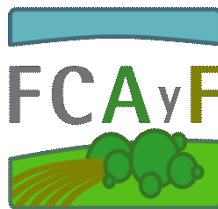


**Selección y efectividad del uso de aislamientos de *Trichoderma* spp.  
para el control del Cancro Bacteriano (*Clavibacter michiganensis*  
subsp. *michiganensis*) del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**

---

**Tesis presentada para optar al título de  
Magister en Protección Vegetal  
de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
Universidad Nacional de La Plata**

Ing. Raquel Guerrero



**UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA**

**2016**

**DIRECTORA:**

Dra. Cecilia Mónaco

**JURADO:**

Dra. Laura Gasoni

Dra. María Marta Reynoso

Dr. Eduardo Wright

**FECHA DE DEFENSA:**

15 de Junio del 2016

*A David y María Victoria.*

*A mi familia.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi agradecimiento para el Gobierno Nacional de la República del Ecuador que a través de su Programa de Becas de Posgrado "Convocatoria Abierta 2012 – Primera Fase" de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia y Tecnología del Ecuador (SENESCYT) me concedió una beca para obtener mi formación de Maestría.

A la Dra. Cecilia Mónaco por su invaluable guía, colaboración y amistad sincera.

A la Dra. María Rosa Simón, Directora de la Maestría en Protección Vegetal, por el apoyo brindado durante mis estudios.

A la Dra. Marina Stocco e Ing. Jorgelina Roller por su colaboración en el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Laura Gasoni, Dra. María Martha Reynoso y Dr. Eduardo Wright por las observaciones y el tiempo dedicado a la evaluación de este trabajo.

Al Centro de Investigaciones en Fitopatologías (CIDEFI) de la Universidad Nacional de la Plata, de manera especial a su Director Ing. Pedro Ballati y su grupo de investigadores por las facilidades prestadas en la realización de la presente tesis.

A mis compañeras y compañeros de aula por la amistad y el apoyo brindado durante el transcurso de nuestros estudios.

## INDICE GENERAL

1. INTRODUCCION .....	1
1.1. Antecedentes .....	1
1.2. Cancro Bacteriano del tomate .....	3
1.2.1. Hospedantes y dispersión de la enfermedad .....	3
1.2.2. Mecanismos y proceso de infección .....	4
1.2.3. Detección de la enfermedad .....	5
1.2.4. Síntomas .....	5
1.2.5. Manejo de la enfermedad .....	6
1.3. <i>Trichoderma</i> spp. y el control biológico de enfermedades .....	8
1.3.1. Mecanismos de acción .....	10
1.4. Objetivos .....	13
1.4.1. Objetivo general .....	13
1.4.2. Objetivos específicos .....	14
1.5. Hipótesis .....	14
2. MATERIALES Y METODOS .....	15
2.1. Aislamiento e identificación de <i>Trichoderma</i> spp. ....	15
2.1.1. Muestreo .....	15
2.1.2. Preparación de las muestras .....	15
2.1.3. Medio y técnica de cultivo .....	15
2.1.4. Evaluación .....	16

2.1.5. Observación morfológica, identificación y conservación.....	16
2.2. Obtención de colonias del patógeno .....	16
2.2.1. Aislamiento e identificación .....	16
2.2.2. Conservación.....	17
2.3. Evaluación del efecto <i>Trichoderma</i> spp. sobre el crecimiento de <i>C. m. michiganensis</i> .....	17
2.3.1. Obtención cultivos de <i>C. m. michiganensis</i> y hongos antagonistas.....	17
2.3.2. Inoculación e incubación .....	17
2.3.3. Evaluación.....	19
2.3.4. Diseño experimental y análisis estadístico .....	19
2.4. Evaluación del efecto de <i>Trichoderma</i> spp. sobre la infección de <i>C. m. michiganensis</i> en plantas de tomate en condiciones de invernáculo.....	20
3. RESULTADOS .....	25
3.1. Aislamiento e identificación de <i>Trichoderma</i> spp. ....	25
3.2. Evaluación del efecto <i>Trichoderma</i> spp. sobre el crecimiento de <i>C. m. michiganensis</i> .....	26
3.2.1. Porcentajes de supresión .....	26
3.2.2. Porcentajes de colonización.....	29
3.3. Evaluación del efecto de <i>Trichoderma</i> spp. sobre la infección de <i>C. m. michiganensis</i> en plantas de tomate en condiciones de invernáculo.....	29
3.3.1. Altura de plantas, número de flores y frutos.....	29
3.3.2. Presencia/ausencia de la enfermedad.....	34
4. DISCUSION .....	39

4.1. Aislamiento e identificación de <i>Trichoderma</i> spp. ....	39
4.2. Evaluación del efecto <i>Trichoderma</i> spp. sobre el crecimiento de <i>C. m. michiganensis</i> .....	40
4.3. Evaluación del efecto de <i>Trichoderma</i> spp. sobre la infección de <i>C. m. michiganensis</i> en plantas de tomate en condiciones de invernáculo.....	41
4.3.1. Altura de plantas, número de flores y frutos.....	41
4.3.2. Presencia/ausencia de la enfermedad.....	42
4.3.3. Evaluación de la colonización de los biocontroladores y del peso seco en plantas tratadas .....	43
5. CONCLUSIONES GENERALES .....	45
6. BIBLIOGRAFIA .....	46
7. ANEXOS .....	56
7.1. Datos meteorológicos de los meses de Agosto a Octubre de los años 2014 y 2015 obtenidos en la Estación Experimental Ing. Agr. J. Hirschhorn (UNLP, 2016). ...	56

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Número de colonias obtenidas por gramo de suelo de cada muestra.....	25
<b>Tabla 2.</b> Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) de los porcentajes de supresión resultantes para cada tratamiento.....	27
<b>Tabla 3.</b> Porcentajes de colonización bacteriana promedios registrados en la confrontación de <i>C. m. michiganensis</i> con aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp., 72 horas después de la inoculación.....	27
<b>Tabla 4.</b> Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) de los porcentajes de colonización resultantes para cada tratamiento.....	27
<b>Tabla 5.</b> Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) de la altura de plantas (cm) registrados a las cinco semanas después del trasplante.....	32
<b>Tabla 6.</b> Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) del número de flores por planta registrado a las cinco semanas después del trasplante.....	32
<b>Tabla 7.</b> Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) número de frutos por planta registrados a las ocho semanas después del trasplante.....	34
<b>Tabla 8.</b> Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) de los porcentajes de plantas sanas registrados a las ocho semanas después del trasplante.....	35
<b>Tabla 9.</b> Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) del peso seco de raíces registrado a las ocho semanas después del trasplante.....	36
<b>Tabla 10.</b> Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) del peso seco total registrado a las ocho semanas después del trasplante.....	38



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Gráfica descriptiva del crecimiento simultáneo de <i>C. m. michiganensis</i> y <i>Trichoderma</i> spp., en donde: S es el diámetro de acción del antagonista (crecimiento del antagonista y de la bacteria visiblemente afectada), I es el diámetro del halo de inhibición (sin crecimiento bacteriano) y C es el diámetro del crecimiento bacteriano.	18
<b>Figura 2.</b> 1) Plantines de tomate de 15 días de edad, 2) Plantas de tomate luego del trasplante, 3) Inoculación del patógeno, 4) Cámaras húmedas, 5) Hoja con bordes necrosados y 6) Plantas en bandejas antes de ingresar a estufa para secado.....	24
<b>Figura 3.</b> Porcentajes de supresión del crecimiento bacteriano de colonias de <i>C. m. michiganensis</i> ejercidos por aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. registrados a las 72 horas luego de la inoculación. ....	26
<b>Figura 4.</b> 1 y 2) Crecimiento de <i>C. m. michiganensis</i> en los testigos a las 72 horas después de la inoculación, 3-8) Crecimiento simultáneo de <i>C. m. michiganensis</i> y aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. a las 72 horas de la inoculación.....	28
<b>Figura 5.</b> Halos de inhibición en colonias de <i>C. m. michiganensis</i> en crecimiento simultáneo con aislamiento A4 de <i>Trichoderma</i> spp. ....	29
<b>Figura 6.</b> Promedios de altura de plantas (cm) registrados cinco semanas después del trasplante. ....	30
<b>Figura 7.</b> Promedios de número de flores por planta registrados cinco semanas después del trasplante .....	31
<b>Figura 8.</b> Número de frutos por planta ocho semanas después del trasplante. ....	33
<b>Figura 9.</b> Porcentajes de plantas sanas registrados ocho semanas después del trasplante	35
<b>Figura 10.</b> Promedios de peso seco de raíces por planta registrados ocho semanas después del trasplante. ....	37
<b>Figura 11.</b> Promedios de peso seco de plantas registrados ocho semanas después del trasplante. ....	38

**ABREVIATURAS Y SIMBOLOS**

<b>AN</b>	Agar nutritivo
<b>cm</b>	centímetro
<b>Cmm</b>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
<b>g</b>	gramo
<b>h</b>	hora
<b>kg</b>	kilogramo
<b>ml</b>	mililitro
<b>mm</b>	milímetro
<b>NBY</b>	Nutrient broth yeast (Caldo nutritivo levadura)
<b>APG</b>	Agar papa glucosado
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>TSM</b>	<i>Trichoderma</i> selective media (Medio selectivo de <i>Trichoderma</i> )
<b>UFC</b>	unidades formadoras de colonia
<b>spp.</b>	especies
<b>°C</b>	grados centígrados
<b>%</b>	por ciento

## RESUMEN

En la presente investigación se evaluaron aislamientos de *Trichoderma* spp., obtenidos de plantaciones de tomate del Cinturón Hortícola Platense, para controlar el desarrollo *in vitro* de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, al igual que su efecto para prevenir el Cancro Bacteriano en plantas de tomate en condiciones de invernáculo. Se obtuvieron nueve aislamientos de *Trichoderma* spp. a partir de muestras de suelo usando la técnica de dilución seriada. A través de una prueba *in vitro* se evaluó su capacidad para suprimir e inhibir el crecimiento del patógeno, encontrándose que todos ellos suprimían el crecimiento de la bacteria en medio de cultivo entre 14 y 16%, aunque sólo uno de ellos (aislamiento A4) inhibió aproximadamente en un 15,76% el desarrollo de la bacteria. En condiciones de invernáculo, se evaluó el efecto de cinco aislamientos de *Trichoderma* spp. aplicados en plántulas de tomate susceptibles al patógeno de quince días de edad mediante dos métodos de aplicación: (1) al suelo durante el trasplante y (2) foliar tres días antes de la inoculación del patógeno. A los diez días después del trasplante, se realizó la inoculación del patógeno atomizando una suspensión bacteriana con una concentración aproximada de  $1 \times 10^7$  UFC/ml. Cinco semanas después del trasplante se evaluó: altura de plantas, número de flores y frutos, encontrándose diferencias estadísticas entre las plantas tratadas con los biocontroladores y los testigos. Las plantas con aplicación foliar presentaron promedios mayores a las con aplicación al suelo. Ocho semanas después del trasplante se evaluó la presencia de la enfermedad en función de la sintomatología. Aproximadamente la mitad de las plantas del testigo del patógeno presentaron síntomas asociados a la enfermedad: bordes de folíolos secos, retraso en el crecimiento y marchitamiento leve generalizado. Los biocontroladores tuvieron un efecto positivo sobre las plantas tratadas que presentaron mejores condiciones sanitarias que los testigos, al igual que mayor desarrollo vegetativo y acumulación de materia seca.

## ABSTRACT

In this research, *Trichoderma* spp. isolates collected from tomato fields in the “Cinturón Hortícola Platense” were evaluated *in vitro* against of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, as well as its effect to prevent the bacterial canker in glasshouse conditions. Nine strains of *Trichoderma* spp. were obtained from soil samples using the serial dilution method. Its ability to suppress and inhibit pathogen growth was evaluated in an *in vitro* assay. All *Trichoderma* isolates showed ability to suppress the bacterial growth between 14 and 16%, just isolate A4 was capable to inhibit the pathogen development in 15.76%, approximately. Under glasshouse conditions, five *Trichoderma* spp. isolates were inoculated in 15 days seedlings using two methods: (1) soil inoculation during the transplant and (2) leaf inoculations three days before pathogen inoculation. Ten days after the transplant, the pathogen was inoculated by spraying a bacterial suspension with  $1 \times 10^7$  CFU/ml, approximately. Five weeks after the transplant plant height, number of flowers and fruits were evaluated; results showed there were statistical differences between biocontrol treatments and the control. Tomato seedlings with leaves treated had bigger averages than those with soil inoculation. After eight weeks from transplant, disease symptomatology was evaluated. Approximately, 50% of pathogen control plants showed symptoms associated with the pathogen under glasshouse conditions, such us: marginal necrosis of leaflets and generalized slight wilting; the biocontrol strains had a positive effect over treated seedlings which were healthier than control ones, as well as they had better vegetative development and dry mass accumulation.

# 1. INTRODUCCION

## 1.1. Antecedentes

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es la segunda hortaliza de mayor importancia a nivel mundial después de la papa (Viteri *et al.* 2013). Lozano (2012) sostiene que la producción de hortalizas en la República Argentina tiene como uno de sus principales protagonistas el cultivo de tomate especialmente bajo el sistema de cultivos protegidos. Según Argerich *et al.* (2011) la producción estimada hortalizas es de 10.500.000 toneladas, de cuales el 65% corresponde a nueve especies, entre ellas, el tomate. Se estima que 17.800 hectáreas de cultivo se producen en todo el territorio nacional tanto para consumo fresco como para la industria, para el mercado interno e internacional (Asociación Tomate 2000 2014).

El aporte del Cinturón Hortícola del Gran Buenos Aires es de suma importancia debido a que su producción tiene como principal destino los doce millones de habitantes del área metropolitana de Buenos Aires, la población de provincia de Buenos Aires y otros mercados nacionales distantes. De las 2000 hectáreas que componen esta gran zona productiva, el 70% de esta superficie y las plantaciones de tomate están ubicadas en el Partido de La Plata y alrededores formando el Cinturón Hortícola Platense (Argerich *et al.* 2011). Sin embargo, el potencial productivo de los cultivares de tomate en la región se ve afectado constantemente por problemas de carácter fitosanitario (Polack & Mitidieri 2005).

Flores (2012), señala que la enfermedad conocida como Cancro Bacteriano es la enfermedad de origen bacteriano de mayor importancia económica en el país tanto por las pérdidas de plantas, frutos de menor tamaño o en menor cantidad como también por la falta de un control efectivo (Colombo 2002, Borboa *et al.* 2009). Argerich *et al.* (2011) indican que es la enfermedad vascular más importante en el cultivo de tomate de invernadero, confirmando el estatus que mantiene a nivel mundial como uno de los mayores problemas sanitarios del cultivo de tomate (Agrawal *et al.* 2012, Gartemann *et al.* 2003, Sandoval 2004).

El Cancro Bacteriano es una enfermedad causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Davis *et al.* 1984, Smith 1910) que se caracteriza por ser

devastadora (OEPP/EPPO 2013). Puede causar pérdidas de entre 50 a 100% de la producción según EFSA (2014), el patógeno tiene la capacidad de sobrevivir en los restos de cosechas y estructuras de los invernaderos en cultivos protegidos y de diseminarse fácilmente cuando tiene condiciones favorables que propician el desarrollo de las infecciones lo que hace más complejo su manejo (Flores 2012).

Las alternativas disponibles para reducir la presencia de la enfermedad se enfocan principalmente en la prevención y exclusión, el uso de cultivares resistentes no está disponible al momento dado que todos los materiales de tomate al presente son susceptibles a la enfermedad (Colombo 2002, De León *et al.* 2011, Gartemann *et al.* 2003, Sandoval 2004, Xu *et al.* 2010).

A nivel mundial no existen alternativas químicas eficientes para el control de las enfermedades bacterianas en tomate (Balestra *et al.* 2009). El uso de compuestos cúpricos y antibióticos han mostrado efecto sobre el patógeno (Milijacevic *et al.* 2009, Sandoval 2004); sin embargo, han sido cuestionados por los efectos tóxicos y su potencial acumulación en los suelos y organismos vivos. Adicionalmente, día a día existe mayor presión social para la búsqueda de alternativas de control más amigables con el medio ambiente y que no tengan efectos negativos sobre la salud humana (Borboa *et al.* 2010, Butt *et al.* 2001, Flores 2004, Pouvova *et al.* 2008, Zanón 2009), sin que haya actualmente una herramienta que permita reducir la incidencia de la enfermedad a niveles considerables. Por dichas razones algunos investigadores se atreven a decir que esta enfermedad es una de las más difíciles de controlar en el cultivo de tomate (Burokiene 2006).

Los aislamientos del género *Trichoderma* spp. están siendo usados para el control biológico de enfermedades en los principales cultivos de importancia económica a nivel mundial (Chaverri *et al.* 2011, De Souza *et al.* 2008, Elad *et al.* 1981, Samuels 2006). Varias especies han sido exitosamente usadas tanto para aplicaciones en invernáculo como en plantaciones en campo (Hjeljord & Tronsmo 1998). Siendo un habitante común del suelo este hongo ha demostrado poseer una alta capacidad para reducir las infecciones causadas por un amplio rango de patógenos asociados a problemas vasculares (Harman *et al.* 2004, Hjeljord & Tronsmo 1998). Adicionalmente, dada su

versatilidad al momento de actuar frente a los patógenos, *Trichoderma* spp. ofrece un mayor rango de acción que no ha sido superado fácilmente por otros agentes de control biológico (Harman *et al.* 2004, Samuels 2006). Por estas razones, siendo un habitante natural del fitoplasma del cultivo de tomate en el cinturón hortícola Platense (Alippi & Mónaco 1990, Mónaco 1990), se propuso en la presente investigación aislar cepas de este organismo y evaluarlas a nivel *in vitro* y de invernáculo con la finalidad de que a futuro pueda desarrollarse una alternativa no sólo más efectiva para el control del Cancro Bacteriano sino también acorde a las exigencias ambientales de nuestra época.

## **1.2. Cancro Bacteriano del tomate**

El cancro bacteriano del tomate fue inicialmente reportada en Estados Unidos por Erwin F. Smith en invernaderos de tomate en Michigan (Agrawal *et al.* 2012, CABI & EPPO 1999). Originalmente descrita bajo el nombre de *Bacterium*, luego de varias modificaciones en su nomenclatura emprendidas por Davis *et al.* (1984) fue definido como *Clavibacter* (EFSA 2014). Basados en características fenotípicas y bioquímicas, marcadores moleculares y huéspedes específicos, *Clavibacter michiganensis* ha sido subdividida en seis subespecies. Todas aquellas que son patogénicas para tomate son agrupadas en subespecie *michiganensis* y a través de estudios se ha determinado que las cepas que atacan al pimiento son diferentes de las cepas patogénicas para el tomate (EFSA 2014).

### **1.2.1. Hospedantes y dispersión de la enfermedad**

El patógeno es un bacilo aerobio Gram positivo que no produce endosporas (EFSA 2014), habitante del suelo y permanece en las cubiertas de las semillas (Agrawal *et al.* 2012).

El tomate es el principal hospedante natural de *C. m. michiganensis* (Eichenlaub & Burger 2006), al igual que el pimiento y algunas malezas solanáceas en las que ha sido encontrado esporádicamente (EFSA 2014). En inoculaciones artificiales ha sido patogénico para trigo, frejol, maíz, avena, melón, sandía entre otros (CABI & EPPO 1999).

La importancia relativa de cada fuente de inóculo depende mayormente de las condiciones ambientales y del sistema de cultivo. Las semillas son el mayor medio de dispersión a larga distancia, pudiendo sobrevivir años a bajas concentraciones y provocar la transmisión a plántulas; adicionalmente, puede sobrevivir en rastrojos de cultivo en el suelo (Agrawal *et al.* 2012, Chang *et al.* 1991, EFSA 2014). El patógeno es altamente resistente a la desecación comparado con otras bacterias patógenas (EFSA 2014).

La dispersión de la enfermedad en el campo o bajo invernáculo es favorecida por el agua (lluvia o riego) y prácticas culturales que como la poda y el desbrote contribuyen a su rápida dispersión pudiendo llegar a niveles epidémicos (Agrawal *et al.* 2012, CABI & EPPO 1999, Chang *et al.* 1991, EFSA 2014).

### **1.2.2. Mecanismos y proceso de infección**

La bacteria tiene la capacidad de ingresar por varias vías, de ellas las heridas (naturales o provocadas) y los hidátodos son las principales entradas (Eichenlaub & Burger 2006, Sharabani *et al.* 2013, Tancos *et al.* 2013). La infección de las semillas ocurre a través de una ruta vascular pero también después de la penetración de las paredes del ovario o partes de las flores (EFSA 2014).

La enfermedad está influenciada por el suelo y condiciones ambientales. En estudios realizados por Chang *et al.* (1991), la temperatura óptima del suelo y del aire para el desarrollo de la enfermedad fue superior a 28°C. En el mismo estudio el periodo de incubación y la severidad del cáncer estuvieron influenciados por la temperatura, edad de la planta, concentración del inóculo y el cultivar. Por su parte, Eichenlaub & Burger (2006) sostienen que la temperatura optima sería entre 25 y 28°C y agregan que el tiempo de generación es bastante alto, con una temperatura máxima de 35°C.

El periodo entre la infección y la expresión de los síntomas es variable, en un rango de 7 a 84 días y está determinado por la temperatura, edad de la planta, características del suelo y el estado nutritivo de la planta, junto con la densidad de la población bacteriana la cual necesita exceder  $10^7$  UFC/g de peso fresco antes que los



síntomas sean expresados (EFSA 2014), generalmente existe un largo periodo de latencia antes de que los síntomas aparezcan (CABI & EPPO 1999).

Las plantas jóvenes son más susceptibles y cuando están infectadas son a menudo asintomáticas (EFSA 2014); sin embargo, bajo condiciones naturales las plantas de tomate son susceptibles durante toda su vida (CABI & EPPO 1999).

### **1.2.3. Detección de la enfermedad**

La detección de la enfermedad en semillas y en plántulas proveen una alternativa para excluir la enfermedad y su dispersión a través del material de propagación (EFSA 2014). Se han desarrollado un amplio rango de métodos de detección de la enfermedad en muestras con y sin síntomas sin importar el tipo de muestras (hojas, tallo, semilla). Los extractos de semillas son evaluados directamente (por métodos inmunológicos), por siembra en medios semi-selectivos o por extracción de ADN (CABI & EPPO 1999, EFSA 2014).

### **1.2.4. Síntomas**

Algunos síntomas pueden ser confundidos con los causados por *Ralstonia solanacearum*, *Fusarium* spp. o *Verticillium* spp. (EFSA 2014). Los síntomas en las plantas hospederas van a depender si la infección es sistémica o superficial (Lelis 2013) y varían además de acuerdo al lugar de producción (invernáculo o campo), edad de la planta al momento de la infección, prácticas culturales, cultivar, etc. (OEPP/EPPO 2013).

De manera general, los principales síntomas son marchitamiento unilateral de las hojas que luego se extiende a todas las hojas y estrías necróticas que pueden aparecer desde la parte inferior del peciolo hasta el punto que se une con el tallo. Bajo ciertas condiciones la bacteria se localiza en los vasos xilemáticos donde puede causar cavidades que contienen depósitos granulares viscosos y masas de bacterias (CABI & EPPO 1999). En los tallos y peciolos pueden aparecer bandas color café que podrían llegar a dividirse para exponer las cavidades amarillentas a pardas rojizas, dando el síntoma de cáncer (Agrawal *et al.* 2012, CABI & EPPO 1999, EFSA 2014).

Adicionalmente, es característico que los bordes de folíolos inferiores aparezcan secos y curvados hacia abajo (Borboa *et al.* 2009, Gartemann *et al.* 2003, Utkhede & Koch 2004). Con condiciones favorables provoca la muerte de la planta (OEPP/EPPO 2013), bajo condiciones menos favorables se pueden presentar retrasos en el marchitamiento (EFSA 2014).

Cuando se trata de infecciones sistémicas infecta los tejidos vasculares de las plantas y los abandona sólo en estados avanzados para entrar en los tejidos circundantes en donde después degrada paredes celulares creando maceraciones de los tejidos (Eichenlaub & Burger 2006). Los frutos se caen al desarrollarse o maduran de manera desigual, este síntoma se encuentra menos frecuentemente en invernáculo que en cultivos a campo (EFSA 2014, OEPP/EPPO 2013). Los síntomas típicos de "ojo de pájaro" en los frutos son infrecuentes en cultivos de invernáculo, estas manchas tienen un centro café oscuro, elevado y rodeado de un halo blanco distintivo (CABI & EPPO 1999, EFSA 2014).

Si la infección ocurre en estadios tardíos del desarrollo de la planta, comúnmente se desarrollan en las hojas manchas café oscura rodeadas de una área amarillanaranja, usualmente ubicadas al final de la hoja (OEPP/EPPO 2013), la planta puede sobrevivir y generar frutos (Gartemann *et al.* 2003). El patógeno puede producir manchas en hojas, peciolo y frutos como resultado de infecciones locales (EFSA 2014).

#### **1.2.5. Manejo de la enfermedad**

El control de *C. m. michiganensis* depende de la precisión y de su detección en estadios tempranos de la infección (Burokienė 2006). Las estrategias de control deben enfocarse primariamente en invernáculo a fin de prevenir infecciones severas y pérdidas en campo (Milijasevic *et al.* 2009).

El uso de semilla sana es el primero y más importante método de control (Xu 2010, CABI & EPPO 1999). Los tratamientos de semillas (químicos y físicos) reducen las poblaciones de la bacteria aunque las infecciones internas no puedan ser eliminadas (Agrawal *et al.* 2012, EFSA 2014).

Una vez que la enfermedad aparece en el cultivo, estrictas medidas de higiene tales como la erradicación de plantas y el aislamiento de hileras infectadas acompañadas de desinfección de estructuras y equipo pueden minimizar las pérdidas de producción (CABI & EPPO 1999).

No existe un producto químico que controle eficientemente la enfermedad, una vez que se instaló en el cultivo (Kronka 2004). La baja eficiencia de los antibióticos y de los fungicidas cúpricos, han provocado el surgimiento de poblaciones resistentes (Milijasevic *et al.* 2009, Kronka 2004).

En la búsqueda de soluciones, la combinación de estrategias de manejo integrado ha mostrado ser más eficiente que el uso de una sola estrategia de control (Tlatilpa 2010). En este contexto se han evaluado extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas, encontrándose algunas de ellas con potencial efecto antibiótico contra la enfermedad en condiciones laboratorio e invernáculo (Balestra *et al.* 2009, Borboa *et al.* 2009, Pouvova *et al.* 2008, Talibi *et al.* 2011).

*Bacillus subtilis* ha sido evaluado en un estudio realizado por Tlatilpa (2010). En dicho estudio, el biocontrolador actuó a través de la inducción de resistencia que junto con una buena nutrición redujeron la enfermedad. Por otra parte, Flores (2004) también resaltó el control de la enfermedad por cepas de *Bacillus* spp., al igual que Utkhede & Koch (2004) quienes demostraron que productos de *B. subtilis* tuvieron potencial para el control de la enfermedad en invernáculo. A pesar de estos reportes favorables para el biocontrolador, en estudios *in vitro* aislamientos de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. no ejercieron control sobre la bacteria (Ślusarski 2009).

Utkhede & Koch (2004) evaluaron el efecto de aplicaciones de un producto comercial formulado a base de *Trichoderma* spp. aplicado a las hojas y demostraron que el mismo fue efectivo en el control de la enfermedad.

En la actualidad, no existen cultivares con niveles de tolerancia aceptables o resistencia a la enfermedad (EFSA 2014). Aparentemente, los materiales comerciales actualmente disponibles en el mercado no fueron desarrollados buscando resistencia a la enfermedad a diferencia de otras enfermedades, tales como, la fusariosis,

*damping-off*, etc. (Kronka 2004). El uso de inductores de resistencia como el Acibenzolar-S-Metil (ASM) ha mostrado ejercer una reducción significativa de la severidad del cancro bacteriano usado solo o combinado con otros productos fitosanitarios (Kronka 2004). La biofumigación también ha sido evaluada para controlar la bacteria (Zanón 2009); sin embargo, la incidencia de la enfermedad no disminuyó con la biofumigación y el tratamiento con biosolarización controló efectivamente el patógeno.

### **1.3. *Trichoderma* spp. y el control biológico de enfermedades**

*Trichoderma* spp. es un género que ha sido investigado y evaluado como agente de control biológico durante años, algunas de sus especies han sido ampliamente estudiadas y sus efectos positivos en plantas aplicadas han colaborado para que se amplíe su comercialización a nivel mundial. Este agente biocontrolador es generalmente considerado de vida libre en el suelo pero hay evidencia que sugiere que puede ser simbiote oportunista y avirulento, así como parásito de otros hongos (Harman *et al.* 2004). Ha sido aislado de muchos suelos alrededor del mundo, por lo que algunas de sus especies pueden ser consideradas cosmopolitas, como *T. harzianum*, o limitadas a una región geográfica como *T. viride* (Liu *et al.* 2008, Samuels 2006).

Eilenberg *et al.* (2001) definen el biocontrol o control biológico como "el uso de organismos para suprimir la densidad de población o el impacto de una plaga específica, haciéndolo menos abundante o reduciendo su daño".

Hjeljord & Tronsmo (1998) sostienen que los organismos de control biológico y en especial *Trichoderma* spp. pueden reaccionar a cambios en su hábitat de maneras inalcanzables por los fungicidas químicos, tanto por su capacidad para competir ecológicamente como por atacar patógenos que ya están establecidos o aquellos que llegarán después. Aclaran también que las medidas de control biológico no poseen la capacidad de erradicar al patógeno o su daño y si bien la reducción del nivel de severidad de la enfermedad es la medida más obvia de efectividad de un tratamiento, reducir niveles de enfermedad en futuros cultivos es también un indicativo de control.

Cada vez con mayor frecuencia los aislamientos de *Trichoderma* spp. son evaluados cuidadosamente en el laboratorio, para luego ser llevados a estudios a campo, en donde muchas veces muestran un comportamiento variable (González *et al.* 2005, Hjeljord & Tronsmo 1998, Liu *et al.* 2008, Papavizas 1981).

Algunos factores ambientales tienen una influencia sobre la eficacia de biocontrol de *Trichoderma* spp., tales como, la temperatura, la humedad y el pH, la disponibilidad de nutrientes, la presencia de pesticidas, iones metálicos y bacterias antagonistas en el suelo. La temperatura junto con la humedad influyen sobre la germinación de las esporas y el desarrollo del tubo germinativo, así como en su distribución y actividad, por lo que podrían llegar a considerarse en determinadas situaciones como un factor limitante (Kredics *et al.* 2003). En aplicaciones de invernáculo realizadas por Elad *et al.* (1993) se demostró que la humedad relativa puede afectar la eficacia del biocontrol en mayor medida que la temperatura. Una alternativa para aquellos periodos en los que tanto la temperatura como la humedad sean un factor limitante para el uso de *Trichoderma* spp., el uso de agroquímicos podría ser una medida para mantener la eficacia del control de la enfermedad (Hjeljord & Tronsmo 1998).

Otro factor que puede influir sobre la eficacia del biocontrolador, es la disponibilidad de nutrientes, la cual puede ser compensada con una formulación que asegure que las esporas accedan a los nutrientes una vez que germinen (Hjeljord & Tronsmo 1998); sin embargo, esto debe ser cuidadosamente evaluado con anticipación para evitar proveer de nutrientes a microorganismos indeseados (Harman *et al.* 2004).

Por otro lado, Butt *et al.* (2001) señalan que la inhibición de un patógeno *in vitro* en un medio altamente nutritivo no tiene correlación con la eficacia del biocontrol en el campo, tal como sucedió en estudio realizado por Jash y Pan (2007), en donde aislamientos de *T. viride* mostraron un alto antagonismo *in vitro* aunque no todos fueron altamente competitivos en la rizosfera. Pero esto no siempre es el caso, existen reportes de experimentos con cepas nativas de *Trichoderma* spp. demostrando una correlación positiva entre los resultados observados en los ensayos *in vitro* y los bioensayos en campo (Mpika *et al.* 2009).

### **1.3.1. Mecanismos de acción**

El género *Trichoderma* se caracteriza por ejercer su acción biocontroladora por varios mecanismos de acción, un mecanismo en sí constituye tan solo una parte de un complejo sistema aun cuando parezca que cada uno tenga un papel prominente por separado (Hjeljord & Tronsmo 1998, Howell 2006). El desarrollo de una estrategia de control biológico exitosa requiere del conocimiento de los mecanismos de los biocontroladores ya que los agentes más exitosos son aquellos que hacen un uso balanceado y eficiente de sus mecanismos en un amplio rango de condiciones ambientales (Harman *et al.* 2004, Howell 1998). Los principales mecanismos de acción descritos en la actualidad son:

#### **1.3.1.1. Antibiosis**

La antibiosis ocurre cuando hay producción de metabolitos tóxicos o antibióticos de un organismo en acción directa sobre otro. A pesar de que el micoparasitismo es generalmente el mecanismo que atrae la mayor atención de los investigadores, cada vez son más frecuentes los reportes de investigaciones que revelan la producción de metabolitos con una fuerte actividad antifúngica y/o antibacteriana (Howell 1998, Howell 2006).

Las cepas de *Trichoderma* spp. tienen la capacidad de producir una amplia variedad de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles con una fuerte actividad inhibitoria del crecimiento de muchos patógenos de plantas (Hjeljord & Tronsmo 1998). Algunas cepas producen más de 100 diferentes metabolitos que son conocidos por sus actividades antibióticas (Harman *et al.* 2004). Vey *et al.* (2001) sostienen que es imposible nombrar a todos los metabolitos producidos por *Trichoderma* spp.; sin embargo, Howell (1998) destaca como principales grupos: alquil pirones (responsables del olor a coco característico de algunas especies identificado como 6-pentyl-pirone), isonitrinilos (de los que se destaca el isonitrin A con alta efectividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas), peptabolitos (péptidos antibióticos que inhiben el crecimiento de un gran número de hongos y bacterias Gram-positivas), sesquiterpenos (de los cuales el ácido

heptelidico ha mostrado tener actividad antibiótica contra bacterias anaerobias) y esteroides.

Estudios *in vitro* demuestran que extractos de *T. harzianum* presentan una actividad anticribiana tanto contra hongos como bacterias (Leelavathi *et al.* 2014).

#### **1.3.1.2. Micoparasitismo**

El micoparasitismo es el ataque directo de un hongo a otro (Chet *et al.* 1998), es uno de los mecanismos más ampliamente estudiados y reportados.

Harman *et al.* (2004) sintetizaron el proceso de micoparasitismo en los siguientes pasos: a) *Trichoderma* spp. detecta otros hongos y crece hacia ellos, la teledetección es parcial debido a la expresión secuencial de las enzimas de degradación de la pared celular, b) la difusión de estas enzimas cataliza la liberación de oligómeros de la pared celular hacia el hongo objetivo, y esto induce la expresión de endoquitinasas fungitóxicas, las cuales difunden e inician el ataque antes de que el contacto se realice, c) adhesión y enrollamiento de las hifas de *Trichoderma* al hospedante y d) la combinación de estas actividades de estos compuestos resultan en el parasitismo del objetivo y la disolución de las paredes celulares secreción de enzimas líticas.

Howell *et al.* (1998) indican que este mecanismo juega un importante rol en el control biológico pero que es difícil de evaluar en condiciones de campo dada su complejidad. Agrega que algunos de los pasos del mismo son altamente delimitados a algunas especies.

#### **1.3.1.3. Competencia**

La competencia por nutrientes ocurre cuando dos o más microorganismos demandan del mismo recurso que está inmediatamente disponible (Hjeljord & Tronsmo 1998) y que puede llevar al control del patógeno.

Algunas especies han sido evaluadas por su efectividad al momento de competir en suelo y en el ambiente de la rizosfera, reportándose en algunos casos

la competencia por nutrientes como el mecanismo de antagonismo más efectivo (Howell 2006). Sivan & Chet (1989) reportaron la reducción en la germinación de *Fusarium oxysporum* en suelo debido a la competencia ejercida por *T. harzianum*.

#### **1.3.1.4. Inducción de resistencia**

La primera demostración consistente de resistencia inducida por *Trichoderma* spp. fue en 1997 por Bigirimana y colaboradores, quienes mostraron que el suelo tratado con *T. harzianum* provocó que las plantas de frijol sean resistentes a enfermedades causadas por patógenos como *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum lindemuthianum*, incluso cuando el biocontrolador estuvo únicamente en suelo y no en el follaje (Harman *et al.* 2004).

*Trichoderma* spp. tiene la capacidad de inducir resistencia sistémica y localizada a un rango de enfermedades causadas por virus, bacterias u hongos en una gran variedad de plantas. Sin embargo, aún faltan detalles para entender cómo funciona (Harman 2006, Nawrocka & Malolepsza 2013). Los aislamientos de *Trichoderma* spp. pueden inducir diferentes tipos de señales que dan como resultado la activación de genes y la producción de enzimas que están involucradas en la supresión de patógenos y el incremento de barreras bioquímicas y estructurales en la planta (Harman *et al.* 2004, Hermosa *et al.* 2012, Hoitink *et al.* 2006, Nawrocka & Malolepsza 2013).

*Trichoderma* spp. puede producir reacción de resistencia de tipo sistémica inducida (RSI) o sistémica adquirida (RSA), dando como resultado cambios a nivel fisiológico, bioquímico y molecular (Nawrocka & Malolepsza 2013).

#### **1.3.1.4. Efecto en el crecimiento de las plantas y tolerancia a estrés abiótico**

Según Hermosa *et al.* (2012), *Trichoderma* spp. tiene la capacidad de inducir el crecimiento y de incrementar la resistencia a estrés biótico y abiótico. Además agregan que los aislamientos que promuevan el crecimiento de las plantas deben ser capaces de colonizar las raíces de la planta. Harman *et al.* (2004) sostienen que tienen la capacidad de incrementar la productividad lo cual podría ser particularmente beneficioso en áreas de producción con condiciones poco



óptimas, en donde sus efectos son más fáciles de observar. Dado que este género tiene la capacidad de competir a nivel rizosférico, los autores señalan que a nivel de invernáculo el uso de *Trichoderma* spp. ha mostrado ser tan eficiente que ha sustituido en algunos casos el uso de químicos, logrando promover el crecimiento a nivel radicular y vegetativo a niveles no alcanzados por los agroquímicos.

Los efectos en el crecimiento de plantas han sido demostrados en maíz, tomate, tabaco, entre otros, y se ha encontrado que inclusive incrementa las tasas de germinación, peso seco y emergencia (Bailey & Lumsden 1998). Lo & Lin (2002) encontraron que cepas de la misma especie muestran diferentes grados de acción en el crecimiento de cultivos como pepino y sugieren que esto podría estar influenciado por factores aún desconocidos. Tucci *et al.* (2010), al respecto indican que según sus experiencias en el cultivo de tomate y su relación con *Trichoderma* spp. algunos cultivares pueden verse mayormente beneficiados que otros en cuanto a crecimiento por acción del biocontrolador.

El uso de aislamientos de *Trichoderma* aplicados para el control de enfermedades ha mostrado un efecto adicional, por ejemplo, el cultivo de arvejas se obtuvo un efecto significativo sobre el crecimiento de las plantas y a la vez redujeron el daño causado por *Phytophthora* spp. (Naseby *et al.* 2000). Windham *et al.* (1986) adicionaron *Trichoderma* spp. a suelo estéril y al evaluar el efecto sobre plantas de tomate y tabaco ocho semanas después de la siembra, encontraron un incremento del peso seco de raíces y del área vegetativa en 213 - 175% y 259 - 318 %, respectivamente.

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. Objetivo general**

Obtener aislamientos de *Trichoderma* spp. y evaluar su potencial para el control de la infección causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

#### **1.4.2. Objetivos específicos**

- Obtener cepas de *Trichoderma* spp. procedentes de suelo de plantaciones de tomate del cinturón hortícola Platense.
- Seleccionar *in vitro* las cepas con mayor agresividad frente al patógeno.
- Evaluar la respuesta de crecimiento de las plantas frente a la aplicación del patógeno y las cepas más agresivas de *Trichoderma* spp.
- Seleccionar las cepas más efectivas en el control de la infección de *C. m. michiganensis* en plántulas de tomate en invernáculo.

#### **1.5. Hipótesis**

Aislamientos del género *Trichoderma* spp. pueden tener la capacidad de disminuir las infecciones causadas por *C. m. michiganensis* en el cultivo de tomate a nivel de invernáculo.

## **2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.1. Aislamiento e identificación de *Trichoderma* spp.**

#### **2.1.1. Muestreo**

Se colectaron muestras de suelo de la rizosfera de plantas de cultivos de tomate de tres invernáculos comerciales de la zona hortícola Platense. Cada muestra estuvo compuesta por varias submuestras obtenidas a una profundidad 5 a 10 cm teniendo un volumen total de 100 g de suelo por cada plantación. Las muestras fueron colectadas en bolsas de polietileno estériles, transportadas al laboratorio de Fitopatología de la FCAyF-UNLP en donde se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez secas, se almacenaron a 4°C.

#### **2.1.2. Preparación de las muestras**

Cada muestra de suelo se desmenuzó en un mortero para lograr una estructura homogénea, luego se pasaron a través de una malla con orificios de 2 mm de diámetro y se almacenaron a 4°C hasta ser procesadas (Vargas *et al.* 2009).

#### **2.1.3. Medio y técnica de cultivo**

Para realizar el aislamiento de cepas de *Trichoderma* spp. se utilizó el Medio Selectivo para *Trichoderma* (TSM) desarrollado por Elad *et al.* (1981). Cinco gramos de cada submuestra de suelo se homogeneizó en 50 ml de agua destilada estéril (dilución 1:10) y se agitó durante 20 minutos.

A partir de la dilución inicial (1:10) se realizaron tres diluciones sucesivas (1:100, 1:1000 y 1:10000) en agua destilada estéril. Las diluciones 1:1000 y 1:10000 se sembraron en cinco placas de Petri, usando 1 ml de cada suspensión y 9 ml de TSM diluido (a una temperatura de 50 °C). Las placas de Petri se sellaron y colocaron en cámara de crecimiento a 24 °C durante 8 días en oscuridad.

#### **2.1.4. Evaluación**

Los cultivos fueron observados diariamente durante su periodo de incubación y cada colonia fue considerada una unidad formadora de colonia (UFC). Aquellas colonias que presentaron características (micelio, cuerpos fructíferos, esporas) del género *Trichoderma* fueron subcultivadas en tubos de ensayo conteniendo medio agar papa glucosado (APG) para su posterior identificación.

#### **2.1.5. Observación morfológica, identificación y conservación**

Para la identificación de las colonias de *Trichoderma* spp. se obtuvieron cultivos puros realizando cultivos monospóricos de cada uno de los aislamientos en medio APG incubados durante 36 horas a 25°C en oscuridad. Cada cultivo monospórico se repicó a tubo de repique. La identificación de las cepas se realizó usando las claves taxonómicas de Samuels *et al.* (2014).

Las cepas de *Trichoderma* spp. se conservaron en papel filtro (Stocco *et al.* 2010). Se colocaron cortes de papel filtro estéril de 20 x 10 mm sobre los cultivos activos desarrollados en las placas de Petri. Una vez que los cortes de papel filtro estuvieron colonizados por los hongos se traspasaron a placas de Petri estériles y se secaron a temperatura ambiente durante 5 a 7 días aproximadamente, posteriormente se colocaron en recipientes estériles y se almacenaron a -20°C.

### **2.2. Obtención de colonias del patógeno**

#### **2.2.1. Aislamiento e identificación**

Los cultivos de *C. m. michiganensis* se aislaron a partir de plantas de tomate enfermas que presentaban síntomas característicos del cancro bacteriano, provenientes de lotes de productores del Cinturón Hortícola de La Plata. Las plantas fueron maceradas en morteros de porcelana (Borboa *et al.* 2009), la savia resultante se colocó en placas de Petri conteniendo medio Agar nutritivo – extracto de levadura (NBY) y se incubaron durante 72 horas a 25±2 °C (Balestra *et al.* 2009).

La identificación se realizó mediante técnicas convencionales de descripción de características fisiológicas y culturales: reacción de Gram, movilidad, producción de pigmentos en agar, características de las colonias (color, forma, consistencia) (Shaad *et al.* 2001).

### **2.2.2. Conservación**

Las colonias puras del patógeno se conservaron a 10 °C en tubos de ensayo conteniendo medio NBY.

## **2.3. Evaluación del efecto *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de *C. m. michiganensis***

La evaluación de la capacidad de inhibición de *Trichoderma* spp. frente a *C. m. michiganensis* en condiciones *in vitro* se evaluó siguiendo la metodología propuesta por De Boer *et al.* (1999) con algunas modificaciones que se describen en el ítem 2.3.2.

### **2.3.1. Obtención cultivos de *C. m. michiganensis* y hongos antagonistas**

La cepa bacteriana fitopatógena se sembró en frascos Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de caldo nutritivo. El medio fue inoculado con dos discos de agar (5mm) de la cepa desarrollada en agar nutritivo (de dos días de edad) 48 horas antes de la instalación del experimento.

Cada aislamiento de *Trichoderma* spp. se sembró en placas de Petri de 90 mm de diámetro conteniendo medio APG (por duplicado).

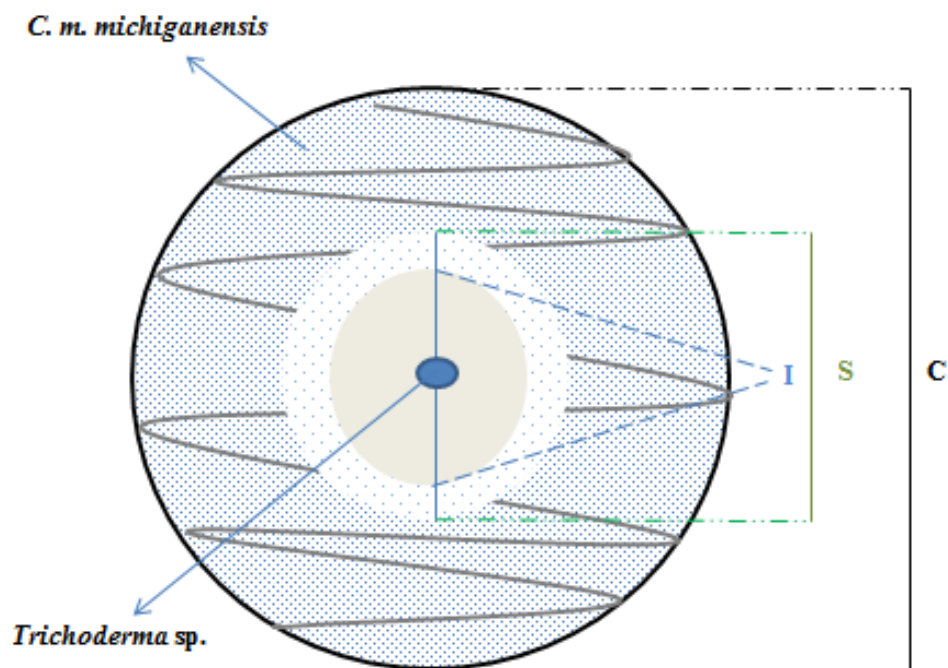
Los cultivos bacterianos se incubaron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  en agitación constante (50 rpm) durante 48 horas, mientras que los cultivos fúngicos se incubaron a 25 °C durante 8 días.

### **2.3.2. Inoculación e incubación**

Una vez que los cultivos de bacterias y *Trichoderma* spp. completaron su periodo de incubación, se procedió a realizar el enfrentamiento *in vitro* de las colonias. El

cultivo bacteriano se sembró en placas de Petri conteniendo APG usando un hisopo estéril.

Usando un sacabocados de 5 mm de diámetro se cortaron discos de agar de la periferia de los cultivos de cada aislamiento del antagonista y se colocaron en el centro de cada placa de Petri conteniendo el medio de cultivo previamente inoculado con la bacteria (Figura 1). Se inocularon diez placas por cada aislamiento de *Trichoderma* spp. más diez placas de testigo (diez unidades por cada aislamiento de *Trichoderma* spp. en medio de cultivo sin la bacteria y diez unidades de placas únicamente con la bacteria). Todas las placas se incubaron a 25°C en oscuridad durante 72 horas.



**Figura 1.** Gráfica descriptiva del crecimiento simultáneo de *C. m. michiganensis* y *Trichoderma* spp., en donde: S es el diámetro de acción del antagonista (crecimiento del antagonista y de la bacteria visiblemente afectada), I es el diámetro del halo de inhibición (sin crecimiento bacteriano) y C es el diámetro del crecimiento bacteriano del testigo.

### 2.3.3. Evaluación

La evaluación se realizó a las 72 horas después de la siembra de los microorganismos, para ello se registraron los valores de: a) diámetro de crecimiento de los hongos antagonistas y con crecimiento bacteriano visiblemente disminuido, b) el diámetro del halo de inhibición alrededor del disco y c) se consideró constante el diámetro de crecimiento bacteriano del testigo (9 cm tamaño de la placa de Petri) (Figura 1). A partir de los datos obtenidos se calculó el porcentaje de supresión y el porcentaje de colonización del patógeno, usando las siguientes fórmulas (modificado de De Boer *et al.* 1999):

$$\text{Porcentaje de Supresión} = \frac{\text{Area de Supresión (AS)}}{\text{Area de Crecimiento Bacteriano (AB)}} \times 100$$

$$\text{Porcentaje de Colonización} = \frac{\text{Area de Colonización (AC)}}{\text{Area de Crecimiento Bacteriano (AB)}} \times 100$$

Donde:

**AS** = área de crecimiento de los hongos antagonistas y de crecimiento bacteriano visiblemente disminuido, obtenida con la fórmula  $AS = (S/2)^2 * \pi$

**AC** = área alrededor del disco del antagonista que presentó crecimiento bacteriano, obtenida con la fórmula  $AC = AB - AI$        $AI = (I/2)^2 * \pi$

**AB** = área de crecimiento bacteriano en los testigos, obtenida con la fórmula  $AB = (C/2)^2 * \pi$

### 2.3.4. Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se desarrolló bajo un diseño completamente al azar (10 unidades de observación por cada especie de *Trichoderma* + 10 unidades de observación del testigo). Los datos obtenidos fueron analizados usando el programa STATISTICA versión 8 (StatSoft Inc.). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y las medias fueron comparadas usando una prueba de Tukey al 0,05 de probabilidad.

## **2.4. Evaluación del efecto de *Trichoderma* spp. sobre la infección de *C. m. michiganensis* en plantas de tomate en condiciones de invernáculo**

El experimento se realizó bajo condiciones de invernáculo en el Centro de Investigaciones en Fitopatología (CIDEFI) de la FCAyF de la UNLP, entre los meses de agosto a octubre del 2014 y 2015. Como material vegetal se usaron plantines de la variedad Elpida (susceptible a la enfermedad) de 15 días de edad (Figura 2.1).

### **2.4.1. Tratamientos**

Se evaluaron dos métodos de inoculación de las cinco cepas de *Trichoderma* spp. ensayadas (aquellas que presentaron mayor capacidad biocontroladora frente al patógeno a partir de los resultados del experimento 2.3), siendo:

Técnica 1. Inoculación de la cepa fúngica al suelo una semana antes de la inoculación del patógeno.

Técnica 2. Aplicación de la cepa fúngica a la parte aérea de la planta 72 horas antes de la inoculación del patógeno.

### **2.4.2. Inoculación**

En el caso de *Trichoderma* spp. se prepararon dos tipos de inóculo:

a) Para realizar la técnica 1, se inocularon 100 g de granos de arroz estériles con 1 ml de una suspensión de esporas de *Trichoderma* spp. ( $10^6$  esporas/ml) y se incubó a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) durante 10 días. Al momento del trasplante y una semana antes de la inoculación del patógeno, el inóculo fúngico se incorporó a la tierra de las macetas en una proporción de 1:100 (por cada maceta de 2 kg se utilizaron 20 g de inóculo).

b) Para realizar la técnica 2, se realizó una suspensión de esporas de cada aislamiento de *Trichoderma* spp. desarrollados en medio APG (8 días de crecimiento). Las suspensiones se realizaron en agua estéril con el agregado de Tween 20 (0,01%), se ajustaron a  $1 \times 10^6$  esporas/ml y se atomizaron las plantas tres días antes de la inoculación del patógeno.



La suspensión bacteriana se obtuvo utilizando cultivos de 3 días de edad desarrollados en el medio NBY a partir de los cuales se retiraron las bacterias de la superficie y se suspendieron en agua destilada estéril, la concentración de la suspensión se ajustó a  $1 \times 10^7$  UFC/ml.

Antes de la inoculación del patógeno por aspersión, se realizó un pequeño corte en la base de cada planta con bisturí previamente sumergido en la suspensión bacteriana, a fin de facilitar la infección. Se atomizó cada planta de tomate con la suspensión bacteriana hasta punto de goteo durante las primeras horas del día. Cada planta inoculada fue cubierta con una bolsa plástica durante 24 horas para elevar la humedad y favorecer la infección de la bacteria (Figura 2.3 y 2.4).

Para los testigos de la bacteria se inocularon las plantas de tomate con la suspensiones bacterianas sin previa infestación de *Trichoderma* spp. Adicionalmente, se estableció un testigo absoluto sin inoculación del patógeno ni de los biocontroladores.

### **2.4.3. Evaluación**

Las plantas se mantuvieron en el invernáculo a una temperatura entre 22 – 25 °C y humedad relativa entre 60 - 80% durante 8 semanas.

#### **2.4.3.1. Altura de plantas, número de flores y frutos**

A las cinco semanas después del trasplante, se midió la altura (cm) de cada planta (de la base de la planta hasta el ápice) y se contó el número de flores y de frutos de cada planta.

#### **2.4.3.2. Presencia/ausencia de la enfermedad**

Ocho semanas después del trasplante, se evaluó presencia/ausencia de la enfermedad contando el número de plantas que presentaban síntomas asociados a la enfermedad.

Las plantas que presentaron síntomas fueron llevadas al laboratorio y mediante el método de dilaceración se realizaron cultivos para verificar la infección del

patógeno. Se obtuvieron secciones de hojas con tejido sano y enfermo, las cuales se desinfectaron con alcohol 70% y luego, con una solución de hipoclorito de sodio al 5%. Los cortes de tejido vegetal (1 cm<sup>2</sup>) se colocaron en tubos de ensayo con 10 ml de agua destilada estéril durante 20 minutos, se agitaron con vórtex durante un minuto y finalmente, se tomó una alícuota de 5 µl y se estrió sobre la superficie de placas de Petri conteniendo medio NBY. Las placas se incubaron durante 72 horas a 25±2 °C. La identificación del patógeno se realizó siguiendo la metodología descrita anteriormente.

#### **2.4.3.3. Evaluación de la colonización de los biocontroladores y del peso seco en plantas tratadas**

Por cada tratamiento, se retiraron del sustrato cinco plantas y mediante evaluación destructiva se tomaron secciones de raíz y tallo que fueron colocados en medio TSM (Evans *et al.* 2003).

La superficie de las plántulas, tallos y raíces se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2% por un minuto, seguido por tres enjuagues en agua destilada estéril. Se realizaron cortes de 1 cm para obtener segmentos de raíz, tallos y meristemo apical (cinco secciones de cada uno). Los segmentos obtenidos se transfirieron a placas de Petri conteniendo medio TSM.

Las placas se incubaron a una temperatura aproximada de 25 °C en oscuridad durante 15 días. A los 5, 8 y 15 días de incubación se evaluó la presencia de los biocontroladores usando lupa estereoscópica y microscopio.

Para evaluar el peso seco se separaron cinco plantas por cada tratamiento. Se retiró el suelo de las raíces mediante lavado y se colocaron segmentadas en bandejas metálicas dentro de una estufa a 60 °C durante 48 horas (Figura 2.6). Al término de este tiempo, las plantas llegaron a peso constante y se procedió a pesar (g) por separado las raíces y luego la planta entera.

#### **2.4.4. Diseño experimental y análisis estadístico**

Por cada tratamiento se establecieron seis bloques (seis unidades de observación por cada tratamiento). El diseño experimental utilizado fue bloques al azar. Los resultados se analizaron usando un test de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias de Tukey al 0.05 de probabilidad.



**Figura 2. 1) Plantines de tomate de 15 días de edad, 2) Plantas de tomate luego del trasplante, 3) Inoculación del patógeno, 4) Cámaras húmedas, 5) Hoja con bordes necrosados y 6) Plantas en bandejas antes de ingresar a estufa para secado.**

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Aislamiento e identificación de *Trichoderma* spp.

Ocho días después de la siembra se realizó la evaluación de las colonias presentes en la dilución 1:1000. Mediante el uso de lupa estereoscópica y microscopio se determinó la presencia de nueve colonias con características correspondientes al género *Trichoderma* (Tabla 1) de acuerdo a las claves de Samuels *et al.* (2014). No se consideró la dilución 1:10000 debido al bajo número de colonias presentes.

Las muestras A y C presentaron una mayor población promedio de *Trichoderma* spp. con  $8 \times 10^2$  UFC por gramo de muestra, obteniéndose cuatro colonias en cada una, mientras que a partir de la muestra B sólo se aisló una única colonia del biocontrolador lo que representa una población aproximada de  $2 \times 10^2$  UFC por gramo de suelo analizado. Cada colonia fue purificada y conservada siguiendo la metodología descrita anteriormente. Usando las claves taxonómicas de Samuels *et al.* (2014) se determinó que todas las colonias obtenidas presentaban características propias de la especie *T. harzianum*.

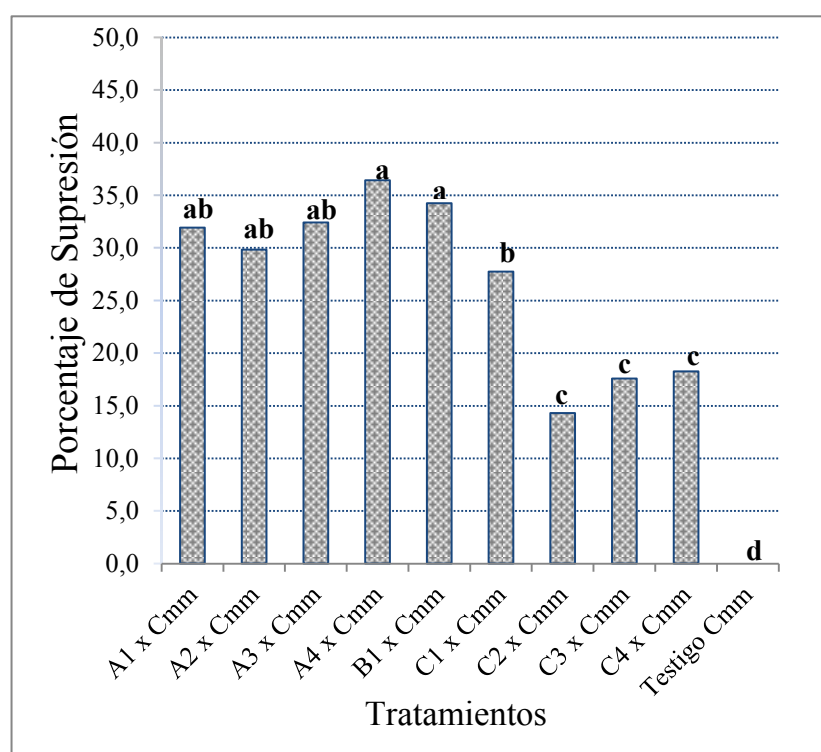
**Tabla 1. Número de colonias obtenidas por gramo de suelo de cada muestra.**

Muestra de suelo	Repetición	Colonias de <i>Trichoderma</i> spp.			
		Número de colonias de <i>Trichoderma</i> por repetición (1:1000)	Denominación del aislamiento	Número de UFC/g por repetición	Promedio UFC/g de suelo seco
A	2	1	A1	$1 \times 10^3$	$8 \times 10^2$
	4	1	A2	$1 \times 10^3$	
	5	2	A3 y A4	$2 \times 10^3$	
B	4	1	B1	$1 \times 10^3$	$2 \times 10^2$
C	1	1	C1	$1 \times 10^3$	$8 \times 10^2$
	2	1	C2	$1 \times 10^3$	
	3	1	C3	$1 \times 10^3$	
	5	1	C4	$1 \times 10^3$	

### 3.2. Evaluación del efecto *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de *C. m. michiganensis*

#### 3.2.1. Porcentajes de supresión

En el análisis de los porcentajes de supresión obtenidos en cada tratamiento, se observó que todos los tratamientos fueron estadísticamente diferentes del testigo (Tabla 2), es decir todos ejercieron acción sobre el crecimiento de las colonias bacterianas significativamente (Figuras 3 y 4). El aislamiento A4 presentó el mayor valor con 36,42%, seguido de los aislamientos B1, A3, A1 y A2 quienes no fueron diferentes entre sí, con 34,24%, 32,41%, 31,92% y 29,83% de área bacteriana visiblemente reducida, respectivamente. Los aislamientos restantes tuvieron menor área de supresión aunque también fueron estadísticamente diferentes del testigo.



**Figura 3. Porcentajes de supresión del crecimiento bacteriano de colonias de *C. m. michiganensis* ejercidos por aislamientos de *Trichoderma* spp. registrados a las 72 horas luego de la inoculación.**

**Tabla 2. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) de los porcentajes de supresión resultantes para cada tratamiento.**

Fuente de Variación	SC	GL	CM	F	P valor
Tratamientos	11839,29	9	1315,48	38,08	<0,0001
CV	24,22				

**Tabla 3. Porcentajes de colonización bacteriana promedios registrados en la confrontación de *C. m. michiganensis* con aislamientos de *Trichoderma* spp., 72 horas después de la inoculación.**

Tratamientos	Porcentajes de Colonización (%) <sup>1</sup>	
A1 x <i>Cmm</i>	99,21	<b>b</b>
A2 x <i>Cmm</i>	99,21	<b>b</b>
A3 x <i>Cmm</i>	99,17	<b>b</b>
A4 x <i>Cmm</i>	84,24	<b>a</b>
B1 x <i>Cmm</i>	99,21	<b>b</b>
C1 x <i>Cmm</i>	99,21	<b>b</b>
C2 x <i>Cmm</i>	99,04	<b>b</b>
C3 x <i>Cmm</i>	99,21	<b>b</b>
C4 x <i>Cmm</i>	99,02	<b>b</b>
Testigo <i>Cmm</i>	100	<b>b</b>

**Tabla 4. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) de los porcentajes de colonización resultantes para cada tratamiento.**

Fuente de Variación	SC	GL	CM	F	P valor
Tratamientos	2034,27	9	226,03	5,69	<0,0001
CV	6,45				

<sup>1</sup> Valores con la misma letra no difieren entre sí según el Test de Tukey al 0,05 de probabilidades.

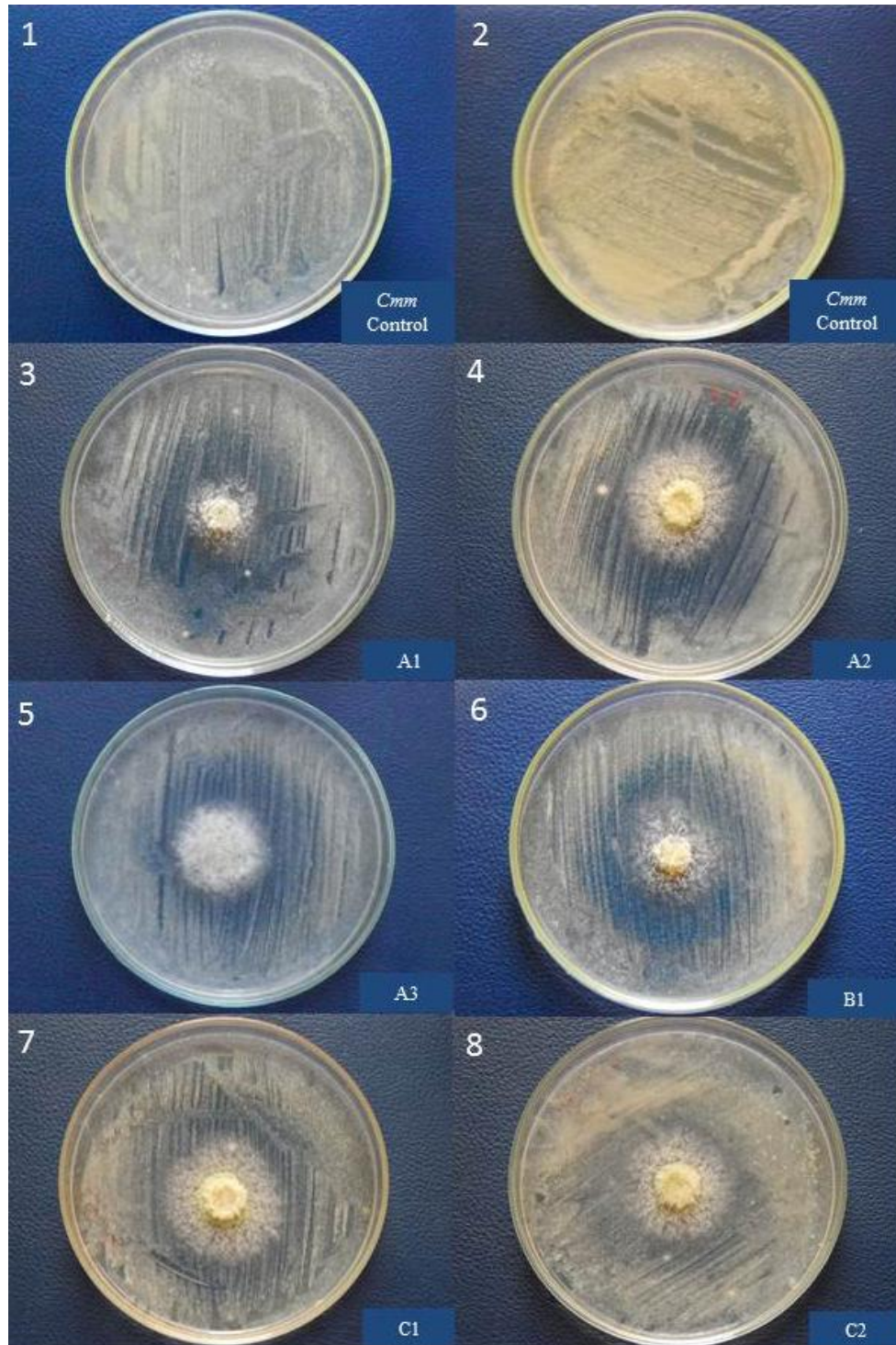
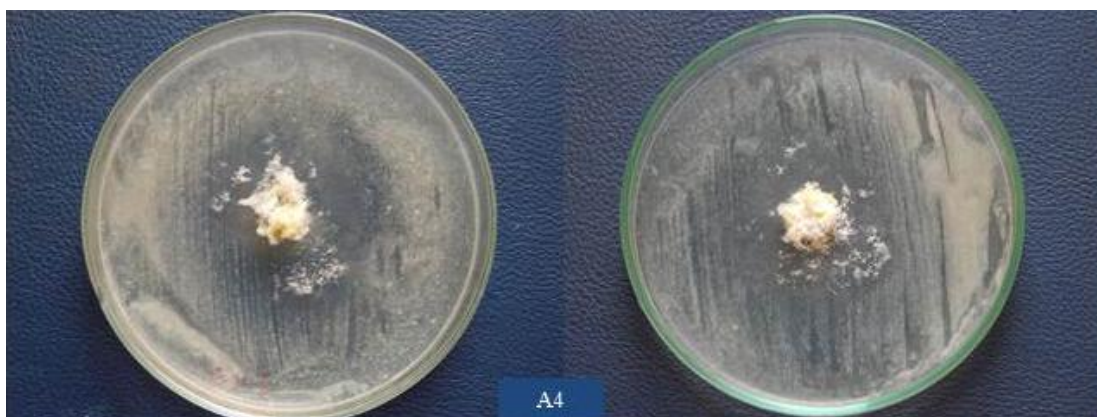


Figura 4. 1 y 2) Crecimiento de *C. m. michiganensis* en los testigos a las 72 horas después de la inoculación, 3-8) Crecimiento simultáneo de *C. m. michiganensis* y aislamientos de *Trichoderma* spp. a las 72 horas de la inoculación.



### 3.2.2. Porcentajes de colonización

En cuanto a los resultados del análisis de los porcentajes de colonización bacteriana, el aislamiento A4 identificado como *T. harzianum* fue el único que presentó valores estadísticamente diferentes del testigo. La bacteria en presencia de este aislamiento presentó un porcentaje promedio de colonización de 84,24% (Figura 4), los demás tratamientos presentaron un pequeño halo de inhibición por lo que los valores no fueron diferentes del testigo (Tablas 3 y 4).



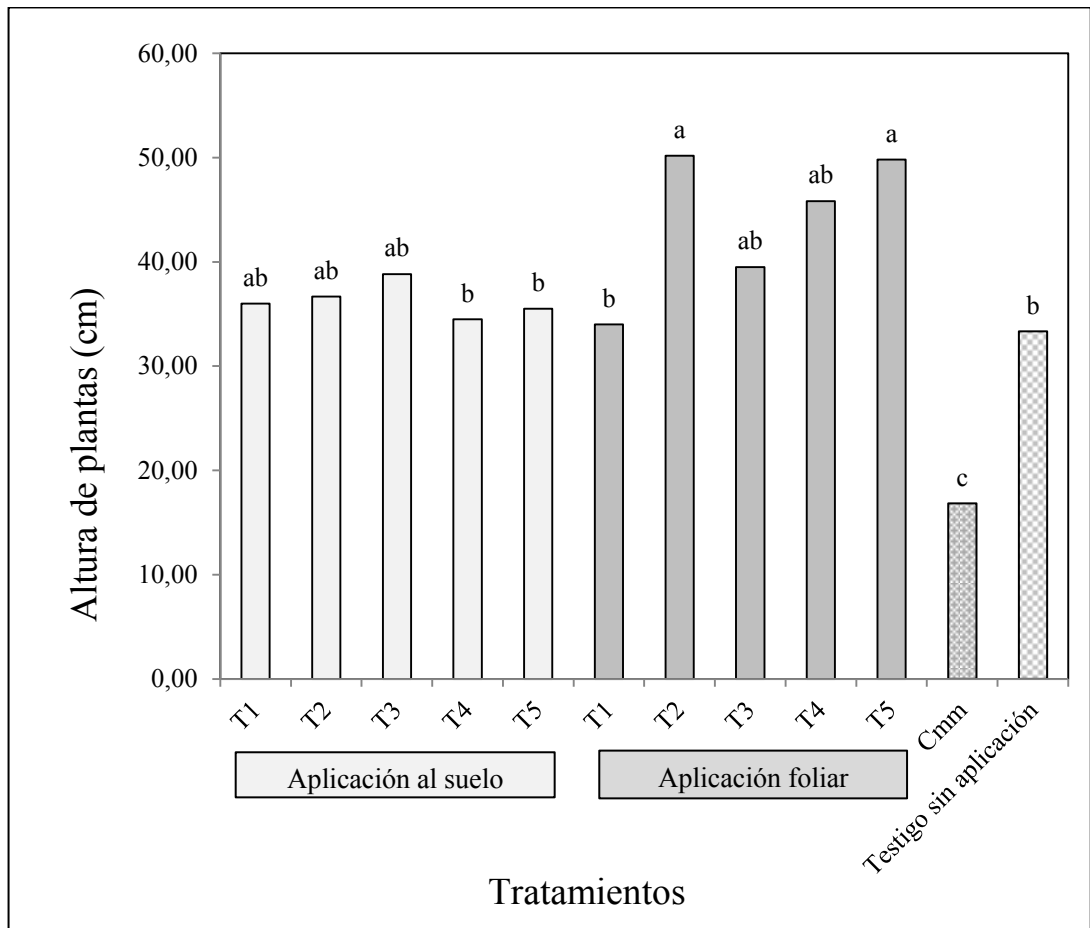
**Figura 5. Halos de inhibición en colonias de *C. m. michiganensis* en crecimiento simultáneo con aislamiento A4 de *Trichoderma* spp.**

### 3.3. Evaluación del efecto de *Trichoderma* spp. sobre la infección de *C. m. michiganensis* en plantas de tomate en condiciones de invernáculo

#### 3.3.1. Altura de plantas, número de flores y frutos

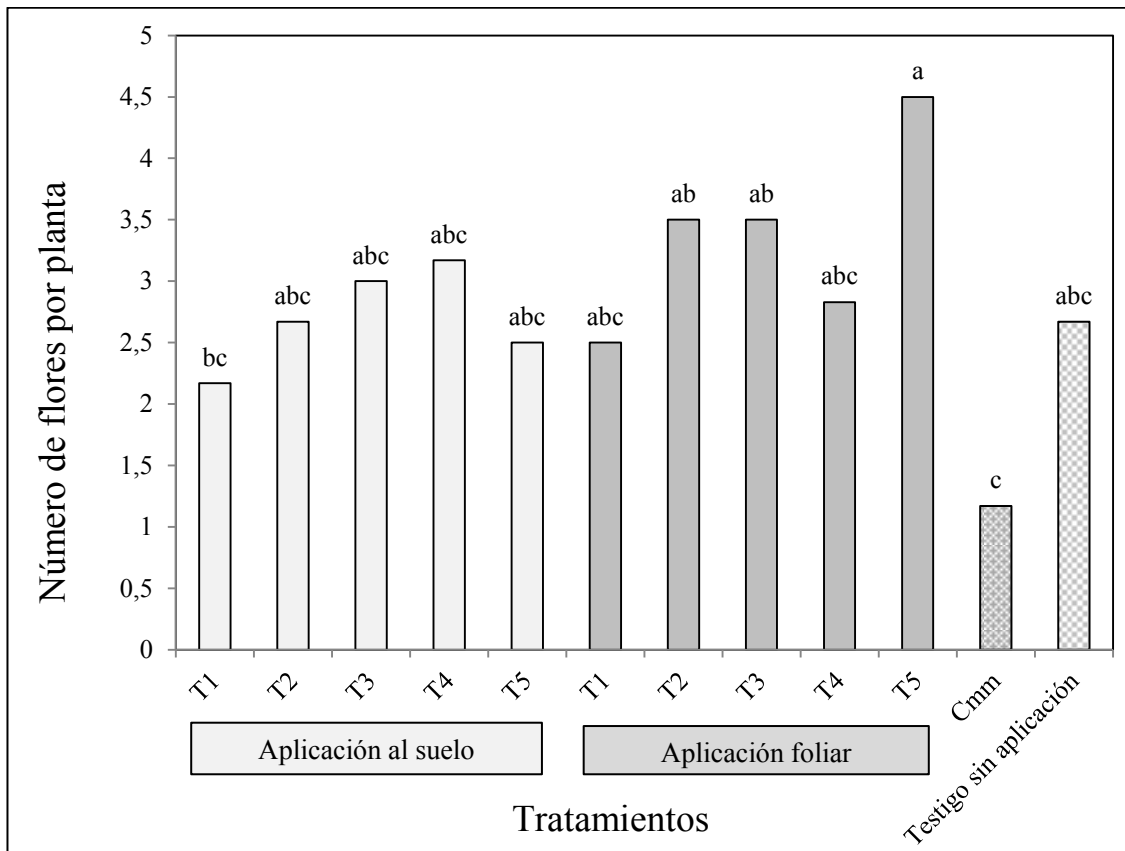
Los valores de probabilidad (Tabla 5) muestran que en cuanto a altura se presentaron diferencias entre las medias de los tratamientos y de los métodos de inoculación utilizados. De manera general, los tratamientos aplicados con método 2 (foliar) presentaron mayores promedios de altura de planta que aquellos con aplicación al suelo, y ambos métodos fueron superiores al testigo sin aplicación y del patógeno (Figura 5). Las plantas sometidas a aplicación foliar de los tratamientos 2 y 5 obtuvieron los mayores valores de altura con 50,17 y 49,83 cm, respectivamente. Los tratamientos 1, 2 y 3 aplicados al suelo mostraron valores intermedios (36,0, 36,67 y 38,83 cm) al igual que los tratamientos 3 y 4 aplicados al follaje (39,50 y 45,83 cm). Por otra parte, algunos tratamientos presentaron valores que no difirieron

estadísticamente con los del testigo absoluto, tales como los tratamientos 4 y 5 aplicados al suelo, y el tratamiento 1 aplicado a las hojas. Las plantas con aplicación de la bacteria patógena y sin aplicación de biocontroladores (testigo del patógeno) fueron considerablemente más pequeñas que las del testigo absoluto y las de los tratamientos con *Trichoderma* spp. presentando una media de 16,83 cm (Figura 5).



**Figura 6. Promedios de altura de plantas (cm) registrados cinco semanas después del trasplante<sup>2</sup>.**

<sup>2</sup> Valores con la misma letra no difieren entre sí según el Test de Tukey al 0,05 de probabilidades.



**Figura 7. Promedios de número de flores por planta registrados cinco semanas después del trasplante <sup>3</sup>.**

En la Figura 6 puede observarse que la emisión de flores se vio estimulada por la presencia de los biocontroladores en tres de los tratamientos aplicados foliarmente (T5 4,5 flores/planta, T2 y T3 con 3,5 flores/planta cada uno). Adicionalmente, se destaca que aquellas plantas del testigo *C. m. michiganensis* fueron notablemente afectadas por la aplicación del patógeno presentando un promedio de 1,17 flores por planta a las cinco semanas después del trasplante. Los tratamientos con aplicación al suelo no difirieron estadísticamente del testigo absoluto (sin aplicación del patógeno ni *Trichoderma* spp.). Los valores de probabilidad (P) confirman las diferencias entre los tratamientos y entre los métodos de inoculación utilizados (Tabla 6).

<sup>3</sup> Valores con la misma letra no difieren entre sí según el Test de Tukey al 0,05 de probabilidades.

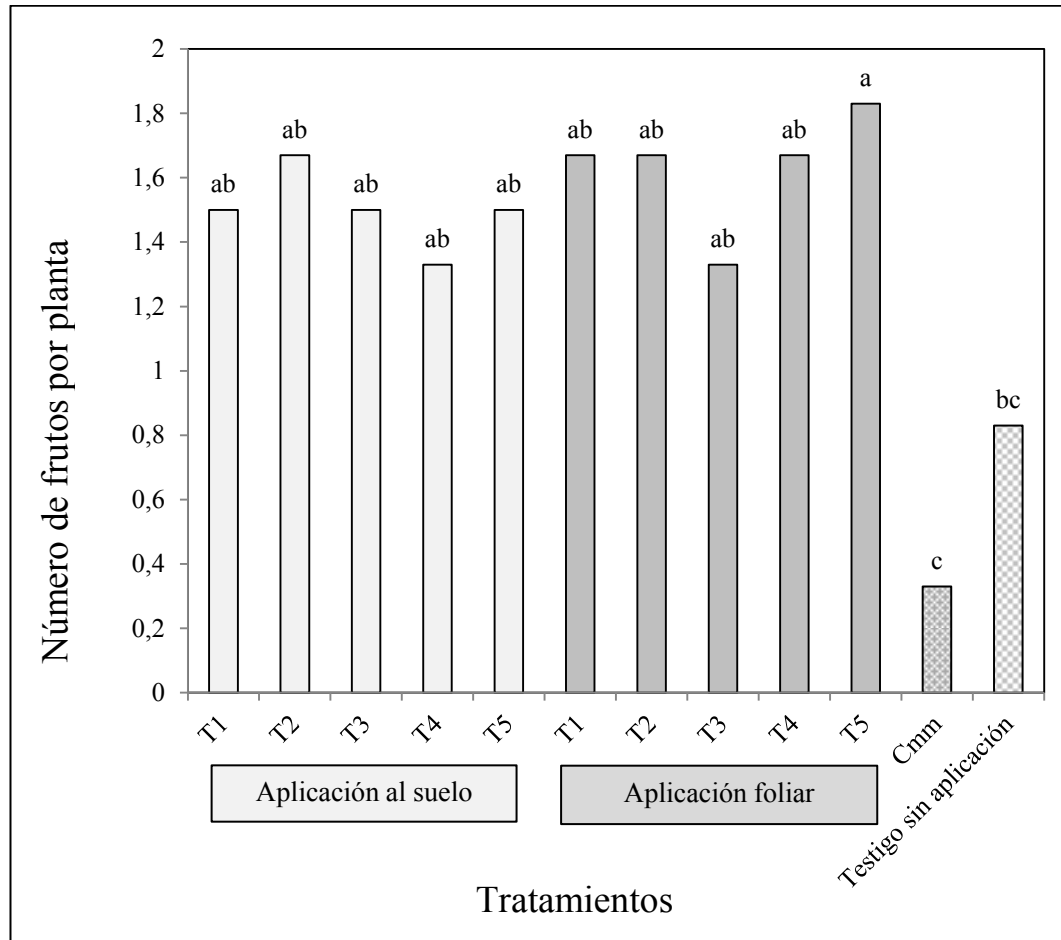
**Tabla 5. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) de la altura de plantas (cm) registrados a las cinco semanas después del trasplante.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P valor</b>
Tratamientos	5162,17	11	469,29	8,31	<0,0001
Inoculación*Tratamientos	948,31	6	158,05	3,01	0,0117
CV	20,24				

**Tabla 6. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) del número de flores por planta registrado a las cinco semanas después del trasplante.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P valor</b>
Tratamientos	43,82	11	3,98	3,65	<0,0001
Inoculación*Tratamientos	10,74	6	1,79	1,62	0,1549
CV	36,69				

Los valores de números de frutos por planta no presentaron diferencias estadísticas entre sí en los tratamientos con biocontroladores pero si difirieron de los testigos (Tabla 7), presentando un incremento de hasta cuatro veces más frutos que el testigo *C. m. michiganensis* y superando la producción de frutos en plantas del testigo absoluto en un 200% (Figura 8). El número de frutos producidos en plantas aplicadas con el patógeno (sin presencia de los biocontroladores) fue reducido con un promedio de 0,33 frutos/planta a la fecha de la evaluación. El tratamiento con mejor desempeño en cuanto a producción de frutos fue el T5 aplicado foliarmente con un promedio de 1,83 frutos/planta a las cinco semanas después del trasplante. A las 8 semanas después del trasplante se realizó un segundo recuento de número de frutos manteniéndose la relación de frutos entre los tratamientos y los testigos en 3:1.



**Figura 8. Número de frutos por planta ocho semanas después del trasplante<sup>4</sup>.**

<sup>4</sup> Valores con la misma letra no difieren entre sí según el Test de Tukey al 0,05 de probabilidades.

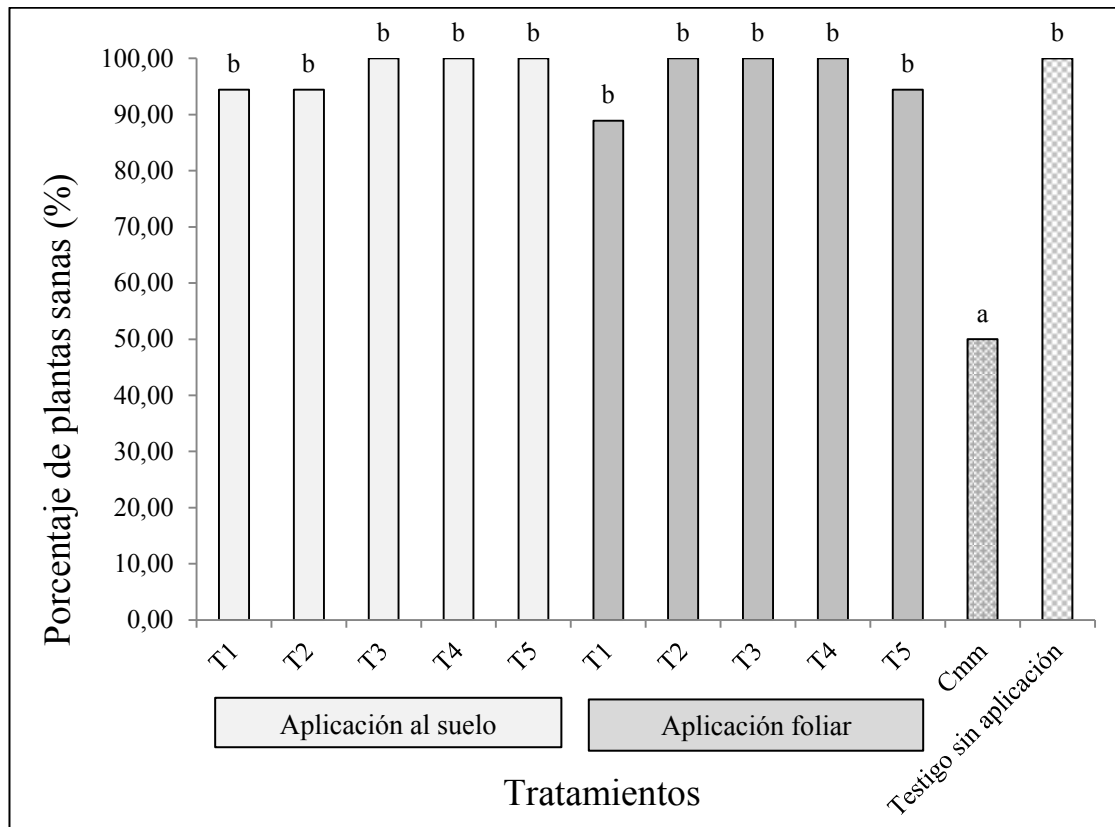
**Tabla 7. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) número de frutos por planta registrados a las ocho semanas después del trasplante.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P valor</b>
Tratamientos	11,82	11	1.07	4,16	<0,0001
Inoculación*Tratamientos	3095,24	6	515,87	0,83	0,554
CV	36,23				

### **3.3.2. Presencia/ausencia de la enfermedad**

Ocho semanas después del trasplante se registró el número de plantas con sintomatología relacionada a infecciones causadas por *C. m. michiganensis*. Aunque no se presentaron síntomas característicos como el cáncer en tallos o el “ojo de pájaro” en los frutos, se observó que en algunas plantas con retraso de crecimiento, los bordes de los folíolos se mostraban secos y curvados junto con un marchitamiento leve generalizado. No hubo diferencias estadísticas en la interacción “método de inoculación x tratamiento” (Tabla 8). Sin embargo, si hubo diferencia estadística entre el testigo con el patógeno y los tratamientos con biocontroladores (Figura 9).

Los valores de plantas sanas en los tratamientos con biocontroladores y el testigo absoluto no difirieron estadísticamente entre sí, sin embargo, si lo hicieron cuando se los comparó con el testigo *C. m. michiganensis* (50% de plantas sanas). Los tratamientos T1 y T2 (al suelo) y T5 aplicado a las hojas presentaron una disminución del número de plantas sanas (6-11%).



**Figura 9. Porcentajes de plantas sanas registrados ocho semanas después del trasplante<sup>5</sup>.**

**Tabla 8. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) de los porcentajes de plantas sanas registrados a las ocho semanas después del trasplante.**

Fuente de Variación	SC	GL	CM	F	P valor
Tratamientos	3717,9	11	301,63	12,22	<0,0001
Inoculación*Tratamientos	264,55	6	44,09	0,39	0,8835
CV	5,14				

<sup>5</sup> Valores con la misma letra no difieren entre sí según el Test de Tukey al 0,05 de probabilidades.

### 3.3.3. Evaluación de la colonización de los biocontroladores y del peso seco en plantas tratadas

Los biocontroladores fueron aislados de todos los tratamientos aplicados al suelo y específicamente en los tejidos de la raíces. En ningún caso se obtuvieron aislamientos a partir de tejidos de tallos y hojas de plantas aplicadas, tampoco estuvo presente en los testigos.

Los valores de peso de raíces y total de las plantas evaluadas mostraron que en los tratamientos con los biocontroladores la respuesta en la producción de materia seca fue superior a los testigos, presentándose diferencias estadísticas entre los tratamientos y los métodos de inoculación utilizados (Tabla 8).

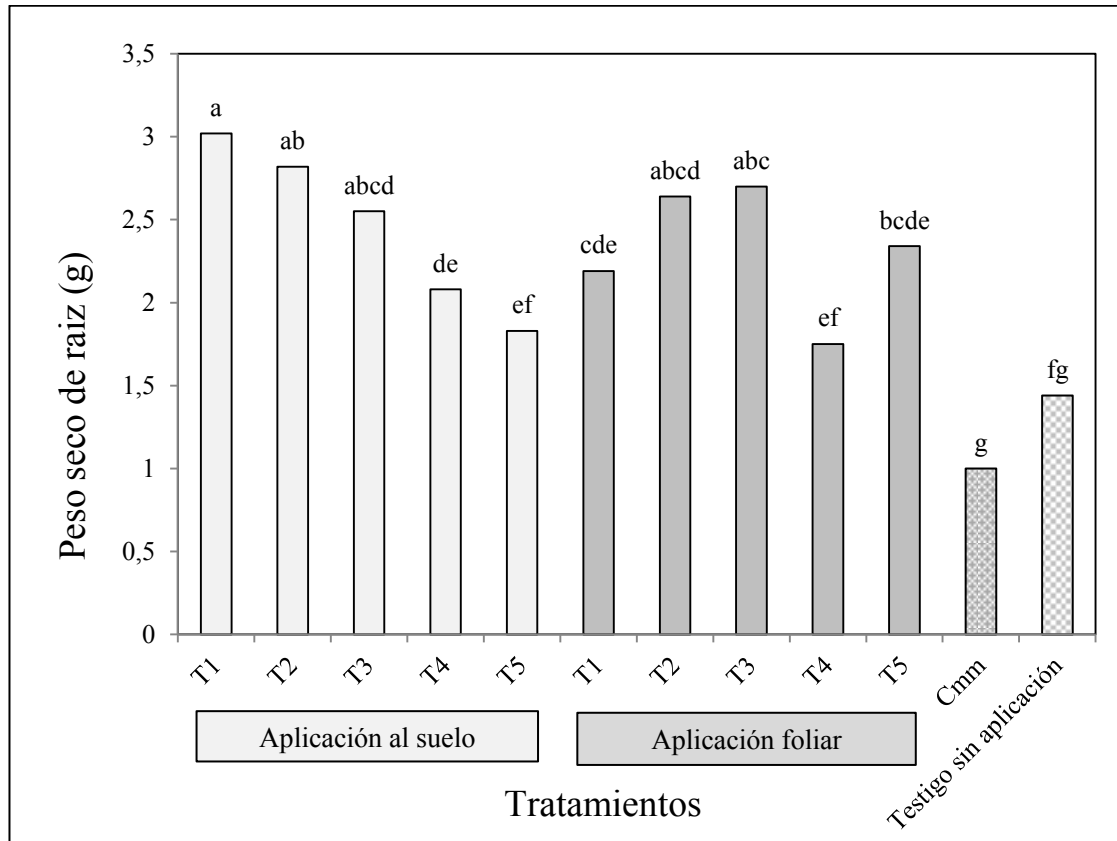
Las plantas tratadas con *Trichoderma* spp. presentaron valores de peso seco de raíces y peso total hasta tres veces superiores a los encontrados en el testigo con *C. m. michiganensis* cuyas plantas tuvieron un promedio de 1,0 g de peso de materia seca de raíces. El testigo absoluto presentó un peso seco de raíces de 1,44 g.

Los tratamientos 1, 2 y 3 incrementaron el desarrollo de las raíces aplicados al suelo o a las hojas, sin embargo, el efecto de los dos primeros fue estadísticamente superior cuando fueron inoculados al suelo (Figura 8 y Tabla 9), presentando valores promedios de 3,02 y 2,82 g de materia seca por planta respectivamente. El efecto en el incremento de materia seca de raíces para los tratamientos 4 y 5 fue menor en comparación con los otros tratamientos, aunque superior a los testigos.

**Tabla 9. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) del peso seco de raíces registrado a las ocho semanas después del trasplante.**

Fuente de Variación	SC	GL	CM	F	P valor
Tratamientos	25,94	6	4,32	57,80	<0,0001
Inoculación*Tratamientos	2,63	6	0,44	5,86	0,0001
CV	13,29				

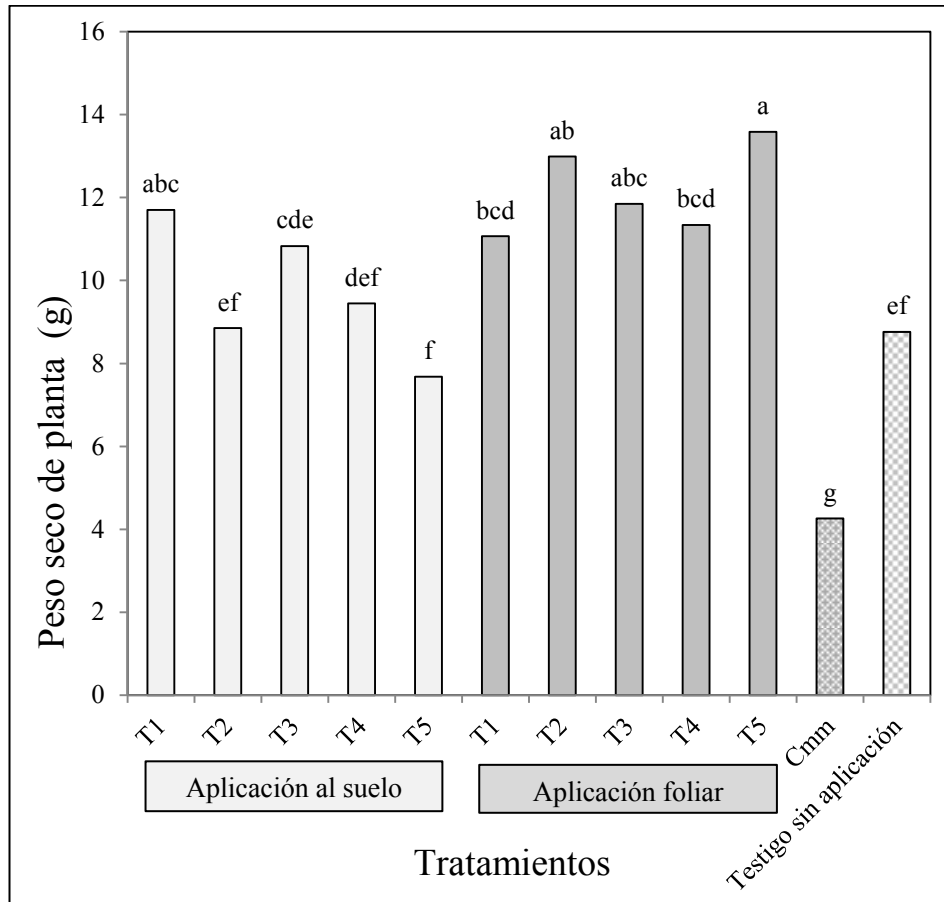




**Figura 10. Promedios de peso seco de raíces por planta registrados ocho semanas después del trasplante<sup>6</sup>.**

De manera general, se observó que el incremento de materia seca total por planta fue mayor en los tratamientos con aplicación en el área foliar (Figura 9 y Tabla 9). El tratamiento 5 presentó el mayor incremento en peso seco con un promedio de 13,59 g por planta, seguido de los tratamientos 2 y 3 quienes difirieron levemente entre sí con 12,99 y 11,85 g respectivamente. Las plantas en las que la aplicación de *Trichoderma* spp. fue en el suelo tuvieron un desempeño similar al presentado por el testigo sin aplicación (8,76 g) aunque superior al testigo *C. m. michiganensis* (4,26 g).

<sup>6</sup> Valores con la misma letra no difieren entre sí según el Test de Tukey al 0,05 de probabilidades.



**Figura 11. Promedios de peso seco de plantas registrados ocho semanas después del trasplante<sup>7</sup>.**

**Tabla 10. Valores de probabilidad (P) obtenidos a partir de los correspondientes análisis de medias (ANOVA) del peso seco total registrado a las ocho semanas después del trasplante.**

Fuente de Variación	SC	GL	CM	F	P valor
Tratamientos	388,46	6	64,74	72,94	<0,0001
Inoculación*Tratamientos	88,40	6	14,73	16,60	<0,0001
CV	9,74				

<sup>7</sup> Valores con la misma letra no difieren entre sí según el Test de Tukey al 0,05 de probabilidades.

## 4. DISCUSION

### 4.1. Aislamiento e identificación de *Trichoderma* spp.

De las tres muestras de suelo analizadas se obtuvieron nueve cepas de *Trichoderma* spp., lo que demuestra la presencia de este género en los suelos hortícolas de la zona. Esto coincide con lo expuesto por Harman *et al.* (2004) y Samuels (2006), quienes sostienen que *Trichoderma* spp. es un microorganismo de vida libre del suelo y ha sido aislado de muchos suelos del mundo llegando algunas de sus especies a considerarse cosmopolitas.

*T. harzianum* fue la especie predominante entre las cepas recuperadas, lo cual coincide con Joshi *et al.* (2010) y Harman *et al.* (2004) quienes sostienen que esta especie es una de las más frecuentes en muestras de suelo.

La cantidad de aislamientos obtenidos por gramo de suelo (entre 2 a 8 x 10<sup>2</sup> UFC) muestran que la población de los biocontroladores en los suelos de las hortícolas es relativamente baja. Las labores de desinfección de suelos usadas comúnmente en el Cinturón Hortícola Platense tienden a ser agresivas e incluir agroquímicos de elevada toxicidad. Stirling (2011) señala que la desinfección de suelos afecta las poblaciones microbianas que de manera natural suprimen el efecto de los patógenos. Aunque los efectos de los agroquímicos sobre el desarrollo de este género es variable, por regla general, las especies de *Trichoderma* tienden a soportar una amplia gama de agroquímicos utilizados en la agricultura (Kredics *et al.* 2003, Verma *et al.* 2007). Esto explicaría la presencia de aislamientos de *Trichoderma* spp. en las muestras analizadas.

Bajo la influencia de factores como los agroquímicos y disponibilidad de nutrientes, los aislamientos obtenidos nos dan una idea de la capacidad que poseen para soportar condiciones de estrés. Esto coincide con lo presentado por Liu *et al.* (2008) quienes encontraron que la mayor parte de los microorganismos habitantes del suelo son sensibles a las actividades de la agricultura convencional, especialmente a la aplicación de fungicidas y fertilizantes inorgánicos. Sin embargo, según los mismos autores, las especies de *Trichoderma* muestran ser menos sensible a estas alteraciones en el suelo y tendrían la capacidad de ocupar rápidamente los nichos dejados por otros microorganismos.

#### 4.2. Evaluación del efecto *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de *C. m. michiganensis*

Todos los aislamientos evaluados presentaron efecto sobre el crecimiento *C. m. michiganensis* en medio de cultivo comprobándose diferencias estadísticas entre los tratamientos y el testigo. Esta reducción en el crecimiento de las colonias en el área cercana al disco de cultivo del biocontrolador fue evaluada como porcentaje de supresión y podría estar influenciada por la producción de metabolitos tóxicos o antibióticos producidos por *Trichoderma* spp. tal como lo sugiere Howel (1998). Al respecto, Harman *et al.* (2004), Hjeljord & Tronsmo (1998), Verma *et al.* (2007) y Vinale *et al.* (2008) sostienen que la capacidad de biocontrol está correlacionada con la producción de antibióticos que pueden ser de tipo volátil o no volátil.

Estudios realizados por Ezziyani *et al.* (2004) mostraron que la presencia de *Trichoderma* spp., en cultivos duales con *Phytophthora capsici*, jugaría un papel importante en la reducción y destrucción de la colonia del patógeno. De igual manera, Patil *et al.* (2012) encontraron que el uso de metabolitos difusibles y volátiles en medios de cultivo, redujeron el crecimiento *in vitro* de *Pythium* spp. causante de pudrición de raíces en tomate.

A pesar de que todos los aislamientos mostraron un efecto sobre el desarrollo de la bacteria, sólo uno de ellos (el aislamiento A4) mostró tener un efecto inhibitorio. La bacteria en presencia del aislamiento A4 cubrió el 84,24% del área del medio de cultivo, mientras que los tratamientos restantes y el testigo superaron el 99% de área de medio cultivo colonizada. Los aislamientos de *Trichoderma* spp. evaluados en este experimento tienen efecto sobre la bacteria, sin embargo, el nivel de acción varía entre ellos. Se ha comprobado que la actividad antagonista de algunos aislamientos de *Trichoderma* spp. podría diferir aun cuando pertenezcan a la misma especie (Köhl & Schlösser 1989 citado por Hjeljord & Tronsmo 1998, Vinale *et al.* 2008). La literatura presenta resultados variables referente a la producción de antibióticos por las cepas antagonistas, tales como los observados por Eziashi *et al.* (2006) quienes mostraron que los antibióticos producidos por *T. viride* inhibieron el crecimiento *in vitro* de *Ceratocystis* spp. entre 2 a 81%. Estudios realizados por Joshi *et al.* (2010) revelaron que únicamente el 5% de los aislamientos evaluados fueron altamente antagonistas.

Vinale *et al.* (2008) aseguran que la aplicación de estos metabolitos para la protección de cultivos puede ser una realidad en el futuro inmediato, debido a sus bajos costos de producción a gran escala, especialmente con aquellos extractos que posean actividad antimicrobiana tanto contra hongos como bacterias (Leelavathi *et al.*, 2014).

#### **4.3. Evaluación del efecto de *Trichoderma* spp. sobre la infección de *C. m. michiganensis* en plantas de tomate en condiciones de invernáculo**

##### **4.3.1. Altura de plantas, número de flores y frutos.**

Los resultados obtenidos en las pruebas de invernáculo muestran que la presencia de la bacteria puede afectar el desarrollo de las plantas; sin embargo, la aplicación de *Trichoderma* spp. fue efectiva reduciendo el impacto de la enfermedad permitiendo su normal desarrollo, e inclusive permitió elevar los valores de crecimiento de las plantas a niveles superiores a los obtenidos en el testigo absoluto.

Esta respuesta coincide con lo expresado por Hermosa *et al.* (2012), quienes sostienen que este género de biocontroladores pueden inducir el crecimiento de plantas, como un efecto adicional al control de enfermedades (Naseby *et al.* 2000). Al respecto, Bailey & Lumsden (1998) señalan los mismos efectos en plantas de tomate, maíz, entre otros cultivos.

Aunque se observó un efecto en el crecimiento en todos los tratamientos con *Trichoderma* spp. los análisis para cada parámetro revelaron diferencias estadísticas entre los aislamientos evaluados y entre los métodos de inoculación utilizados. Lo & Lin (2002) y Tucci *et al.* (2010) encontraron que, inclusive cepas de la misma especie muestran diferentes grados de acción sobre el crecimiento de cultivos y que también pueden variar de un cultivar a otro. Los autores señalan que esto podría estar influenciado por factores aún desconocidos.

En cuanto al número de flores y frutos, los tratamientos con aplicación al suelo no difirieron estadísticamente entre sí independientemente del método de inoculación utilizado pero sí de los testigos, lo que nos da la posibilidad de mantener la producción a niveles normales aunque la bacteria haya estado presente en la población de plantas, capacidad que poseen algunos géneros de biocontroladores y

ampliamente demostrada para el caso de *Trichoderma* spp. (Harman *et al.* 2004, Hermosa *et al.* 2012).

#### **4.3.2. Presencia/ausencia de la enfermedad**

A las ocho semanas después del trasplante, los síntomas presentes fueron retraso en el crecimiento, bordes de foliolos secos y marchitamiento leve generalizado. La ausencia de síntomas típicos de la enfermedad como las manchas "ojo de pájaro" podría deberse al hecho de que esta sintomatología es poco frecuente en cultivos de invernáculo, según lo señalado por CABI & EPPO (1999) y EFSA (2014).

La variabilidad en los síntomas observados al evaluar la enfermedad está condicionada por múltiples factores, tales como, el tipo de infección (sistémica o superficial), lugar de producción (invernáculo o campo), edad de la planta al momento de la infección, prácticas culturales, cultivar, entre otras (EFSA 2014, OEPP/EPPO 2013, Lelis 2013).

Al momento de la evaluación, el 50% de las plantas testigos mostraron marchitamiento leve y los bordes de los foliolos secos. Estos síntomas son característicos de la enfermedad (Borboa *et al.* 2009, Gartemann *et al.* 2003, Utkhede & Koch 2004) y con condiciones favorables provocan la muerte de la planta (OEPP/EPPO, 2013), pero bajo condiciones menos favorables se puede presentar retrasos en el marchitamiento (EFSA, 2014).

Según datos meteorológicos de la Estación Experimental Ing. Agr. J. Hirschhorn (UNLP 2016), las temperaturas promedio de los meses de septiembre a octubre tanto en el año 2014 como en el 2015 fueron relativamente bajas (13,5°C y 16,5°C, respectivamente) comparadas con las medias históricas de esos meses (19°C y 22°C) (Anexo 7.1.). Aunque se intentó elevar la temperatura dentro del invernáculo con la ayuda de un radiador (promedio de 21°C), las temperaturas logradas probablemente influyeron en el desarrollo de la enfermedad y la manifestación de sus síntomas. Chang *et al.* (1991), informaron que la temperatura óptima del suelo y del aire para el desarrollo de la enfermedad fue superior a 28°C. Según los mismos autores, el periodo de incubación y la severidad del cancro estuvieron influenciados por la

temperatura, edad de la planta, concentración del inóculo y el cultivar. Agrios (2005) sostiene que el ciclo completo de la enfermedad en el más corto periodo de tiempo usualmente ocurre cuando la temperatura es óptima para el desarrollo del patógeno pero sobre o bajo la temperatura óptima del hospedante y agrega que a temperaturas bajo o sobre el óptimo del patógeno, pero cerca del óptimo del hospedante, la enfermedad se desarrolla lentamente.

En los análisis estadísticos realizados no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos con *Trichoderma* spp. cuando se evaluó el porcentaje de plantas sanas, sin embargo, se pudo observar que todos los tratamientos con los biocontroladores mostraron valores superiores y diferentes estadísticamente del testigo. Esto probablemente se debe al hecho de que *Trichoderma* spp. tiene la capacidad de inducir resistencia sistémica y localizada a un rango de enfermedades, incluidas las causadas por bacterias (Harman 2006, Nawrocka & Malolepsza 2013). Los aislamientos de *Trichoderma* spp. pueden inducir diferentes tipos de señales que dan como resultado la activación de genes y la producción de enzimas que están involucradas en la supresión de patógenos y el incremento de barreras bioquímicas y estructurales en la planta (Harman *et al.* 2004, Hermosa *et al.* 2012, Hoitink *et al.* 2006, Nawrocka & Malolepsza 2013). Este efecto sumado al mejoramiento del vigor de las plantas juega un papel importante al momento de desarrollarse la infección y la posterior manifestación de los síntomas.

#### **4.3.3. Evaluación de la colonización de los biocontroladores y del peso seco en plantas tratadas**

Todos los aislamientos de *Trichoderma* spp. fueron eficientes colonizadores de las raíces, a pesar de que no se logró aislarlos de tallos y hojas. Hermosa *et al.* (2012) y Harman *et al.* (2004) indicaron que esta es una característica del género *Trichoderma* especialmente de aquellos aislamientos que inducen el crecimiento de las plantas.

El incremento en el peso seco tanto de raíces como de las plantas fue superior a los testigos, encontrándose diferencias entre los tratamientos. El incremento obtenido

fue hasta 300% superior a los testigos y similar a los resultados de Windham *et al.* (1986) quienes adicionaron *Trichoderma* spp. a suelo estéril y encontraron que tanto en plantas de tomates como en tabaco se incrementaron el peso seco de raíces y área vegetativa en 213-175% y 259 - 318 %, respectivamente. Bailey & Lumsden (1998) también señalan efectos como el incremento en el peso de seco tal como se observó en los resultados presentados anteriormente.

El efecto en el peso seco está directamente relacionado al incremento en el desarrollo de las plantas tratadas con los biocontroladores. Naseby *et al.* (2000) indican que este es un efecto adicional al control de las enfermedades debido a que encontraron un efecto significativo sobre el crecimiento de las plantas y a la vez redujeron el daño causado por *Phytophthora* spp. en arveja.

Bailey *et al.* (2011) sostienen que el desarrollo de las raíces tiene el beneficio adicional de elevar la capacidad de soportar condiciones de estrés en las plantas colonizadas, especialmente aquellas asociadas a la captación de agua. Al respecto, Hermosa *et al.* (2012) y Brotman *et al.* (2013) coinciden en que las cepas de *Trichoderma* pueden interactuar directamente con las raíces colonizando el apoplasto, incrementando el potencial de crecimiento, la resistencia a enfermedades y la tolerancia a estreses abióticos.

Dado que a pequeña escala *Trichoderma* spp. ha mostrado ser un potencial agente de biocontrol frente a la enfermedad, es necesario continuar con la búsqueda y selección de cepas para el control del Cancro Bacteriano del tomate, a fin de en un futuro poner a disposición de los agricultores una alternativa más acorde con las políticas medioambientales.

Además, más experimentos de campo, incluyendo un mayor número genotipos de cultivares de la zona, permitirán obtener resultados más cercanos a las realidades de los productores y acortar la brecha entre la investigación de laboratorio y campo.



## 5. CONCLUSIONES GENERALES

Con respecto a la hipótesis planteada en el presente trabajo, se acepta y se concluye que:

Los aislamientos de *T. harzianum* obtenidos a partir de suelo de plantaciones de tomate del Cinturón Hortícola Platense tienen potencial para actuar frente a infecciones causadas por *C. m. michiganensis* en el cultivo de tomate a nivel de invernáculo.

Adicionalmente, se destaca que:

- *Trichoderma* spp. es un habitante del suelo de plantaciones de tomate del Cinturón Hortícola Platense.
- Observaciones microscópicas permitieron asociar la mayoría de los aislamientos al género *T. harzianum*.
- Todas las cepas aisladas poseen la capacidad de suprimir el desarrollo de las colonias del patógeno en condiciones *in vitro*, una de ellas mostró potencial para inhibir el crecimiento de *C. m. michiganensis*.
- Las plantas tratadas con los aislamientos de *Trichoderma* spp. mostraron incremento en altura, número de flores y frutos en comparación con los testigos.
- Bajo las condiciones del experimento las plantas del testigo del patógeno presentaron de manera generalizada marchitamiento y los bordes de los folíolos secos, síntomas característicos de la enfermedad en cultivos de invernáculo.
- Durante los dos años en que se desarrolló el experimento, la temperatura de los meses de agosto a octubre influyeron en el desarrollo de la enfermedad, sin embargo, se mostraron diferencias entre los tratamientos vs. los testigos lo que indicaría que aún bajo estas condiciones los aislamientos mejoraron la sanidad de las plantas evaluadas.
- Los aislamientos evaluados en condiciones de invernáculo mostraron capacidad para colonizar raíces y elevar la acumulación de materia seca.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Agrawal, K., Sharma, D., & Jain, V. (2012). Seed-borne bacterial diseases of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and their control measures: a review. *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences*, 2(2), 173-182.
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology* (5 ed.). London: Elsevier Academic Press.p. 251.
- Alippi, H., & Mónaco, C. (1990). Antagonismo in vitro entre hongos fitopatógenos y saprobios de suelos hortícolas. *Revista Argentina de Microbiología*(22), 90-93.
- Argerich, C., Troilo, L., Rodriguez, M., Izquierdo, J., Strassca, M., Balcaza, L., & Iribarren, M. (2011). Manual de Buenas Prácticas agrícolas en la cadena de Tomate. (A. Argerich, & L. Troilo, Edits.) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación - FAO. 262p.
- Asociación Tomate 2000. (2014). Programa para el aumento de la competitividad de la industria del tomate: informe progresos 2013-2014. La Consulta.181p.
- Bailey, B., & Lumsden, R. (1998). Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. En C. K. G. Harman, *Trichoderma & Gliocladium* (Vol. 2, p. 185-204). Bristol: Taylor & Francis.
- Bailey, B., Bae, H., Melnick, R., & Crozier, J. (2011). The endophytic *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b enhances seedling growth and delays the onset of drought stress in *Theobroma cacao*. En M. Pirttila, C. Frank, M. Pirttila, & C. Frank (Edits.), *Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications* (p.157-172). Netherlands: Springer.
- Balestra, G., Heydari, A., Ceccarelli, D., Ovidi, E., & Quattrucci, A. (2009). Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. *Crop Protection*, 28(10), 807-811.
- Borboa, F., Rueda, E., Acedo, E., Ponce, J., Cruz, M., García, J., & Ortega, M. (2010). Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales contra

*Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12, 539-547.

- Borboa, J., Rueda, E., Acedo, E., Ponce, J., Cruz, M., Juárez, O., & García, A. (2009). Detection of *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* in Tomato of the state of Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(4), 319-326.
- Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, A., Tohge, T., Takayuki, T., Fernie, A., & Willmitzer, L. (2013). *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathogens*, 9(3), 1-15.
- Burokiene, D. (2006). Early detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seedlings. *Agronomy Research*, 151-154.
- Butt, T., Jackson, C., & Magan, N. (2001). Fungi as biocontrol agents. London: CABI Publishing. p. 377-384.
- CABI; EPPO. (1999). Data sheets on quarantine pests *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. European Union. Boletín OEPP/EPPO, 43(1), 46-47.
- Chang, R., Ries, S., & Pataky, J. (1991). Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology*, 81(10), 12716-1281.
- Chaverri, P., Gazis, P., & Samuels, G. (2011). *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. *Mycologia*, 103(1), 139-151.
- Chet, I., Benhamou, N., & Haran, S. (1998). Mycoparasitism and lytic enzymes. En G. Harman, & C. Kubicek, *Trichoderma & Gliocladium* (Vol. 2, p. 153-172). Bristol: Taylor & Francis.
- Colombo, M. (2002). Manejo de enfermedades en cultivos protegidos de tomate. INTA Publicación Técnica N°4. Centro Regional Corrientes. p. 44-46.

- Davis, M., Graves, A., Vidaver, A., & Harris, R. (1984). *Clavibacter*: a New Genus Containing Some Phytopathogenic Coryne form Bacteria. *Internatinal Journal of Systematic Bacterioogy*, 34, 107-117.
- De Boer, M., Van Der Sluis, I., Van Loon, L., & Bakker, P. (1999). Combining flourescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of Fusarium wilt of radish. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 201-210.
- De León, L., Sivero, F., Lopez, M., & Rodriguez, A. (2011). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seed born tomato pathogen: Healthy seeds are still the goal. *Plant Diseases*, 95(11), 1328-1339.
- De Souza, J., Bailey, B., Pomella, A., Erbe, E., Murphy, C., Bae, H., & Hebbar, P. (2008). Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. *Biological Control*, 46, 36-45.
- EFSA (2014). Scientific opinion on the pest categorisation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. *EFSA Journal*, 12(6), 1-26.
- Eichenlaub, R., & Burger, A. (2006). *Clavibacter michiganensis*, a group of Gram-positive phytopathogenic bacteria. En G. S., & S. Gnanamanickam (Ed.), *Plant-Associated Bacteria*. Springer. p. 385-421.
- Elad, Y., Chet, I., & Henis, Y. (1981). A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica*, 9(1), 59-67.
- Elad, Y., Zimand, G., Zaqs, Y., Zuriel, S., & Chet, I. (1993). Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould. *Plant Pathology*, 42, 324-332.
- Evans, H., Holmes, K., & Thomas, S. (2003). Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa disease. *Mucological Progress*, 2, 149-160.

- Eziashi, E., Uma, N., Adekunle, A., & Airede, C. (2006). Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. *African Journal of Biotechnology*, 5(9), 703-706.
- Ezziyyani, M., Sánchez, C., Ahmed, A., Requena, M., & Candela, M. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*, 26, 35-45.
- Flores, C. (2012). Enfermedades de tomate: guía de consulta para técnicos y agricultores. INTA Yuto. Guía de consulta - Ediciones INTA. 136 p.
- Flores, F. (2004). Evaluación in vitro del control de *Bacillus* spp. sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Memoria de Título de Ingeniería de la Universidad de Talca. 36p.
- Gartemann, K., Kirchner, O., Engemann, J., Grafen, I., Eichenlaub, R., & Burger, A. (2003). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: First steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 106, 179-191.
- González, J., Maruri, J., & González, A. (2005). Evaluación de diferentes concentraciones de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum* agente causal de la pudrición de plántulas en papaya (*Carica papaya* L.) en Tuxpan, Veracruz, México. *Revista Científica UDO Agrícola*, 5(1), 45-47.
- Harman, G. (2006). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96, 190-194.
- Harman, G., Howell, C., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(1), 43-56. *Microbiology*, 2(1), 43-56.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158(1), 17-25.

- Hjerljord, L., & Tronsmo, A. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. En G. Harman, & C. Kubicek, *Trichoderma & Gliocladium* (Vol. 2, p. 131-154). Bristol: Francis & Taylor.
- Hoitink, H., Madden, L., & Dorrance, A. (2006). Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp.: interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. *Phytopathology*, *96*(2), 186-189.
- Howell, C. (1998). The role of antibiosis in biocontrol. En G. Harman, & C. Kubicek, *Trichoderma & Biocontrol* (Vol. 2, págs. 173-184). Bristol: Taylor & Francis.
- Howell, C. (2006). The nature and application of biocontrol microbes II : *Trichoderma* spp. understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology*, *96*(2), 178-180.
- Jash, S., & Pan, S. (2007). Variability in antagonistic activity and root colonizing behaviour of *Trichoderma* isolates. *Journal of Tropical Agriculture*, *45*(1), 29-35.
- Joshi, B., Bhatt, R., & Bahukhandi, D. (2010). Antagonistic and plant growth activity of *Trichoderma* isolates of Western Himalayas. *Journal of Environmentak Biology*, *31*(6), 921-928.
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F., & Nagy, E. (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Foof Technology and Biotechnology*, *41*(1), 37-42.
- Leelavathi, M., Vani, L., & Reena, P. (2014). Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *3*(1), 96-103.
- Liu, B., Glenn, D., & Buckley, K. (2008). *Trichoderma* communities in soils from organic, sustainable, and conventional farms, and their relation with Southern blight of tomato. *Soil Biology and Biochemistry*, *40*(5), 1124-1136.

- Lo, C., & Lin, C. (2002). Screening Strains of *Trichoderma* spp for plant growth enhancement in Taiwan. *Plant Pathology*, 11, 215-220.
- Lozano, J. (2012). La producción de hortalizas en Argentina. Informe Corporación del Mercado Central de Buenos Aires. Recuperado el 13 de Noviembre de 2015, de [http://www.mercadocentral.gob.ar/zip tecnicas/la\\_produccion\\_de\\_hortalizas\\_en\\_argentina.pdf](http://www.mercadocentral.gob.ar/zip tecnicas/la_produccion_de_hortalizas_en_argentina.pdf). 29 p.
- Milijasevic, S., Todorovic, B., Potocnik, I., Rekanovic, E., & Stepanovic, M. (2009). Effects of copper-based compounds, antibiotics and a plant activator on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouse tomato seedlings. *Pesticide and Phytomedicine*, 24, 19-27.
- Mónaco, C. (1990). Evaluación de la eficiencia de micoparásitos sobre esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* "in vitro". *Revista de la Facultad de Agronomía UNLP*, 65(1), 67-73.
- Mpika, J., Kebe, I., Issali, A., N'Guessan, F., Druzhinina, S., Komon-Zelaaowska, M., & Ake, S. (2009). Antagonist potential of *Trichoderma* indigenous isolates for biological control of *Phytophthora palmivora* the causative agent of black pod disease on cocoa (*Theobroma cacao* L.) in Cote d'Ivoire. *African Journal of Biotechnology*, 8(20), 5280-5293.
- Naseby, D., Pascual, J., & Lynch, J. (2000). Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 161-169.
- Nawrocka, J., & Malolepsza, U. (2013). Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological Control*, 67, 149-156.
- OEPP/EPPO. (2013). PM 7/42 (2) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. European and Mediterranean Plant Protection Organization/EPPO. *Bulletin EPPO*, 43 p.
- Papavizas, G. (1981). Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizospheres. *Phytopathology*, 71, 121-125.

- Patil, A., Laddha, A., Lunge, A., Paikrao, H., & Mahure, S. (2012). *In vitro* antagonistic properties of selected *Trichoderma* species against tomato root rot causing *Pythium* species. *International Journal of Science Environment and Technology*, *1*(4), 302-315.
- Polack, A., & Mitidieri, M. (2005). Producción de tomate diferenciado: Protocolo preliminar de manejo integrado de plagas y enfermedades. INTA Documento Divulgativo N° 13. 29p.
- Pouvova, D., Kokoskova, B., Pavela, R., & Rysanek, P. (s.f.). Effectivity of plant essential oils against *Clavibacter michiganensis*, *in vitro*. *Zemdirbyste-agriculture*, *95*(3), 440-446.
- Ratnadass, A., Fernandez, P., Avelino, J., & 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.
- Samuels, G. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, *96*(2), 195-206.
- Samuels, G., Chaverri, P., Farr, D., & McCray, E. (2014). Obtenido de *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA: <http://taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>
- Sandoval, C. (2004). *Manual técnico de manejo integrado de enfermedades en cultivos hidropónicos* (1 ed.). Manual FAO; Universidad de Talca. 53p.
- Shaad, N., Jones, J., & Chun, W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria (3 ed.). APS Press. 398p.
- Sharabani, G., Shtienberg, D., Borenstein, M., Shulhani, R., Lofthouse, M., Sofer, M., & Manulis-Sasson, S. (2013). Effects of plant age on disease development and virulence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato. *Plant Pathology*, *62*(5), 1114-1122.



- Sivan, A., & Chet, I. (1989). The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on ryzhosphere colonization. *Phytopathology*, 79(2), 198-203.
- Slusarski, C. (2009). Attempts at biological control of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on rockwool-grown greenhouse tomatoes. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 69, 125-134.
- Smith, E. (1910). A new tomato disease of economic importance. *Science*, 31, 794-796.
- Stirling, G. (s.f.). Biological control of plant-parasitic nematodes: an ecological perspective, a review of progress and opportunities for further research. En K. Davies, & Y. Spiegel (Edits.), *Biological control of plant-parasitic nematodes: building coherence between microbial ecology and molecular mechanisms* (1 ed., págs. 1-38). Springer.
- Stocco, M., Mónaco, C., & Cordo, C. (2010). A comparision of preservation method for *Trichoderma harzianum* cultures. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(4), 2013-2015.
- Talibi, I., Amkraz, N., Askarne, L., Msanda, F., Saadi, B., Boudyach, E., & Ait Ben Aoumar, A. (2011). Antibacterial activity of moroccan plants extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomatoes bacterial canker. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4332-4338.
- Tancos, M., Chalupowicz, L., Barash, I., Manulis-Sasson, S., & Smart, C. (2013). Tomato fruit and seed colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through external and internal routes. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(22), 6948-6957.
- Tlatilpa, M. (2010). Estrategias de manejo de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en jitomate. Tesis de Maestría en Ciencias del Colegio de Postgraduados. 76p.
- Torres, A., & Rodriguez, R. (2006). Hongos en suelos dedicados al monocultivo del Tomate. Boletín INIA N°155. p.23-40.

- Tucci, M., Roucco, M., De Masi, L., De Palma, M., & Lorito, M. (2010). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology*, 1-14.
- UNLP. (2016). Reportes meteorológicos. Boletín Estación Experimental Ing.Agr. J.Hirschhorn. Obtenido de <http://www.agro.unlp.edu.ar/institucional/boletin-estacion-experimental-jh>
- Utkhede, R., & Koch, C. (2004). Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. *Biocontrol*, 49, 305-313.
- Vargas, S., Pastor, S., & March, G. (2009). Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. *Microbiological Research*, 164, 196-205.
- Verma, M., Brar, S., Tyagi, R., Surampalli, R., & Valero, J. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 1-20.
- Vey, A., Hoagland, R., & Butt, T. (2001). Toxic Metabolites of fungal biocontrol agents. En G. Harman, & C. Kubicek, *Fungi as biocontrol agents* (p. 311-346). London: CABI Publishing.
- Lelis, F. (2013). Colonização de sementes e plantas de tomate cultivadas *in vitro* por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* transformadas com gfp. Tesis Doctoral de la Universidade Federal de Lavras. 78p.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E., Marra, R., Woo, S., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1-10.
- Viteri, M., Ghezán, G., & Iglesias, D. (2013). Tomate y Lechuga: producción, comercialización y consumo. INTA, Estudio socioeconómico de los sistemas agroalimentarios y agroindustriales N°14. 165 p.

- Windham, M., Elad, Y., & Baker, R. (1986). A mechanism of increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 76(5), 518-521.
- Xu, X. (2010). Seed transmission of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and development of strategies to control the pathogen in seed. Tesis Doctoral de The Ohio State University. 182p.
- Xu, X., Miller, F., Baysal-Gurel, K., Gartemann, R., Eichenlaub, K., & Rajashekara, G. (2010). Bioluminescence imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection in tomato seeds and plants. *Applied Environmental Microbiology*, 76, 3978-3988.
- Kronka, A. (2004). Cancro bacteriano do tomateiro: metodologia de inoculação, reação de genótipos do hospedeiro e eficiência de químicos sobre o controle. Tesis Doctoral de la Universidade de Sao Paulo. 74 p.
- Zanón, M. (2009). *Efecto de la biofumigación y biosolarización en el control de agentes fitopatógenos*. Tesis Doctoral de la Universidad Politécnica de Valencia. 301 p.

## 7. ANEXOS

### 7.1. Datos meteorológicos de los meses de Agosto a Octubre de los años 2014 y 2015 obtenidos en la Estación Experimental Ing. Agr. J. Hirschhorn (UNLP, 2016).

Boletín Agrometeorológico Mensual  
CLIMATOLOGIA Y FENOLOGIA AGRICOLA

Agosto de 2014

UBICACION: LAT 34 59 S - LONG 57 59 W de G - A.S.N.M. 45 m

Fecha	Temperatura del aire			Temp.Suelo	Radiación	Presión	Viento (h=3.6 m)		Precipitaciones		E.T.P.	Humedad
	Media °C	Máx. °C	Min. °C	h=(-0,05 m) °C	Solar Wat./m2	Barométrica Hpa.	Velocidad Km/H.	Dom.	Cantidad mm.	Íax.Intensidad mm/h	mm	%
01/08/2014	15.7	21.2	10.9	14.2	9104	1006.9	1.7	N	0.00	0.00	1.5	73
02/08/2014	17.5	22.5	11.1	14.6	5233.0	1000.3	3.4	N	23.2	30.5	0.8	92
03/08/2014	15.6	19.8	12.9	15.4	5705.0	1002.6	2.3	SO	0.0	0.0	1.3	69
04/08/2014	10.3	15.7	4.2	12.9	12708.0	1018.3	3.2	O	0.8	1.0	2.2	58
05/08/2014	11.0	16.3	2.7	11.2	12454.0	1018.3	8.1	NNE	0.0	0.0	2.7	59
06/08/2014	13.3	15.7	11.8	11.8	4159.0	1008.8	6.6	N	0.0	0.0	1.4	62
07/08/2014	10.8	16.4	5.0	11.8	12835.0	1020.9	3.1	OSO	0.0	0.0	2.2	60
08/08/2014	9.4	17.2	3.1	10.6	12877.0	1025.1	1.7	N	0.0	0.0	2.0	60
09/08/2014	12.2	16.7	6.2	10.6	12848.0	1014.3	6.7	N	0.0	0.0	2.6	63
10/08/2014	13.1	17.5	5.3	12.2	7052.0	1008.9	3.7	SSO	0.0	0.0	1.4	67
11/08/2014	7.6	13.7	2.1	10.4	8849.0	1016.1	2.2	NO	0.0	0.0	1.5	67
12/08/2014	7.7	13.9	2.4	9.4	13060.0	1019.0	4.8	SO	0.0	0.0	2.6	51
13/08/2014	7.6	15.2	0.6	8.6	13646.0	1026.1	5.1	NO	0.0	0.0	2.7	44
14/08/2014	11.0	16.4	5.5	9.4	13636.0	1021.7	8.6	NNO	0.0	0.0	3.2	43
15/08/2014	11.2	17.4	6.6	10.2	13679.0	1021.3	5.1	N	0.0	0.0	2.6	54
16/08/2014	12.9	19.1	7.1	11.1	12952.0	1020.1	2.5	NNE	0.0	0.0	2.2	64
17/08/2014	14.4	23.1	5.9	11.9	13571.0	1019.1	2.0	N	0.0	0.0	2.3	74
18/08/2014	18.1	24.1	13.3	14.3	14088.0	1013.3	5.4	N	0.0	0.0	2.7	73
19/08/2014	17.5	26.0	10.4	15.1	14005.0	1013.4	0.3	N	0.0	0.0	2.3	74
20/08/2014	17.5	24.3	9.8	15.1	13909.0	1011.7	2.7	N	0.0	0.0	2.5	74
21/08/2014	20.6	26.7	16.1	16.5	11334.0	1006.7	3.3	N	0.0	0.0	2.6	68
22/08/2014	18.6	24.4	14.3	16.6	9003.0	1007.0	2.5	E	0.0	0.0	1.8	75
23/08/2014	18.9	25.6	15.6	16.7	9351.0	998.0	4.0	ENE	2.4	2.5	1.8	80
24/08/2014	13.2	16.0	10.2	14.5	1584.0	997.8	3.7	O	31.8	30.5	0.4	91
25/08/2014	8.3	10.2	6.4	10.7	3687.0	1000.7	16.2	NO	3.4	2.0	1.4	77
26/08/2014	9.1	11.8	6.4	10.3	7809.0	1011.5	8.4	SO	0.0	0.0	1.8	69
27/08/2014	7.0	12.3	3.3	10.3	14452.0	1019.8	0.0	SO	0.0	0.0	1.9	69
28/08/2014	6.5	13.1	0.2	10.0	15400.0	1021.8	0.3	ENE	0.0	0.0	2.0	74
29/08/2014	9.8	17.4	1.9	10.7	15351.0	1018.0	0.7	N	0.0	0.0	2.4	67
30/08/2014	12.5	17.4	7.3	11.8	10852.0	1011.8	0.8	ENE	0.0	0.0	1.8	80
31/08/2014	14.5	21.8	8.5	13.3	15650.0	1008.7	0.5	O	0.8	0.0	2.4	76
Media	12.7	18.4	7.3	12.3	10994.9	1013.2	3.9	N				68
Total					340843.0				62.4	30.5	63.2	
Normal de Mes	11.6								59.9			

UBICACION: LAT 34 59 S - LONG 57 59 W de G - A.S.N.M. 45 m

Fecha	Temperatura del aire			Temp. Suelo h=(-0,05 m) °C	Radiación Solar Wat/m2	Presión Barométrica Hpa.	Viento (h=3.6 m) Velocidad Km/H. Dom.	Precipitaciones		E.T.P. mm	Humedad %
	Media °C	Máx. °C	Min. °C					Cantidad mm.	Máx.Intensidad mm/h		
01/09/2014	11,8	15,6	6,2	12,8	6432,0	1010,6	2,4 E	0,0	0,0	0,7	89
02/09/2014	14,4	18,4	12,5	13,6	9834,0	1009,1	4,3 ENE	12,6	1,8	1,6	84
03/09/2014	15,0	17,5	12,3	14,0	4313,0	1014,5	2,2 ENE	0,0	0,0	0,7	93
04/09/2014	16,0	18,4	13,6	14,5	8705,0	1016,9	11,9 ENE	0,0	0,0	2,3	77
05/09/2014	15,3	17,1	13,9	14,6	2561,0	1011,1	2,9 ENE	18,6	9,1	0,7	92
06/09/2014	15,0	17,2	11,2	15,1	11281,0	1007,0	6,6 O	28,6	10,7	2,0	81
07/09/2014	14,5	20,4	8,4	13,8	16272,0	1014,2	6,4 NO	0,0	0,0	3,3	59
08/09/2014	17,8	22,7	12,0	15,0	16270,0	1009,5	5,9 N	0,0	0,0	3,5	66
09/09/2014	15,6	20,9	10,5	16,1	3111,0	1002,4	8,7 SSO	16,0	7,1	1,1	76
10/09/2014	11,6	17,3	5,2	13,6	17939,0	1012,9	1,7 O	0,0	0,0	2,9	60
11/09/2014	11,3	18,8	4,3	12,6	16492,0	1018,7	0,9 O	0,0	0,0	2,7	60
12/09/2014	12,0	19,2	5,1	12,7	17367,0	1016,4	2,9 NNE	0,0	0,0	3,2	64
13/09/2014	13,3	18,3	8,2	13,4	10246,0	1016,2	3,6 ESE	3,2	0,8	1,8	82
14/09/2014	14,5	16,2	13,3	14,4	3176,0	1012,9	4,2 SSE	7,6	0,8	0,5	91
15/09/2014	13,3	18,4	6,7	14,1	18609,0	1014,8	3,2 SSO	0,0	0,0	3,2	69
16/09/2014	11,4	18,6	3,4	12,8	18296,0	1016,9	0,5 NNE	0,0	0,0	2,8	65
17/09/2014	13,2	19,3	6,6	13,4	18662,0	1016,7	2,8 ENE	0,0	0,0	3,1	74
18/09/2014	13,5	19,2	6,9	13,8	16814,0	1013,6	1,9 ENE	0,0	0,0	2,7	79
19/09/2014	15,8	21,8	11,7	15,2	15229,0	1009,4	0,8 SSO	0,0	0,0	2,4	83
20/09/2014	14,6	19,0	9,3	15,0	18273,0	1014,5	4,5 SSO	0,0	0,0	3,4	70
21/09/2014	13,5	18,1	7,8	14,5	13353,0	1018,4	1,9 ENE	0,0	0,0	2,3	76
22/09/2014	16,6	21,4	13,6	15,1	17868,0	1012,2	8,1 NNE	0,0	0,0	3,5	68
23/09/2014	13,9	17,2	10,6	14,7	7379,0	1009,9	3,1 S	2,0	3,3	1,2	78
24/09/2014	14,2	21,9	6,6	13,9	18970,0	1012,8	2,8 N	0,0	0,0	3,7	68
25/09/2014	15,4	20,2	10,1	14,2	9210,0	1006,2	5,8 NNE	1,8	0,5	2,2	71
26/09/2014	10,7	17,5	3,2	13,2	19318,0	1016,4	1,0 ONO	0,0	0,0	3,2	56
27/09/2014	11,8	18,5	2,6	12,4	19018,0	1018,3	2,9 N	0,0	0,0	3,6	57
28/09/2014	15,4	18,3	11,4	14,1	6909,0	1008,3	1,9 NE	3,4	2,3	1,5	76
29/09/2014	15,3	20,8	11,1	15,2	17994,0	1011,1	0,3 ENE	0,4	0,0	3,0	84
30/09/2014	15,6	20,3	11,2	15,3	10990,0	1013,5	1,3 S	0,0	0,0	2,2	73
Media	14,1	19,0	9,0	14,1	13029,7	1012,8	3,6 N				74
Total					390891,0			94,2	10,7	71,1	
Normal de Mes	13,5							67,9			

UBICACION: LAT 34 59 S - LONG 57 59 W de G - A.S.N.M. 45 m

Fecha	Temperatura del aire			Temp. Suelo h=(-0,05 m) °C	Radiación Solar Wat/m2	Presión Barométrica Hpa.	Viento (h=3.6 m)		Precipitaciones		E.T.P. mm	Humedad %
	Media °C	Máx. °C	Min. °C				Velocidad Km/H.	Dom.	Cantidad mm.	Máx. Intensi mm/h		
01/10/2014	11,9	17,2	6,5	14,5	3559,0	1023,0	2,4	S	0,0	0,0	2,4	76
02/10/2014	10,4	15,7	2,4	13,3	4438,0	1028,8	3,4	ESE	0,0	0,0	2,9	73
03/10/2014	14,6	15,6	13,5	13,7	1132,0	1025,2	10,9	ENE	1,0	0,3	1,8	67
04/10/2014	15,9	17,9	14,2	14,3	1864,0	1016,1	13,0	ENE	6,4	1,0	2,3	73
05/10/2014	16,0	16,9	14,9	15,0	301,0	1011,6	6,3	ENE	46,8	6,3	0,7	79
06/10/2014	16,7	19,5	13,9	15,8	3486,0	1009,8	3,6	NO	0,0	0,0	2,6	85
07/10/2014	17,7	25,2	11,6	16,1	5279,0	1010,7	1,1	O	0,0	0,0	3,9	78
08/10/2014	19,9	25,4	13,7	17,2	4414,0	1006,0	2,8	N	0,0	0,0	3,7	75
09/10/2014	18,5	23,5	12,6	18,2	1527,0	999,8	4,5	SO	32,0	18,3	1,3	94
10/10/2014	11,7	16,3	8,1	15,3	4634,0	1015,8	5,2	SO	0,0	0,0	3,2	66
11/10/2014	12,7	18,9	5,6	14,9	5025,0	1018,8	0,4	ESE	0,0	0,0	3,0	66
12/10/2014	15,4	21,8	9,0	16,0	5156,0	1014,4	0,8	N	0,0	0,0	3,3	74
13/10/2014	16,8	23,4	11,2	16,3	3655,0	1012,6	0,5	NNO	0,0	0,0	2,6	71
14/10/2014	18,8	25,3	12,5	17,1	4972,0	1012,7	1,2	N	0,0	0,0	3,8	65
15/10/2014	19,7	24,8	11,6	17,9	4830,0	1007,6	2,4	NE	0,0	0,0	3,9	65
16/10/2014	21,2	26,0	14,0	19,8	5156,0	1003,9	1,6	SSO	0,0	0,0	4,1	66
17/10/2014	17,6	22,9	11,4	18,4	4381,0	1007,2	2,4	ESE	0,0	0,0	3,2	66
18/10/2014	19,4	22,4	16,0	18,8	1484,0	1003,5	2,3	S	5,6	2,3	1,3	83
19/10/2014	18,1	24,4	12,5	18,6	5732,0	1010,8	1,3	SO	0,0	0,0	4,2	64
20/10/2014	15,2	21,6	7,7	17,8	5770,0	1017,1	0,3	NE	0,0	0,0	3,7	67
21/10/2014	20,8	26,3	14,5	18,4	5745,0	1013,6	6,3	N	0,0	0,0	5,4	54
22/10/2014	23,3	29,7	17,1	19,8	5882,0	1011,0	6,7	N	0,0	0,0	5,7	54
23/10/2014	22,4	28,8	16,2	20,7	5843,0	1010,3	0,3	ESE	0,4	0,5	4,4	69
24/10/2014	22,2	29,4	17,3	21,9	4659,0	1009,6	0,2	ESE	0,0	0,0	3,6	76
25/10/2014	21,9	28,9	15,3	21,7	5530,0	1007,8	1,9	ENE	0,0	0,0	4,6	72
26/10/2014	25,0	30,5	20,7	22,4	5024,0	1004,4	7,0	N	0,0	0,0	4,9	65
27/10/2014	25,2	32,3	17,4	22,9	4990,0	1001,6	9,6	NNE	0,0	0,0	5,7	58
28/10/2014	18,8	24,4	13,7	21,0	4445,0	1005,1	6,8	ESE	15,8	9,7	3,9	78
29/10/2014	18,0	19,3	14,6	18,7	301,0	999,9	8,6	ENE	61,2	22,9	0,4	83
30/10/2014	17,6	24,4	11,8	18,7	5703,0	1005,3	0,5	S	0,0	0,0	3,9	73
31/10/2014	16,7	22,4	13,2	18,6	3058,0	1010,9	2,5	S	2,6	1,3	2,2	78
<b>Media</b>	18,1	23,3	12,7	17,9	4128,2	1010,8	3,8	N				71
<b>Total</b>					127975,0				171,8	22,9	102,7	
<b>Normal de Mes</b>	16,5								96,1			

UBICACION: LAT 34 59 S - LONG 57 59 W de G - A.S.N.M. 45 m

Fecha	Temp.Suelo			Radiación Solar Wat./m2	Presión Barométric Hpa.	Viento (h=3.6 m)		Precipitaciones		E.T.P. mm	Humedad %	
	Media °C	Máx. °C	Min. °C			h=(-0,05 m) °C	Velocidad Km/H.	Dom.	Cantidad mm.			Máx.Intens idad mm/h
01/08/2015	10,8	15,8	4,1	12,7	2373,0	1013,1	4,3	ESE	0,8	2,3	1,7	81
02/08/2015	14,9	19,3	10,3	13,7	2014,0	1004,9	2,3	SO	0,0	0,0	1,3	84
03/08/2015	12,2	20,0	7,0	12,8	3107,0	1014,6	2,0	OSO	0,0	0,0	2,2	66
04/08/2015	10,8	16,2	5,9	12,0	2766,0	1018,7	5,6	SSE	0,0	0,0	2,0	72
05/08/2015	14,6	17,5	10,9	12,5	1435,0	1009,9	10,5	ESE	5,4	3,0	1,3	78
06/08/2015	17,2	21,1	15,6	15,5	1383,0	995,5	8,9	ENE	64,6	14,0	1,1	92
07/08/2015	15,7	17,4	12,1	15,7	627,0	1000,2	6,5	OSO	9,8	4,8	0,5	99
08/08/2015	14,3	17,2	11,8	14,6	420,0	1005,2	7,7	SSO	1,6	0,3	0,4	100
09/08/2015	17,7	21,6	14,6	15,6	394,0	999,6	4,5	N	21,0	15,2	0,4	97
10/08/2015	11,6	15,1	7,4	13,7	973,0	1010,0	6,6	OSO	29,0	9,7	0,6	97
11/08/2015	10,1	14,3	5,7	12,2	1577,0	1021,2	2,1	SSO	3,0	0,0	0,9	95
12/08/2015	10,4	12,4	8,2	12,0	666,0	1020,2	8,7	SSO	4,2	0,3	0,5	92
13/08/2015	12,3	14,1	10,9	12,4	742,0	1015,0	9,1	SSO	8,6	0,5	0,6	99
14/08/2015	10,5	11,7	9,6	12,5	779,0	1014,7	4,0	SO	5,4	30,5	0,6	100
15/08/2015	10,9	16,3	6,6	12,4	3481,0	1015,5	3,4	O	1,0	0,0	2,0	85
16/08/2015	10,9	18,1	4,4	12,1	3293,0	1021,5	1,9	ESE	0,0	0,0	2,0	80
17/08/2015	13,6	17,7	8,5	12,7	1173,0	1012,4	1,6	SE	0,0	0,0	0,8	88
18/08/2015	13,7	19,8	8,1	13,5	3149,0	1011,3	3,2	OSO	0,0	0,0	2,3	77
19/08/2015	9,8	15,0	6,1	12,6	1655,0	1020,9	6,6	SO	0,0	0,0	1,3	81
20/08/2015	9,7	15,4	3,2	11,8	2172,0	1023,3	4,5	SE	0,0	0,0	1,6	83
21/08/2015	14,0	19,1	8,1	12,8	3003,0	1013,1	5,6	ESE	0,0	0,0	2,2	78
22/08/2015	15,5	18,8	11,6	13,8	1853,0	1003,4	7,2	NO	0,4	0,0	1,4	73
23/08/2015	9,4	12,2	3,5	12,3	2818,0	1016,9	7,3	OSO	0,0	0,0	1,9	65
24/08/2015	7,6	13,7	1,6	11,3	3658,0	1020,8	2,9	ESE	0,4	0,0	2,1	74
25/08/2015	13,0	17,1	6,7	12,0	2970,0	1011,7	8,4	ENE	0,0	0,0	2,3	75
26/08/2015	15,7	20,9	11,8	13,7	2478,0	1006,0	3,8	NE	1,6	0,0	2,0	80
27/08/2015	13,2	18,7	7,9	13,5	3686,0	1011,7	4,9	OSO	0,0	0,0	3,0	58
28/08/2015	12,5	18,7	7,6	12,4	900,0	1012,2	8,4	N	0,0	0,0	0,8	72
29/08/2015	17,7	23,3	12,1	14,7	3308,0	1004,3	8,3	N	0,0	0,0	3,3	66
30/08/2015	16,9	24,9	9,2	14,9	3604,0	1008,8	8,7	E	0,0	0,0	3,8	64
31/08/2015	15,6	21,8	6,9	15,4	3768,0	1012,9	13,8	SSE	0,0	0,0	3,8	67
Media	13,0	17,6	8,3	13,2	2136,3	1011,9	5,9	SO				81
Total					66225,0				156,8	30,5	50,7	
Normal del Mes (1964-2014)	11,5								61,5			

UBICACION: LAT 34 59 S - LONG 57 59 W de G - A.S.N.M. 45 m

Fecha	Temperatura del aire			Temp. Suelo h=(-0,05 m) °C	Radiación Solar Wat./m2	Presión Barométrica Hpa.	Viento (h=3.6 m) Velocidad Km/H. Dom.	Precipitaciones		E.T.P. mm	Humedad %	
	Media °C	Máx. °C	Min. °C					Cantidad mm.	Máx.Intensidad mm/h			
01/09/2015	7.9	13.8	2.4	13.1	1877.0	1029.4	10.7	SSE	0.0	0.0	3.0	62
02/09/2015	10.8	14.4	6.9	12.5	972.0	1022.6	5.6	ESE	0.0	0.0	1.8	66
03/09/2015	10.2	16.1	4.7	12.9	1788.0	1020.7	4.7	SSE	0.0	0.0	2.5	69
04/09/2015	11.2	19.8	3.8	12.3	2011.0	1020.8	5.8	SSE	0.0	0.0	3.2	64
05/09/2015	11.7	20.5	2.9	12.7	2015.0	1020.3	3.9	N	0.0	0.0	3.0	66
06/09/2015	13.4	19.4	7.6	12.9	2103.0	1014.0	9.3	NE	0.0	0.0	3.7	66
07/09/2015	12.9	15.4	9.3	12.9	759.0	1007.4	8.0	NE	0.0	0.0	1.2	83
08/09/2015	14.5	21.9	8.6	13.9	2153.0	1004.8	5.5	SO	0.0	0.0	3.4	68
09/09/2015	9.2	11.9	6.9	12.2	180.0	1011.0	5.6	S	15.4	0.5	0.6	74
10/09/2015	8.6	14.5	4.0	11.2	2018.0	1012.5	7.6	OSO	16.2	61.0	3.2	58
11/09/2015	6.1	10.5	1.2	10.0	2282.0	1017.8	9.7	OSO	0.0	0.0	3.2	45
12/09/2015	9.5	16.4	2.2	10.0	2263.0	1018.4	7.5	SO	0.0	0.0	3.6	44
13/09/2015	13.3	20.7	7.4	11.5	2268.0	1015.2	9.3	NNO	0.0	0.0	4.2	51
14/09/2015	16.2	22.4	8.0	12.2	2008.0	1009.8	13.1	N	0.0	0.0	4.6	54
15/09/2015	18.6	24.3	12.3	14.3	2137.0	1001.6	14.2	NNO	0.0	0.0	5.4	39
16/09/2015	10.8	16.4	4.4	13.4	2255.0	1010.8	9.3	SSE	0.0	0.0	3.8	51
17/09/2015	10.6	18.2	4.3	12.5	2322.0	1013.8	5.3	ENE	0.0	0.0	3.6	55
18/09/2015	10.7	18.6	3.5	12.5	2279.0	1018.0	6.6	E	0.0	0.0	3.5	65
19/09/2015	12.8	19.9	5.9	13.0	2133.0	1017.6	6.1	E	0.0	0.0	3.5	60
20/09/2015	12.9	20.3	6.6	13.1	1713.0	1016.0	9.9	ESE	0.0	0.0	3.4	67
21/09/2015	13.8	15.2	12.6	13.5	433.0	1012.6	18.2	E	2.0	0.3	1.6	81
22/09/2015	12.0	13.2	10.5	12.9	421.0	1013.9	15.9	ESE	2.6	0.0	0.9	93
23/09/2015	13.2	14.0	12.6	13.1	232.0	1008.0	14.6	SE	9.0	1.0	0.5	90
24/09/2015	13.8	16.2	12.2	13.6	878.0	1008.7	15.8	SE	0.0	0.0	1.7	86
25/09/2015	12.7	17.0	9.6	13.6	1434.0	1015.2	8.5	SSE	0.0	0.0	2.3	81
26/09/2015	12.2	17.3	7.4	13.4	1389.0	1016.2	3.2	NE	0.0	0.0	2.0	79
27/09/2015	14.0	22.1	5.5	13.3	2406.0	1012.6	5.3	NE	0.0	0.0	3.8	63
28/09/2015	15.0	17.8	11.6	14.0	934.0	1005.8	11.9	NNO	2.8	1.5	2.3	70
29/09/2015	11.8	17.6	5.4	13.1	2486.0	1010.1	8.0	SO	0.0	0.0	4.1	62
30/09/2015	10.3	16.7	2.6	12.5	2544.0	1015.3	4.9	NE	0.0	0.0	3.6	62
Media	12.0	17.4	6.8	12.7	1689.8	1014.0	8.8	E				68
Total					50693.0				48.0	61.0	66.8	
Normal de Mes	13.5								69.8			



UBICACION: LAT 34 59 S - LONG 57 59 W de G - A.S.N.M. 45 m

Fecha	Temperatura del aire			Temp. Suelo h=(-0,05 m) °C	Radiación Solar Wat./m2	Presión Barométrica Hpa.	Viento (h=3.6 m)		Precipitaciones		E.T.P. mm	Humedad %
	Media °C	Máx. °C	Min. °C				Velocidad Km/H.	Dom.	Cantidad mm.	Máx. Intensi mm/h		
01/10/2015	14.1	18.7	8.6	13.3	1699.0	1011.0	12.2	NE	9.6	2.5	3.1	69
02/10/2015	10.8	13.5	4.7	13.0	795.0	1012.7	15.2	SSO	16.0	2.0	1.5	86
03/10/2015	7.7	14.1	0.9	11.1	2230.0	1020.8	8.2	SSO	0.0	0.0	3.1	69
04/10/2015	10.4	15.9	4.7	11.9	2070.0	1020.2	9.3	E	0.0	0.0	3.1	75
05/10/2015	13.8	17.0	11.1	12.8	1260.0	1014.8	11.7	NE	0.0	0.0	2.6	68
06/10/2015	14.5	17.4	13.1	13.9	777.0	1009.5	9.2	SSE	5.9	4.6	1.3	89
07/10/2015	14.4	19.4	10.4	14.4	2235.0	1010.1	12.4	SE	0.0	0.0	3.7	77
08/10/2015	14.0	20.9	8.0	14.6	2661.0	1013.9	10.6	SE	0.5	0.0	4.8	63
09/10/2015	10.4	15.3	6.9	13.5	1524.0	1023.4	11.3	SE	0.0	0.0	2.6	71
10/10/2015	10.7	15.1	6.8	13.0	1960.0	1027.8	11.6	SE	0.0	0.0	3.2	72
11/10/2015	11.7	17.0	7.4	13.2	1688.0	1024.6	9.5	SSE	0.0	0.0	2.8	76
12/10/2015	11.5	17.7	7.5	13.4	2048.0	1017.3	5.9	NE	0.0	0.0	2.7	77
13/10/2015	13.8	20.3	5.9	13.5	2406.0	1012.7	8.1	NE	0.0	0.0	4.1	69
14/10/2015	16.3	20.2	12.8	14.7	1862.0	1002.6	13.4	NE	8.6	5.8	3.5	74
15/10/2015	13.8	17.4	9.2	14.6	1579.0	1003.0	12.3	OSO	0.0	0.0	2.8	78
16/10/2015	10.1	15.6	5.5	13.2	2618.0	1018.8	8.6	SSO	0.0	0.0	3.9	65
17/10/2015	10.3	16.8	2.3	12.7	2984.0	1026.5	7.8	S	0.0	0.0	4.6	57
18/10/2015	12.6	18.4	5.9	13.0	2961.0	1021.0	9.0	NNE	0.0	0.0	4.6	58
19/10/2015	15.7	19.9	13.0	14.3	1387.0	1008.0	8.3	N	11.6	1.5	2.7	68
20/10/2015	15.3	19.9	12.0	15.2	1892.0	1003.3	7.0	OSO	3.0	0.8	2.9	84
21/10/2015	16.9	23.2	9.9	15.7	2737.0	1007.2	4.9	ENE	0.0	0.0	4.0	74
22/10/2015	17.2	25.1	11.2	16.7	2441.0	1011.2	7.8	SSE	0.0	0.0	4.1	72
23/10/2015	10.8	15.4	5.2	15.1	2947.0	1021.6	8.9	S	0.0	0.0	4.3	58
24/10/2015	10.4	14.9	4.2	13.6	1650.0	1023.1	11.2	E	0.0	0.0	2.8	68
25/10/2015	15.0	18.5	12.4	14.4	1649.0	1016.9	12.5	E	0.6	0.0	3.1	73
26/10/2015	17.8	22.9	14.2	16.4	2224.0	1013.2	6.9	E	0.0	0.0	3.4	83
27/10/2015	18.2	24.5	13.6	17.7	2778.0	1014.8	7.7	E	0.0	0.0	4.3	83
28/10/2015	19.4	24.4	15.2	18.6	2966.0	1012.5	11.2	NE	0.0	0.0	4.7	82
29/10/2015	18.5	21.2	16.6	18.6	542.0	1010.5	8.2	NE	12.0	2.8	0.9	93
30/10/2015	15.3	20.0	8.2	17.7	2045.0	1012.7	10.4	SE	0.0	0.0	3.4	61
31/10/2015	12.4	19.5	6.7	15.9	2707.0	1018.9	8.6	ESE	0.0	0.0	4.7	48
Media	13.7	18.7	8.8	14.5	2042.6	1015.0	9.7	E				72
Total					63322.0				67.8	5.8	103.3	
Normal de Mes	16.5								96.4			