17,1
10	54	21,5
10	54	21,5

8	51	36,3
9	56	30,0
11	57	28,8
10	53	33,8
10	58	27,5
10	57	28,8
10	54	32,5
10	54	32,5

Tratamiento  
4  
CEP-725

10	57	17,1
10	57	17,1
8	55	20,0
11	55	20,0
9	56	18,5
9	52	24,4
9	54	21,5
9	54	21,5

10	57	28,8
10	57	28,8
8	55	31,3
11	55	31,3
9	56	30,0
9	52	35,0
9	54	32,5
9	54	32,5

Tratamiento  
5  
CEP-726

7	55	20,0
7	54	21,5
7	57	17,1
6	49	28,7
7	57	17,1
7	58	15,6
7	52	24,4

8	55	31,3
8	54	32,5
7	58	27,5
9	49	38,8
7	57	28,8
7	58	27,5
8	55	31,3

7	52	24,4
---	----	------

8	55	31,3
---	----	------

Datos crudos de los cultivos duales y porcentajes de inhibición de *Sclerotinia sclerotiorum* frente a aislamientos de hongos incluidos en el género *Metarhizium*.

	Meta. mm/día4	Scl. mm/día4	% inhib.
Tratamiento 1 CEP-722	7	43	-16,6
	4	40	-8,5
	5	45	-22,0
	6	24	34,9
	4	31	15,9
	6	35	5,1
	4	31	15,9
	6	35	5,1

	Meta. mm/día5	Scl. mm/día5	% inhib.
	8	57	3,4
	6	53	10,2
	7	59	0,0
	6	41	30,5
	8	39	33,9
	8	52	11,9
	6	40	32,2
	8	52	11,9

Tratamiento 2 CEP-723	6	31	15,9
	5	30	18,6
	5	29	21,4
	5	44	-19,3
	6	44	-19,3
	7	39	-5,8
	7	49	-32,9
	6	44	-19,3

	8	56	5,1
	7	45	23,7
	7	50	15,3
	7	63	-6,8
	9	59	0,0
	8	60	-1,7
	7	58	1,7
	9	59	0,0

Tratamiento 3 CEP-724	6	38	-3,1
	6	33	10,5
	6	35	5,1
	6	36	2,4
	7	53	-43,7
	6	30	18,6
	7	43	-16,6
	6	43	-16,6

	8	54	8,5
	9	52	11,9
	8	53	10,2
	7	51	13,6
	7	60	-1,7
	7	48	18,6
	9	61	-3,4
	8	61	-3,4

Tratamiento 4 CEP-725	6	26	29,5
	5	46	-24,7
	5	32	13,2
	5	44	-19,3
	6	30	18,6
	7	50	-35,6

	8	40	32,2
	7	59	0,0
	8	49	16,9
	8	58	1,7
	8	48	18,6
	8	60	-1,7

5	31	15,9
5	40	-8,5

7	46	22,0
7	56	5,1

Tratamiento 5 CEP-726	6	30	18,6
	5	33	10,5
	5	32	13,2
	5	37	-0,3
	4	21	43,1
	4	34	7,8
	4	40	-8,5
	4	34	7,8

8	48	18,6
7	46	22,0
7	46	22,0
8	53	10,2
7	35	40,7
6	55	6,8
6	61	-3,4
6	55	6,8

	Meta. mm/día6	Scl. mm/día6	% inhib.
Tratamiento 1 CEP-722	9	56	24,5
	7	54	27,2
	7	58	21,8
	7	56	24,5
	7	53	28,5
	8	55	25,8
	8	52	29,8
	7	57	23,1

	Meta. mm/día7	Scl. mm/día7	% inhib.
	9	60	25
	8	59	26,25
	8	60	25
	8	58	27,5
	8	56	30
	9	57	28,75
	9	55	31,25
	8	60	25

Tratamiento 2 CEP-723	8	57	23,1
	8	58	21,8
	8	58	21,8
	7	62	16,4
	9	59	20,4
	8	60	19,1
	7	58	21,8
	8	58	21,8

	9	62	22,5
	9	60	25
	9	60	25
	8	62	22,5
	10	60	25
	9	60	25
	8	60	25
	9	60	25

Tratamiento 3 CEP-724	8	56	24,5
	8	59	20,4
	10	60	19,1
	8	56	24,5
	8	58	21,8
	9	56	24,5
	9	60	19,1

	9	58	27,5
	9	60	25
	11	60	25
	9	60	25
	10	60	25
	10	58	27,5
	10	60	25

9	60	19,1
---	----	------

10	60	25
----	----	----

Tratamiento 4 CEP-725	10	53	28,5
	6	59	20,4
	8	56	24,5
	7	59	20,4
	8	54	27,2
	8	60	19,1
	7	57	23,1
	8	58	21,8

10	55	31,25
7	61	23,75
9	58	27,5
8	60	25
9	56	30
9	60	25
8	60	25
9	60	25

Tratamiento 5 CEP-726	8	60	19,1
	8	56	24,5
	7	64	13,7
	8	60	19,1
	8	48	35,2
	7	57	23,1
	6	61	17,7
	7	60	19,1

9	60,1	25
9	58	27,5
8	66	17,5
9	62	22,5
9	60	25
8	60	25
8	62	22,5
8	61	23,75

**Pruebas formales e informales de supuestos de normalidad y de homocedasticidad de varianza:**

**Testigos de aislamientos del género *Metarhizium* para el cuarto día de haber sido sembrados en placas de Petri para el ensayo con el patógeno *Botrytis cinerea*.**

Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks:

[Shapiro-Wilks \(modificado\)](#)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO mm/día 7	40	0,00	0,60	0,95	0,3330

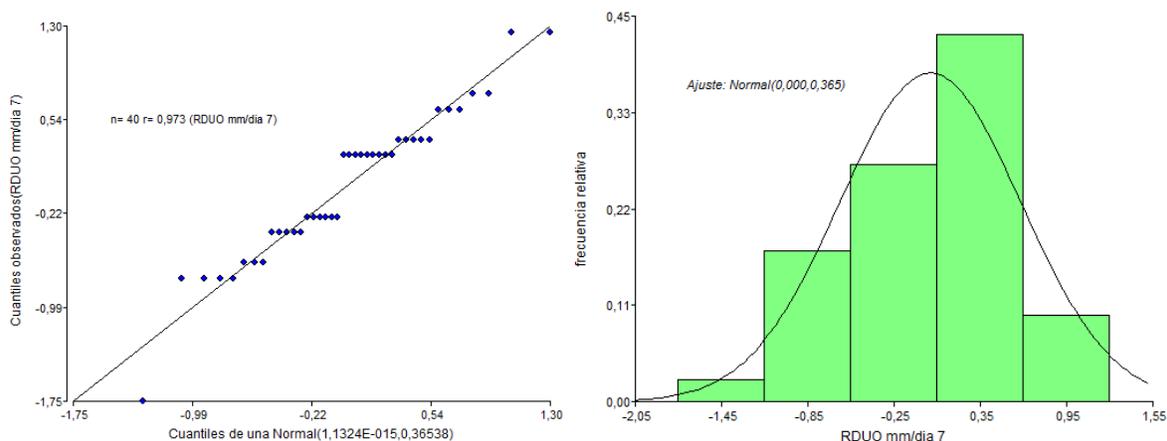
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene:

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS mm/día 7	40	0,07	0,00	67,22

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,30	4	0,07	0,66	0,6259
Tratamiento	0,30	4	0,07	0,66	0,6259
Error	3,95	35	0,11		
Total	4,25	39			

Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma:



Testigos de aislamientos del género *Metarhizium* para el cuarto día de haber sido sembrados en placas de Petri para el ensayo con el patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.

Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks:

**Shapiro-Wilks (modificado)**

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO mm/dia7	40	0,00	0,76	0,96	0,5229

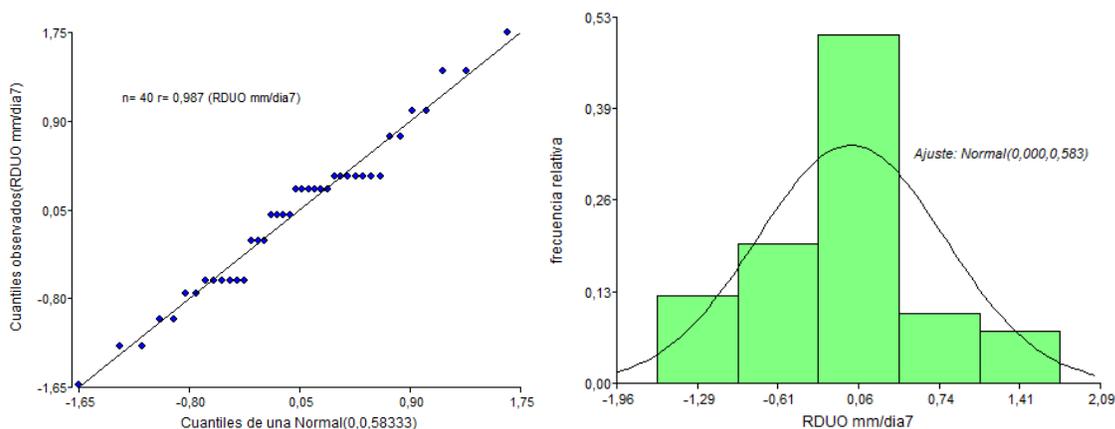
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene:

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS mm/dia7	40	0,12	0,02	74,22

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,96	4	0,24	1,19	0,3329
tratamiento	0,96	4	0,24	1,19	0,3329
Error	7,09	35	0,20		
Total	8,05	39			

Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma:



**Inhibición de crecimiento en placas de Petri de *Botrytis cinerea* frente a aislamientos del género *Metarhizium* para el cuarto día de haber sido sembrados.**

Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks:

**Shapiro-Wilks (modificado)**

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Inhib.día7	40	0,00	2,67	0,97	0,8026

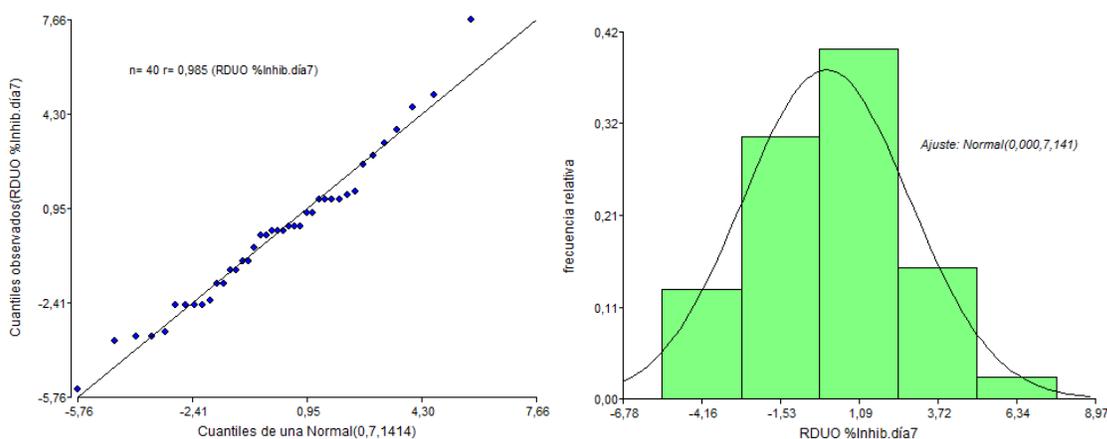
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene:

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS %Inhib día 7	40	0,08	0,00	85,81

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9,24	4	2,31	0,77	0,5545
Tratamientos	9,24	4	2,31	0,77	0,5545
Error	105,51	35	3,01		
Total	114,74	39			

Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma:



**Inhibición de crecimiento en placas de Petri de *Sclerotinia sclerotiorum* frente a del género *Metarhizium* para el cuarto día de haber sido sembrados.**

Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks:

**Shapiro-Wilks (modificado)**

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO % Inhib.día 7	40	0,00	2,11	0,97	0,7333

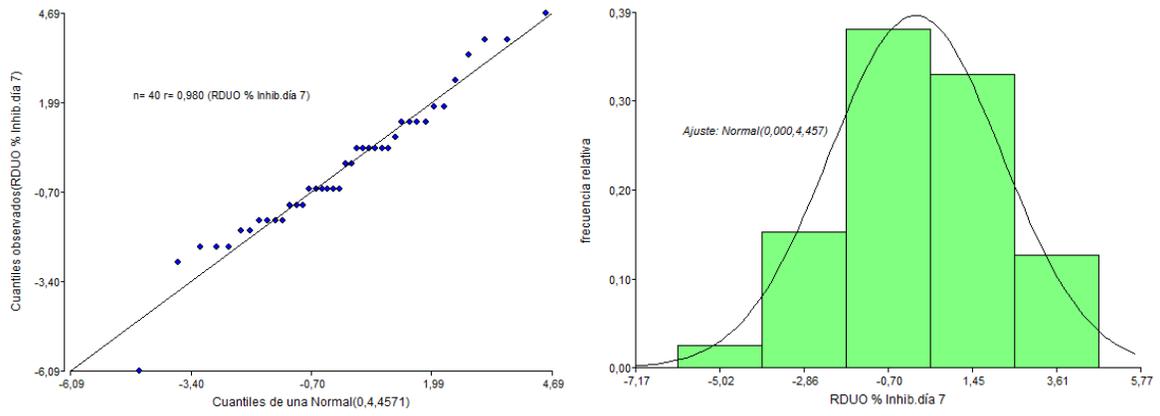
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene:

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS % Inhib. día7	40	0,21	0,12	73,52

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	13,73	4	3,43	2,34	0,0744
Tratamiento	13,73	4	3,43	2,34	0,0744
Error	51,40	35	1,47		
Total	65,13	39			

Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma:



## Anexo 2.

**Tablas de valores observados en ensayo promoción de crecimiento de plantines de tomate inoculados con aislamientos del género *Trichoderma*.**

Diámetro de tallo (mm):

	Trat.	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bloque 5	Bloque 6	Bloque 7
1	Control	5	5	5,5	5,5	5	5	5
2	Cep-745	5	5,5	6	5	6,5	6	6
3	Cep-749	6	6	6	6	6	5,5	6
4	Cep-751	6	6,5	6	6,5	6,5	6	6
5	Cep-752	6	6,5	6,5	6,5	5	6,5	6
6	Cep-753	6	5,5	6,5	6,5	6,5	6	6
7	Cep-754	6	6	5,5	6	6,5	6	6

Longitud de tallo (mm):

	Trat.	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bloque 5	Bloque 6	Bloque 7
1	Control	235	168	190	186	177	172	185
2	Cep-745	200	220	210	212	210	227	218
3	Cep-749	177	206	210	200	192	210	185
4	Cep-751	185	198	195	205	200	198	191
5	Cep-752	201	200	205	198	189	185	221
6	Cep-753	223	185	190	205	203	248	199
7	Cep-754	227	195	203	208	210	210	223

Peso de tallo (g):

	Trat.	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bloque 5	Bloque 6	Bloque 7
1	Control	10,51	9,03	9,13	10,6	6,8	7,12	9,88
2	Cep-745	10,54	9,32	9,06	8,03	14,32	12,53	10,65
3	Cep-749	8,66	12,72	12,86	10,8	11,23	10,56	8,72

4	Cep-751	10,85	12,36	10,12	10,64	11,86	11,82	7,62
5	Cep-752	10,64	10,63	14,37	10,02	7,85	8,4	9,56
6	Cep-753	13,09	9,43	12,27	12,98	15,03	15,42	11,58
7	Cep-754	11,59	10,45	10,81	12,05	14,01	12,06	14,06

**Valores observados en ensayo promoción de crecimiento de plantines de tomate inoculados con aislamientos del género *Trichoderma*.**

Diámetro de tallo (mm):

Trat.	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bloque 5	Bloque 6	Bloque 7
Control	5	5	5	5	5	5,5	5
Cep-745	5	5,5	6	5	6	6	5,5
Cep-749	6	6	5,5	6	6	6	6
Cep-751	6,5	6,5	6	6,5	6,5	6,5	6
Cep-752	6	6,5	6,5	6,5	5	6,5	5
Cep-753	6,5	6	6,5	6,5	6	6	6
Cep-754	6	6	5,5	6	6,5	6	6

Longitud de tallo (mm):

Trat.	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bloque 5	Bloque 6	Bloque 7
Control	167	197	178	160	183	175	169
Cep-745	209	223	203	120	209	222	221
Cep-749	198	216	220	201	196	214	193
Cep-751	187	202	210	216	201	197	207
Cep-752	210	201	200	194	194	190	214
Cep-753	221	198	197	210	206	229	209
Cep-754	227	210	209	203	214	209	224

Peso de tallo (g):

Trat.	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bloque 5	Bloque 6	Bloque 7
Control	9,13	8,93	7,12	10,6	9,03	9,88	10,04
Cep-745	11,55	10,33	9,23	9,03	14,09	12,44	11,01
Cep-749	10,44	11,78	13,05	10,3	11,94	11,43	8,99
Cep-751	11,12	12,44	10,65	10,44	12,03	12,04	8,9
Cep-752	13,04	11,2	14,02	9,98	8,93	9,03	10,03
Cep-753	12,39	11,03	12,05	13,05	14,96	15,05	12,6
Cep-754	12,33	11,23	11,03	12,32	14,23	13,04	13,97

**Análisis de varianza, comparaciones de medias, gráfico de barras, pruebas formales e informales de supuestos de normalidad y de homocedasticidad de varianza primer ensayo promoción de crecimiento:**

Análisis de varianza y comparaciones de medias y gráfico de barras para diámetro de tallo:

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Diám. tallo (mm)	49	0,39	0,30	7,14

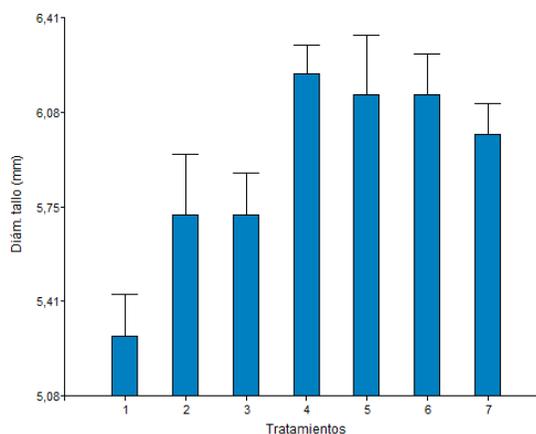
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,70	6	0,78	4,43	0,0015
Tratamientos	4,70	6	0,78	4,43	0,0015
Error	7,43	42	0,18		
Total	12,13	48			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,69587

Error: 0,1769 gl: 42

Tratamientos	Medias	n	E.E.
1	5,29	7	0,16 A
3	5,71	7	0,16 A B
2	5,71	7	0,16 A B
7	6,00	7	0,16 B
5	6,14	7	0,16 B
6	6,14	7	0,16 B
4	6,21	7	0,16 B



Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para diámetro de tallo:

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Diám. tallo (mm)	49	0,00	0,39	0,94	0,0503

Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para diámetro de tallo:

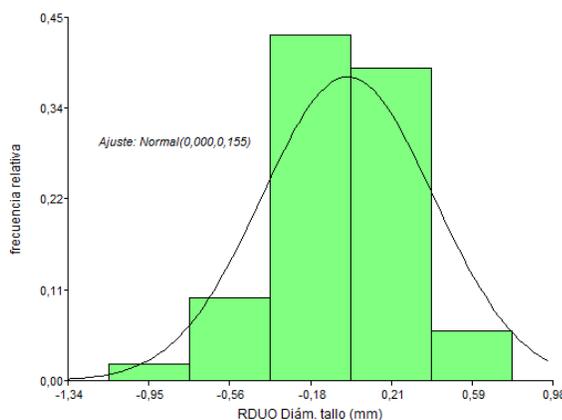
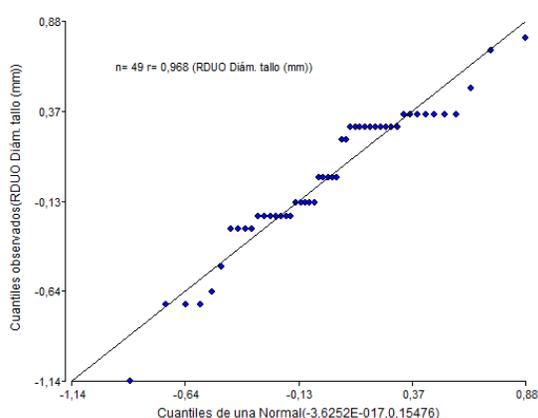
**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS Diám. tallo (mm)	49	0,19	0,07	68,82

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,47	6	0,08	1,64	0,1593
Tratamientos	0,47	6	0,08	1,64	0,1593
Error	2,01	42	0,05		
Total	2,48	48			

Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para diámetro de tallo:



Análisis de varianza y comparaciones de medias y gráfico de barras para longitud de tallo:

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Long. tallo (mm)	49	0,55	0,49	5,05

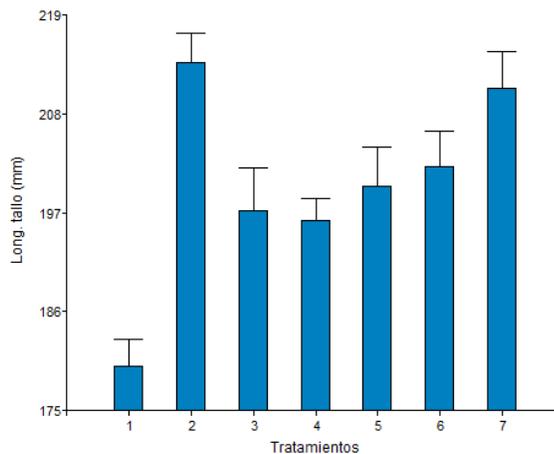
**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5251,10	6	875,18	8,58	<0,0001
Tratamientos	5251,10	6	875,18	8,58	<0,0001
Error	4283,71	42	101,99		
Total	9534,82	48			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=16,71047

Error: 101,9932 gl: 42

Tratamientos	Medias	n	E.E.
1	179,71	7	3,82 A
4	196,00	7	3,82 A B
3	197,14	7	3,82 B
5	199,86	7	3,82 B C
6	202,14	7	3,82 B C
7	210,86	7	3,82 B C
2	213,86	7	3,82 C



Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para longitud de tallo:  
[Shapiro-Wilks \(modificado\)](#)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Long. tallo (mm)	49	0,00	9,45	0,97	0,6687

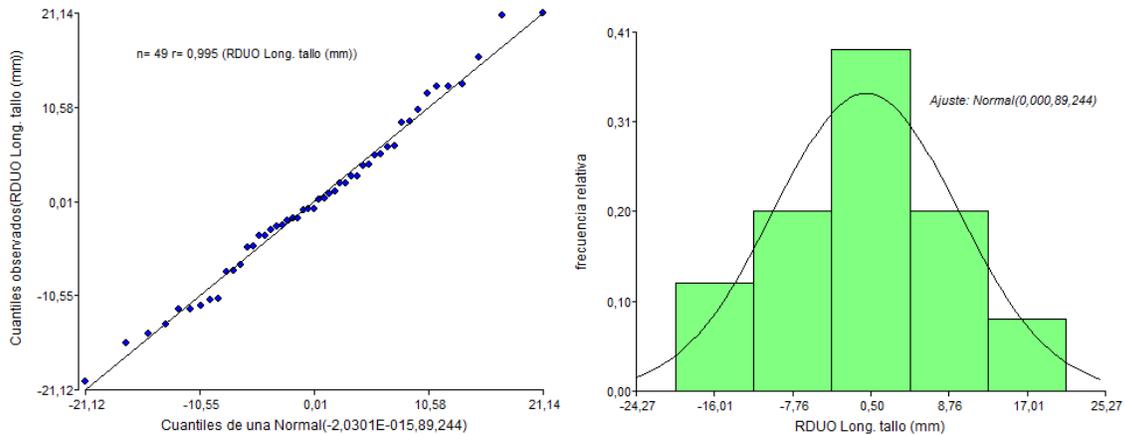
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para longitud de tallo:  
[Análisis de la varianza](#)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS Long. tallo (mm)	49	0,09	0,00	80,81

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	138,56	6	23,09	0,65	0,6883
Tratamientos	138,56	6	23,09	0,65	0,6883
Error	1487,64	42	35,42		
Total	1626,21	48			

Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para longitud de tallo:



Análisis de varianza y comparaciones de medias y gráfico de barras para peso aéreo:

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso aéreo (g)	49	0,32	0,23	16,65

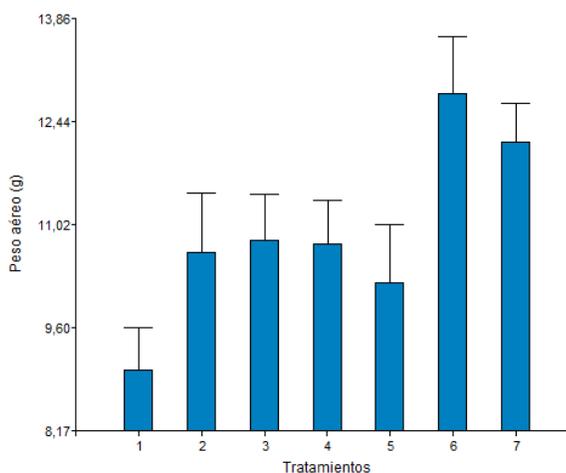
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	65,98	6	11,00	3,33	0,0089
Tratamientos	65,98	6	11,00	3,33	0,0089
Error	138,61	42	3,30		
Total	204,59	48			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,00596

Error: 3,3004 gl: 42

Tratamientos	Medias	n	E.E.
1	9,01	7	0,69 A
5	10,21	7	0,69 A B
2	10,64	7	0,69 A B
4	10,75	7	0,69 A B
3	10,79	7	0,69 A B
7	12,15	7	0,69 B
6	12,83	7	0,69 B



Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para peso aéreo:

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Peso aéreo (g)	49	0,00	1,70	0,97	0,5778

Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para peso aéreo:

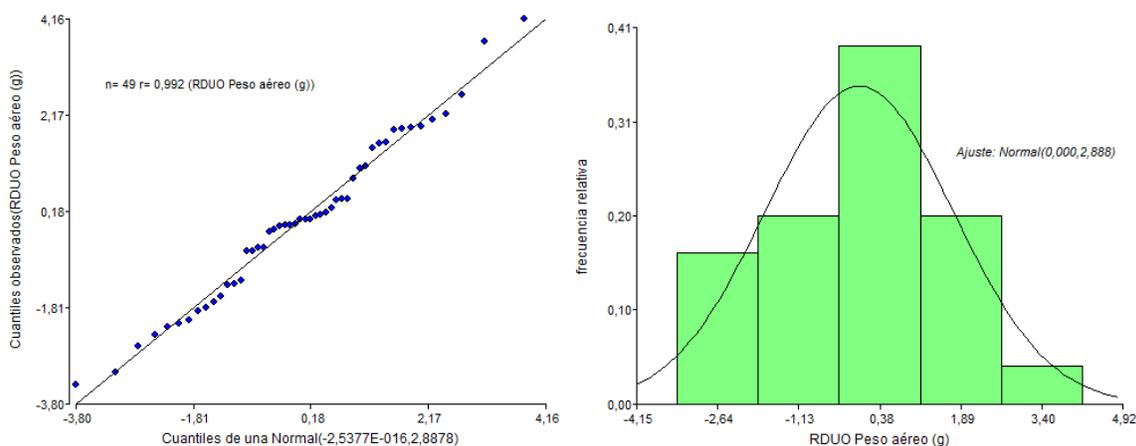
Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS Peso aéreo (g)	49	0,03	0,00	86,25

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,71	6	0,28	0,22	0,9666
Tratamientos	1,71	6	0,28	0,22	0,9666
Error	53,31	42	1,27		
Total	55,02	48			

Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para peso aéreo:



**Pruebas formales e informales de supuestos de normalidad y de homocedasticidad de varianza segundo ensayo:**

Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para diámetro de tallo:

[Shapiro-Wilks \(modificado\)](#)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Diám. tallo (mm)	49	0,00	0,36	0,95	0,1870

Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para diámetro de tallo:

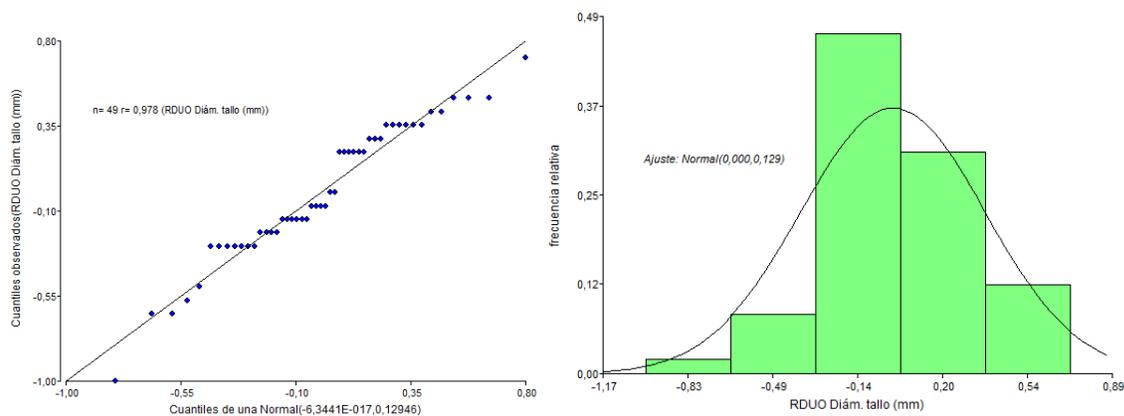
[Análisis de la varianza](#)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS Diám. tallo (mm)	49	0,10	0,00	65,22

[Cuadro de Análisis de la Varianza \(SC tipo III\)](#)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,18	6	0,03	0,80	0,5728
Tratamientos	0,18	6	0,03	0,80	0,5728
Error	1,61	42	0,04		
Total	1,80	48			

Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para diámetro de tallo:



Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para longitud de tallo:

**Shapiro-Wilks (modificado)**

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Long. tallo (mm)	49	0,00	8,93	0,95	0,1729

Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para longitud de tallo:

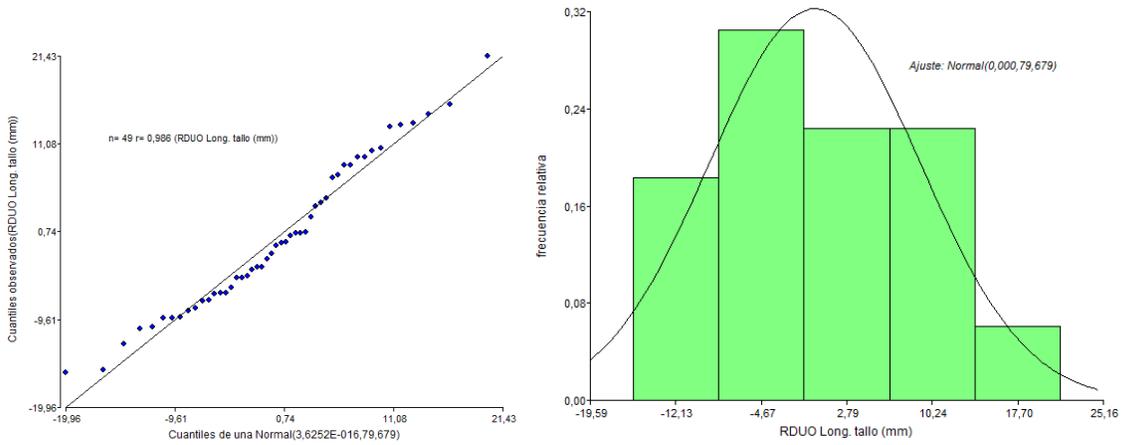
**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS Long. tallo (mm)	49	0,08	0,00	68,64

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	87,90	6	14,65	0,57	0,7499
Tratamientos	87,90	6	14,65	0,57	0,7499
Error	1074,95	42	25,59		
Total	1162,85	48			

Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para longitud de tallo:



Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para peso aéreo:

**Shapiro-Wilks (modificado)**

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Peso aéreo (g)	49	0,00	1,36	0,95	0,1620

Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para peso aéreo:

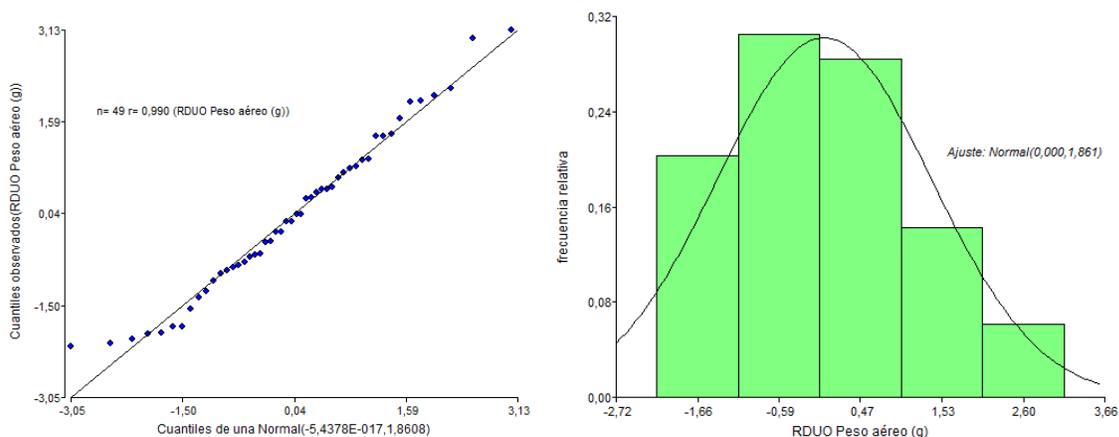
**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS Peso aéreo (g)	49	0,13	2,6E-03	69,57

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,66	6	0,61	1,02	0,4251
Tratamientos	3,66	6	0,61	1,02	0,4251
Error	25,12	42	0,60		
Total	28,78	48			

Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para peso aéreo:



**Valores observados en el primer ensayo de promoción de crecimiento de plántines de tomate inoculados con aislamientos del género *Metarhizium*.**

Diámetro de tallo (mm):

		Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bloque 5	Bloque 6	Bloque 7
1	Control	5,5	5	5	5	5	5	5,5
2	Cep -722	6	5,5	5,5	6	6	5,5	6
3	Cep -723	6	6	6	6	6	5,5	5,5
4	Cep -724	6,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,6
5	Cep -725	5,5	6	5,5	5	5,5	5,5	5,5
6	Cep -726	6,5	6	6	5,5	5,5	6	6,5

Longitud de tallo (mm):

	Trat	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bloque 5	Bloque 6	Bloque 7
1	Control	245	253	238	247	231	220	257
2	Cep -722	305	272	281	305	277	266	278
3	Cep -723	256	286	247	313	245	281	274
4	Cep -724	284	248	251	272	293	277	312

5	Cep -725	247	253	248	256	239	267	256
6	Cep -726	258	273	271	260	257	266	313

Peso de tallo (g):

		Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bloque 5	Bloque 6	Bloque 7
1	Control	10,34	8,12	9,7	10,6	11,59	6,35	10,09
2	Cep -722	11,09	12,58	11,15	12,88	13,81	8,92	12,6
3	Cep -723	11,92	13,51	12,17	15,75	10,13	10,48	10,31
4	Cep -724	13,74	11,64	10,12	11,99	12,53	9,36	13,86
5	Cep -725	9,46	9,17	11,49	11,28	9,74	9,29	10,53
6	Cep -726	12,23	11,34	10,47	10,2	9,37	9,01	12,95

**Tablas de valores observados en el segundo ensayo de promoción de crecimiento de plántines de tomate inoculados con aislamientos del género *Metarhizium*.**

Diámetro de tallo (mm):

	Trat	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bloque 5	Bloque 6	Bloque 7
1	Control	4	4,5	5	5	5	5	5
2	Cep -722	5,5	5	6	5	6	6	6,5
3	Cep -723	5	5	5	5	6	5,5	6
4	Cep -724	5	5	5,5	6	5,5	6	5,5
5	Cep -725	5	5	5,5	5	5	5	5
6	Cep -726	5	5,5	6	5,5	6	6	5

Longitud de tallo (mm):

	Trat	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bloque 5	Bloque 6	Bloque 7
1	Control	270	286	279	296	308	261	273
2	Cep -722	305	291	312	329	336	355	321
3	Cep -723	331	315	351	305	371	321	305

4	Cep -724	332	284	375	345	335	336	341
5	Cep -725	281	347	338	331	327	321	310
6	Cep -726	311	355	298	310	319	337	341

Peso de tallo (g):

	Trat	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bloque 5	Bloque 6	Bloque 7
1	Control	9,39	9,75	9,89	9,9	12,41	9,5	11,11
2	Cep -722	10,21	10,31	11,93	10,08	14,49	11,3	11,55
3	Cep -723	10,95	10,11	11,16	12,15	13,06	11,01	9,82
4	Cep -724	9,15	10,05	9,63	12,01	12,89	11,56	9,87
5	Cep -725	8,66	12,77	13,01	11,62	13,75	13,84	10,02
6	Cep -726	11,07	12,35	10,54	12,12	12,62	13,43	12,91

**Análisis de varianza, comparaciones de medias, gráfico de barras, pruebas formales e informales de supuestos de normalidad y de homocedasticidad de varianza en el primer ensayo de promoción de crecimiento:**

Análisis de varianza y comparaciones de medias y gráfico de barras para diámetro de tallo:

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Diam. Tallo	42	0,48	0,41	5,50

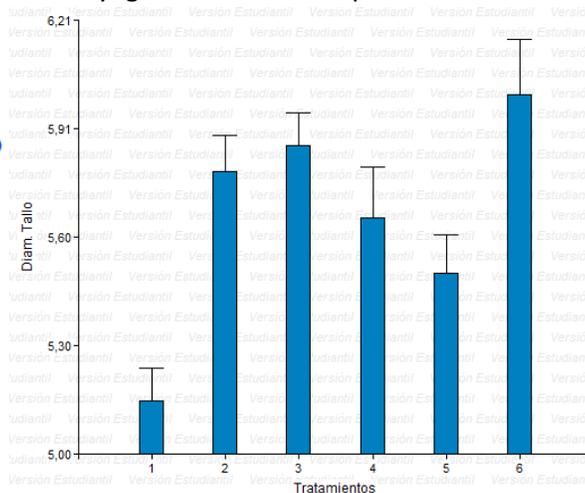
**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,24	5	0,65	6,71	0,0002
Tratamiento	3,24	5	0,65	6,71	0,0002
Error	3,48	36	0,10		
Total	6,72	41			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,49999

Error: 0,0967 gl: 36

Tratamiento	Medias	n	E.E.
1,00	5,14	7	0,12 A
5,00	5,50	7	0,12 A B
4,00	5,66	7	0,12 B C
2,00	5,79	7	0,12 B C
3,00	5,86	7	0,12 B C
6,00	6,00	7	0,12 C



Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para diámetro de tallo:

**Shapiro-Wilks (modificado)**

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Diam. Tallo	42	0,00	0,29	0,95	0,2775

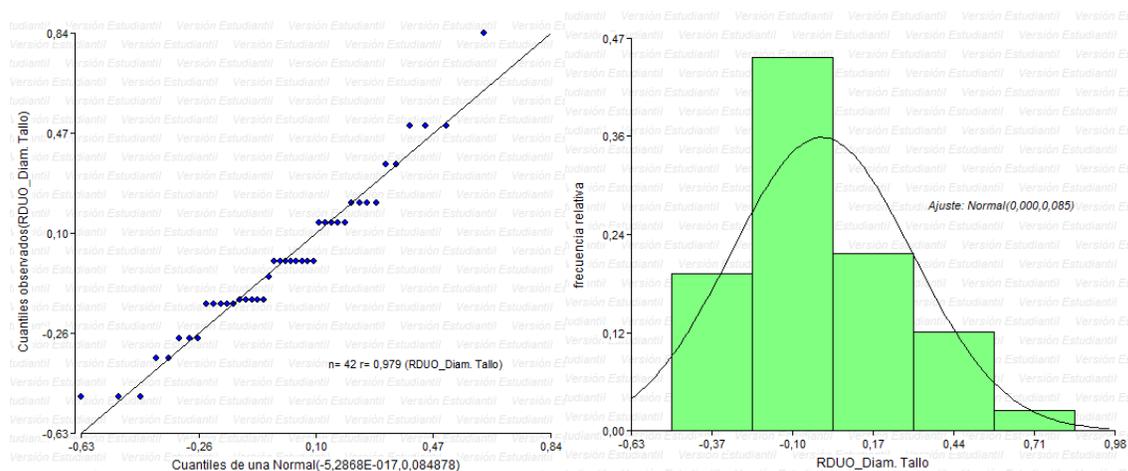
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para diámetro de tallo:

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS Diam. Tallo	42	0,06	0,00	88,08

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,08	5	0,02	0,44	0,8180
Tratamiento	0,08	5	0,02	0,44	0,8180
Error	1,36	36	0,04		
Total	1,44	41			

Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para diámetro de tallo:



## Análisis de varianza y comparaciones de medias y gráfico de barras para longitud de tallo:

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Long. Tallo	42	0,43	0,35	6,81

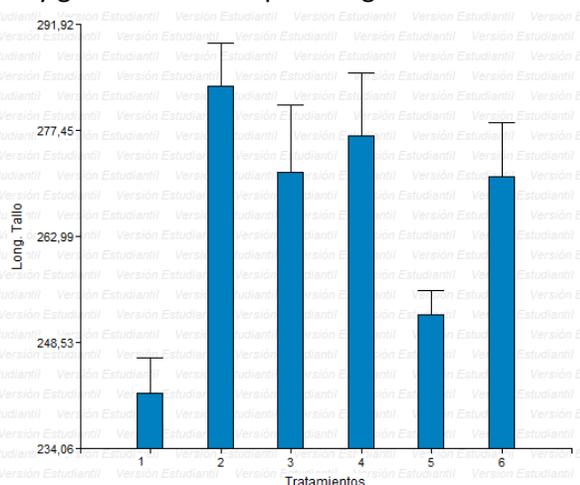
### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8836,57	5	1767,31	5,38	0,0009
Tratamiento	8836,57	5	1767,31	5,38	0,0009
Error	11830,57	36	328,63		
Total	20667,14	41			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=29,15267

Error: 328,6270 gl: 36

Tratamiento	Medias	n	E.E.
1,00	241,57	7	6,85 A
5,00	252,29	7	6,85 A B
6,00	271,14	7	6,85 B C
3,00	271,71	7	6,85 B C
4,00	276,71	7	6,85 B C
2,00	283,43	7	6,85 C



## Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para longitud de tallo:

### Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Long. Tallo	42	0,00	16,99	0,94	0,1552

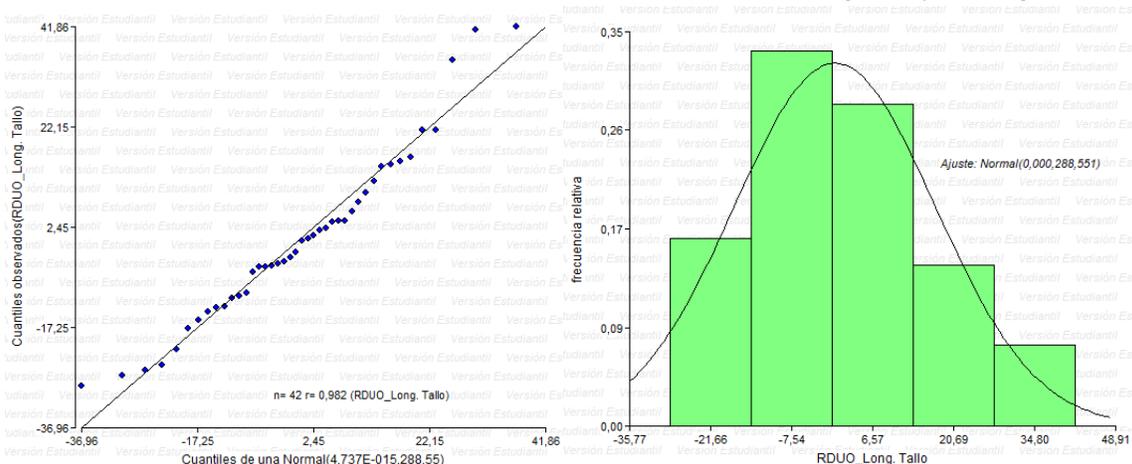
## Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para longitud de tallo:

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS Long. Tallo	42	0,15	0,03	82,20

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	726,55	5	145,31	1,28	0,2920
Tratamiento	726,55	5	145,31	1,28	0,2920
Error	4072,72	36	113,13		
Total	4799,27	41			

## Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para longitud de tallo:



Análisis de varianza y comparaciones de medias y gráfico de barras para peso aéreo:

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso Aéreo	42	0,29	0,19	14,69

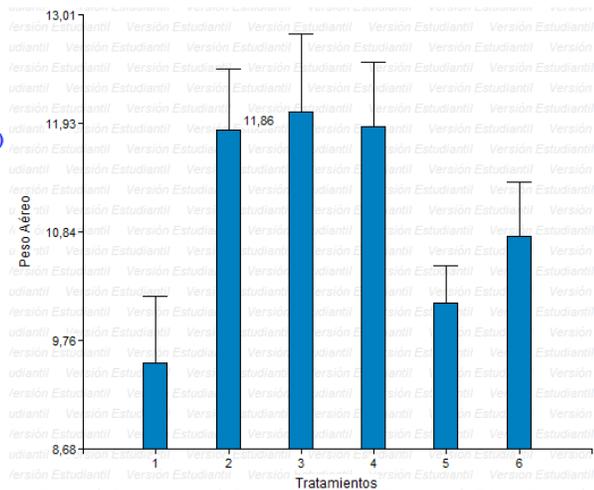
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	38,62	5	7,72	2,94	0,0253
Tratamiento	38,62	5	7,72	2,94	0,0253
Error	94,72	36	2,63		
Total	133,34	41			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,60858

Error: 2,6312 gl: 36

Tratamiento	Medias	n	E.E.
1,00	9,54	7	0,61 A
5,00	10,14	7	0,61 A
6,00	10,80	7	0,61 A
2,00	11,86	7	0,61 A
4,00	11,89	7	0,61 A
3,00	12,04	7	0,61 A



Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para peso aéreo:

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Peso Aéreo	42	0,00	1,52	0,98	0,8603

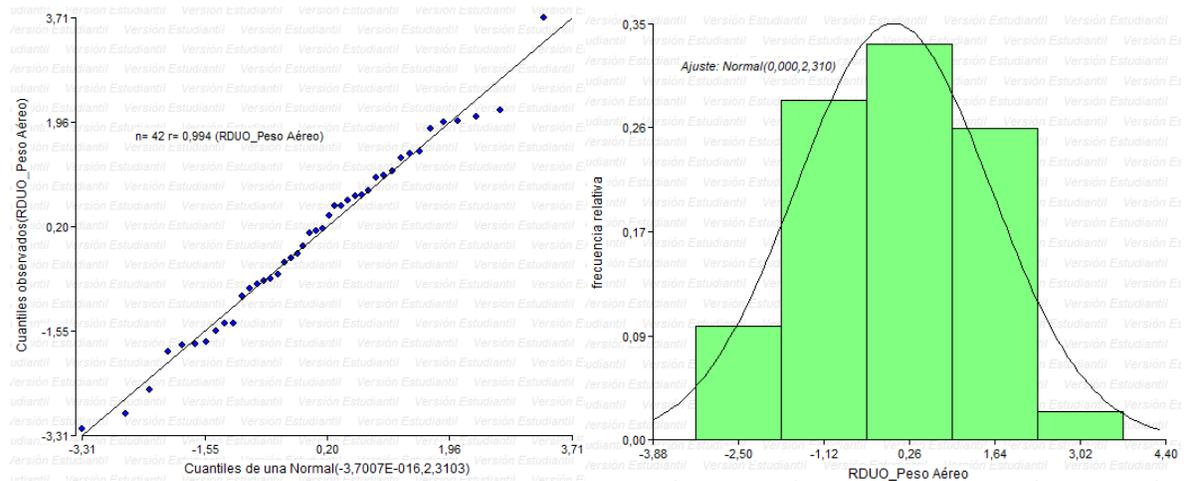
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para peso aéreo:

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS Peso Aéreo	42	0,06	0,00	72,52

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,84	5	0,37	0,46	0,8035
Tratamiento	1,84	5	0,37	0,46	0,8035
Error	28,86	36	0,80		
Total	30,70	41			

Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para peso aéreo:



Pruebas formales e informales de supuestos de normalidad y de homocedasticidad de varianza en el segundo ensayo:

Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para diámetro de tallo:

**Shapiro-Wilks (modificado)**

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Diam. Tallo	42	0,00	0,40	0,95	0,2240

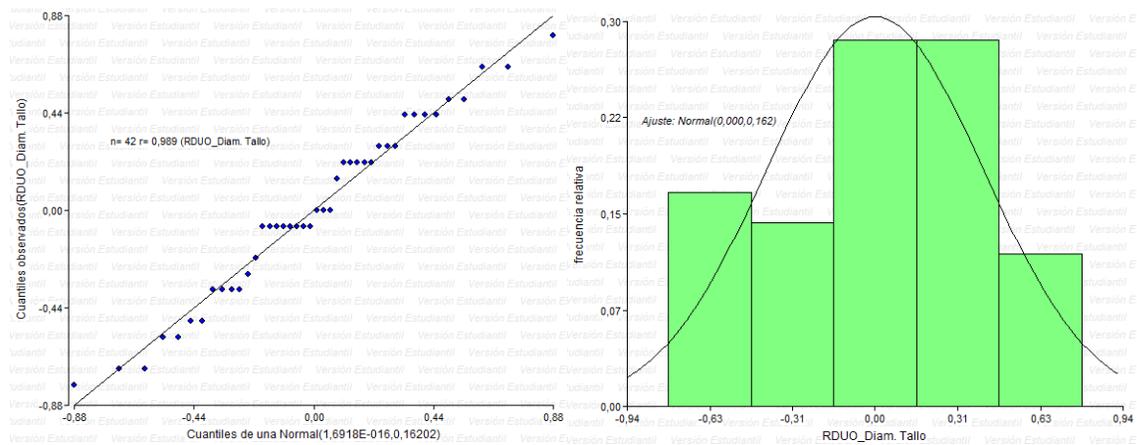
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para diámetro de tallo:

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS Diam. Tallo	42	0,23	0,13	65,71

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,51	5	0,10	2,20	0,0753
Tratamientos	0,51	5	0,10	2,20	0,0753
Error	1,66	36	0,05		
Total	2,16	41			

Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para diámetro de tallo:



Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para longitud de tallo:  
**Shapiro-Wilks (modificado)**

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Long. Tallo	42	0,00	20,69	0,98	0,9323

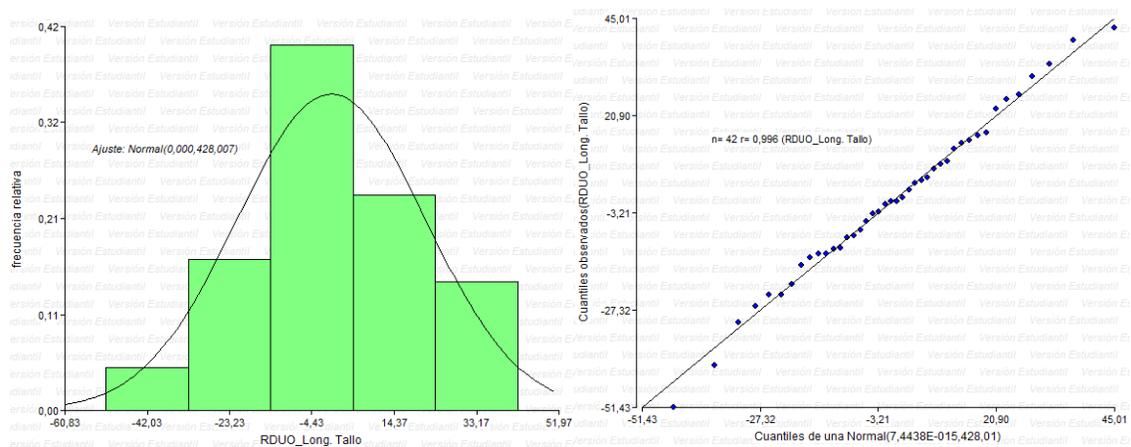
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para longitud de tallo:

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS Long. Tallo	42	0,02	0,00	83,70

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	164,24	5	32,85	0,18	0,9679
Tratamientos	164,24	5	32,85	0,18	0,9679
Error	6522,05	36	181,17		
Total	6686,29	41			

Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para longitud de tallo:



Prueba formal de normalidad de varianza, Shapiro-Wilks para peso aéreo:

**Shapiro-Wilks (modificado)**

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Peso Aéreo	42	0,00	1,31	0,98	0,9149

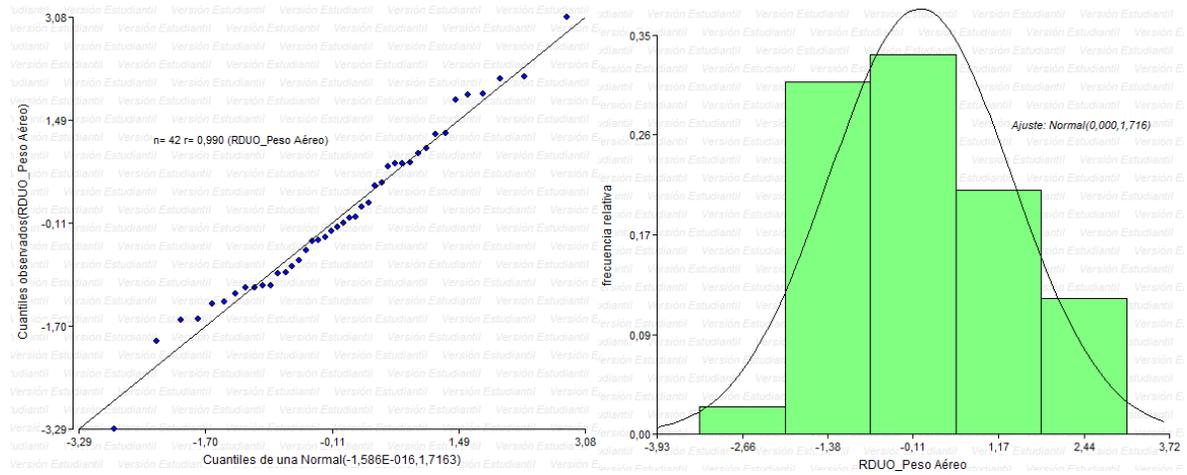
Prueba formal de homocedasticidad de varianza, Levene para peso aéreo:

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS Peso Aéreo	42	0,14	0,02	71,84

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,42	5	0,68	1,20	0,3288
Tratamientos	3,42	5	0,68	1,20	0,3288
Error	20,53	36	0,57		
Total	23,95	41			

### Prueba informal de normalidad de varianza, Gráfico de Q-Q Plot e Histograma para peso aéreo:



### Anexo 3.

**Resultados y salidas del programa R, para el primer y segundo ensayo de parasitismo con cepas de hongos:**

Primer ensayo - (Versión : R 4.2.1):

Modelos lineales generalizados mixtos:

Especificación del modelo en R:

```
mlgm.modelo.004_muertes_ML<-  
glmer(muertes~1+tratamiento+(1|planta)+(1|hoja)  
,family=myFamily  
,na.action=na.omit  
,nAGQ=1  
,offset=NULL  
,data=R.data04)
```

Resultados para el modelo: `mlgm.modelo.004_muertes_ML`:

*Variable dependiente: muertes*

General:

```
Familia Enlace nAGQ  
poisson log 1
```

Medidas de ajuste del modelo:

```
N AIC BIC logLik Deviance  
105 330,55 343,82 -160,27 117,52  
AIC y BIC menores implica mejor
```

Pruebas de hipótesis marginales (Wald) para los efectos fijos:

```
Source numDF denDF F-value p-value  
tratamiento 2 102 78,02 <0,0001
```

Efectos fijos:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z )
(Intercept)	3,38	0,06	52,44	<0,0001
tratamientoT2	-6,25	0,71	-8,84	<0,0001
tratamientoT3	-6,25	0,71	-8,84	<0,0001

Parámetros de los efectos aleatorios:

RndEff	Param	Var	SD
hoja	(Intercept)	0,02	0,14
planta	(Intercept)	1,1E-03	0,03

Muertes - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento:

*Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0*

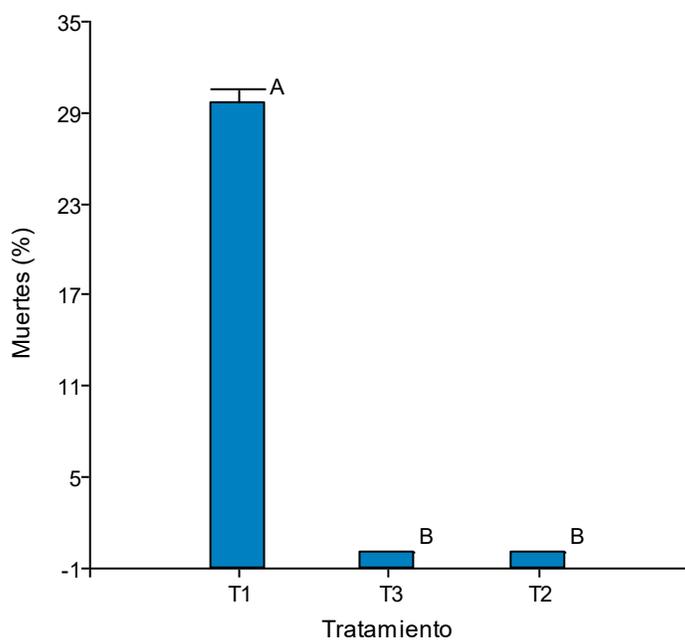
*LSD Fisher (Alfa=0,05)*

*Procedimiento de corrección de p-valores: No*

tratamiento	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
T1	3,38	0,06	29,31	1,89	A
T2	-2,87	0,71	0,06	0,04	B
T3	-2,87	0,71	0,06	0,04	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

Gráfico de barras de la media de muertes por infección fúngica:



## Segundo ensayo - (Versión: R 4.2.1).

Modelos lineales generalizados mixtos:

Especificación del modelo en R:

```
mlgm.modelo.000_Muertes_ML<-  
glmer (Muertes~1+Tratamiento+(1|Planta)+(1|Hoja)  
,family=myFamily  
,na.action=na.omit  
,nAGQ=1  
,offset=NULL  
,data=R.data00)
```

Resultados para el modelo: mlgm.modelo.000\_Muertes\_ML:

*Variable dependiente: Muertes*

General:

Familia	Enlace	nAGQ
poisson	log	1

Medidas de ajuste del modelo:

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
105	400,64	413,91	-195,32	175,58

*AIC y BIC menores implica mejor*

Pruebas de hipótesis marginales (Wald) para los efectos fijos:

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
Tratamiento	2	102	176,00	<0,0001

Efectos fijos:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z )
(Intercept)	-1,49	0,36	-4,14	<0,0001
TratamientoT1	4,72	0,35	13,32	<0,0001
TratamientoT2	2,6E-05	0,50	5,2E-05	>0,9999

**Parámetros de los efectos aleatorios:**

RndEff	Param	Var	SD
Hoja	(Intercept)	0,02	0,14
Planta	(Intercept)	0,01	0,09

**Muertes - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento:**

*Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0*

*LSD Fisher (Alfa=0,05)*

*Procedimiento de corrección de p-valores: No*

Tratamiento	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
T1	3,24	0,07	25,41	1,90	A
T2	-1,49	0,36	0,23	0,08	B
Control	-1,49	0,36	0,23	0,08	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

**Gráfico de barras de la media de muertes por infección fúngica:**

