



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

**SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS
CON CAPACIDAD ANTIFÚNGICA Y FERTILIZANTE
AISLADOS DE LA RIZÓSFERA DE PLANTAS DE YERBA
MATE DE LA PROVINCIA DE MISIONES PARA SU
APLICACIÓN COMO PROMOTORES DEL CRECIMIENTO
VEGETAL**

Tesista: Ana Clara López

Director/a: Dra. Laura Lidia Villalba

Codirector/a: Dra. María Flavia Luna

Año: 2021

El presente trabajo de tesis, para optar al grado Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Molecular del Instituto de Biotecnología Misiones "Dra. María Ebe Reca" (Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones), y en el Laboratorio de Microorganismos de Aplicación en Agricultura del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CONICET, Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata) bajo la dirección de la Dra. Laura Lidia Villalba y la co-dirección de la Dra. María Flavia Luna¹.

¹La Dra. Luna es Investigadora Adjunta de la CIC-PBA.

Este trabajo de tesis se lo dedico a mis hijos

Vittoria y Valentino

AGRADECIMIENTOS

A Pedro y Laura, por abrirme las puertas del InBioMis sin conocerme, por confiar en mí, permitirme ser parte del grupo y poder obtener la beca para doctorarme.

A Flavia por estar siempre a mi lado a pesar de la distancia, guiarme y acompañarme en todo este proceso. Estuviste en cada momento para levantarme y darme fuerza para seguir, gracias por todo lo aprendido y más por todo lo vivido este último tiempo, que si bien fue intenso, me quedo con todo el aprendizaje y el acompañamiento.

A Adri por estar para guiarme, por aceptarme desde el primer momento y acompañarme siempre. Gracias por formar esta hermosa amistad y grupo de trabajo.

A Andrés por entender mi ausencia, principalmente el último tiempo, y por entender que esto es lo que me gusta y apoyarme en cada decisión.

A Vitto y Valen, si bien no se puede recuperar el tiempo perdido, espero poder compensar el tiempo que no estuve a su lado.

A mi mamá, en un contexto complicado, supo entender todo. Siempre presente, sos la mejor mamá y abuela del mundo. Te amamos.

A mi familia, Rami, Joa, Fran, papá, mamá, Pau, Nati y Fausti, que siempre estuvieron apoyándome y acompañándome en todo, y más el último tiempo que me ayudaron en todo lo que necesitaba.

A la familia de Andrés por acompañarnos siempre, en especial a Miguel y Alicia por venir a ayudarnos los últimos días.

A mis amigas de la vida, Bel, Ney, Coty y Vero, por estar siempre, sin importar el tiempo ni la distancia.

A mi amiga (y hermana mayor) Sil, por estar siempre, por ser incondicional desde el primer momento, sos todo lo que está bien. Sin vos, no hubiese sido lo mismo, gracias por siempre.

A Carlita por acompañarme y apoyarme a la distancia.

A mis amigos de Itu, Koky, Ivana, Juan y Guille (y familia), por estar siempre que los necesitamos, más en este último tiempo y entender todo, ¡son familia!

A mis amigas de la facu, Katy, Mica, Consu, Eli y Lu, por estar siempre a pesar de la distancia.

A mis compañeros del L4 del CINDEFI por ayudarme siempre. En especial a Pame y Sole, que siempre que necesité algo estuvieron para ayudarme. Los extraño...

A mis compañeros del InBioMis por los momentos compartidos. A Martín por ayudarme con la medición de enzimas y estar predispuesto a trabajar conmigo. A Romi y Gabi, por todos momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, por integrarme rápido al grupo y por la buena onda de siempre. A Lucre, Kari y Marilyn por los momentos compartidos y su compañerismo. A mis pasantes/becarios, Manu, José, Vicky, Adri N., Seba y Cele, por dejarme acompañarlos, crecer con ustedes y ayudarme siempre que lo necesité.

A la Dra. Mónaco, a la Dra. Astoreca y el Dr. Sansberro, por aceptar ser jurado de mi trabajo de tesis y esperarme.

A la Fundación Alberto Roth por permitirme utilizar sus instalaciones y proveer el material necesario para realizar los ensayos.

A la Universidad Nacional de La Plata, en particular a la Facultad de Ciencias Exactas, por mi formación de posgrado.

A la Universidad Nacional de Misiones, en particular a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales por abrimme las puertas y permitirme utilizar sus instalaciones para la realización de mi doctorado.

Al CONICET por haberme otorgado una beca para realizar mi doctorado y darme la posibilidad de hacer lo que amo. ¡Investigar es trabajar!

Al Dr. José Luis López del IBBM (UNLP), por compartir sus conocimientos y ayudarme en la realización de las determinaciones cualitativas y la obtención de quitina coloidal.

Al Dr. Tales Polleto, Laboratorio de Fitopatología de la Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, por facilitarme las cepas de *Fusarium* utilizadas en los ensayos de antagonismo de cultivo dual.

ÍNDICE

CAPITULO 1: Introducción y objetivos.....	2
1.1 Yerba mate.....	2
1.1.1 Origen e importancia del cultivo de yerba mate	2
1.1.2 Distribución del cultivo	3
1.1.3 Morfología del cultivo.....	4
1.1.4 Complejidad del cultivo de yerba mate	4
1.1.5 De las semillas a la plantación	5
1.1.6 Plagas y enfermedades	7
1.1.7 Situación actual de la producción de yerba mate.....	9
1.2 Agricultura sustentable.....	9
1.2.1 Bioinsumos. Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal.	10
1.2.2 Comunidades microbianas rizosféricas y su contribución al desarrollo y la salud de las plantas. Reservorio de PGPM.	13
1.2.3 Microbiota nativa de yerba Mate	14
1.3 Reino Fungi. Contribución a la sustentabilidad agrícola.	15
1.3.1 Criterios taxonómicos para el estudio de organismos fúngicos	17
1.4 El género <i>Trichoderma</i>	19
1.4.1 Ubicación taxonómica	19
1.4.2 Distribución en la naturaleza e importancia del género <i>Trichoderma</i> en el contexto agrícola	21
1.4.3.1 Efectos de su aplicación como PGPM y factores que limitan su acción	23
1.4.3.2 Bioinsumos comercializados a base de <i>Trichoderma</i> spp. para cultivos en general.....	25
1.4.3.3 Bioinsumos a base de <i>Trichoderma</i> spp. para yerba mate	27
Hipótesis	28
Objetivo general y específicos	28
CAPITULO 2: Selección e identificación de especies del género <i>Trichoderma</i> aisladas de la rizósfera de yerba mate.....	30
2.1 RESUMEN.....	30
2.2 INTRODUCCIÓN	31

2.1.1	Carácter endofítico de los microorganismos	31
2.1.2	<i>Trichoderma</i> como colonizador endofítico y promotor del crecimiento vegetal	31
2.1.3	Identificación de aislamientos fúngicos como especies del género <i>Trichoderma</i>	33
2.1.3.1	A través de la descripción de aspectos morfofisiológicos	33
2.1.3.2	A través de marcadores moleculares	36
2.1.4	Biodiversidad de <i>Trichoderma</i>	38
2.3	MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.3.1	Recolección del material vegetal	41
2.3.2	Aislamiento de hongos asociados a la raíz de yerba mate y selección con enfoque en el género <i>Trichoderma</i>	41
2.3.3	Mantenimiento de los cultivos	43
2.3.4	Caracterización morfológica de los aislamientos fúngicos	43
2.3.4.1	Observación y caracterización macroscópica	44
2.3.4.2	Observación y caracterización microscópica	44
2.3.5	Caracterización e identificación molecular de los aislamientos fúngicos	45
2.3.5.1	Desarrollo de los aislamientos en medio líquido	45
2.3.5.2	Extracción, cuantificación y purificación del ADN.....	46
2.3.5.3	Reacción en cadena de la polimerasa.....	46
2.3.5.4	Secuenciación de los productos de PCR	47
2.3.5.5	Análisis de las secuencias y búsqueda de secuencias homólogas	47
2.3.5.6	Análisis filogenético	48
2.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
2.4.1	Selección y aislamiento de hongos asociados a la raíz de yerba mate	49
2.4.2	Asignación del género de los aislamientos fúngicos mediante características morfológicas	50
2.4.3	Asignación de especie de los aislamientos fúngicos.....	52
2.4.3.1	A través de caracterización morfológica.....	52
2.4.3.2	A través de caracterización molecular	56
2.4.3.2.a	Análisis de los geles de agarosa	56
2.4.3.2.b	Análisis de las secuencias y búsqueda de secuencias homólogas.....	58
2.4.3.2.c	Construcción de árboles filogenéticos	61

Aislamiento, identificación y selección de fitopatógenos fúngicos foliares de yerba mate	67
CAPÍTULO 3: Aislamiento, identificación y selección de fitopatógenos fúngicos foliares de yerba mate.....	68
3.1. RESUMEN	68
3.2. INTRODUCCIÓN	69
3.2.1 Hongos fitopatógenos	69
3.2.1.1 Aislamiento de patógenos fúngicos y pruebas de patogenicidad.....	71
3.2.2 Hongos causantes de enfermedades.....	71
3.2.3 Hongos fitopatógenos en el cultivo de yerba mate	75
3.2.4 Control de enfermedades.....	75
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS	77
3.3.1 Recolección del material vegetal	77
3.3.2 Aislamiento de microorganismos fúngicos	77
3.3.3 Mantenimiento y crecimiento de los aislamientos.....	78
3.3.4 Ensayos de patogenicidad <i>in vitro</i>	78
3.3.5 Caracterización morfológica y molecular de los aislamientos fúngicos.....	79
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	80
3.4.1 Aislamiento de microorganismos fúngicos	80
3.4.2 Ensayos de patogenicidad <i>in vitro</i>	81
3.4.3 Asignación de género a los aislamientos fúngicos.....	83
3.4.3.1 A través de caracterización morfológica.....	83
3.4.3.2 A través de caracterización molecular	89
3.4.3.2.a Análisis de los geles de agarosa	89
3.4.3.2.b Análisis de las secuencias y búsqueda de secuencias homólogas.....	89
3.4.3.2.c Análisis filogenético.....	90
Caracterización y selección de especies del género <i>Trichoderma</i> con capacidad de promoción del crecimiento vegetal <i>in vitro</i>	94
CAPÍTULO 4: Caracterización y selección de especies del género <i>Trichoderma</i> con capacidad de promoción del crecimiento vegetal <i>in vitro</i>.....	95
4.1 RESUMEN.....	95
4.2 INTRODUCCIÓN	96

4.2.1 Promoción del crecimiento vegetal: mecanismos y efectos.....	96
4.1.1.1 Mecanismos directos.....	96
4.1.1.2 Mecanismos indirectos.....	97
4.2.2 ¿Cómo puede <i>Trichoderma</i> mejorar el desarrollo y la salud de las plantas que coloniza?.....	100
4.3 MATERIALES Y METODOS	104
4.3.1 Material biológico.....	104
4.3.3 Mantenimiento y crecimiento de los microorganismos.....	105
4.3.3 Ensayo dual en placa para determinar antagonismo.....	105
4.3.4 Determinación cualitativa de actividades enzimáticas.....	106
4.3.4.1 Celulasas.....	106
4.3.4.2 Proteasas.....	107
4.3.4.3 Quitinasas.....	107
4.3.4.4 Lipasas.....	108
4.3.4.5 Amilasas.....	109
4.3.4.6 Pectinasa.....	109
4.3.5 Determinación cuantitativa de actividades enzimáticas.....	110
4.3.5.1 Preparación del inóculo.....	110
4.3.5.2 Protocolo de inoculación del medio, condiciones de incubación y toma de muestra.....	111
4.3.5.3 Actividad β -1,3-glucanasa.....	111
4.3.5.4 Actividad quitinasa.....	113
4.3.5.5 Actividad celulasa y endoglucanasa.....	113
4.3.6 Producción de sideróforos.....	114
4.3.7 Solubilización de compuestos insolubles de fósforo.....	116
4.3.8 Determinación cuantitativa de auxinas y/o análogos.....	116
4.3.9 Índices de Promoción del Crecimiento Vegetal.....	117
4.3.9.1 Índice del Potencial de Biocontrol.....	117
4.3.9.2 Índice de Acción Biofertilizante.....	118
4.3.9.3 Índice de Promoción de Crecimiento Vegetal.....	119
4.3.10 Análisis estadístico.....	119
4.3.10.1 Análisis de la varianza de una vía (ANOVA).....	119

4.3.10.2 Análisis multivariado.....	119
4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	121
4.4.1 Capacidad antagónica de los aislamientos de <i>Trichoderma</i>	121
4.4.2 Determinación cualitativa de actividades enzimáticas	125
4.4.3 Determinación cuantitativa de actividades enzimáticas	126
4.4.3.1 Actividad β -1,3- glucanasa y quitinasa.....	126
4.4.3.2 Actividad celulasa y endoglucanasa.....	127
4.4.6 Producción de sideróforos.....	128
4.4.7 Solubilización de compuestos insolubles de fósforo	129
4.4.8 Determinación cuantitativa de auxinas y/o análogos.....	130
4.4.9 Agrupamiento de aislamientos de <i>Trichoderma</i> mediante análisis multivariado	131
4.4.10 Selección de aislamiento de <i>Trichoderma</i> con características como PGPM <i>in vitro</i>	133
CAPÍTULO 5: Formulación de un bioinsumo a base de <i>Trichoderma</i> y evaluación de la promoción del crecimiento vegetal <i>in vivo</i>.....	137
5.1 RESUMEN.....	137
5.2 INTRODUCCIÓN	138
5.2.1 Multiplicación de la biomasa microbiana	140
5.2.2 Características de la producción de un bioinsumo microbiano a base de especies del género <i>Trichoderma</i>	141
5.3 MATERIALES Y MÉTODOS	144
5.3.1 Material biológico.....	144
5.3.2 Obtención de suspensión de conidios de <i>Trichoderma</i>	144
5.3.2.1 A partir <i>Trichoderma</i> crecido en PDA	144
5.3.2.2 A partir de <i>Trichoderma</i> crecido en arroz.....	144
5.3.2.3 Evaluación de la calidad de la suspensión de conidios y del formulado....	145
5.3.3 Ensayo de promoción del crecimiento en plantas de yerba mate en vivero.....	146
5.3.3.1 Ensayo preliminar inoculando con una suspensión de conidios a partir de PDA	146
5.3.3.2 Ensayo inoculando con el formulado.....	148
5.3.3.3 Medidas de parámetros de crecimiento y sanidad	149

5.3.3.4 Índice de promoción del crecimiento <i>in vivo</i>	150
5.3.3.5 Análisis estadístico.....	151
5.3.3.5.a ANOVA	151
5.3.3.5.b Modelos Lineales Generales y Mixtos.....	151
5.3.3.5.c Análisis Multivariado	151
5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	152
5.4.1 Características de la suspensión de conidios de <i>Trichoderma</i> crecido en PDA ..	152
5.4.2 Características de la suspensión de conidios de <i>Trichoderma</i> crecido en arroz.	152
5.4.3 Evaluación de promoción del crecimiento <i>in vivo</i> de los aislamientos de <i>Trichoderma</i>	154
5.4.3.1 Ensayo preliminar inoculando con una suspensión de conidios de <i>Trichoderma</i> crecidos en PDA.....	154
5.4.2.2 Ensayo inoculando con una suspensión de conidios preparada a partir del formulado	159
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	164
ANEXO	168
ANEXO 2	169
ANEXO 3	173
ANEXO 4	174
ANEXO 5	180
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	183

Parte de los ensayos presentados en este trabajo de tesis formaron parte de las siguientes publicaciones:

- López AC, Alvarenga AE, Zapata PD, Luna MF, Villalba LL (2020). Aislamiento e identificación de hongos asociados a *Ilex paraguariensis* St. Hil., Revista de Ciencia y Tecnología (RECyT) de la UNaM.
- López AC, Alvarenga AE, Vereschuk ML, Barua CR, Zapata PD, Luna MF, Villalba LL (2020). *Trichoderma* strains isolated from *Ilex paraguariensis* St. Hil.: promising biocontrol agents with chitinolytic activity and plant growth promoter on *Lycopersicon esculentum*, Arab Journal of Basic and Applied Science. DOI: 10.1080/25765299.2020.1732033
- López AC, Alvarenga AE, Zapata PD, Luna MF, Villalba LL (2019). *Trichoderma* spp. from Misiones, Argentina: effective fungi to promote plant growth of the regional crop *Ilex paraguariensis* St. Hil., Mycology. DOI: 10.1080/21501203.2019.1606860

CAPITULO 1

Introducción y objetivos

CAPITULO 1: Introducción y objetivos

1.1 Yerba mate

1.1.1 Origen e importancia del cultivo de yerba mate

La yerba mate, *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire, fue un árbol muy apreciado en las comunidades guaraníes indígenas debido a sus efectos medicinales y estimulantes. Antes de la llegada de los europeos a América, la yerba mate era consumida por los guaraníes como una infusión de hojas secas y trituradas, utilizando una bombilla rudimentaria confeccionada de tacuara y fibras vegetales (Dellacassa *et al.*, 2007). Luego, durante la colonización española, los jesuitas descubrieron el potencial de este árbol, decidieron domesticar la especie y establecieron las primeras plantaciones (Capellari *et al.*, 2017). Actualmente, el árbol de yerba mate (Figura 1.1) es un cultivo regional muy valioso ya que sus hojas se continúan procesando para dar lugar en una bebida tradicional Argentina llamada [mate](#) (Figura 1.1), consumida como alternativa al café por millones de sudamericanos debido a sus efectos estimulantes (Bergottini *et al.*, 2015). El mate¹ representa un importante patrimonio cultural y forma parte de la identidad nacional. Además, tiene varias propiedades beneficiosas para la salud como un gran poder antioxidante, es fuente de vitaminas y minerales, tiene efecto energizante, [entre otras](#).



Figura 1.1. Fotografía de un árbol de yerba mate (izquierda) y de un mate típico (derecha) que me acompañó durante todo mi trabajo de tesis.

La yerba mate, es un árbol originario del noreste de Argentina, Paraguay y el sur de Brasil que pertenece a la familia *Aquifoliaceae*. Los antecedentes más remotos sobre la yerba mate denotan que esta planta cobró importancia en la cultura de los guaraníes asentados en las tierras circundantes a los ríos Paraná, Paraguay y Uruguay (Capellari *et al.*, 2017). En los últimos años, la yerba mate ha alcanzado rápidamente nuevos mercados donde se aprecia como té o como ingrediente en alimentos formulados o suplementos dietéticos (Heck & De Mejia, 2007). En la actualidad, Argentina es el principal productor mundial de yerba mate con el 62% de la producción total, seguido de Brasil con el

¹ El mate fue declarado "infusión nacional" por el Congreso de la Nación en 2013 y el 30 de noviembre de 2015 fue la primera vez que se celebró el Día Nacional del Mate.

34% y Paraguay con el 4%. En Argentina, la mayor producción de yerba mate se concentra en la provincia de Misiones con el 90% de las plantaciones (Pérez *et al.*, 2016).

1.1.2 Distribución del cultivo

Ilex es el género de la familia *Aquifoliaceae* que posee más representantes dentro de las plantas leñosas. Se encuentra distribuido en todo el mundo, principalmente en regiones tropicales o subtropicales y comprende entre 400/500 especies (Kvaček *et al.*, 2009). *Ilex paraguariensis* fue descrita por primera vez por Auguste de Saint Hilaire y publicado en 1822 (Giberti, 2011). *Ilex paraguariensis* St. Hil. variedad *paraguariensis* se distribuye al Sur del Brasil, Este del Paraguay, Nordeste de Argentina y algunos departamentos de Uruguay, donde se dan las características y condiciones agroecológicas aptas para su cultivo y desarrollo (Grondona, 1954; Giberti, 2011) (Figura 1.2).

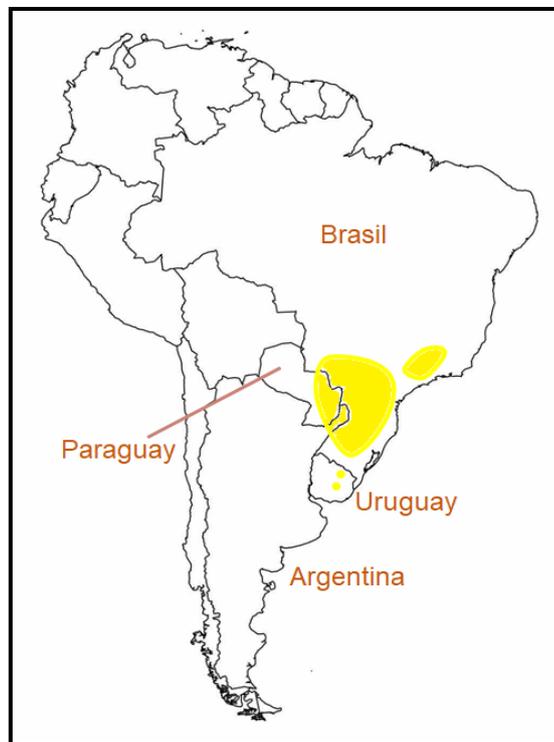


Figura 1.2. Área de distribución de *I. paraguariensis* y sus variedades en Sudamérica.

En la actualidad se cuentan con 165.000 hectáreas implantadas con yerba mate, principalmente como monocultivo, en la región subtropical húmeda Argentina, que incluye la provincia de Misiones y el Nordeste de la provincia de Corrientes. En esta área los regímenes de lluvias son de alrededor de 1800 milímetros anuales, con temperaturas promedio de 21° C y los suelos (rojos profundos) con buen drenaje y fértiles (Skromeda, 2019). Estas características agroecológicas permiten alcanzar una producción potencial de 1.000.000 de toneladas de hoja verde, equivalentes a unas 360.000 toneladas

de yerba mate canchada² (Capellari *et al.*, 2017). En Misiones, los departamentos de Oberá, Caingúas y San Ignacio, ubicados en la zona centro, concentran la mayor parte de la producción de hoja verde y de productores. En el Noroeste también se destaca General Belgrano por tener los más altos rendimientos. En Corrientes, la producción se concentra fundamentalmente en Santo Tomé e Ituzaingó (Capellari *et al.*, 2017).

1.1.3 Morfología del cultivo

Ilex paraguariensis St. Hil. es un árbol perennifolio³, dioico⁴, de hasta 30 metros de altura y bajo cultivo es conducido como un arbusto cuyo porte se mantiene entre los 3 y 6 metros de altura por razones de practicidad (Capellari *et al.*, 2017). El tallo y las hojas, que componen una rama, son los principales órganos de cosecha de la yerba mate, por ello es importante conocer en detalle los atributos que de alguna manera impactan sobre su productividad o la calidad organoléptica del producto comercial (Capellari *et al.*, 2017). Las hojas de yerba mate son persistentes y pueden perdurar en la planta no cosechada unos tres años. Las hojas son simples, alternas y coriáceas, en forma de cuña, ovales o elípticas, de bordes ligeramente aserrados, de tamaño entre 5 y 15 centímetros, y de color verde oscuro (Burtnik, 2006). La floración de la planta se produce entre los meses de octubre a noviembre, es de tipo racimosa en forma de falsa panoja, desarrollándose en las axilas de las hojas; las flores son pequeñas, dioicas, con cáliz y corola de constitución tetrámera, color blanco, con cuatro a cinco estambres y un gineceo. Los frutos de unos 7 milímetros de diámetro, color azul oscuro (maduro), contienen de cuatro a ocho semillas de color amarillo (Burtnik, 2006). La raíz es de color marrón, tipo pivotante, con raíces secundarias que se entrecruzan en el mismo sentido. La mayor parte de las raíces absorbentes se encuentran en el horizonte superficial del suelo.

1.1.4 Complejidad del cultivo de yerba mate

La forma tradicional y más común de multiplicación de la yerba mate es mediante el uso de semillas. Las semillas de yerba mate presentan diferentes grados de maduración del embrión cigótico, aun cuando los frutos se encuentran externamente maduros, este fenómeno se conoce como **embriogénesis tardía**. Esto determina un largo período de germinación de la semilla desde el momento de la siembra, lo cual está asociado, a su vez, con un bajo poder germinativo (23% en promedio) y una tolerancia intermedia a la deshidratación con una viabilidad que desciende rápidamente durante el almacenamiento. Durante la embriogénesis tardía, los embriones continúan evolucionando dentro de la semilla aun cuando se encuentran en condiciones de germinar (ya sembradas) y es por esto que en un lote el período de germinación puede variar desde 60 hasta incluso 360 días (Capellari *et al.*, 2017). Además de la embriogénesis tardía, la causa de la dormancia de las semillas de yerba mate también

² Proceso de trituración gruesa al que se someten las hojas de yerba mate una vez terminada la etapa de secado, facilitando su manipulación durante el transporte y estacionamiento, que antiguamente se hacía sobre un lugar plano recubierto de apilleras a las que denominaban “canchas”, de allí su nombre (Buduba, 2011).

³ Que conserva su follaje todo el año.

⁴ Que tiene las flores unisexuales en tallos y troncos separados.

se debe a la diferenciación de un endocarpo leñoso y la producción de compuestos fenólicos que podrían interferir en el desarrollo de los embriones (Souza Medeiros, 2001).

1.1.5 De las semillas a la plantación⁵

1. Obtención de la semilla: la recolección de los frutos se realiza a mano, cuando se encuentran con una coloración violácea a negruzca, para una adecuada separación de las semillas. Los meses de recolección de frutos maduros son febrero, marzo y abril. Para la extracción de la semilla, se rompen los frutos por acción mecánica. Las semillas limpias, sin restos de los frutos y secas se almacenan dentro de bolsas de polietileno.

2. Preparación y siembra del almácigo: los almácigos⁶, hechos con madera o bandejas plásticas, deben ser construidos en sitios altos y bien ventilados, con una cobertura de 2 metros de altura para evitar los efectos de la fuerte insolación y se colocan a 15 cm o más del suelo (Burtnik, 2006) (Figura 1.3). Como sustrato se utiliza una mezcla que contiene sustrato comercial de pino, materia orgánica y arena, en proporción 1:1:1. Debido al extenso tiempo de germinación de estas plantas, las semillas sembradas pasan mucho tiempo creciendo en el sustrato, por lo que es de relevante importancia la desinfección del almácigo para prevenir o reducir pérdidas del material (Capellari *et al.*, 2017).



Figura 1.3. A. Almácigos hechos con madera con plantines de yerba mate. Adaptada de Capellari *et al.*, (2017).
B. Almácigos de bandejas plásticas de 25 celdas con plantines de yerba mate.

Una vez preparado el almácigo, **la siembra** se efectúa entre los meses de marzo a mayo, distribuyendo las semillas en la superficie de los almácigos en cantidad de 250 a 500 gramos de semilla por metro cuadrado y tapando con una delgada capa de tierra. Es recomendable cubrir la superficie del almácigo con algún material vegetal, como palitos de yerba o cáscara de pino, para evitar la excesiva evaporación de agua y, cubrir el cantero con un micro túnel de polietileno para proteger los plantines de las bajas temperaturas del invierno (Figura 1.3.A) (Capellari *et al.*, 2017). El período en almácigo comprende desde la germinación hasta la presencia de 3 a 5 hojas y una altura de 2 a 4 cm. Durante este período se trata de evitar al máximo la aparición de enfermedades como *damping-off* (o mal de los almácigos), con pulverizaciones preventivas y rotativas con diferentes fungicidas (Capellari *et al.*, 2017).

⁵ Cultivo de yerba mate – Etapa inicial: <https://www.youtube.com/watch?v=LSuCi8KbuJI>

⁶ Cajones de madera de la medida deseada (generalmente de 1 m²) o bandejas plásticas de 25 celdas de 40 cm², al cual se le agrega sustrato y se siembra la semilla para su germinación.

3. Trasplante a vivero y rustificación de los plantines de yerba mate: el trasplante de la plántula, del almácigo a vivero, tal como se mencionó anteriormente se produce cuando se observan la presencia de 3 a 5 hojas y una altura de 2 a 4 cm. La extracción de las plántulas, debe realizarse luego de una lluvia o de un intenso riego, a fin de facilitar la remoción sin causar daños en el sistema radical. El repique puede ser realizado en suelo directo, en macetas o en tubetes⁷ (Figura 1.4). Como sustrato suele utilizarse abono orgánico en una mezcla con virutas de madera de pino compostadas y cáscara de arroz (Bergottini *et al.*, 2015), compost orgánico, tierra colorada con arena, suelo fértil de la selva tropical, etc. (Burtnik, 2006).



Figura 1.4.A. Plantín de yerba mate en tubete sobre malla metálica. B. Plantines en tubetes en el vivero.

El trasplante se realiza en los viveros durante todo el año, con picos entre los meses de octubre a diciembre. La sobrevivencia del material repicado alcanza en promedio entre 65 a 85%. Es importante mantener la calidad de los plantines, ofreciéndoles un hábitat sin factores estresantes que pudieran afectar su normal desarrollo y crecimiento. Para esto, los plantines se desarrollan en condiciones controladas de luz, humedad y temperatura. Luego, los plantines en el vivero son adaptados gradualmente a las condiciones naturales en la etapa conocida como rustificación. En esta etapa, las plantas están al aire libre y se coloca media sombra por las noches en invierno, por el riesgo de heladas, o bien en las horas de mayor insolación durante el verano. El proceso de rustificación responde a la domesticación que ha sufrido la especie para poder ser cultivada bajo condiciones de campo, muy diferentes a las de su área de evolución y distribución natural que se asociaba a la protección en términos de sombra y humedad bajo el soto bosque (Capellari *et al.*, 2017).

4. Traspaso a campo y plantación: el período de implantación se realiza de abril a septiembre. Para esto, los plantines de aproximadamente un año y medio de vida se extraen del recipiente en el que se encuentran y se ubican en suelo directo. Por lo general, se debe colocar una protección al plantín conocida como poncho⁸ a efectos de evitar el frío, viento y la alta insolación primaveral estival (Figura 1.5) (Burtnik, 2006).

⁷ Recipientes plásticos, con forma de cono, con orificios en el extremo más estrecho, de 20 cm de alto. Se utiliza para la propagación de plantas forestales para un buen desarrollo del sistema radical.

⁸ Protección pueden fabricarse con paja, eucaliptos o pino, ubicados en posición noroeste.



Figura 1.5. A. Plantín trasplantado a campo con “poncho” B. Yerbales de 10 años en Oberá, Misiones, Argentina.

Debido a una expansión en los últimos años del número de plantaciones de yerba mate, al aumento de la homogeneidad de las mismas y al proceso de domesticación en los yerbales se registra un incremento del desarrollo de plagas y enfermedades en las plantas (Capellari *et al.*, 2017). En el ambiente selvático, la acción de las enfermedades es contrarrestada por el ecosistema natural. En un ambiente agrícola, como el hospedero es abundante y homogéneo y la biodiversidad pequeña, los enemigos naturales son pocos para equilibrar las poblaciones de hongos y/o bacterias patógenas, lo cual conduce indefectiblemente a una mayor frecuencia de plagas y enfermedades (Burtnik, 2006). A continuación, se mencionan las más comunes para el cultivo de yerba mate.

1.1.6 Plagas⁹ y enfermedades¹⁰

Una amplia gama de artrópodos está asociados al cultivo de yerba mate, la mayoría ocurren en bajos niveles poblacionales, y en yerbales equilibrados naturalmente no causan daños económicos significativos. Pero cuando esto no sucede, aparecen [ciertas plagas que se observan con mayor frecuencia en el cultivo de yerba mate](#): “Taladro o tigre de la yerba mate”, “Rulo o psílido de la yerba mate”, “Marandová u oruga rabuda” y ácaros: “ácaro del bronceado”, “ácaro rojo”, “ácaro blanco” (Capellari *et al.*, 2017).

Dentro de las enfermedades causadas por hongos patógenos registradas en yerba mate las más frecuentes son las siguientes:

- *Damping off* es causado por un complejo de hongos del suelo (*Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Rhizopus sp.*, *Pythium sp.*, *Phytophthora sp.*) que afecta al cultivo en la etapa temprana de desarrollo de plantines. Estos presentan un estrangulamiento a la altura del cuello que las debilita provocando, en la mayoría de los casos, su muerte (Burtnik, 2006).
- Mancha negra es ocasionada por *Cylindrocladium spathulatum*. Se observan áreas cloróticas sobre la hoja, puede ocasionar defoliación y muerte descendente de ramas (Rybak *et al.*, 2014).

⁹ Se considera organismo plaga (insecto, maleza o agente patógeno) cuando la densidad de su población supera los niveles que son aceptables para el cultivo y provocan un daño que se traduce en pérdidas económicas para la producción.

¹⁰ Alteraciones de la fisiología normal de una planta producidas por la acción persistente de agentes bióticos o abióticos que generalmente derivan en modificaciones morfológicas visibles y variables, desde alteraciones apenas perceptibles hasta la muerte de la planta.

- El tizón es producido por *Colletotrichum* sp., comienzan en los brotes tiernos y avanzan en sentido descendente, poniendo negras las ramas de las plantas (Burtnik, 2006).
- Mal de la tela, cuyo agente etiológico es *Ceratobasidium niltonsouzanum*, se inicia en ramas verdes jóvenes, necrosando tejidos corticales y provocando su muerte (Lima *et al.*, 2019).
- Hollín de la yerba mate ocasionadas por *Asterina sphaerelloides*, donde se observan puntos negros agrupados formando manchas redondeadas (Rybak *et al.*, 2014).
- Enfermedad causada por *Phoma* sp. y *Phomopsis* sp., afectan a ramas y tallos de plantas maduras o debilitadas, donde se observan canchales de diversos tamaños (Rybak *et al.*, 2014).
- Mancha foliar o cercosporosis ocasionado por *Pseudocercospora mate*. Las lesiones se inician en las hojas como un punto oscuro, que aumenta su tamaño resultando en grandes manchas localizadas (Rybak *et al.*, 2014).
- Podredumbre de la raíz causada por *Fusarium oxysporum* (Poletto *et al.*, 2007).

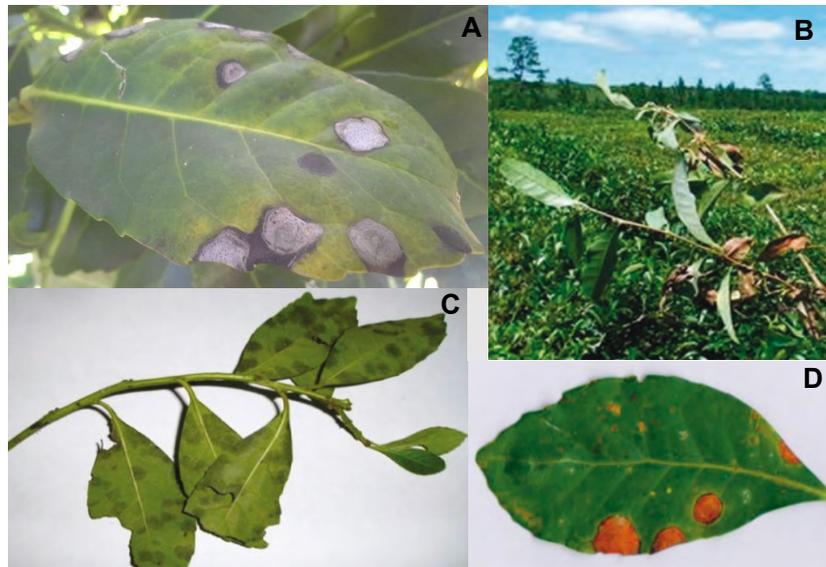


Figura 1.6. Enfermedades de yerba mate. **A.** Mancha negra. Adaptada de Maidana Ojeda *et al.* (2016) **B.** Mal de la tela. **C.** Hollín de la yerba mate. **D.** Cercosporosis. Imagen C y D. Adaptadas de Rybak *et al.* (2014).

Tanto para plagas como para enfermedades su control se basa principalmente en pesticidas químicos, pero la aparición de cepas resistentes a éstos y los problemas ambientales que ellos conllevan obligan a pensar en la necesidad de tomar medidas de control que sean más amigables con el medio ambiente (Mari *et al.*, 2003). Por otro lado, la actualización respecto del estado fitosanitario de los cultivos, la emergencia de enfermedades y su impacto es una necesidad constante, ya que las situaciones fitosanitarias son muy dinámicas y permanentemente se publican reportes de patógenos nuevos para un determinado hospedero o nuevos para un área geográfica (Fletcher *et al.*, 2020). Las recorridas a los cultivos mantienen el vínculo con los productores y son fuente de información sobre alteraciones en el *status* sanitario de la producción.

Tanto los microorganismos patógenos como los beneficiosos¹¹ se pueden aislar de las plantas de yerba mate de una región en particular para realizar estudios específicos sobre la interacción

¹¹ En párrafos posteriores se definirán los microorganismos benéficos o Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal.

patógeno-planta-microorganismo antagonista y proponer soluciones locales a los problemas de plagas y enfermedades.

1.1.7 Situación actual de la producción de yerba mate

La vida útil o económicamente productiva de un yerbal es entre 25-30 años. Sin embargo, se conocen explotaciones que alcanzan los 80 años con excelente producción (Burtnik, 2006). Esta práctica no es recomendable, ya que luego de los 25-30 años, en respuesta al envejecimiento de las plantaciones, se produce una caída de la productividad, rendimientos y la degradación del suelo debido a las prácticas de manejo no sustentables. En Misiones, el cultivo de yerba mate es una actividad socioeconómica muy importante y se han realizado muchos esfuerzos para mejorar la productividad y la calidad de los suelos recomendando la implementación de la agricultura sin labranza y la introducción de cultivos de cobertura (Prat Kricun, 2011) o árboles nativos en plantaciones mixtas (Montagnini *et al.*, 2011), además de la reducción del uso de agroquímicos y prácticas de manejo controlado de plagas (Burtnik, 2006). Aún son escasos los estudios enfocados en el papel de los microorganismos nativos asociados a este cultivo y su acción benéfica natural o artificial como una estrategia sustentable para mejorar el crecimiento y la salud del cultivo de yerba mate.

Tecnologías basadas en la minimización del uso de productos químicos de síntesis, la utilización de microorganismos benéficos y prácticas de manejo de cultivo adecuadas, permitirán lograr producciones sanas, sin impactos negativos sobre el medio ambiente. Paralelamente, la identificación y el posible trabajo mutuo junto a productores influyentes, o generadores de opinión, puede facilitar la transferencia de tecnologías al medio productivo.

1.2 Agricultura sustentable

La agricultura convencional se caracteriza por el uso intensivo de fertilizantes y pesticidas, para aumentar la producción agrícola. La necesidad de producir grandes cantidades de alimentos ha llevado a emplear cada vez mayores cantidades de agroquímicos sintéticos para satisfacer esta demanda (Zapata *et al.*, 2012). Según Venturoso *et al.* (2010) algunas características y consecuencias de estos sistemas agrícolas son:

- ✓ Uso poco racional de los suelos y del agua.
- ✓ Aparición de patógenos resistentes y surgimiento de nuevas plagas.
- ✓ Eliminación de enemigos naturales y de microorganismos responsables de la degradación de la materia orgánica y del control biológico.
- ✓ Alteración del equilibrio dinámico de los ecosistemas terrestres y acuáticos con la consiguiente pérdida de biodiversidad.
- ✓ Acumulación y persistencia de residuos tóxicos en el ambiente y en los alimentos.
- ✓ Degradación de los ambientes.

Por ello resultan necesarias **propuestas sustentables para la producción agrícola**, que sean amigables con el medio ambiente y que impulsen el desarrollo de alternativas no contaminantes que

puedan complementar o reemplazar a los productos químicos de síntesis (Harman *et al.*, 2004). Según la FAO (2015)¹², una agricultura será sustentable si satisface las necesidades de las generaciones actuales y futuras y, al mismo tiempo, garantiza la rentabilidad, la salud ambiental, la equidad social y económica. Las acciones que pueden conducir a la sustentabilidad agrícola se centran en el desarrollo de tecnologías y prácticas agrícolas que:

1. no tengan efectos adversos sobre el medio ambiente.
2. sean accesibles y eficaces para los agricultores.
3. conduzcan a mejoras en la productividad de alimentos inocuos (Pretty, 2008) reduciendo el uso de agroquímicos.

Dentro de las prácticas recomendadas para una producción agrícola sustentable en la producción de alimentos se incluyen el manejo integrado de plagas, labranza de conservación, y el uso de **bioinsumos**, entre otras. Los bioinsumos son una alternativa que tiene cada vez mayor participación en el esquema de manejo de los cultivos, complementando al manejo convencional, ya que representan opciones económicamente atractivas y ecológicamente aceptables.

1.2.1 Bioinsumos. Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal.

Se considera [bioinsumos agropecuarios](#) a todo aquel producto biológico que consista o haya sido producido por **microorganismos** (hongos, bacterias y virus), macroorganismos (ácaros e insectos benéficos), o extractos de plantas, y que estén destinados a ser aplicados como insumo en la producción agropecuaria, agroalimentaria, agroindustrial, agroenergética y en el saneamiento ambiental¹³. Los **bioinsumos** ocupan un lugar destacado dentro de las prácticas sustentables ya que permiten obtener productos agroalimentarios de calidad, agregan valor en origen, reducen la aplicación de productos químicos, además de ser una alternativa efectiva y de bajo costo. Su uso se ha fomentado en Argentina en los últimos años en el Plan Argentina Innovadora 2020, el lanzamiento del PROFOBIO (Programa de Fomento del Uso de Bioinsumos Agropecuarios), la creación de la CABIO (Cámara Argentina de Bioinsumos), entre otras acciones. De esta manera se pretende no sólo fomentar las investigaciones en relación a la producción de esta herramienta biotecnológica sino también fomentar su uso, ya que su éxito requiere también que el agricultor conozca el uso y manejo de los mismos, sobre todo en el caso de **bioinsumos microbianos** ya que estamos hablando de microorganismos que están **vivos** y deben seguir estándolo para ser efectivos, a diferencia de lo que ocurre con un producto químico. Según la [CABUA](#) los bioinsumos se pueden clasificar como:

- **Biofertilizantes:**
 - a. Para fijación de fósforo y/o nitrógeno.
 - b. Como fitoestimulantes (Microorganismos productores de moléculas fitoestimulantes o promotores del desarrollo del crecimiento de las plantas)
- **Biopesticidas:**

¹² Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura.

¹³ Según el Comité Asesor en Bioinsumos de Uso Agropecuario (CABUA), creado por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación (Resolución SAGyP 7/2013).

- a. Empleados para el control biológico de plagas y enfermedades en los cultivos.
 - b. Bioinsecticidas fúngicos, virales y/o bacterianos
 - c. Extractos vegetales de plantas con características insecticidas, nematocidas, o repelentes
 - d. Insectos para el control biológico (parásitos y predadores).
- **Microorganismos eficaces:**
 - a. Aplicación en agricultura, producción animal, sanidad y salud animal, medio ambiente, tratamiento de aguas servidas, etc.
 - b. Bacterias ácido lácticas: suprimen microorganismos patógenos e incrementa la rápida descomposición de la materia orgánica.
 - c. Probióticos de uso agropecuario.
 - d. Aditivos para forraje

Un bioinsumo incluido en una determinada categoría, puede presentar más de un efecto en la planta, por ejemplo, puede promover el desarrollo de la planta y, a su vez, protegerla del ataque de patógenos. Estos efectos, son el resultado de diferentes mecanismos ejercidos por los PGPM, los cuales se muestran en la Figura 1.7 (Gaiero *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta estas características, los PGPM se encuentran ubicados dentro de la categoría de **Biofertilizantes** y/o **Biopesticidas** dentro de los bioinsumos microbianos.

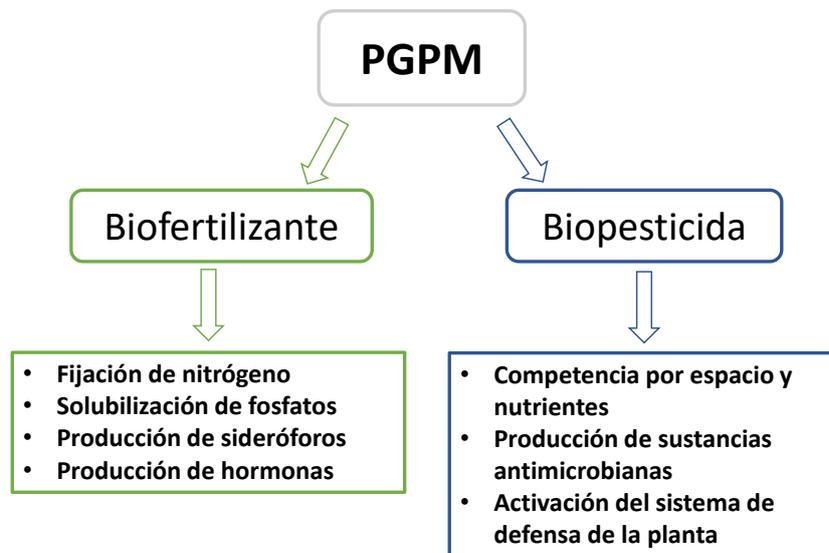


Figura 1.7. Mecanismos directos e indirectos que ejercen los PGPM.

La aplicación de PGPM contribuye no solo a aumentar la fertilidad del suelo, la producción agrícola y la calidad alimentaria y nutricional, sino también a mejorar los agroecosistemas.

En los estudios de investigación y desarrollo de bioinsumos a base de PGPM se suceden diversas etapas que en forma resumida incluyen:

- Aislamiento del microorganismo de suelo/rizósfera/planta (endófitos)
- Identificación taxonómica
- Evaluación de la capacidad de promoción del crecimiento *in vitro*
- Caracterización de colonización rizosférica

- Ensayos de promoción de crecimiento *in vivo*: momento y forma de aplicación, dosis
- Selección de cepas promisorias
- Cultivo en masa en biorreactores, líquido sumergido (bacterias) o sustrato sólido (hongos)
- Formulación¹⁴ y determinación de viabilidad, compatibilidad con agroquímicos
- Ensayos ecotoxicológicos para presentar ante el organismo regulador. SENASA¹⁵ es el organismo oficial responsable del registro de productos químicos y biológicos para las actividades agropecuarias en Argentina.

El desarrollo, producción y aplicación de un bioinsumo microbiano de alta calidad es un proceso complejo en el que se ven involucrados diversos especialistas que se ocupan de optimizar cada una de las etapas del mismo. El conocimiento de aspectos fisiológicos básicos de los microorganismos que puedan ser importantes tanto para su cultivo en biorreactores (producción) como en su interacción con las plantas (aplicación), constituye una etapa importante de este proceso. Un bioinsumo microbiano requiere la producción de biomasa a escala industrial y una formulación adecuada que permita su depósito, distribución, aplicación sencilla y persistencia, con la menor pérdida de actividad biológica posible. No obstante, un problema que se encuentra a menudo en la mayoría de los experimentos a campo con PGPM es la inconsistencia de la respuesta de las plantas a la inoculación (aplicación del bioinsumo), siendo entonces poco probable garantizar el éxito de la misma. Esta falta de respuesta es atribuida generalmente a una ineficiente colonización (Stewart & Hill, 2014). Las fuentes de carbono que se encuentran en los exudados de las raíces, los minerales disponibles en el suelo, la colonización de las raíces lograda con un inóculo y dosis adecuados, así como características ambientales (pH, temperatura) son algunos de los factores que influyen en la colonización de las PGPM (Stewart & Hill, 2014). Por estas razones se ha puesto énfasis en el aislamiento de PGPM de los mismos cultivos donde se pretenden aplicar como bioinsumos. Esta estrategia puede ayudar a superar las dificultades para adaptar microorganismos no “nativos” en un nuevo entorno. De esta forma, los PGPM estarán adaptados al crecimiento en las condiciones de cultivo locales a las que se los va a exponer y tienen más posibilidad de promover el crecimiento en ese entorno que otros productos comerciales, además de poder ser microorganismos que aún no hayan sido aislados en otros sitios previamente otorgándole a este producto biotecnológico un carácter propio. Se requiere de experimentación para seleccionar microorganismos locales de la rizósfera de cultivos de interés agronómico que presenten una o más aptitudes como PGPM.

En las últimas décadas una gran cantidad de microorganismos han sido aislados de diferentes ambientes, estudiados y evaluados en diferentes cultivos con el objetivo de promover el crecimiento vegetal, siendo introducidos en un ecosistema donde tienen lugar complejas interacciones. En la Argentina, el mayor mercado de PGPM está representado principalmente por **biofertilizantes** para leguminosas con bacterias de los géneros *Rhizobium* spp. y *Bradyrhizobium* spp. por su efectividad en la fijación de Nitrógeno atmosférico que proporciona compuestos nitrogenados asimilables por las plantas con la concomitante disminución en el uso de fertilizantes nitrogenados de síntesis (Lagler,

¹⁴ Formulación: los microorganismos se encuentran adsorbidos, adheridos o suspendidos en un soporte, que puede ser de naturaleza sólida (turba, granos) o líquida y pueden ser aplicados en semillas, hojas o suelo (Bashan *et al.*, 2014).

¹⁵ Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.

2017). Otros microorganismos diazótrofos (fijadores de nitrógeno atmosférico) que no forman estructuras particulares como lo hacen los rizobios, es decir, fijadores libres, por ejemplo el género *Azospirillum* siendo el más ampliamente estudiado con la especie *A. brasilense* y no principalmente por su diazotrofia, sino por su capacidad de producir fitohormonas que entre otras acciones aumentan el volumen radical y permiten una mayor absorción de nutrientes en el hospedero (Richardson *et al.*, 2009).

En relación al mercado de **biopesticidas**, entre las bacterias uno de los más representativos son los productos a base de especies del género *Bacillus* y entre los hongos, especies del género *Trichoderma*, como por ejemplo la especie *T. harzianum*. Algunos registrados en SENASA ([Productos registrados](#)), aunque con menos comercialización¹⁶, principalmente como biofertilizantes ya que, si bien estos microorganismos también ejercen una actividad de biocontrol, el registro de un bioinsumo como fertilizante (Decreto Ley Nacional Nº 5769/59) presenta muchos menos requerimientos que el registro como un agente de control biológico (Decreto Ley Nacional 3489/58).

En cultivos de yerba mate se utilizan fertilizantes y pesticidas sintéticos y, aún no hay registros de bioinsumos microbianos para la aplicación en dicho cultivo.

1.2.2 Comunidades microbianas rizosféricas, su contribución al desarrollo y la salud de las plantas. Reservorio de PGPM.

En 1904, el agrónomo y fisiólogo vegetal alemán Lorenz Hiltner acuñó por primera vez el término "**rizósfera**" para describir la interfaz planta-raíz, una palabra originada en parte de la palabra griega "*rhiza*", que significa raíz (Hiltner, 1904). Hiltner describió la rizósfera como "el área alrededor de la raíz de una planta que está habitada por una población única de microorganismos influenciados por los químicos liberados de las raíces de las plantas". En años posteriores, la definición de rizósfera se fue perfeccionando para incluir tres zonas que se definen en función de su proximidad relativa y, por lo tanto, la influencia de la raíz (Figura 1.8).

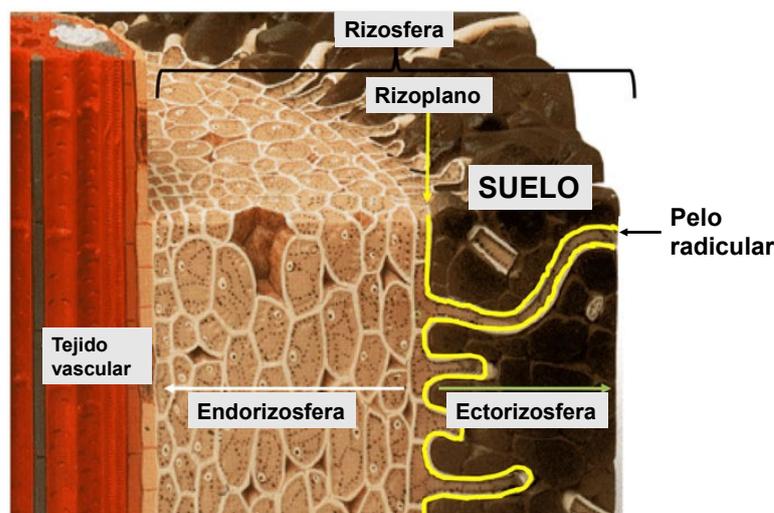


Figura 1.8. Esquema de la raíz que muestra la estructura de la rizósfera. Adaptada de McNear Jr. (2013).

¹⁶ Comparados con los biofertilizantes para leguminosas todos los bioinsumos se comercializan en menor cantidad debido a que la soja como principal leguminosa es cultivada en grandes extensiones y presenta una mayor demanda.

La **endorizósfera** incluye partes de la corteza y la endodermis en las que los microorganismos pueden ocupar el "espacio libre" entre las células (espacio apoplástico). El **rizoplano** es la zona media directamente adyacente a la raíz que incluye la epidermis de la raíz y el mucílago. La zona más externa es la **ectorizósfera** que se extiende desde el **rizoplano** hacia el **suelo**. Como podría esperarse debido a la complejidad y diversidad inherentes de los sistemas de raíces de las plantas, la rizósfera no es una región de tamaño o forma definibles, sino que consiste en un gradiente en las propiedades químicas, biológicas y físicas que cambian tanto radialmente como longitudinalmente a lo largo de la raíz.

Las plantas viven en íntima asociación con comunidades microbianas complejas y diversas que constituyen la microbiota¹⁷, cuyos integrantes ejercen efectos benéficos sobre el crecimiento de las mismas (Philipot *et al.*, 2013). Las plantas y estos microorganismos asociados –no sólo los que colonizan su parte superficial sino también la interna (endófitos¹⁸)– interactúan entre sí formando un conjunto de especies que a menudo se denomina "holobionte".

Comprender y aprovechar estas interacciones para la producción sustentable de alimentos, combustible y fibra para apoyar a una población mundial en crecimiento con una oferta cada vez menor de tierra cultivable es el desafío de las generaciones venideras.

1.2.3 Microbiota nativa de yerba mate

Tal como se mencionó al comienzo de este capítulo, el aumento de las plantaciones en monocultivo de yerba mate desencadenó una serie de problemas fitosanitarios, intensificados por prácticas y manejo de cultivo inadecuado. Estas prácticas, alteran la dinámica de las comunidades de microorganismos e influyen en la calidad de los productos y en la productividad del cultivo (Borges *et al.*, 2011). El empleo de PGPM que se encuentran naturalmente en los ecosistemas, busca restablecer los equilibrios ecológicos naturales, aportando al aumento de la biodiversidad del sistema productivo. Por ello, la evaluación y caracterización de la diversidad de microorganismos asociados a los cultivos de importancia regional se ha convertido en una herramienta con relevante importancia (Carvalho, 2008).

En relación a la microbiota bacteriana, Collavino *et al.* (2010) aislaron bacterias de la rizósfera de yerba mate capaces de solubilizar fosfatos, pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Burkholderia* y *Exiguobacterium*. Algunos de estos aislados promovieron el crecimiento de las plantas y aumentaron el contenido de fósforo y nitrógeno de las hojas en *Phaseolus vulgaris*. Bergottini *et al.* (2015) lograron aislar bacterias endófitas de yerba mate y seleccionó a *Kosakonia radicincitans* YD4 como promotora de crecimiento vegetal en plantas de yerba mate. Pérez *et al.* (2016) lograron aislar bacterias, siendo el taxón *Actinobacteria* el más abundante, con representantes en los géneros *Curtobacterium* y *Microbacterium* que demostraron ser capaces de solubilizar fosfatos y fijar nitrógeno, mientras que una de ellas logró inhibir el crecimiento de *Fusarium* en ensayos *in vitro* (Pérez *et al.*, 2016). Además, bacterias pertenecientes al género *Bacillus* aisladas

¹⁷ Microbiota vegetal es el conjunto de microorganismos asociados a plantas: fitomicrobiota. Fitomicrobiota + Planta (Hospedero): Holobionte-Entidad Funcional.

¹⁸El término "endófito" significa "dentro de la planta": "endo" significa dentro y "phyto" significa planta.

de la raíz de yerba mate presentaron la capacidad de promoción del crecimiento en vivero en plantas de yerba mate (Laczeski *et al.*, 2020).

En cuanto a integrantes del reino fungi, con el fin de determinar la biodiversidad fúngica en monocultivos de yerba mate, Pimentel *et al.* (2006) informaron la población de hongos endofíticos en hojas de yerba mate cultivadas en Brasil, donde reconocieron 5 géneros de hongos: *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma*. También, se ha registrado hongos aislados de hojas de yerba mate pertenecientes al género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, entre otros (Poletto, 2010; Poletto *et al.*, 2007). Pérez *et al.* (2016), lograron aislar hongos del género *Acrocalymma*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Clonostachys*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Microsphaeropsis*, *Neofusicoccum*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phomopsis* y *Trichoderma* a partir de muestras de hojas desinfectadas de yerba mate, y demostraron la capacidad antagónica *in vitro* de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* frente a *Fusarium* sp., un patógeno típico del suelo que afecta las plantas de yerba mate.

Dado que existen muy pocos estudios acerca de la microbiota tanto bacteriana como fúngica asociada a yerba mate, y más aún en relación a sus propiedades como PGPM *in vivo* —principalmente debido a la complejidad del cultivo de yerba mate— investigar en relación a estos temas permitirán orientar a la selección y aislamiento de posibles microorganismos beneficiosos para aplicar en este cultivo como biofertilizantes y/o biopesticidas para lograr contribuir a su sustentabilidad.

1.3 Reino Fungi. Contribución a la sustentabilidad agrícola.

El reino fungi es el reino de los hongos: organismos eucariotas heterótrofos, que están filogenéticamente cerca de determinados grupos de animales y plantas de estructura simple cuyas paredes celulares comúnmente presentan quitina (Sitte *et al.*, 2004). Pueden ser organismos unicelulares como las levaduras o multicelulares plasmoidales como los *Mixomycetes*¹⁹ o con una estructura filamentosa en forma de malla llamada micelio, formada por estructuras largas en forma de hilo conocidas como hifas, como las spp. del género *Penicillium*. Los integrantes del reino fungi representan un grupo heterogéneo de organismos de vida libre o parásita, saprófitos o patógenos, en el que actualmente se encuentran 5 filos o divisiones principales: Zygomycota, Chytridiomycota, Basidiomycota, Ascomycota y Glomeromycota ([Catalogue of Life: 2014 Annual Checklist](#), revisado el 28 de enero de 2021).

Una característica importante de los hongos, es que en el ciclo de vida pueden tener dos o más etapas en las que puede existir una fase de reproducción **asexual** (reproducción por mitosis) y/o una **sexual** (reproducción por meiosis) (Dyer & Kück, 2017). Un hongo que produce esporas²⁰ **asexuales** o que no produce ninguna espóra se denomina **anamórfico o imperfecto**, y el estado **sexual** cuando está presente se denomina **teleomorfo o estado perfecto**. Aunque en muchos hongos aún no se ha descubierto la fase sexual, la mayoría de los hongos disponen de algún mecanismo de reproducción sexual, siendo ésta una característica importante que se toma como base de la pertenencia a una determinada división. Cuando las formas anamorfo y teleomorfo existen y ocurren por separado,

¹⁹ Conocidos comúnmente como mohos de limo acelular (Stephenson & Schnittler, 2017).

²⁰ Del griego σπορά (*sporá*) que significa semilla, también llamadas conidios.

generalmente hay nombres duales, uno se usa para el anamorfo y otro para el teleomorfo. En algunos casos, la morfología del anamorfo puede ser muy básica, por lo que formas anamórficas aparentemente similares pueden producir teleomorfos diferentes y, a veces, no relacionados. Esto ocurre comúnmente en los *Ascomycotas*, y ejemplos de géneros anamórficos comunes con más de un género de teleomorfo incluyen *Phoma*, *Aspergillus* y *Paecilomyces*. El término holomorfo se usa para cualquier espécimen donde el teleomorfo y uno o más estados anamórficos están presentes, y en casi todos los casos, el nombre del holomorfo es el mismo que el del teleomorfo (Bridge *et al.*, 2005).

Dentro de los hongos, los *Ascomycotas* comprenden la división más grande y son uno de los *phylum* más diversos y omnipresentes de eucariotas, encontrándose prácticamente en todos los ecosistemas terrestres y acuáticos. Están presentes en la descomposición de sustratos orgánicos, y actúan como mutualistas o también como parásitos de animales, plantas y otros hongos (Schoch *et al.*, 2009). Además, a esta división la integran géneros que son económica y ecológicamente significantes pues contribuyen como agentes biotecnológicos tanto a la industria alimenticia, a la industria farmacéutica, así como a la **producción sustentable de cultivos agrícolas**, tal como se muestra en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Géneros *Ascomycotas* con mayor relevancia y su aplicación.

Género	Especies	Aplicaciones	Referencia
<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i>	Producción de enzimas, ácidos orgánicos, alimentos fermentados.	Dyer & Kück (2017)
	<i>A. oryzae</i>		
	<i>A. terreus</i>		
	<i>A. flavus</i>		
<i>Botrytis</i>	<i>B. cinerea</i>	Industria del vino.	Harper <i>et al.</i> (2019)
<i>Penicillium</i>	<i>P. camemberti</i>	Producción de alimentos lácteos, producción de antibióticos, control biológico.	Dyer & Kück (2017)
	<i>P. roqueforti</i>		
	<i>P. brevicompactum</i>		
	<i>P. griseofulvum</i>		
<i>Trichoderma</i>	<i>T. harzianum</i>	Control biológico, producción de enzimas, promotor del crecimiento vegetal.	Harman <i>et al.</i> (2004)
	<i>T. reesei</i>		
	<i>T. viride</i>		
	<i>T. asperellum</i>		

Los géneros como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, se reproducen de forma asexual, siendo el tipo más común mediante esporas²¹ y/o conidios²² (Agrios, 2005). Estos géneros fúngicos se diferencian en general, por sus conidióforos, fiálides²³ y conidios. En la Figura 1.9, se muestran imágenes de ilustraciones y fotografías microscópicas representativas de estos 3 géneros, donde se pueden observar sus diferencias entre las estructuras mencionadas.

²¹ Estructuras reproductivas de hongos imperfectos *Ascomycotas*.

²² Se forman por hifas especializadas o ramas de hifas que cortan en una célula terminal (conidióforo).

²³ Células finales con forma de botella que producen las esporas en los conidióforos.

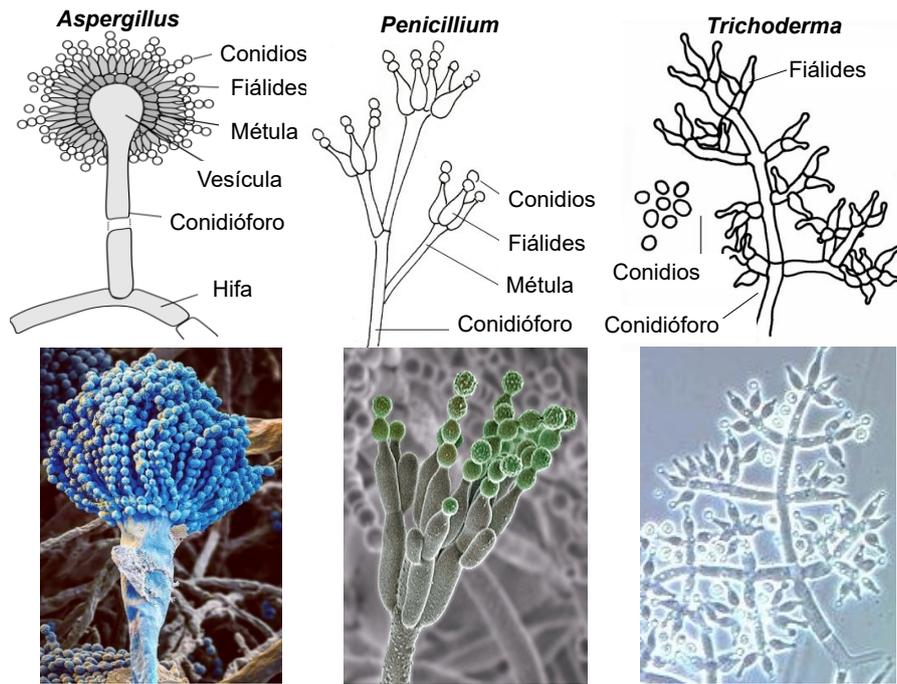


Figura 1.9. Imágenes de ilustraciones (arriba) y fotografías microscópicas (abajo)²⁴ de estructuras características de los géneros: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*. Adaptado de Dyer & Kück (2017); Lu *et al.* (2004).

1.3.1 Criterios taxonómicos para el estudio de organismos fúngicos

La taxonomía²⁵ comprende la descripción en este caso de organismos fúngicos y su clasificación, así como también la provisión de herramientas necesarias para su identificación²⁶.

Características morfológicas. Si bien actualmente se utilizan otros criterios tal como los moleculares para la identificación taxonómica definitiva de los hongos, la sistemática de los hongos se ha desarrollado históricamente a partir de **características observables macroscópicas y microscópicas (método tradicional)**, particularmente aquellas involucradas con el crecimiento y la reproducción, tal como se mencionó previamente (Bridge *et al.*, 2005). La nomenclatura fúngica se rige por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (Greuter *et al.*, 2000) y las colecciones de referencia de material tipo y autenticado. La identificación preliminar se realiza a través de la comparación de los **caracteres morfológicos** del organismo que se pretende ubicar taxonómicamente con aquellos reportados para hongos ya establecidos cultivados bajo un conjunto estándar de condiciones determinadas por expertos en micología (Kredics *et al.*, 2014). El estudio a nivel **macroscópico** se basa en la observación de las características de la colonia que forma el hongo en un determinado medio tales como, la forma, el color del anverso y reverso de la colonia, velocidad de crecimiento, textura (algodonosos, secos, pulverulentos), entre otros (Guarro *et al.*, 1999). En cuanto a la caracterización **microscópica**, además de la primera apreciación que se hace sobre si es uni o pluricelular, para los hongos imperfectos, se basa en la observación de estructuras fértiles y caracteres como la

²⁴ Fuente: <https://aspergillosis.org/> – <http://microenalimentos.blogspot.com/2016/04/penicillium.html> – <https://biologia.laguia2000.com/> – revisado el 30 de enero de 2021.

²⁵ Del griego taxis, ‘ordenamiento’, y nomos, ‘norma’ o ‘regla’. En biología, la taxonomía es el estudio científico de clasificar grupos de organismos basados en características compartidas, nombrarlos e identificarlos.

²⁶ La identificación incluye a un determinado microorganismo en un grupo taxonómico previamente establecido.

pigmentación, la forma de las hifas²⁷, la presencia o ausencia de tabiques, los tipos de esporas y su disposición (Guarro *et al.*, 1999), forma, longitud y disposición de fiálides, forma del conidióforo y presencia o ausencia de clamidosporas. En el caso de hongos con fase de reproducción sexual las estructuras utilizadas para la identificación son los ascocarpos y la morfología que adoptan sus paredes, las formas que adoptan los ascos y las ascosporas (Agrios, 2005). Un hongo que se conoce solo por su estado vegetativo²⁸ puede ser extremadamente difícil de identificar utilizando el análisis morfológico tradicional siendo esto una limitación importante para su identificación.

➤ **Características moleculares.** La identificación taxonómica por el análisis de las estructuras fúngicas es muy útil para la descripción y asignación de género, pero en la actualidad son los **métodos moleculares** los que se utilizan para hacer una asignación definitiva a nivel de especie (Bickford *et al.*, 2007).

La identificación molecular consiste en secuenciar y analizar regiones del ácido desoxirribonucleico (ADN), o incluso del genoma completo, que son marcadores moleculares específicos o *barcoding*, es decir, como código de barras o huella digital del individuo. El método molecular de identificación mediante secuenciación de genes marcadores incluye las siguientes etapas:

- amplificación del marcador molecular a partir de la muestra apropiada, mediante la amplificación en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como sustrato se utiliza normalmente ADN purificado a partir de un cultivo puro del microorganismo y existen diversos cebadores para amplificar diferentes regiones variables del gen o bien el gen completo.
- determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón. En esta etapa se llevan a cabo las reacciones de secuenciación.
- análisis de la secuencia. Las secuencias obtenidas deben ser analizadas y editadas empleando programas bioinformáticos como Bioedit, MEGA y otros similares.
- búsqueda de secuencias homólogas en base de datos. La última etapa que consiste en la comparación de la secuencia con las depositadas en bases de datos. La herramienta [BLAST](#)²⁹ del GenBank disponible en la página del [NCBI](#) (*National Center for Biotechnology Information*) es la más utilizada. Además, existen otras bases de datos que pueden utilizarse para la búsqueda de secuencias homólogas como [Mycobank](#) del CBS-KNAW³⁰ (*Westerdijk Fungal Biodiversity Institute*), [UNITE](#), entre otras. El porcentaje de similitud indicará la relación entre la secuencia problema y las disponibles en la base de datos.

Es importante señalar que la bondad de una clasificación se relaciona con la base de datos subyacente. La base de datos más utilizada para la identificación de hongos es la del NCBI la cual registra más de 14 millones de secuencias nucleotídicas, más de 3 millones de genes diferentes y 2762 genomas. Otra base de datos utilizada para la identificación de hongos es el Mycobank, si bien no posee tantas secuencias como el NCBI, la información presente es proveniente de cepas tipo ingresadas en su cepario.

²⁷La hifa es el filamento fúngico que se origina a partir de una espora.

²⁸ Multiplicación vegetativa, no produce esporas o estructuras portadoras de esporas: fisión, gemación, fragmentación, crecimiento apical de las hifas.

²⁹ Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool

³⁰ El CBS-KNAW contiene secuencias curadas de cepas tipo.

Para lograr una identificación exitosa, un marcador molecular para estudios taxonómicos y filogenéticos debe cumplir con las siguientes características: i- contener una variabilidad y una divergencia genética significativa a nivel de especie; ii- poseer sitios conservados, que permitan el diseño de *primers* universales para amplificación por PCR; y iii- obtener amplicones de longitud adecuada para permitir su extracción y secuenciación de manera simple, reproducible y precisa, es decir, secuencias de buena calidad (Kress & Erickson, 2012).

La región del espaciador transcrito interno [*Internal Transcribed Spacer (ITS)*] tiene la mayor probabilidad de identificación exitosa para la gama más amplia de hongos, ya que además de reunir las características que debe cumplir como marcador, existe en multicopia y está altamente conservado a nivel de género. Es por ello que la región ITS se propone como código de barra reconocido oficialmente (Schoch *et al.*, 2009). La región ITS incluye las regiones ITS1 e ITS2, separadas por el gen 5.8S rRNA, ubicado entre los genes 18S rRNA (SSU) y 28S rRNA (LSU) (Figura 1.10).

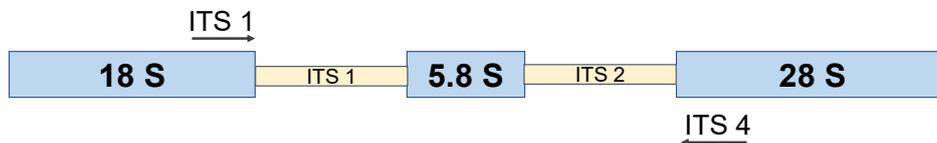


Figura 1.10. Representación esquemática de la región del ITS del ADNr. Los cuadros celestes representan las subunidades ribosómicas. Las flechas indican las posiciones de los cebadores de secuenciación.

El uso del marcador ITS solo para la identificación de especie puede no ser suficiente en ciertos géneros de hongos, como *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Trichoderma*, entre otros. Por lo tanto, para la identificación de especies de hongos, además de ITS, se utilizan genes que codifican proteínas debido a que presentan regiones de intrones que evolucionan a un ritmo más rápido que ITS y se emplean también en análisis filogenéticos³¹ debido a su mejor resolución de niveles taxonómicos (Raja *et al.*, 2017). Además, presentan una sola copia en los hongos, por lo que son menos variables en su longitud ya que acumulan menos mutaciones en sus exones. Entre estos marcadores moleculares, los más utilizados son: el factor de elongación de la transcripción [*Transcription elongation factor (tef)*], la subunidad de la ARN polimerasa II [*Subunit of RNA polymerase II (rpb2)*], endoquitinasas (*ech*), entre otros.

Los marcadores moleculares, también son utilizados para realizar un análisis filogenético³² cuando no se puede identificar un aislamiento mediante la búsqueda de secuencias homólogas. Además, es un método utilizado para validar la identificación de aquellos aislamientos asignados a una especie mediante la búsqueda de secuencias homólogas.

1.4 El género *Trichoderma*

1.4.1 Ubicación taxonómica

³¹ Comparando moléculas homólogas de diferentes organismos es posible establecer su grado de similitud estableciendo o revelando así una jerarquía de relación en un árbol filogenético (Patwardhan *et al.*, 2014).

³² Análisis filogenético: indica las relaciones evolutivas entre especies, cuales descienden de ancestros comunes y nos indica cuales son las distancias entre ellas. También, permite establecer parentesco y cambios fenotípicos, genéticos, entre otros.

En el año 1974, Persoon describió por primera vez una especie de *Trichoderma*. En 1865 se vinculó con el estado sexual de una especie del género *Hypocrea*. En la Figura 1.11, se detalla la ubicación taxonómica del género *Trichoderma* de acuerdo a la base actualizada de especies fúngicas [Index Fungorum](#).

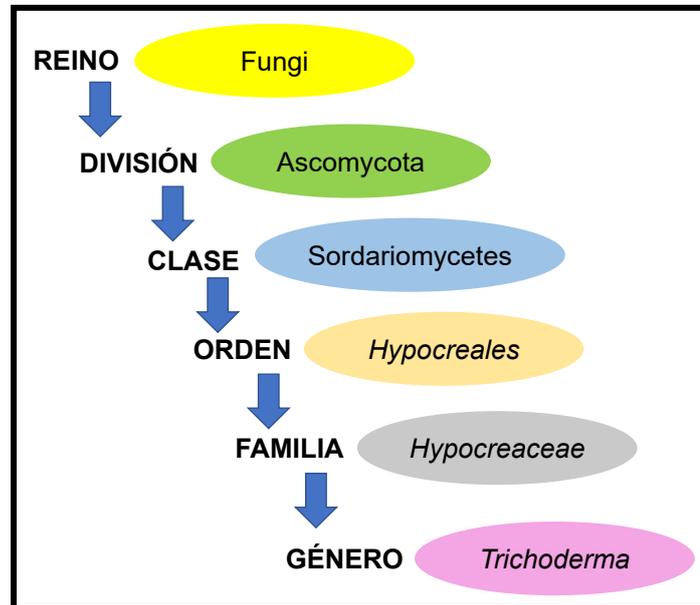


Figura 1.11. Ubicación taxonómica del género *Trichoderma* (Index Fungorum, revisado el 31 de enero de 2021).

Las dificultades que se presentaban en la identificación de especies dentro del género por la similitud de sus características morfológicas, fueron resueltas con el advenimiento de las técnicas moleculares que permitieron esclarecer la filogenia de los diferentes grupos y una identificación más confiable de las especies que aumentaron rápidamente en número. Además, se determinó que la sistemática del género comprende 3 secciones: *Trichoderma*, *Longibrachiatum*, *Pachybasium* y un grupo que comprende 13 clados: *Spinulosa*, *Chlorospora*, *Harzianum*, *Semiorbis*, *Virens*, *Ceramica*, *Strictipilosa*, *Gelatinosa*, *Stromaticum*, *Hypocreanum*, *Psichrophila*, *Brevicompectum*, *Lutea* (Druzhinina & Kubicek, 2005). También se reconoció que *Trichoderma* e *Hypocrea* eran filogenéticamente indistinguibles mostrando que la forma asexual y sexual, respectivamente, formaban una especie holomórfica, es decir, las especies del género *Trichoderma* corresponden al estado anamórfico de *Hypocrea*, o bien, tienen sus teleomorfos en el género *Hypocrea* (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009). Las técnicas moleculares mostraron su gran potencial en estudios a nivel interespecífico y, combinadas con criterios morfológicos, condujeron a la reubicación de algunas especies, la definición de otras nuevas y a conectar fases anamorfos con su teleomorfo (Martínez *et al.*, 2015).

La Figura 1.12 muestra cronológicamente cómo se fueron incorporando nuevas especies al género desde que Persoon introdujo el nombre genérico de *Trichoderma* en el año 1794 (Druzhinina *et al.*, 2006).

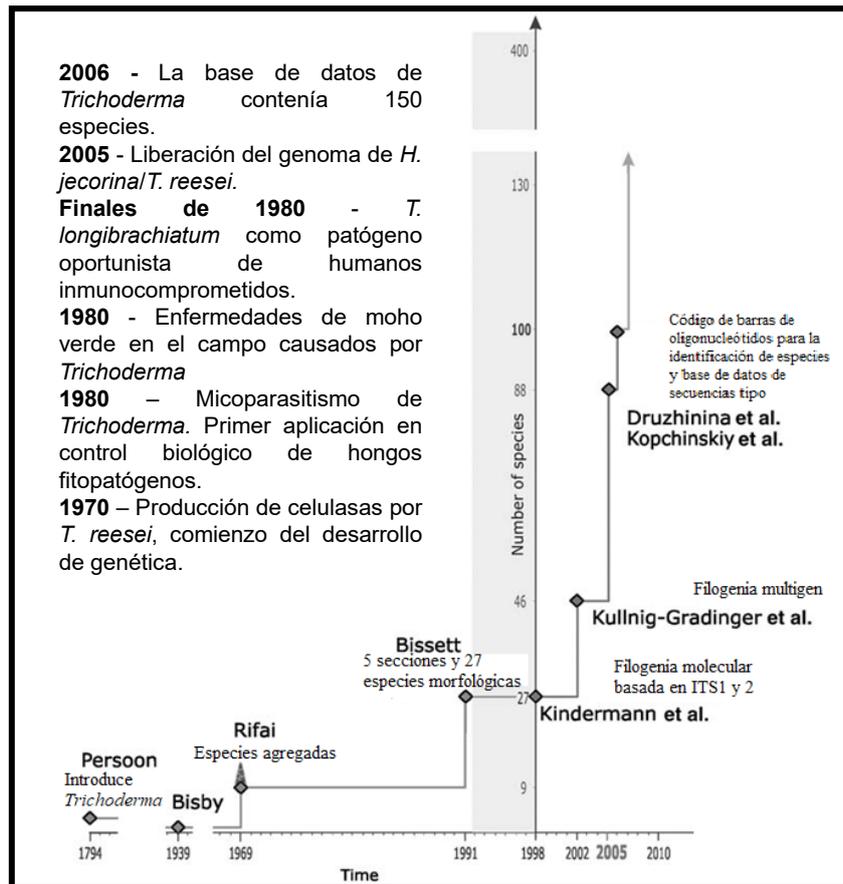


Figura 1.12. Crecimiento en el número de especies reconocidas del género *Trichoderma* hasta el año 2006. Adaptada de Druzhinina *et al.* (2006).

Dado que la mayoría de las especies fueron reconocidas en la era molecular de la taxonomía fúngica, el género *Trichoderma* está excepcionalmente bien documentado por datos de secuencias genéticas y prácticamente todas las especies están documentadas con secuencias de diagnóstico de al menos uno o dos genes. Hasta el año 2006, Druzhinina *et al.* (2006) reportaron un total de 104 especies disponibles en la base de datos de la Subcomisión Internacional de Taxonomía de [*Trichoderma* e *Hypocrea* International Subcommision on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy (ISTH)]. En esta base de datos, además hay disponible 153 secuencias de haplotipos de ITS 1 y 2. Del año 2006 en adelante, con el afianzamiento de las técnicas de biología molecular y los estudios polifásicos (morfológicos, fisiológicos y genéticos), la cantidad de especies de *Trichoderma* se duplicaron considerablemente en los últimos años. Actualmente, según el registro de datos de *Specie Fungorum*³³ se reportan [405 especies de *Trichoderma*](#) (revisada el 31 de enero de 2021). Mientras que en la base de datos del NCBI, hay 53 genomas ensamblados de especies de *Trichoderma*, y cerca de 290.000 [secuencias nucleotídicas](#) (revisada el 28 de enero de 2021).

1.4.2 Distribución en la naturaleza e importancia del género *Trichoderma* en el contexto agrícola

³³Es una base de datos mundial de nombres de hongos coordinada y respaldada por Index Fungorum Partnership, contiene nombres de hongos en todos los rangos. <http://www.speciesfungorum.org/>.

El género *Trichoderma* se puede decir que es cosmopolita³⁴, ya que frecuentemente especies de este género son componentes dominantes de la microflora del suelo en hábitats muy diversos. Sin embargo, a algunas especies se les ha atribuido cierta especialización geográfica (Chaverri & Samuels, 2003). Los integrantes de este género muestran gran habilidad adaptativa a una variedad de entornos como suelo y madera debido a su éxito en diversas interacciones heterotróficas³⁵, incluidas la descomposición y el parasitismo (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). También se han aislado de fuentes tan inusuales como esponjas marinas, estrella de mar, entre otros (Kredics *et al.*, 2014). En particular, varias especies del género *Trichoderma* colonizan las raíces de las plantas, en algunos casos también la parte aérea e incluso pueden crecer como endófitos (Guzmán-Guzmán *et al.*, 2019).

La alta capacidad de colonizar distintos ambientes, es debido a sus pocos requerimientos nutricionales y a la producción de gran variedad de enzimas hidrolíticas que permiten su crecimiento en presencia de materia orgánica. En general, son fáciles de aislar, de cultivar y de propagar en diversos sustratos. Su humedad y temperatura óptimas de crecimiento se encuentran en un rango de 25 a 30 °C (Atanasova, 2014). Sin embargo, se pueden adaptar y sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Atanasova, 2014).

Las especies de hongos del género *Trichoderma* se caracterizan por un crecimiento rápido en forma de micelio y una producción abundante de conidios, generalmente de color verde. Esta capacidad de esporular es beneficiosa cuando se producen estos microorganismos como bioinsumos ya que le dan al producto una mayor vida útil. Esto ocurre cuando los microorganismos crecen en cultivo en sustrato sólido ya que este sistema reproduce un entorno similar al de su hábitat natural, pero no es sencillo que esporulen en cultivos líquidos sumergidos (Stewart & Hill, 2014).

Este género está integrado por especies de importancia biotecnológica ya que, por ejemplo, producen enzimas hidrolíticas como polisacarasas, celulasas, xilanasas y quitinasas, las cuales se aplican en la industria de detergentes, papel, aceite de oliva, vino, cerveza, jugos, alimentos para animales y en la producción de biocombustibles (Lilliana Hoyos-Carvajal & Bissett, 2011). En el contexto agrícola este género es de gran relevancia ya que ciertas especies de *Trichoderma* tienen la capacidad de actuar como biofertilizantes y biopesticidas debido a que entre algunas de sus características como PGPM pueden sintetizar sideróforos, hormonas de crecimiento como auxinas y giberelinas (Lilliana Hoyos-Carvajal & Bissett, 2011), pueden producir diversos metabolitos secundarios dentro de los que se encuentran algunas toxinas y antibióticos, e incluso inducción del sistema de defensa del hospedante (Harman *et al.*, 2004; Kubicek *et al.*, 2011). Algunas especies son empleadas en la biorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos e inorgánicos, incluyendo metales pesados (Lilliana Hoyos-Carvajal & Bissett, 2011). Por otro lado, algunas especies de *Trichoderma* son patógenos oportunistas para las plantas y en humanos (en pacientes inmunocomprometidos) (Kredics *et al.*, 2018).

De manera general, el género *Trichoderma* se presenta como PGPM con la capacidad de participar en la resistencia a enfermedades, la mejora en el crecimiento de las plantas, y la resistencia al estrés ambiental (Jangir *et al.*, 2017; Bae *et al.*, 2009; Vinale *et al.*, 2008). En la mayoría de los casos, la resistencia a patógenos es independiente de las condiciones ambientales. No obstante, se ha

³⁴ Que se distribuye por todo o la mayor parte del mundo.

³⁵ *Trichoderma* no produce su propio alimento, sino que se nutren de otras fuentes de carbono orgánico.

documentado que el incremento en rendimiento ocurre mayormente cuando las plantas se encuentran en situaciones de estrés tales como escasas de nutrientes, elevada salinidad, elevadas temperaturas, entre otras (Stewart & Hill, 2014). *Trichoderma* se caracteriza por ejercer su acción de promoción del crecimiento en plantas mediante diversos mecanismos, los cuales se muestran en la Figura 1.13, habiendo un consenso general sobre el efecto sinérgico de varias acciones benéficas. La alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, hacen que el género *Trichoderma* esté biológicamente adaptado para una eficiente colonización de los sustratos y una alta supervivencia como saprófito, lo cual hace que se posicione como un excelente candidato para ser usado como bioinsumo agrícola.

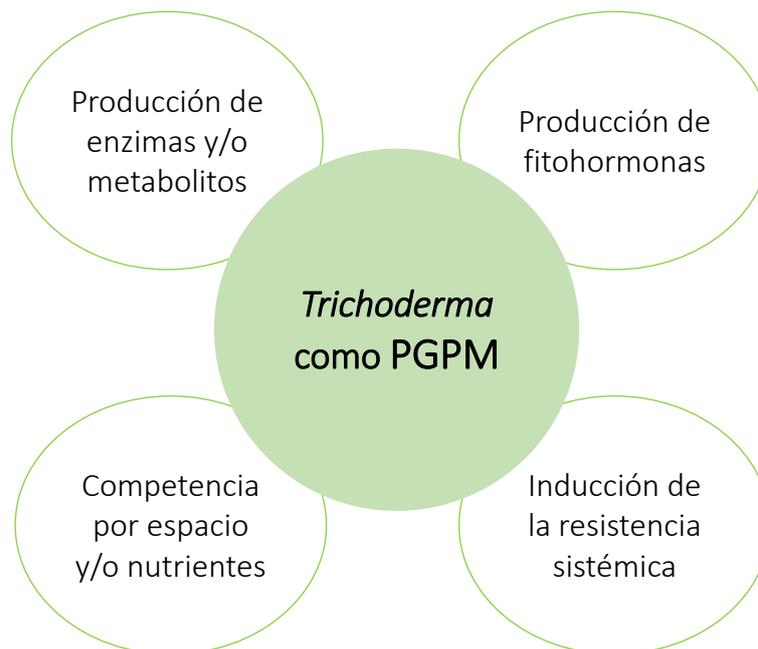


Figura 1.13. Características del género *Trichoderma* como biofertilizante y biopesticida.

A pesar de haber sido caracterizados muchos aislamientos del género *Trichoderma* como promotores del crecimiento vegetal ya sea por su efecto biofertilizante o biocontrolador (acción como PGPM), la estrategia de búsqueda de cepas nativas de una región y del cultivo en el cual se pretenden aplicar, que puedan ayudar a superar las dificultades de adaptación de especies foráneas en un nuevo entorno (aplicabilidad), hacen a la continuidad de los estudios de aislamiento y caracterización de organismos pertenecientes a este género de diferentes regiones y cultivos (Consolo *et al.*, 2012).

1.4.3.1 Efectos de su aplicación como PGPM y factores que limitan su acción

Diversas especies del género *Trichoderma* producen diferentes efectos positivos sobre las plantas después de ser inoculadas, gracias a su acción como PGPM mediante los mecanismos mencionados anteriormente. Entre los efectos que producen sobre las plantas se pueden mencionar los siguientes:

- ❖ aumenta la solubilidad de los nutrientes del suelo, mejorando la absorción de estos por las plantas (Cano, 2011)

- ❖ aumento de la formación de pelos radicales, ocasionando un aumento en el volumen de las raíces (Cano, 2011)
- ❖ disminución de enfermedades causadas por patógenos en la raíz y en hojas (Cano, 2011)
- ❖ incremento del rendimiento (Stewart & Hill, 2014)
- ❖ resistencia al estrés biótico y abiótico (Stewart & Hill, 2014)
- ❖ aumento del contenido de clorofila en las hojas (Stewart & Hill, 2014)

Algunos ejemplos de estos efectos sobre diferentes plantas se enumeran a continuación:

- incremento del porcentaje de germinación en maíz, frijoles, mostaza, soja, garbanzo, tomate (Kumar *et al.*, 2014). Muchos patógenos como *Pythium* no pueden atacar al hospedero debido a la mayor velocidad en la germinación y al vigor de las plántulas inoculadas (Shoresh *et al.*, 2010).
- modificación de la arquitectura del sistema radical que incluye una mayor biomasa de la raíz y un mayor desarrollo de pelos radicales en plantas de maíz (*Zea mays*) (Harman *et al.*, 2004).
- disminución de la severidad de la mancha de la hoja en trigo causada por *Zymoseptoria tritici* (Stocco *et al.*, 2016).
- aumento del rendimiento de híbridos de maíz por *T. harzianum* T22 que fueron mayores cuando la variedad de prueba presentó alguna debilidad genética o cuando había limitaciones bióticas (enfermedad) o abióticas (compactación del suelo, sequía, nutrientes) (Stewart & Hill, 2014).
- mejora de la resistencia de la planta contra fitopatógenos, como *Sclerotinia sclerotiorum*, efecto correlacionado con la producción de enzimas degradantes de la pared celular por la planta (Contreras-Cornejo *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2012).
- incremento de las variables diámetro (31,6 %) y altura (11,3 %), que son los índices más utilizados en viveros, de plantines de *Eucalyptus dunnii* inoculados con *T. harzianum* en sustrato, lo cual permitió comenzar las etapas de clasificación de plantines 3 semanas antes de lo estipulado y también disminuir la dosis de nitrógeno aplicadas (Rossi & Romero, 2010).
- aumento significativo del diámetro de cuello en híbridos de *Eucalipto grandis* en la fase rustificación inoculados con *Trichoderma* sp. (Bóffano Chebataroff & Mosqueira Campos, 2012).

Como se puede apreciar son numerosos los resultados positivos encontrados a nivel laboratorio o vivero en condiciones controladas. Un problema que se encuentra a menudo en la mayoría de los experimentos a campo con *Trichoderma* es la inconsistencia de la respuesta de las plantas a la inoculación, siendo entonces poco probable garantizar el éxito de la acción del microorganismo (Stewart & Hill, 2014). Esta falta de respuesta es atribuida generalmente a una ineficiente colonización, siendo necesario profundizar los estudios en relación a formulaciones que permitan una mayor viabilidad en el envase, la dosis de aplicación, así como el establecimiento, proliferación y supervivencia –características relacionadas con características propias del microorganismo y con la calidad de la formulación– después de su inoculación para así contribuir a la visibilidad de los efectos beneficiosos de las especies del género *Trichoderma*. Además de estas características que hacen a la calidad del bioinsumo, la respuesta de *Trichoderma* spp. también puede ser muy variable debido a otros factores limitantes que incluyen el tipo de cultivo y las condiciones de crecimiento (Figura 1.14) (Stewart & Hill, 2014). Además, si el producto tiene acción biofungicida, la acción del formulado

dependerá de los rasgos del patógeno, como su diversidad genética y su capacidad para evolucionar en respuesta a las presiones de selección (Bolívar-Anillo *et al.*, 2020).

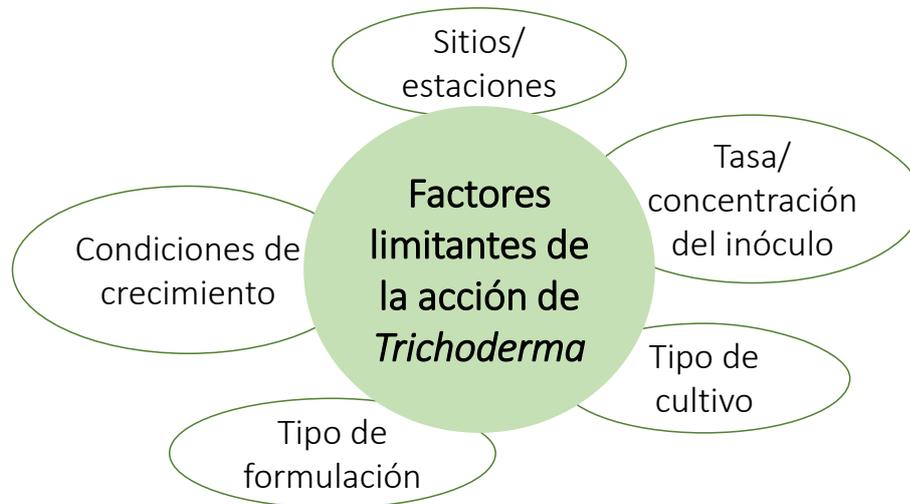


Figura 1.14. Factores limitantes de la acción de *Trichoderma* spp. en condiciones *in vivo*. Adaptada de Stewart & Hill (2014).

El desarrollo de formulados eficaces adquiere una gran importancia en el campo de los bioinsumos agrícolas ya que puede afectar profundamente al rendimiento del mismo. Uno de los mayores obstáculos para el uso y la comercialización reside en que el producto esté formulado adecuadamente. Esto implica que contenga una cantidad suficiente de inóculo y que la calidad de éste se mantenga durante el tiempo de almacenamiento. Por otra parte, debe ser de fácil aplicación, que muestre una alta persistencia en el medio en el que se va a dispersar y que su producción sea económicamente rentable (Fravel, 2005).

1.4.3.2 Bioinsumos comercializados a base de *Trichoderma* spp. para cultivos en general

Trichoderma representa más del 60% de los biofungicidas registrados en el mundo, y su mercado ha ido en aumento considerablemente en la última década. *Trichoderma* se produce en formulaciones sólidas y líquidas con inóculo viable (hifas, clamidosporas y conidios) (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). La mayoría de estos bioinsumos se preparan a base de las especies *T. viride*, *T. virens*, y en mayor proporción *T. harzianum* (Hernández-Melchor *et al.*, 2019; Vargas-hoyos & Gilchrist-ramelli, 2015).

Tal como se dijo en la sección anterior, la aplicación de *Trichoderma*, éste debe ser preparado en formulaciones de fácil aplicación, almacenamiento, comercialización y aplicación en campo. Algunas formulaciones comerciales de este microorganismo corresponden a talcos, vermiculita-salvado de trigo, cáscara de café, aceite vegetal o mineral, entre otros (Kumar *et al.*, 2014). En la Tabla 1.2, se muestran algunos ejemplos de productos comerciales procedentes de diferentes países, y en la Tabla 1.3 se muestran bioinsumos en base a *Trichoderma* comercializados en Argentina.

Tabla 1.2. Productos de *Trichoderma* comercializados en diferentes países. Adaptado de Stewart & Hill (2014).

Producto comercial	Cepas	Cultivo	Acción	Empresa
T22 Planter Box™ T22 HC™		Maíz, papa, frijol, algodón, soja	<ul style="list-style-type: none"> Disminución de enfermedades del suelo ocasionadas por patógenos de raíces. 	BioWorks Inc. - NY, EEUU
Trianum P™	<i>T. harzianum</i> T22	Hortalizas, frutos rojos, hierbas, ornamentales, plantas perennes, césped y arboricultura	<ul style="list-style-type: none"> Mayor desarrollo de la planta (raíces, parte aérea, rendimiento). Mejora la absorción de nutrientes. Mayor tolerancia al estrés. 	Koppert BV - Berkel, Rodenrijs, Países Bajos
Tricho-Shield™	<i>T. harzianum</i> , <i>T. lignorum</i> y <i>T. koningii</i>	Todo tipo de cultivos	<ul style="list-style-type: none"> Promoción del crecimiento de las plantas asociado con los metabolitos. Protección de las plantas frente a patógenos. 	NTS, Nutri Tech Solutions, Yandina, Australia
Plantmate Drench	<i>T. harzianum</i>	Todo tipo de cultivos	<ul style="list-style-type: none"> El aumento de la bioactividad produce un vigoroso crecimiento de las raíces, al tiempo que mejora la salud general de la planta. 	Agrimm Technologies Ltd, Nueva Zelanda
Trichostart	<i>T. atroviride</i>	Todo tipo de semillas	<ul style="list-style-type: none"> Germinación mejorada. Establecimiento más rápido. Sistemas de raíces más grandes. Mayor peso seco. 	

Tabla 1.3. Productos comerciales a base de *Trichoderma* spp. en Argentina. Adaptado de Amerio *et al.* (2020).

Nombre comercial	Principio activo	Función	Lugar	Empresa
Cero Pestes Cultivo	<i>T. viride</i>	Fungicida	C.A.B.A	Sanipro
Minitric	<i>T. harzianum</i>	Biocontrolador, biofertilizante y bioestimulante	C.A.B.A	La Juana Grow Shop
Rizoderma*	<i>T. harzianum</i>	Biofungicida de semillas	Pergamino, Bs.As.	Rizobacter
Tratbac	<i>T. harzianum</i>	Fertilizante y bioestimulante	Ramos Mejía, Bs. As.	Bea Tecno Bio S.A.
<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma</i> sp.	Larvicida y fungicida	Ramos Mejía, Bs. As.	Ecomambo
<i>Trichoderma</i>	<i>T. harzianum</i>	Fungicida	Olivos, Bs.As	Olivos Grow Shop
<i>Trichovidas</i> *	<i>T. harzianum</i>	Biocontrolador y biofertilizante	Santa Fe	Microvida SA
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>T. viride</i>	Fungicida	Tucumán	Lab. San Pablo
<i>Trichoderma</i> Tifi	<i>T. atroviride</i>	Fungicida	Recoleta, Bs.As	How High Grow Shop
Trichofull	<i>Trichoderma</i> sp.	Fertilizante y bioestimulante	C.A.B.A	Brometan

*Producto comercial inscripto y aprobado por SENASA.

Como lo muestran los datos que se presentan en las tablas anteriores, existe una amplia variedad de productos de *Trichoderma* en el mercado mundial. Algunos de estos productos han sido bien investigados y respaldados por datos experimentales a campo, mientras que otros tienen datos técnicos mínimos. La producción y comercialización de bioinsumos no registrados en SENASA lleva a la utilización de productos de baja calidad que no reproducen los efectos beneficiosos de los microorganismos y que, a largo plazo, conducen a la falta de credibilidad de los productores agrícolas en estas herramientas biotecnológicas (Amerio *et al.*, 2020). Esto, sumado a la falta de investigación sobre cultivos específicos y la menor eficacia relativa en comparación con pesticidas convencionales deriva en una adopción limitada de *Trichoderma* como PGPM en cultivos agrícolas.

1.4.3.3 Bioinsumos a base de *Trichoderma* spp. para yerba mate

Del análisis de los párrafos anteriores se puede ver que existe una amplia evidencia de la acción del género *Trichoderma*, como PGPM en una variedad de cultivos cuando son inoculadas en sistemas agrícolas convencionales tanto para cultivos extensivos como intensivos, pero a nuestro entender su aplicación específica a cultivos de yerba mate aún no se ha estudiado y no se han reportado investigaciones que avalen esta práctica.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

En este trabajo de Tesis Doctoral se postula que la rizósfera de yerba mate alberga microorganismos endófitos del género *Trichoderma* que poseen capacidades de promoción del crecimiento vegetal *in vitro*, y que pueden ejercer una acción tanto biofertilizante como biocontroladora de hongos fitopatógenos del cultivo, mejorando la salud y el desarrollo de las plantas.

Objetivo general y específicos

Teniendo en cuenta la hipótesis propuesta y las apreciaciones mencionadas en este capítulo, el objetivo general fue aislar, seleccionar e identificar no sólo especies de hongos del género *Trichoderma* nativas de yerba mate de la región de Misiones sino también especies de hongos patógenos provenientes de plantas enfermas de las mismas parcelas, para caracterizarlas en relación a sus propiedades como PGPM y en relación al desarrollo de enfermedades, respectivamente, en yerba mate.

Los objetivos específicos fueron:

1. Aislar, seleccionar (*screening* primario) e identificar –taxonómica y filogenéticamente– microorganismos pertenecientes al género *Trichoderma* de rizósfera de yerba mate.
2. Aislar, identificar –taxonómica y filogenéticamente– y seleccionar hongos patógenos de hoja de yerba mate.
3. Evaluar las características como PGPM *in vitro* de los aislamientos de *Trichoderma* de rizósfera de yerba mate en condiciones de vivero y seleccionar aquellos aislamientos con mejores características.
4. Obtener un formulado a base de los aislamientos de *Trichoderma* seleccionados y evaluar la calidad del producto final.
5. Evaluar la efectividad como PGPM *in vivo* de los aislamientos de *Trichoderma* seleccionados en plantas de yerba mate en etapa de crecimiento temprano en vivero.

CAPITULO 2

Selección e identificación de especies del género *Trichoderma* aisladas de la rizósfera de yerba mate

CAPITULO 2: Selección e identificación de especies del género *Trichoderma* aisladas de la rizósfera de yerba mate

2.1 RESUMEN

Ilex paraguariensis St. Hil. (yerba mate) es un cultivo regional económicamente muy importante en la provincia de Misiones, Argentina. En los últimos años, el acelerado proceso de degradación del suelo –debido a las prácticas agrícolas inadecuadas– ha llevado a la necesidad de investigación y desarrollo de prácticas sustentables. Tecnologías basadas en la minimización del uso de productos químicos de síntesis, la utilización de microorganismos benéficos y prácticas de manejo de cultivo adecuadas, permitirán lograr producciones sanas, sin impactos negativos sobre el medio ambiente. Las características de las especies del género *Trichoderma* como PGPM hacen de este microorganismo un candidato potencial para ser utilizado como bioinsumo microbiano en el cultivo de yerba mate. Teniendo en cuenta la ventaja adaptativa que tiene el uso de microorganismos nativos y la ventaja ecológica de los microorganismos endófitos, en el presente capítulo se describen los ensayos que nos permitieron aislar microorganismos fúngicos a partir de raíces desinfectadas de yerba mate, seleccionar (*screening* primario) aquellos que presentaron características macroscópicas similares a *Trichoderma* e identificarlos mediante caracterización morfológica y molecular empleando dos marcadores moleculares. Para la identificación morfológica se describieron las características macro y microscópicas del aislamiento crecido en PDA. Estas características fueron comparadas con las que se encuentran disponibles en bibliografía y se realizó una identificación preliminar de los aislamientos. Para la identificación molecular, se realizó la extracción de ADN y la amplificación del mismo por PCR con el par de cebadores ITS y *tef*. Los productos de PCR secuenciados y editados se utilizaron para realizar la búsqueda de secuencias homólogas con la herramienta BLAST del NCBI para determinar la identidad de los aislamientos. Se realizó un análisis filogenético para validar la identificación de los aislamientos o identificar aquellos que no se pudieron identificar en la búsqueda con BLAST. El análisis de los resultados presentados en este capítulo nos permitió concluir que se obtuvieron 14 aislamientos los cuales presentaron carácter endofítico y se identificaron mediante morfología como pertenecientes al género *Trichoderma*. Mediante la caracterización morfológica y molecular se obtuvo un diagnóstico de identidad confiable, que permitió identificar 13 de estos aislamientos a nivel de especie: 7 aislamientos fueron identificados como *T. asperelloides*, 3 como *T. strigosellum*, 2 como *T. asperellum* y 1 como *T. hamatum*. En este trabajo de tesis logramos ampliar el conocimiento sobre la diversidad de especies de *Trichoderma* presentes en la rizósfera de yerba mate.

2.2 INTRODUCCIÓN

2.1.1 Carácter endofítico de los microorganismos

Las plantas proporcionan el hábitat para gran cantidad de microorganismos, los cuales pueden colonizar su superficie (epífitos), así como también el interior de los órganos de la planta y comportarse como endófitos (Schulz & Boyle, 2006). Se han encontrado tanto hongos como bacterias endófitas en casi todas las especies de plantas herbáceas o leñosas estudiadas y de casi todos los órganos vegetales (Pérez *et al.*, 2016). Los microorganismos endófitos pueden definirse como aquellos que viven en asociación con las plantas durante la mayoría o parte de su vida sin causar enfermedad, y pueden distinguirse de otros microorganismos asociados a las plantas teniendo en cuenta que se pueden recuperar de material vegetal desinfectado superficialmente (Hardoim *et al.*, 2015; Pérez *et al.*, 2016). Estos microorganismos pueden ingresar a la planta –mediante la producción de enzimas que degradan la pared celular tal como pectinasas, celulasas, amilasas, entre otras– por el sistema de raíces, por estomas o bien por heridas y permanecer allí colonizando la endorizósfera o pueden colonizar tallos, hojas, flores y frutos (Pérez, 2016). El nicho endofítico constituye un ambiente protegido en comparación con el suelo, confiriendo una ventaja ecológica a los microorganismos capaces de colonizarlo debido a que no compiten por los nutrientes con la gran diversidad de microorganismos que viven en el rizoplaneo/ectorizósfera/suelo y están protegidos de los cambios ambientales (Hardoim *et al.*, 2015). En relación a la reacción de las plantas frente a estos colonizadores, se han encontrado diversos genes (cuyas funciones no se conocen en su totalidad) que son diferencialmente expresados durante la asociación planta–endófito, e indican que los pasos iniciales de la colonización de los endófitos son activamente monitoreados y, seguramente, propiciados o no por la planta hospedera según registre a los microorganismos como benéficos o patógenos (Hardoim *et al.*, 2015). Los endófitos en su mayoría derivan de la ectorizósfera y se ha informado que la comunidad endofítica vive en estrecha relación con la planta hospedera, y que influye sobre sus procesos fisiológicos y la interacción con otros organismos. De esta manera, los cambios en la composición y diversidad de endófitos pueden afectar el crecimiento y desarrollo de las plantas (Compant *et al.*, 2010; Hardoim *et al.*, 2015). Debido a esto, en las últimas décadas se ha puesto énfasis en explorar estos reservorios de agentes biológicos y profundizar en su diversidad y en sus funciones tanto en plantas crecidas en forma natural como en cultivos agrícolas bajo diferentes condiciones agroecológicas (Bamisile *et al.*, 2018).

2.1.2 *Trichoderma* como colonizador endofítico y promotor del crecimiento vegetal

Una cantidad creciente de investigaciones muestran que *Trichoderma* puede interactuar como endófito con diversas plantas tal como maíz, pepino, algodón, tomate, entre otras (Jangir *et al.*, 2017). En la Tabla 2.1, se muestran especies de *Trichoderma* descritas como endófitos en diferentes cultivos.

Tabla 2.1. Especies de *Trichoderma* descritas como endófitos de diferentes cultivos.

Especie	Cultivo	Referencia
<i>T. aggressivum</i>		
<i>T. amazonicum</i>		
<i>T. catoptron</i>		
<i>T. harzianum</i>	Árbol de caucho	Chaverri <i>et al.</i> (2011)
<i>T. pleuroticola</i>		
<i>T. pleuroti</i>		
<i>T. virens</i>		
<i>T. asperellum</i>		
<i>T. brevicompactum</i>	Banana	Xia <i>et al.</i> (2016)
<i>T. koningiopsis</i>		
<i>T. virens</i>		
<i>T. martiale</i> sp. nov.*		Hanada <i>et al.</i> (2008)
<i>T. ovalisporum</i>		
<i>T. caribbaeum</i> var.		
<i>T. aequatoriale</i> sp. nov.*		
<i>T. koningiopsis</i>	Cacao	Samuels <i>et al.</i> (2006)
<i>T. harzianum</i>		
<i>T. theobromicola</i>		
<i>T. paucisporum</i>		
<i>T. hamatum</i>		Bae <i>et al.</i> (2009)
<i>T. aethiopicum</i> sp. nov.*		Samuels <i>et al.</i> (2012)
<i>T. flagellatum</i> sp. nov.*	Café	
<i>T. flagellatum</i>		Mulaw <i>et al.</i> (2013)
<i>T. hamatum</i>		
<i>T. asperelloides</i>		
<i>T. asperellum</i>		
<i>T. harzianum</i>	Raíces de plantas nativas	Cummings <i>et al.</i> (2016)
<i>T. reesei</i>	de Borneo,	
<i>T. strigosum</i>	Malasia	
<i>T. virens</i>		
<i>Trichoderma</i> sp.		

*sp. nov.: especie nueva.

En esta interacción, se ha descrito que las hifas de *Trichoderma* invaden la epidermis de la raíz y penetran en la primera y segunda capa de células de la epidermis del tejido radical y colonizan los espacios intercelulares de la endorizósfera, previa competición por nutrientes y espacio con otros microorganismos (Figura 2.1) (Yedidia *et al.*, 1999; Ramírez-Valdespino *et al.*, 2019). Esta acción de “abrirse paso” hacia el interior de la raíz es posible gracias a la acción de las enzimas degradadoras de la pared celular (CWDE)¹, al igual que lo hacen otros microorganismos con carácter endofítico (Gao *et al.*, 2010).

¹ CWDE: del inglés, *Cell Wall Degrading Enzymes*.

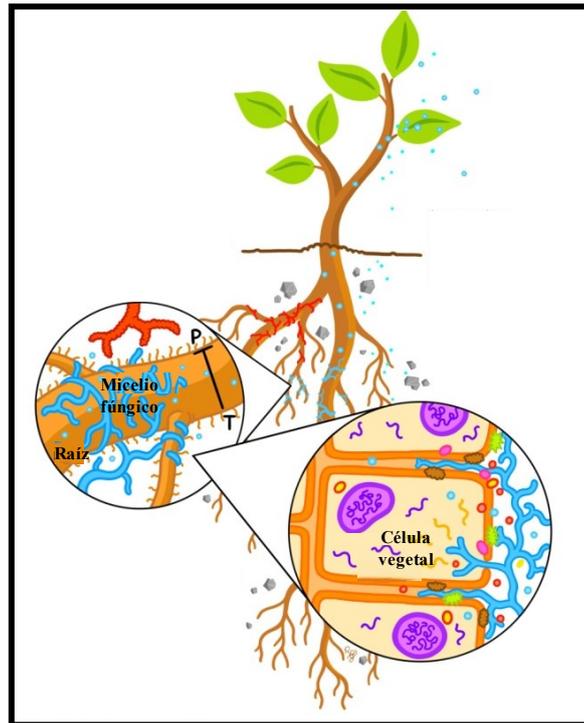


Figura 2.1. Imagen representativa de *Trichoderma* ingresando a las raíces de las plantas. Adaptada de Ramírez-Valdespino *et al.* (2019).

Tal como se describió en el Capítulo 1, existen escasos reportes acerca de aislamiento de endófitos fúngicos (entre ellos *Trichoderma* spp.) asociados a yerba mate. Además, los estudios reportados se limitan al estudio de endófitos presentes en la hoja del cultivo y no profundizan en el análisis de identificación a nivel de especie de los aislamientos, ni de los beneficios de estos microorganismos para la planta de yerba mate.

2.1.3 Identificación de aislamientos fúngicos como especies del género *Trichoderma*

2.1.3.1 A través de la descripción de aspectos morfofisiológicos

La identificación del género *Trichoderma*, al igual que para otros géneros fúngicos, se puede realizar mediante observación de las características morfológicas y compararlas con las descripciones disponibles en la bibliografía (Hoyos-Carvajal & Bissett, 2011). Entre las características macroscópicas se tiene en cuenta el desarrollo de la colonia en determinados medios nutritivos, donde se evalúa la velocidad de crecimiento de la colonia, el color anverso y reverso, aspecto de la colonia o forma y tipo de micelio (micelio aéreo, polvoso, entre otros), olor característico, producción de pigmento, entre otros caracteres (Jangir *et al.*, 2017). Por lo general, para la descripción de estas características, el aislamiento fúngico se hace crecer en el medio agar papa dextrosa, comúnmente llamado PDA² (Piontelli, 2011) (Figura 2.2.A).

² De las siglas en inglés de *Potato Dextrose Agar*.

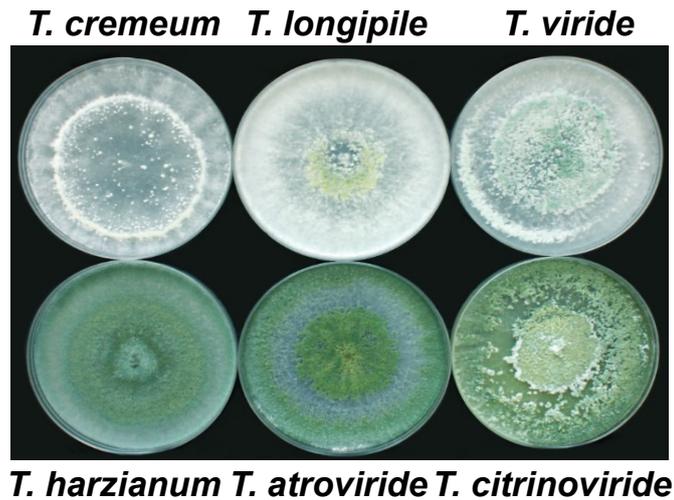


Figura 2.2. Características morfológicas de las colonias de *Trichoderma* spp. en PDA. Adaptada de Błaszczuk *et al.* (2014).

Las especies de este género presentan las siguientes características morfofisiológicas (Jangir *et al.*, 2017):

- los rangos de crecimiento son entre 25-30 °C; la mayoría de las especies no crece a 35 °C, pero algunas de la sección *Longibrachiatum* lo hacen a 40 °C.
- colonias en el anverso son de color inicialmente blancas, que se tornan a color verdoso-amarillo o color marrón luego de desarrollo a 25-30 °C durante 4-7 días en presencia de luz. Esta coloración se debe a la producción de conidios y conidióforos, los cuales suelen estar compactos o formando pústulas, las cuales conducen a formar anillos concéntricos o se observa escaso micelio aéreo.
- el color reverso de las colonias suele observarse de color pálido o bronceado, y en algunos casos, color amarillento o rojo debido a la liberación de pigmento difusible en el agar.
- algunas especies, como *T. viride*, producen olor semejante a coco.

En cuanto a la caracterización microscópica del género *Trichoderma*, se realiza mediante la visualización de preparados generalmente por microscopía de campo claro. A continuación, se mencionan las características microscópicas del género *Trichoderma*, según Jangir *et al.* (2017):

- hifas vegetativas septadas, hialinas y de paredes lisas, con **conidióforos altamente ramificados**, parecidos a un árbol. Por lo general, las ramas laterales que emergen de la rama central están en aproximadamente 90°, observándose una estructura piramidal formada por ramas apareadas.
- las células conidiógenas, denominadas **fiálides**, suelen estar hinchadas en el centro formando una forma de matraz o pueden ser cilíndricas o subglobosas. Pueden presentarse en racimos densamente compactos o solitarias sobre el conidióforo (Figura 2.3.A).
- los conidios pueden tener forma elipsoidal, ovoidal a cilíndricos y globosos. Pueden presentar una superficie lisa, finamente rugosa o con depósitos en su pared. Además, pueden tener diversas coloraciones, desde incoloras o incluso grises o marrones hasta diferentes tonalidades de verde (Figura 2.3.B).

- Algunas especies presentan clamidosporas³ (Samuels *et al.*, 2006); generalmente, se presentan como estructuras unicelulares, globosas, terminales o intercalares en las hifas, incoloras, de color amarillo pálido o verdes (Figura 2.3.C).

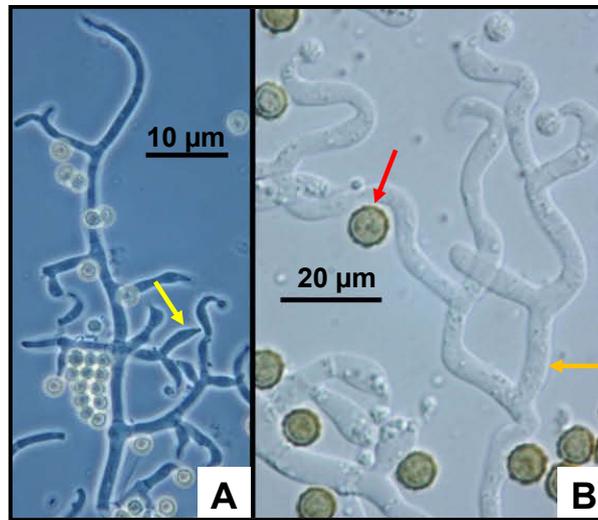


Figura 2.3. Imágenes representativas de estructuras microscópicas de *T. martiale*. **A.** Flecha amarilla: fiálide. **B.** Flecha roja: conidio y flecha naranja: conidióforo. Adaptada de Hanada *et al.* (2008).

Una vez que un aislamiento se reconoce como perteneciente al género *Trichoderma*, para identificar la especie se observan algunos caracteres diferenciales que presentan mayor variabilidad: disposición o tipo de ramificación de los conidióforos, tamaño, color y forma de los conidios, forma de las fiálides y presencia o no de clamidosporas. Las bases de la taxonomía morfológica de *Trichoderma* fueron establecidas por Rifai en 1969, realizando el primer agrupamiento en nueve “especies agregadas” o grupos de especies: *T. piluliferum* Rifai, *T. polysporum* Rifai, *T. hamatum* Bain, *T. koningii* Rifai, *T. aureoviride* Rifai, *T. harzianum* Rifai, *T. longibrachiatum* Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai y *T. viride* (Jangir *et al.*, 2017). En 1991, Bissett clasificó a los grupos reconociendo 5 secciones de *Trichoderma*: *Hypocreanum*, *Pachybasium*, *Trichoderma*, *Longibrachiatum* y *Saturnisporum* (Figura 2.4). Esta clasificación se mantiene aún hoy como referencia para describir la morfología de *Trichoderma* y, a medida que se van descubriendo nuevas especies, se van agregando a cada sección, como *T. asperellum* incluida dentro de la sección *Trichoderma* (Piontelli, 2011; Samuels *et al.*, 1999).

³ Las clamidosporas toleran condiciones ambientales adversas, son estructuras de resistencia y permiten que el hongo pueda perdurar a través del tiempo.

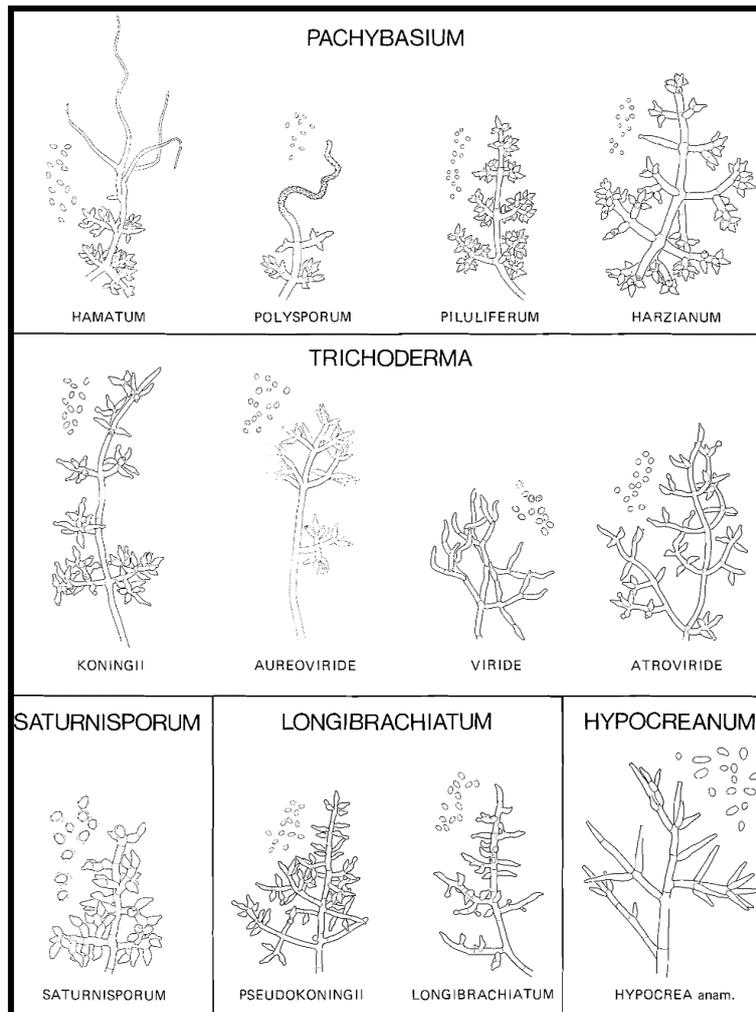


Figura 2.4. Ilustración de las secciones de *Trichoderma* reconocidas por Bisset (1991). Adaptada de Bissett (1991).

Debido a la gran similitud morfológica de las diversas especies del género *Trichoderma* es compleja la identificación de especies teniendo en cuenta solamente la morfología (Jangir *et al.*, 2017). Actualmente, los métodos moleculares son las nuevas herramientas para la clasificación de las especies de este género basándose principalmente mediante el uso de marcadores moleculares (Dou *et al.*, 2020).

2.1.3.2 A través de marcadores moleculares

Los métodos utilizados para la identificación de *Trichoderma* han evolucionado de métodos basados en caracteres fenotípicos a métodos basados en ADN complementados por observación fenotípica (Raja *et al.*, 2017).

En la Figura 2.5, se muestra un protocolo simplificado con los criterios utilizados para la identificación molecular de aislamientos fúngicos potencialmente pertenecientes al género *Trichoderma*. Tal como se mencionó en el Capítulo 1, es posible identificar al género *Trichoderma* utilizando el marcador molecular ITS y para lograr identificar las especies debe utilizarse, además de ITS, y otro marcador molecular tal como *tef* y/o *rpb2*, cuyas secuencias están bien documentadas en la base de datos de especies de *Trichoderma* (Dou *et al.*, 2020).

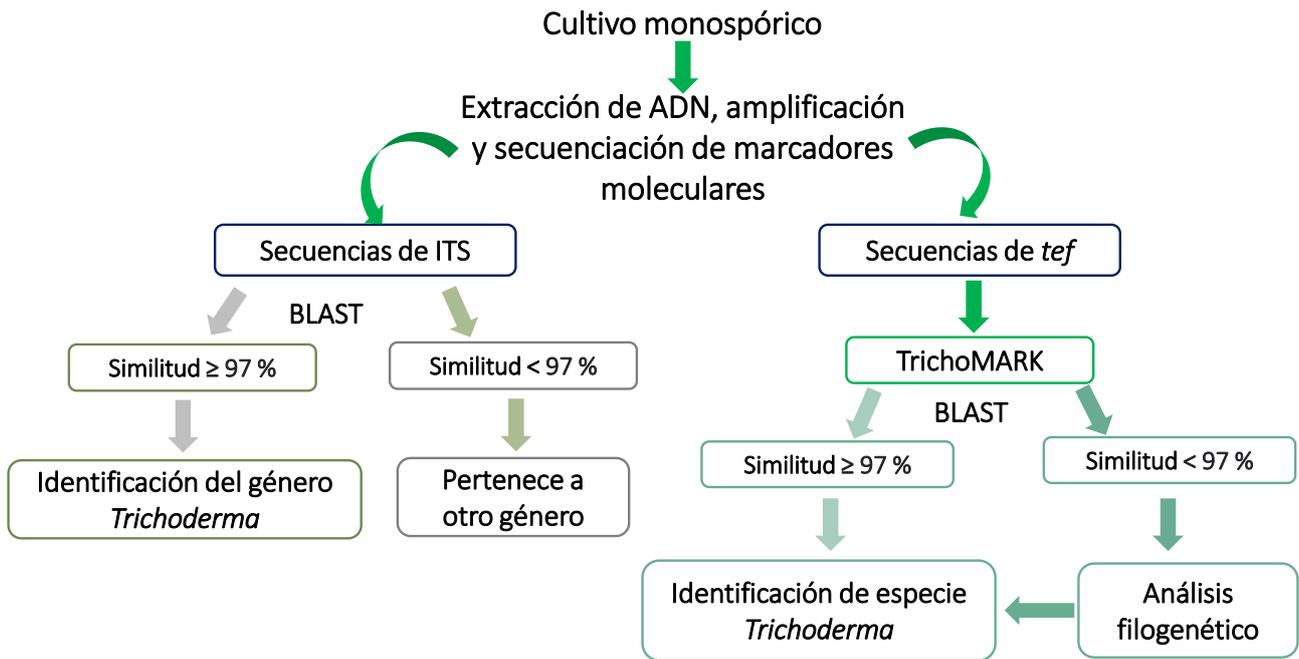


Figura 2.5. Representación gráfica del protocolo de identificación molecular de aislamientos potencialmente pertenecientes a género y especie de *Trichoderma*. Los criterios para identificar género o especie de *Trichoderma* son: $\geq 97\%$ de similitud⁴, $\geq 80\%$ de cobertura⁵ y valor esperado⁶ $< 1 \times 10^{-6}$ (Dou *et al.*, 2018) entre la secuencia consulta y la obtenida de la búsqueda.

Para mejorar la búsqueda de secuencias homólogas, se sugiere la utilización de la herramienta [TrichoMARK](#), que detecta las regiones de cebadores, intrones y exones de las secuencias de *tef* y *rpb2*. En el caso de las secuencias de referencia⁷ de *tef*, se recuperan los intrones 4 y 5 (Figura 2.6). Este diagnóstico de secuencia pre-BLAST mejora sustancialmente la búsqueda de similitud posterior (Druzhinina *et al.*, 2006), debido a la variabilidad específica de la secuencia de los intrones entre las diferentes especies de *Trichoderma*, permitiendo obtener mayores porcentajes de similitud con las secuencias de referencia.

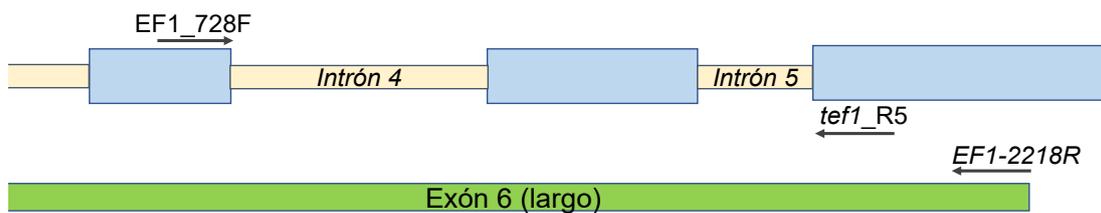


Figura 2.6. Esquema de la estructura del gen *tef*. Las regiones con variabilidad específica se encuentran en el intrón largo (*tef* 4), el intrón corto (*tef* 5) y el exón (*tef* 6)⁸. Adaptada de Druzhinina & Kubicek (2005).

⁴ Porcentaje de identidad entre la secuencia consulta y la secuencia de referencia.

⁵ El porcentaje de cobertura es el porcentaje que cubre la alineación con la secuencia de referencia.

⁶ El e-valor es el número de alineamientos que esperamos para un score X en la búsqueda que estamos realizando si la base de datos fuese una colección de letras al azar.

⁷ Una secuencia biológica (generalmente, ADN) que se depositó en una base de datos pública autorizada como material para un taxón determinado (Cai & Druzhinina, 2021).

⁸ La región del intrón 4 posee entre 250-300 nucleótidos (nt) y del intrón 5 tiene entre 60-100 nt.

Tal como se mencionó en el Capítulo 1 es necesario realizar un análisis filogenético para identificar un aislamiento que no pudo identificarse mediante la búsqueda de secuencias homólogas y/o para validar la especie asignada. Como resultado del análisis filogenético se obtiene un árbol filogenético consenso (Patwardhan *et al.*, 2014), el cual se considera como un “árbol promedio”, ya que sólo se mantienen aquellos agrupamientos que se repiten un cierto número de veces representados por el *bootstrap*⁹. En general, se considera que un nodo es fiable si su valor de *bootstrap* es superior al 50 % (Holmes, 2003), siendo mejores los valores próximos a 100 %. En la Figura 2.7, se muestra una representación de un árbol filogenético y sus partes.

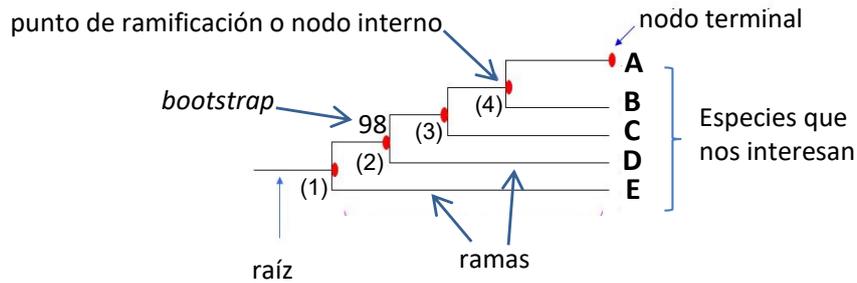


Figura 2.7. Imagen representativa de un árbol filogenético y sus partes.

Cada punto de ramificación presenta un evento de **divergencia** o separación de un grupo en dos grupos descendientes. El nodo interno más alejado de la raíz, corresponde al ancestro común más reciente, y el nodo más cercano a la raíz es el ancestro común menos reciente de los grupos descendientes de las especies que nos interesan. Las especies que coinciden en su ancestro común más reciente están más relacionadas entre sí, y están menos relacionadas con aquellas con las que tienen un ancestro común menos reciente. Para el caso de la Figura 2.7, A y B están más relacionadas entre sí (nodo 4) que con la especie E (ancestro común menos reciente). En conclusión, un árbol va a separar mejor los taxones, cuantos más nodos tenga.

2.1.4 Biodiversidad de *Trichoderma*

El uso de herramientas moleculares para la identificación de especies ha aumentado drásticamente el número de especies de *Trichoderma* y ha revelado que algunas de estas son cosmopolitas y que otras parecen ocupar nichos ecológicos limitados (Atanasova, 2014). La presencia de especies de *Trichoderma* en un ambiente depende de varios factores como el clima, disponibilidad de sustrato, asociaciones de rizósfera, química del suelo, interacciones ecológicas, entre otros (Hoyos-Carvajal & Bissett, 2011). Samuels & Ismaiel (2009) lograron identificar 8 especies diferentes de *Trichoderma* de un estudio de biodiversidad realizado en Ecuador, Colombia, Puerto Rico, Costa Rica y Perú. Hoyos-Carvajal *et al.* (2009) obtuvieron 182 aislamientos de *Trichoderma* de las regiones neotrópicas de América¹⁰, de los cuales fueron identificadas 19 especies y, 11 especies que aún no fueron descritas.

⁹ Proporciona la cantidad de veces que se formó un nodo en N réplicas del árbol. El valor obtenido (en porcentaje) es el valor de *bootstrap* para ese nodo.

¹⁰ Estas especies fueron aisladas de suelos de la selva tropical y otras áreas específicas de Brasil, Perú, México, Panamá, Ecuador, Guatemala y Colombia.

En la Tabla 2.1, se muestran algunos estudios de biodiversidad realizados por grupos de investigadores en diferentes partes del mundo.

Tabla 2.1. Biodiversidad de *Trichoderma* spp.

Especie	Material de aislamiento	N° de aislamientos/ Lugar de aislamiento	Referencia
<i>T. aggressivum</i> (35)			
<i>T. atroviride</i> (20)			
<i>T. harzianum</i> (43)			
<i>T. citrinoviride</i> (11)			
<i>T. gamsii</i> (2)	Granos de maíz		
<i>T. hamatum</i> (9)	Suelo forestal		
<i>T. koningii</i> (17)	Compost de hongos	170 aislamientos/ 49 localidades diferentes de Polonia	Błaszczuk <i>et al.</i> (2011)
<i>T. koningiopsis</i> (1)	Bosque forestal		
<i>T. longibrachiatum</i> (4)	Compost de hongos		
<i>T. polysporum</i> (1)	Rizósfera de centeno		
<i>T. tomentosum</i> (1)	Suelo de jardín		
<i>T. virens</i> (6)	Compost		
<i>T. viride</i> (7)			
<i>T. viridescens</i> (13)			
<i>Trichoderma</i> sp. (60)			
<i>T. harzianum</i> (20)	Suelos de cultivo de arroz, soja y maíz	33 aislamientos/ 4 localidades de Bs. As., Argentina	Consolo <i>et al.</i> (2012)
<i>T. koningii</i> (2)			
<i>T. virens</i> (11)			
<i>H. parapilulifera</i> (2)			
<i>T. atroviride</i> (3)			
<i>T. citrinoviride</i> (3)			
<i>T. hamatum</i> (3)			
<i>T. harzianum</i> (6)		123 aislamientos/ Diferentes localidades de Noruega	Hageskal <i>et al.</i> (2008)
<i>T. koningii</i> (4)	Agua potable		
<i>T. cf. minutisporum</i> (1)			
<i>T. polysporum</i> (3)			
<i>T. virens</i> (1)			
<i>T. viride</i> (43)			
<i>T. viridescens</i> (18)			
<i>T. asperellum</i> (3)			
<i>T. asperelloides</i> (3)			
<i>T. cf. harzianum</i> (41)			
<i>T. cf. stilbohypoxyli</i>			
<i>T. cf. rogersonii</i>			
<i>T. epimyces</i>			
<i>T. hamatum</i>		107 aislamientos/ Diferentes regiones de bosques de Amazonia Colombiana	López-Quintero <i>et al.</i> (2013)
<i>T. harzianum</i> s.s. (2)	Raíces y hojas de árboles		
<i>T. inhamatum</i> (1)			
<i>T. koningiopsis</i>			
<i>T. spirale</i>			
<i>T. strigosum</i> (7)			
<i>T. strigosellum</i> sp. nov.			
<i>T. virens</i> (6)			
<i>Trichoderma</i> sp.			
<i>T. asperellum</i>			
<i>T. atroviride</i>			
<i>T. oblongisporum</i>			
<i>T. ghanense</i>		75 aislamientos/ Rusia- Norte de India-Nepal	Kullnig <i>et al.</i> (2000)
<i>T. hamatum</i>	Suelo		
<i>T. harzianum</i>			
<i>T. virens</i>			
<i>Trichoderma</i> sp.			

T. harzianum demostró ser el taxón más frecuente y genéticamente diverso (Kredics *et al.*, 2014). Sin embargo, Hoyos-Carvajal *et al.* (2009) en su estudio de biodiversidad en América del sur y América central, encontraron que las especies del complejo *T. asperellum* fueron las más comunes entre las especies aisladas. Samuels *et al.* (2010) logró definir una nueva especie a la que llamó *T. asperelloides* muy cercana a *T. asperellum*.

Teniendo en cuenta las características como PGPM descritas para las especies del género *Trichoderma* y considerando las ventajas del endofitismo, es que resulta de gran interés realizar investigaciones orientadas a **la obtención e identificación de aislamientos del género *Trichoderma* nativos de la rizósfera de plantas de yerba mate de la región misionera que posean carácter endofítico.** En este capítulo se detallan las tareas realizadas, los resultados obtenidos y su análisis para el cumplimiento de dicho objetivo.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Recolección del material vegetal

Se recolectaron 10 plantas de yerba mate sanas de un año de crecimiento, sin daños o signos visibles de alguna patología, tomadas al azar del borde, centro y extremos del invernadero. Las plantas se encontraban en tubetes de 160 ml con 110 g de sustrato compuesto por tierra de monte: cáscara de pino: compost (1:1:1) (Figura 2.8.A), y fueron llevadas al Instituto de Biotecnología de Misiones (InBioMis) para su procesamiento. La recolección se llevó a cabo en el vivero propiedad de la Fundación Alberto Roth (Figura 2.8.B) de la ciudad de Santo Pipó, Misiones; ubicado a 87 kilómetros de Posadas, ciudad capital de la provincia de Misiones, donde se encuentra el InBioMis, en el cual se llevaron a cabo los ensayos de laboratorio.

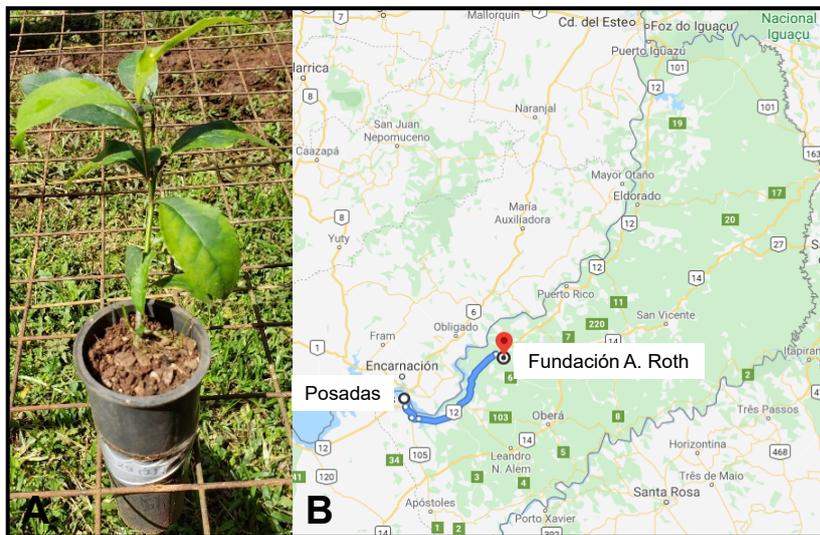


Figura 2.8. Planta de yerba mate de un año. B. Ubicación geográfica de la Fundación Alberto Roth (Coordenadas 27°08'24"S 55°24'31"O). Fuente: Google Maps.

2.3.2 Aislamiento de hongos asociados a la raíz de yerba mate y selección con enfoque en el género *Trichoderma*

El procedimiento que se detallará a continuación fue realizado para cada muestra por separado. Las plantas recolectadas se sacaron de los tubetes y las raíces fueron descubiertas tratando de evitar su alteración. Para ello, se extrajo la mayor cantidad de tierra de las raíces, agitándolas y eliminando las grandes partes de tierra con la mano. La tierra que quedó adherida se eliminó sumergiendo las raíces en vasos de 200 ml con agua corriente. Se tomaron 20 a 30 porciones de diferentes tamaños (entre 4 y 7 cm) de raíces secundarias de la raíz limpia y se desinfectaron de acuerdo al protocolo propuesto por Cummings *et al.* (2016), con modificaciones (Figura 2.9). El control del proceso de desinfección consistió en apoyar los tejidos desinfectados sobre placas con agar-agua al 2 % (p/v), se retiraron los tejidos y se incubaron durante 36-48 h a 28 °C.

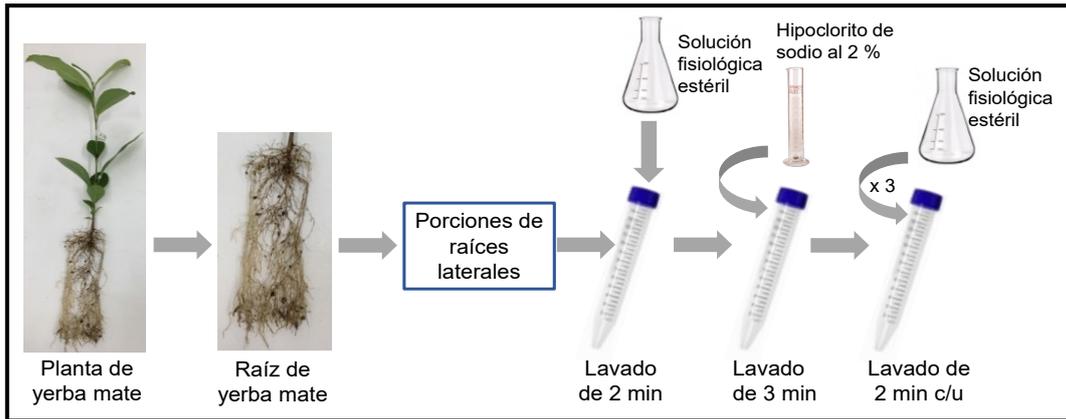


Figura 2.9. Protocolo de desinfección de raíces de yerba mate para el aislamiento de material fúngico.

En la Figura 2.10, se muestra un esquema del protocolo utilizado para el screening primario para la selección y el aislamiento de microorganismos con características macroscópicas similares al género *Trichoderma*.

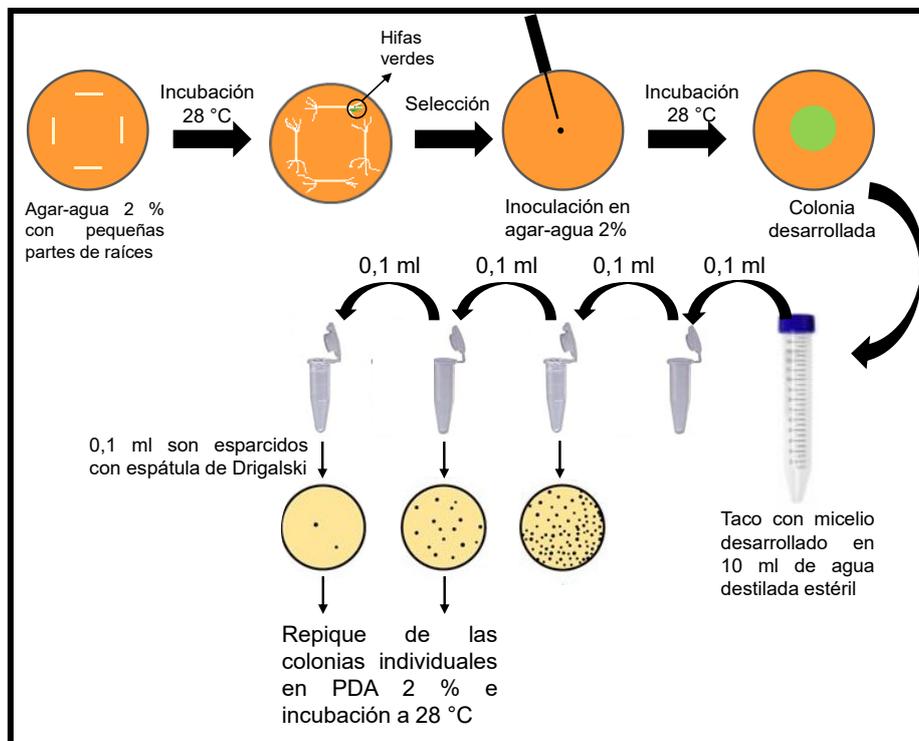


Figura 2.10. Esquema del screening primario para la selección y el aislamiento de hongos del género *Trichoderma*.

Para el *screening* primario, las raíces desinfectadas se cortaron en pequeñas partes de aproximadamente 1 centímetro (cm), se colocaron en placas de Petri con agar-agua al 2 % (p/v) suplementado con cloranfenicol (50 mg/l), para inhibir el desarrollo de bacterias. Las placas fueron incubadas a 28 °C en presencia de luz para estimular la esporulación fúngica y así, seleccionar aquellas que mostraron desarrollo de micelio similar al de *Trichoderma* (color amarillo-verde). Con un ansa estéril, se tomó parte del micelio, se repicó en medio agar-agua al 2 % (p/v) y se incubó a 28 °C durante 5 días. A partir de la colonia desarrollada, siguiendo el protocolo sugerido por Covacevich & Consolo

(2014), con modificaciones, se obtuvo un cultivo monospórico de cada aislamiento para asegurarnos que se originó a partir de una sola célula reproductiva y que el cultivo obtenido fue puro (Covacevich & Consolo, 2014). Los aislamientos fúngicos obtenidos fueron nombrados según la nomenclatura interna del InBioMis, utilizando las siglas LBM (Laboratorio de Biología Molecular) acompañadas por números.

2.3.3 Mantenimiento de los cultivos

Para evitar el envejecimiento de los aislamientos y asegurar la estabilidad de las propiedades morfológicas y fisiológicas, los aislamientos fúngicos se mantuvieron almacenados según el protocolo propuesto por Covacevich & Consolo (2014). A partir de las colonias desarrolladas en PDA¹¹, se tomó un disco de 5 mm de diámetro de cada aislamiento y se colocaron en los viales como se muestra en la Figura 2.11. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada aislamiento. Los viales con PDA y el disco de micelio del aislamiento, se incubaron a 28 °C durante 5 días para permitir que el aislamiento colonice el medio. Los viales se renovaron cada 6 meses.

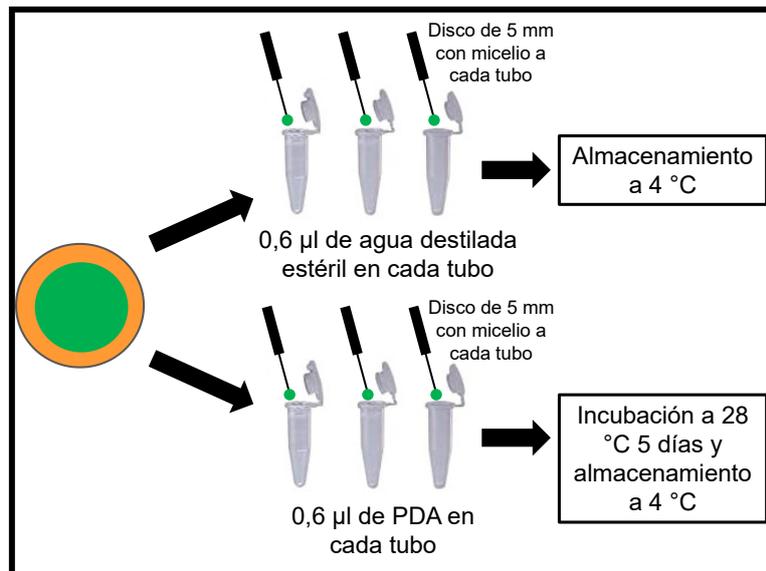


Figura 2.11. Esquema del mantenimiento de los aislamientos en agua destilada estéril y PDA.

2.3.4 Caracterización morfológica de los aislamientos fúngicos

Las características morfológicas, tanto macro como microscópicas, se utilizaron para determinar si los aislamientos pertenecían al género *Trichoderma* y, en algunos casos, asignarles una especie comparando estas características con las disponibles en la bibliografía. Además, aquellos aislamientos que fueron identificados como pertenecientes al género *Trichoderma* fueron seleccionados para ser caracterizados molecularmente.

¹¹ PDA: Britania - composición: 200 g/l infusión de papa, 20 g/l glucosa, 15 g/l agar, pH 5,6 ± 0,2.

2.3.4.1 Observación y caracterización macroscópica

Los aislamientos se hicieron crecer en PDA durante 6 días a 28 °C con fotoperíodo (12 h de luz, 12 h de oscuridad). Se registraron las características morfológicas macroscópicas de las colonias fúngicas, mediante observación directa de las colonias en medio PDA, tales como textura del micelio, borde de la colonia, pigmentación de los conidios, velocidad de crecimiento y producción de pigmento difusible en PDA (Piontelli, 2011).

En la Tabla 2.3, se muestra la escala utilizada para determinar la velocidad de crecimiento de las colonias en PDA, de acuerdo al tiempo en el que la placa se cubrió completamente con el micelio.

Tabla 2.3. Escala de desarrollo de las colonias de los aislamientos.

Tasa de desarrollo en PDA	Crecimiento
4 días en cubrir toda la placa	Muy rápido
4-6 días en cubrir la placa	Rápido
Más de 6 días en cubrir la placa	Lento

2.3.4.2 Observación y caracterización microscópica

Para la observación de las estructuras mediante microscopía, se tomó una pequeña porción de la colonia desarrollada en PDA utilizando una cinta adhesiva y, luego, se colocó en un portaobjetos junto con una gota de azul de lactofenol para su posterior visualización en el microscopio óptico con campo claro (Figura 2.12).

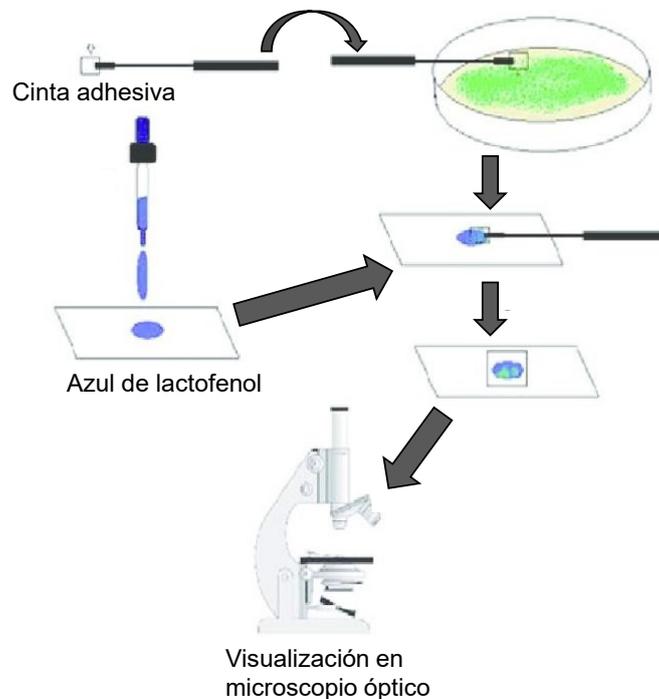


Figura 2.12. Preparación de las muestras para observar estructuras de los aislamientos en el microscopio óptico. Adaptada de López-Jácome *et al.* (2014).

Las observaciones microscópicas se centraron en la búsqueda de estructuras características de *Trichoderma*: forma y tamaño de conidios, disposición de los conidióforos, longitud y forma de las fialides, presencia o ausencia de clamidosporas, y en caso de estar presentes, su tamaño y forma. Para medir el tamaño de las estructuras, se utilizó un microscopio binocular con una regla milimétrica y cámara fotográfica digital. Las imágenes se analizaron mediante el programa procesador de imágenes *Image J 1.47v* (Schneider *et al.*, 2012), con el cual se midieron las dimensiones de las estructuras y se comparó con las descripciones para especies del género *Trichoderma* presentes en la bibliografía (López-Quintero *et al.*, 2013; Piontelli, 2011; Samuels *et al.*, 2010; Samuels & Ismael, 2009; Torres-De la Cruz *et al.*, 2015).

2.3.5. Caracterización e identificación molecular de los aislamientos fúngicos

En la Figura 2.13, se muestra el protocolo seguido para lograr la identificación molecular de los aislamientos.

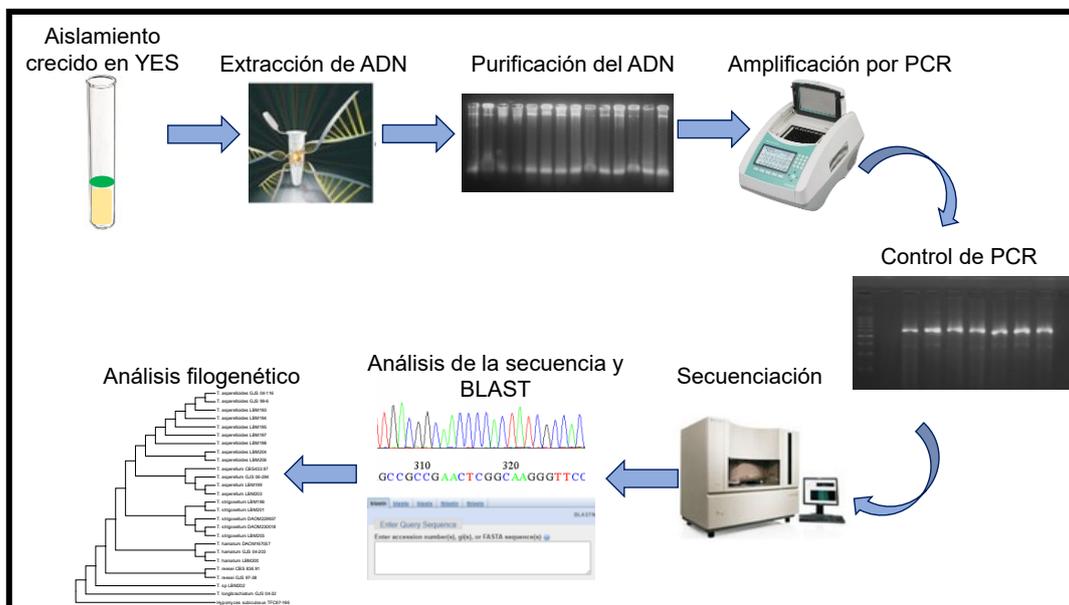


Figura 2.13. Representación gráfica de las técnicas utilizadas para la identificación molecular de los aislamientos.

2.3.5.1 Desarrollo de los aislamientos en medio líquido

Los aislamientos se reactivaron en placas con PDA y se incubaron a 28 °C durante 5 días. Luego, se cortaron asépticamente discos de PDA con micelio de cada aislamiento y se colocaron en tubos de ensayo con 10 ml de medio líquido Extracto de levadura 5 g/l - Sacarosa 30 g/l (YES, del inglés *Yeast Extract Sucrose*). Se incubaron a 28 °C durante 3 días en la oscuridad para evitar la esporulación. Luego se extrajo el micelio y se eliminó el excedente de agua con papel secante. Este procedimiento se realizó por duplicado.

2.3.5.2 Extracción, cuantificación y purificación del ADN

A partir del micelio crecido se extrajo el ADN siguiendo el protocolo sugerido por Weining & Langridge (1991) con modificaciones.

El ADN de los aislamientos se cuantificó de acuerdo a los niveles de absorbancia a 260 nanómetros (nm), considerando que 1 unidad de absorbancia equivale a una concentración de 50 µg/µl de ADN y la pureza del ADN se determinó mediante la relación A260/A280. Además, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) y posterior visualización con luz ultravioleta (UV) en transiluminador de los productos para determinar la integridad de la molécula de ADN. A partir de estos resultados, se determinó la cantidad de ADN a utilizar en las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR)¹². El ADN genómico se conservó a -20 °C para su posterior utilización. Este procedimiento se realizó por duplicado para cada aislamiento.

2.3.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa

La mezcla de reacción utilizada para realizar la PCR se muestra en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Reactivos utilizados para la mezcla de reacción de la PCR.

Reactivo	Concentración	Cantidad (µl)*
Taq polimerasa (Inbio Highway)	1 unidad	0,1
<i>Buffer</i>	1 X	2
MgCl ₂	2,5 mM	2
Desoxirribonucleótidos (dNTPs)	0,2 mM	1,43
Cebador sentido	10 picomol	2
Cebador antisentido	10 picomol	2
ADN	60 ng	1
Agua	-	9,47

*Cantidades para mezcla de reacción de 20 µl.

Para la PCR se utilizaron dos pares de cebadores: ITS y *tef*. Se realizó un control positivo con una muestra de ADN que ya había sido amplificada con estos cebadores, y un control negativo, que consistió en la mezcla de reacción sin el agregado de ADN. Estos controles permitieron determinar la presencia de contaminantes en los reactivos utilizados. Las condiciones de PCR y la secuencia de los cebadores utilizados se detallan en la Tabla 2.5.

¹² Del inglés *Polymerase Chain Reaction*.

Tabla 2.5. Condiciones de PCR para la amplificación de la región ITS y *tef* del ADN de los aislamientos fúngicos.

Cebadores	Secuencia 5' – 3'	Parámetros	Ciclos	Tamaño del producto
ITS 1 ITS 4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC (White <i>et al.</i> , 1990)	94°C, 4 min	1	~650 pb (White <i>et al.</i> , 1990)
		94°C, 40 s	35	
		55°C, 40 s		
		72°C, 40 s		
		72°C, 10 min	1	
EF1_728F <i>tef1_R5</i>	CATCGAGAAGTTCGAGAAGGGCCAT CCTTGAGATACCAGC (Samuels & Ismaiel, 2009)	94°C, 4 min	1	~700 pb (Samuels, 2006)
		94°C, 40 s	35	
		55°C, 40 s		
		72°C, 40 s		

Se verificó que la amplificación fue exitosa mediante la realización de electroforesis en gel de agarosa al 2 % (p/v) de los controles, de los productos de PCR obtenidos y el marcador de peso molecular¹³ “*qLadder 100 pb Precision*” (Productos Bio-Lógicos S.A.). Se repitió la amplificación para las muestras de ADN de cada aislamiento empleando los diferentes cebadores hasta lograr el volumen requerido para su secuenciación (100 µl).

2.3.5.4 Secuenciación de los productos de PCR

Los productos de PCR amplificados fueron enviados a [Macrogen](#) Inc., Seúl, Corea según las recomendaciones de la empresa, para su posterior purificación y secuenciación en secuenciadores capilares automáticos del tipo ABI3730XL (Applied Biosystems).

2.3.5.5 Análisis de las secuencias y búsqueda de secuencias homólogas

Las secuencias de los productos de PCR se visualizaron, analizaron y editaron con el programa MEGA 7.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software*) (Kumar *et al.*, 2016). Además, para el caso particular de las secuencias obtenidas utilizando el marcador molecular *tef*, se continuó con el análisis realizando un diagnóstico preliminar con la herramienta [TrichoMARK](#), para identificar las regiones del intrón 4 (largo) e intrón 5 (corto).

Por lo tanto, se analizaron las secuencias de ITS, de *tef* completa y del intrón 4 y 5 de *tef* mediante un análisis de identidad/similitud con la herramienta BLAST (Altschul *et al.*, 1997), la cual utiliza el algoritmo heurístico de búsqueda de alineamiento de secuencias nucleotídicas de la base de datos *online* del NCBI.

Un aislamiento se logró asignar con el género y la especie que presentó máximo *score*¹⁴ –mediante la búsqueda de secuencias homólogas de ITS y *tef*, respectivamente– el cual estuvo determinado por los siguientes criterios:

¹³ Permite determinar el tamaño de los productos de PCR obtenidos.

¹⁴ *Score*: mejor puntuación obtenida para la secuencia alineada con la secuencia de los aislamientos.

✚ La secuencia del aislamiento tendrá un valor de similitud $\geq 97\%$, un porcentaje de cobertura $\geq 80\%$ y el e-valor fue $< 1 \times 10^{-6}$ con la secuencia tipo obtenida en la búsqueda.

✚ Además, para identificar un aislamiento a nivel de especie mediante la búsqueda de secuencias homólogas de *tef*, la diferencia del porcentaje de similitud entre la primera y segunda especie identificada tendrá que ser $\geq 7\%$.

2.3.5.6 Análisis filogenético

Para la realización del análisis filogenético de todos los aislamientos, se descargaron de la base de datos del GenBank del NCBI, las secuencias tipo de ITS y *tef* que presentaron máximo *score* en la búsqueda de similitud realizada en BLAST. Además, para el enraizamiento¹⁵ de los árboles, se descargaron las secuencias de ITS y *tef* de *Hypomyces subiculosus* (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009).

Para la construcción de los árboles filogenéticos por el método de máxima similitud, se siguieron los pasos mencionados a continuación:

1. Se realizó el alineamiento con la herramienta *Clustal W* del software MEGA 7.0 (Larkin *et al.*, 2007), de las secuencias tipo descargadas y las secuencias de los aislamientos, de:

- ✓ ITS
- ✓ *tef*
- ✓ ITS concatenadas con el intrón 4 y 5 de *tef*¹⁶.

Luego, las secuencias se reacomodaron manualmente, se rellenaron los *gaps* y se eliminaron los extremos, obteniéndose fragmentos del mismo tamaño.

2. El alineamiento de las secuencias fue analizado para seleccionar el mejor modelo de sustitución de nucleótidos del método de máxima similitud para la construcción del árbol filogenético. El modelo que presentó menor BIC (criterio de información bayesiano) describió el mejor patrón de sustitución, por lo tanto, fue el método elegido para la realización del árbol filogenético.

3. Para evaluar la solidez estadística de los nodos del árbol se utilizó un *bootstrap* de 1000 repeticiones. Los nodos con un *bootstrap* $< 50\%$ se consideraron que estuvieron colapsadas.

Utilizando estos datos, se pueden construir 3 árboles filogenéticos de máxima similitud, para los cuales se tuvo un criterio basado en consideraciones moleculares en el que las especies de *Trichoderma* se clasifican en 3 secciones y 13 clados (Druzhinina *et al.*, 2005).

¹⁵ Un árbol filogenético enraizado presenta un nodo que corresponde al ancestro común más reciente entre todos los taxones del árbol. Un árbol filogenético sin raíz no asume conocimiento de un ancestro común, sólo posiciones de los taxones –grupo de organismos emparentados– para mostrar sus relaciones.

¹⁶ Las secuencias tipo de *tef* descargadas se analizaron con TrichoMARK para determinar las secuencias de los intrones 4 y 5.

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1. Selección y aislamiento de hongos asociados a la raíz de yerba mate

No se observó crecimiento en las placas de agar-agua 2 % en los controles de desinfección para el 90% de las muestras de raíces desinfectadas. Con este resultado se consideró que el proceso de desinfección fue efectivo y podemos determinar que los aislamientos fúngicos presentaron carácter endofítico.

En la Figura 2.14, se aprecia claramente crecimiento fúngico en placas con agar-agua al 2 % a partir porciones de raíces desinfectadas de yerba mate.

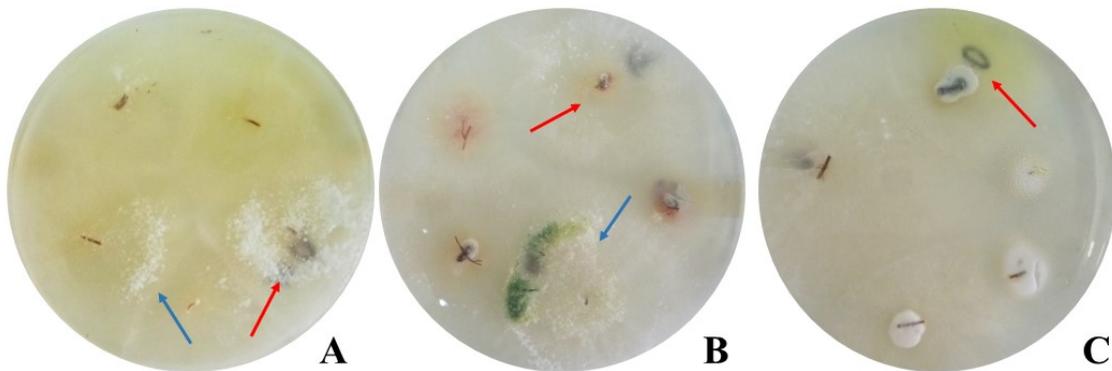


Figura 2.14. Placas de agar-agua al 2 % con las colonias crecidas a partir de la porción de raíces desinfectadas de yerba mate. **A.** Flecha azul y roja corresponden al aislamiento LBM 196₃ y LBM 197₃, respectivamente. **B.** Flecha roja y azul corresponden al aislamiento LBM 199₅ y LBM 200₅, respectivamente. **C.** Flecha roja indica el aislamiento LBM 202₈.

De las zonas con crecimiento fúngico color verde-amarillento –característico de la mayoría de las especies del género *Trichoderma*– se tomaron muestras que fueron repicadas en medio agar-agua 2% y luego de varios repiques sucesivos se logró obtener cultivos fúngicos monospóricos. A partir de estos repiques, se obtuvieron 14 aislamientos fúngicos con características macromorfológicas coincidentes con aquellas correspondientes al género *Trichoderma*. En la Tabla 2.6, se muestra el código de InBioMis asignado a cada aislamiento según la planta de la cual se aisló el microorganismo. En esta tabla, no aparecen las plantas 2, 4 y 7, ya que no se encontraron microorganismos con características macroscópicas similares a *Trichoderma*.

Tabla 2.6. Código de los aislamientos fúngicos depositados en el cepario del InBioMis.

Planta	Aislamiento	Código de InBioMis
1	1A	LBM 193 ₁
	1B	LBM 194 ₁
	1C	LBM 195 ₁
3	3A	LBM 196 ₃
	3B	LBM 197 ₃
	3C	LBM 198 ₃
5	5C	LBM 199 ₅
	5D	LBM 200 ₅
6	6B	LBM 201 ₆
8	8A	LBM 202 ₈
	9B	LBM 203 ₉
	9C	LBM 204 ₉
9	9D	LBM 205 ₉
	10A	LBM 206 ₁₀

Los aislamientos que provienen de una misma planta, si bien tienen diferentes códigos, pueden llegar a provenir de un mismo microorganismo que al procesar las muestras dio origen a 2 o 3 colonias.

2.4.2 Asignación del género de los aislamientos fúngicos mediante características morfológicas

Todos los aislamientos presentaron micelio con o sin septos, la presencia de estructuras microscópicas asexuales: conidios, conidióforos, fiálides, y en algunos casos, clamidosporas. Esto nos permite decir que los aislamientos pertenecen al filo *Ascomycota*, dentro del grupo de hongos imperfectos¹⁷.

En la Figura 2.15, se muestran imágenes representativas de los aislamientos que presentaron características macro y microscópicas similares al género *Trichoderma*.

¹⁷ Hongos imperfectos o Deuteromycetes: especies de hongos que carecen de un ciclo sexual conocido. El análisis filogenético ha demostrado que se trata de agrupaciones artificiales que no se basan en una relación taxonómica (Dyer & Kück, 2017).

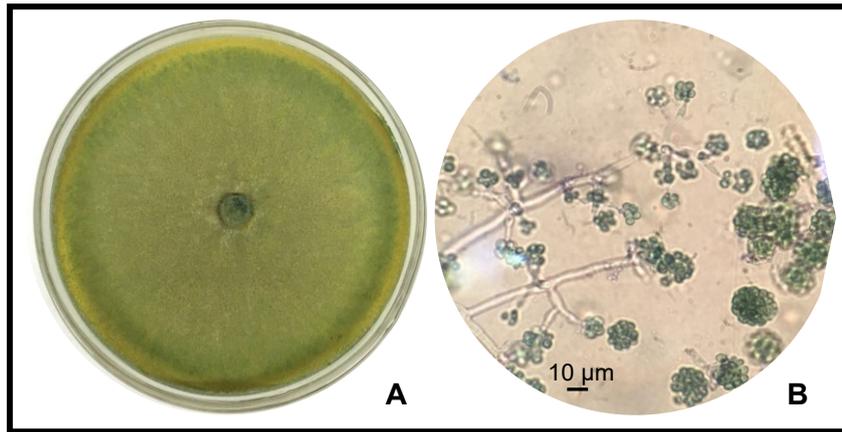


Figura 2.15. Imágenes representativas de los aislamientos fúngicos. **A.** Colonia del aislamiento LBM 201₆ **B.** Estructuras microscópicas de LBM 194₁.

Todos los aislamientos presentaron colonias de rápido crecimiento color verde-amarillo y en las observaciones al microscopio en campo claro se observaron diversas estructuras reproductivas. En la Tabla 2.7, se detallan las características macroscópicas observadas para las colonias desarrolladas en PDA de cada aislamiento fúngico.

Tabla 2.7. Características macroscópicas de los aislamientos fúngicos.

Aislamiento	Colonia			
	Color reverso	Color anverso	Crecimiento	Aspecto
LBM 193 ₁	Incoloro	Verde-amarillo	Rápido	Polvoso
LBM 194 ₁	Incoloro	Verde-amarillo	Rápido	Polvoso
LBM 195 ₁	Incoloro	Verde-amarillo	Rápido	Polvoso
LBM 196 ₃	Incoloro	Verde-amarillo	Rápido	Polvoso
LBM 197 ₃	Incoloro	Verde claro	Rápido	Polvoso
LBM 198 ₃	Incoloro	Verde claro	Rápido	Polvoso
LBM 199 ₅	Incoloro	Verde	Lento	Polvoso
LBM 200 ₅	Incoloro	Verde con micelio blanco	Lento	Micelio aéreo
LBM 201 ₆	Incoloro	Verde	Rápido	Polvoso
LBM 202 ₈	Amarillo-pigmento difusible	Verde	Muy rápido	Polvoso
LBM 203 ₉	Incoloro	Verde-amarillo	Rápido	Polvoso
LBM 204 ₉	Incoloro	Amarillo-verde claro	Rápido	Polvoso-aéreo
LBM 205 ₉	Incoloro	Verde	Rápido	Polvoso
LBM 206 ₁₀	Incoloro	Verde oscuro	Rápido	Polvoso

Se observó que los parámetros de morfología de las colonias fueron similares entre los diferentes aislamientos. La colonia con mayor diferencia respecto a los demás aislamientos fue la de LBM 202₈, ya que fue la única que presentó pigmento difusible en PDA.

En cuanto a las características microscópicas, los aislamientos presentaron similares características, las cuales se mencionan a continuación:

- ✓ conidióforos hialinos, ramificados, parecidos a un árbol, no verticilados;
- ✓ fiálides individuales o en grupos;
- ✓ conidios hialinos, unicelulares, globosos/ovoides, en grupos o solos, que nacen en pequeños grupos terminales.

Estas características coinciden con las descritas por Barnett & Hunter (1998) y Kubicek & Harman (1998) para la identificación del género *Trichoderma*. Por lo cual, se determinó que:

- Todos los aislamientos pertenecen al filo *Ascomycota*.
- Todos los aislamientos pertenecen al género *Trichoderma*.

2.4.3 Asignación de especie de los aislamientos fúngicos

2.4.3.1 A través de caracterización morfológica

A continuación, se muestran imágenes representativas de las características macro y micromorfológicas de los aislamientos fúngicos. Debido a que varios aislamientos presentaron características similares, las imágenes serán presentadas por grupos.

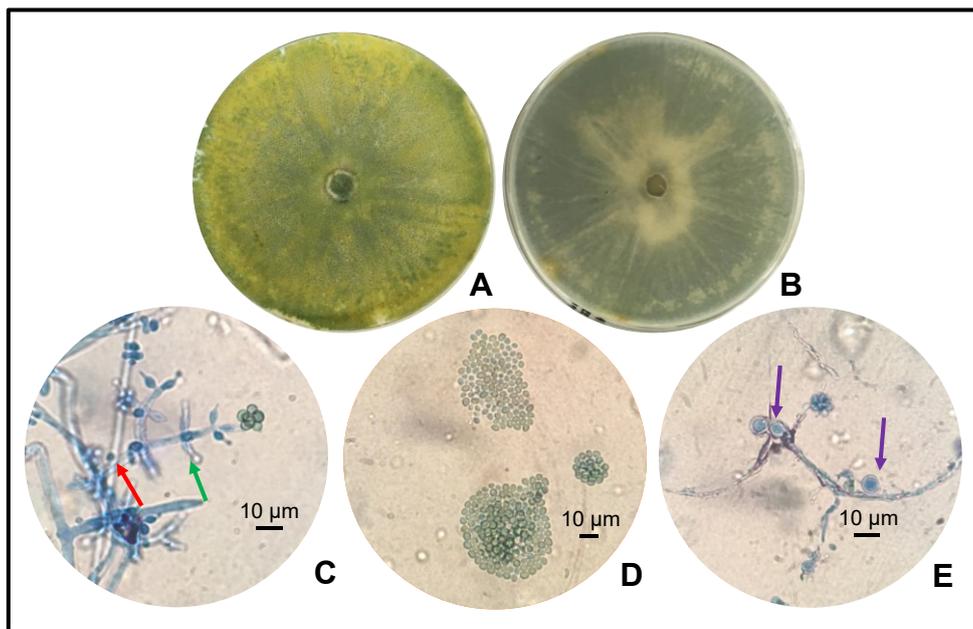


Figura 2.16. Grupo 1. Imágenes representativas de los aislamientos correspondientes a LBM 193₁, LBM 194₁, LBM 195₁, LBM 197₃, LBM 198₃, LBM 199₅, LBM 203₉, LBM 204₉ y LBM 206₁₀. **A.** Anverso y **B.** reverso de la colonia luego de 5 días de crecimiento en PDA **C.** Conidióforo (flecha roja) y fiálides (flecha verde) **D.** Conidios agrupados **E.** Clamidosporas (flechas violetas).

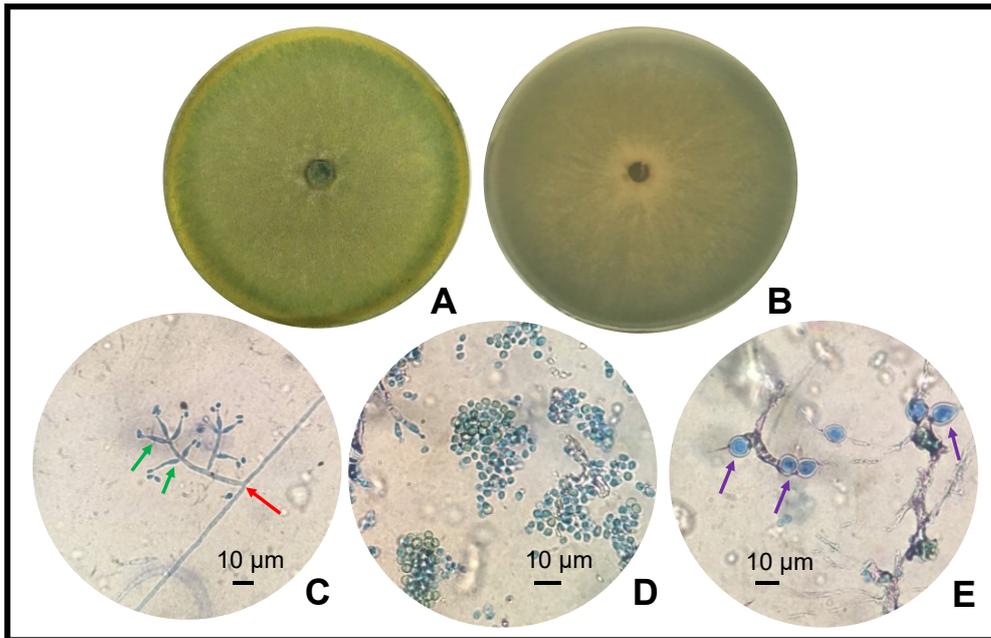


Figura 2.17. Grupo 2. Imágenes representativas de los aislamientos LBM 196₃, LBM 201₆ y LBM 205₉. **A.** Anverso y **B.** reverso de la colonia luego de 5 días de crecimiento en PDA. **C.** Conidióforo (flecha roja) y fiálides con conidios (flechas verdes). **D.** Conidios agrupados. **E.** Clamidosporas (flechas violetas).

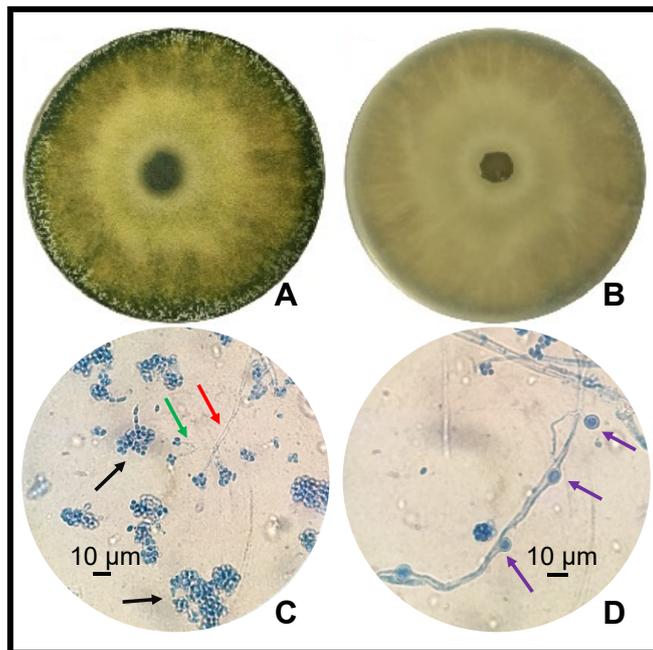


Figura 2.18. Grupo 3. Características macro y microscópicas del aislamiento LBM 200₅. **A.** Anverso y **B.** reverso de la colonia desarrollada en PDA, **C.** Conidióforo (flecha roja), fiálides (flecha violeta) y conidios agrupados (flechas negras). **D.** Clamidosporas intercalares (flechas verdes).

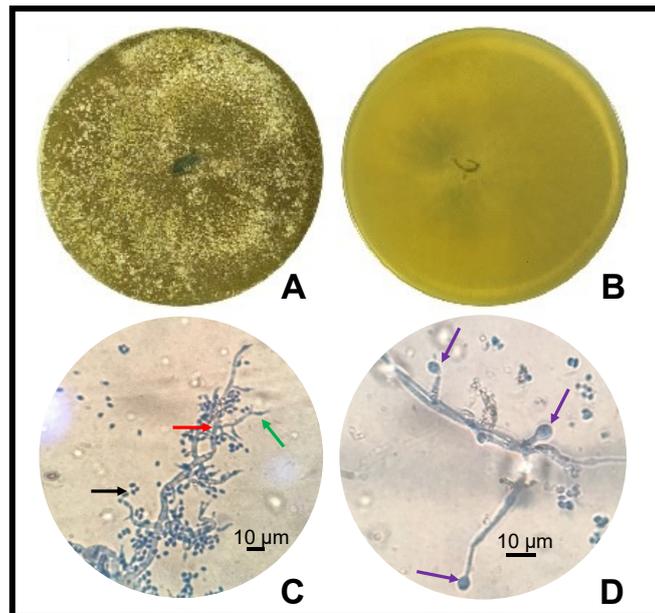


Figura 2.19. Grupo 4. Características macro y microscópicas del aislamiento LBM 2028. **A.** Anverso y reverso **B.** de la colonia desarrollada en PDA **C.** Conidióforos (flecha roja), fiálides (flecha verde) y conidios (flecha negra) **D.** Clamidosporas (flechas violetas).

En la Tabla 2.8 se muestran las características microscópicas de los grupos y las mediciones de conidios, fiálides y clamidosporas de cada aislamiento.

Tabla 2.8. Características microscópicas de los aislamientos.

Aislamiento	Grupo	Conidióforo	Conidios		Fiálides		Clamidosporas (µm)
			Forma	Tamaño (µm)	Forma	Tamaño (L-A) (µm)	
LBM 193 ₁				3,46±0,13 - 3,03±0,25		8,52±1 - 2,6±0,4	ND
LBM 194 ₁				3,15±0,38 - 2,13±0,35		7,91±1,14 - 2,65±0,97	8,77±2,8 - 7,9±0,86
LBM 195 ₁				3,56±0,54 - 2,63±0,47		8,44±1,1 - 2,29±0,28	6,12±0,29 - 5,77±0,57
LBM 197 ₃				3,78±0,4 - 2,72±0,46		9,93±1,1 - 2,22±0,29	8,61±0,4 - 8,05±0,15
LBM 198 ₃	Grupo 1	Simétricos. Ramificados, terminando en 2 o más fiálides	Ovoide- subglobosa/ agrupados	3,53±0,38 - 2,75±0,24	Botella	9,34±0,9 - 2,47±0,33	ND
LBM 199 ₅				3,75±0,3 - 3,11±0,32		7,79±0,81 - 2,38±0,4	9,54±1,18 - 8,75±0,93
LBM 203 ₉				3,78±0,43 - 3,07±0,41		7,65±1,13 - 2,47±0,32	10,21±1,32 - 8,51±1,45
LBM 204 ₉				3,5±0,32 - 2,82±0,46		8,25±1,22 - 2,18±0,43	ND
LBM 206 ₁₀				3,32±0,65 - 2,65±0,34		8,69±0,78 - 2,08±0,33	ND
LBM 196 ₃				3±0,46 - 1,98±0,32		9,59±0,95 - 0,77±0,28	ND
LBM 201 ₆	Grupo 2	Ramificados, entre 7 a 3 fiálides	Elipsoide/ Solos- agrupados	2,97±0,36 - 2,29±0,53	Matraz	8,26±0,98 - 1,87±0,11	6,75±0,77 - 6,01±1,11
LBM 205 ₉				3,34±0,36 - 2,03±0,25		9,85±1,05 - 2,06±0,3	ND
LBM 200 ₅	Grupo 3	Ramificados y rectos	Elipsoide/ agrupados	3,64±0,42 - 2,61±0,26	Matraz	9,26±0,82 - 2,28±0,36	7,87±1,5 - 6,48±1,05
LBM 202 ₈	Grupo 4	Ramificados. Ramas casi rectas	Ovoide- elipsoide/Solos -grupos de 2 o 3	2,85±0,35 - 2,01±0,38	Botella	6,47±0,82 - 2,17±0,3	6,84±0,15 - 5,3±0,7

*Tamaño: promedio ± desvío estándar – L-A: Largo-Ancho – ND: No Detectable.

Estas características (Tabla 2.8) fueron comparadas con las que se encuentran en bibliografía para las especies de *Trichoderma* ya descritas, para poder asignar en forma preliminar una especie a los aislamientos fúngicos (Tabla 2.9).

Tabla 2.9. Características microscópicas de las especies de *Trichoderma* con las que fueron comparadas los aislamientos.

Especie	Conidios				Fiálides		Clamidosporas (LxA) (µm)	Referencia
	Forma	L/A	LxA (µm)	Disposición	Forma	LxA (µm)		
<i>T. asperellum</i>	Ovoide - subglobosa	1-1,3	3,5-4 x 3-3,5	Agrupados	Botella, rectas y ampuliformes	6,5-10,5 x 2,7-4	Ancho de 6,2 - 11,5	Samuels <i>et al.</i> (1999)
<i>T. asperelloides</i>	Ovoide - subglobosa	1-1,3	3,5-4,2 x 3-3,5	Agrupados	Botella, rectas y ampuliformes	6,2-9,7 x 3-3,5	7,2-11,2 x 6,5-9,5	Samuels <i>et al.</i> (2010)
<i>T. hamatum</i>	Elipsoide	1,4-1,8	4-5 x 2,7-3	Agrupados	Matraz-agrupados 3-6	5,5-7,5 x 2,7-4	7-13 x 6-12	Samuels & Ismaiel (2009)
<i>T. strigosellum</i>	Elipsoide	1,5-1,6	3,5-4,5 x 2-3	Agrupados-solitarios	Matraz-agrupados 2-4	5-10 x 2,5-3,5	Hasta 8 µm de diámetro	López-Quintero <i>et al.</i> (2013)
<i>T. reesei</i>	Globosa	1,5-1,6	3,5-4,5 x 2,3-3	Solos-agrupados	Botella-agrupadas 2-3	5-7 x 2,5-3,5	5-7 x 5-6	Torres-De la Cruz <i>et al.</i> (2015)

*LxA: Largo x Ancho.

Los resultados presentados sobre las características morfológicas nos permitieron llevar a cabo una identificación taxonómica preliminar de los aislamientos fúngicos:

- *T. asperelloides/asperellum*¹⁸: fueron asignadas a los 9 aislamientos del grupo 1 (LBM 193₁, LBM 194₁, LBM 195₁, LBM 197₃, LBM 198₃, LBM 199₅, LBM 203₉, LBM 204₉ y LBM 206₁₀).
- *T. strigosellum*: fue asignada a los 3 aislamientos del grupo 2 (LBM 196₃, LBM 201₅ y LBM 205₉).
- *T. hamatum*: fue asignada al aislamiento del grupo 3, LBM 200₅.
- *T. reesei*: fue asignada al aislamiento del grupo 4, LBM 202₈.

2.4.3.2 A través de caracterización molecular

2.4.3.2.a Análisis de los geles de agarosa

Se logró extraer material genético de todos los aislamientos fúngicos de raíz de yerba mate, tal como se observa en la Figura 2.20. Además, se observó una sola banda, lo cual indica la integridad del material genético y que no hubo contaminación del mismo. Estos datos coinciden con los datos mostrados en la Tabla 2.10.

¹⁸ Los aislamientos asignados como *T. asperelloides/T. asperellum* o complejo *T. asperellum* pueden pertenecer a las especies *T. asperelloides* y *T. asperellum* ya que estas especies están estrechamente relacionadas y no se pueden distinguir por su fenotipo (Samuels *et al.*, 2010).

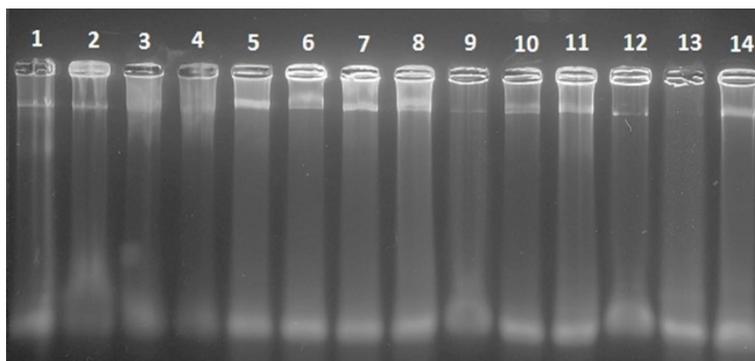


Figura 2.20. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v del ADN de cada aislamiento. Referencias: 1: LBM 193₁, 2: LBM 194₁, 3: LBM 195₁, 4: LBM 196₃, 5: LBM 197₃, 6: LBM 198₃, 7: LBM 199₅, 8: LBM 200₅, 9: LBM 201₆, 10: LBM 202₈, 11: LBM 203₉, 12: LBM 204₉, 13: LBM 205₉ y 14: LBM 206₁₀.

Tabla 2.10. Cuantificación de ADN genómico por espectrofotometría.

Aislamiento	Absorbancia 260 nm	Concentración (µg/ml)	Pureza del ADN (260/280)
LBM 193 ₁	0,037	180 ± 0,02	1,38
LBM 194 ₁	0,020	95 ± 0,04	1,10
LBM 195 ₁	0,060	250 ± 0,01	1,44
LBM 196 ₃	0,035	170 ± 0,03	1,32
LBM 197 ₃	0,040	150 ± 0,04	1,23
LBM 198 ₃	0,022	105 ± 0,01	1,44
LBM 199 ₅	0,027	132 ± 0,02	1,03
LBM 200 ₅	0,042	205 ± 0,06	1,43
LBM 201 ₆	0,034	132 ± 0,02	1,33
LBM 202 ₈	0,050	150 ± 0,04	1,44
LBM 203 ₉	0,041	205 ± 0,05	1,52
LBM 204 ₉	0,036	170 ± 0,03	1,37
LBM 205 ₉	0,026	95 ± 0,04	1,09
LBM 206 ₁₀	0,450	180 ± 0,02	1,31

Una vez obtenido el ADN de todos los aislamientos, se llevó a cabo la PCR de las regiones ITS y *tef* bajo las condiciones mencionadas en materiales y métodos. Para todos los aislamientos, se obtuvieron fragmentos de ADN de 600-700 pares de bases (pb) (Figura 2.21) correspondientes a los productos de PCR obtenidos con ITS y *tef*, los cuales coincidieron con el peso molecular esperado. Además, el control negativo, permitió determinar que no hubo contaminación en los reactivos utilizados (dato no mostrado).

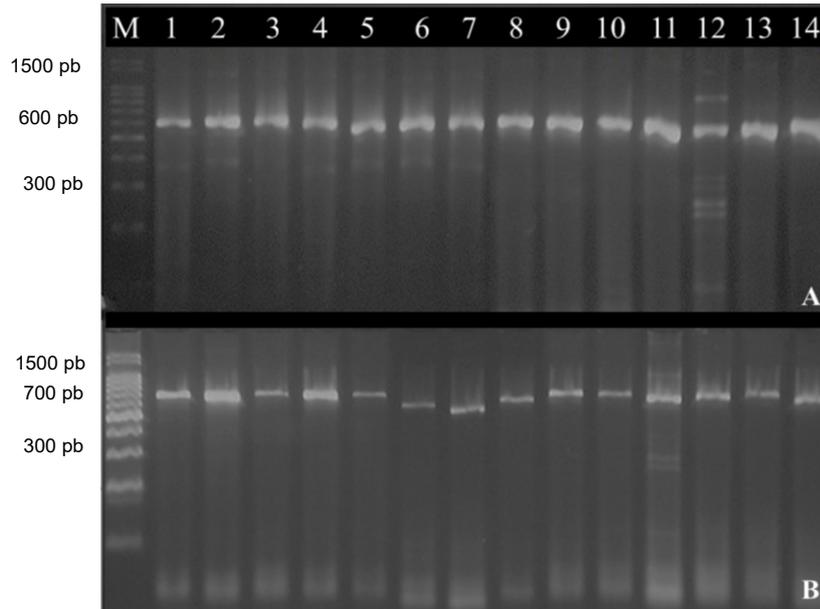


Figura 2.21. Productos de amplificación por PCR de los aislamientos de *Trichoderma*. **A.** ITS1-5,8S-ITS2 y **B.** *tef*. M: marcador de peso molecular. 1: LBM 193, 2: LBM 194, 3: LBM 195, 4: LBM 196, 5: LBM 197, 6: LBM 198, 7: LBM 199, 8: LBM 200, 9: LBM 201, 10: LBM 202, 11: LBM 203, 12: LBM 204, 13: LBM 205 y 14: LBM 206.

2.4.3.2.b Análisis de las secuencias y búsqueda de secuencias homólogas

Se lograron editar todas las secuencias de ITS y *tef* de todos los aislamientos fúngicos. Además, se hallaron las secuencias del intrón 4 y 5 de *tef* para todos los aislamientos, excepto para el aislamiento LBM 202₈, para el cual no se logró identificar la secuencia del intrón 4. En la Tabla A.1 y A.2 del [Anexo](#) se muestran las secuencias de ITS y *tef*, respectivamente, para todos los aislamientos fúngicos.

En la Tabla 2.11, se muestran los resultados de la búsqueda de secuencias homólogas de cepas tipo en BLAST¹⁹, utilizando las secuencias completas de ITS y *tef* de los aislamientos.

¹⁹ Revisado el 5 de febrero de 2021.

Tabla 2.11. Resultados de la búsqueda de similitud de BLAST de las secuencias de ITS y *tef*.

Aislamiento	Asignación de especies con ITS	% similitud de secuencias de ITS ²⁰	Asignación de especies con <i>tef</i>	% similitud de secuencias de <i>tef</i> ²¹
LBM 193 ₁	<i>T. yunnanense</i>	98,96	<i>T. asperelloides</i> <i>T. yunnanense</i>	100
	<i>T. asperellum</i>	98,38		92,61
	<i>T. lieckfeldtia</i>	98,17		
LBM 194 ₁	<i>T. yunnanense</i>	100	<i>T. asperelloides</i> <i>T. yunnanense</i>	100
	<i>T. lieckfeldtia</i>	99,30		92,79
	<i>T. pubescens</i>	98,95		
LBM 195 ₁	<i>T. yunnanense</i>	100	<i>T. asperelloides</i> <i>T. yunnanense</i>	100
	<i>T. asperellum</i>	99,59		92,70
	<i>T. lieckfeldtia</i>	99,19		
LBM 196 ₃	<i>T. strigosum</i>	99,44	<i>T. strigosellum</i> <i>T. strigosum</i>	95,58
	<i>T. martiale</i>	98,69		91,13
	<i>T. atroviride</i>	98,32		
LBM 197 ₃	<i>T. yunnanense</i>	98,45	<i>T. asperelloides</i> <i>T. yunnanense</i>	99,81
	<i>T. asperellum</i>	98,14		92,57
	<i>T. lieckfeldtia</i>	98,14		
LBM 198 ₃	<i>T. yunnanense</i>	99,82	<i>T. asperelloides</i> <i>T. yunnanense</i>	100
	<i>T. asperellum</i>	99,61		92,57
	<i>T. lieckfeldtia</i>	99,28		
LBM 199 ₅	<i>T. asperellum</i>	100	<i>T. asperellum</i> <i>T. matsushimae</i>	99,81
	<i>T. yunnanense</i>	99,60		92,31
	<i>T. lieckfeldtia</i>	98,84		
LBM 200 ₅	<i>T. pubescens</i>	99,73	<i>T. hamatum</i> <i>T. pubescens</i>	98,69
	<i>T. evansii</i>	99,72		90,68
	<i>T. hamatum</i>	99,72		
LBM 201 ₆	<i>T. atroviride</i>	99,05	<i>T. strigosellum</i> <i>T. strigosum</i>	95,38
	<i>T. scalesiae</i>	98,86		92,10
	<i>T. strigosum</i>	98,66		
LBM 202 ₈	<i>T. reesei</i>	100	<i>T. samuelsii</i> <i>T. sphaerosporum</i>	80,13
	<i>T. parareesei</i>	100		78,50
	<i>T. citrinoviride</i>	99,03		
LBM 203 ₉	<i>T. yunnanense</i>	99,47	<i>T. asperellum</i> <i>T. yunnanense</i>	99,80
	<i>T. lieckfeldtia</i>	98,93		93,27
	<i>T. pubescens</i>	98,58		
LBM 204 ₉	<i>T. yunnanense</i>	99,82	<i>T. asperelloides</i> <i>T. yunnanense</i>	100
	<i>T. lieckfeldtia</i>	99,09		92,75
	<i>T. pubescens</i>	98,72		
LBM 205 ₉	<i>T. strigosellum</i>	99,30	<i>T. strigosellum</i> <i>T. strigosum</i>	96,38
	<i>T. martiale</i>	98,83		91,37
	<i>T. atroviride</i>	98,83		
LBM 206 ₁₀	<i>T. yunnanense</i>	99,00	<i>T. asperelloides</i> <i>T. yunnanense</i>	100
	<i>T. asperellum</i>	99,00		92,75
	<i>T. kunmingense</i>	99,00		

²⁰ Se muestra el mayor porcentaje de similitud de las 3 primeras especies que presentaron máximo score.

²¹ Se muestra el mayor porcentaje de similitud las 2 primeras especies que presentaron máximo score.

Los resultados de la Tabla 2.11, indicaron que todos los aislamientos fúngicos corresponden al género *Trichoderma*, ya que cumplen con los criterios que se establecieron para identificación de género. Estos resultados eran de esperar ya que por medio de la caracterización morfológica (Sección 2.4.3.1) se habían asignado al género *Trichoderma*.

Observando los datos de la Tabla 2.11, para una mejor comprensión de los resultados de la búsqueda de secuencias homólogas de *tef*, se muestra la Tabla 2.12 que detalla el cumplimiento o no de los criterios que debe cumplir la especie que presentó máximo *score*. Esta tabla nos permitió determinar qué aislamiento pudo ser identificado mediante búsqueda de secuencias homólogas de *tef*.

Tabla 2.12. Resultados de la búsqueda de similitud de secuencias de *tef* para los aislamientos fúngicos.

Aislamiento	% similitud de secuencia <i>tef</i> ≥ 97 %	% de cobertura de <i>tef</i> ≥ 80 %	Diferencia del % similitud ≥ 7 % entre las 2 primeras especies identificadas	Especie asignada
LBM 193 ₁	Sí	Sí	Sí	<i>T. asperelloides</i>
LBM 194 ₁	Sí	Sí	Sí	<i>T. asperelloides</i>
LBM 195 ₁	Sí	Sí	Sí	<i>T. asperelloides</i>
LBM 196 ₃	No	Sí	No	ND
LBM 197 ₃	Sí	Sí	Sí	<i>T. asperelloides</i>
LBM 198 ₃	Sí	Sí	Sí	<i>T. asperelloides</i>
LBM 199 ₅	Sí	Sí	Sí	<i>T. asperellum</i>
LBM 200 ₅	Sí	Sí	Sí	<i>T. hamatum</i>
LBM 201 ₆	No	Sí	No	ND
LBM 202 ₈	No	No	No	ND
LBM 203 ₉	Sí	Sí	Sí	<i>T. asperellum</i>
LBM 204 ₉	Sí	Sí	Sí	<i>T. asperelloides</i>
LBM 205 ₉	No	Sí	No	ND
LBM 206 ₁₀	Sí	Sí	Sí	<i>T. asperelloides</i>

ND: No Determinado. *Aquellos aislamientos que no cumplieron las condiciones, no se lograron identificar mediante el uso de la herramienta BLAST.

Los resultados de la Tabla 2.12 indican que 10 de los 14 aislamientos se pudieron identificar a nivel de especie y se logró diferenciar los aislamientos pertenecientes a las especies de *T. asperellum* y de *T. asperelloides*, los cuales en la identificación morfológica se agruparon dentro de un mismo grupo debido a que no se podían diferenciar por sus características macro y micromorfológicas.

Los resultados de la búsqueda de secuencias homólogas evidenciaron que:

- Todos los aislamientos pertenecen al género *Trichoderma*.
- Los aislamientos LBM 193₁, LBM 194₁, LBM 195₁, LBM 197₃, LBM 198₃, LBM 204₉ y LBM 206₁₀ fueron identificados como *T. asperelloides*.
- Los aislamientos LBM 199₅ y LBM 203₉ fueron identificados como *T. asperellum*.
- El aislamiento LBM 200₅ se identificó como *T. hamatum*.
- Los aislamientos LBM 196₃, LBM 201₆ y LBM 205₉ no cumplieron todos los criterios necesarios para asignarle una especie, por lo tanto, no pudieron ser identificados.

➤ El aislamiento LBM 202₈ no cumplió ningún criterio de asignación de especie, por lo tanto, no pudo ser identificado.

Por todo lo expuesto, fue necesario realizar un análisis filogenético para identificar aquellos aislamientos a los que no se les pudo asignar ninguna especie y, además, para validar aquellos aislamientos ya identificados.

2.4.3.2.c Construcción de árboles filogenéticos

En base a los resultados obtenidos con la secuencia de *tef*, se buscaron y descargaron secuencias tipo de especies que presentaron máximo *score* con las secuencias de los aislamientos. En la Tabla 2.13 se muestran el número de acceso de las secuencias descargadas de la base de datos del Gen Bank utilizadas en el análisis filogenético.

Tabla 2.13. Secuencias de ITS y *tef* descargadas de la base de datos.

N° acceso GenBank ITS	N° de acceso GenBank <i>tef</i>	Cepa tipo	Especie
GU198301.1	GU248412.1	GJS 04-116	<i>T. asperelloides</i>
DQ315464.1	GU198240.1	GJS 99-6	
NR_130668.1	AY376058.1	CBS 433.97	<i>T. asperellum</i>
GU198307.1	GU198235.1	GJS 06-294	
EU280124.1	AF456911.1	DAOM 167057	<i>T. hamatun</i>
EU883567.1	EU883565.1	GJS 04-203	
DQ297061.1	DQ297070.1	GJS 04-32	<i>T. longibrachiatum</i>
X93951.1	GQ354354.1	CBS 836.91	<i>T. reesei</i>
AJ004962.1	JN175603.1	GJS 97-38	
EU280139.1	EU280030.1	DAOM 229937	<i>T. strigosellum</i>
FJ442649.1	FJ463279.1	DAOM 230018	
FN859452.1	FN868770.1	TFC 97-166	<i>Hypomyces subiculosus</i>

Para la construcción de los 3 árboles filogenéticos, se utilizó el modelo del alineamiento de Jukes-Cantor con una heterogeneidad de tasa de sustitución de sitios invariantes y distribución gama (JC+G+I), ya que este modelo fue el que presentó menor BIC (criterio de información bayesiano). Además, para los árboles obtenidos, se consideró que nodos con *bootstrap* $\geq 60\%$ indicaron ramas estadísticamente fuertes, confirmando la robustez del árbol y determinaron la ubicación taxonómica de los aislamientos.

En las Figuras 2.22, 2.23 y 2.24 se muestran los árboles filogenéticos de máxima similitud obtenidos por alineamiento de las secuencias de la región ITS, *tef* y secuencias de ITS concatenadas con las del intrón 4 y 5 de *tef*, respectivamente.

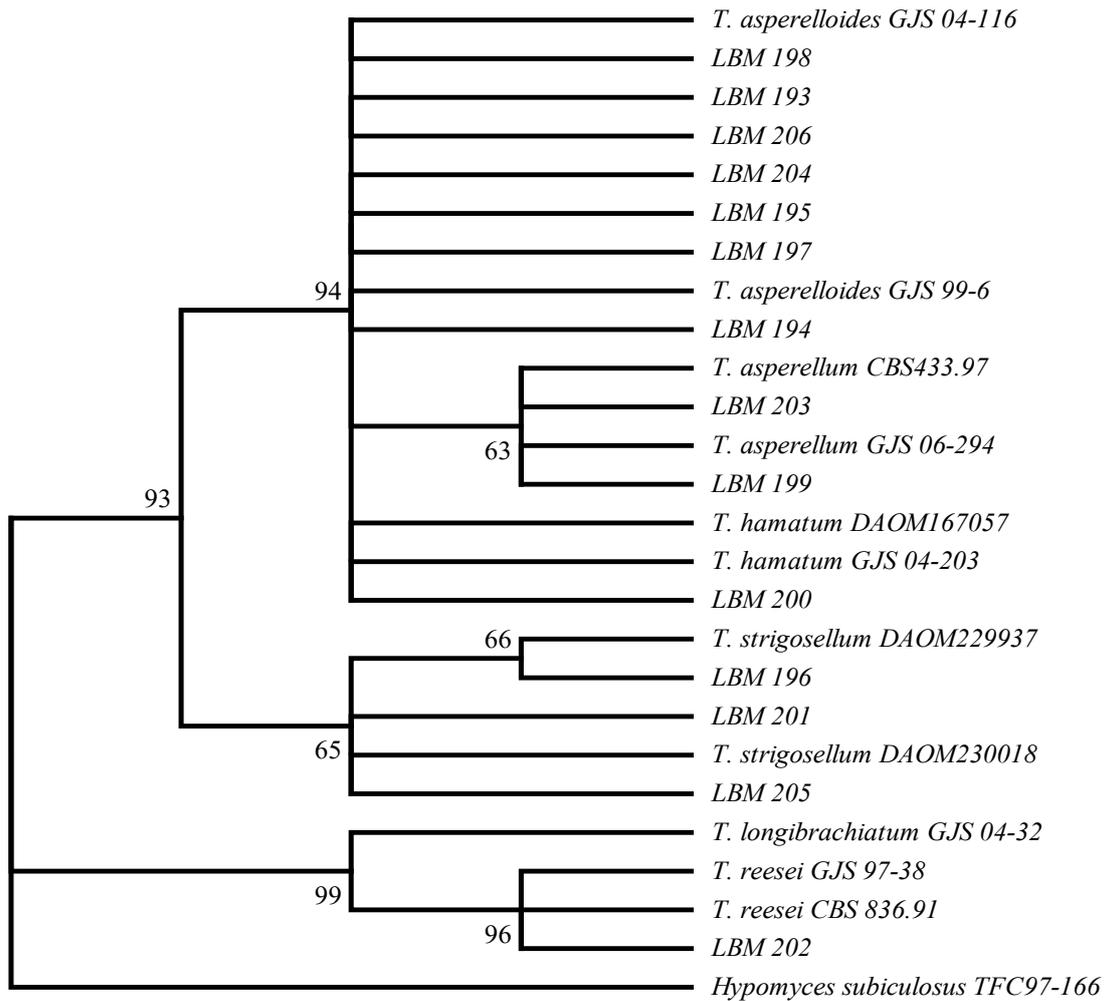


Figura 2.22. Árbol filogenético consenso de máxima similitud basado en el alineamiento de la región ITS1-5,8S-ITS2. Como método de distancia evolutiva se utilizó el método Jukes-Cantor, con un soporte estadístico de 1000 *bootstrap* y se muestran sólo los de *bootstrap* \geq 60 %.

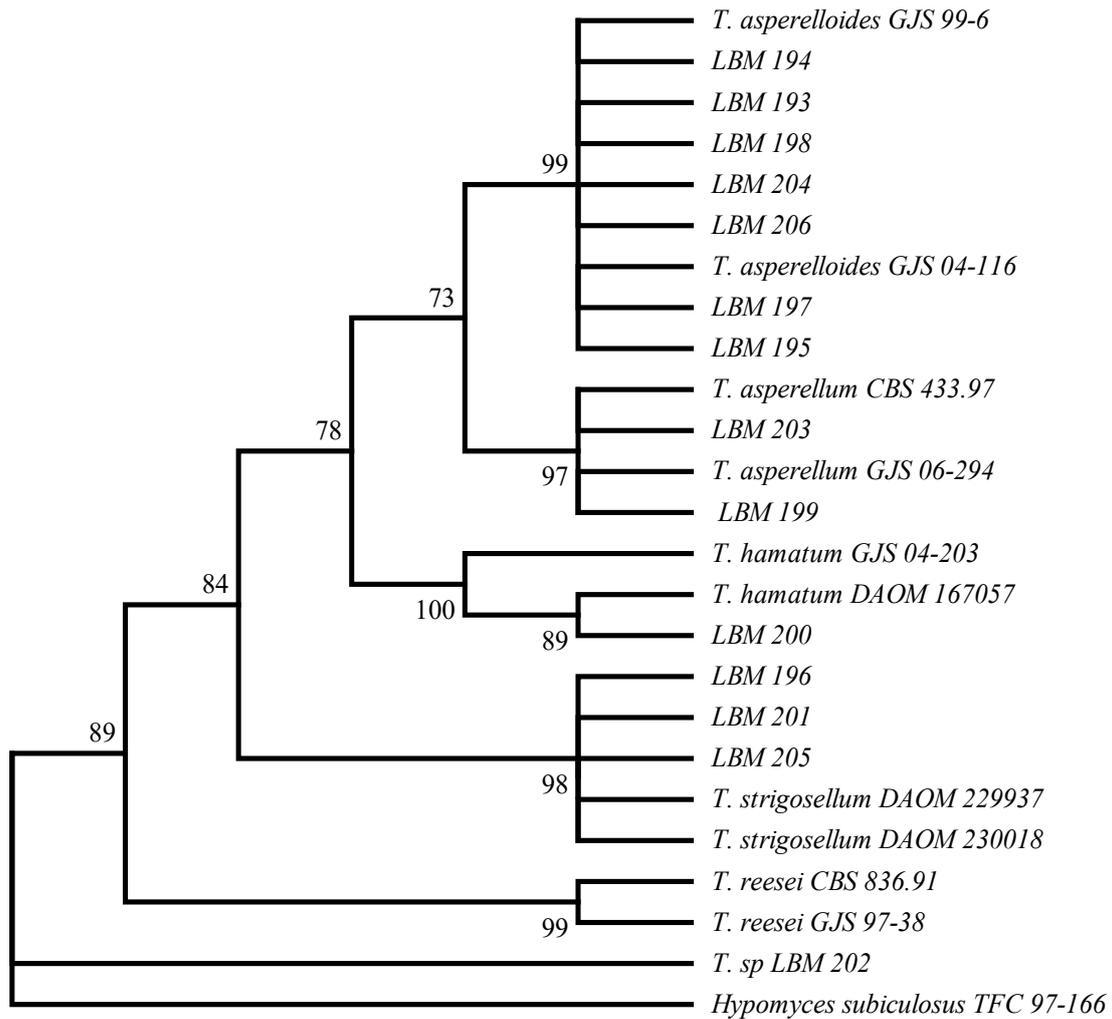


Figura 2.23. Árbol filogenético consenso de máxima similitud basado en las secuencias de *tef*. Como método de distancia evolutiva se utilizó el método Jukes-Cantor, con un soporte estadístico de 1000 réplicas (*bootstrap*) y se muestran sólo los valores de *bootstrap* \geq 60 %.

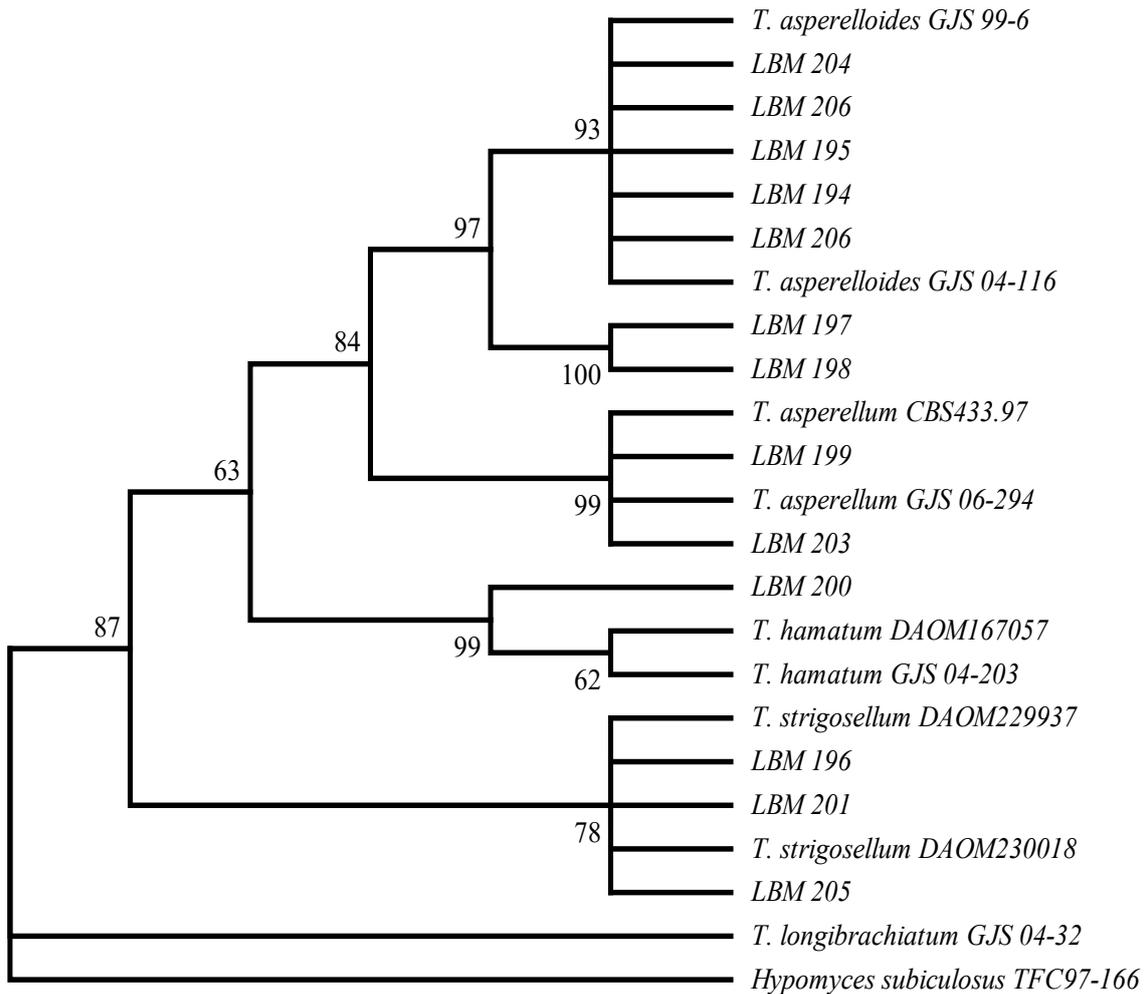


Figura 2.24. Árbol filogenético consenso de máxima similitud basado en las secuencias de ITS concatenadas con las secuencias del intrón 4 y 5 de *tef*. Como método de distancia evolutiva se utilizó el método Jukes-Cantor, con un soporte estadístico de 1000 *bootstrap* y se muestran sólo los valores de *bootstrap* $\geq 60\%$.

Los resultados del análisis filogenético evidenciaron que:

- en todos los árboles, se observó que los aislamientos se agruparon formando un gran *cluster* con especies de *Trichoderma*, alejados del grupo externo utilizado *Hypomyces subiculosus*.
- la ubicación taxonómica de los aislamientos coincidió en los árboles obtenidos con las secuencias de *tef* y el concatenado, con buen soporte estadístico, *bootstrap* $\geq 60\%$, lo cual indicó que los árboles presentaron ramas estadísticamente fuertes. Además, se observó mayor cantidad de nodos (5 nodos internos que lograron separar los taxones estudiados) y ramificaciones en comparación al árbol obtenido con las secuencias de ITS, lo cual permitió un mejor agrupamiento entre las diferentes especies. Por lo tanto, los resultados se basarán en el análisis de estos dos árboles.
- el análisis filogenético nos permitió validar la asignación de especie a aquellos aislamientos que ya habían sido identificados por búsqueda de secuencias homologas, ya que todos se agruparon mostrando un ancestro común más reciente con las cepas tipo esperadas.

- además, los aislamientos LBM 196₃, LBM 201₆ y LBM 205₉ se agruparon con las cepas tipo de *T. strigosellum*, por lo tanto, fueron asignados a esta especie.
- el aislamiento LBM 202₈, si bien pertenece al género *Trichoderma*, no se ha podido identificar con las especies utilizadas para la construcción de árboles con el marcador *tef*, debido a que no se pudo agrupar ni con las especies del árbol de la Figura 2.23, ni con otras especies que presentaron el máximo *score* en la búsqueda de secuencias homólogas que fueron utilizadas para la construcción de otros árboles filogenéticos con este marcador (datos no mostrados).

El análisis de los resultados presentados en este capítulo nos permitió concluir que se logró caracterizar morfológica y molecularmente 14 aislamientos fúngicos con **carácter endofítico** pertenecientes al género *Trichoderma*, obtenidos de la endorizósfera de yerba mate de la provincia de Misiones. Mediante la caracterización morfológica y molecular se obtuvo un diagnóstico de identidad confiable, que permitió identificar 13 de estos aislamientos a nivel de especie:

- de los 9 aislamientos que morfológicamente se identificaron de manera preliminar como *T. asperelloides/asperellum*, 7 de ellos –LBM 193₁, LBM 194₁, LBM 195₁, LBM 197₃, LBM 198₃, LBM 204₉ y LBM 206₁₀– fueron identificados como *T. asperelloides* y los 2 restantes –LBM 199₅ y LBM 203₉– como *T. asperellum*, por análisis comparativo de secuencias homólogas de marcadores moleculares con una identidad $\geq 99\%$. Además, un análisis filogenético permitió validar estos resultados y le dio un mayor soporte estadístico a la identificación.
- el aislamiento LBM 200₅ que se identificó de manera preliminar como *T. hamatum* por sus caracteres morfológicos, se determinó que efectivamente pertenece a dicha especie por análisis de BLAST con un porcentaje de similitud $\geq 99\%$, y también fue validado como tal por análisis filogenético.
- los aislamientos LBM 196₃, LBM 201₆ y LBM 205₉ se asignaron preliminarmente por sus características morfológicas a la especie *T. strigosellum*, pero fue necesario un análisis filogenético para afirmar que estos aislamientos efectivamente se identificaron con esta especie.

De esta manera queda demostrado, una vez más, que la identificación molecular respalda la descripción morfológica y estos elementos permiten tener un diagnóstico taxonómico acertado y confiable.

- tal como se mencionó previamente en este trabajo, los aislamientos obtenidos de una misma planta (se aislaron como máximo 3 por planta) podrían provenir de un mismo microorganismo, que creció en diferentes lugares de la placa de cultivo de donde se aislaron. Los resultados de este capítulo muestran que no es el caso de los aislamientos de las plantas 5 y 9, ya que fueron identificados como diferentes especies: LBM 199₅ y LBM 200₅ pertenecen a *T. asperellum* y *T. hamatum*, respectivamente, mientras que LBM 203₉, LBM 204₉ y LBM 205₉ pertenecen a *T. asperellum*, *T. asperelloides* y *T. strigosellum*, respectivamente.
- no se logró identificar a nivel de especie el aislamiento LBM 202₈, siendo necesario realizar estudios utilizando diferentes marcadores moleculares a los que se emplearon en este trabajo para identificar este aislamiento con una especie ya documentada o determinar si se trata de una nueva especie del género *Trichoderma* (Kubicek *et al.*, 2019).

En este estudio ampliamos el conocimiento sobre la diversidad de especies de *Trichoderma* presentes en la rizósfera de yerba mate. Las especies identificadas en este trabajo –*T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. hamatum* y *T. strigosellum*– fueron aisladas de raíz de yerba mate, planta nativa de la provincia de Misiones donde el clima es subtropical²² y también fueron encontradas de manera coincidente por otros autores como habitantes de climas tropicales²³ (Hoyos-Carvajal & Bissett, 2011; López-Quintero *et al.*, 2013; Bae *et al.*, 2009).

En cuanto al carácter endofítico de estas especies aisladas de endorizósfera de yerba mate, también han sido aisladas como endófitos en otros cultivos (Tabla 2.1), exceptuando el caso de *T. strigosellum* que, a nuestro entender, aún no ha sido reportado como endófito en ningún cultivo. Una exhaustiva búsqueda bibliográfica indica que este trabajo es el primer reporte de caracterización de hongos endófitos de plantas de yerba mate.

Por otro lado, estos estudios son significativos ya que además estas especies de *Trichoderma* son especies que no se han reportado para esta región en este cultivo y, en general, son ya investigadas como potenciales agentes de promoción del crecimiento en otros cultivos (Harman *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2006; Hermosa *et al.*, 2012).

²² El clima subtropical de Misiones se debe a que está ubicada cerca del trópico de Capricornio. Por lo tanto, el verano es muy caluroso y húmedo, y el invierno es templado y con precipitaciones (<https://www.todo-argentina.net/geografia/provincias/misiones/clima.html>).

²³ Clima tropical: se caracteriza por ser caliente y húmedo durante la mayor parte del año. Es un clima propio de las regiones que se ubican en los trópicos.

CAPÍTULO 3

Aislamiento, identificación y selección de fitopatógenos fúngicos foliares de yerba mate

CAPÍTULO 3: Aislamiento, identificación y selección de fitopatógenos fúngicos foliares de yerba mate

3.1. RESUMEN

La importancia del cultivo de yerba mate para la región misionera y la escasa investigación sobre los fitopatógenos fúngicos causantes de enfermedades, hacen prioritario el estudio del agente causal. Para ello, es necesario la identificación de los hongos fitopatógenos que se presentan en un vivero o plantación, lo cual posibilita tanto la generación de información del rol ecológico de una especie determinada como las posibles consecuencias que potencialmente se pueden presentar y la manera de combatirlos. A medida que el cultivo de yerba mate se siga expandiendo, los problemas sanitarios se agudizarán aún más en el futuro. Por lo tanto, en este capítulo se muestran los ensayos realizados para lograr el aislamiento, identificación y selección de hongos patógenos de hoja de yerba mate que fueron utilizados en los ensayos *in vitro* de antagonismo que se muestran en el Capítulo 4, con el fin de evaluar el efecto antagónico de los aislamientos de *Trichoderma* endófitos para su potencial uso como bioinsumos. A partir de hojas de yerba mate que presentaban signos y/o síntomas de enfermedad se aislaron microorganismos fúngicos. Se evaluó la patogenicidad de estos aislamientos en hojas sanas de yerba mate y se seleccionaron aquellos que presentaron un porcentaje de severidad mayor al 5 %. Los aislamientos seleccionados fueron caracterizados utilizando herramientas morfológicas y moleculares, tal como se mencionó en el capítulo 2 para los aislamientos de raíz de yerba mate. El análisis de los resultados presentados en este capítulo nos permitió concluir que se obtuvieron 31 aislamientos fúngicos, de los cuales 17 fueron patógenos de hoja de yerba mate. Mediante la caracterización morfológica y molecular se obtuvo un diagnóstico de identidad confiable, que permitió identificar 9 aislamientos a nivel de género: *Alternaria* (2 aislamientos), *Colletotrichum* (2 aislamientos), *Epicoccum* (1 aislamiento), *Pestalotiopsis* (1 aislamiento), *Phoma* (2 aislamiento) y *Pillidium* (1 aislamiento). De los cuales, 2 aislamientos presentaron el mayor índice de severidad y fueron seleccionados para su utilización en los ensayos de antagonismo en cultivo dual en placa. Las especies del género *Alternaria*, *Colletotrichum* y *Phoma* han sido reportadas como patógenos de hojas de yerba mate. Además, este trabajo contribuye con el aporte de patógenos fúngicos que afectan las hojas de yerba mate que aún no han sido reportados como tales: los géneros *Pestalotiopsis*, *Pillidium* y *Epicoccum*.

3.2. INTRODUCCIÓN

Como se mencionó en el capítulo 1 de este trabajo de tesis, el control de enfermedades de plantas tal como la yerba mate, se basa principalmente en la utilización de pesticidas químicos. La necesidad de una agricultura sustentable conduce a la búsqueda de soluciones amigables con el medio ambiente tal como el uso de agentes de biocontrol. Al igual que los microorganismos beneficiosos se pueden aislar de plantas de yerba mate de una región en particular (Capítulo 2), también es propicio aislar hongos fitopatógenos de la misma zona y plantas donde se pretende aplicar el agente de biocontrol.

3.2.1 Hongos fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos son responsables del 80 % de las enfermedades¹ presentes en las plantas (Manzo Sánchez *et al.*, 2005). Más de 10.000 especies de hongos pueden causar enfermedades en una amplia variedad de plantas diferentes (Horbach *et al.*, 2011), la mayoría de estos hongos pertenecen a la división *Ascomycota* (Schoch *et al.*, 2009). Estos patógenos pueden reproducirse asexualmente y/o sexualmente, y son capaces de superar las defensas inmunitarias de las plantas y de ingresar a los tejidos (Shuping & Eloff, 2017). La mayoría de los hongos patógenos que afectan a las plantas presenta un ciclo de reproducción asexual (hongos imperfectos), los cuales son capaces de reproducirse principalmente en hojas, frutos o tallos infectando los tejidos.

Cuando un patógeno se desarrolla en el tejido vegetal se observan **signos** de su presencia, es decir, las estructuras del patógeno que suelen aparecer sobre la superficie de las plantas y se ven a simple vista (Balatti *et al.*, 2019). Entre los signos más frecuentes se pueden mencionar: eflorescencia (por ejemplo, oídios o fumagina), puntuaciones negras, pústulas, masas carbonosas, esclerocios, entre otros. Los **síntomas** son los cambios de forma, color y estructura que ocurren en las plantas como respuesta a la acción de los agentes bióticos y abióticos, la visualización de síntomas sugiere la presencia de la enfermedad. El reconocimiento de los síntomas en una planta enferma es crucial para el diagnóstico de las enfermedades (Balatti *et al.*, 2019). Los síntomas más frecuentes son clorosis, manchas necróticas, pudrición, entre otros. En la Figura 3.1, se muestran algunas imágenes representativas de signos y síntomas en hojas de diferentes plantas.

¹ Alteraciones de la fisiología normal de una planta producidas por la acción persistente de agentes bióticos o abióticos que generalmente derivan en modificaciones morfológicas visibles, variables desde alteraciones apenas perceptibles hasta la muerte de la planta.

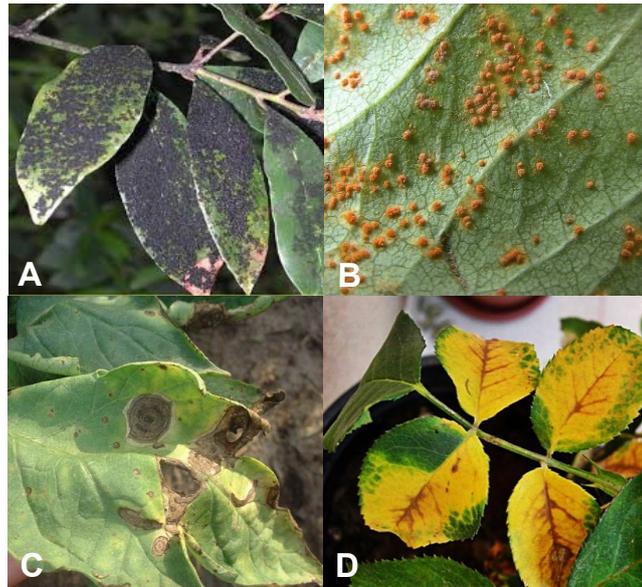


Figura 3.1. Imágenes de signos A. Fumagina B. Pústulas. Imágenes de síntomas C. Manchas necróticas D. Manchas cloróticas.²

El desarrollo del patógeno en el tejido vegetal ocurre mediante la reproducción de conidios sobre las hifas o en estructuras multihifales especializadas como sinema, picnidios, acérvulos o esporodoquios (Figura 3.2) (Cabrera, 2015).

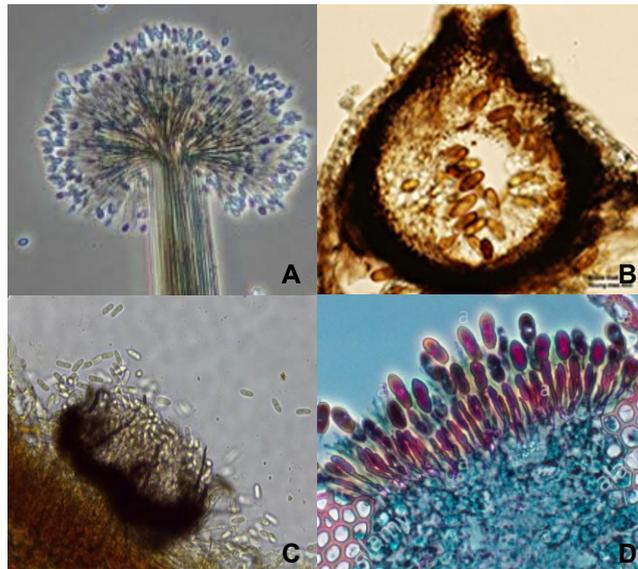


Figura 3.2. Estructuras multihifales productoras de conidios A. Sinema de *Graphium* spp. B. Picnidio C. Acérvulo de *Colletotrichum* spp. D. Esporodoquio de *Puccinia* spp.³

² Fuente: A. <https://www.massogarden.com/> B. <https://huertofamiliar.wordpress.com/>. C. <http://www.pv.fagro.edu.uy/>. D. <https://www.plantasyjardines.es/agallas-en-plantas/> – Revisado el 25 de febrero de 2021.

³ Fuente: A. <http://bdi.conabio.gob.mx/> B. <https://macronaturaleza.com/> C. <https://www.infectario.ufv.br/> D. <https://www.alamy.es/> – Revisado 22 de febrero de 2021

3.2.1.1 Aislamiento de patógenos fúngicos y pruebas de patogenicidad

En la Figura 3.3, se muestran los pasos a seguir cuando se pretende aislar un patógeno fúngico de una determinada planta y probar su patogenicidad.

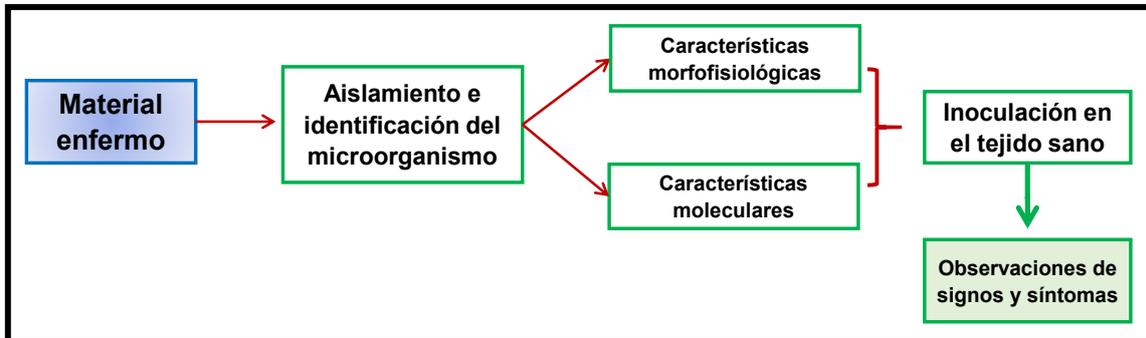


Figura 3.3. Esquema de pasos a seguir para determinar la patogenicidad de un microorganismo aislado.

Una vez aislado, el hongo debe reintroducirse en el tejido vegetal sano con el fin de observar si produce los mismos signos y/o síntomas que se observaron en un principio en la planta. Para ello, el tejido vegetal es inoculado con propágulos (micelio, esporas, conidios y/o clamidosporas) del hongo, se coloca el material vegetal inoculado en una “cámara húmeda”⁴ (Figura 3.4) y se incuba a la temperatura adecuada durante el tiempo necesario para ver si se producen signos y/o síntomas.

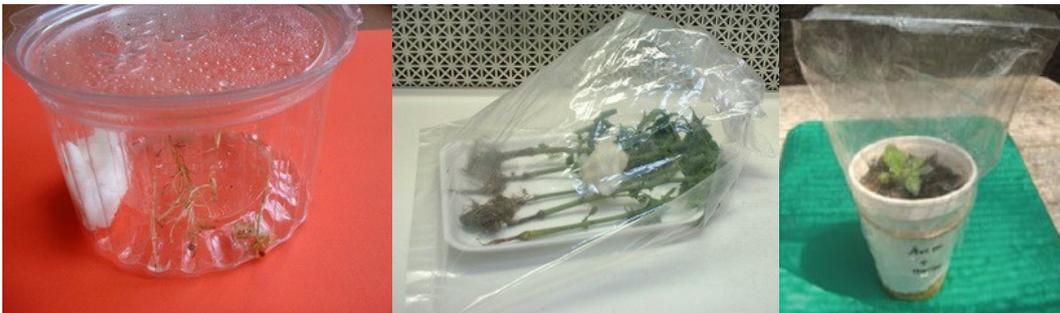


Figura 3.4. Diferentes tipos de cámaras húmedas utilizadas para ensayos de patogenicidad⁵.

A partir del tejido dañado, se realiza el aislamiento del hongo inoculado, y sus características morfológicas y/o moleculares son comparadas con las del aislamiento original para determinar si se trata del mismo microorganismo. Las lesiones causadas por el hongo son comparadas con las registradas en la bibliografía para especies del género identificado.

3.2.2 Hongos causantes de enfermedades

Existe una amplia variedad de géneros de hongos *Ascomycota* que son patógenos de una gran cantidad de cultivos de interés agronómico, los cuales causan diversos signos y/o síntomas en diferentes tejidos. La mayoría de los hongos fitopatógenos pertenecen a los géneros *Alternaria*,

⁴ Cámara húmeda es un sistema cerrado capaz de mantener una atmósfera saturada de humedad bajo condiciones estables de temperatura.

⁵ Primer y segunda foto, fuente: http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursos/fitopato/practicas/Camara_humeda.html - Revisada el 22 de febrero de 2021. Tercera foto hacia la derecha: Adaptada de Gil Rivero *et al.* (2017).

Aspergillus, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Verticillium*, entre otros (Sharma *et al.*, 2017). A continuación, se mencionan algunas características y enfermedades causadas por algunos de estos géneros.

Las especies del género *Alternaria* se conocen como patógenos vegetales graves, que causan pérdidas importantes en una amplia gama de cultivos (Woudenberg *et al.*, 2013). Estos patógenos son necrotróficos y producen lesiones rodeadas de áreas cloróticas en hojas y tallos provocando la reducción de las áreas fotosintéticas, defoliación y senescencia en la planta (Kumar *et al.*, 2014). La taxonomía de *Alternaria* se basa principalmente en la morfología y el desarrollo de conidios polimorfos individuales en cadenas con tabiques longitudinales y transversales y conidióforos simples o ramificados, de color marrón (Kumar *et al.* 2014). En la Figura 3.5, se muestran los síntomas ocasionados por *A. brassicae* y *A. brassicicola* en hojas de mostaza, y un conidio de *Alternaria* sp.



Figura 3.5. A. Síntomas de mancha foliar causada por *A. brassicae* y B. *A. brassicicola* en mostaza C. Conidios de *A. brassicae*. Adaptada de Kumar *et al.* (2014).

Colletotrichum es uno de los géneros más importantes de hongos fitopatógenos con más de 200 especies conocidas por causar enfermedades en cultivos de plantas en todo el mundo (de Silva *et al.*, 2019). Las especies de *Colletotrichum* causan enfermedades económicamente significativas en las plantas, la más común es la denominada antracnosis (Figura 3.6.A), que afecta una amplia variedad de cultivos, principalmente en hortalizas y frutos (Cano *et al.*, 2004; de Silva *et al.*, 2019). Las características morfológicas que identifican al género son sus conidiomas acervulares (Figura 3.6.B), a menudo con setas⁶, que producen conidios viscosos alargados y, en algunos casos, la presencia de apresorios⁷.

⁶ Setas: hifas estériles de paredes gruesas, pigmentadas oscuras y no ramificadas con punta, parecidas a una espina.

⁷ Apresorio: estructuras de forma achatada, de las que suelen surgir hifas infectivas.

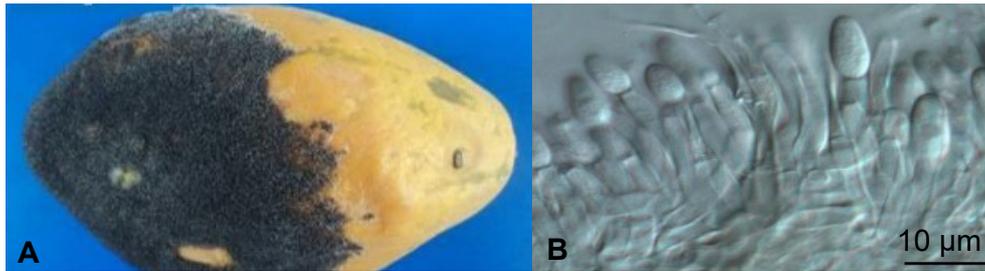


Figura 3.6. A. Mango con signos causados por *Colletotrichum*. Adaptada de Gonçalves Ribeiro *et al.* (2016) B. Conidióforos y conidios de *C. javanense*. Adaptada de Silva *et al.* (2019).

Las especies del género *Epicoccum* causan diversas enfermedades en las plantas, siendo la más común la mancha foliar. La morfología del género *Epicoccum* se caracteriza por la producción de clamidosporas color marrón de forma ovoide y conidios de color marrón, mayormente globosos (Aveskamp *et al.*, 2010). En la Figura 3.7, se muestran imágenes representativas de las lesiones ocasionadas por *Epicoccum* en cactus y una imagen representativa de la morfología de las especies de este género.

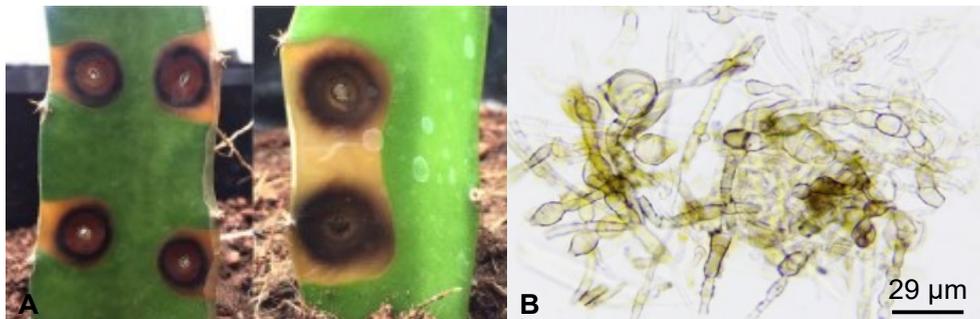


Figura 3.7. A. Cactus con síntomas y signos causados por *E. sorghinum*. B. Conidios de *E. sorghinum*. Adaptada de Darby *et al.* (2020).

Las especies de *Pestalotiopsis* son fitopatógenos comunes que causan una variedad de enfermedades como canchros, muerte regresiva, manchas foliares, clorosis severa, pudrición de la fruta, entre otras (Maharachchikumbura *et al.*, 2014). Las especies de *Pestalotiopsis* reducen la producción y causan pérdidas económicas en manzana, arándano, jengibre, vid, guayaba, avellana, mango, orquídea, entre otros cultivos. Las características morfológicas de las especies de este género se caracterizan por la presencia de conidios de 5 celdas de color marrón de forma ovoide o fusiformes⁸, terminales, hialinos, simples o ramificados (Figura 3.8.B-C) (Maharachchikumbura *et al.*, 2014). En la Figura 3.8, se muestran imágenes representativas de las lesiones ocasionadas por *Pestalotiopsis* en el tejido vegetal y dos imágenes representativas de la morfología de las especies de este género.

⁸ Fusiforme: forma alargada, elipsoide y con las extremidades más estrechas que el centro.

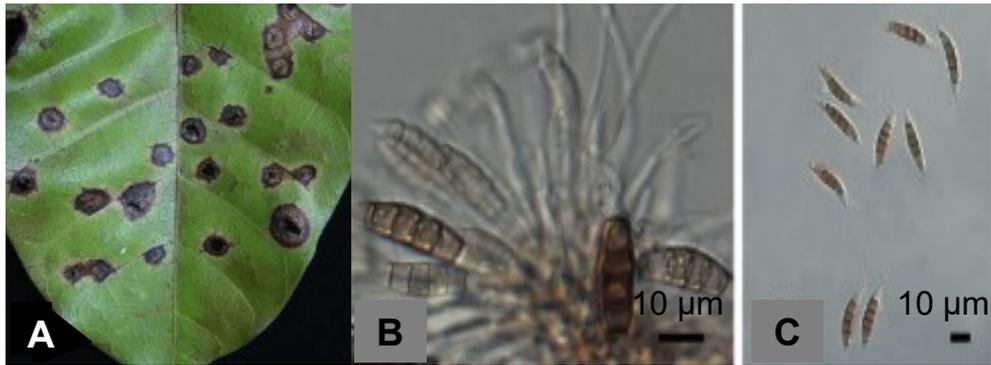


Figura 3.8. A. Manchas foliares causadas por *Pestalotiopsis* sp. en mango. B. Célula conidiógenas y C. conidios de *P. pezizoides*. Adaptada de Maharachchikumbura *et al.* (2014).

Las especies del género *Phoma* se han encontrado en asociación con una amplia variedad de plantas, causando principalmente manchas en las hojas y el tallo (Aveskamp *et al.*, 2010). Las especies de este género se caracterizan por la presencia de conidiomas picnidiales, solitarios, subglobosos; las filídes son hialinas, lisas y los conidios suelen ser oblongos a elipsoidales, de paredes lisas y delgadas, hialinos y a veces septados (Chen *et al.*, 2015). En la Figura 3.9, se muestran imágenes de las lesiones de *Phoma* en el tejido vegetal y de estructuras microscópicas reproductivas.

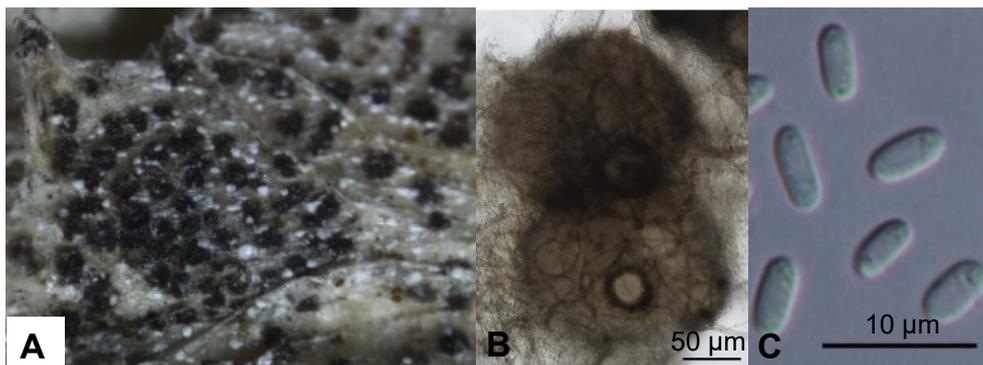


Figura 3.9. A. Picnidios en el sustrato del hospedador. B. Picnidio y C. conidios de *P. herbarum*. Adaptada de Maharachchikumbura *et al.* (2014).

Las especies del género *Pilidium* causan enfermedades en las plantas y los árboles, como la pudrición de color marrón tostado de la frutilla causada por *P. lythri* (Torbati *et al.*, 2019). Las especies del género *Pilidium* presentan picnidios cerrados color marrón claro a negros y los conidios suelen ser fusiformes con punta curvada de tamaño pequeños y de color claro (Rossman *et al.*, 2004). También, suelen verse esporodoquios con masas de conidios viscosas y anaranjadas (Torbati *et al.*, 2019). En la Figura 3.10, se muestran imágenes de la pudrición en frutilla e imágenes de estructuras microscópicas reproductivas de este género.

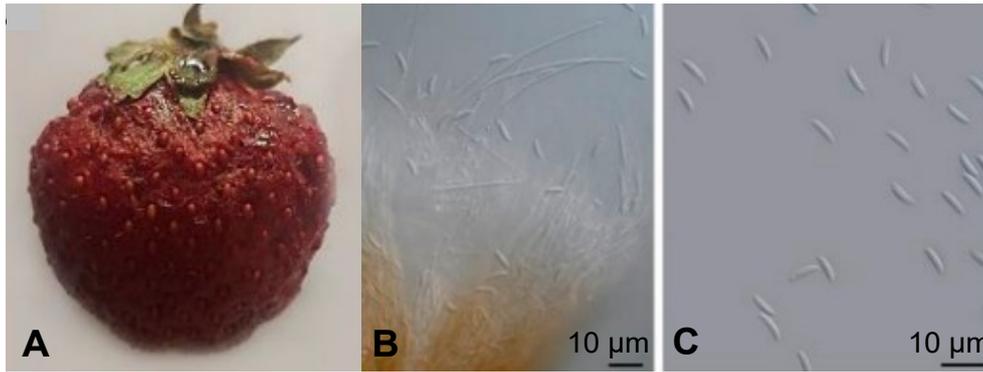


Figura 3.10. A. Frutos sintomáticos de frutilla infectados con *P. lythri* B. Conidióforos y células conidiógenas y C. conidios de *P. lythri*. Adaptada de Torbati *et al.* (2019).

3.2.3 Hongos fitopatógenos en el cultivo de yerba mate

Tal como se mencionó en el Capítulo 1, en la zona productora yerbatera de la provincia de Misiones, se ha observado la presencia de distintas enfermedades tanto en las plantaciones de yerbales como en plantines en etapa de vivero, de las cuales hay muchas en las que no se conoce el agente causal, la epidemiología y el potencial de daño económico (Rybak *et al.*, 2014). Estas enfermedades están asociadas al aumento del área de plantación, domesticación del cultivo, prácticas agrícolas inadecuadas y la reducción del espaciamiento entre las plantas, lo cual favorece el desarrollo de enfermedades y la dispersión de patógenos, ocasionando problemas fitosanitarios en el cultivo (Maidana Ojeda *et al.*, 2016).

Entre los géneros de los hongos fitopatógenos mencionados anteriormente, varios de ellos han sido reportados como patógenos de yerba mate, tal como se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Hongos patógenos de yerba mate y origen del aislamiento.

Género	Especie	Origen	Referencia
<i>Alternaria</i>	sp.	Suelo de monocultivo	Rolim Borges <i>et al.</i> (2011)
		Hojas, ramas y tallos	Capellari <i>et al.</i> (2017)
<i>Colletotrichum</i>	<i>acutatum</i>	Hojas jóvenes	Gomes <i>et al.</i> (2001)
<i>Epicoccum</i>	sp.	Suelo y semillas	Grigoletti <i>et al.</i> (1998)
<i>Phoma</i>	sp.	Hojas, ramas y tallos	Rybak <i>et al.</i> (2014)

3.2.4 Control de enfermedades

El control de la enfermedad se ha basado principalmente en el uso de fungicidas, los cuales juegan un papel importante en el manejo de diversas enfermedades de las plantas. Muchos estudios, han reportado que la utilización de fungicida en algunos cultivos no fue eficaz, sumado a los problemas ambientales debido a su uso excesivo (Mercader *et al.*, 2006) y, además, debido a esto los patógenos pueden desarrollar resistencia al producto químico utilizado (Vinodkumar *et al.*, 2017). Además de todo lo mencionado, los fungicidas pueden afectar a organismos que no son el objetivo, lo que da como resultado la pérdida de microflora y fauna beneficiosas (Vinodkumar *et al.*, 2017). Estos problemas causados por los fungicidas aplicados a diferentes cultivos, ha incentivado investigaciones orientadas a proporcionar nuevas alternativas de control que disminuyan los residuos de agrotóxicos,

incorporando medidas de manejo cultural y biológico (Mercader *et al.*, 2006). En este contexto, aparece como una alternativa viable la aplicación de microorganismos que actúan como agentes de control biológico (BCA). El control biológico realizado con especies del género *Trichoderma* ofrece un manejo prometedor para las enfermedades de las plantas (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). Algunas especies de *Trichoderma* que actúan como BCA, restringen el crecimiento y establecimiento de patógenos vegetales a través de diferentes modos de acción, los cuales incluyen competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo por secreción de diversas enzimas hidrolíticas, exudación de metabolitos secundarios antimicrobianos, inducción de resistencia sistémica y promoción del crecimiento de las plantas (Vinodkumar *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta la importancia del cultivo de yerba mate para la región y la escasa investigación sobre los fitopatógenos fúngicos causantes de enfermedades, es prioritario el diagnóstico correcto y estudio del agente causal en cultivos de yerba mate. Para ello, es necesario la identificación de los hongos fitopatógenos que se presentan en un vivero o plantación, lo cual posibilita tanto la generación de información del rol ecológico de una especie determinada como las posibles consecuencias que potencialmente se pueden presentar y la manera de combatirlos (Ochoa *et al.*, 2007). Por lo tanto, en este capítulo se muestran los ensayos realizados para lograr el aislamiento, identificación y selección de hongos patógenos de hoja de yerba mate que fueron utilizados en los ensayos *in vitro* de antagonismo que se muestran en el Capítulo 4, con el fin de evaluar el efecto antagónico de los aislamientos de *Trichoderma* endófitos para su potencial uso como bioinsumos.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Recolección del material vegetal

Se seleccionaron 10 plantas de yerba mate de un año de vida que presentaban signos y/o síntomas visibles de alguna patología en sus hojas. Las plantas se encontraban en el vivero de la Fundación Alberto Roth, Santo Pipó, Misiones, Argentina (ubicación mencionada en el Capítulo 2), de las cuales se recolectaron 13 hojas con signos y/o síntomas de enfermedad (Figura 3.5).

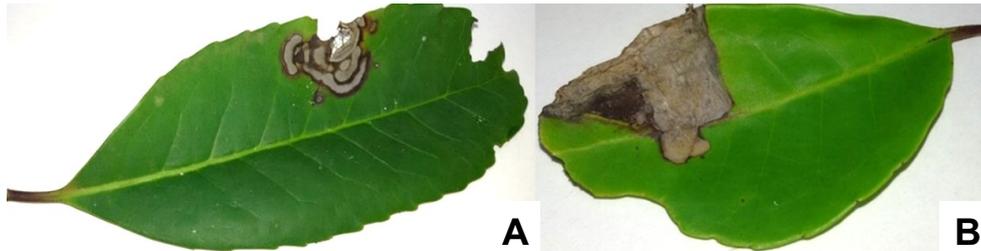


Figura 3.5. Ejemplares de hojas de yerba mate recolectadas con signos y/o síntomas visibles de patologías.

Las muestras recolectadas se transportaron en bolsas plásticas refrigeradas al InBioMis, donde se conservaron a 4 °C por no más de 24 hs.

3.3.2 Aislamiento de microorganismos fúngicos

Las hojas se cortaron en pequeñas porciones con signos y/o síntomas de infección y tejido sano, se tomaron 5 porciones por hoja y se realizó un protocolo de sanitización como se indica en la Figura 3.6.

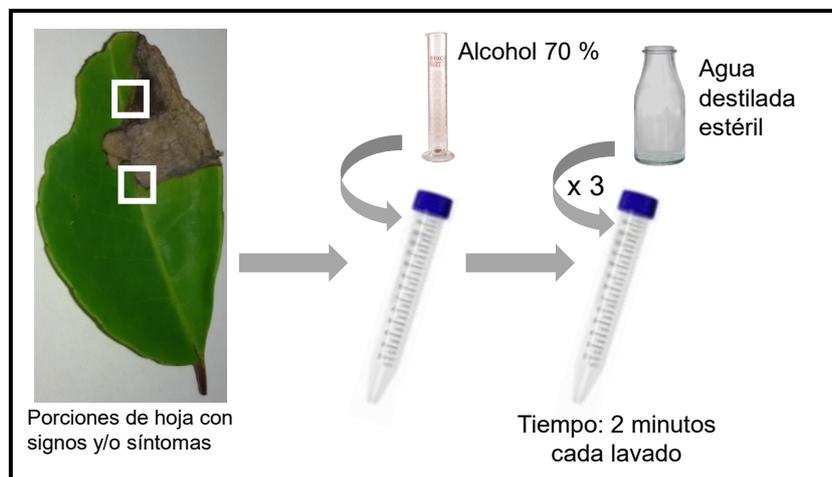


Figura 3.6. Protocolo de sanitización realizado a los pequeños fragmentos de hoja con signos y/o síntomas de enfermedad.

Para el aislamiento de los microorganismos fúngicos, se utilizó el protocolo sugerido por Agrios (2005) (Figura 3.7) en el cual pequeñas porciones de hoja desinfectadas se colocaron en placas de Petri con medio agar-agua al 2 % p/v (con 50 mg/ml de cloranfenicol para evitar el desarrollo de colonias bacterianas) y se incubaron a 28 °C, hasta la visualización de colonias fúngicas. Se evaluó diariamente el crecimiento de colonias en las placas, cuando se observó la presencia de micelio

desarrollado, se seleccionaron colonias con diferentes características macroscópicas, las cuales fueron repicadas en agar-agua al 2 % p/v y se incubaron a 28 °C hasta desarrollo de la colonia.

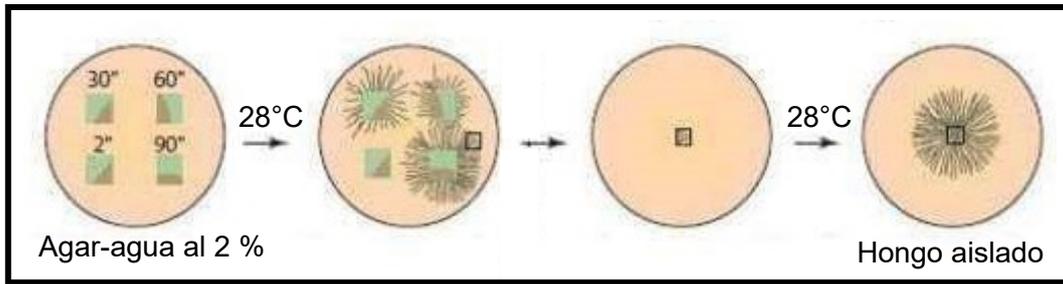


Figura 3.7. Protocolo realizado para el aislamiento de colonias fúngicas a partir de material vegetal dañado. Adaptada de Agrios (2005).

3.3.3 Mantenimiento y crecimiento de los aislamientos

Los aislamientos fúngicos fueron almacenados y mantenidos a 4 °C en viales como se mencionó en la Sección 2.3.3 *Mantenimiento de los cultivos*. La activación de los aislamientos, consistió en repicarlos con un ansa estéril en PDA e incubarlos a 28 °C durante 7 días.

3.3.4 Ensayos de patogenicidad *in vitro*

Para la realización de este ensayo, se recolectaron hojas sanas de plantas de yerba mate de un año que no fueron sometidos a tratamiento con herbicidas, fungicidas u otro tipo de agroquímico. Se utilizaron 32 tratamientos, incluido el control, de tres repeticiones cada uno, y la variable de estudio fue el daño ocasionado por el microorganismo mediante el cálculo del índice de severidad.

Para la inoculación de las hojas, se siguió el protocolo descrito por Imathiu *et al.* (2009), con modificaciones. En la Figura 3.8, se muestra el protocolo de desinfección de las hojas y las partes que constituyen la cámara húmeda⁹.

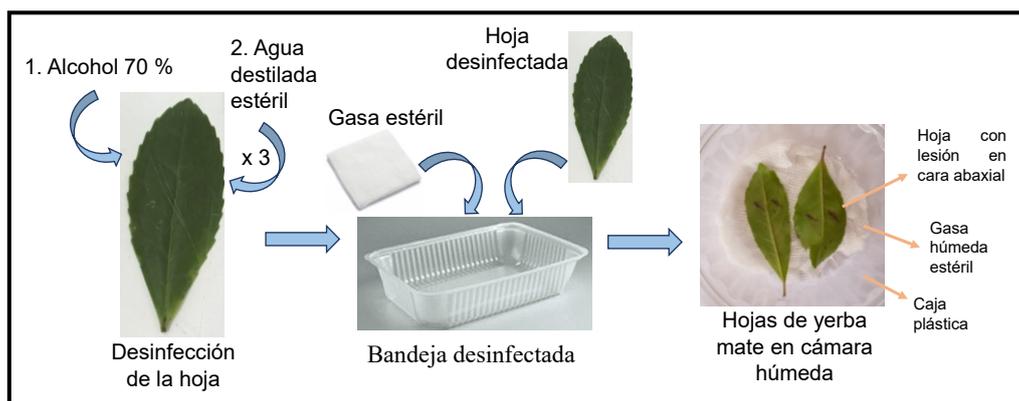


Figura 3.8. Protocolo de desinfección de hojas de yerba mate y las partes que conforman la cámara húmeda.

Dentro de la bandeja plástica, a las hojas se les realizó un pequeño corte con un bisturí estéril a ambos lados del nervio principal, se colocó un disco de PDA con micelio desarrollado de los

⁹ Bandejas plásticas desinfectadas en el interior con alcohol 70 % v/v, gasa estéril humedecida con agua destilada estéril sobre la base y tapa plástica.

aislamientos fúngicos y se tapó la bandeja, obteniendo la cámara húmeda. Como control negativo, se utilizaron hojas desinfectadas sin el agregado de disco con micelio. Las cámaras húmedas se incubaron a 28 °C durante 14 días en presencia de luz. Luego, en aquellas hojas que presentaron signos/síntomas, se midió el área de la lesión utilizando el programa Image J (Schneider *et al.*, 2012). Con estas mediciones se calculó el índice de severidad empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de severidad (\%)} : \frac{\text{Superficie del halo de crecimiento} \times 100}{(\text{Superficie foliar total}/2)}$$

Los valores obtenidos para cada aislamiento fúngico fueron comparados con una escala para determinar si la prueba de patogenicidad resultó positiva o negativa, la cual se muestra en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Escala de patogenicidad de los aislamientos fúngicos según el índice de severidad.

Índice de Severidad	Prueba de patogenicidad
Ausencia completa de crecimiento	Negativa
Igual o menor a 5 %	Negativa
Mayor a 5 %	Positiva

Se tomó una porción de aquellas hojas que presentaron signos y/o síntomas de enfermedad, y se visualizó en el microscopio con el fin de observar estructuras características del hongo inoculado.

3.3.5 Caracterización morfológica y molecular de los aislamientos fúngicos

Los aislamientos que fueron positivos en la prueba de patogenicidad, se seleccionaron para ser identificados mediante caracterización morfológica y molecular tal como se mencionó en el Capítulo 2 para los aislamientos de *Trichoderma*. La identificación molecular se llevó a cabo utilizando los marcadores moleculares ITS, y con las secuencias obtenidas de los aislamientos y las descargadas de la base de datos, se construyó un árbol filogenético tal como se mencionó en el Capítulo 2 para los aislamientos de *Trichoderma*.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Aislamiento de microorganismos fúngicos

Se logró obtener un total de 31 aislamientos fúngicos relacionados con signos y/o síntomas de enfermedad en hojas de yerba mate. A los aislamientos se les asignó un código interno para poder relacionarlos con la hoja de la cual fueron aislados (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Signos y/o síntomas observados en las muestras y código de los aislamientos.

Hojas	Signos y/o síntomas	Código del aislamiento
1	Zonas con leve clorosis	H1A1
	Pequeñas estructuras blanquecinas	1A
2	Gran mancha necrótica grisácea Estructuras blancas miceliales	H2A2
		2A2
		H2C
		H2D
3	Mancha necrótica negra	HPV1
		HPV2
		HPV3
4	Estructuras blancas miceliales	O4B
		H4A
5	Marchitamiento Bordes necróticos	I1
		I2
		I3A
		I5B
6	Manchas cloróticas Marchitamiento	II3
7	Marchitamiento	III1
		III2
8	Estructuras blancas Marchitamiento	IVA
9	Bordes necróticos	V1
		V1B
		V12
10	Manchas necróticas negras Marchitamiento generalizado	VI1
11	Manchas necróticas negras Marchitamiento generalizado	VII1A
		VII1B
		VII2A
		VII2B
12	Manchas necróticas negras Marchitamiento generalizado	X1
		X2
		X3
13	Manchas necróticas negras Marchitamiento generalizado	XI1
		XI2

3.4.2 Ensayos de patogenicidad *in vitro*

En la Figura 3.9, se muestran imágenes representativas de los resultados obtenidos del ensayo de patogenicidad en hojas de yerba mate con diferentes aislamientos.

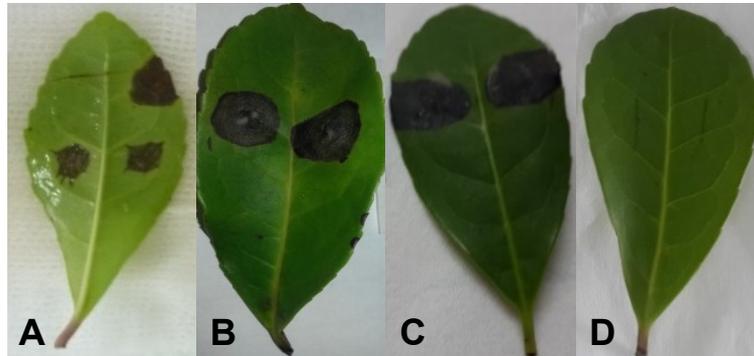


Figura 3.9. Imágenes de hojas de yerba mate inoculadas con: **A.** H4A **B.** V1 **C.** VII2A **D.** Control.

En estas imágenes se pueden observar el daño que ocasionaron algunos aislamientos sobre el material inoculado en comparación con el control, en el cual no se observaron lesiones. Todos los aislamientos fueron capaces de dañar el tejido en menor o mayor medida, en comparación con el control. En la mayoría de las hojas infectadas con los diferentes aislamientos, se observaron lesiones de forma casi ovalada –en algunos casos, superando el diámetro del disco de PDA– color marrón oscuro/negro caracterizadas por necrosis del tejido. Además, en algunas muestras, se observó micelio del microorganismo inoculado.

En la Tabla 3.4, se muestra el porcentaje del índice de severidad de los diferentes aislamientos en la hoja de yerba mate. Como se mencionó en la [Sección 3.3.4](#), se consideran como positivos en el ensayo de patogenicidad aquellos aislamientos que presentaron un índice de severidad > 5 %.

Tabla 3.4. Patogenicidad de los aislamientos fúngicos. (+): Positivo. (-): Negativo.

N° de aislamiento	Código del aislamiento	Índice de severidad (%)	Criterio de patogenicidad
1	H1A1	25	+
2	A1	8	+
3	H2A2	2	-
4	2A2	3	-
5	H2C	3	-
6	H2D	4	-
7	HPV1	2	-
8	HPV2	2	-
9	HPV3	18	+
10	O4B	1	-
11	H4A	10	+
12	I1	1	-
13	I2	18	+
14	I3A	3	-
15	I5B	13	+
16	II3	2	-
17	III1	2	-
18	III2	20	+
19	V1	12	+
20	VIB	13	+
21	VI2	6	+
22	VI1	3	-
23	VII1A	9	+
24	VII1B	4	-
25	VII2A	23	+
26	VII2B	17	+
27	X1	19	+
28	X2	18	+
29	X3	18	+
30	XI1	2	-
31	XI2	20	+

Los resultados mostraron que 17 aislamientos presentaron un índice de severidad > 5 %, por lo tanto, se consideraron positivos en la prueba de patogenicidad.

En la Figura 3.10, se muestra un esquema de la selección de los aislamientos que serán utilizados en el ensayo de antagonismo de cultivo dual *in vitro* (Capítulo 4).

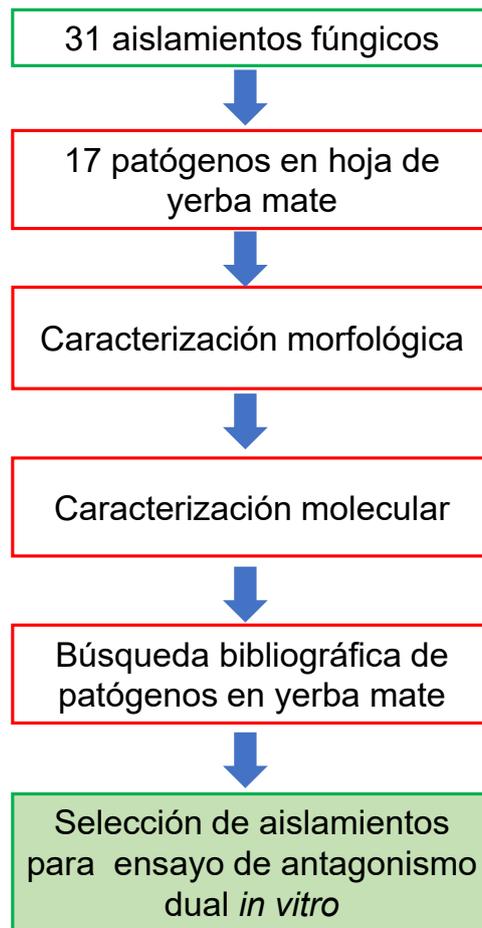


Figura 3.10. Esquema realizado para seleccionar los aislamientos que serán utilizados en el ensayo de antagonismo dual *in vitro*.

3.4.3 Asignación de género a los aislamientos fúngicos

3.4.3.1 A través de caracterización morfológica

Los aislamientos fúngicos fueron agrupados según características micromorfológicas similares. A continuación, se muestran imágenes representativas de la colonia desarrollada en PDA, estructuras microscópicas de los aislamientos a partir de la colonia y en las hojas de yerba mate. Estas características se resumen en la Tabla 3.5.

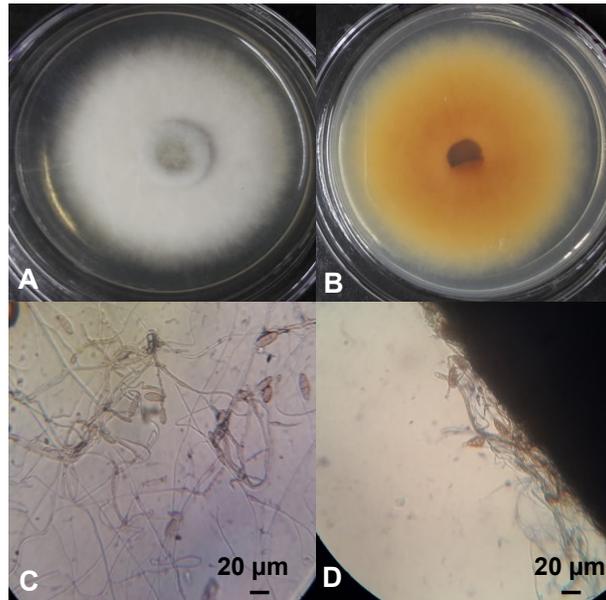


Figura 3.11. Imágenes representativas de los aislamientos del Grupo 1, conformado por HPV3, VII1A, VII2A, VII2B. **A.** Anverso y **B.** Reverso de la colonia del aislamiento VII2A crecidos en PDA durante 7 días. **C.** Conidios de HPV3 observados de muestra de la colonia crecida en PDA. **D.** Conidios observados al microscopio de la hoja infectada con el aislamiento VII2A.

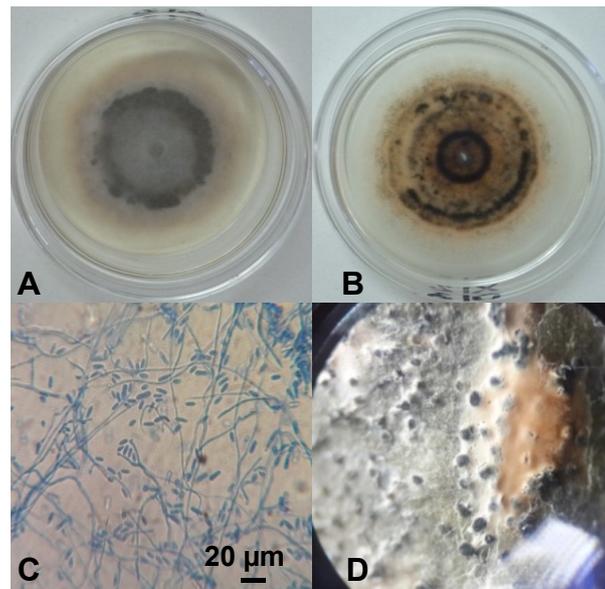


Figura 3.12. Imágenes representativas del Grupo 2, conformado por V1, VI2, X1, X3, XI2. **A.** Anverso y **B.** Reverso de la colonia de X1, luego de siete días de desarrollo en PDA. **C.** Conidios unicelulares hialinos observados en el microscopio de XI2. **D.** Presencia de micelio rosáceo del aislamiento V1 en lesiones foliares de yerba mate.

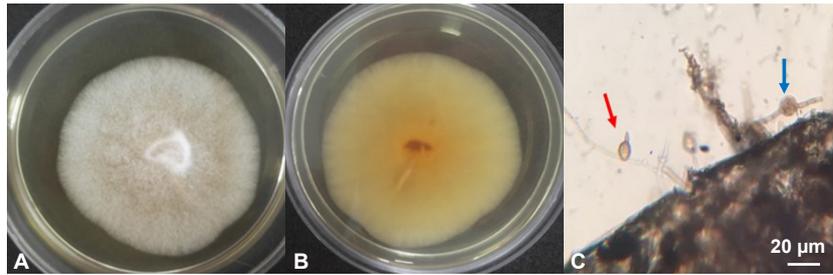


Figura 3.13. Imágenes del Grupo 3 representado por III2. **A.** Anverso y **B.** Reverso de la colonia luego de 7 días de desarrollo en PDA. **C.** Corte transversal de la hoja de yerba mate infectada. Flecha roja: conidio; flecha azul: clamidospora.

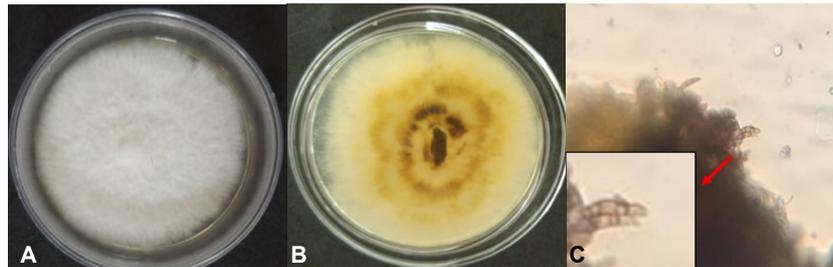


Figura 3.14. Imágenes del Grupo 4 representado por I2. **A.** Anverso y **B.** Reverso de la colonia de I2 luego de 5 días de desarrollo en PDA. **C.** Corte transversal de la hoja infectada con I2.

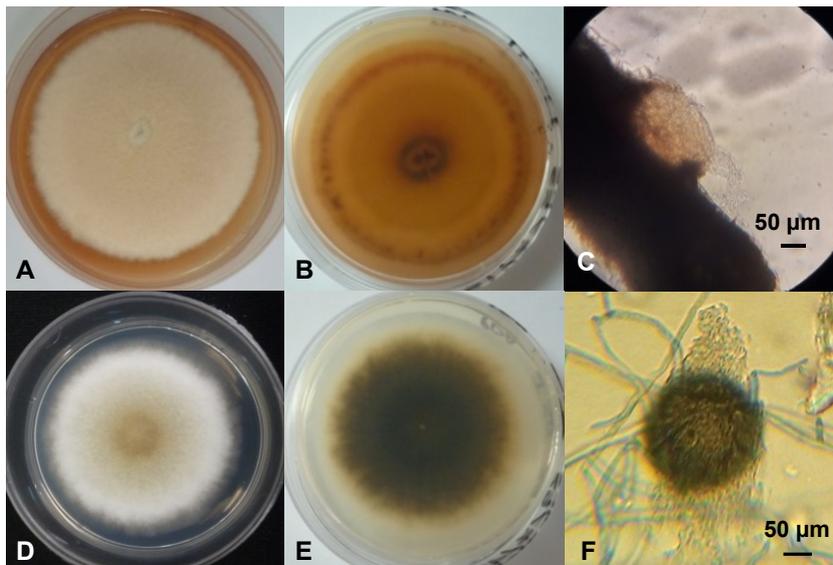


Figura 3.15. Imágenes representativas del Grupo 5, conformado por H1A1 e I5B. **A.** Anverso y **B.** Reverso de la colonia de H1A1 crecida en PDA durante 7 días **C.** Picnidio observado de muestras de hojas de yerba mate infectadas con H1A1. **D.** Anverso y **E.** Reverso de la colonia de I5B crecida en PDA a los 7 días **F.** Picnidio observado a partir de muestra de la colonia desarrollada de I5B en PDA.

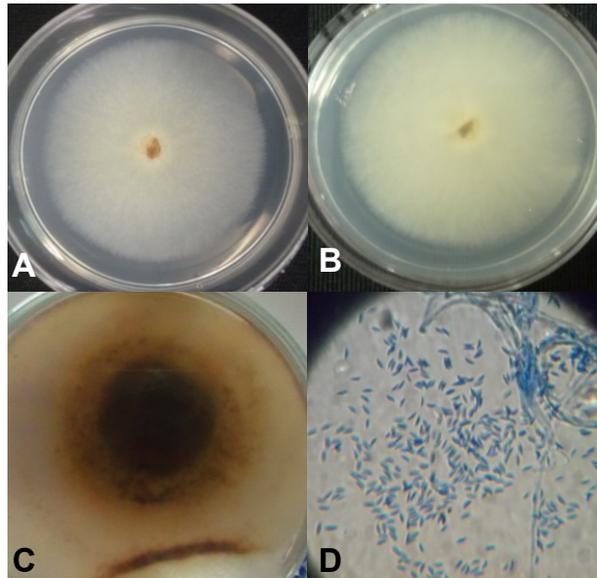


Figura 3.16. Imágenes del Grupo 6 conformado por H4A. **A.** Anverso y **B.** Reverso de la colonia crecida en PDA luego de 7 días **C.** Reverso de la colonia crecida en PDA luego de 12 días **D.** Conidios observados a partir de la colonia desarrollada en PDA.

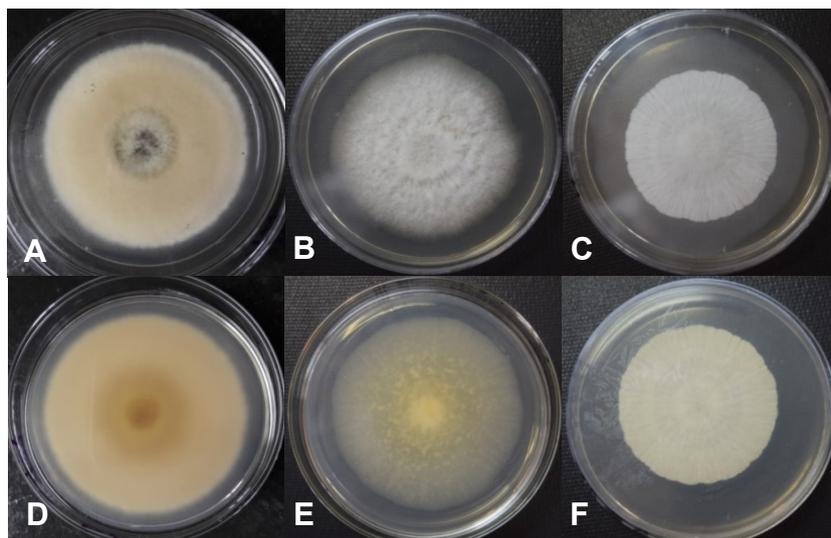


Figura 3.17. Imágenes de la colonia de los aislamientos del Grupo 7 conformado por A1, VIB y X2. Anverso de **A.** A1 **B.** VIB y **C.** X2. Reverso de **D.** A1 **E.** VIB y **F.** X2, luego de 7 días de desarrollo en PDA.

Tabla 3.5. Características morfológicas de los aislamientos fúngicos de hoja de yerba mate.

Grupo	Aislamientos	Características macroscópicas	Estructuras microscópicas observadas a partir de la colonia crecida en PDA		Estructuras microscópicas observadas en la hoja inoculada
			Conidios	Otras estructuras	
Grupo 1 (Figura 3.12)	HPV3*	Aspecto algodonoso. Anverso: gris. Reverso: marrón claro	Marrones, forma ovoidal de gran tamaño con septos. Dispuestos en cadena de 2 o 3, o individuales	Hifas septadas color marrón	Conidios como se describió para la colonia crecida en PDA
	VII1A	Aspecto algodonoso.			
	VII2A	Anverso: marrón claro.			
	VII2B	Reverso: marrón oscuro			
Grupo 2 (Figura 3.13)	V1	Aspecto algodonoso. Anverso: gris. Reverso: rosa con formación de anillos concéntricos	Hialinos. Forma cilíndrica, alargados, solitarios	Hifas septadas hialinas. Acérvulos marrones	Acérvulos marrones. Conidios como se describió para la colonia crecida en PDA
	VI2				
	X1				
	X3				
	XI2				
Grupo 3 (Figura 3.14)	III2	Anverso: color blanco a rosa pálido. Reverso: naranja	ND	Clamidosporas marrones de forma globosa intercalares y solitarias	Conidios marrones claro, solitarios de forma globosa
Grupo 4 (Figura 3.15)	I2	Aspecto algodonoso. Anverso: blanco. Reverso: marrón oscuro en el centro con anillos más claros hacia los bordes	ND	ND	Conidios: Fusiformes, ligeramente curvados, septados, y de color marrón claro
Grupo 5 (Figura 3.16)	H1A1	Anverso: rosado. Reverso: anaranjado/marrón claro con formación de anillos concéntricos	ND	Picnidios globosos, marrones y de gran tamaño. Hifas hialinas septadas	Picnidios como se describió para la colonia crecida en PDA
	I5B	Aspecto algodonoso. Anverso: marrón claro y blanco hacia los bordes. Reverso: negro			
Grupo 6 (Figura 3.17)	H4A	Anverso: blanco. Reverso: amarillo. Crecimiento lento. Luego de 12 días de crecimiento en PDA, colonia marrón con círculos concéntricos y presencia de picnidios	A los 12 días, conidios fusiformes con extremos puntiagudos aglomerados en masa	Hifas hialinas	ND
Grupo 7 (Figura 3.18)	A1	Anverso: marrón claro con centro gris. Reverso: marrón oscuro en el centro y marrón claro hacia los bordes.	ND	Hifas hialinas septadas	ND
	VIB	Anverso: blanco con micelio aéreo. Reverso: amarillo			
	X2	Anverso: blanco. Reverso: marrón claro			

ND: No Detectado.

Estas características morfológicas se compararon con las de géneros fúngicos presentes en la bibliografía (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Características morfológicas de los géneros asignados.

Género	Características macroscópicas	Características microscópicas		Referencia
		Conidios	Otras estructuras	
<i>Alternaria</i>	Micelio sumergido o parcialmente superficial. Color gris, marrón oscuro o negro	Color pálido o marrón de forma ovoidal, cilíndricos o elipsoides. Con o sin septos. Solos o concatenados	Hifas incoloras o marrón. Conidióforos marrones solos o agrupados	Woudenberg <i>et al.</i> (2013)
<i>Colletotrichum</i>	Color blanco, gris, rosado o naranja. Presencia de acérvulos oscuros	Unicelulares, cilíndricos de extremos redondeados	Hifas hialinas. Acérvulos, a veces con setas y presencia de apresorios	Cano <i>et al.</i> , (2004)
<i>Epicoccum</i>	Marrón claro a marrón oscuro	Hialinos o color pardo, forma variable, lisos y siempre septados	Clamidosporas uni o multicelulares o, lisas, verrugosas o tuberculadas, hialinas a pardas. Conidióforos compactos o sueltos, oscuros. Esporodocios negros	Aveskamp <i>et al.</i> (2010)
<i>Pestalotiopsis</i>	Color blanco, marrón, gris, negro. Presencia de conidioma tipo picnidio o acérvulo globoso, solitario o agregado, color marrón oscuro/negro	Fusiformes, marrones, elipsoidales, rectos/ ligeramente curvados, con 3-5 septos	Conidióforos septados, ocasionalmente reducidos a células conidiógenas, hialinas, lisas	Maharachchikumbura <i>et al.</i> (2016)
<i>Phoma</i>	Verde grisáceo hasta un micelio blanco con reverso salmón	Unicelulares alrededor de picnidios	Picnidios globulares de color marrón con 1 o varios orificios denominados ostiolos. Conidióforos simples, cortos, no ramificados	Aveskamp <i>et al.</i> (2010) Pitt & Hockings (2009)
<i>Pilidium</i>	Micelio escaso. Color beige, tornándose más oscuro a los 12 días debido a los cuerpos fructíferos. Se observan picnidios negros en anillos concéntricos	Los conidios son pequeños, hialinos y de forma fusiforme con extremos puntiagudos, que generalmente crecen en picnidios de color oscuro	Picnidios globosos color oscuro	Rossmann <i>et al.</i> (2004)

Los resultados presentados nos permitieron llevar a cabo una identificación morfológica preliminar de los aislamientos fúngicos y se determinó que:

- los aislamientos del Grupo 1, HPV3, VII1A, VII2A, VII2B, fueron asignados al género *Alternaria*.
- a los aislamientos del Grupo 2, V1, VI2, X1, X3 y XI2, se les asignó el género *Colletotrichum*.
- al aislamiento del Grupo 3, III2, se les asignó el género *Epicoccum*.
- al aislamiento del Grupo 4, I2, se les asignó el género *Pestalotiopsis*.
- a los aislamientos del Grupo 5, H1A1 e I5B, se les asignó el género *Phoma*.
- al aislamiento del Grupo 6, H4A, se le asignó el género *Pilidium*.
- los aislamientos del Grupo 7, A1, VI B y X2, no se asignaron a ningún género.

3.4.3.2 A través de caracterización molecular

Para la identificación mediante técnicas moleculares, se seleccionaron 1–2 representantes de cada género identificado preliminarmente por sus características morfológicas: HPV3, VII2A, V1, VI2, III2, I2, H1A1, I5B y H4A. En la Tabla A.3 del [Anexo 3](#) se muestran las secuencias de ITS de los aislamientos fúngicos.

3.4.3.2.a Análisis de los geles de agarosa

Se logró extraer material genético de todos los aislamientos fúngicos (Figura 3.18.A). Además, se observó una sola banda, lo cual indica la integridad del material genético y la ausencia de contaminaciones. Para todos los aislamientos, se obtuvieron fragmentos de ADN de 600-700 pb, tal como se muestran en la Figura 2.18.B. Además, el control negativo, permitió determinar que no hubo contaminación en los reactivos utilizados.

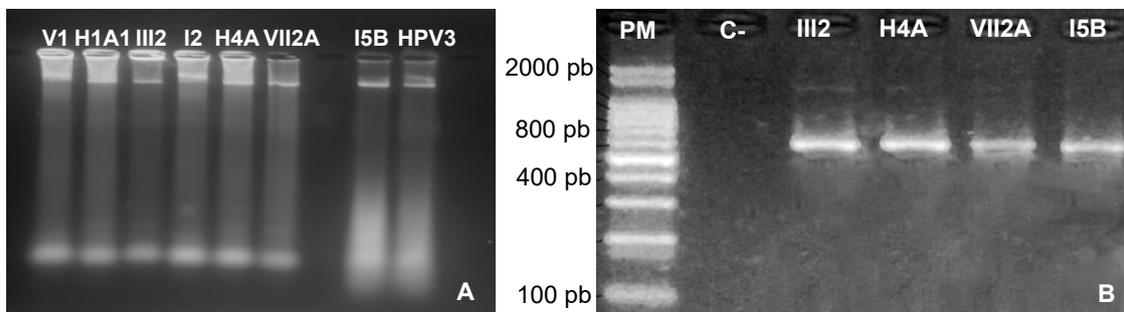


Figura 3.18. A. Imagen del gel de agarosa al 1 % con muestras de ADN de los aislamientos V1, H1A1, III2, I2, H4A, VII2A, I5B y HPV3. B. Imagen del gel de agarosa al 2 % de productos de PCR de algunos aislamientos. PM: marcador de peso molecular (PM), C-: control negativo. pb: pares de base.

3.4.3.2.b Análisis de las secuencias y búsqueda de secuencias homólogas

Las secuencias de la región ITS de los aislamientos fueron utilizadas para realizar la búsqueda de secuencias homólogas en BLAST del NCBI. Los resultados de esta búsqueda mostraron un porcentaje de similitud $\geq 97\%$ y porcentaje de cobertura mayor al 80 % con secuencias de ITS de más de una especie pertenecientes a un mismo género para cada aislamiento. En la Figura 3.19, se muestra una imagen representativa de los resultados de la búsqueda en BLAST utilizando el aislamiento HPV3 el cual fue identificado como perteneciente al género *Alternaria*.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Alternaria alstroemeriae CBS 118809 ITS region: from TYPE material	998	998	97%	0.0	98.76%	569	NR_163686.1
Alternaria angustiovoidea strain CBS 195.86 small subunit ribosomal RNA gene	990	990	97%	0.0	98.58%	568	MH861939.1
Alternaria destruens ATCC 204363 ITS region: from TYPE material	976	976	96%	0.0	98.56%	552	NR_137143.1
Alternaria eichhorniae ATCC 22255 ITS region: from TYPE material	972	972	96%	0.0	98.38%	552	NR_111832.1
Alternaria arborescens CBS 102605 ITS region: from TYPE material	952	952	92%	0.0	98.88%	530	NR_135927.1
Alternaria cerealis CBS 119544 ITS region: from TYPE material	922	922	89%	0.0	98.85%	514	NR_136117.1
Alternaria doliconidium HKAS 100840 ITS region: from TYPE material	918	918	91%	0.0	98.30%	531	NR_158361.1
Alternaria doliconidium strain KUMCC 17-0263 18S ribosomal RNA gene_partial	918	918	91%	0.0	98.30%	531	MG828864.1
Alternaria betae-kenyensis CBS 118810 ITS region: from TYPE material	917	917	89%	0.0	98.65%	514	NR_136118.1
Alternaria burnsii CBS 107.38 ITS region: from TYPE material	917	917	89%	0.0	98.65%	514	NR_136119.1
Alternaria mirabibensis strain CPC 38838 small subunit ribosomal RNA gene_pa	911	911	97%	0.0	96.09%	566	MW175361.1
Alternaria iridiaustralis CBS 118486 ITS region: from TYPE material	905	905	89%	0.0	98.27%	515	NR_136120.1
Alternaria sp. TK-2019a isolate MFLUCC 18-1589 internal transcribed spacer_1_	904	904	89%	0.0	98.27%	516	MH827030.1
Alternaria sp. TK-2018a isolate MFLUCC 18-1597 internal transcribed spacer_1_	891	891	89%	0.0	97.88%	510	MH827035.1
Alternaria indefessa strain CBS 536.83 small subunit ribosomal RNA gene_parti	889	889	99%	0.0	94.69%	1237	MH861641.1
Alternaria sorghi CBS 127502 ITS region: from TYPE material	885	885	99%	0.0	94.80%	580	NR_160246.1
Alternaria aspera strain CBS 115269 small subunit ribosomal RNA gene_partia	885	885	99%	0.0	94.66%	582	MH862983.1
Alternaria multiformis strain CBS 102060 small subunit ribosomal RNA gene_pa	880	880	97%	0.0	95.06%	567	MH862776.1
Alternaria gypsophilae strain CBS 107.41 small subunit ribosomal RNA gene_pa	870	870	98%	0.0	94.55%	587	MH856084.1

Figura 3.19. Resultados de la búsqueda de secuencias homólogas para el aislamiento HPV3 utilizando la herramienta BLAST del NCBI.

Los resultados correspondientes a la búsqueda de secuencias homologas de ITS de los aislamientos evidenciaron que:

- los 9 aislamientos evaluados pertenecen al género ya identificados de manera preliminar mediante características morfológicas.

3.4.3.2.c Análisis filogenético

En la Tabla 3.7, se muestra el número de acceso al GenBank de las secuencias de la región ITS de cepas tipo utilizadas para el análisis filogenético.

Tabla 3.7. Número de acceso de GenBank de las secuencias de ITS de cepas tipo.

Número de acceso GenBank	Género	Especie
MT279999.1		<i>alternata</i>
MT635274.1	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>
MT635275.1		<i>brassicicola</i>
NR_137143.1		<i>destruens</i>
GU183331.1	<i>Colletotrichum</i>	<i>simmondsii</i>
MH864562.1		<i>indonesiense</i>
MN493119.1	<i>Epicoccum</i>	<i>sorghinum</i>
MT125854.1		<i>sorghinum</i>
FN859452.1	<i>Hypomyces</i>	<i>subiculosus</i>
MN341553.1	<i>Pestaloteopsis</i>	<i>kenyana</i>
MT163275.1		sp.
MK299419.1		sp.
MF800902.1	<i>Phoma</i>	sp.
JQ044433.1		<i>proteae</i>
JX047867.1		<i>concaum</i>
KF646103.1	<i>Pilidium</i>	<i>concaum</i>
MT555783.1		<i>lythri</i>

Para la construcción del árbol filogenético de máxima similitud se utilizó el modelo de Jukes Cantor con una heterogeneidad de tasa de sustitución de sitios invariantes (JC+I), y se consideró que nodos con *bootstrap* ≥ 60% indicaron ramas estadísticamente fuertes, confirmando la robustez del árbol, y determinaron la ubicación taxonómica de los aislamientos.

Los aislamientos utilizados para la identificación molecular, fueron ingresados en el cepario del InBioMis utilizando el código LBM seguido por la numeración correspondiente, como se muestra en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Aislamientos con su correspondiente código LBM.

Aislamiento	Código LBM	Género identificado búsqueda de secuencias homólogas
VII2A	LBM 186 ₁₁	<i>Alternaria</i> sp.
HPV3	LBM 229 ₃	
V1	LBM 231 ₉	<i>Colletotrichum</i> sp.
VI2	LBM 232 ₉	
III2	LBM 228 ₇	<i>Epicoccum</i> sp.
I2	LBM 227 ₅	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
H1A1	LBM 207 ₁	<i>Phoma</i> sp.
I5B	LBM 189 ₅	
H4A	LBM 208 ₄	<i>Pilidium</i> sp.

En la Figura 3.20, se muestra el árbol filogenético de máxima similitud obtenido por alineamiento de las secuencias de la región ITS.

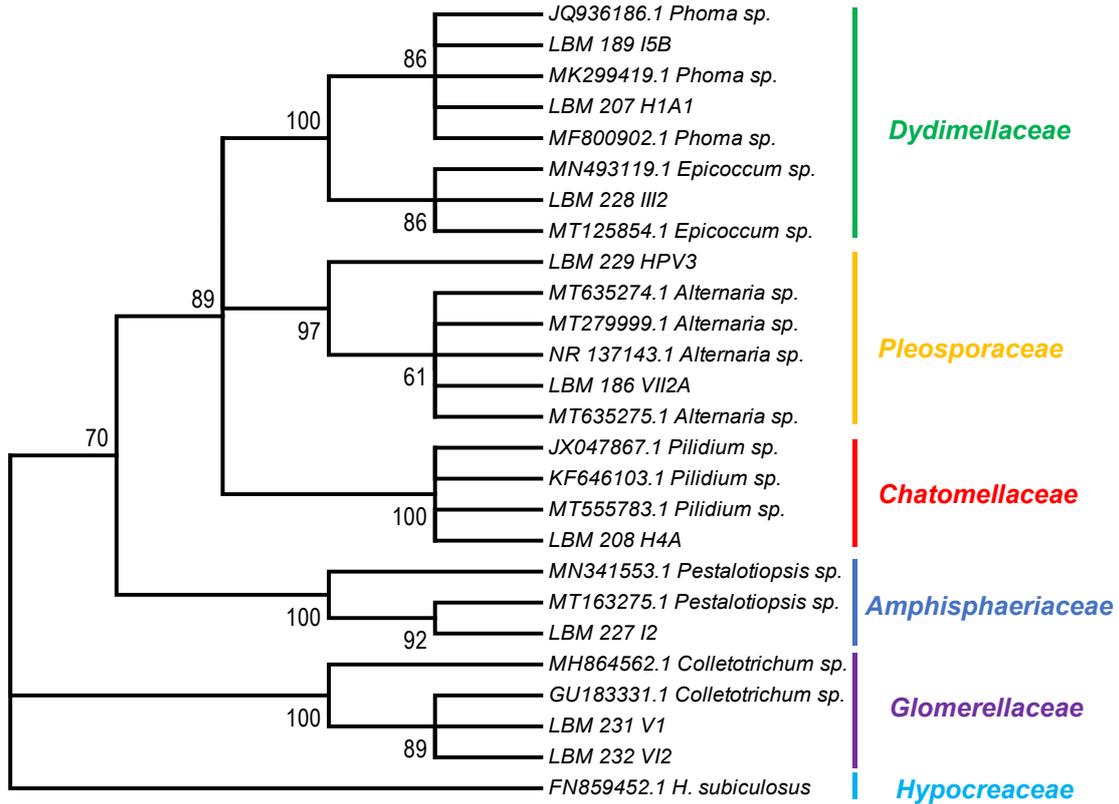


Figura 3.20. Árbol filogenético consenso de máxima similitud basado en el alineamiento de la región ITS1-5,8S-ITS2. Como método de distancia evolutiva se utilizó el método Jukes-Cantor, con un soporte estadístico de 1000 *bootstrap* y se muestran sólo los de *bootstrap* ≥ 60 %.

Los resultados del análisis filogenético evidenciaron que:

- en todos los árboles, se observó que los aislamientos se agruparon formando un gran *cluster*, alejados del grupo externo *Hypomyces subiculosus*.
- la ubicación taxonómica de los aislamientos coincidió con las secuencias de ITS de las cepas tipo utilizadas, con buen soporte estadístico –*bootstrap* ≥ 60 %– lo cual indicó que el árbol presentó ramas estadísticamente fuertes.
- el análisis filogenético nos permitió validar la asignación de género a aquellos aislamientos que ya habían sido identificados por búsqueda de secuencias homólogas, ya que todos se agruparon mostrando un ancestro común más reciente con las cepas tipo esperadas.

El análisis de los resultados presentados en este capítulo nos permitió concluir que se lograron caracterizar morfológica y molecularmente 9 de 17 patógenos fúngicos aislados de hoja de yerba mate de la provincia de Misiones, identificados como pertenecientes a diferentes géneros. Estos fueron identificados de manera confiable mediante caracterización morfológica, molecular y análisis filogenético, y las 3 aproximaciones dieron resultados coincidentes, permitiendo asignar los siguientes géneros de pertenencia a los aislamientos fúngicos:

- *Alternaria* sp. a los aislamientos LBM 186₁₁ y LBM 229₃.
- *Colletotrichum* sp. a los aislamientos LBM 231₉ y LBM 232₉.
- *Epicoccum* sp. al aislamiento LBM 228₇.

- *Pestalotiopsis* sp. al aislamiento LBM 227₅.
- *Phoma* sp. a los aislamientos LBM 207₁ y LBM 189₅.
- *Pillidium* al aislamiento LBM 208₄.

Comparando los resultados presentados en este capítulo con los disponibles en la bibliografía, podemos concluir que:

- este es el primer reporte de los géneros *Pestalotiopsis* y *Pillidium* como patógenos de yerba mate.
- *Epicoccum* está reportado como patógeno de yerba mate, pero este trabajo es el primero en el que se menciona como patógeno de hoja de yerba mate.
- de manera coincidente a lo reportado por otros autores, en este trabajo se identificaron aislamientos fúngicos patógenos de hoja de yerba mate pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Colletotrichum* y *Phoma*.

Teniendo en cuenta los resultados presentados, se seleccionaron 2 aislamientos fúngicos, los cuales presentaron mayor índice de severidad, para ser utilizados en la realización de los ensayos *in vitro* con los aislamientos de *Trichoderma*:

- *Alternaria* sp. LBM 186₁₁ y *Phoma* sp. LBM 207₁.

CAPÍTULO 4

Caracterización y selección de especies del género *Trichoderma* con capacidad de promoción del crecimiento vegetal *in vitro*

CAPÍTULO 4: Caracterización y selección de especies del género *Trichoderma* con capacidad de promoción del crecimiento vegetal *in vitro*

4.1 RESUMEN

Diferentes especies de *Trichoderma* pueden exhibir variación en la actividad como PGPM, lo que hace que un estudio específico de su biodiversidad sea esencial para aprovechar al máximo el potencial de estos microorganismos. Aún no se ha investigado la importancia de las especies del género *Trichoderma* nativas de rizósfera de yerba mate, como parte de la diversidad microbiana de estas plantas, así como tampoco su caracterización como promotores del crecimiento vegetal *in vitro*. Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, el objetivo por el cual se realizaron los ensayos que se presentarán en este capítulo, fue determinar el potencial como PGPM *in vitro* de los aislamientos de *Trichoderma* endófitos de raíz de yerba mate identificados en el Capítulo 2, para su potencial aplicación en plantas de yerba mate. Se evaluaron las características *in vitro* relacionadas con la capacidad de biocontrol –antagonismo frente a patógenos de yerba mate, quitinasas, celulasas, lipasas, pectinasas y amilasas– y capacidad biofertilizante –solubilización de compuesto insolubles de fosforo, producción de sideróforos y de auxinas–. Con estos resultados se calcularon índices de promoción del crecimiento vegetal y se agruparon los 14 aislamientos según sus características comunes como PGPM *in vitro*. El análisis de los resultados presentados en este capítulo nos permitió concluir que se lograron caracterizar los 14 aislamientos de *Trichoderma* como promotores del crecimiento vegetal *in vitro*. Estos resultados nos permitieron seleccionar 4 aislamientos de *Trichoderma* que presentaron mejores características como PGPM: 3 aislamientos pertenecientes a *T. asperelloides* y un aislamiento perteneciente *Trichoderma* sp. Este trabajo es el primer reporte de aislamientos fúngicos de especies del género *Trichoderma* obtenidos de endorizósfera de yerba mate de la provincia de Misiones con capacidad como PGPM *in vitro*.

4.2 INTRODUCCIÓN

4.2.1 Promoción del crecimiento vegetal: mecanismos y efectos

Tal como se mencionó en el Capítulo 1 los PGPM son capaces de promover el crecimiento vegetal mediante diferentes mecanismos:

- Directos: mediante el aumento de la accesibilidad o suministro de nutrientes (acción propiamente fertilizante) y/o a través de la producción de fitohormonas (acción fitoestimulante). En el Capítulo 1, cuando se mencionó la clasificación de bioinsumos, aquellos PGPM con estos mecanismos se ubicaron dentro de los **biofertilizantes**.
- Indirectos: mediante la protección de las plantas frente al ataque de plagas y de las enfermedades causadas por microorganismos (Gaiero *et al.*, 2013). En el Capítulo 1, cuando se mencionó la clasificación de bioinsumos, aquellos PGPM con estos mecanismos se ubicaron dentro de los **biopesticidas**, como agentes de control biológico o BCA¹ o biocontroladores.

En la Tabla 4.1, se muestran en forma resumida estos mecanismos.

Tabla 4.1. Mecanismos de acción de los PGPM. Adaptada de Cano (2011).

Tipo de mecanismo	Mecanismo de acción general	Acción específica
Mecanismos Directos (Biofertilizantes)	Aumenta la accesibilidad de nutrientes para la planta	Solubilización de compuestos insolubles de fósforo a formas solubles
		FBN: Aumento de disponibilidad de N, por conversión de N ₂ a NH ₃
	Aumento en el volumen radical de la planta y acceso a nutrientes	Secuestro de Fe ⁺³ mediante la producción de sideróforos
Mecanismos Indirectos (BCA)	Micoparasitismo	Producción de fitohormonas (auxinas, gibberelinas)
	Antibiosis	Contacto directo y liberación de enzimas degradadoras de la pared celular (CWDEs)
	Respuesta de defensa de la planta	Liberación de metabolitos difusibles y volátiles (antibióticos y otros)
		ISR ² : estimular la producción de enzimas, metabolitos, entre otros

4.1.1.1 Mecanismos directos

Dentro de este grupo se encuentran los mecanismos por los cuales los PGPM producen compuestos que son tomados por las plantas para utilizarlos en su metabolismo o que facilitan la captura de ciertos nutrientes por las plantas. Entre ellos se encuentran:

¹ Derivado de las palabras en inglés *BioControl Agent*

² ISR: Inducción de la Resistencia Sistémica.

- **Solubilización de compuestos insolubles de fósforo:** el fósforo es un macronutriente esencial para las plantas, ya que es un componente clave de diversas rutas metabólicas y bioquímicas, además de ser parte de moléculas estructurales. Las plantas sólo pueden absorber el fósforo en dos formas solubles, la monobásica (H_2PO_4^-) y la dibásica (HPO_4^{2-}) (Richardson *et al.*, 2009). Sin embargo, en el suelo gran parte de este elemento se encuentra en forma insoluble y por tanto su biodisponibilidad es limitada, lo que provoca un crecimiento vegetal restringido. Los PGPM que poseen la capacidad de solubilizar fosfatos, producen y liberan al medio compuestos tales como ácidos orgánicos, para transformar los fosfatos inorgánicos insolubles en formas de fosfato solubles haciendo que estén disponibles para las plantas.
- **Fijación biológica de nitrógeno:** la fijación biológica de nitrógeno (FBN) es el proceso responsable de la reducción de N_2 a amonio (NH_3) (Richardson *et al.*, 2009) y, en general, es llevado a cabo por microorganismos diazótrofos que poseen una enzima llamada nitrogenasa.
- **Producción de sideróforos:** el hierro es un micronutriente esencial para plantas y microorganismos, necesario para diversos procesos metabólicos como la fotosíntesis, la respiración y la FBN; sin embargo, tal como sucede con el fósforo, el hierro presente en los suelos es moderadamente soluble, haciendo que el hierro disponible para bioasimilación sea muy bajo, por lo que su escasez en los suelos genera una gran competencia entre los organismos. Bajo condiciones limitantes de este nutriente, los PGPM producen sustancias de bajo peso molecular que contienen cadenas laterales y grupos funcionales cuya función es actuar como agentes quelantes de hierro, y son denominados sideróforos. Los sideróforos son capaces de secuestrar el ion férrico (Fe^{+3}) con alta afinidad, transportarlo y absorberlo gracias a la síntesis de receptores de membrana capaces de unir complejos Fe-sideróforos. La biosíntesis de dichos compuestos está altamente regulada por proteínas sensibles a la baja concentración de hierro (Hardoim *et al.*, 2015).
- **Producción de fitohormonas:** tal como auxinas, giberelinas y citoquininas, que pueden aumentar el volumen radical, permitir un mayor sostén y absorción de minerales, pueden acelerar la germinación y, además, reducir los niveles de etileno en la planta retardando la senescencia. El ácido Indol Acético (AIA) es una de las auxinas naturales más comunes producidas por microorganismos (Stewart & Hill, 2014).

4.1.1.2 Mecanismos indirectos

Los mecanismos indirectos se observan cuando los PGPM previenen o atenúan los efectos perjudiciales de las plagas y las enfermedades (Compant *et al.*, 2010) y se comportan como BCA:

- El **control biológico de plagas** agrícolas consiste en la utilización de organismos y/o sustancias derivadas de éstos con el fin de reducir la incidencia de plagas, manteniendo o mejorando los rendimientos sin generar contaminación al ambiente. Los BCA son de gran utilidad para el Manejo Integrado de Plagas (MIP) tanto en sistemas convencionales como agroecológicos.
- El **control biológico de enfermedades** ha sido definido por diversos investigadores como la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades del patógeno en estado activo o en dormancia por uno o más organismos, que ocurre en forma natural o a través del manejo del medio (Pal & McSpadden Gardener, 2006). El **control biológico de fitopatógenos con microorganismos antagonistas** ha recibido gran interés en los últimos años debido a su gran potencial como alternativa sustentable

y a las aplicaciones exitosas en diferentes cultivos (Stewart & Hill, 2014). Sin embargo, el éxito de este control depende de factores como la temperatura, el pH y las condiciones fisicoquímicas del suelo o del ambiente donde sea aplicado, así como de la dosis de inóculo, momento de aplicación, entre otros. El éxito del control de estos organismos se atribuye en general a la actividad sinérgica de diferentes mecanismos de acción tales como competencia por un nicho ecológico o por un sustrato (por ejemplo, por producción de sideróforos) y acción directa sobre el patógeno a través de la antibiosis, el parasitismo o la lisis del agente patógeno (Guzmán-Guzmán *et al.*, 2019). Los buenos antagonistas suelen superar el efecto fungistático del suelo que resulta de la presencia de metabolitos producidos por otras especies, incluidas las plantas, y sobrevivir en condiciones competitivas muy extremas (Benítez *et al.*, 2004).

- ✓ La **antibiosis** es el mecanismo mediante el cual un microorganismo antagonista inhibe o interfiere en el crecimiento de otro organismo por la creación de condiciones desfavorables debido a la producción de sustancias con actividad biológica (Vinale *et al.*, 2008). Los PGPM producen metabolitos³ difusibles, metabolitos volátiles y enzimas que impiden la colonización por microorganismos patógenos, provocando la muerte o reduciendo el crecimiento del microorganismo blanco. En la antibiosis no se requiere el contacto entre el microorganismo antagonista y el patógeno. La síntesis de antibióticos está altamente ligada al estado metabólico celular, el cual está dictado a su vez por la disponibilidad de nutrientes y otros estímulos ambientales, como los minerales presentes, los tipos de fuente de carbono, el pH, la temperatura, presencia de otros organismos y otros parámetros (Compant *et al.*, 2010).
- ✓ **Competencia por un nicho o por un sustrato:** los PGPM deben rápidamente colonizar las superficies de las plantas y usar la mayoría de los nutrientes disponibles, dificultando el crecimiento y desarrollo de otros microorganismos (Benítez *et al.*, 2004). La competencia en la rizósfera incluye la colonización de las raíces (por ejemplo, a través de la producción de pectinasas, amilasas, lipasas, entre otras enzimas) junto con la habilidad para sobrevivir durante un periodo considerable de tiempo en presencia de la microbiota nativa. Como los exudados de raíz son la fuente principal de los nutrientes para los microorganismos presentes en la rizósfera, la competencia implica que los PGPM estén bien adaptados a la utilización de estas fuentes de carbono y energía (Compant *et al.*, 2019; Vinale *et al.*, 2008).
- ✓ **Sideróforos:** la excreción de sideróforos por los PGPM puede estimular el crecimiento vegetal por el mecanismo directo anteriormente descrito, o por inhibición del establecimiento de fitopatógenos (efecto indirecto) a través del secuestro de Fe del ambiente. Los sideróforos de los PGPM pueden prevenir que algunos fitopatógenos adquieran suficiente cantidad de hierro, limitando su capacidad de proliferación. Este mecanismo es efectivo debido a que los PGPM producen sideróforos que tienen mucha mayor afinidad por el hierro que los de los patógenos (Glick, 2012). Independientemente del mecanismo, la habilidad de producir sideróforos confiere ventajas competitivas para la colonización de tejidos vegetales y la exclusión de otros microorganismos presentes en el mismo nicho ecológico (Glick, 2012).

³ Entre estos metabolitos, se ha descrito la producción de alamecinas, tricolina, peptaibols, antibióticos, 6-pentil- α -pirona, ácido heptelídico y otros.

✓ El **micoparasitismo** consiste en el contacto directo del antagonista con un hongo hospedador y consta de etapas secuenciales incluyendo el reconocimiento del hospedador, ataque mediante la producción de enzimas líticas, siguiente penetración y muerte del hospedador (Vinale *et al.*, 2008). Durante este proceso, el antagonista secreta **enzimas degradadoras de la pared celular (CWDE⁴)**, que hidrolizan la pared celular del hongo⁵ huésped, liberando posteriormente oligómeros de la pared celular del patógeno. Los PGPM que sintetizan una o más de estas enzimas tienen actividad contra un amplio espectro de fitopatógenos. Además, aquellos PGPM capaces de producir enzimas hidrolíticas y antibióticos presentarán un mayor nivel de antagonismo que el obtenido por cualquiera de los mecanismos por sí solo (Benítez *et al.*, 2004).

✓ Los PGPM pueden desencadenar un fenómeno conocido como **Resistencia Sistémica Inducida (ISR⁶)**, que ocurre cuando la planta activa sus propios mecanismos de defensa en respuesta a la infección por agentes patógenos. La ISR no actúa contra patógenos específicos, más bien es efectiva al momento de controlar enfermedades causadas por diferentes microorganismos (Glick, 2012). La ISR hace que las plantas puedan responder más rápido e intensamente contra el ataque de patógenos; fortifica las paredes celulares vegetales, altera las condiciones fisiológicas y metabólicas del hospedador, dando lugar a un aumento en la síntesis de productos químicos de defensa en respuesta a factores de estrés bióticos o abióticos (Hardoim *et al.*, 2015; Hossain *et al.*, 2017).

Son varias las etapas necesarias para llevar a cabo un programa de control biológico por PGPM. El primer paso es identificar al agente biocontrolador a través de ensayos *in vitro* en el laboratorio; el siguiente paso es la realización de ensayos de eficacia a niveles mayores, tanto en invernadero como a campo (Stewart & Hill, 2014).

Existen diversas metodologías de estudio *in vitro* para evaluar la potencialidad de los PGPM como agentes de biocontrol, ya que son varios los mecanismos posibles para que ejerzan dicho efecto. El primer recurso que se utiliza es el ensayo de antagonismo en placa en donde se enfrenta el microorganismo a evaluar (antagonista) con el hongo fitopatógeno y se evalúa el grado de inhibición del crecimiento. No obstante, muchos microorganismos pueden dar negativo este ensayo, ya que las sustancias inhibitorias probablemente se puedan producir por la inducción con algún metabolito que sólo se produce en una situación *in vivo* cuando existe una interacción planta-PGPM.

El control biológico en cultivos destinados a alimentación, tanto humana como animal, es muy importante ya que el daño que produce el agente causal de la enfermedad no sólo se traduce en pérdidas significativas en el rendimiento sino también en un detrimento de la calidad fitosanitaria con las consecuentes pérdidas económicas que esto implica. El control biológico es una herramienta basada en la introducción artificial de agentes de biocontrol en un patosistema (Stewart & Hill, 2014), que para el caso de la utilización de microorganismos nativos sería una reintroducción en su ecosistema natural, en el que se pretende aumentar su población para evitar que el fitopatógeno se desarrolle.

⁴ CWDE: del inglés *Cell Wall Degrading Enzymes*. Entre las enzimas producidas se encuentran quitinasas, β -1,4-glucanasas, proteasas, celulasas, lipasas, entre otras.

⁵ La pared celular de los hongos consta de 80 a 90% de carbohidratos (principalmente polisacáridos como glutanos, quitina, celulosa, mananos y otros) y 10 a 20% de proteínas, lípidos, iones y pigmentos orgánicos (Qualhato *et al.*, 2013).

⁶ ISR: del inglés *Induction Systemic Resistance*.

4.2.2 ¿Cómo puede *Trichoderma* mejorar el desarrollo y la salud de las plantas que coloniza?

El género *Trichoderma* se encuentra entre uno de los géneros fúngicos más comúnmente estudiados como promotores del crecimiento vegetal, específicamente como BCA ya que tienen efectos antagónicos con una amplia variedad de hongos fitopatógenos (Chalie-u & Jakhar, 2018; Vinale *et al.*, 2008; Gravel *et al.*, 2007; Harman *et al.*, 2004). Para poder ejercer cualquiera de los efectos de promoción del crecimiento vegetal, este microorganismo debe colonizar las raíces de las plantas ya sea superficial o endofíticamente y para ello muchas de las especies de *Trichoderma*, entre otras herramientas, expresan diversas enzimas degradadoras de la pared celular, tal como celulasas, lipasas, pectinasas, amilasas, entre otras. Posteriormente a una eficiente colonización, los PGPM pertenecientes a este género, frecuentemente incrementan la absorción de nutrientes, la resistencia al estrés abiótico y biótico, el crecimiento de las raíces, las plantas se desarrollan mejor, y consecuentemente aumentan la productividad del cultivo (Chagas *et al.*, 2017; Stewart & Hill, 2014). En la Figura 4.1, se muestran en forma gráfica las acciones benéficas que las especies del género *Trichoderma* pueden realizar al interactuar con las plantas, que incluyen casi todas las estrategias posibles de los PGPM tal como, competencia, antibiosis, parasitismo y resistencia sistémica inducida. Las mismas no son excluyentes entre sí y dependen de la especie de *Trichoderma* analizada, de la planta, del patógeno, de las condiciones ambientales, de la disponibilidad de nutrientes, entre otras características (Vinale *et al.*, 2008).

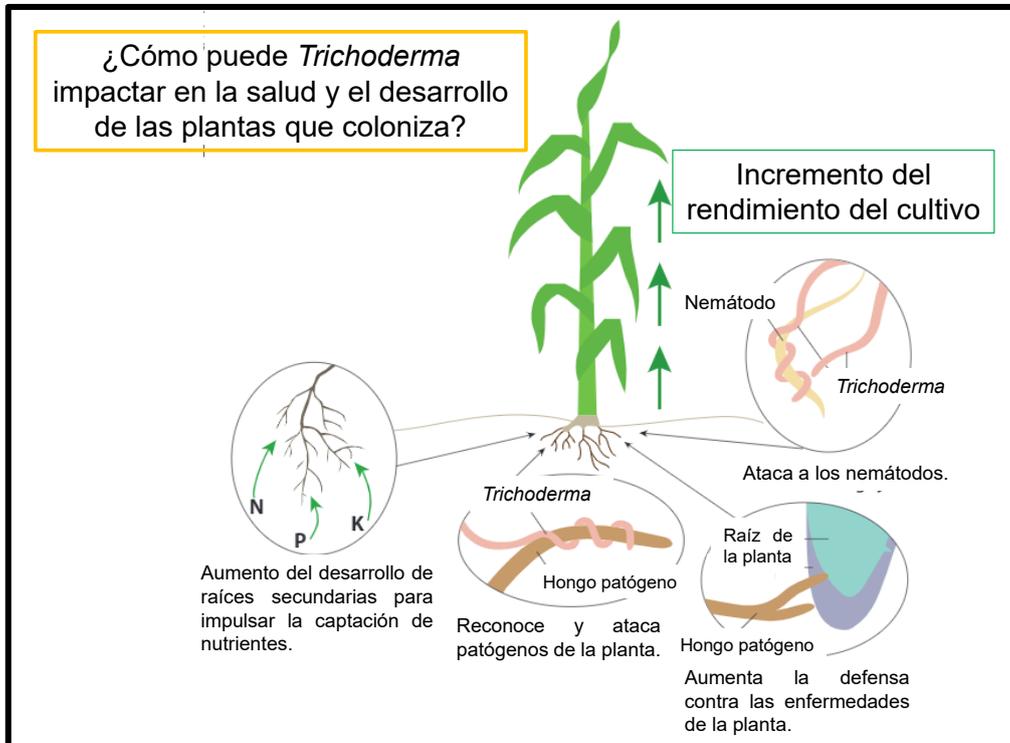


Figura 4.1. Acciones de *Trichoderma* spp. en las plantas que coloniza. Adaptada de Siemering *et al.* (2018).

A continuación, se mencionan algunos reportes en relación a los mecanismos/efectos que *Trichoderma* puede presentar como **biofertilizante**:

- Uno de los cambios morfológicos más evidentes en las plantas provocado por *Trichoderma* es el aumento de raíces laterales, modificando así la arquitectura de las raíces. En este proceso, observaciones previas han demostrado la participación de auxinas (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Guzmán-Guzmán *et al.*, 2019). Además, la presencia de *Trichoderma* no solo modula los niveles de las hormonas producidas por la planta, sino que puede contribuir con sus propias hormonas o podría proporcionar intermediarios para la síntesis de algunas fitohormonas, como parte de los beneficios reportados en la interacción *Trichoderma*-planta (Guzmán-Guzmán *et al.*, 2019). Esto beneficia a la planta a través de un aumento en la superficie de absorción de las raíces ramificadas que conduce a una mayor capacidad de absorción de agua y nutrientes (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009).
- Las especies de *Trichoderma* tienen una amplia capacidad para solubilizar compuestos insolubles de fósforo y micronutrientes como cobre, hierro, manganeso y zinc que pueden no estar disponibles para las plantas en ciertos suelos (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009). *Trichoderma* spp. solubiliza compuestos insolubles de fósforo mediante la producción de ácidos orgánicos como los ácidos cítrico, glucónico o fumárico (Benítez *et al.*, 2004). Algunas especies, son capaces de reducir el Fe III a través de quelantes como los sideróforos y las plantas lo absorben mediante reductasas presentes en la membrana plasmática (Altomare *et al.*, 1999). A diferencia de los sideróforos bacterianos, la producción de sideróforos de *Trichoderma* no requiere deficiencia de Fe y también se une a otros metales como Pb (II), Cr (III) y Al (III) (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009).

A continuación, se mencionan algunos reportes en relación a los mecanismos/efectos que *Trichoderma* puede presentar como **BCA**:

- Se ha demostrado que todas las especies de *Trichoderma* son micoparásitos eficientes. La interacción micoparasitaria de *Trichoderma* con otros hongos está programada por señales del hospedador, lo que resulta en la producción de estructuras infecciosas y secreción de enzimas (Guzmán-Guzmán *et al.*, 2019). Durante este mecanismo, las CWDE actúan de forma sinérgica con metabolitos secundarios, lo cual determina la eficiencia de la capacidad antagónica de las especies de *Trichoderma*.
- La antibiosis ocurre durante el proceso de interacción de cepas de *Trichoderma* con patógenos que involucran metabolitos secundarios de bajo peso molecular que retardan el crecimiento del patógeno (Vinale *et al.*, 2008). La producción de metabolitos secundarios por *Trichoderma* spp. depende tanto de la cepa de *Trichoderma* como del microorganismo a antagonizar (Vinale *et al.*, 2008). Por lo general, una cepa es capaz de producir varios tipos de metabolitos, lo que dificulta el poder relacionar la acción de un determinado metabolito con su actividad como BCA.
- La competencia por el carbono, el nitrógeno y otros factores de crecimiento, junto con la competencia por el espacio o sitios de colonización específicos, son utilizadas por los microorganismos para controlar los patógenos (Benítez *et al.*, 2004). *Trichoderma* tiene una capacidad superior para movilizar y absorber los nutrientes del suelo en comparación con otros organismos (Benítez *et al.*, 2004). El uso eficiente de los nutrientes disponibles se basa en la capacidad de *Trichoderma* de obtener ATP a partir del metabolismo de diferentes azúcares, como los derivados de polímeros: celulosa, glucano, quitina, entre otros. Uno de los mecanismos más estudiados por los cuales *Trichoderma* compete con otros microorganismos, es la producción de sideróforos (mecanismo mencionado anteriormente).

■ Varias plantas, tanto mono como dicotiledóneas, mostraron una mayor resistencia al ataque de patógenos cuando fueron tratadas previamente con *Trichoderma* (Harman *et al.*, 2004). La colonización de plantas por *Trichoderma* redujo la enfermedad causada por uno o más patógenos diferentes, en el sitio de inoculación (resistencia adquirida localizada inducida, LAR), así como cuando *Trichoderma* fue inoculado en momentos o sitios diferentes al del patógeno (ISR). Durante la interacción de *Trichoderma* con la planta, diferentes clases de metabolitos pueden actuar como elicitores o inductores de resistencia (Vinale *et al.*, 2008), las cuales incluyen: i) proteínas con actividad enzimática, como xilanasas; (ii) productos similares a los genes de avirulencia capaces de inducir reacciones de defensa en plantas; (iii) compuestos de bajo peso molecular liberados de las paredes celulares de hongos o plantas por la actividad de las enzimas de *Trichoderma* (Vinale *et al.*, 2008). Estos compuestos estimulan la capacidad de biocontrol de *Trichoderma* activando la cascada de expresión génica micoparasitaria y la actividad biológica de poblaciones microbianas antagonistas promoviendo un efecto ISR en la planta (Vinale *et al.*, 2008).

La mayor parte de las investigaciones sobre PGPM se han realizado solo en algunas especies de *Trichoderma*, entre las que se destacan *T. harzianum*, *T. viride*, *T. virens*, *T. asperellum*, *T. asperelloides* (Consolo *et al.*, 2012; Sawant *et al.*, 2020; Tapwal *et al.*, 2011). Estas especies han demostrado que son capaces de promover el antagonismo frente a patógenos a través de acciones sinérgicas entre metabolitos antifúngicos secundarios y CWDE (Horta Crivelente *et al.*, 2018). En la Tabla 4.2, se muestran ejemplos de la acción de especies de *Trichoderma* con características como BCA frente a patógenos fúngicos causantes de diversas enfermedades en diferentes plantas.

Tabla 4.2. Especies de *Trichoderma* y su acción como BCA *in vitro*. Adaptado de Jangir *et al.* (2017).

PGPM	Patógeno	Enfermedad	Planta	% de inhibición
<i>T. viride</i> NBAII Tv23	<i>Rizhoctonia solani</i>	Pudrición de la raíz	Algodón	85,34 %
<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Fusarium solani</i>	Pudrición de la raíz	Frijol	86 %
<i>T. asperellum</i>	<i>Phytium aphanidermatum</i>	<i>Damping off</i>	Tomate	40 %
<i>T. asperellum</i>	<i>Phytophthora megakarya</i>	Olla negra	Cacao	90 %
<i>T. harzianum</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>	Contaminación por fumosinas	Maíz	58 %

Las múltiples funciones de *Trichoderma* en las asociaciones planta-*Trichoderma* son de particular importancia para la sustentabilidad de los ecosistemas tanto naturales como agrícolas. La aplicabilidad de los aislamientos de *Trichoderma* a diferentes ecozonas depende del comportamiento de las especies seleccionadas en cada una de ellas y, como ya se ha mencionado durante este trabajo de tesis, los mejores aislamientos podrían seleccionarse de áreas de la planta y del suelo donde se espera que funcionen mejor como PGPM y donde crezcan en condiciones ecológicas similares a las que se encuentran en forma natural (Stocco *et al.*, 2016). Diferentes especies de *Trichoderma* pueden exhibir variación en la actividad como PGPM, lo que hace que un estudio específico de su biodiversidad sea esencial para aprovechar al máximo el potencial de estos microorganismos (Hoyos-Carvajal & Bissett,

2011). A nuestro entender, aún no se ha investigado la importancia de las especies del género *Trichoderma* nativas de rizósfera de yerba mate, como parte de la diversidad microbiana de estas plantas, así como tampoco su caracterización como promotores del crecimiento vegetal *in vitro* e *in vivo*.

Por todo lo expuesto, el objetivo por el cual se realizaron los ensayos que se presentarán en este capítulo, fue determinar el potencial como PGPM *in vitro* de los aislamientos de *Trichoderma* endófitos de raíz de yerba mate identificados en el Capítulo 2, para su potencial aplicación en plantas de yerba mate en etapa de vivero.

4.3 MATERIALES Y METODOS

4.3.1 Material biológico

En la Tabla 4.3 se detallan los microorganismos utilizados para su evaluación como PGPM en los experimentos que se muestran en este capítulo: 14 aislamientos correspondientes al género *Trichoderma* obtenidos de endorizósfera de yerba mate e identificados taxonómicamente en este trabajo de tesis (Capítulo 2). Además, se detallan los hongos fitopatógenos utilizados en los ensayos de cultivo dual *in vitro*: 2 aislamientos obtenidos de hoja de yerba mate en este trabajo de tesis (Capítulo 3) y otros 2 cedidos gentilmente por el Laboratorio de Fitopatología - DFS de la Universidade Federal de Santa María, Rio Grande Du Sul, Brasil.

Tabla 4.3. Microorganismos utilizados en los experimentos que se detallan en este capítulo.

Nombre del microorganismo	Procedencia	Referencia
<i>T. asperelloides</i> LBM 193 ₁	Endorizósfera de yerba mate	Este trabajo (Capítulo 2)
<i>T. asperelloides</i> LBM 194 ₁		
<i>T. asperelloides</i> LBM 195 ₁		
<i>T. strigosellum</i> LBM 196 ₃		
<i>T. asperelloides</i> LBM 197 ₃		
<i>T. asperelloides</i> LBM 198 ₃		
<i>T. asperellum</i> LBM 199 ₅		
<i>T. hamatum</i> LBM 200 ₅		
<i>T. strigosellum</i> LBM 201 ₆		
<i>Trichoderma</i> sp. LBM 202 ₈		
<i>T. asperellum</i> LBM 203 ₉		
<i>T. asperelloides</i> LBM 204 ₉		
<i>T. strigosellum</i> LBM 205 ₉		
<i>T. asperelloides</i> LBM 206 ₁₀		
<i>Alternaria</i> sp. LBM 186	Patógenos de hoja de yerba mate	Este trabajo (Capítulo 3)
<i>Phoma</i> sp. LBM 207		
<i>Fusarium solani</i> AVF1	Patógenos de raíz de yerba mate	Laboratorio de Fitopatología - DFS de la Universidade Federal de Santa Maria
<i>Fusarium oxysporum</i> I5RF		

4.3.3 Mantenimiento y crecimiento de los microorganismos

Los aislamientos fúngicos se mantuvieron según el protocolo propuesto por Covacevich & Consolo (2014) con modificaciones, descrito en el Capítulo 2.

Para la realización de los ensayos de antagonismo en placa, producción de enzimas y/o metabolitos en diferentes medios selectivos, los aislamientos de *Trichoderma* y los patógenos fueron activados en placas con PDA incubadas a 28 °C en presencia de luz durante 5 y 7 días, respectivamente, según el protocolo que se muestra en la Figura 4.2.

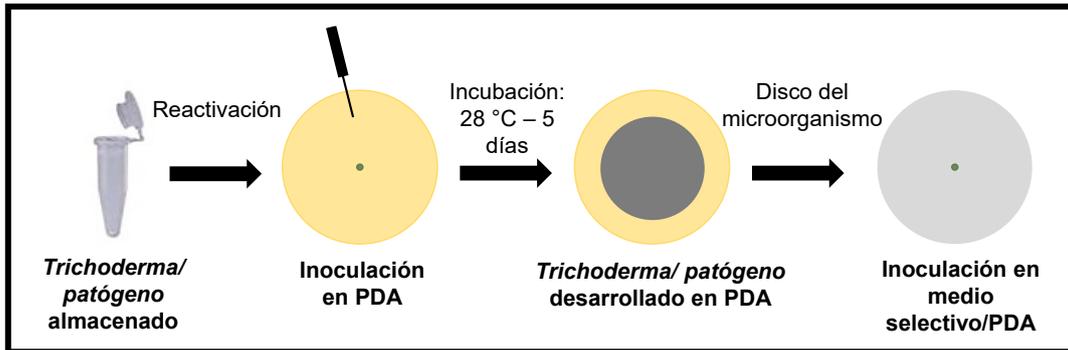


Figura 4.2. Protocolo de crecimiento de *Trichoderma*/patógenos e inoculación en medios selectivos/PDA.

4.3.3 Ensayo de antagonismo dual en placa

Para evaluar la capacidad antagónica de los aislados de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos se realizaron ensayos duales en placa según la metodología descrita por Mokhtar & Dehimat (2015), con algunas modificaciones. Se colocaron tacos miceliares de 5 mm de diámetro con micelio desarrollado de *Trichoderma* y del fitopatógeno en la misma placa con PDA, a 7 cm uno del otro (Figura 4.3). Las placas se incubaron a 28 °C bajo luz constante. Placas inoculadas solo con el patógeno se utilizaron como controles. Todos los cultivos duales y los controles se realizaron por triplicado.

A los 3, 5 y 7 días desde el inicio del ensayo, se midió el crecimiento radial del patógeno en todas las placas de cultivo dual y controles, tal como se indica en la Figura 4.3. Se realizó un promedio del radio del crecimiento del patógeno por día por aislamiento de *Trichoderma*, datos utilizados para graficar en función del tiempo.

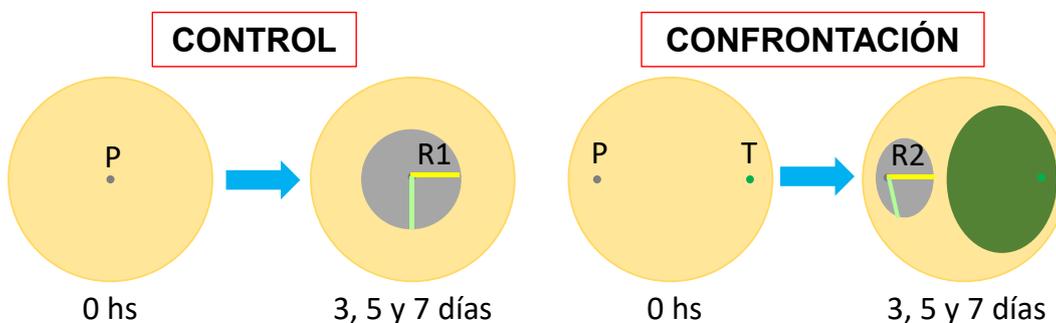


Figura 4.3. Esquema del ensayo de cultivo dual *in vitro* de hongos patógenos (P, colonia gris) de yerba mate creciente en ausencia (CONTROL) y en presencia de los aislamientos de *Trichoderma* (T, colonia verde) (CONFRONTACIÓN). Adaptado de Cubilla-Ríos *et al.* (2019).

Microscopía. A los 3-4 días de incubación, se examinó por microscopía de campo claro la zona de interacción entre el patógeno y los aislamientos de *Trichoderma*, utilizando la metodología descrita en el Capítulo 2 para la visualización de estructuras microscópicas de los aislamientos de *Trichoderma*.

Porcentaje de inhibición (% I). Los datos del ensayo de cultivo dual al día 7 se utilizaron para el cálculo del porcentaje de inhibición:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{(R1 - R2)}{R1} \times 100$$

Donde R1 y R2 son el promedio del radio de crecimiento del patógeno a los 7 días de la placa control y de la confrontación, respectivamente.

Índice de antagonismo. A los 10 días de iniciado el ensayo, se determinó el índice de antagonismo (IA), utilizando la escala de Bell (Bell *et al.* 1982) modificada. Esta escala evalúa cualitativamente la capacidad antagonica que posee *Trichoderma* en invadir y reducir la colonia de hongos fitopatógenos (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Escala de Bell utilizada para evaluar la capacidad antagonica de los aislamientos de *Trichoderma*.

Índice de antagonismo	Capacidad antagonica
4	<i>Trichoderma</i> crece completamente sobre el patógeno y cubre toda la superficie del medio
3	<i>Trichoderma</i> crece dos terceras partes sobre la superficie del medio y esporula parcialmente sobre el patógeno
2	<i>Trichoderma</i> y el patógeno colonizan la superficie del medio y ningún organismo parece dominar al otro
1	El patógeno coloniza dos terceras partes de la superficie del medio y resiste la invasión de <i>Trichoderma</i>
0	El patógeno crece por encima de <i>Trichoderma</i> y ocupa la superficie total del medio

Antagonistas eficientes: aquellos aislamientos de *Trichoderma* que presentaron un porcentaje de inhibición (%) ≥ 40 % y un índice de antagonismo (IA) ≥ 3 en escala de Bell.

4.3.4 Determinación cualitativa de actividades enzimáticas

Se llevaron a cabo ensayos en placa con medios específicos para determinar la producción de diferentes enzimas como celulasas, proteasas, quitinasas, lipasas, amilasas y pectinasas de los aislamientos de *Trichoderma* spp. Todas determinaciones se realizaron por triplicado.

4.3.4.1 Celulasas

En la Tabla 4.5, se muestra el medio utilizado para la determinación de celulasas.

Tabla 4.5. Composición del medio utilizado para la determinación de celulasas.

Componentes del medio	Concentración (p/v)
NaNO ₃	0,2 %
K ₂ HPO ₄	0,1 %
MgSO ₄	0,05 %
KCl	0,05 %
Peptona	0,02 %
Carboximetilcelulosa (CMC)	0,2 %
Agar	1,7 %
pH final 5,5	

Las placas inoculadas con los aislamientos de *Trichoderma* se incubaron durante 5 días a 28 °C con luz constante. Luego, se reveló mediante la adición de rojo Congo 0,1 % p/v (se dejó secar), se lavó con NaCl 1 M y, por último, se agregó ácido acético al 0,5 % v/v para bajar el pH (Teather & Wood, 1982).

Las celulasas hidrolizan la celulosa a unidades de glucosa. Luego del revelado, el rojo Congo es absorbido por las largas cadenas de polisacáridos de CMC. Si el microorganismo utiliza como sustrato la CMC, alrededor de esa zona el colorante rojo Congo no será absorbido, por lo que se observará un halo claro alrededor de la colonia y, por lo tanto, el resultado se considera positivo (Teather & Wood, 1982).

4.3.4.2 Proteasas

Para esta determinación se utilizó el medio compuesto por 5 % p/v de leche descremada y 1 % p/v de agar (Dunne *et al.*, 1997). Las placas inoculadas con los aislamientos de *Trichoderma* se incubaron durante 48 hs a 28 °C con luz constante.

Los microorganismos productores de proteasas, degradan la caseína (proteína predominante de la leche) e incorporan los aminoácidos liberados en la hidrólisis. La formación de un halo transparente alrededor de la colonia se consideró como resultado positivo, debido a la hidrólisis de la caseína (Walsh *et al.*, 1995).

4.3.4.3 Quitinasas

Se utilizó un método cualitativo para determinar la producción de quitinasas en medio sólido mínimo (Grosch *et al.*, 2006). La quitina, (C₈H₁₃O₅N)_n, es un polímero de cadena larga con enlaces β-1,4 de N-acetilglucosamina, difícil de hidrolizar. Las quitinasas son capaces de romper estos polisacáridos que se encuentran en la pared celular de otros microorganismos contribuyendo a la actividad micoparasitaria frente a patógenos fúngicos. Cuando se realiza el *screening* de estas enzimas, en general se utiliza quitina coloidal como fuente de carbono, la cual se encuentra parcialmente degradada y facilita la visualización de la actividad quitinasa por los microorganismos estudiados.

1. Medio con quitina coloidal como única fuente de carbono. La quitina coloidal se preparó siguiendo el protocolo descrito por Takayanagi *et al.* (1991), en el cual la quitina comercial⁷ fue tratada con HCl y se lavó durante varios días para aumentar el pH de la suspensión obtenida. Luego, se determinó el peso seco de quitina en la suspensión de quitina coloidal obtenida.

En la Tabla 4.6., se muestra el medio utilizado para la determinación de quitinasas utilizando como fuente de carbono quitina coloidal como única fuente de carbono.

Tabla 4.6. Composición del medio utilizado para la determinación de quitinasas.

Componentes del medio	Concentración (p/v)
Quitina coloidal	0,15 %
K ₂ HPO ₄	0,27 %
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,07 %
NaCl	0,05 %
KCl	0,05 %
Extracto de levadura	0,013 %
Agar	1,5 %
pH final 5,5	

Las placas inoculadas con los aislamientos de *Trichoderma* se incubaron durante 3 días a 28 °C con luz constante. La aparición de un halo transparente alrededor de la colonia se consideró como resultado positivo por la acción de quitinasas capaces de degradar oligómeros de cadena corta.

2. Medio con quitina como única fuente de carbono. Se utilizó el medio mostrado en la tabla anterior, pero con el agregado de quitina en lugar de quitina coloidal.

Las placas inoculadas con los aislamientos de *Trichoderma* se incubaron durante 5 días a 28 °C con luz constante. Los aislamientos de *Trichoderma* spp. productores de quitinasas degradadoras del polímero quitina, fueron aquellos capaces de crecer en este medio.

4.3.4.4 Lipasas

En la Tabla 4.7., se muestra el medio utilizado para la determinación lipasas (Howe & Ward, 1976).

Tabla 4.7. Composición del medio utilizado para la determinación de lipasas.

Componentes del medio	Concentración
NaCl	0,5 % p/v
CaCl ₂	0,01 % p/v
Peptona	1 % p/v
Tween 80	1 % v/v
Agar	2 % p/v
pH final 5,5	

⁷ [Quitina](#) de camarón, Sigma Aldrich.

Las placas inoculadas con los aislamientos de *Trichoderma* se incubaron durante 5 días a 28 °C con luz constante. Las lipasas catalizan la hidrólisis de acilglicérols de cadena larga. Si el microorganismo es capaz de hidrolizar el Tween 80 se observa la aparición de un precipitado alrededor de la colonia debido a la combinación de Ca^{+2} y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis, formándose monooleato de calcio (Samad *et al.*, 1989).

4.3.4.5 Amilasas

En la Tabla 4.8, se muestra el medio utilizado para la determinación de amilasas.

Tabla 4.8. Composición del medio utilizado para la determinación de amilasas.

Componentes del medio	Concentración (p/v)
Almidón soluble	1 %
CaCl_2	0,015 %
MgSO_4	0,05 %
NaCl	0,05 %
Peptona	0,5 %
Extracto de levadura	0,2 %
Agar	2 %
pH final 5,5	

Las placas inoculadas con los aislamientos de *Trichoderma* se incubaron durante 3 días a 28 °C con luz constante. Las placas se revelaron con una solución I_2/I^- (Composición: I_2/I^- : 1g de I_2 + 6g de IK en 330ml de agua). Los resultados positivos se evidenciaron por la formación de un halo transparente alrededor de la colonia (Deb *et al.*, 2013), ya que el yodo reacciona con el almidón que no fue hidrolizado, intercalándose en la estructura helicoidal del almidón y formando un complejo de color azul intenso.

4.3.4.6 Pectinasas

En la Tabla 4.9, se muestra el medio utilizado para la determinación de pectinasas.

Tabla 4.9. Composición del medio utilizado para la determinación de pectinasas.

Componentes del medio	Concentración (p/v)
Pectinasa cítrica	1 %
K_2HPO_4	0,2 %
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02 %
Solución nutritiva	0,10 %
Peptona	0,05 %
Extracto de levadura	0,05 %
Agar	2 %
pH final 5,5	

Tabla 4.10. Composición de la solución nutritiva o solución de metales

Componentes del medio	Concentración (mg/ml)
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,0
MnSO ₄ .H ₂ O	1,6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,4
CoCl ₂	2,0

Las placas inoculadas con los aislamientos de *Trichoderma* se incubaron durante 5 días a 28 °C con luz constante y luego se revelaron con solución I₂/I⁻ (Anisa & Girish, 2014), tal como se mencionó en la determinación de amilasas. La pectina reacciona con el yodo para formar un complejo color café, por lo que un resultado positivo se observa una decoloración alrededor de la colonia.

4.3.5 Determinación cuantitativa de actividades enzimáticas

4.3.5.1 Preparación del inóculo

Para la realización de las determinaciones cuantitativas enzimáticas se reactivaron los microorganismos en PDA, se tomaron conidios de la colonia desarrollada y se suspendieron en Tween 80 al 0,1 % hasta lograr una concentración de 10⁶ conidios/ml (Figura 4.4).

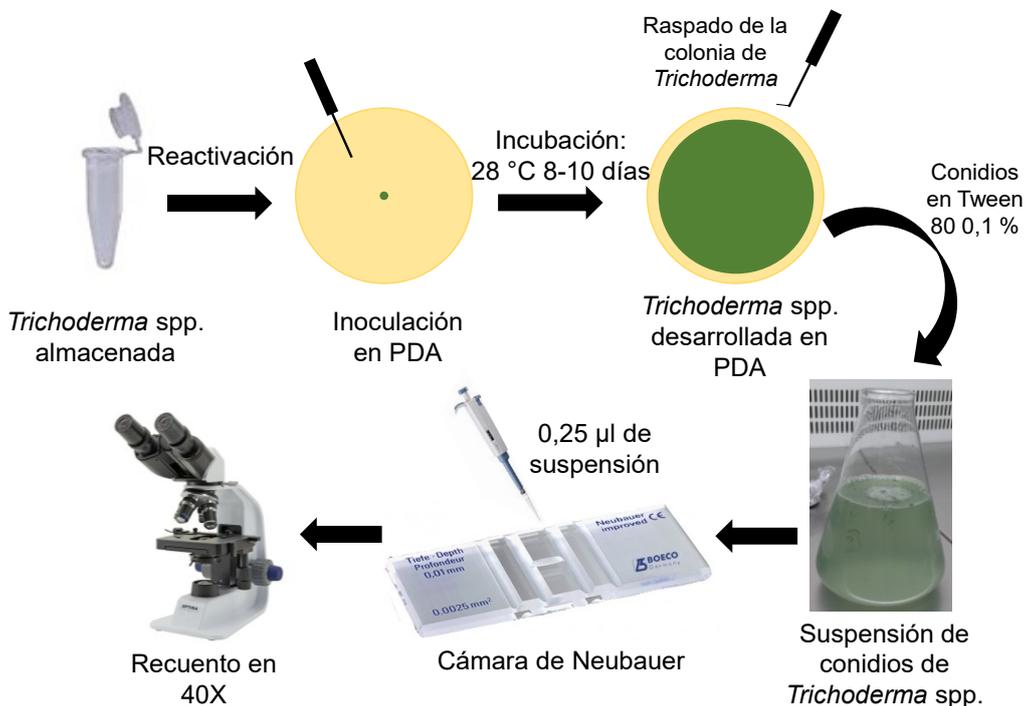


Figura 4.4. Protocolo realizado para la obtención de la suspensión de conidios de *Trichoderma* spp. utilizada para las determinaciones cuantitativas.

Para la realización del recuento de conidios en la cámara de Neubauer en campo claro con aumento 40 X, se enfocó la cámara superior A1 y se contó la cantidad de conidios. Luego se repitió el mismo paso para B2, C3, D4, E5, para la cámara superior e inferior (Figura 4.5).

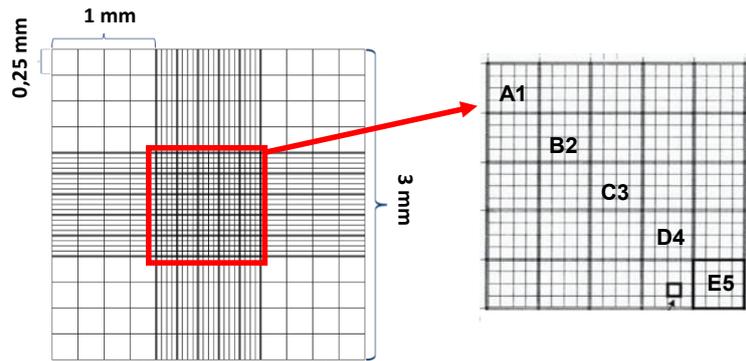


Figura 4.5. Esquema de la cámara de Neubauer utilizada para el recuento de conidios.

La suspensión de conidios inicial, se ajustó según la concentración deseada con el agregado de Tween 80 0,1 % para diluirla o con el agregado de más conidios para concentrarla.

4.3.5.2 Protocolo de inoculación del medio, condiciones de incubación y toma de muestra

En la Figura 4.6, se detalla el protocolo utilizado en todas las determinaciones enzimáticas cuantitativas para la inoculación de los aislamientos de *Trichoderma*, condiciones de incubación y toma de muestra a diferentes días. Este procedimiento, se realizó por triplicado para cada aislamiento en cada determinación.

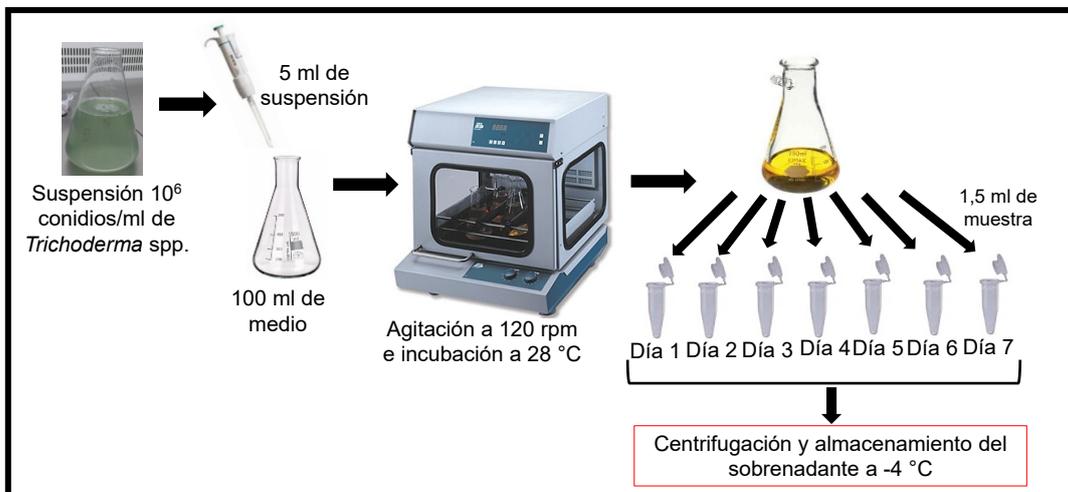


Figura 4.6. Metodología utilizada para la inoculación del medio con los aislamientos de *Trichoderma*, condiciones de incubación y toma de muestra a diferentes días en las determinaciones enzimáticas.

Luego de la centrifugación, el precipitado fue utilizado para determinar peso seco del micelio de los aislamientos de *Trichoderma*, siguiendo el protocolo sugerido por Pérez *et al.* (2016).

4.3.5.3 Actividad β-1,3-glucanasa

En la Tabla 4.11., se muestra el medio utilizado para la determinación de actividad β-1,3-glucanasa.

Tabla 4.11. Composición del medio Mandels.

Componentes del medio	Concentración (p/v)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,14 %
K ₂ HPO ₄	0,2 %
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,038 %
CaCl ₂	0,04 %
Urea	0,03 %
Extracto de levadura	0,025 %
CMC	1 %
Solución traza ⁸	100 µl cada 50 ml de medio
Micelio de <i>F. solani</i> AVF1 ⁹	0,5 %
Agar	1,5 %
pH final 5,5	

Para la determinación de la producción enzimática, se utilizó el protocolo propuesto Ting & Chai (2015) modificado (Figura 4.7). La concentración glucosa liberada se calculó realizando una curva de calibración con triplicados de patrones. Se definió una unidad de actividad específica (UE) de β-1,3-glucanasa como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de glucosa por minuto por gramo de biomasa fúngica.



Figura 4.7. Protocolo utilizado para la medición de actividad β-1,3-glucanasa.

Los blancos utilizados fueron los siguientes:

Blanco reactivo: 0,75 ml *buffer* acético/acetato.

Blanco sustrato: 0,5 ml laminarina + 0,25 *buffer* acético/acetato.

Blanco muestra: 0,5 ml *buffer* acético/acetato + 0,25 ml de muestra.

Para determinar la absorbancia de los blancos, se utilizó el protocolo anteriormente descrito.

⁸ Composición de solución traza (g/ml): FeSO₄.7H₂O 0,0025, MnSO₄.7H₂O 0,0008, ZnSO₄.7H₂O 0,0007, CoCl₂.6H₂O 0,0165.

⁹ Micelio del patógeno fue utilizado como fuente de carbono y nitrógeno (Bara *et al.*, 2003).

4.3.5.4 Actividad quitinasa

El medio utilizado fue el mismo que el de la determinación cualitativa de quitinasas con quitina coloidal como fuente de carbono, pero sin el agregado de agar.

La determinación de la actividad quitinasas se realizó como se muestra en la figura anterior para actividad β -1,3-glucanasa, utilizando quitina coloidal 1 % como sustrato para la reacción enzimática. La concentración azúcares reductores liberados se calculó realizando una curva de calibración con N-acetilglucosamina (NAG) por triplicado. La actividad específica de quitinasa se expresó como 1 μ mol de azúcares reductores liberado por minuto por gramo de biomasa fúngica.

Los blancos utilizados fueron los siguientes:

Blanco reactivo: 0,75 ml de *buffer*

Blanco sustrato: 0,25 ml *buffer* + 0,5 ml de sustrato

Blancos muestra: 0,25 ml muestra + 0,5 ml de *buffer*

4.3.5.5 Actividad celulasa y endoglucanasa

Para estas determinaciones, se utilizó el medio Mandels, composición mostrada en la *Sección 4.3.5.3 Actividad β -1,3-glucanasa*. Se utilizaron las mismas muestras para la medición de actividad celulasa y endoglucanasa.

Medición de actividad celulasa¹⁰. Se utilizó el protocolo propuesto Adney & Nrel (1996) con modificaciones. En la Figura 4.8, se muestra el protocolo utilizado para medir la actividad celulasa. Una unidad de actividad de papel de filtro [*Paper filter unit* (PFU)] se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de glucosa por minuto por gramo de biomasa fúngica.



Figura 4.8. Protocolo utilizado para la medición de actividad celulasa.

Los blancos utilizados fueron los siguientes:

Blanco reactivo: 0,3 ml *buffer* acético/acetato.

Blanco sustrato: papel de filtro + 0,3 ml *buffer* acético/acetato.

Blanco muestra: 0,1 muestra + 0,2 ml *buffer* acético/acetato.

Para determinar la absorbancia de los blancos, se utilizó el protocolo anteriormente descrito.

¹⁰ La actividad celulasa comprende la actividad de las endo y exoglucanasas, las cuales son producidas por *Trichoderma* en presencia de un inductor tal como CMC.

Medición de actividad endoglucanasa. En la Figura 4.9, se muestra el protocolo utilizado para medir la actividad endoglucanasa. Una unidad de actividad enzimática de endoglucanasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por minuto por gramo de biomasa fúngica.



Figura 4.9. Protocolo utilizado para la medición de actividad endoglucanasa.

Los blancos utilizados fueron los siguientes:

Blanco reactivo: 0,2 ml *buffer* acético/acetato.

Blanco sustrato: 0,1 ml CMC + 0,1 ml *buffer* acético/acetato.

Blanco muestra: 0,1 muestra + 0,1 ml *buffer* acético/acetato.

Para determinar la absorbancia de los blancos, se utilizó el protocolo anteriormente descrito.

4.3.6 Producción de sideróforos

Se utilizaron dos métodos cualitativos para censar la producción de sideróforos en medio sólido de los aislamientos fúngicos. En las 2 determinaciones, las placas fueron inoculadas con los aislamientos fúngicos como se mencionó en la [Sección 4.3.2](#).

1. Medio de *screening* para evaluar **producción de hidroxamatos y catecolatos utilizando el medio cromo-azurol-S (CAS)**. Se realizó según el protocolo descrito por Louden *et al.* (2011) (Tabla 4.12). El ensayo se fundamenta en que un fuerte quelante, tal como un sideróforo, remueve el ion férrico del complejo ternario CAS/ Fe^{3+} /bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) y su color cambia de azul a amarillo-anaranjado si el sideróforo es del tipo hidroxamato o de azul a púrpura si se trata de catecolatos.

Tabla 4.12. Composición del medio Cromo S Azurol (CAS).

Componentes del medio	Concentración
PIPES	3,05 % p/v
Triptona	0,016 % p/v
Solución de minerales MM9 (10X)	10 ml
Agua destilada	80 ml
Solución CAS (10X)	10 ml
Glucosa (20 % p/v)	1 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O (1M)	0,05 ml
CaCl ₂ (50 mM)	0,1 ml
Triptófano (1 % p/v)	0,3 ml
Vitaminas	0,05 ml
Micelio de <i>F. solani</i> AVF1 ¹¹	0,5 % p/v
Agar	7,5 % p/v
pH final 6	

Tabla 4.13. Composición de las soluciones utilizadas en medio CAS.

Solución	Componentes
CAS 10X	Solución A: 60,5 mg CAS en 50 ml de agua desionizada 10 ml de Fe ₃ Cl ₆ H ₂ O 1 mM en HCl 10 mM Solución B: 72,9 mg HDTMA en 40 ml de agua desionizada. Esterilización a 121 °C, 20 minutos.
Sales MM9 10X	KH ₂ PO ₄ 0,3 % p/v NaCl 0,5 % p/v NH ₄ Cl 10 % p/v Esterilización a 121 °C, 20 minutos.
Stock de vitaminas	riboflavina 20 mg ácido p-aminobenzoico 20 mg ácido nicotínico 20 mg D-biotina 20 mg D-pantotenato de calcio 20 mg Piridoxal-HCl 20 mg Tiamina-HCl 200 mg agua destilada 100 ml Esterilización con filtros de 0,22 mm.

Los aislamientos de *Trichoderma* se inocularon en las placas de medio CAS y se incubaron a 28 °C durante 5 días en presencia de luz. Se consideró que los aislamientos producían sideróforos cuando se formó un halo de color alrededor de la colonia. Como control positivo, se utilizó una cepa de

¹¹ El micelio del patógeno fue utilizado como fuente de carbono y nitrógeno (Bara *et al.*, 2003).

Pseudomona fluorescens y como control negativo *Escherichia coli*. Esta determinación se realizó por triplicado para cada aislamiento.

2. Medio de *screening* para la selección de aislamientos de *Trichoderma* productores de **sideróforos con alta afinidad por el hierro** (Kotasthane *et al.*, 2017). Se utilizó el medio compuesto por extracto de malta (12,7 g/l) y un quelante fuerte¹², 8-hidroxiquinolina (50 mg/l) (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009). La 8-hidroxiquinolina (8HQ), también denominada 8-quinolinol u oxina, es un quelante de varios metales, por ejemplo hierro, cobre, aluminio, entre otros, y muestra una fuerte capacidad complejante (Pierre *et al.*, 2003). Los aislamientos capaces de crecer en este medio luego de 5 días de incubación a 28 °C se consideraron productores de sideróforos que presentan alta afinidad por el hierro. Esta determinación se realizó por triplicado para cada aislamiento.

4.3.7 Solubilización de compuestos insolubles de fósforo

Para determinar la capacidad de solubilizar compuestos insolubles de fósforo, se utilizó el medio NBRIP¹³(Nautiyal, 1999). En la Tabla 4.14, se muestra la composición del medio utilizado.

Tabla 4.14. Composición del medio NBRIP para la solubilización de compuestos insolubles de P.

Componentes del medio	Concentración (p/v)
Glucosa	1 %
Ca ₃ (PO ₄) ₂	0,5 %
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,5 %
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,025%
KCl	0,02 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,01 %
Agar	1,7 %
pH final 6	

Las placas inoculadas se incubaron a 28 °C durante 5 días en presencia de luz. Los microorganismos capaces de solubilizar Ca₃(PO₄)₂ presentaron un halo transparente alrededor de la colonia. Como control positivo, se utilizó una cepa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 salvaje y como control negativo un mutante no productor de ácidos orgánicos de dicha cepa (Crespo *et al.*, 2011).

4.3.8 Determinación cuantitativa de auxinas y/o análogos

Se utilizó el protocolo sugerido por Asghar *et al.* (2002), con modificaciones. Los aislamientos de *Trichoderma* se hicieron crecer en medio extracto de malta (12,7 g/l) con 500 µg/ml L-Triptofano (L-Trp) y sin L-Trp. Las condiciones de incubación y la toma de muestras se realizaron siguiendo el

¹² 8-hidroxiquinolina se considera un quelante de Hierro fuerte, ya que inhibe el desarrollo de aquellos microorganismos que no son capaces de utilizarlo.

¹³ De sus siglas en inglés *National Botanical Research Institute's phosphate*.

protocolo detallado en la Sección 4.3.5.3 *Actividad β-1,3-glucanasa*. La determinación se realizó por triplicado.

Para la determinación de auxinas la muestra se mezcló con el reactivo de Salkowski¹⁴ en una proporción 1:2 (muestra: reactivo), se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos y luego se midió la absorbancia a 530 nm. La curva de calibración se realizó utilizando ácido indol acético (AIA). Los valores de absorbancia obtenidos se expresaron en µg por ml de ácido indol acético (AIA) por miligramo de biomasa fúngica.

Los blancos utilizados fueron los siguientes:

Blanco reactivo: agua: reactivo (1:2)

Blanco muestra: muestra: agua (1:2)

4.3.9 Índices de Promoción del Crecimiento Vegetal

Con el propósito de realizar un análisis integral de las actividades de promoción del crecimiento vegetal para todos los aislamientos de *Trichoderma* y seleccionar aquellos con mejores características como PGPM, se realizó el cálculo de los índices que se mencionan a continuación, según Agarás *et al.* (2015) con modificaciones.

4.3.9.1 Índice del Potencial de Biocontrol

Para el cálculo del Índice de Potencial de Biocontrol fue necesario calcular el Índice Potencial de Antagonismo (API) y el Índice de Ensayos de Biocontrol (BTI), los cuales se mencionan a continuación.

API¹⁵. Utilizando los resultados del porcentaje de inhibición y del índice de antagonismo (IA) del ensayo de cultivo dual en placa, se calculó el API_i para cada aislamiento de *Trichoderma* con la siguiente fórmula:

$$API_i = \frac{\left(\sum \frac{\% I_{i,j}}{\% I_{i,j \max}} \right) \times \text{N}^\circ \text{ de patógenos inhibidos}}{n}$$

Donde:

- *i* es el número correspondiente a cada aislamiento de *Trichoderma* (de 1 a 14).
- *j* es el número correspondiente a cada patógenos (de 1 a 4).
- % *I_{i,j}* es el porcentaje de inhibición del aislamiento *i* para cada patógeno *j*.
- % *I_{i,j max}* es el mayor porcentaje de inhibición encontrado entre todos los aislamientos *i* para un patógeno *j*. Por ejemplo, si el aislamiento 1 fuera el de mayor porcentaje de inhibición para el patógeno 2 el *I_{i,j max}* sería el *I_{1,2}*, pero si el aislamiento 12 fuera el de mayor porcentaje de inhibición contra el patógeno 2, el *I_{i,j max}* sería el *I_{12,2}*.
- *n* es el número total de patógenos (*n* = 4).

¹⁴ Composición del reactivo Salkowski: 10,8 M H₂SO₄ y 4,5 g/l FeCl₃.

¹⁵ Del inglés *Antagonism Potential Index*.

• número de patógenos inhibidos: se calculó para cada aislamiento de *Trichoderma* con la siguiente fórmula:

$$\text{Nº de patógenos inhibidos} = \frac{(\text{Nº de patógenos con } \% I \geq 40 \% + \text{Nº de patógenos con IA} \geq 3)}{2}$$

BTI¹⁶. Utilizando los resultados de las determinaciones enzimáticas cuantitativas de β-1,3-glucanasa; quitinasa; celulasa; endoglucanasa a todos los tiempos evaluados; y las cualitativas de proteasa y amilasa, se calculó el BTI para cada aislamiento de *Trichoderma* con la siguiente fórmula:

$$\text{BTI}_i = \frac{\sum \frac{a_{i,j}}{a_{i,j} \max}}{n}$$

Donde:

- i es el número correspondiente a cada aislamiento de *Trichoderma* (de 1 a 14).
- j es el número correspondiente a cada actividad enzimática (de 1 a 17).
- a_{i,j} es la actividad de la enzima j del aislamiento i.
- a_{i,j} max es la mayor valor de actividad de la enzima j seleccionada entre todos los aislamientos i.
- n es el número total de actividades evaluadas, n=17.

Para las determinaciones cualitativas, los valores de a_{i,j} y a_{i,j} max utilizados fueron desde 0 (resultado negativo) a 4 (muy productor: ++++).

BPI¹⁷ es el Índice de Potencial de Biocontrol. Se calculó utilizando el API y BTI con la siguiente fórmula:

$$\text{BPI} = \frac{\text{API} + \text{BTI}}{2}$$

4.3.9.2 Índice de Acción Biofertilizante

El Índice de Acción de Biofertilizante (IAB), se calculó utilizando los resultados de las siguientes determinaciones: producción de sideróforos y pectinasas, solubilización de compuestos insolubles de fósforo y las determinaciones cuantitativas de ácido indol acético, con la siguiente fórmula:

$$\text{IAB}_i = \frac{\sum \frac{a_{i,j}}{a_{i,j} \max}}{n}$$

Donde:

- i es el número correspondiente a cada aislamiento de *Trichoderma* (de 1 a 14).
- j es el número correspondiente a cada determinación (de 1 a 10).

¹⁶ Del inglés *Biocontrol Traits Index*.

¹⁷ Del inglés *Biocontrol Potencial Index*.

- $a_{i,j}$ es el valor de la determinación j del aislamiento i .
- $a_{i,j}$ max es el mayor valor de la determinación j seleccionado entre todos los aislamientos i .
- n es el número total de determinaciones evaluadas, $n=10$.

Para las determinaciones cualitativas, los valores de $a_{i,j}$ y $a_{i,j}$ max utilizados fueron: 0 (resultado negativo) a 4 (muy productor: ++++).

4.3.9.3 Índice de Promoción de Crecimiento Vegetal

El Índice de Promoción de Crecimiento Vegetal (PGPI)¹⁸, tiene en cuenta todas las actividades de promoción del crecimiento vegetal para cada aislamiento de *Trichoderma*, se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{PGPI} = \frac{\text{BPI} + \text{IAB}}{2}$$

4.3.10 Análisis estadístico

4.3.10.1 Análisis de la varianza de una vía (ANOVA)

Se realizó el análisis estadístico ANOVA de los resultados de los siguientes ensayos: ensayo dual en placa, actividades enzimáticas cuantitativas de β -1,3-glucanasa, quitinasa, celulasa y endoglucanasa, concentración de AIA en la determinación de auxinas y el API. Para la realización del ANOVA, se evaluó el cumplimiento de los supuestos: normalidad y homogeneidad de varianza (Balzarini *et al.*, 2008). Además, aquellos datos que presentaron diferencias estadísticamente significativas, se compararon mediante el test LSD Fisher con un nivel de significancia de 0,05.

4.3.10.2 Análisis multivariado

La estadística multivariada es usada para comparar, agrupar y/o clasificar ciertas observaciones en función de varias variables (Balzarini *et al.*, 2008). Tomando todos los datos de todas las determinaciones¹⁹ descritas en este capítulo y el API (variables para cada microorganismo) se realizó un análisis multivariado mediante el análisis de componentes principales (PCA)²⁰. Los resultados del PCA se visualizan en un gráfico denominado biplot, el cual permite apreciar cuales de las determinaciones realizadas en este trabajo son las que posicionan mejor a los aislamientos de *Trichoderma* como PGPM.

Luego, se realizó un análisis multivariado mediante la realización de un análisis de conglomerado utilizando las determinaciones que presentaron mayor influencia en el posicionamiento de los aislamientos en el PCA. Como resultado de este análisis se obtuvo un dendrograma jerárquico²¹, el

¹⁸ Del inglés *Plant Growth Promotion Index*

¹⁹ Determinaciones cualitativas: la matriz se realizó con números desde 0 (resultado negativo) a 4 (muy productor: ++++).

²⁰ El PCA es una técnica que permite identificar las variables que explican la mayor parte de la variabilidad de los datos, explorar las correlaciones entre variables y reducir la dimensión del análisis al combinarlas (Córdoba *et al.*, 2012).

²¹ En biología, las técnicas jerárquicas traducen mejor la complejidad de la organización de los seres vivos y la existencia de distintos niveles evolutivos.

cual presenta el agrupamiento en función de la distancia seleccionada e indica que los aislamientos en un mismo grupo comparten un gran número de características comunes (Balzarini *et al.*, 2008). Estos análisis se realizaron utilizando el programa InfoStat versión 2018 (Di Rienzo *et al.*, 2018).

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1 Capacidad antagonista de los aislamientos de *Trichoderma*

En la Figura 4.10, se muestran imágenes representativas de 2 de los ensayos de antagonismo de cultivo dual realizados con *Phoma* sp. LBM 207–*T. asperelloides* LBM 193 y *F. oxysporum* I5RF–*Trichoderma* sp. LBM 202.

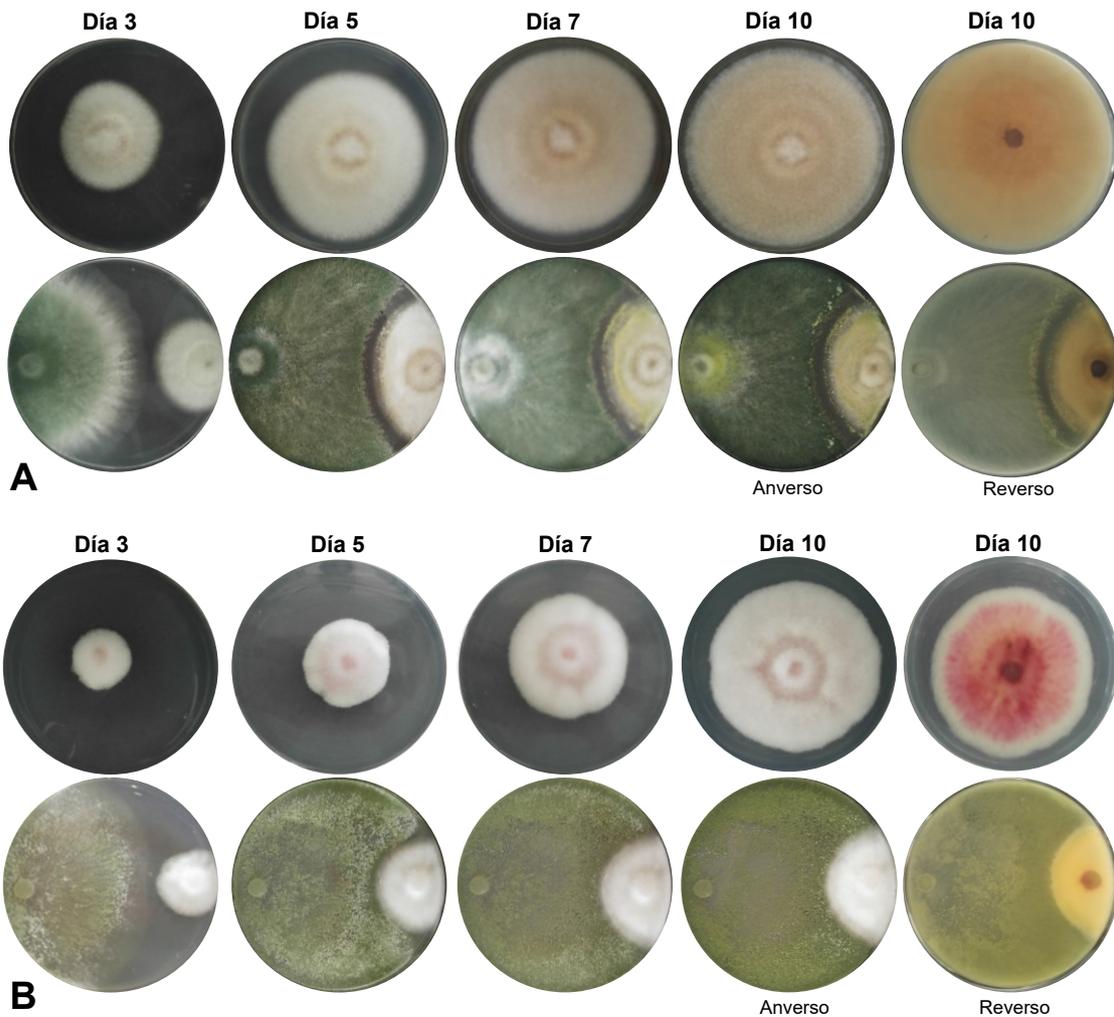


Figura 4.10. A. Imágenes de *Phoma* sp. LBM 207 creciendo solo (parte superior) y en presencia de *T. asperelloides* LBM 193 (parte inferior) a diferentes días de incubación a 28°C. B. Imágenes de *F. oxysporum* I5RF creciendo solo (parte superior) y en presencia de *Trichoderma* sp. LBM 202 (parte inferior) a diferentes días de incubación a 28°C.

Las imágenes que se muestran en la Figura 4.10 son representativas del crecimiento de los aislamientos de *Trichoderma* por sobre la colonia del patógeno (Figura 4.10.A) y de los que crecieron hasta la colonia del patógeno (Figura 4.10.B). **Observando estas imágenes, podemos decir que:**

- todos los patógenos fúngicos presentaron inhibición del crecimiento, evidenciadas por la disminución del radio de crecimiento del hongo y en algunos casos incluso por el cambio de color del micelio (Figura 4.10).

- en muchos de los enfrentamientos se observó, además, un cambio de color del micelio e incluso una zona clara (sin micelio) entre *Trichoderma* y el patógeno (Figura 4.10.A), lo cual muestra la “agresividad” del aislamiento de *Trichoderma* frente a ese patógeno. Esto podría deberse a la liberación de metabolitos en el medio y a la degradación de las hifas del patógenos por parte del antagonista.

En la Figura 4.11., se muestran imágenes representativas de la zona de interacción del ensayo de cultivo dual patógeno-*Trichoderma* observadas en el microscopio.

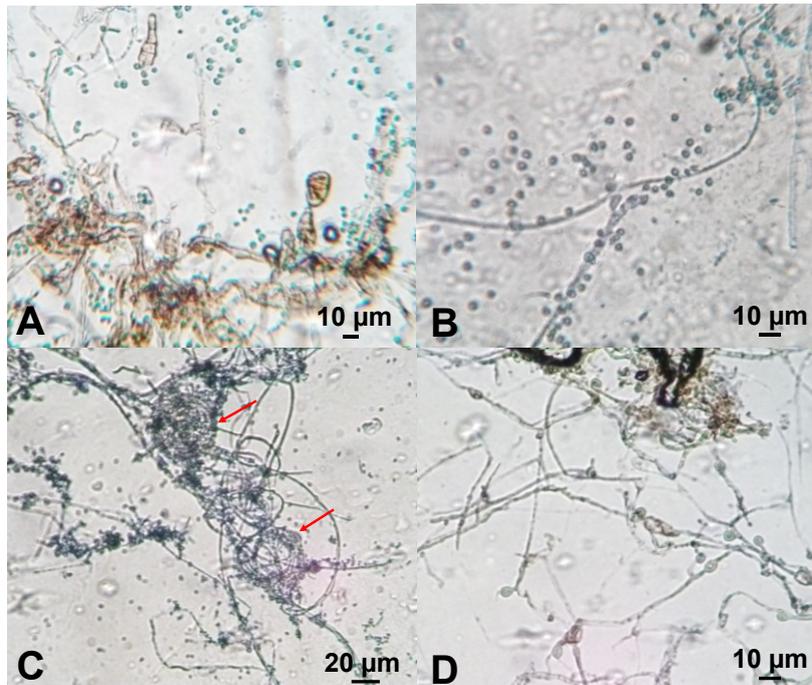


Figura 4.11. Imágenes de microscopía de la interacción *Trichoderma* spp. - patógeno. **A.** *Alternaria* sp. LBM 186 en presencia de *T. asperellum* LBM 199₅. **B.** *Phoma* sp. LBM 207₁ en presencia de *T. asperelloides* LBM 206₁₄. **C.** *F. oxysporum* I5RF en presencia de *T. asperelloides* LBM 193₁. **D.** *Alternaria* sp. LBM 186₁₁ en presencia de *T. asperelloides* LBM 197₃.

De las imágenes de microscopía de la interacción patógeno-*Trichoderma*, podemos decir que:

- en todos los ensayos de cultivo dual, se observaron conidios de *Trichoderma* cerca o sobre las hifas y conidios del patógeno (Figura 4.11.A y B).
- en la interacción de la mayoría de los aislamientos de *Trichoderma* frente a *Phoma* sp. LBM 207₁, se observó que las hifas de *Trichoderma* lograron enrollarse alrededor de las del patógeno (Figura 4.11.C, flechas rojas).
- fue evidente la formación de clamidosporas en varios aislamientos de *Trichoderma* en presencia del patógeno (Figura 4.11.D). La presencia de clamidosporas podría deberse a que *Trichoderma* está biológicamente adaptado para una colonización agresiva de los sustratos y, además, es capaz de desarrollarse en condiciones adversas, como cuando está compitiendo con otros microorganismos (Infante *et al.*, 2009).

En la Figura 4.12 se observa la disminución del radio del crecimiento del patógeno en función del tiempo, la cual muestra en forma cuantitativa que todos los aislamientos de *Trichoderma* tuvieron cierto grado de inhibición sobre los 4 fitopatógenos evaluados.

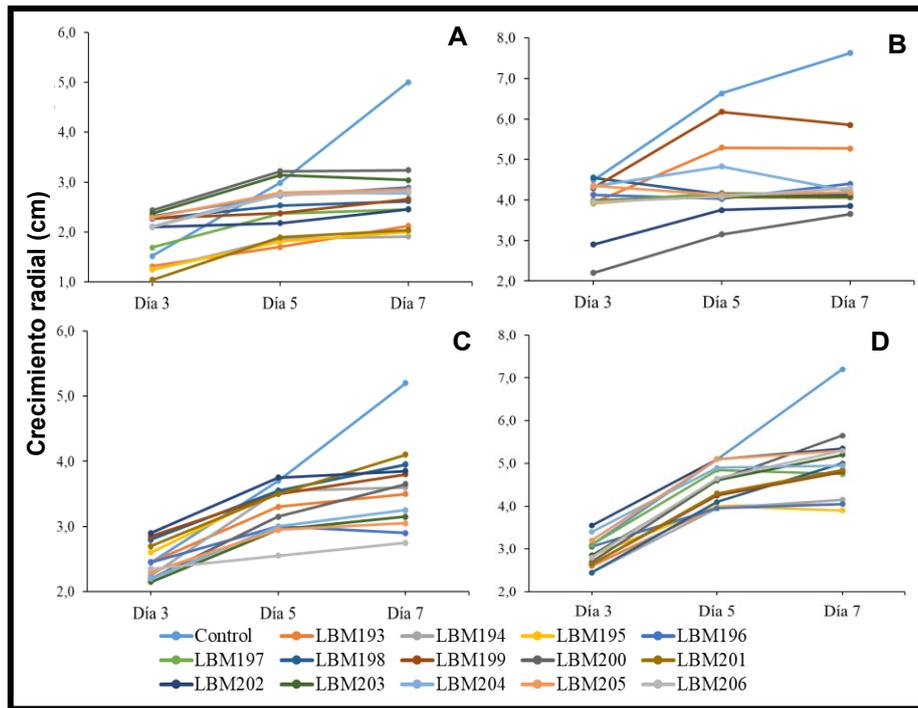


Figura 4.12. Promedio del radio de crecimiento del patógeno. A. *Alternaria* sp. LBM 186₁₁ B. *Phoma* sp. LBM 207₁ C. *F. oxysporum* I5RF D. *F. solani* AVF1 en ausencia (control) y presencia de los aislamientos de *Trichoderma*.

En la Tabla 4.15, se muestra el porcentaje de inhibición de los patógenos por cada uno de los aislamientos de *Trichoderma*. Se marcaron con color amarillo aquellos aislamientos que lograron inhibir en más de un 40 % el desarrollo de los patógenos.

Tabla 4.15. Porcentaje de inhibición de los patógenos por cada uno de los aislamientos.

Aislamiento	<i>Trichoderma</i>	<i>Alternaria</i> sp. LBM 186 ₁₁	<i>Phoma</i> sp. LBM 207 ₁	<i>F. oxysporum</i> I5RF	<i>F. solani</i> AVF1
LBM 193 ₁	<i>asperelloides</i>	57,50 ± 3,00	32,91 ± 1,47	32,7 ± 1,92	43,75 ± 0,98
LBM 194 ₁	<i>asperelloides</i>	61,87 ± 1,22	47,39 ± 0,18	30,77 ± 1,92	42,36 ± 0,98
LBM 195 ₁	<i>asperelloides</i>	59,80 ± 2,51	47,01 ± 0,72	24,03 ± 0,96	46,53 ± 0,98
LBM 196 ₃	<i>strigosellum</i>	42,30 ± 1,98	43,95 ± 0,72	44,23 ± 1,92	43,75 ± 4,91
LBM 197 ₃	<i>asperelloides</i>	50,95 ± 2,19	47,13 ± 0,18	28,85 ± 1,92	34,03 ± 0,98
LBM 198 ₃	<i>asperelloides</i>	47,65 ± 2,62	45,76 ± 0,37	24,04 ± 2,88	30,56 ± 3,93
LBM 199 ₅	<i>asperellum</i>	46,80 ± 2,55	25,48 ± 2,44	26,92 ± 1,92	33,33 ± 1,96
LBM 200 ₅	<i>hamatum</i>	35,25 ± 1,06	45,99 ± 2,88	29,81 ± 2,88	21,53 ± 0,98
LBM 201 ₆	<i>strigosellum</i>	59,20 ± 2,26	48,28 ± 0,36	21,15 ± 1,92	32,64 ± 0,98
LBM 202 ₈	sp.	50,85 ± 0,64	46,75 ± 2,46	25,96 ± 0,96	25,69 ± 0,98
LBM 203 ₉	<i>asperellum</i>	39,17 ± 1,07	48,03 ± 0,36	39,42 ± 0,96	27,78 ± 1,96
LBM 204 ₉	<i>asperelloides</i>	44,45 ± 2,05	46,24 ± 2,49	37,5 ± 2,88	31,25 ± 2,95
LBM 205 ₉	<i>strigosellum</i>	43,00 ± 0,87	46,62 ± 1,93	41,35 ± 0,96	26,39 ± 1,96
LBM 206 ₁₀	<i>asperelloides</i>	43,80 ± 3,27	45,22 ± 3,6	47,12 ± 2,88	27,08 ± 0,98

Los resultados del porcentaje de inhibición obtenidos evidenciaron que:

- 13 aislamientos de *Trichoderma* fueron capaces de inhibir más del 40 % el desarrollo de *Alternaria* sp. LBM 186₁₁
- 12 aislamientos de *Trichoderma* fueron capaces de inhibir más del 40 % el desarrollo de *Phoma* sp. LBM 207₁.
- sólo 4 de los 14 aislamientos de *Trichoderma* fueron capaces de inhibir más del 40 % el desarrollo de *F. oxysporum* I5RF y *F. solani* AVF1, provenientes de raíz de yerba mate.

En la Tabla 4.16, se muestran los valores del índice de antagonismo para todos los aislamientos de *Trichoderma*.

Tabla 4.16. Índice de antagonismo de *Trichoderma* frente a los patógenos fúngicos.

Aislamiento	<i>Trichoderma</i>	<i>Alternaria</i> sp. LBM 186 ₁₁	<i>Phoma</i> sp. LBM 207 ₁	<i>F. oxysporum</i> I5RF	<i>F. solani</i> AVF1
LBM 193 ₁	<i>asperelloides</i>	4	3	3	4
LBM 194 ₁	<i>asperelloides</i>	4	3	2	2
LBM 195 ₁	<i>asperelloides</i>	4	3	2	2
LBM 196 ₃	<i>strigosellum</i>	2	2	2	2
LBM 197 ₃	<i>asperelloides</i>	4	3	3	3
LBM 198 ₃	<i>asperelloides</i>	4	2	2	3
LBM 199 ₅	<i>asperellum</i>	4	2	2	3
LBM 200 ₅	<i>hamatum</i>	3	2	2	2
LBM 201 ₆	<i>strigosellum</i>	4	2	2	3
LBM 202 ₈	<i>Trichoderma</i> <i>sp.</i>	4	2	2	2
LBM 203 ₉	<i>asperellum</i>	4	2	2	2
LBM 204 ₉	<i>asperelloides</i>	3	2	2	3
LBM 205 ₉	<i>strigosellum</i>	2	2	2	2
LBM 206 ₁₀	<i>asperelloides</i>	3	3	2	3

Los resultados del índice de antagonismo mostraron que:

- los aislamientos que lograron inhibir el crecimiento y esporular sobre los 4 patógenos fúngicos evaluados fueron *T. asperelloides* LBM 193₁ y LBM 197₃ (color celeste).
- *T. asperelloides* LBM 206, logró inhibir el crecimiento y esporular sobre 3 de los 4 patógenos evaluados.

En base a todos los resultados mostrados anteriormente, aquellos aislamientos de *Trichoderma* que se consideraron como eficientes antagonistas, debido a que presentaron un porcentaje de inhibición $\geq 40\%$ y un índice de antagonismo IA ≥ 3 en escala de Bell fueron:

- todos los aislamientos de *T. asperelloides* y *T. asperellum*, *Trichoderma* sp. LBM 202₈ y *T. strigosellum* LBM 201₉ frente al patógeno *Alternaria* sp. LBM 186₁₁.

- los aislamientos de *T. asperelloides* LBM 194₁, LBM 195₁, LBM 197₃ y LBM 206₁₀ frente al patógeno *Phoma* sp. LBM 207₁.
- *T. asperelloides* LBM 193₁ frente al patógeno *F. solani* AVF1.

4.4.2 Determinación cualitativa de actividades enzimáticas

En la Tabla 4.17, se muestran los resultados y una imagen representativa de un resultado positivo de las determinaciones enzimáticas cualitativas para los aislamientos de *Trichoderma* evaluados. En el [Anexo 4](#) se muestran imágenes representativas de los resultados de las determinaciones enzimáticas de los aislamientos de *Trichoderma*.

Tabla 4.17. Resultados de la producción enzimática de los aislamientos de *Trichoderma*.

Aislamiento	<i>Trichoderma</i>	Celulasas	Proteasas	Quitinasas 1	Quitinasas 2	Lipasas	Amilasas	Pectinasas
LBM 193	<i>asperelloides</i>	+++	++	+	+	+	++	+
LBM 194	<i>asperelloides</i>	+++	+	+	+	+	+	+
LBM 195	<i>asperelloides</i>	+++	+	++++	+	+	++	+
LBM 196	<i>strigosellum</i>	++	+	+	-	+	+	-
LBM 197	<i>asperelloides</i>	+++	++	++++	+	+	+	+
LBM 198	<i>asperelloides</i>	++	+	+	+	+	++	-
LBM 199	<i>asperellum</i>	+++	+	+	+	+	+	-
LBM 200	<i>hamatum</i>	++	+	++	-	+	-	-
LBM 201	<i>strigosellum</i>	++	+	++	-	+	+	-
LBM 202	<i>T. sp.</i>	+++	++	+	-	+	+	-
LBM 203	<i>asperellum</i>	+++	+	+	+	+	++	-
LBM 204	<i>asperelloides</i>	+++	++	+	+	+	++	-
LBM 205	<i>strigosellum</i>	+++	+	+	-	+	++	-
LBM 206	<i>asperelloides</i>	+++	+++	++++	+	+	++	-



Las imágenes debajo de cada ensayo representan el resultado positivo de la determinación. Referencias: +: baja producción, ++: producción moderada, +++: alta producción, ++++: producción muy alta. Quitinasas 1 fuente de carbono quitina coloidal. Quitinasas 2: fuente de carbono quitina no coloidal.

Los resultados de las determinaciones cualitativas de actividades enzimáticas mostraron que:

- todos los aislamientos fueron capaces de producir celulasas, proteasas, quitinasas en medio con quitina coloidal y lipasas.
- todos los aislamientos, excepto *T. hamatum* LBM 200₆, fueron capaces de producir amilasas.
- los aislamientos pertenecientes a *T. asperellum* y *T. asperelloides* fueron los únicos capaces de producir quitinasas utilizando como sustrato quitina no coloidal, por lo cual, estos aislamientos podrían tener una acción más agresiva frente a los patógenos fúngicos en comparación a aquellos aislamientos de *Trichoderma* que produjeron quitinasas solo en el medio con quitina coloidal.
- *T. asperelloides* LBM 193₁, LBM 194₁, LBM 195₁ y LBM 197₃ fueron capaces de producir pectinasas.

Los resultados de la producción enzimática de celulasas, proteasas, quitinasas, amilasas y lipasas de los aislamientos pertenecientes a *T. asperelloides* y *T. asperellum*, fueron coincidentes con lo

reportado por diversos autores para estas especies (Qualhato *et al.*, 2013; Sawant *et al.*, 2020; B. D. S. Silva *et al.*, 2011; Sood *et al.*, 2020).

Con respecto a *T. hamatum*, los resultados mostraron que es capaz de producir una variedad de enzimas, pero en bibliografía son escasos reportes sobre estudios de la capacidad de producción enzimática de esta especie en relación a su acción como PGPM (Sayed *et al.*, 2019), al igual para la especie *T. strigosellum*.

En relación a la actividad de pectinasa, varias especies de *Trichoderma* son utilizadas en la industria biotecnológica para diferentes aplicaciones (Anisa & Girish, 2014), pero es escasa su caracterización en relación a la habilidad que estas enzimas le confieren a los microorganismos para colonizar el interior de las plantas.

Relacionando los resultados de estas determinaciones y los mostrados anteriormente en el ensayo de cultivo dual en placa, podemos decir que la inhibición que se logró por los aislamientos de *Trichoderma* podría deberse a la acción de algunas de las enzimas evaluadas, ya que todos los aislamientos fueron capaces de producir al menos 4 de ellas.

4.4.3 Determinación cuantitativa de actividades enzimáticas

En el Anexo 4 de este capítulo se muestran las curvas de calibración realizadas para todas las determinaciones enzimáticas cuantitativas.

4.4.3.1 Actividad β -1,3- glucanasa y quitinasa

En la Figura 4.13, se muestra la actividad de β -1,3-glucanasa y quitinasa específica máxima alcanzada durante los días de medición para los aislamientos de *Trichoderma*.

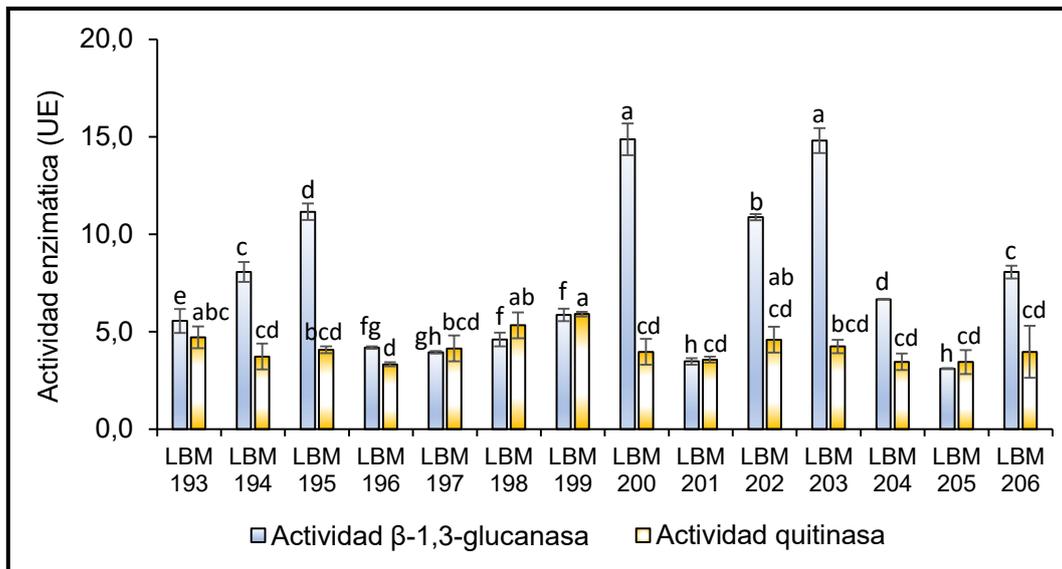


Figura 4.13. Actividad β -1,3-glucanasa y quitinasa. Actividad específica máxima de los aislamientos de *Trichoderma*. Letras iguales arriba de las barras indican que no existen diferencias estadísticamente significativas de las actividades β -1,3-glucanasa y quitinasa, respectivamente ($p > 0,05$).

Los resultados de la actividad β -1,3-glucanasa y quitinasa mostraron que:

- *T. hamatum* LBM 200₅ y *T. asperellum* LBM 203₉ presentaron mayor actividad β -1,3-glucanasa con diferencia estadísticamente significativas en comparación a los demás aislamientos.
- *T. asperelloides* LBM 193₁ y LBM 198₃, *T. asperellum* LBM 199₃ y *Trichoderma sp.* LBM 202₈ presentaron mayor actividad quitinasa en comparación a los demás aislamientos.

Qualhato *et al.* (2013) y Sawant *et al.* (2020), al igual que en este trabajo, observaron que *T. asperellum* y *T. asperelloides*, respectivamente, fueron capaces de producir la mayor actividad quitinasa y β -1,3-glucanasa en comparación con otras especies de *Trichoderma*.

En general, los aislamientos de *Trichoderma* son buenas productoras de ambas enzimas, sin embargo, en los resultados obtenidos, se observó una diferencia marcada de actividad quitinasa en comparación con la actividad β -1,3-glucanasa. Se ha reportado que la composición de las paredes celulares de los patógenos vegetales es un factor importante para inducir la producción de estas enzimas (Qualhato *et al.*, 2013). Por lo tanto, la diferencia en los valores de actividad entre ambas determinaciones podría deberse al sustrato utilizado en el medio de cultivo para el desarrollo de los aislamientos, ya que en la determinación de actividad quitinasa se utilizó quitina coloidal como fuente carbono y para determinar la actividad β -1,3-glucanasa se usó micelio del patógeno *F. solani* AVF1.

4.4.3.2 Actividad celulasa y endoglucanasa

En la Figura 4.14, se muestra la actividad de celulasa y endoglucanasa específica máxima alcanzada durante los días de medición para los aislamientos de *Trichoderma*.

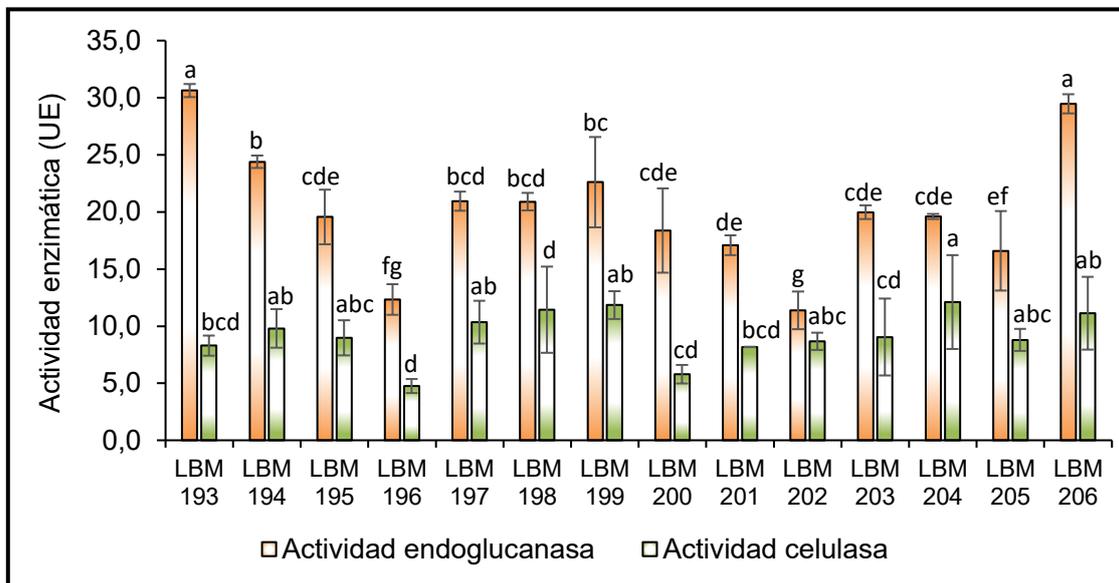


Figura 4.14. Actividad endoglucanasa y celulasa. Actividad específica máxima de los aislamientos de *Trichoderma*. Letras iguales arriba de las barras indican que no existen diferencias estadísticamente significativas de las actividades endoglucanasa y celulasa, respectivamente ($p > 0,05$).

Los resultados de la actividad endoglucanasa y celulasa indicaron que:

- *T. asperelloides* LBM 193₁ y LBM 206₁₀ mostraron una mayor actividad endoglucanasa con diferencias estadísticamente significativas comparadas con los valores de actividad endoglucanasa de los demás aislamientos.

- *T. asperelloides* LBM 194₁, LBM 195₁, LBM 197₃, LBM 204₉, LBM 206₁₀, *T. asperellum* LBM 199₅, *Trichoderma* sp. LBM 202₈ y *T. strigosellum* LBM 205₉ mostraron la mayor actividad celulasa con respecto a los demás aislamientos.

Los resultados presentados concuerdan con diversos estudios que reportan a las especies del complejo *T. asperellum* como productoras de celulasas y de endoglucanasas (Sawant *et al.*, 2020; Horta Crivelente *et al.*, 2018; Zapata *et al.*, 2018).

4.4.6 Producción de sideróforos

En la Figura 4.15 se muestran imágenes representativas de las determinaciones cualitativas de la producción de sideróforos en medio CAS y con 8HQ, y en la Tabla 4.15 se muestran los resultados de estas determinaciones para todos los aislamientos de *Trichoderma*. En el [Anexo 4](#) se muestran imágenes representativas de los resultados de la determinación de sideróforos en medio CAS de los demás aislamientos de *Trichoderma*.

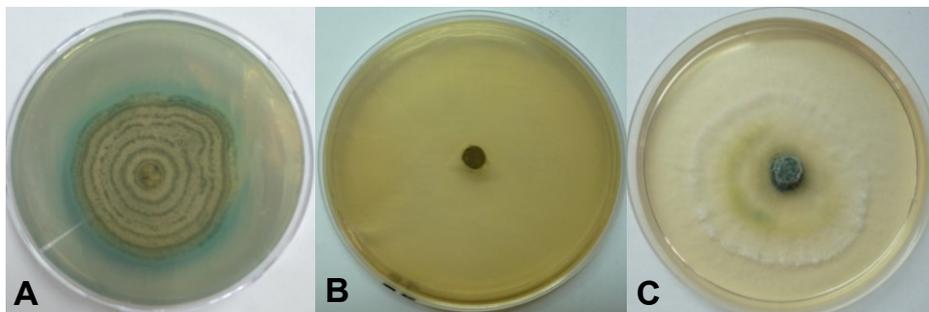


Figura 4.15. Imágenes del resultado de la producción de sideróforos en: medio CAS **A.** *Trichoderma* sp. LBM 202₈ (sideróforo de tipo hidroxamato); medio con 8HQ **B.** resultado negativo de *T. strigosellum* LBM 203₉ **C.** resultado positivo de *T. asperelloides* LBM 194₁.

Tabla 4.15. Producción de sideróforos en diferentes medios.

Aislamiento	<i>Trichoderma</i>	CAS	8-HQ
LBM 193 ₁	<i>asperelloides</i>	+	-
LBM 194 ₁	<i>asperelloides</i>	+	+++
LBM 195 ₁	<i>asperelloides</i>	+	-
LBM 196 ₃	<i>strigosellum</i>	-	-
LBM 197 ₃	<i>asperelloides</i>	+	-
LBM 198 ₃	<i>asperelloides</i>	+	-
LBM 199 ₅	<i>asperellum</i>	-	-
LBM 200 ₅	<i>hamatum</i>	-	-
LBM 201 ₆	<i>strigosellum</i>	+	+
LBM 202 ₈	sp.	+	-
LBM 203 ₉	<i>asperellum</i>	-	-
LBM 204 ₉	<i>asperelloides</i>	+	+
LBM 205 ₉	<i>strigosellum</i>	-	-
LBM 206 ₁₀	<i>asperelloides</i>	+	++

Los resultados de la determinación de la producción de sideróforos evidenciaron que:

- todos los aislamientos pertenecientes a *T. asperelloides*, *T. strigosellum* LBM 201₆ y *Trichoderma sp.* LBM 202₈ son productoras de sideróforos de tipo hidroxamato, debido a que el cambio de color en el medio CAS fue de azul a naranja, acorde con lo reportado con Sawant *et al.* (2020) para *T. asperelloides*.
- de los aislamientos de *Trichoderma* productores de sideróforos en medio CAS, *T. asperelloides* LBM 194₁, LBM 204₉ y LBM 206₁₀, y *T. strigosellum* LBM 201₆ fueron positivos en la determinación de sideróforos en medio con 8HQ, por lo que presentaron una capacidad complejante más fuerte que el resto de los aislamientos. Estos resultados coinciden con los reportados por Hoyos-Carvajal *et al.* (2009) para especies de *T. asperellum* y *T. harzianum*.

4.4.7 Solubilización de compuestos insolubles de fósforo

En la Figura 4.16, se muestra una imagen representativa del resultado de la determinación de la solubilización de compuestos insolubles de fósforo para los aislamientos de *Trichoderma*, en la que se observa una clarificación del medio y no un halo alrededor de la colonia como puede ocurrir con aislamientos bacterianos. En el [Anexo 4](#) se muestran imágenes representativas de los resultados de la determinación de solubilización de compuestos insolubles de fósforo de los demás aislamientos de *Trichoderma*.

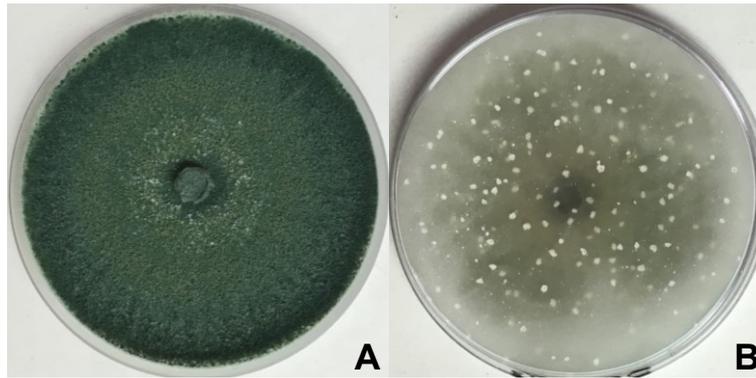


Figura 4.16. Imágenes representativas del resultado de solubilización de compuestos insolubles de fósforo. **A.** Anverso y **B.** reverso de la colonia de *T. strigosellum* LBM 205₉ desarrollada en el medio NBRIP luego de 5 días de incubación a 28 °C.

Los resultados de la capacidad de solubilización de compuestos insolubles de fósforo evidenciaron que:

- todos los aislamientos de *Trichoderma* mostraron un resultado positivo en la determinación, por lo cual fueron capaces de solubilizar compuestos insolubles de fósforo.

Coincidentemente con estos resultados, existen estudios que reportan a *T. asperelloides* (Borges-Chagas *et al.*, 2017; Sood *et al.*, 2020) y *T. asperellum* (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009) como solubilizadores de compuestos insolubles de fósforo. De acuerdo con la búsqueda bibliográfica exhaustiva, no se han encontrado investigaciones que reporten a *T. hamatum* y *T. strigosellum* como solubilizadores de compuestos insolubles de fosforo.

4.4.8 Determinación cuantitativa de auxinas y/o análogos

En la Figura 4.17, se muestran los valores promedio de la concentración de AIA alcanzada entre 1 y 7 días, en presencia y ausencia de Trp, para los aislamientos de *Trichoderma*.

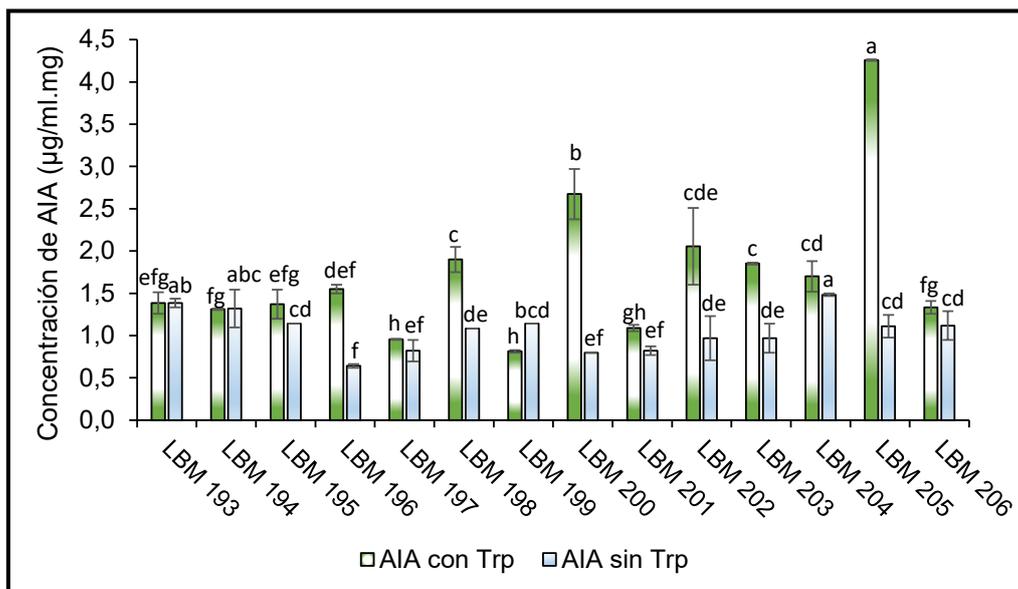


Figura 4.17. Concentración máxima de AIA en presencia y ausencia de Trp para los aislamientos de *Trichoderma*. Letras iguales arriba de las barras indican que no existieron diferencias estadísticamente significativas de las actividades enzimáticas ($p > 0,05$).

Los resultados de la producción de AIA evidenciaron que:

- para la mayoría de los aislamientos, se observó un aumento en la producción de AIA con el agregado de Trp, coincidiendo estos resultados con los reportados por Bader *et al.* (2020).
- *T. strigosellum* LBM 205₉ fue el aislamiento que mayor cantidad de AIA produjo en presencia de Trp.
- los aislamientos pertenecientes al complejo *T. asperellum* presentaron mayor producción de AIA en ausencia de Trp y, además, estos valores fueron similares a los obtenidos en presencia de Trp. Esto podría deberse a que las especies del complejo *T. asperellum* producen otro tipo de auxinas diferentes al AIA, como giberelinas y/o citocinas (Sood *et al.*, 2020; Yadav *et al.*, 2020).

4.4.9 Agrupamiento de aislamientos de *Trichoderma* mediante análisis multivariado

En la Figura 4.18, se muestra el biplot obtenido del análisis de PCA realizado con los resultados de las determinaciones realizadas en este trabajo. Esta figura muestra la correlación entre las determinaciones realizadas y, el posicionamiento y la clasificación de los aislamientos de *Trichoderma* en función de estas determinaciones.

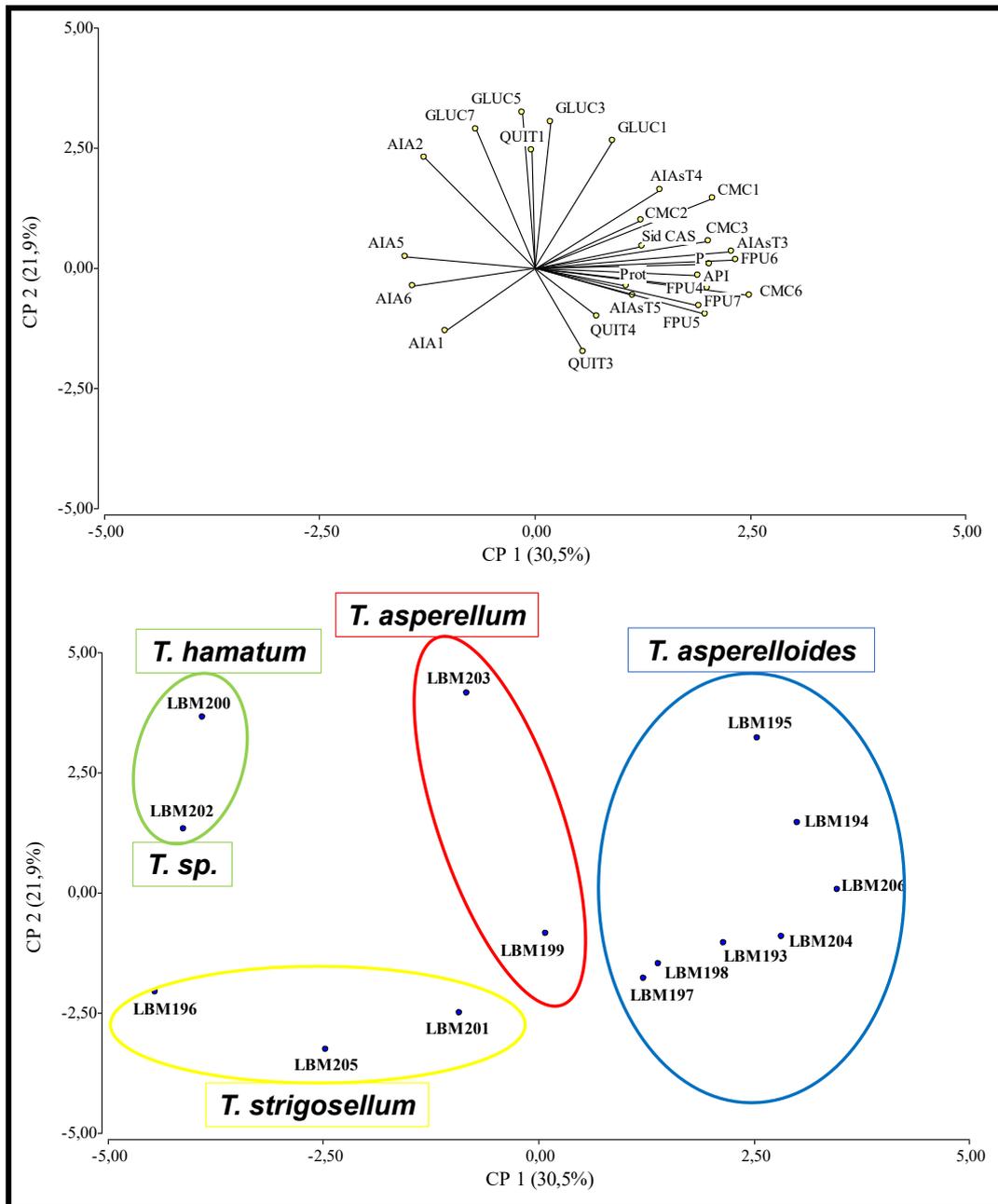


Figura 4.18. Arriba. Biplot de la correlación de las determinaciones, las cuales definieron el posicionamiento de los aislamientos de *Trichoderma*. Abajo. Posicionamiento de los aislamientos de *Trichoderma* en relación a las propiedades como PGPM. **Referencias:** actividad endoglucanasa día 1, 2, 3, 4 y 6: CMC1, CMC2, CMC3 y CMC6; actividad celulasa día 4, 5, 6 y 7: FPU4, FPU5, FPU6 y FPU7; actividad β -1,3-glucanasa día 1, 3, 5 y 7: GLUC1, GLUC3, GLUC5 y GLUC7; actividad quitinasa día 1, 3 y 4: QUIT, QUIT3 y QUIT 4; producción de AIA en presencia de Trp día 1, 2, 5 y 6: AIA1, AIA2, AIA5 y AIA6; producción de AIA en ausencia de Trp al día 3, 4 y 5: AIA5T3, AIA5T4 y AIA5T5; sideróforos en medio CAS (CAS); proteasas (prot), solubilización de fosfatos (P) y el índice API (Tabla 4.15).

Los resultados del análisis de PCA mostraron que:

- el posicionamiento de los aislamientos de *T. asperelloides* estuvo mayormente explicado por los resultados de las determinaciones cualitativas de proteasa, sideróforos y solubilización de fosfato, las determinaciones cuantitativas de β -1,3-glucanasa, quitinasas, celulasas, endoglucanasas y AIA, y el API. Además, estas determinaciones mostraron una correlación positiva entre ellas.

- el posicionamiento de *T. asperellum* LBM 193₁ y LBM 203₉ estuvo mayormente explicado por los resultados de la producción enzimática de quitinasas, y para LBM 203₉, además, por la actividad β-1,3-glucanasa.
- el posicionamiento de *T. hamatum* LBM 200₅ y *Trichoderma sp.* LBM 202₈ estuvo mayormente explicado por los resultados de la producción de AIA en presencia de Trp y por la actividad β-1,3-glucanasa, que tuvieron una correlación positiva entre ellas.
- el posicionamiento de los aislamientos de *T. strigosellum* estuvo mayormente explicado por los resultados de la producción de AIA en presencia de Trp.

En la Figura 4.19, se muestra el dendrograma jerárquico del agrupamiento de los aislamientos de *Trichoderma* obtenido a partir del análisis de conglomerado, el cual muestra el agrupamiento de los aislamientos en función de las determinaciones evaluadas.

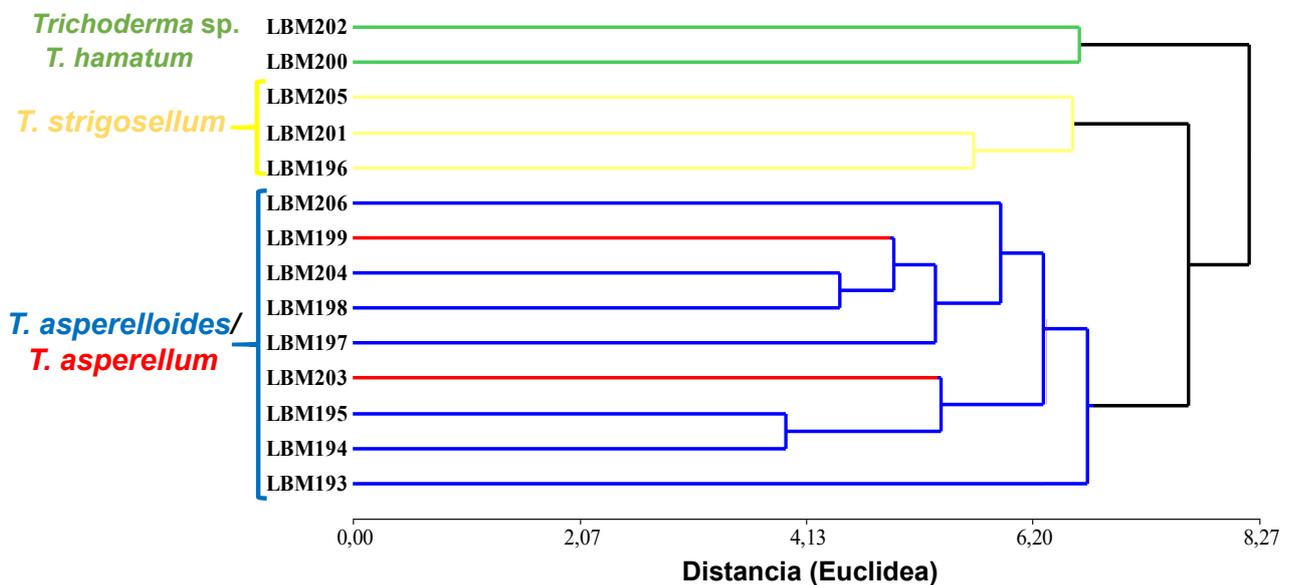


Figura 4.19. Dendrograma jerárquico del agrupamiento de los aislamientos de *Trichoderma*. La clasificación de los aislamientos se basó en las determinaciones utilizadas en el PCA.

Los resultados obtenidos del biplot de PCA y del dendrograma jerárquico permitieron agrupar a los aislamientos de *Trichoderma* en base a sus características como PGPM y este agrupamiento fue coincidente con el obtenido utilizando marcadores moleculares (árbol filogenético), [Capítulo 2](#). Por lo tanto, los aislamientos de *Trichoderma* pertenecientes a una misma especie no solo se pudieron agrupar por similitudes en sus secuencias nucleotídicas, sino que, además, mostraron similares características como PGPM.

4.4.10 Selección de aislamiento de *Trichoderma* con características como PGPM in vitro

En la Tabla 4.15, se muestran los valores de los índices de promoción del crecimiento vegetal para los aislamientos de *Trichoderma*.

Tabla 4.15. Índices de promoción del crecimiento vegetal de los aislamientos de *Trichoderma*.

Aislamiento	<i>Trichoderma</i>	Promedio de patógenos inhibidos	API	BTI	BPI	IAB	PGPI
LBM 193 ₁	<i>asperelloides</i>	2,5	0,507	0,717	0,612	0,624	0,618
LBM 194 ₁	<i>asperelloides</i>	1,5	0,332	0,756	0,544	0,616	0,580
LBM 195 ₁	<i>asperelloides</i>	1,5	0,323	0,808	0,566	0,610	0,588
LBM 196 ₃	<i>strigosellum</i>	0	0,000	0,387	0,193	0,403	0,298
LBM 197 ₃	<i>asperelloides</i>	2,5	0,491	0,666	0,578	0,464	0,521
LBM 198 ₃	<i>asperelloides</i>	1	0,180	0,636	0,408	0,582	0,495
LBM 199 ₅	<i>asperellum</i>	1	0,161	0,536	0,348	0,400	0,374
LBM 200 ₅	<i>hamatum</i>	0,5	0,082	0,589	0,335	0,473	0,404
LBM 201 ₆	<i>strigosellum</i>	1,5	0,291	0,473	0,382	0,459	0,421
LBM 202 ₈	<i>Trichoderma</i> sp.	1	0,181	0,582	0,382	0,621	0,514
LBM 203 ₉	<i>asperellum</i>	0,5	0,096	0,661	0,378	0,645	0,486
LBM 204 ₉	<i>asperelloides</i>	1	0,196	0,699	0,448	0,647	0,548
LBM 205 ₉	<i>strigosellum</i>	0	0,000	0,506	0,253	0,709	0,481
LBM 206 ₁₀	<i>asperelloides</i>	1,5	0,302	0,771	0,537	0,549	0,543

*Promedio de patógenos inhibidos= (% Inhibición > 40% + IA ≥ 3)/2. API: índice Potencial de Antagonismo, BTI: Índice de Ensayos de Biocontrol, BPI: Índice del Potencial de Biocontrol, IAB: Índice de Acción Biofertilizante, PGPI: Índice Potencial de Promoción del Crecimiento.

En la Figura 4.20, se muestra de una manera gráfica los índices presentados en la Tabla 4.15.

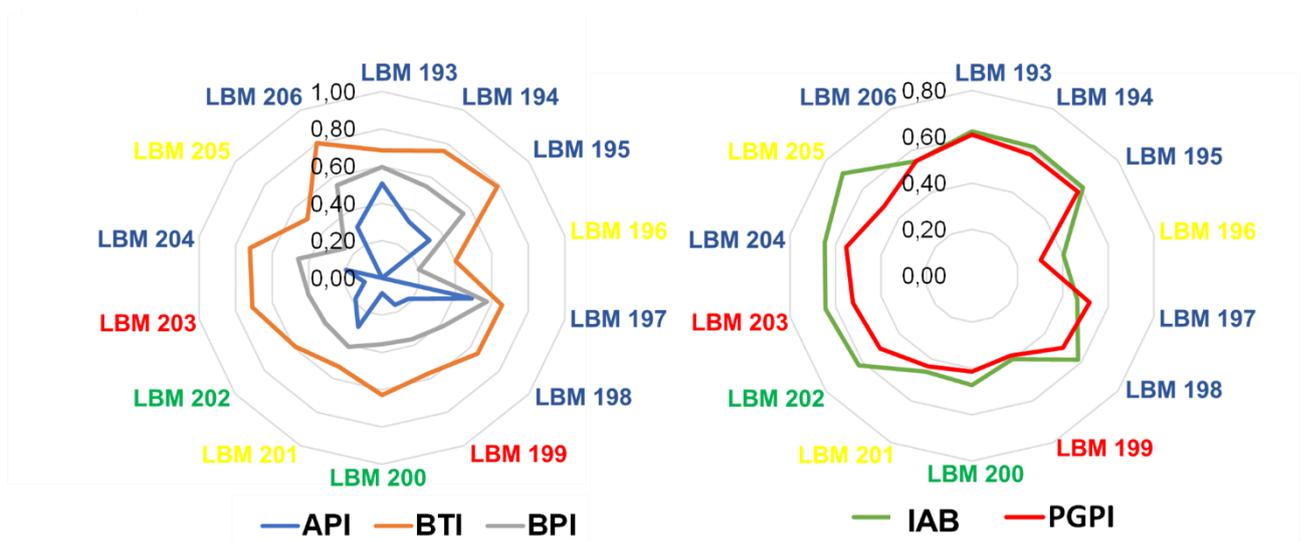


Figura 4.20. Gráfico radial de los índices de promoción del crecimiento vegetal.

Los resultados de los índices mostrados anteriormente indicaron que:

- los aislamientos de *T. asperelloides*, LBM 193₁ y LBM 197₃, fueron los que presentaron mayor API.
- todos los aislamientos pertenecientes a *T. asperelloides* (siglas LBM en azul) presentaron los mayores BTI y BPI, destacándose el índice obtenido para LBM 195₁ en BTI y LBM 193₁ en BPI. Esto

indica que LBM 195₁ fue el aislamiento que presentó mejor capacidad de producir enzimas y metabolitos evaluados. Mientras que, LBM 193₁, no solo fue un buen productor de enzimas y metabolitos, sino que también fue un eficiente antagonista frente a los patógenos evaluados (API).

- *T. strigosellum*, LBM 205₉ fue el que presentó mayor IAB, debido principalmente por la elevada producción de AIA.
- los mayores valores de PGPI lo presentaron los aislamientos de *T. asperelloides*, siendo LBM 193₁ el que presentó mayor PGPI, en consecuencia, presentó mejores características como PGPM.
- el aislamiento *Trichoderma sp.* LBM 202₈ (color verde), presentó el mayor PGPI en comparación al resto de los aislamientos que no pertenecen a *T. asperelloides*, el cual estuvo mayormente influenciado por los resultados de IAB.

El análisis de los resultados presentados en este capítulo nos permitió concluir que se lograron caracterizar como promotores del crecimiento vegetal *in vitro* los 14 aislamientos fúngicos de especies del género *Trichoderma* obtenidos de endorizósfera de yerba mate de la provincia de Misiones. Estos resultados permitieron agrupar a los aislamientos de *Trichoderma* evaluados en base a sus características como PGPM en 3 grupos que coincidieron con el agrupamiento realizado de los mismos en el Capítulo 2, sumando más características comunes a los grupos estudiados.

Este trabajo es el primer reporte de aislamientos fúngicos de especies del género *Trichoderma* obtenidos de endorizósfera de yerba mate de la provincia de Misiones con capacidades como PGPM. Además, a nuestro entender, **es la primera vez** que se caracterizan especies de *T. strigosellum* con capacidad de promoción del crecimiento *in vitro*.

Por todo lo expuesto, los microorganismos seleccionados para la realización de ensayos de promoción del crecimiento *in vivo* en plantas de yerba mate en condiciones de vivero, fueron:

- *T. asperelloides* LBM 193₁, LBM 204₉ y LBM 206₁₀, por presentar mayor PGPI que el resto de los aislamientos y por haber sido aisladas de plantas diferentes.
- *Trichoderma sp.* LBM 202₈, por ser el siguiente aislamiento que presentó mayor PGPI después de los *T. asperelloides* y por la posibilidad de ser a una especie aun no descrita.

CAPÍTULO 5

Formulación de un bioinsumo a base de *Trichoderma* y evaluación de la promoción del crecimiento vegetal *in vivo*

CAPÍTULO 5: Formulación de un bioinsumo a base de *Trichoderma* y evaluación de la promoción del crecimiento vegetal *in vivo*

5.1 RESUMEN

En los estudios de investigación y desarrollo de bioinsumos a base de *Trichoderma* se suceden diversas etapas que conducen a la obtención de un formulado de calidad, característica dada por un título elevado de conidios viables al inicio de la formulación y una elevada viabilidad en el envase y en el sitio de aplicación. En la práctica comúnmente ocurre que excelentes resultados de laboratorio no resultan reproducibles en invernadero o a campo, debido a la falta de estudios sobre calidad de las formulaciones, así como de estudios *in situ* en donde los microorganismos deben sobrellevar condiciones bióticas y abióticas adversas del ambiente. Por lo tanto, hay ciertas pautas que se deben tener en cuenta a la hora de desarrollar un bioinsumo a base de PGPM, y específicamente a base de *Trichoderma*, para que los potenciales efectos benéficos que estos microorganismos pueden aportar sean logrados. La manera más común de cultivar hongos filamentosos es en fermentación en sustrato sólido, principalmente debido a que crecen y producen esporas o conidios más fácilmente en este sistema que en medio líquido. Considerando que el arroz es utilizado comúnmente como sustrato para el crecimiento de *Trichoderma*, en el presente capítulo se describen los ensayos para obtener un formulado de calidad a partir de los aislamientos de *Trichoderma* y su aplicación en ensayos *in vivo*. Para evaluar el efecto promotor se determinaron diferentes parámetros de crecimiento de las plantas de yerba mate: altura, diámetro, clorofila, número de hojas, peso seco e incidencia. El análisis de los resultados presentados en este capítulo nos permitió concluir que se obtuvieron formulados de calidad a base de los 4 aislamientos de *Trichoderma* ensayados. Todos los aislamientos de *Trichoderma* mostraron un efecto promotor del crecimiento en plantas de yerba mate en etapa temprana de vivero, siendo el aislamiento LBM 193₁ el que presentó mayor acción biofertilizante y el aislamiento LBM 202₈ el que mejoró en mayor medida el aspecto fitosanitario de las plantas.

5.2 INTRODUCCIÓN

Tal como se detalló en el Capítulo 1, en los estudios de investigación y desarrollo de bioinsumos a base de PGPM se suceden diversas etapas que conducen a la obtención de un bioinsumo microbiano eficaz (Figura 5.1).

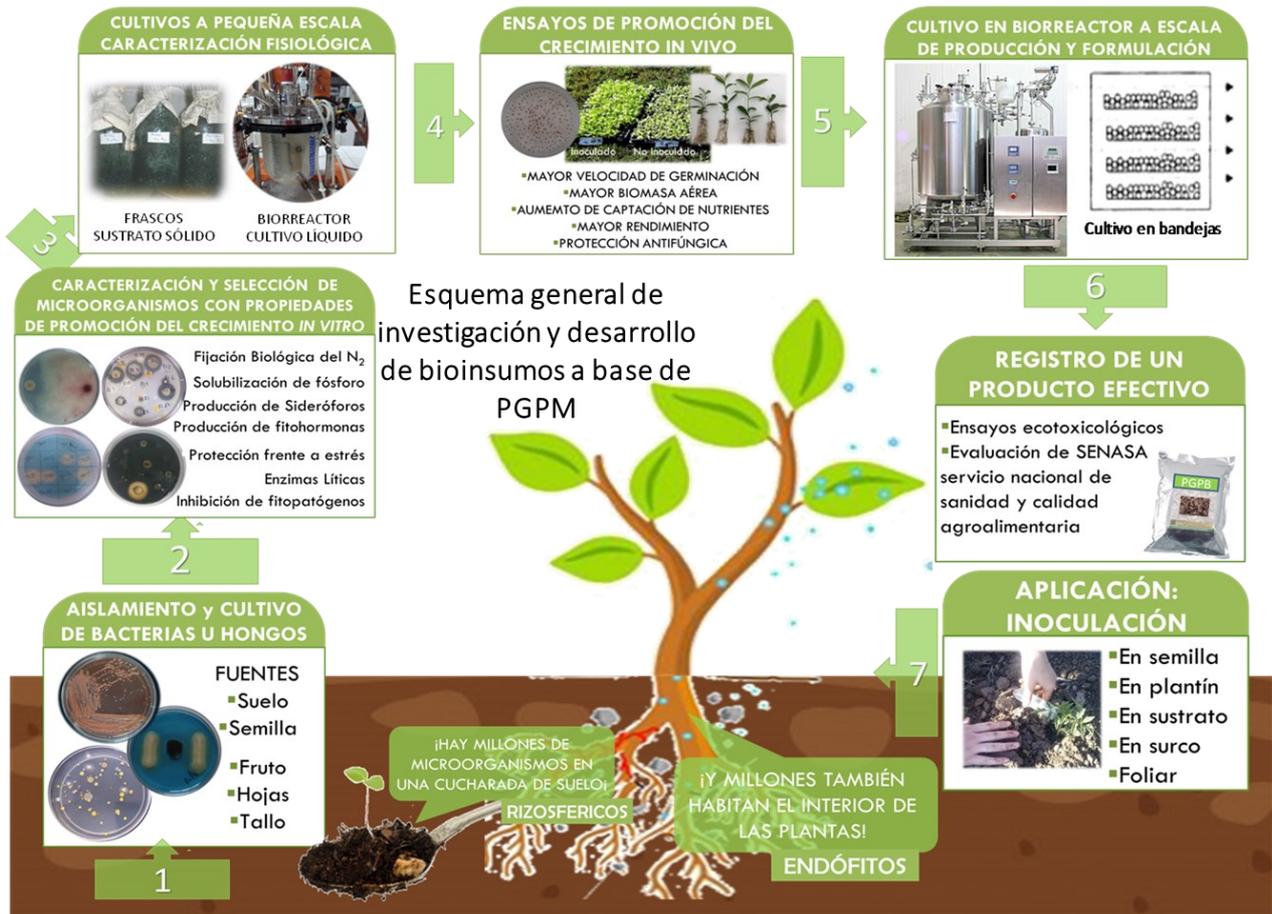


Figura 5.1. Esquema de desarrollo de un bioinsumo microbiano.

En general, luego de la selección del microorganismo a evaluar y la caracterización de ciertas capacidades de promoción del crecimiento *in vitro*, continúa la etapa de ensayos *in vivo*, en la que se evalúa el efecto que producen los PGPM después de ser inoculados en las plantas en donde se los pretende utilizar como potenciales bioinsumos. Esta etapa, comúnmente, se lleva a cabo primero en el laboratorio en condiciones controladas en donde se tratan de optimizar, por ejemplo, dosis a inocular, momento y forma de aplicación, entre otras características de la inoculación, evaluando ciertos parámetros de crecimiento de las plantas. Luego de esta etapa, la evaluación final que determinará la eficacia del bioinsumo microbiano es la evaluación en vivero o a campo, tal como ocurre en la primera etapa del cultivo de yerba mate.

Tal como se describió a lo largo de este trabajo de tesis, son diversas las especies del género *Trichoderma* que presentan la capacidad para promover el crecimiento vegetal *in vivo*, como se muestra en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Especies de *Trichoderma* y sus efectos de promoción del crecimiento vegetal en diferentes cultivos (Hossain *et al.*, 2017; Stewart & Hill, 2014).

PGPM	Cultivo	Efectos en la planta
<i>Aislamientos de Trichoderma sp.</i>	Pino de California	Mayor crecimiento de plántulas y esquejes. Aumento de la altura y peso seco de las plantas. Incremento del diámetro del tallo.
<i>T. asperellum PR11</i>	Cacao	Aumento de altura de las plantas, peso fresco de la raíz y de brotes.
<i>Trichoderma GT2-1</i>	Cebada	Aumento en la longitud del tallo y biomasa seca de brotes. Espigas más largas y producción de más semillas.
<i>T. hamatun</i>	Melón	Aumento del peso fresco de la raíz.
<i>T. harzianum</i>	Pepino, morrón	Aumento de altura y peso seco de las plantas. Incremento del área foliar. Aumento del vigor de la planta y del contenido de clorofila.
<i>T. longipile y T. tomentosum</i>	Repollo	Mayor área foliar, peso seco de brotes y raíces.
<i>Trichoderma sp.</i>	Roble plateado	Aumento de altura y circunferencia de las plantas
<i>Trichoderma sp.</i>	Manzano	Mayor peso total de las plantas.
<i>T. viride</i>	Algodón	Mayor longitud de brotes y raíces. Mayor peso seco de la planta.
<i>T. viride BBA 70239</i>	Tomate, <i>Arabidopsis Thaliana</i>	Aumento del peso fresco de la raíz y aumento del contenido de clorofila.

A la acción **biofertilizante** de las especies de *Trichoderma*, además, se puede sumar la acción como **biocontroladores**, tal como se detalló en el Capítulo 4, e incluso estas acciones pueden ser sinérgicas.

No obstante, un problema que se encuentra a menudo en la mayoría de los experimentos con PGPM es la inconsistencia de la respuesta de las plantas a la inoculación, es decir, la falta de respuesta en la etapa final, de vivero o de campo. Esta falta de respuesta es atribuida generalmente a una ineficiente colonización (Lugtenberg & Kamilova, 2009), y en este sentido es importante destacar la complejidad de factores bióticos o abióticos que conducen a una baja colonización de las raíces por los PGPM que se traduce en la falta de respuesta global de la planta a la inoculación, tales como:

- bióticos: genotipo y estado fisiológico de la planta, mecanismos de defensa, comunidad microbiana nativa.
- abióticos: composición y manejo del suelo, factores climáticos.

Independientemente de las diversas propiedades promotoras del crecimiento vegetal de *Trichoderma*, en la práctica su uso como bioinsumo es reducido, ya que excelentes resultados de laboratorio no resultan reproducibles ni en invernadero ni a campo, en general, debido a factores bióticos y abióticos que regulan su *performance*. Para minimizar estos efectos, es necesario producir bioinsumos cuyas formulaciones aseguren una determinada calidad, dada por una elevada viabilidad en el envase y en el sitio de aplicación y estén acompañadas por estudios sobre su forma, dosis y momento de inoculación en el cultivo (Stewart & Hill, 2014).

Por lo tanto, hay ciertas pautas que se deben tener en cuenta a la hora de desarrollar un bioinsumo a base de PGPM, y específicamente a base de hongos como *Trichoderma*, para que los efectos benéficos potenciales que estos microorganismos pueden aportar sean logrados.

5.2.1 Multiplicación de la biomasa microbiana

Entre las etapas de desarrollo de un bioinsumo microbiano se requiere la optimización de su producción, es decir, la multiplicación de la biomasa microbiana a una escala mayor que la escala de laboratorio. La multiplicación o cultivo de los microorganismos se realiza en un **biorreactor** o **fermentador** que consiste en un recipiente que debe asegurar ciertas funciones que pueden resumirse en los puntos que se detallan a continuación:

- mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo.
- mantener constante y homogénea la temperatura.
- minimizar los gradientes de concentración de nutrientes.
- suministrar oxígeno (necesario para el metabolismo aeróbico) a una velocidad tal que satisfaga el consumo.
- el diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente inoculado con el microorganismo deseado.

Para satisfacer estos requerimientos existen dos grandes grupos de cultivos:

➡ Fermentaciones líquidas sumergidas (FLS): contenido de agua del medio 90-95 %. Hay tres formas básicas según si el sistema opera cerrado o abierto: Batch o Discontinuo (es el más simple y el más utilizado para la producción de bioinsumos microbianos), Batch alimentado y Cultivo Continuo. Reactores del tipo tanque agitado o columnas de burbujeo (Figura 5.2).

➡ Fermentaciones en sustrato sólido (FSS): el medio son partículas húmedas con ausencia o muy bajo contenido de agua libre. Según el tipo de sustrato: natural (granos, residuos agroindustriales, entre otros) o soporte inerte impregnado con medio nutritivo (perlita, poliuretano). Generalmente son sistemas de cultivo cerrados tipo Batch, donde sólo hay intercambio de fase gaseosa (Figura 5.2).

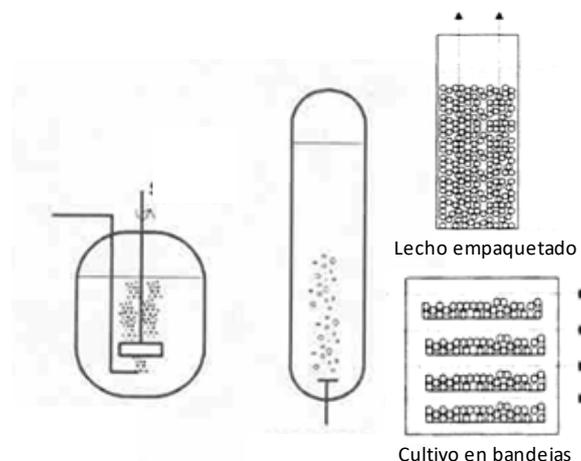


Figura 5.2. Esquema de un biorreactor tipo tanque agitado (izquierda), columna de burbujeo (centro) y FSS (derecha).

La manera más común de cultivar hongos filamentosos es en FSS debido a que:

- crecen y producen esporas o conidios más fácilmente en sustrato sólido que en medio líquido, obteniendo mayores concentraciones de producto.
- la mayoría de las FLS se llevan a cabo en biorreactores agitados mecánicamente (con un motor que mueve unas paletas) que generan fuerzas de corte que no son toleradas por la mayoría de los hongos filamentosos ya que provoca la ruptura del micelio en forma de *pellets* y el daño de las hifas disminuyendo su rendimiento.

5.2.2 Características de la producción de un bioinsumo microbiano a base de especies del género *Trichoderma*

Trichoderma se puede producir a gran escala en formulaciones sólidas y líquidas con inóculo viable (hifas, clamidosporas y conidios) (Cumagun, 2014; Kumar *et al.*, 2014). En relación a la producción en FLS si bien varias especies como *T. harzianum* han sido producidas mediante esta metodología, la mayoría de los bioinsumos a base de especies de *Trichoderma* se multiplican en FSS, no sólo por lo ya mencionado, sino también porque esta producción puede llevarse a cabo artesanalmente (ver [Anexo 5](#)), es decir, se puede hacer una producción a pequeña escala en FSS poco costosa con poco equipamiento. Se han diseñado diversas configuraciones de biorreactores en FSS (Figura 5.3) para resolver los inconvenientes de la oxigenación, del aprovechamiento del sustrato y de la transferencia de calor. Entre los más estudiados encontramos: bandejas, cuartos incubados, columnas de lecho empacado, lecho múltiple, biorreactores de tipo tambor rotatorio múltiple, etc. (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). Entre los sustratos utilizados se destaca el uso de múltiples sustratos sólidos complejos como arroz, trigo, maíz, así como también residuos agroindustriales, como bagazo de caña, salvado de trigo, pulpa de café, cáscara de frutas, entre otros (Kumar *et al.*, 2014). En la Figura 5.3 cultivos desarrollados de *Trichoderma* en sustrato sólido y en la Figura 5.4 se muestra el esquema simplificado de la producción de *Trichoderma* en FSS.



Figura 5.3. Cultivo de *Trichoderma* en sustrato sólido. Adaptada de Sivila & Alvarez (2013).

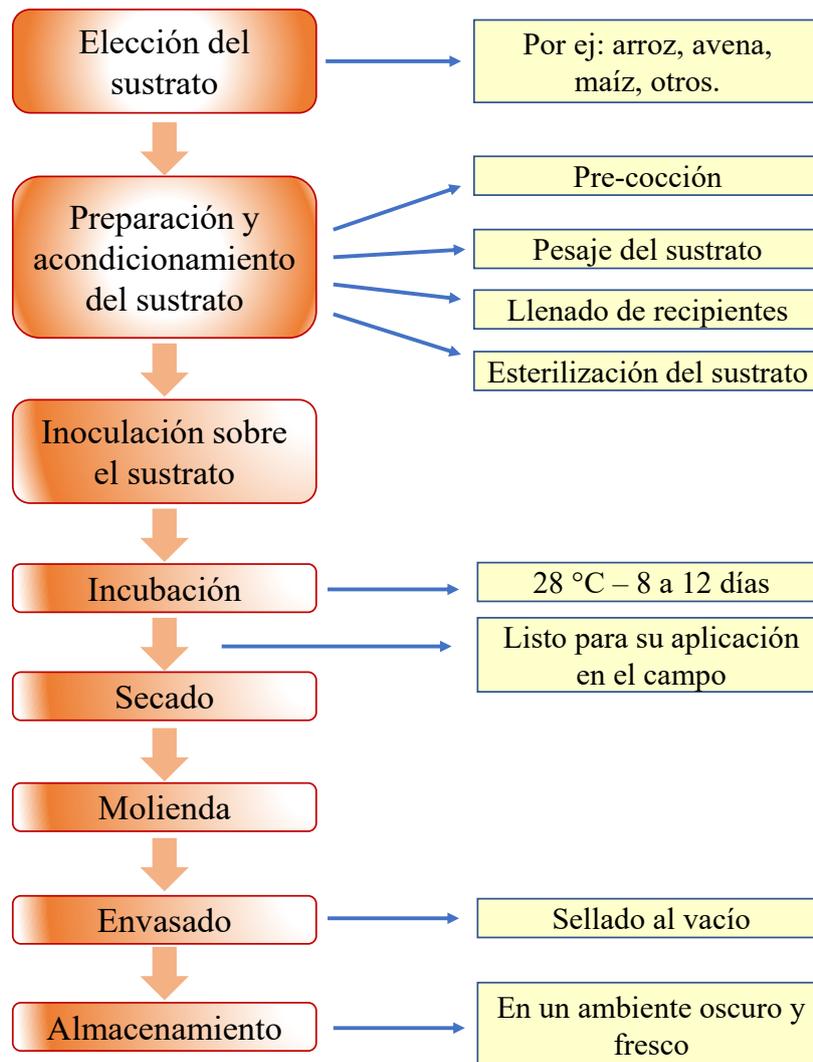


Figura 5.4. Etapas del proceso de producción de *Trichoderma*. Adaptada de Sivila & Alvarez (2013).

Es necesario destacar que para que un sustrato en FSS sea colonizado y consumido por un microorganismo tal como *Trichoderma* debe presentar una humedad entre 30 – 75 % (Rentería, 2011), ya que un bajo contenido de humedad puede causar reducción en la solubilidad de los nutrientes del sustrato y un alto nivel de humedad puede dificultar el procesamiento del producto final. Luego de la multiplicación de *Trichoderma* en FSS cuando el sustrato ya fue consumido, comienzan a aparecer los conidios, y al finalizar esta etapa, si bien el bioinsumo ya puede ser aplicado, en general, se realiza una etapa de secado y molienda. Esto permite que el formulado perdure en el tiempo, presentando una sencilla y fácil aplicación en semillas, hojas (aplicación foliar) o suelo (aplicación en surco) y que sea fácilmente almacenado. Kumar *et al.* (2014) proponen que una formulación de calidad a base de *Trichoderma* debe cumplir con los siguientes requisitos:

1. de bajo costo, fácil de manipular y ser estable en un rango de -5 a 35 ° C
2. tener elevada concentración inicial de conidios y mantenerla durante el tiempo de almacenamiento (viabilidad). El recuento de colonias viables debe ser $\geq 2.10^6$ UFC/g de formulado
3. debe presentar baja contaminación < 20 % (Viera *et al.*, 2018)
4. no debe ser fitotóxico para las plantas que se desea aplicar.

La estabilidad del formulado depende de factores externos como la temperatura, la humedad relativa y el tipo de empaque utilizado, lo que determina el tiempo durante el cual se mantienen las características iniciales del mismo (Viera *et al.*, 2018). El control de calidad del formulado es el que garantiza el funcionamiento del producto obtenido y su aceptación a largo plazo (Stewart & Hill, 2014). En la Tabla 5.2, se muestran las determinaciones que se deben realizar periódicamente a un formulado a base de *Trichoderma* para garantizar su eficacia.

Tabla 5.2. Determinaciones para el control de calidad de un formulado a base de *Trichoderma*.

Control de calidad	Método de determinación	Expresión del resultado
Concentración de conidios	Diluciones seriadas del producto y recuento de conidios en la cámara de Neubauer	Conidios/g de formulado
Viabilidad de conidios	Realización de cultivos en medios simples	UFC/g de formulado
	Realización de microcultivos en PDA y recuento de conidios germinados al microscopio	Porcentaje de viabilidad
Pureza del producto	Diluciones seriadas y siembra en PDA 2 %	Porcentaje de pureza

Como se mencionó anteriormente, el éxito de la acción como PGPM depende en gran parte de la capacidad de los microorganismos de proliferar bajo las condiciones adversas del ambiente, por esta razón el uso de cepas nativas suele ser ventajoso comparado con formulados comerciales (Sivila & Alvarez, 2013).

En Argentina, la comercialización de productos biológicos basados en *Trichoderma* es bastante reciente y, si bien se encuentra en expansión, su aplicación aún es incipiente. Tal como se mencionó en el Capítulo 1 (Tabla 1.3), en nuestro país se comercializan 10 productos a base de *Trichoderma*, de los cuales solo dos de ellos se encuentran registrados en el SENASA (Amerio *et al.*, 2020; N. Bader *et al.*, 2020).

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, y **el objetivo de obtener un bioinsumo microbiano formulado a partir de *Trichoderma* para su aplicación en plantas de yerba mate**, los aislamientos de *Trichoderma* seleccionados de acuerdo a sus propiedades como PGPM *in vitro* (Capítulo 4) fueron formulados en sustrato sólido y evaluados en relación a su efecto promotor *in vivo* en plantas de yerba mate. Por lo tanto, en este capítulo se muestran los ensayos realizados para obtener un formulado de calidad a base de *Trichoderma* utilizando arroz como sustrato sólido y su aplicación en plantas de yerba mate en etapa temprana de vivero.

5.3 MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1 Material biológico

Los ensayos presentados en este capítulo se realizaron en el vivero de la Fundación Roth, Santo Pipó, Misiones, en el cual se utilizaron plantas de yerba mate de un año de crecimiento, las cuales se encontraban en tubetes de 160 ml con aproximadamente 110 g de sustrato compuesto por tierra de monte: cáscara de pino: compost (1:1:1).

Los aislamientos de *Trichoderma* utilizados en los ensayos presentados en este capítulo fueron: *T. asperelloides*: LBM 193₁, LBM 204₉ y LBM 206₁₀ y *Trichoderma sp.* LBM 202₈, seleccionados de acuerdo con los resultados presentados en el Capítulo 4. Los aislamientos fúngicos se mantuvieron y activaron en PDA, según lo descrito en el Capítulo 4.

5.3.2 Obtención de una suspensión de conidios

5.3.2.1 A partir *Trichoderma* crecido en PDA

En la Figura 5.5, se muestra el protocolo utilizado para la obtención y recuento de una suspensión de conidios a partir de una placa de PDA. El recuento de conidios totales se realizó como se describió en el Capítulo 4, utilizando una cámara de Neubauer.

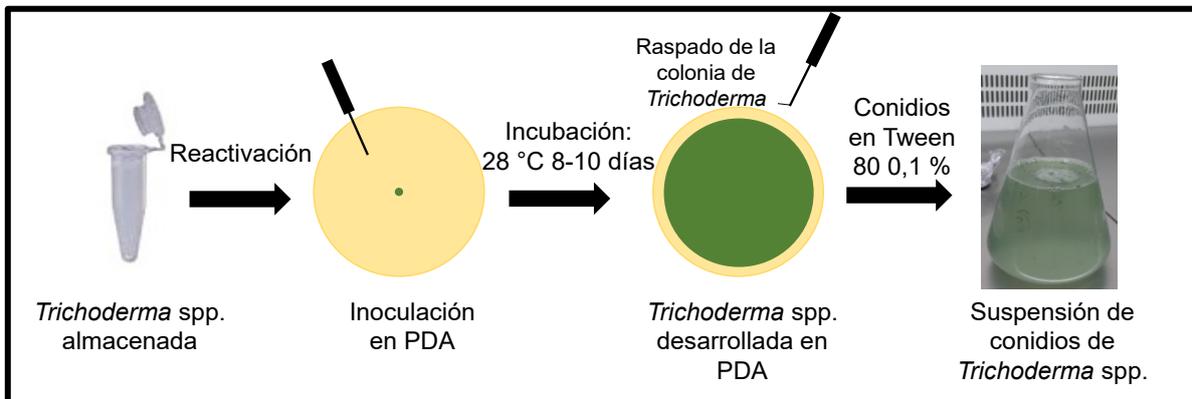


Figura 5.5. Protocolo utilizado para la obtención de una suspensión de conidios a partir de un cultivo de *Trichoderma* desarrollada en PDA.

5.3.2.2 A partir de *Trichoderma* crecido en arroz

Se realizaron 2 protocolos para evaluar la producción de *Trichoderma* en cultivo sólido utilizando arroz como sustrato, ya que es un sustrato rico en carbono, con almidón, proteínas y microelementos como Zinc, los cuales requiere *Trichoderma* spp. para su crecimiento (Chávez-garcía *et al.*, 2009). Además, es uno de los sustratos más utilizados para la producción de *Trichoderma* ya que se obtiene una elevada concentración de conidios, y su producción y manipulación es relativamente sencilla (Aceves *et al.*, 2008; López Alcántara, 2018; Viera *et al.*, 2018). Los dos protocolos son adaptaciones de los descritos por Sivila & Alvarez (2013) y Bader *et al.* (2020), tal como se muestra en la Figura 5.6 y Figura 5.7.

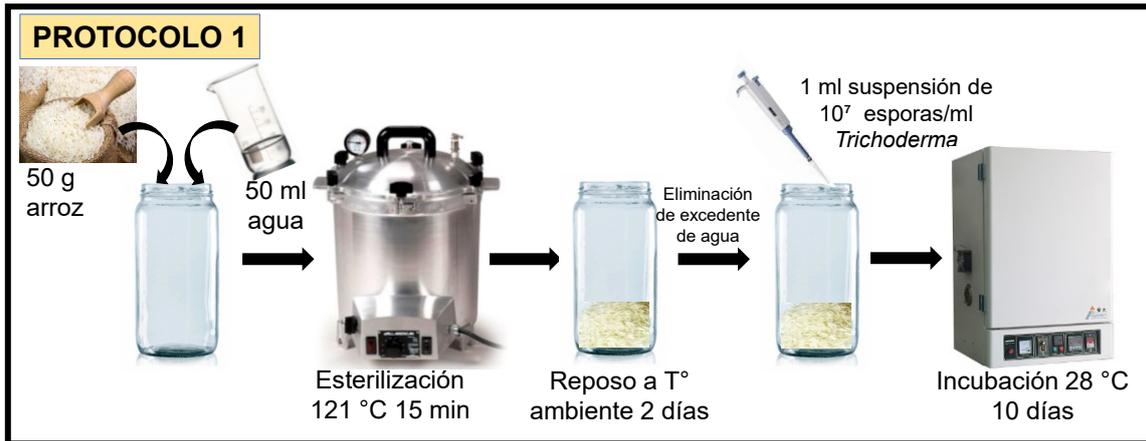


Figura 5.6. Protocolo 1 realizado para la producción de *Trichoderma* en arroz.



Figura 5.7. Protocolo 2 realizado para la producción de *Trichoderma* en arroz.

En ambos protocolos, los recipientes (frasco y bandeja plástica) fueron tapados con varias capas de gasa estéril para mantener la esterilidad del cultivo. Para ambos protocolos, luego de la incubación, cuando el sustrato estaba colonizado y esporulado, se secó a 40 °C hasta que se observó que el producto estaba totalmente seco y fue procesado utilizando un molinillo eléctrico *–High – Speed Universal Desintegrator*, Modelo FW100, Instrumentación Científica S.A– el cual estaba previamente desinfectado con alcohol 70 %. El formulado obtenido se almacenó en bolsas de polietileno, a temperatura ambiente y en la oscuridad.

Una vez seleccionado el protocolo para la producción de *Trichoderma* en arroz, se repitió la metodología 2 veces más para cada aislamiento por duplicado y para la obtención de la suspensión se mezcló el producto sólido con Tween 80 0,5 % p/v.

5.3.2.3 Evaluación de la calidad de la suspensión de conidios y del formulado

Se evaluó la calidad de la suspensión de conidios a tiempo cero y, del formulado a tiempo cero, 1, 2 y 6 meses luego de su preparación. Para ello, se determinó:

➔ **concentración de conidios totales:**

- para la suspensión de conidios se calculó como se mencionó en la Sección 5.3.2.1 A partir del crecimiento de *Trichoderma* en PDA de este capítulo.

- **para el formulado** se preparó una suspensión de conidios tomando 10 gramos de formulado y 90 ml de Tween 80 al 0,5 % v/v. Se homogeneizó en *shaker* durante 30 minutos, luego se realizaron diluciones seriadas y se contaron los conidios en la cámara de Neubauer, tal como se mostró en la *Sección 5.3.2.1 A partir del crecimiento de Trichoderma en PDA* de este capítulo. La concentración obtenida se expresó en conidios/ml y de acuerdo a la cantidad de formulado, se calculó la concentración como conidios/g de formulado. Se realizó por triplicado.
- ➔ **viabilidad:** la metodología utilizada para los dos tipos de suspensiones se muestra en la Figura 5.8. Se realizó por triplicado.
 - **para la suspensión de conidios** la cantidad de conidios viables se expresó como UFC/ml de suspensión.
 - **para el formulado** se utilizó la misma suspensión que para el cálculo de la concentración de conidios totales. Multiplicando el número de colonias por el factor de dilución, se calculó como UFC/g de formulado.
- ➔ **pureza:** se contabilizó el número de colonias de *Trichoderma* y colonias totales de microorganismos (Figura 5.8), se calcularon las UFC/ml o UFC/g según el factor de dilución y se calculó el porcentaje de pureza con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ pureza} = \frac{\text{UFC } Trichoderma}{\text{Total UFC (UFC } Trichoderma + \text{ UFC contaminantes)}} \times 100$$

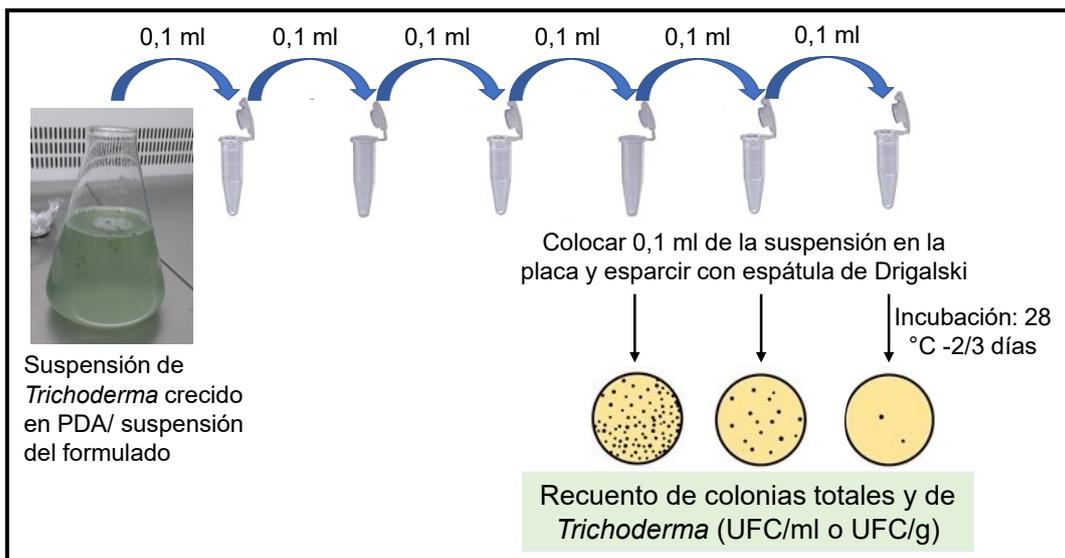


Figura 5.8. Protocolo del recuento de conidios viables y pureza para las suspensiones de conidios a partir de *Trichoderma* crecido en PDA y del formulado.

5.3.3 Ensayo de promoción del crecimiento en plantas de yerba mate en vivero

5.3.3.1 Ensayo preliminar inoculando con una suspensión de conidios obtenida a partir de *Trichoderma* spp. crecida en PDA

El ensayo se llevó a cabo en el vivero de la Fundación Alberto Roth (Figura 5.9), en el período marzo – julio de 2018 (5 meses), y se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado.



Figura 5.9. Vivero con plantines de yerba mate de la Fundación Alberto Roth.

En los ensayos *in vivo* realizados en este trabajo de tesis, se utilizará una concentración de conidios de 10^7 UFC/ml (López Alcántara, 2018). En la Figura 5.10, se muestran los tratamientos y el protocolo de inoculación.

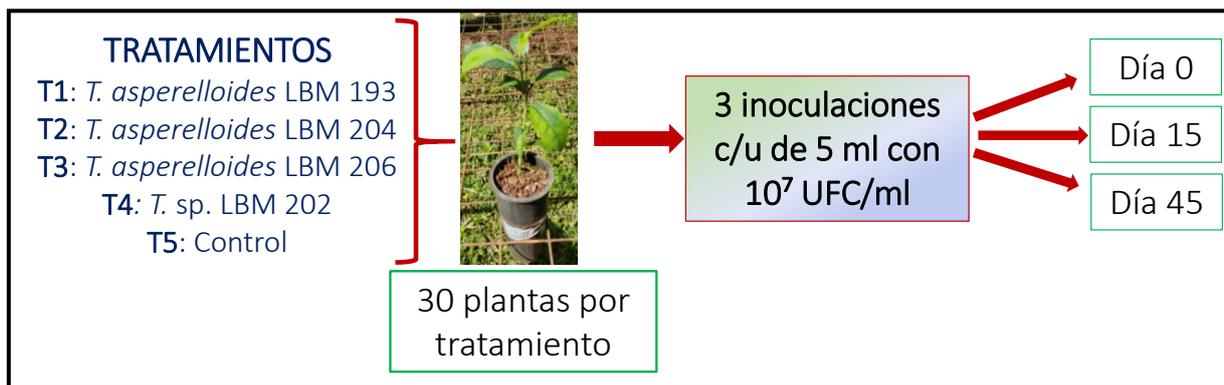


Figura 5.10. Tratamientos y protocolo de inoculación en el ensayo de promoción de crecimiento *in vivo*.

Las suspensiones de conidios se prepararon como se mencionó en la [Sección 5.3.2.1](#). Para evaluar la capacidad de promoción del crecimiento de los aislamientos de *Trichoderma* en plantas de yerba mate, se midieron los parámetros presentados en la Tabla 5.3 a diferentes tiempos. Cuando finalizó el ensayo, las plantas en tubetes fueron transportadas al laboratorio en bandejas plásticas y se procesaron dentro de las 48 h.

Tabla 5.3. Parámetros medidos durante el ensayo de promoción del crecimiento *in vivo*.

Parámetros	Inicio del ensayo	0,5 meses	1,5 meses	6 meses
Altura	X	X	X	X
Clorofila	X	ND	ND	X
Peso seco	ND	ND	ND	X
Lesiones foliares	ND	ND	ND	X

X: determinado, ND: No Determinado.

5.3.3.2 Ensayo inoculando con una suspensión de conidios obtenida a partir del formulado

El ensayo se llevó a cabo en el vivero de la Fundación Alberto Roth, en el período septiembre de 2018-marzo de 2019 (6 meses) y se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar (Figura 5.12, Figura 5.13). En este ensayo se utilizaron los aislamientos que mostraron resultados promisorios en el ensayo preliminar *in vivo*.



Figura 5.12. Bloque 2 del ensayo llevado a cabo en el vivero de la Fundación Roth.

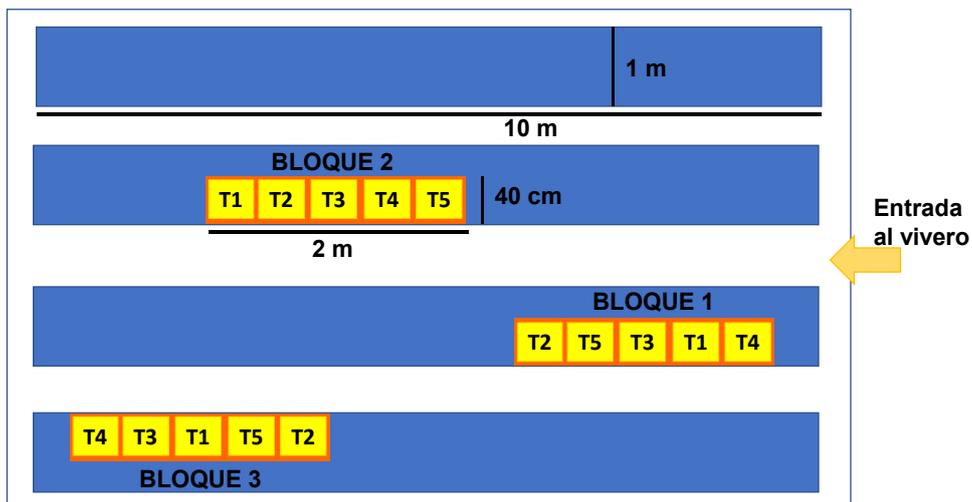


Figura 5.13. Diseño de experimento: bloques completos al azar. T1: LBM 193-Formulado, T2: LBM 193-Suspensión, T3: LBM 202-Formulado, T4: LBM 202-Suspensión, T5: control.

En la Figura 5.14, se muestran los tratamientos y el protocolo utilizado para la inoculación.

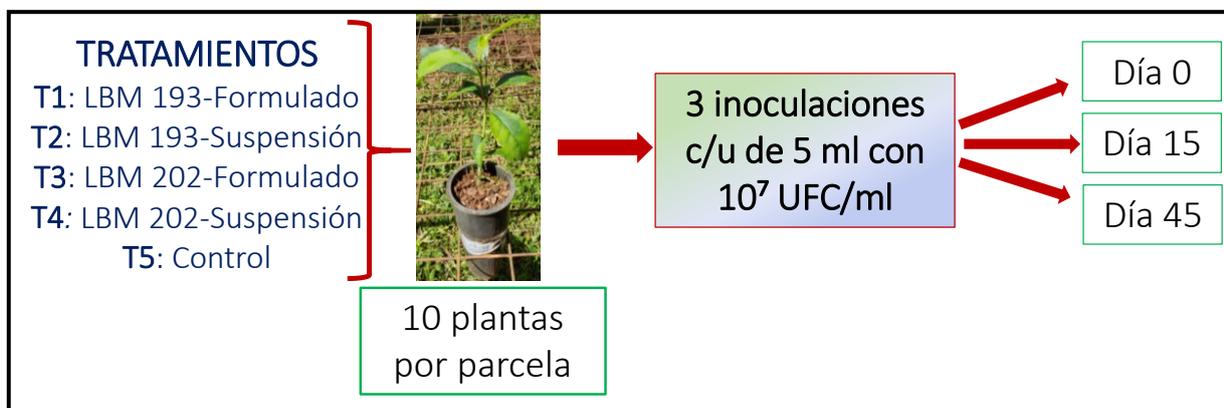


Figura 5.14. Tratamientos y protocolo de inoculación en el ensayo de promoción de crecimiento *in vivo*.

En la Tabla 5.4, se muestran los diferentes parámetros evaluados a diferentes tiempos del ensayo. Cuando finalizó el ensayo, las plantas en tubetes fueron transportadas al laboratorio en bandejas plásticas y se procesaron dentro de las 48 h.

Tabla 5.4. Parámetros de crecimiento y sanidad medidos durante el ensayo de promoción del crecimiento *in vivo*.

Parámetros	Inicio del ensayo	1,5 meses	3 meses	4,5 meses	6 meses
Altura	X	X	X	X	X
Clorofila	X	ND	ND	ND	X
N° de hojas	X	X	X	X	X
Diámetro	X	ND	X	X	X
Peso seco	ND	ND	ND	ND	X
Lesiones foliares	X	X	X	X	X

X: medida del parámetro. ND: No Determinado.

5.3.3.3 Medidas de parámetros de crecimiento y sanidad

En la Figura 5.15, se muestra una fotografía donde se está realizando las medidas de los parámetros que se utilizaron para evaluar la promoción del crecimiento vegetal en plantas de yerba mate tratadas con los aislamientos de *Trichoderma*.



Figura 5.15. Fotografía donde se está realizando las medidas de las plantas tratadas con los aislamientos de *Trichoderma*.

Medición de altura. La altura de las plantas se midió en cm desde la base del tallo en el sustrato hasta la terminación de la rama principal de la planta (Figura 5.16.A).

Medición de clorofila. La clorofila se midió en unidades SPAD en la primera hoja de la parte superior de 3 plantas de cada tratamiento elegidas al azar. La hoja fue marcada para realizar la medición al

finalizar el ensayo. En la Figura 5.16.B, se muestra una imagen que muestra un medidor de clorofila similar al utilizado.

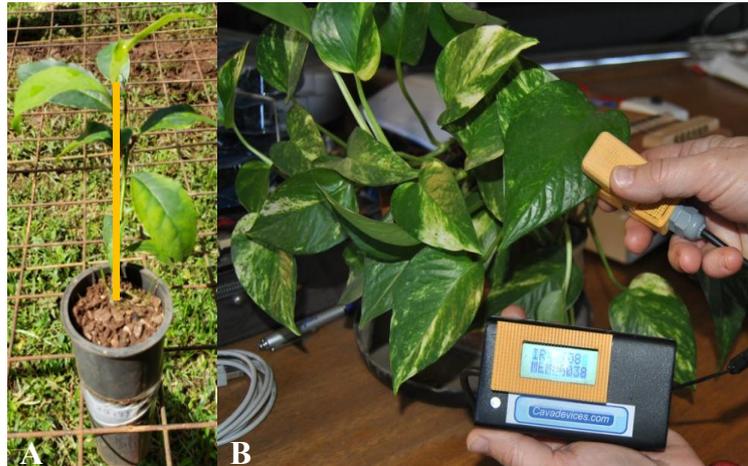


Figura 5.16.A. Medida de la altura de la planta de yerba mate. B. Medidor de clorofila [Clorofilo K17](#). Adaptada de Cavasassi (2017).

Número de hojas. Se contaron las hojas de cada planta, incluyendo los brotes nuevos.

Diámetro del tallo. Se midió el diámetro de la base del tallo en cm.

Determinación del peso seco. Las plantas recolectadas se sacaron de los tubetes, se les extrajo la mayor cantidad de tierra que presentaban las raíces manualmente tratando de no dañarlas. Las raíces se sumergieron en vasos de 200 ml con agua corriente para eliminar la tierra que quedó adherida y, luego, se secaron con papel de filtro. Las plantas se cortaron separando la raíz de la parte aérea, se colocaron en sobres de papel previamente tarados y se llevaron a 70 °C hasta peso constante (4 días) (Poletto, 2010). Luego, se determinó el peso de la raíz y de la parte aérea de la planta en balanza analítica.

Lesiones foliares. se realizó un **registro de los signos y/o síntomas visibles** de enfermedad. Se calculó la incidencia como el porcentaje de individuos enfermos a lo largo del ensayo en relación al total de plantas utilizadas por tratamiento (Balatti *et al.*, 2019), tal como se muestra a continuación:

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de plantas enfermas}}{\text{Total de plantas enfermas}} \times 100$$

5.3.3.4 Índice de promoción del crecimiento *in vivo*

Se calculó el índice de promoción del crecimiento *in vivo* (PGPIV) según Agarás *et al.* (2015) con modificaciones, utilizando los datos de altura, clorofila y peso seco, con la siguiente fórmula:

$$\text{PGPIV}_i = \frac{\sum \frac{a_{i,j}}{a_{i,j,\text{max}}}}{n}$$

Donde:

- i es el número correspondiente a cada aislamiento de *Trichoderma* (de 1 a 14).
- j es el número correspondiente a cada parámetro de crecimiento medido según el ensayo.
- a_{ij} es el valor del parámetro de crecimiento j del aislamiento i .
- $a_{ij \max}$ es el mayor valor del parámetro de crecimiento j seleccionado entre todos los aislamientos i .
- n es el número total de parámetros de crecimiento según el ensayo.

5.3.3.5 Análisis estadístico

5.3.3.5.a ANOVA

Se realizó el análisis estadístico ANOVA de los resultados del ensayo preliminar *in vivo*: altura final, clorofila final y peso seco. Para la realización del ANOVA, se evaluó el cumplimiento de los supuestos: normalidad y homogeneidad de varianzas (Balzarini *et al.*, 2008). Para el caso de los datos de clorofila y altura se utilizaron como covariable los valores iniciales, esto permite reducir el error y mejorar el análisis estadístico del modelo. Además, aquellos datos que presentaron diferencias estadísticamente significativas se compararon mediante el test LSD Fisher con un nivel de significancia de 0,05.

5.3.3.5.b Modelos Lineales Generales y Mixtos.

Se utilizó la herramienta de Modelos Lineales Generales y Mixtos (MLGM) del programa InfoStat para:

- los datos secuenciales de altura del ensayo preliminar *in vivo*, utilizando como covariable la altura inicial.
- los datos secuenciales de altura del segundo ensayo *in vivo*, utilizando como covariable la altura inicial y el factor bloque como efecto aleatorio del modelo.
- los datos finales de clorofila y diámetro del tallo del segundo ensayo *in vivo*, utilizando como covariable los valores iniciales y el factor bloque como efecto aleatorio del modelo.
- los datos de peso seco de raíz, parte aérea y total de la planta y, las relaciones calculadas con estos valores, utilizando el factor bloque como efecto aleatorio del modelo.

Para aquellos datos que presentaron diferencias estadísticamente significativas, se realizaron comparaciones mediante el test de LSD Fisher con un nivel de significancia de 0,05.

5.3.3.5.c Análisis Multivariado

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) y un análisis de conglomerado como se describió en materiales y métodos del Capítulo 4 para los datos de los 2 ensayos *in vivo* realizados, utilizando los parámetros: altura final, clorofila, peso seco y el PGPIV.

5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1 Características de la suspensión de conidios de *Trichoderma* crecido en PDA

Las suspensiones de todos los aislamientos de *Trichoderma* presentaron una pureza de 99 % – 100 % y una concentración de $4 - 8 \cdot 10^7$ conidios/ml de suspensión, obtenida a partir del raspado de 8-10 placas de PDA cubiertas de conidios que se suspendieron en 200 ml de Tween 80 al 0,1 %. La viabilidad de los conidios de una suspensión preparada a partir de un cultivo en PDA luego de 8-10 días incubación fue prácticamente el 100 %.

5.4.2 Características de la suspensión de conidios de *Trichoderma* crecido en arroz

En la Figura 5.17, se muestran imágenes representativas de los cultivos sólidos de *Trichoderma* crecidos en arroz.

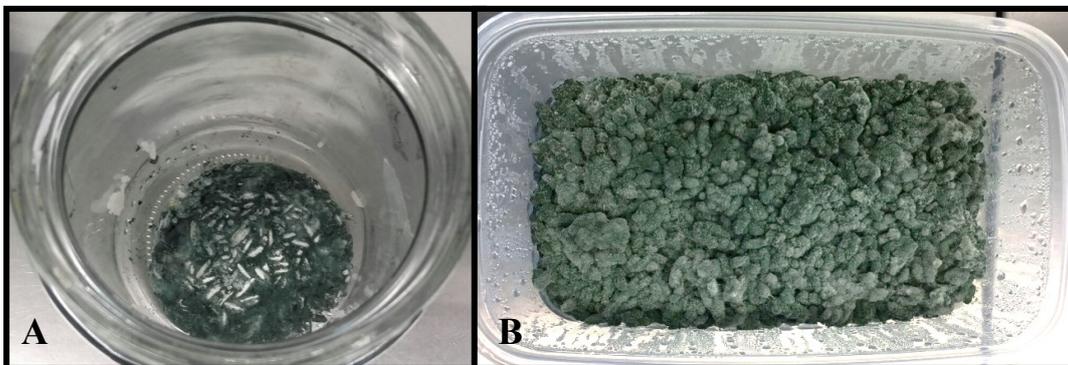


Figura 5.17. A. Arroz colonizado por LBM 204₉ obtenido según el protocolo 1. B. Arroz colonizado por LBM 193₁ obtenido según el protocolo 2.

El análisis de los formulados obtenidos por los 2 protocolos mostró que:

- en el desarrollo del formulado con el protocolo 1, el arroz no presentó la humedad adecuada para un crecimiento óptimo y por esta razón no fue completamente colonizado (Figura 5.17.A). Además, el cultivo sólido no logró secarse completamente luego de 10 días a 40 °C, haciendo difícil la manipulación del producto y, como resultado se obtuvo un producto de consistencia “pastosa” color verde, lo cual contribuye a que esté más expuesto a las contaminaciones por microorganismos presentes en el ambiente. Por lo expuesto, este protocolo no fue utilizado para la producción del formulado a base de los aislamientos de *Trichoderma*.

- en el desarrollo del formulado con el protocolo 2, los aislamientos de *Trichoderma* lograron crecer y colonizar todo el sustrato sólido (Figura 5.17.B). De manera coincidente con estos resultados, el estudio de la producción de diferentes formulados utilizando arroz como sustrato sólido evidenció la necesidad de un cierto grado de humedad en el sustrato para facilitar la colonización por *Trichoderma* (López Alcántara, 2018; Viera *et al.*, 2018). A diferencia del protocolo anterior, el secado del cultivo sólido fue de 4 días a 40 °C, obteniéndose un producto prácticamente seco. El procesamiento fue sencillo y como producto se obtuvo un “polvo” de consistencia muy fina de color verde oscuro de fácil manipulación (Figura 5.18). **Por lo expuesto, el protocolo 2 es el que se utilizó para la producción de los formulados a base de los aislamientos de *Trichoderma*.**



Figura 5.18. Formulados obtenidos empleando el protocolo 2 con LBM 193₁.

En la Tabla 5.5, se muestran las características de los formulados para un aislamiento de *T. asperelloides* LBM 193₁ y *Trichoderma sp.* LBM 202₈. Si bien se formularon los 4 aislamientos de *Trichoderma*, se muestran sólo los resultados de estos 2 aislamientos ya que fueron los seleccionados en el ensayo preliminar *in vivo*.

Tabla 5.5. Características de los formulados de *Trichoderma spp.* a diferentes tiempos.

Tiempo	Concentración conidios (conidios/g)		Viabilidad (UFC/g)	
	LBM 193 ₁	LBM 202 ₈	LBM 193 ₁	LBM 202 ₈
Inicio del ensayo	4,45.10 ¹⁰ ± 1,6.10 ¹⁰	6,3.10 ¹⁰ ± 9,1.10 ⁹	2,15.10 ⁹ ± 9,2.10 ⁸	2,45.10 ⁹ ± 7,8.10 ⁸
Mes 1	4,3.10 ¹⁰ ± 1,7.10 ¹⁰	6,1.10 ¹⁰ ± 8,8.10 ⁹	1,5.10 ⁹ ± 7,1.10 ⁸	1,85.10 ⁹ ± 2,1.10 ⁸
Mes 2	2,82.10 ¹⁰ ± 5,8.10 ⁸	3,95.10 ¹⁰ ± 7,8.10 ⁹	6,4.10 ⁸ ± 5,1.10 ⁸	5,65.10 ⁸ ± 3,3.10 ⁷
Mes 6	2,05.10 ¹⁰ ± 4,5.10 ⁹	3,8.10 ¹⁰ ± 9,9.10 ⁹	8,7.10 ⁷ ± 5,8.10 ⁵	7,7.10 ⁶ ± 1,5.10 ⁵

En el recuento realizado para determinar la pureza de los formulados se observó que el **grado de contaminación** que presentaron fue muy bajo o nulo (pureza cercana al 99 – 100 %), para todos los tiempos evaluados y para los dos aislamientos utilizados. Estos resultados muestran el grado de esterilidad con el que se pudo trabajar en la producción de este formulado.

Los resultados del control de calidad de los formulados mostraron que:

- **al inicio del ensayo**, se obtuvo una elevada concentración de conidios, del orden de 10¹⁰ conidios/g formulado, para los dos aislamientos de *Trichoderma*, siendo estos valores similares a los reportados en bibliografía para *Trichoderma* cultivado en arroz como sustrato sólido (Chávez-garcía *et al.*, 2009; Panahian *et al.*, 2015). Esto muestra que los aislamientos de *Trichoderma* obtenidos en este trabajo de tesis fueron capaces de crecer y esporular en arroz como sustrato, tal como lo hacen otras especies de *Trichoderma* (Chávez-García *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2014). No obstante, al inicio del ensayo todos los conidios no se encontraron viables ya que la viabilidad fue un orden menor que el recuento total de conidios, resultados semejantes a los obtenidos por Viera *et al.* (2018). Esto se le puede atribuir al tratamiento de secado y molienda del producto.

- **durante el almacenamiento**, si bien la concentración de conidios se mantuvo dentro del mismo orden ($\approx 10^{10}$ conidios/g) no ocurrió lo mismo con la viabilidad. Los conidios se mantuvieron viables durante el primer mes de almacenamiento, resultados coincidentes con los reportados por Bader *et al.* (2020), para *T. harzianum*. Luego, la viabilidad comenzó a disminuir con una velocidad semejante en los dos formulados, debido probablemente a la falta de nutrientes, a la desecación y a la acumulación de metabolitos tóxicos (Bader *et al.*, 2020). No obstante, la concentración de conidios viables al final del ensayo (6 meses) para LBM 193 y para LBM 202 fue cercana a 10^7 UFC/g y 10^6 UFC/g de formulado, respectivamente, indicando que son formulados de calidad y presentan una vida útil de al menos 6 meses.

Con los resultados obtenidos en estos ensayos, se logró la selección de un protocolo sencillo para la formulación de un producto sólido a base de *Trichoderma*, de fácil manipulación y que presentó parámetros de calidad aceptables para los dos aislamientos de *Trichoderma* que serán utilizados en los ensayos de promoción de crecimiento *in vivo*.

5.4.3 Evaluación de promoción del crecimiento *in vivo* de los aislamientos de *Trichoderma*

Se realizaron 2 ensayos:

- un ensayo preliminar con los 4 aislamientos de *Trichoderma* seleccionados como PGPM en el Capítulo 4, inoculando plantas de yerba mate con una suspensión de conidios obtenida a partir de la colonia crecida en PDA. En este ensayo se seleccionaron 2 de los 4 aislamientos que resultaron promisorios en la capacidad de promoción de crecimiento *in vivo*.
- un segundo ensayo *in vivo* con 2 aislamientos de *Trichoderma* seleccionados en el ensayo preliminar *in vivo*, inoculando con una suspensión de conidios obtenida a partir del formulado.

5.4.3.1 Ensayo preliminar inoculando con una suspensión de conidios de *Trichoderma* crecidos en PDA

A continuación, se muestran los resultados de los parámetros de crecimiento de las plantas de yerba mate determinados en el ensayo preliminar. En la Figura 5.19 se muestran dos gráficos con los valores de la altura de plantas de yerba mate a los diferentes tiempos del ensayo y el promedio de la altura final de las plantas inoculadas con los diferentes aislamientos.

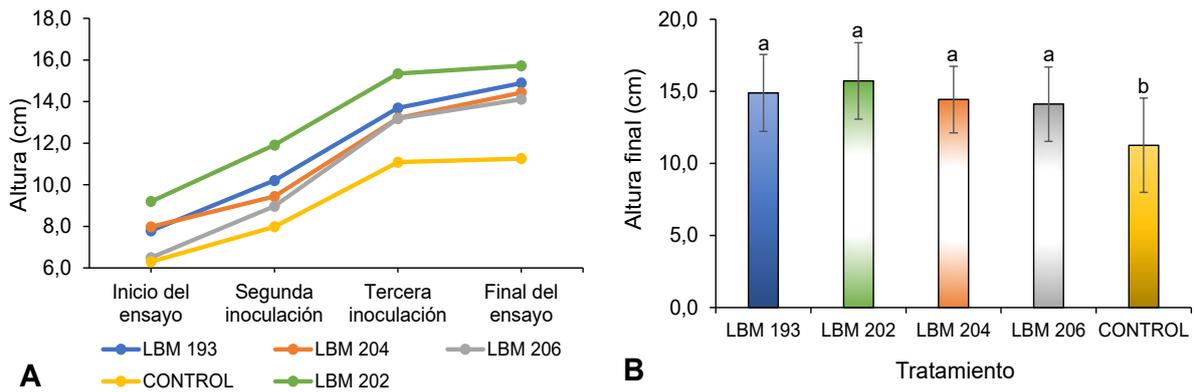


Figura 5.19. A. Altura promedio de las plantas para cada tratamiento a diferentes tiempos del ensayo. B. Altura final promedio de las plantas de yerba mate para los tratamientos. Letras iguales encima de la barra indica que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Los resultados de la altura de las plantas de yerba mate evidenciaron que:

- en el gráfico se observa que el incremento de la altura presenta una misma tendencia a lo largo del tiempo para todos los tratamientos evaluados. El análisis estadístico de MLGM, mostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos, en los 3 primeros tiempos evaluados.
- se observaron mayores valores de altura final en las plantas inoculadas con los aislamientos de *Trichoderma*, los cuales presentaron diferencias estadísticamente significativas con la altura de los controles. Similares resultados obtuvieron Cubillos-Hinojosa *et al.* (2009), quienes demostraron la capacidad como PGPM de *T. harzianum* en maracuyá, y observaron que las plantas inoculadas presentaron mayor altura final que los controles.

En la Figura 5.20, se muestran los promedios de las medidas de clorofila de las hojas de las plantas de yerba mate inoculadas con los diferentes aislamientos.

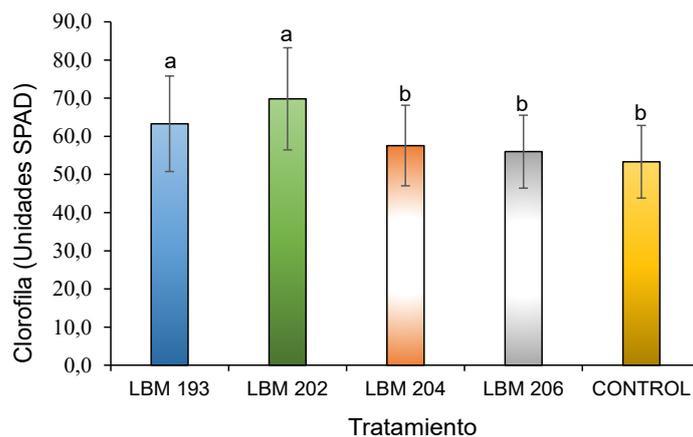


Figura 5.20. Valores promedio de clorofila de hojas de las plantas de yerba mate para los diferentes tratamientos. Letras iguales arriba de las barras indican que no existen diferencias significativas entre tratamiento ($p > 0,05$).

Los resultados de clorofila de las hojas de las plantas de yerba mate evidenciaron que:

- las plantas inoculadas con *T. asperelloides* LBM 193₁ y *Trichoderma sp.* LBM 202₈ presentaron mayor contenido de clorofila con diferencias estadísticamente significativas en comparación a las plantas inoculadas con los demás aislamientos de *Trichoderma* y los controles. Estos resultados coinciden con los estudiados por Moya *et al.* (2020), quienes observaron que plantas de trigo inoculadas con *Trichoderma* presentaron un mayor contenido de clorofila, es decir, una mayor capacidad fotosintética en comparación con los controles.

En la Figura 5.21, se muestran imágenes de plantas de yerba mate con los diferentes tratamientos cosechadas al final del ensayo preliminar (5 meses), que se utilizaron para realizar el peso seco.



Figura 5.21. Imágenes de plantas de yerba mate con los diferentes tratamientos cosechadas al final del ensayo preliminar.

En la Figura 5.22, se muestra el promedio del peso seco de raíz, parte aérea y de planta entera para los diferentes tratamientos.

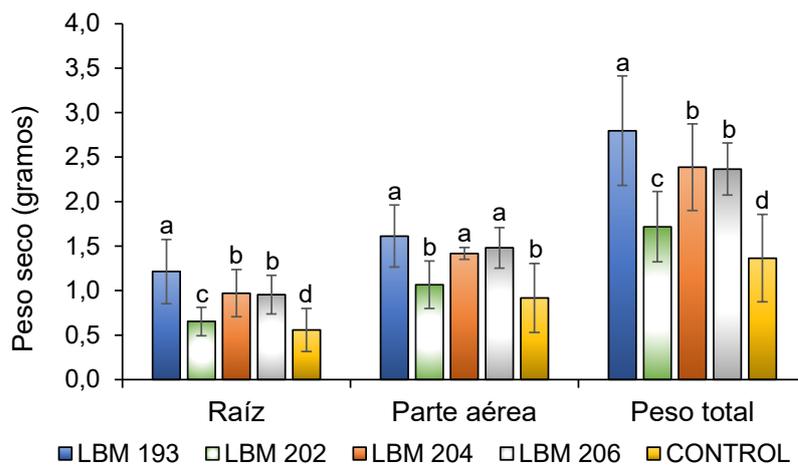


Figura 5.22. Peso seco promedio de raíz, parte aérea y plantas de yerba mate. Letras iguales arriba de las barras indican que no existen diferencias significativas entre tratamiento ($p > 0,05$).

Los resultados de peso seco evidenciaron que:

- las plantas inoculadas con todos los aislamientos de *Trichoderma* mostraron mayor peso seco de raíz y de planta entera con diferencias estadísticamente significativas en comparación al peso seco de las plantas control.
- las plantas tratadas con *T. asperelloides* LBM 193₁, LBM 204₉ y LBM 206₁₀ presentaron mayor peso seco de la parte aérea con diferencias estadísticamente significativas en comparación al peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas con LBM 202₈ y las plantas utilizadas como control.
- las plantas tratadas con *T. asperelloides* LBM 193₁ presentaron el mayor peso seco de raíz, parte aérea y planta entera, con diferencias estadísticamente significativas con los demás tratamientos, e incluso duplicó los valores del control.

Al finalizar el ensayo, se evaluó el aspecto general de las plantas con los diferentes tratamientos. En la Tabla 5.7, se muestran los valores de incidencia obtenidos para las plantas según el tratamiento.

Tabla 5.7. Valores de incidencia de las plantas según el tratamiento.

Tratamiento	Incidencia
<i>T. asperelloides</i> LBM 193	30,77% ± 0,5
<i>Trichoderma sp.</i> LBM 202	3,7% ± 0,17
<i>T. asperelloides</i> LBM 204	24,00% ± 0,22
<i>T. asperelloides</i> LBM 206	20,83% ± 0,29
CONTROL	40,00% ± 0,5

Los resultados de incidencia de las plantas de yerba mate evidenciaron que:

- las plantas inoculadas con los aislamientos de *Trichoderma* mostraron menor porcentaje de incidencia en comparación a las plantas controles, coincidente con estos resultados, presentaron más vigor y se vieron menos afectadas por ataque de insectos/microorganismos que aquellas utilizadas como controles.
- las plantas tratadas con *Trichoderma sp.* LBM 202₈ presentaron el menor porcentaje de incidencia y fueron las que presentaron un mejor aspecto fitosanitario en comparación a las demás plantas. Estos resultados concuerdan con aquellos reportados por Sawant *et al.* (2020) en plantas de vid inoculadas con *Trichoderma*.

En la Figura 5.23.A y B, se muestra el biplot obtenido del PCA del ensayo preliminar y el dendrograma obtenido del análisis de conglomerado, respectivamente, utilizando los datos de altura, clorofila y peso seco de plantas de yerba mate.

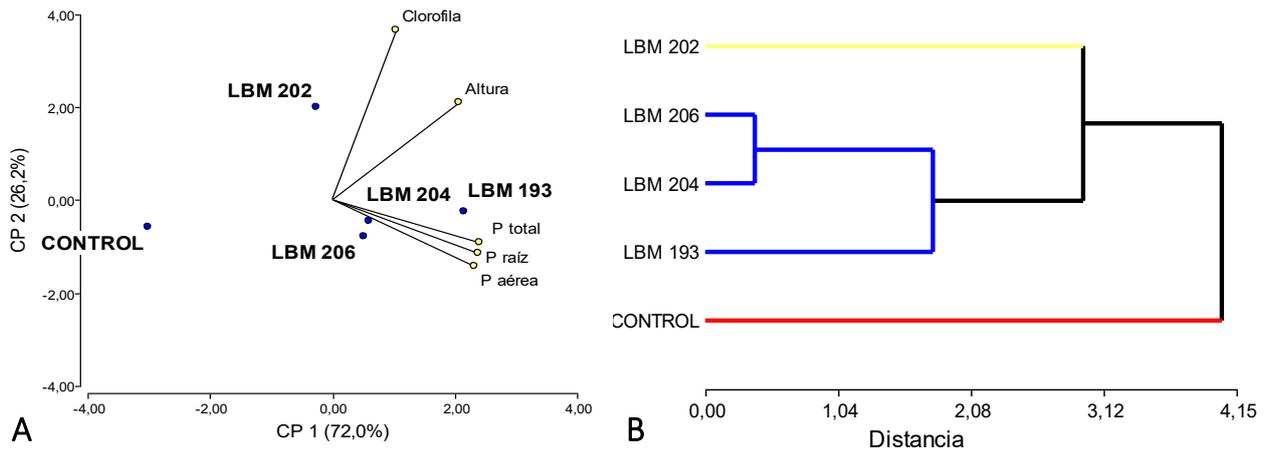


Figura 5.23.A. Posicionamiento de los tratamientos utilizados en el ensayo *in vivo* según los parámetros relacionados con el desarrollo de las plantas de yerba mate. **B.** Dendrograma de los aislamientos de *Trichoderma*.

Los resultados del análisis de PCA y del dendrograma evidenciaron que:

- todos los parámetros mostraron una relación positiva entre ellas.
- el posicionamiento de los *T. asperelloides* estuvo mayormente determinado por los valores de peso seco de las plantas de yerba mate.
- el posicionamiento de *Trichoderma sp.* LBM 202₈ estuvo mayormente determinado por los valores de clorofila de las hojas de yerba mate.
- los aislamientos de *Trichoderma* formaron un gran grupo alejado del control, y dentro de este grupo, los tratamientos de *T. asperelloides* fueron agrupados juntos, teniendo en cuenta características de promoción del crecimiento comunes entre ellas.

Con todos los datos anteriormente mostrados, se calculó el PGPIV (Tabla 5.8).

Tabla 5.8. Valores de PGPIV de los aislamientos.

Tratamiento	PGPIV
<i>T. asperelloides</i> LBM 193	0,968
<i>Trichoderma sp.</i> LBM 202	0,777
<i>T. asperelloides</i> LBM 204	0,841
<i>T. asperelloides</i> LBM 206	0,870
Control	0,586

Los resultados del PGPIV mostraron que:

- todos los tratamientos presentaron un elevado PGPIV, en comparación al control.
- el tratamiento LBM 193₁ fue el que mostró el mayor valor de PGPIV, ya que las plantas tratadas con este aislamiento mostraron elevados valores de las determinaciones que caracterizan la promoción del crecimiento vegetal.

El análisis de los resultados del ensayo preliminar *in vivo* nos permitió concluir que:

- ➡ *T. asperelloides* LBM 193₁ fue el aislamiento que presentó la mayor capacidad de promover el crecimiento *in vivo* en plantas de yerba mate en condiciones de vivero.
- ➡ *Trichoderma* sp. LBM 202₈ fue el aislamiento que mostró una mayor disminución del grado de incidencia en plantas de yerba mate en condiciones de vivero.

Debido a las características promisorias como PGPM *in vivo*, LBM 193₁ y LBM 202₈ fueron seleccionados para su formulación en sustrato sólido y su utilización en el siguiente ensayo *in vivo*.

5.4.2.2 Ensayo inoculando con una suspensión de conidios preparada a partir del formulado

A continuación, se muestran los resultados de los parámetros de crecimiento de las plantas de yerba mate determinados en este ensayo con los siguientes tratamientos: LBM 193-Formulado, LBM 193-Suspensión, LBM 202-Formulado, LBM 202-Suspensión y el control. Se usaron los aislamientos seleccionados del ensayo anterior aplicándolos como suspensión de conidios preparada a partir del crecimiento en PDA y a partir del formulado.

En la Figura 5.24, el gráfico muestra el aumento de la altura de las plantas en función del tiempo y en la Tabla 5.9, se muestra el promedio de los valores finales de altura, clorofila, número de hojas y diámetro de las plantas inoculadas con los diferentes tratamientos.

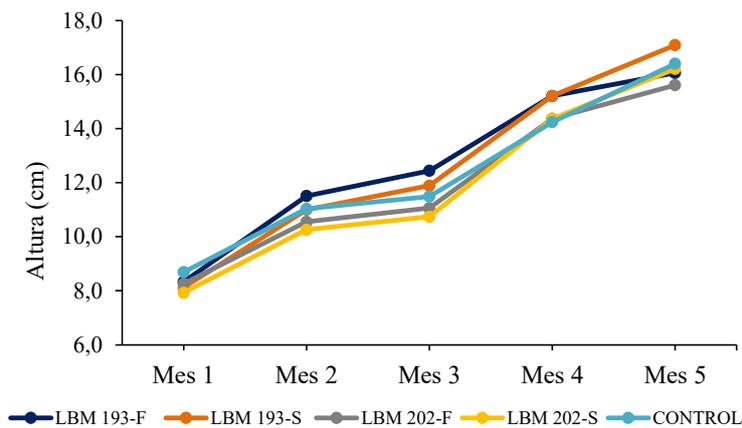


Figura 5.24. Altura promedio de las plantas según los aislamientos inoculados a diferentes tiempos del ensayo. Referencias: F: suspensión preparada a partir del formulado – S: suspensión preparada a partir de *Trichoderma* spp. desarrollada en PDA.

Tabla 5.9. Valores promedio de altura, clorofila, número de hoja y diámetro determinados al final del ensayo.

Tratamiento	Altura	Clorofila	Nº de hojas	Diámetro
LBM 193-F	16,06 ± 3,58	46,54 ± 7,69	12,85 ± 4,97	0,38 ± 0,08
LBM 193-S	17,09 ± 4,66	47,25 ± 8,33	14,72 ± 4,07	0,4 ± 0,11
LBM 202-F	15,61 ± 3,4	44,39 ± 4,67	13,93 ± 5,23	0,37 ± 0,08
LBM 202-S	16,21 ± 4,09	45,55 ± 7,61	14,36 ± 5,75	0,36 ± 0,09
CONTROL	16,40 ± 5,01	44,32 ± 7,69	13,7 ± 5,09	0,38 ± 0,08

Los resultados anteriormente presentados mostraron que:

- comparación de las medias de la altura por mes y por bloque, **no mostraron diferencias estadísticamente significativas** entre los diferentes tratamientos. Se observó que la altura fue variando en función del tiempo de manera similar para todos los tratamientos.
- **no hubo diferencias estadísticamente significativas** entre los diferentes tratamientos utilizados ($p > 0,05$) en los valores finales de altura, clorofila, número de hoja y diámetro del tallo.
- a diferencia del ensayo preliminar, **no se encontraron diferencias estadísticamente significativas** en los valores finales de altura y clorofila de las plantas entre todos los tratamientos utilizados (Tabla 5.9). Esto puede deberse al diseño del ensayo, a la época¹ en la cual se realizó el ensayo, entre otros factores.

En la Figura 5.25, se muestra el promedio del peso seco de raíz, parte aérea y planta para los diferentes tratamientos.

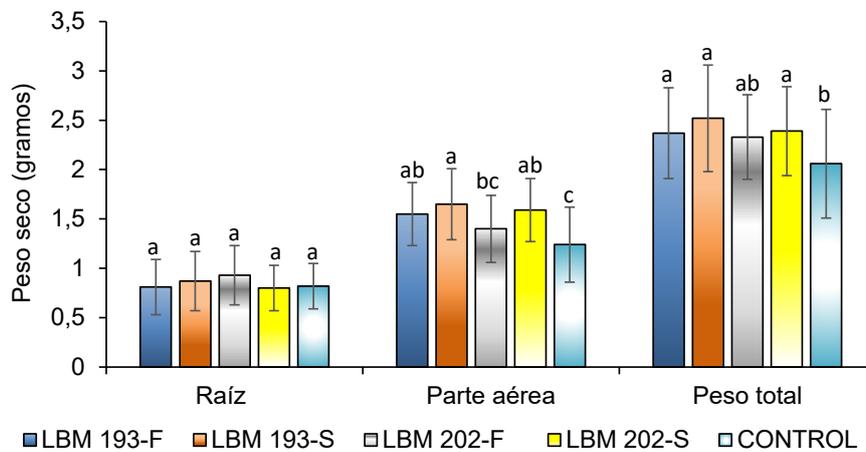


Figura 5.25. Peso seco promedio de raíz, parte aérea y total de plantas de yerba mate. Letras iguales arriba de las barras indican que no existen diferencias significativas entre tratamiento ($p > 0,05$). F: suspensión preparada a partir del formulado – S: suspensión preparada a partir de *Trichoderma* spp. desarrollada en PDA.

Los resultados de peso seco de las plantas de yerba mate evidenciaron que:

- **no hubo diferencias estadísticamente significativas** entre los valores de peso seco de la raíz de las plantas entre los diferentes tratamientos. Estos resultados difieren de los observados en el ensayo preliminar *in vivo*, en el que todos los valores de las plantas tratadas con los aislamientos de *Trichoderma* fueron significativamente mayores a los controles.
- los mayores valores obtenidos de peso seco de la parte aérea y peso seco total se observaron para las plantas inoculadas LBM 193-F, LBM 193-S y LBM 202-S, los cuales **presentaron diferencias estadísticamente significativas** en comparación a las plantas controles. Estos resultados coinciden con los observados en el ensayo preliminar *in vivo*, en el que LBM 193₁ mostró **diferencias estadísticamente significativas** tanto en el peso seco de la parte aérea como de la planta entera.

¹ Ensayo preliminar marzo - julio de 2018 y ensayo 2 septiembre de 2018 - marzo de 2019 (<https://es.climate-data.org/>, revisado el 3 de marzo de 2021).

Para evaluar la capacidad de disminuir la incidencia de enfermedades, se realizó un relevamiento de los signos/síntomas/daños de las hojas de las plantas y se calculó la incidencia según el tratamiento aplicado. En la Figura 5.26 se muestra un gráfico del promedio de la incidencia en función del tiempo del ensayo y en la Tabla 5.12, se muestra el promedio de la incidencia del primer mes y al final del ensayo para todos los tratamientos.

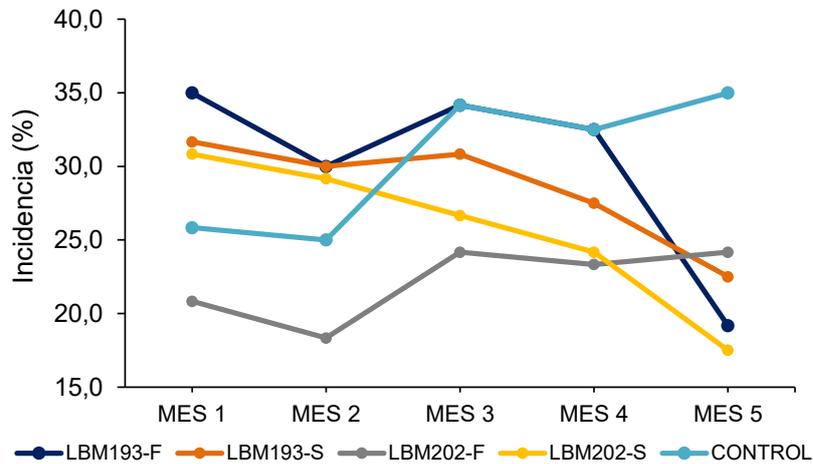


Figura 5.26. Promedio de incidencia a diferentes tiempos del ensayo *in vivo* para cada tratamiento.

Tabla 5.12. Incidencia en las plantas al inicio y final del ensayo según los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Incidencia primer mes (%)	Incidencia final del ensayo (%)
LBM193-F	35,0	19,2
LBM193-S	31,7	22,5
LBM202-F	20,8	24,2
LBM202-S	30,8	17,5
CONTROL	25,8	35,0

Los resultados del porcentaje de incidencia evidenciaron que:

- durante el primer mes del ensayo, las plantas tratadas con el aislamiento LBM 202-F fueron las únicas que presentaron menor incidencia que las plantas utilizadas como controles.
- luego del primer mes, las plantas tratadas con LBM 193₁ tanto formulado como suspensión disminuyeron el porcentaje de incidencia hasta llegar al final del ensayo presentando una incidencia mucho menor que la del control.
- las plantas tratadas con LBM 202-F durante todo el ensayo presentaron una incidencia menor que la del control, y si bien, LBM 202-S en el primer mes presentó una elevada incidencia, a lo largo del ensayo el porcentaje de incidencia disminuyó hasta valores mucho menores que la del control.

En la Figura 5.27.A y B, se muestra el biplot obtenido del PCA y el dendrograma obtenido del análisis de conglomerado, respectivamente, utilizando los datos de altura, clorofila, diámetro, número de hojas, peso seco de raíz, parte aérea y total.

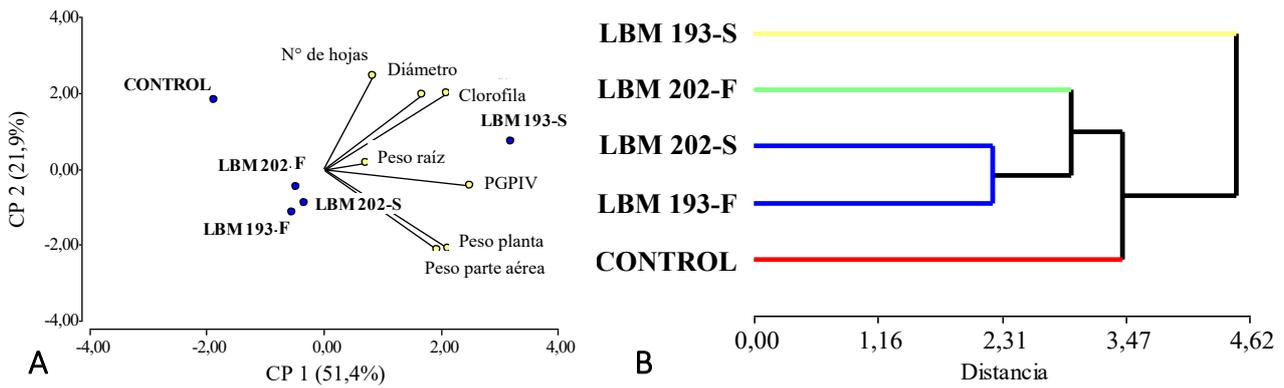


Figura 5.27.A. Posicionamiento de los tratamientos según los parámetros relacionados de crecimiento de las plantas de yerba mate. B. Dendrograma resultante del análisis de conglomerado realizado para los diferentes tratamientos utilizando los mismos datos usados en el PCA.

En la Tabla 5.11, se muestra el valor de PGPIV para los diferentes tratamientos utilizados.

Tabla 5.11. Promedio de los PGPIV para los diferentes tratamientos.

Tratamiento	PGPIV
LBM 193-F	0,920
LBM 193-S	0,989
LBM 202-F	0,924
LBM 202-S	0,930
CONTROL	0,888

Los resultados del análisis de PCA, del dendrograma y el PGPIV evidenciaron que:

- todos los parámetros presentaron una correlación positiva entre ellos.
- el control se posicionó alejado de todas las suspensiones *Trichoderma*, al igual que los resultados observados en el ensayo preliminar *in vivo*.
- los formulados y las suspensiones presentaron un PGPIV mayor que el control.
- no se observó un agrupamiento entre las suspensiones y los formulados para un mismo aislamiento.

El análisis de los resultados presentados en este capítulo nos permitió concluir que:

- ➡ todos los aislamientos de *Trichoderma* seleccionados como mejores promotores del crecimiento vegetal *in vitro* (Capítulo 4), mostraron un efecto promotor del crecimiento *in vivo* en plantas de yerba mate.
- ➡ el aislamiento LBM 193₁ fue el que presentó mejor acción biofertilizante *in vivo*.
- ➡ el aislamiento LBM 202₈ fue el que disminuyó en mayor medida la incidencia de enfermedades (por factores bióticos o abióticos) en las plantas de yerba mate.
- ➡ los formulados preparados a partir del crecimiento de *Trichoderma* en arroz como sustrato sólido con los aislamientos LBM193₁ y LBM 202₈ presentaron una calidad aceptable.

➡ la viabilidad de los conidios a tiempo cero se vio afectada por el tratamiento de secado y molienda del producto, por lo cual, se deben ajustar los parámetros del proceso –como la temperatura y el tiempo de secado– para que el formulado presente una mayor viabilidad inicial.

➡ las plantas inoculadas con el aislamiento LBM 193₁, presentaron una respuesta significativa tanto para el tratamiento con la suspensión como para el formulado en comparación con el control, para el peso seco total y de la parte aérea de las plantas de yerba mate. Esto indica que este aislamiento puede funcionar como potencial bioinsumo a base de *Trichoderma* ya que beneficia el desarrollo de la parte aérea de la planta, siendo el aumento de la biomasa seca vegetal uno de los parámetros más importantes en la determinación de la capacidad de promover el desarrollo de las plantas inoculadas (Hernández *et al.*, 2016).

➡ las plantas inoculadas con el aislamiento LBM 202₈, tanto para el tratamiento con la suspensión como para el formulado en comparación con el control, presentaron una menor incidencia de enfermedades. Esto indica que este aislamiento es capaz de proteger a las plantas de yerba mate del daño ocasionado por factores bióticos o abióticos, mejorando el aspecto fitosanitario de las plantas.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

Al comienzo de este trabajo de tesis se detalló que la Argentina es el principal productor y exportador mundial de yerba mate, y que la mayor producción se concentra en la provincia de Misiones, lugar donde fue desarrollado este trabajo de tesis. El objetivo de este trabajo se planteó teniendo en cuenta que en las zonas yerbateras de la provincia de Misiones ha aumentado la presencia de distintas enfermedades tanto en las plantaciones de yerbales a campo como en plantines en etapa de vivero, de las cuales para muchas de ellas no se conoce el agente causal y su potencial daño económico. Las plantas de yerba mate se caracterizan por tener un extenso período de germinación, y por la necesidad de adaptarse gradualmente a las condiciones ambientales (rustificación) antes de pasar desde el vivero al campo. En este largo período de cultivo en etapa de vivero, tal como se mencionó, es donde ocurren muchas enfermedades que son combatidas con el agregado de productos de síntesis química con todo lo que su utilización conlleva. Del vivero, las plantas deben salir en muy buenas condiciones de salud, y deben haber llevado un óptimo crecimiento relacionado, como ocurre con todos los cultivos, a una buena nutrición, para lo cual también es necesario el agregado de fertilizantes de síntesis química.

Teniendo en cuenta la importancia del cultivo de yerba mate para la región, la necesidad de disminuir el uso de agroquímicos, y el conocimiento de las bondades de los bioinsumos a base de microorganismos del género *Trichoderma* aplicados en otros cultivos, este trabajo de Tesis Doctoral se orientó hacia la **búsqueda de microorganismos pertenecientes a dicho género** que puedan ser utilizados como **bioinsumos microbianos** para contribuir a la sustentabilidad del cultivo de yerba mate. También se postuló que la rizósfera de yerba mate alberga **microorganismos endófitos del género *Trichoderma*** con capacidades de promoción del crecimiento vegetal *in vitro*, y que pueden ejercer una acción tanto **biocontroladora** de hongos fitopatógenos del cultivo de yerba mate como **biofertilizante**. Considerando la escasa investigación sobre patógenos fúngicos causantes de enfermedades en yerba mate también se planteó la **búsqueda e identificación de patógenos fúngicos** asociados a hoja de estas plantas crecidas en condiciones de vivero, para poder evaluar los aislamientos de *Trichoderma* obtenidos en relación a su capacidad biocontroladora de enfermedades propias de la región.

Del análisis e interpretación de los resultados presentados en este trabajo podemos concluir que:

✚ **La rizósfera de plantas de yerba mate de la región misionera, en particular la endorizósfera, es un reservorio de especies del género *Trichoderma* con capacidad de promover el crecimiento vegetal *in vitro*.** En el **Capítulo 2** se mostró el abordaje de la caracterización taxonómica de 14 aislamientos de hongos endófitos de raíz de yerba mate utilizando diferentes aproximaciones que validaron la identificación de los mismos con el género *Trichoderma*. El carácter endófito de los aislamientos le otorga un *plus* en comparación con otros PGPM aislados de suelo o de zonas superficiales de las plantas. En el **Capítulo 4** estos aislamientos fueron evaluados *in vitro* en relación a diversas propiedades de promoción del crecimiento vegetal, tanto de mecanismos directos como indirectos, que se utilizaron para calcular diferentes índices de promoción del crecimiento vegetal los cuales arrojaron en promedio valores similares a los reportados para otros PGPM y los posiciona como candidatos para ser evaluados en ensayos de promoción del crecimiento de plantas de yerba mate *in*

vivo. El empleo de diferentes índices conduce a la selección de los microorganismos de acuerdo al objetivo perseguido de utilizarlos como biocontroladores o biofertilizantes, o como ambos.

✚ Dentro de las especies de *Trichoderma* que habitan la endorizósfera de plantas de yerba mate se pueden encontrar especies como *T. asperellum*, *T. asperelloides* y *T. hamatum* que han sido reportadas como endófitos en otros cultivos –pero por primera vez en el cultivo de yerba mate– así como *T. strigosellum* que a nuestro entender aún no ha sido reportado como colonizador endófito en ningún cultivo. La combinación de métodos morfológicos y moleculares hicieron posible la identificación taxonómica y filogenética a nivel de especie de 13 de los 14 aislamientos obtenidos. Los resultados presentados en el **Capítulo 2** muestran que las especies identificadas fueron: *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. hamatum* y *T. strigosellum*, varias de ellas representadas por más de un aislamiento, muchos de los cuales pueden tener el mismo origen, es decir, haberse aislado de un mismo lugar (planta, zona de la planta, mismo microorganismo). Sólo un aislamiento no pudo identificarse a nivel especie, por lo cual, más allá de la sugerencia de la identificación con otras herramientas, también existe la posibilidad de que se trate de una especie nueva del género *Trichoderma*. Independientemente de que las muestras de raíces de yerba mate de donde se obtuvieron los aislamientos fueron tomadas de manera representativa de diferentes plantas de un vivero, los resultados obtenidos no serían suficientes para realizar un estudio de biodiversidad, pero coinciden con lo reportado por Hoyos-Carvajal *et al.* (2009) sobre las especies del complejo *T. asperellum* como las más comunes entre las especies de *Trichoderma* reportadas en su estudio de biodiversidad en diferentes ambientes de América del sur y América central.

✚ Los aislamientos de *Trichoderma* con características de PGPM pueden ser agrupados de acuerdo a ciertas propiedades de promoción del crecimiento vegetal y este ordenamiento coincide con su agrupamiento de acuerdo al análisis filogenético de los marcadores moleculares ITS concatenados con *tef*. Los resultados mostrados en el **Capítulo 4** refuerzan la caracterización de los aislamientos que se muestra en el **Capítulo 2** y contribuye a la construcción de un banco de PGPM que puede ser de utilidad para comparar con otros aislamientos del género *Trichoderma*.

✚ Dentro de los aislamientos de *Trichoderma* nativos de plantas de yerba mate de la región de Misiones se pueden encontrar especies capaces de promover el crecimiento de plantas de yerba mate en etapa de vivero, contribuyendo a la sustentabilidad del cultivo y abriendo la posibilidad de la utilización de bioinsumos basados en estos microorganismos que minimicen el uso de agroquímicos. Los resultados mostrados en el **Capítulo 4** permitieron seleccionar 4 de los 14 aislamientos evaluados *in vitro* –3 pertenecientes a la especie *T. asperelloides* y 1 a una especie no identificada– de acuerdo a su elevado PGPI, para aplicar *in vivo* como suspensiones de conidios y formulados en sustrato sólido. De los ensayos *in vivo* mostrados en el **Capítulo 5** se puede concluir que todas las suspensiones de *Trichoderma* fueron efectivas siendo *T. asperelloides* LBM 193₁ el aislamiento más efectivo como biofertilizante *in vitro* e *in vivo* y el aislamiento *Trichoderma* sp. LBM 202₈ como biocontrolador *in vitro* y mejorador fitosanitario *in vivo*.

✚ Los aislamientos de *Trichoderma* LBM 193₁ y LBM 202₈ se pueden cultivar en arroz como sustrato sólido y permiten obtener un formulado de sencilla producción, fácil manipulación y de calidad. Los resultados presentados en el **Capítulo 5** mostraron que la viabilidad de los conidios en el formulado se vio afectada por el tratamiento de secado y molienda. No obstante, la concentración de

conidios presentes en el formulado fue suficiente para permitir que los microorganismos presentaran un efecto promotor del crecimiento *in vivo* similar al de la suspensión, determinado por una diferencia significativa en el peso seco total y de la parte área de las plantas de yerba mate cuando se inoculó con LBM 193₁.

✚ Plantas de yerba mate (en etapa de vivero) de la región misionera que presentan signos/síntomas de enfermedad en sus hojas, albergan una diversidad de hongos fitopatógenos dentro de los que se pueden encontrar miembros pertenecientes a los géneros: *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Epicoccum* y *Phoma*, que ya han sido reportados como patógenos de yerba mate, así como también *Pestalotiopsis* y *Pilidium* que, a nuestro entender, aún no han sido reportados como patógenos en este cultivo hasta este trabajo de tesis. En el Capítulo 3 se mostró el abordaje de la caracterización taxonómica de 17 aislamientos patógenos de hoja de yerba mate utilizando diferentes aproximaciones que validaron la identificación de 9 de ellos a nivel género. Se logró construir una colección de hongos patógenos nativos de hoja de yerba mate de la región misionera. Dos de estos aislamientos fúngicos –*Alternaria* sp. LBM 186₁₁ y *Phoma* sp. LBM 207₁– presentaron mayor índice de severidad y permitieron la caracterización de los aislamientos de *Trichoderma* como antagonistas *in vitro* de estos patógenos.

Entre los diversos estudios que pueden contribuir a mejorar diferentes aspectos del uso de los aislamientos de *Trichoderma* obtenidos en este trabajo de tesis como bioinsumos en este cultivo son:

✓ Secuenciar el **genoma** de los 2 microorganismos seleccionados como mejores candidatos de PGPM *in vitro* e *in vivo*, ya que permitirá buscar genes con funciones de promoción del crecimiento vegetal que si bien son putativos –hay que evaluar luego si esos genes se expresan y bajo qué condiciones– orientará la identificación de capacidades específicas. Además, con el dato de la secuencia de su genoma se podrá identificar si LBM 193₁ es una cepa ya documentada y si LBM 202₈, se trata de una especie nueva.

✓ **Realizar pruebas metabólicas** utilizando placas de Biolog FF® (Biolog Inc., Hayward CA) que proporcionan datos sobre las funciones ecológicas de las especies determinando por ejemplo las diferentes fuentes de carbono que utiliza un aislamiento en particular. Llevar a cabo **ensayos moleculares** por ejemplo con *primers* tipo BOX que amplifican muchas partes del genoma y otorgan un perfil o huella digital del microorganismo, mostrando un patrón con muchas bandas en un gel de agarosa que permite diferenciarlos. Todas estas pruebas a realizar con la idea de caracterizar principalmente a los aislamientos que pertenecen a una misma especie buscando alguna diferencia que conduzca a considerarlos cepas diferentes.

✓ **Identificar a nivel de especie** los patógenos fúngicos empleando dos o más marcadores moleculares.

✓ **Evaluar el efecto antagónico *in vivo*** de los aislamientos promisorios de *Trichoderma* en plantas de yerba mate infectadas con los patógenos seleccionados y **tratar de relacionar el patógeno con su enfermedad**.

✓ **Realizar la secretómica y/o metabolómica** de los aislamientos de *Trichoderma*, en medio líquido y sólido, en presencia y ausencia del patógeno, ya que permitirá determinar qué enzimas y metabolitos se producen.

- ✓ **Mejorar los parámetros de calidad del formulado**, mayor concentración de conidios viables al final de su elaboración y que sean perdurables en el tiempo durante su almacenamiento. Esto se podría lograr modificando los sustratos en los que se hace crecer el microorganismo como, por ejemplo, utilizar compost u otro sustrato que garantice el crecimiento y la viabilidad de *Trichoderma* por mayor tiempo. Además, se podría mejorar la formulación con arroz como sustrato sólido acortando el tiempo de secado y/o realizando una modificación en la etapa de molienda.
- ✓ **Evaluar dosis, momento y cantidad de aplicaciones** de los aislamientos de *Trichoderma* en la etapa de vivero para optimizar las condiciones que sean más efectivas para el desarrollo y sanidad del cultivo.
- ✓ **Realizar ensayos *in vivo* a mayor escala** que incluyan diferentes épocas del año, en diferentes localidades y estudios del suelo para determinar la degradación del suelo de los yerbales.
- ✓ **Marcar los aislamientos de *Trichoderma*** por ejemplo con la proteína fluorescente *gfp* (*green fluorescent protein*) para evaluar la colonización del microorganismo y su persistencia después de su aplicación.

Este trabajo de tesis es una contribución a las prácticas sustentables del cultivo de yerba mate, hecho necesario y urgente que debe suscitarse en todas las producciones agrícolas para que las generaciones futuras puedan seguir cultivando y cuidando “una sola salud” *.

*A nivel mundial, ha tomado fuerza el concepto de «una sola salud» (*one health*), que resume una noción conocida desde hace más de un siglo: la salud humana y animal son interdependientes y están vinculadas a los ecosistemas en los cuales coexisten. Desde las ciencias agrarias, es importante señalar la necesidad de considerar la salud de las plantas y su microbioma dentro del concepto *one health*, íntimamente ligado a la salud del ambiente, el suelo, los animales y las personas”, extraído de [Altier & Abreo \(2020\)](#).

ANEXO

ANEXO 2

Tabla A.1. Secuencia de ITS de los aislamientos y su número de acceso a GenBank.

Aislamiento	N° de acceso	Secuencia de ITS
LBM 193 ₁	MK637407.1	CAGGCGCCCGCGGAGGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAA AATTCAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCA TGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGG TGCCGCGCCGAAATACAGTGGCGTCTCGCCGCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCAAACTCGCACCG GGAGCGCGGCGTCCAGTCCGTA AAAACACCAACTTTCTGAAATGTTGACCTT
LBM 194 ₁	MK637408.1	TTCCGTAAGGGGGGACTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCAATGTGAACGTTACCAAAC GTTGCCCTCGCGGGGTACGCCCCGGGTGCGTCGACGCCCCGGAACAGGCGCCCGCGGAGGAACCAACAAA CTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATCAAATGAATCAAACCTTTCAACA CGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTAGTGAA TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCT GAACCCCTCCGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCGCGCCCGAAATACAGTGGCGGT CTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCAAACTCGCACCGGGAGCGCGCGCTCCAGTCCGTA AAAAC CAAATTTCTGAAATGTTGACCTCGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATACT
LBM 195 ₁	MK637409.1	CAAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCGCGGGGTACGCCCCGGGTGCGTCGACGCCCCGGAACAGGCGC CCGCGGAGGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATCAA AATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT GTGAATTGCAGAATTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCCT GTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCC GGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCAAACTCGCACCGGGAGCGCG GCGCTCCAGTCCGTA AAAACACCAACTTTCTGAAA
LBM 196 ₃	MK637410.1	TCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCGCGGGGTACGCCCCGGGT GCGTCGACGCCCCGGAACAGGCGCCCGCGGAGGAACCAACCAAACTCTTTACTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTT TTACTTACAGCTCTGAGCAAAAATCAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAA GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC CCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGTGCGCGTTGGG GACTTCCGGAACCCCTAAGACGGGATCCGCGCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGT AGTTTGCAAACTCGCACCGGGAGCGCGCGCTCCAGTCCGTA AAAACACCAACTTTCTGAAATGTTGACCTCG
LBM 197 ₃	MK637411.1	GTGCGTCGCGCCCGGAGTTCCGACCCCGCGGAGGAACCATCCTCACCTCTTTCTGTGTCGTCCTCCGCGGACGT ATTTCTTACCCTCTGAGCCCCCTTCCCCTCCCTCCCCCTTTCCCCCGGATCTCTTGGTTCTGGCCTCGATGAAG CCCGCCCGCACTGCCATCCCTAATCTGAATTGCCAATCCCTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCC CCCCTATTCTGGCGGGCTGCCTCTCCAGCGTCTTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGAT
LBM 198 ₃	MK637412.1	GTGCGTCGCGCCCGGAGTTCCGACCCCGCGGAGGAACCATCCTCACCTCTTTCTGTGTCGTCCTCCGCGGACGT ATTTCTTACCCTCTGAGCCCCCTTCCCCTCCCTCCCCCTTTCCCCCGGATCTCTTGGTTCTGGCCTCGATGAAG CCGCCCCGCACTGCCATCCCTAATCTGAATTGCCAATCCCTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCC CCCCTATTCTGGCGGGCTGCCTCTCCAGCGTCTTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGAT
LBM 199 ₅	MK637413.1	CCGAGTTTACAACCTCCAAACCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCGCGGGGTACGCCCCGGGTGCGTC GCAGCCCCGGAACAGGCGCCCGCGGAGGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTT ACAGCTCTGAGCAAAAATCAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCG AGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGATCGGCGTTGGGGATCG GGACCCCTCACACGGGTGCGCGCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGAC AACTCGCACCGGAGCGCGCGCTCCAGTCCGTA AAAACACCAAA
LBM 200 ₅	MK637414.1	TCACGCCCCGGGTGCGTAAAAGCCCCGGAACAGGCGCCCGCGGAGGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCC TCGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATCAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTG GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC GCACATTGCGCCCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGA TCGCGTTGGGGATCGGGACCCCTACCGGGTCCGCGCCCTGAAATACAGTGGCGGT
LBM 201 ₆	MK637415.1	ACCAAACCTGTTGCCGCGGGGTACGCCCCGGGTGCGTCGACGCCCCGGAACAGGCGCCCGCGGAGGGAC CAACCAAACTCTTTACTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTTTTACTCACAGCTCTGAGCAAAAATCAAATGAATCAAAA CTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA ATTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAT TTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGTGCGCGTTGGGGACTCGGGAGCCCTAAGACGGGATCCCGCCCCGAA ATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCAAACTCGCACCGGGAGCGCGCGCTCCAG GTCCGTA AAAACACCAACTTTCTGAAATGTTGACCTCGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAG
LBM 202 ₈	MK637416.1	ACCAATCTGTTGCCGCGGGATTCTCTGCCCCGGGCGCTGCGACGCCCCGGATCCCATGGCGCCCGCGGAGG ACCAACTCAAACCTTTTTCTCTCCGTGCGGCTCCGTGCGGCTCTGTTTTACTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGC GACCTAGCGGGGCTCTGAAAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCG AGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGTGCGCGTTGGGGATCG GCCCTCACCGGGCCGCCCGAAATACAG

LBM 203 ₉	MK637417.1	CCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGG TCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAAACCAGGCGCCCCGGGAGGAACCAACCAAACCTTTCTGTAGTCCCC TCGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCT GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA CGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTGAACCCCTCCGGGGG ATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTC CTGCGCAGTAGTTTGCACAACCTGCACCGGGAGCGCGGCGCTCCACGTCCGTAACCAACCAACCTTTCTGAAATG TTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCT
LBM 204 ₉	MK637418.1	ACTCCCAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGTACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGAA CCAGGCGCCCCGGGAGGAACCAACCAAACCTTTCTGTAGTCCCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAA AAATCAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT AAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGTATTCTGGCGGGC ATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTGAACCCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGG GTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAACCTGCACCGGGAG CGCGGCGCTCCACGTCCGTAACCAACCAACCTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAA CTTAAGCATATC
LBM 205 ₉	MK637419.1	AAACTGTTGCCTCGGCGGGGTACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACAGGCGCCCCGGGAGGGACCAA CCAAACTCTTACTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTTTACTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAATGAATCAAACCTT TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTT AACCTCGAACCCCTCCGGGGGTGCGGCTGGGGACCTCGGGAACCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATA CAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAACCT
LBM 206 ₁₀	MK637420.1	CCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACAGGCGCCCCGGGAGGAACCAACCAAACCTTTCTGTAGTCCCCCTCGG GACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATC GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA TTGCGCCCCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTGAACCCCTCCGGGGCATCGGC GTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCCTGCGC AGTAGTTGCACAACCTCGCG

Tabla A.2. Secuencia de *tef* de los aislamientos y su número de acceso a GenBank. En amarillo se resalta el intrón 4 (largo) y en verde el 5 (corto) identificadas con la herramienta TrichoMARK.

Aislamiento	N° de acceso	Secuencia <i>tef1_4</i>
LBM 193 ₁	MK514128.1	CCGACAATTCTGTTCTCAGTTTTGTCTTTCTTTTTCAGCATCACCCCGCTTGGCAGCCTACCTACCCCTCCTTTGG CACAGCAAAAATTTCTCGCTGCCTTGTGGCTTTAGTGGGGTGTCAATTTGTTGACGGCAACCCCACTATC GCCACTGTACCTCTTCCATCATCCACCACATGCTTTGTTCAATCGCATCGTCTATTTCAATATCTCTTGTTCATTA TGCTGATCATGCTTCAATCAA TAGGAAGCCGCGAAGCTCGCAAGGGTTCCTTCAAGTATGCGTGGGTCTTGAC AAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTAT GTCACCGTCA TGGTATGTTTGGACACTTCAGTCGACATTGCAAGATCGTCTTCTAACATACTCTCCCAAGAG GCTCCCGGTACCCGTGATTTCA CAAGAACATGATCACTGGTACCTCCAGGC
LBM 194 ₁	MK514129.1	CACAATTATATGCCGACAATTCTGTTCTCAGTTTTGTCTTTCTTTTTCAGCATCACCCCGCTTGGCAGCCTACCT ACCCCTCCTTGGCAGCAAAAATTTCTCGCTGCCTTGTGGCTTTAGTGGGGTGTCAATTTGTTGACGG CAACCCCACTATCGCCACTGTACCTCTTCCATCATCCACCACATGCTTTGTTCAATCGCATCGTCTATTTCAATA TCTCTTGTTCATTTATGCTGATCATGCTTCAATCAATAGGAAGCCGCGAAGCTCGCAAGGGTTCCTTCAAGTATGC GTGGGTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACT TCCAAGTACTATGTCACCGTCA TGGTATGTTTGGACACTTCAGTCGACATTGCAAGATCGTCTTCTAACATACT CTCCCAAGAGAGCTCCCGGTACCCGTGATTTCA CAAGAACATGATCACTGGTACCTCCAGGCTGACTGCGCT ATCCTGATTATCGTCCCGTACTGGTGGTTCGAGGCTGGTAC
LBM 195 ₁	MK514130.1	TATATGCCGACAATTCTGTTCTCAGTTTTGTCTTTCTTTTTCAGCATCACCCCGCTTGGCAGCCTACCTACCCCT CCTTTGGCAGCAAAAATTTCTCGCTGCCTTGTGGCTTTAGTGGGGTGTCAATTTGTTGACGGCAACCC CACTATCGCCACTGTACCTCTTCCATCATCCACCACATGCTTTGTTCAATCGCATCGTCTATTTCAATATCTCTTG TTCATTATGCTGATCATGCTTCAATCAATAGGAAGCCGCGAAGCTCGCAAGGGTTCCTTCAAGTATGCGTGGGT CTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAG TACTATGTCACCGTCA TGGTATGTTTGGACACTTCAGTCGACATTGCAAGATCGTCTTCTAACATACTCTCCCG ACAGAGCTCCCGGTACCCGTGATTTCA CAAGAACATGATCACTGGTACCTCCAGGCTGACTGCGCTATC
LBM 196 ₃	MK514131.1	TGCCGACTGCCGACAATTCTGTTCTCAGTTTGTCTTTCTTTTTCAGCATCACCCCGCTTGGCAGCCTACCTACCCCT CTACCCCTCCTTGGCGCAGCAAAAATTTCTGGCTGCCTTGTGGCTTTAGTGGGGTGTCAATTTTGGGCAAA CCCGCTATCGCCACTGTCCCTCATGCCCAACACATTCAATTCATCGCATCGTCTTGGCCTCAATCTTTT CAAAATTCATTGTGCTGATCATGTTCAATCAATAGGAAGCCGCGAAGCTCGCAAGGGTTCCTTCAAGTATGCGTG GGTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCC CAAGTACTATGTCACCGTCA TGGTATGTTTTCAGCTTCGTCATTGACATCTGAAATCATCTTCTAACATACTCT CTATAGAGCTCCCGGTACCCGTGATTTCA CAAGAACATGATCACTGGTACCTCCAGGCTGACTGCGCTATC
LBM 197 ₃	MK514132.1	GACAATTCTGTTCTCAGTTTTGTCTTTCTTTTTCAGCATCACCCCGCTTGGCAGCCTACCTACCCCTCCTTTGGCA CAGCAAAAATTTCTCGCTGCCTTGTGGCTTTAGTGGGGTGTCAATTTGTTGACGGCAACCCCACTATCGC CACTGTACCTCTTCCATCATCCACCACATGCTTTGTTCAATCGCATCGTCTATTTCAATATCTCTTGTTCATTATG CTGATCATGCTTCAATCAATAGGAAGCCGCGAAGCTCGCAAGGGTTCCTTCAAGTATGCGTGGGTCTTGACAA GCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGT CACCGTCA TGGTATGTTTGGACACTTCAGTCGACATTGCAAGATCGTCTTCTAACATACTCTCCCAAGAGCG TCCCGGTACCCGTGATTTCA CAAGAACATGATCACTGGTACCTCCAGGCTGACTGCGCTATCCTGATTATCGCT GCCGG
LBM 198 ₃	MK514133.1	GACAATTCTGTTCTCAGTTTTGTCTTTCTTTTTCAGCATCACCCCGCTTGGCAGCCTACCTACCCCTCCTTTGGCA CAGCAAAAATTTCTCGCTGCCTTGTGGCTTTAGTGGGGTGTCAATTTGTTGACGGCAACCCCACTATCGC CACTGTACCTCTTCCATCATCCACCACATGCTTTGTTCAATCGCATCGTCTATTTCAATATCTCTTGTTCATTATG CTGATCATGCTTCAATCAATAGGAAGCCGCGAAGCTCGCAAGGGTTCCTTCAAGTATGCGTGGGTCTTGACAA GCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGT CACCGTCA TGGTATGTTTGGACACTTCAGTCGACATTGCAAGATCGTCTTCTAACATACTCTCCCAAGAGCG TCCCGGTACCCGTGATTTCA CAAGAACATGATCACTGGTACCTCCAGGCTGACTGCGCTATCCTGATTATCGCT GCCGG
LBM 199 ₅	MK514134.1	AAGGTAAGCTCATTCACTGCTTTCCCATCAATTTTGGCAGCATATGCCGACAATTCTGCTCAGTTTTTG TCTTTTTTCCAGCGTACCCCGCTTGGCAGTCTACCTACCCCTCCTTTGGCAGCAAAAATTTCTGGCTGCCT TGTTTGGCTTTAGTGGGGTGTCAATTTTGGCAGCAACCCCGCTATCGCCACTGCACCTCTTCCATCACCCACC ACATGCTATTTGCTCAATCGCGTCGCTTTTTTGTTCATTATGCTGATCATGCTTCAATCAATAGGAAGCCGCGA ACTCGCAAGGGTTCCTTCAAGTATGCGTGGGTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCAT CGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCA TGGTATGTTTGGACACTTCCTCTCTA GCTATCGACATCCAAGTCCGCCATTCTAACATGCTCTCCCAAGAGCGTCCCGGTACCCGTGATTTCA CAAGA ACATGATCACTGGTACCTCCAGGCTGACTGCGCTATCCTGATTATCGCTGCCGGTACTGGTGGTTCGAGGCTG GTATCTCCAA
LBM 200 ₅	MK514135.1	GCACAATTGTGCCAGACAATTCTGTTCTCAGTCTTGTCAACATTTTCCCAACCAAGCATCGACCCCGCTTTGTCT GCCTACCTACCCCTCCTTTGGCAGCAAAAATTTCTGGCTGCCTTGTGGTTTTAGTGGGGTGTCAATTTT TGGCAGTGAACCCCGCATCGCCACTGTTCTCATGCATTACCAACACATGCTACTTATCAACTGATTGGTTCATTG TGCTAATCATACTTCAATCAATAGGAAGCCGCGAAGCTCGCAAGGGTTCCTTCAAGTATGCGTGGGTCTTGAC AAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTAT

		GTCACCGTCA TTGGTATGTTTTAGTCCGACTGTTCACTATCCCAACATCATGCTAACGTGCGACTCTACAGAGCTCCCGGTACCGTGATTTTCA CAAGAACATGATCACTGGTACCTCCCAGGCCGATTGCGCTATCCTCATTATC
LBM 201 ₆	MK514136.1	TTGCACTCTTGCCCGACTGCCGACAATTTCTGTTCTCAGTCTTGTCATTTTTTTTTCAACCAGCGTCACCCCGCTTTGGTTGTCTACCCCTCCTTTGGCGCAGCAAAATTTCTGGCTGCCTGTTTGGCTTTTGTAGTGGGGTGTCAATTTTTTGGGCAAAACCCCGTATCGCCACTGTCCTCATCGCCCAACACATTCAGTTTCACTCCGATCGCTTTTGCCTCAATTTTTTCAAAATTCATTGTGC TGATCATGTTCAATCAATAGGAAGCCGCCGAACCTCGCAAGGGTTCCTCAAGTATGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTGGAAGTTCGAGACTCCAAGTACTATGTCACCGTCA TTGGTATGTTTTAGTCCGACTGTTCACTATCCCAACATCATGCTAACGTGCGACTCTACAGAGCTCCCGGTACCGTGATTTTCA CAAGAACATGATCACTGGTACCTCCCAGGCCGATTGCGCTATCCTCATTATC
LBM 202 ₈	MK514137.1	TGTTGTGCCAACAGGCTTTTTTTCATCACCCCGCTTCTTCTACCCCTCCGAGCGACGCAAAATTTTTTGTGCTTACGATGGGTTTTAGTGGGGGGCCAAATTTTTGGGCAAAACCCCGCTATCGCCCTGTCCTCCATCCCCAACACTTTCATTTATCCCTCGCATCGCACTTTGCCTCAATCTTTTTCAAAATCTTTGGGCTGATCTTGTCAATCAATAGGAACCCGCCAAACTCGGCAGGGTCTCCTCAAGTAGCGGGGTTCTTGACAACCTCAGGGCCGACCCGGGACGGGGTATCACCTTCA CTTTGCCCTCTGGAAGTTCCGAAACTCCCAAGTACTATGTCCTCCGCTTTGGTATGTTTCCACCTCCGCCATTGACATCCCAAAACCATC TTCCAAACATACTCCTCTATAAACGCTCCCGGCCACCGTGATTTATCAAAAACATGATCACTGGTACCTCCCAGGCTAACTGCCCTATCCTGATTATCCCCCGGCCCTGGTGA
LBM 203 ₉	MK514138.1	ATATGCCCGACAATTTCTGCTCAGTTTTTGTCTTTTTTCCAGCGTCACCCCGCTTTGCCAGTCTACCTACCCCTCTTTGGCACAGCAAAAATTTCTGGCTGCCTGTTTGGCTTTTGTAGTGGGGTGTCAAAATTTTTGGCAGCAACCCCGCTATCGCCACTGCACCTCTTCCATCACCCACCACATGCTATTTGCTCAATCGCGTCTTTTTTGTTCATTATGCTGATCATGCTTCAATCAATAGGAAGCCGCCGAACT GGCAAGGGTCTTCAAGTATGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCAAGTACTACGTACCGTCA TTGGTATGTTTTAGTCCGACTGTTCACTATCCCAACATCATGCTAACGTGCGACTCTCCACAGCGTCCCGGTACCGT GATTTCAAGAACATGATCACTGGTACCTCCCAGGCTGACTGCGCTATCCTGATTCGCTGCCGACT
LBM 204 ₉	MK514139.1	CGAGAAGGTAAGCTAATTTCACTGCTTTTCCCATCAATTTTTGGCACAATATATGCCCGACAATCTGTTCTCAGTTTTGTCTTTCTTTTTCAGCATCACCCCGCTTTGCCAGCCTACCTACCCCTCCTTTGGCACAGCAAAAATTTCTCGCTGCTTTGTTGGCTTTTGTAGTGGGGTGTCAATTTGTTGACGGCAACCCCACTATCGCCACTGTACCTCTTTCCATCATCCACCACATGCTTTTGTCAATCGCATCGT CTATTTTCAATATCTCTTGTTCATTATGCTGATCATGCTTCAATCAATAGGAAGCCGCCGAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTATGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCAAGTACTATGTCACCGTCA TTGGTATGTTTTGGACACTTCAGTCGACATTGCAAGATCGTCATTCTAACATACTCTCCCCACAGACGCTCCCGGTACCGTGATTTCAT CAAGAACATGATCACTGGTACCTCCCAGGCTGACTGCGCTATCCTGATTATCGCTGCCGTTACTGGTGGTTCGAGGCTGGT
LBM 205 ₉	MK514140.1	GACTGCCCGACAATTTCTGTTCTCGGTCTTGTCAAATTTTTTCAACCAGCGTCACACCCCGCTTTGGTTGTCTACCCCTCTTTGACACAGCAAAAATTTCTGGCTGCCTGTTTGGCTTTTGTAGTGGGGTGCCAATTTTTGGGCAAAACCCCGCTATCGCCACTGTCCCTCATCGCCCAACACATTCAGTTTCACTCCATCGCATCGCTTTTGCCTCAATCTTTTCAAAATTCATTGTGCTGATCATGTTCAATCAATAGGAAGCCGCCGAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTATGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCAAGTACTATGTCACCGTCA TTGGTATGTTTTAGTCCGACTGTTCACTATCCCAACATCATGCTAACGTGCGACTCTCCACAGCGTCCCGGTACCGTGATTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACCTCCCAGGCTGACTGCGCTATCCTGATTATCGCTGCCGTTACTGGTGGTTCGAGGCTGGT
LBM 206 ₁₀	MK514141.1	GAGAAGGTAAGCTAATTTCACTGCTTTTCCCATCAATTTTTGGCACAATATATGCCCGACAATTTCTGTTCTCAGTTTTGTCTTTCTTTTTCAGCATCACCCCGCTTTGCCAGCCTACCTACCCCTCCTTTGGCACAGCAAAAATTTCTCGCTGCCTGTTTGGCTTTTGTAGTGGGGTGTCAATTTGTTGACGGCAACCCCACTATCGCCACTGTACCTCTTCCATCATCCACCACATGCTTTTGTCAATCGCATCGTCTATTTTCAATATCTCTTGTTCATTATGCTGATCATGCTTCAATCAATAGGAAGCCGCCGAACT GGCAAGGGTTCCTTCAAGTATGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCAAGTACTATGTCACCGTCA TTGGTATGTTTTGGACACTTCAGTCGACATTGCAAGATCGTCATTCTAACATACTCTCCCCACAGACGCTCCCGGTACCGTGATTTCAT CAAGAACATGATCACTGGTACCTCCCAGGCTGACTGCGCTATCCTGATTATCGCTGCCGTTACTGGTGGTTCGAGGCTGGT

*La secuencia del intrón largo *tef1_int4* no fue encontrada en la secuencia de *TEF* para el aislamiento LBM 202.

ANEXO 3

Tabla A.3. Secuencia de ITS de los aislamientos y su número de acceso a GenBank.

Aislamiento	Género	Secuencia de ITS
LBM 229 ₃	<i>Alternaria</i>	CTTCTGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGTTACAGCCTTGCT GAATTATTCACCCTTGTCTTTGCGTACTTCTTTCTTGGTGGGTTCCGCCACCCTAGGACAAACATAAACCTTTTGT AATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC GCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGT ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGCTCATTGTACCCCTCAAGCTTGTCTGGTGTGGGCGTCTTGTCTAGCTTTGC TGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCTACTGTTTTCGAGCGCGAGGCGAGCACAAAGTCGCACTCTATC AGCAAAGGTCTAGCATCCATAAGCCTTTTTCAACTTTTACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATA TCAATAAGCCGGAGGAA
LBM 186 ₁₁		AACCTGCGGAGGGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGTTACAGCCTTGTGAATTATTCACC CTTGTCTTTTGCCTACTTCTTTGTTCTTGGTGGTTCGCCACCCTAGGACAAACATAAACCTTTTGAATTGCAATCAG CGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAACAACGCGAAATGC GATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGC ATGCTGTTGAGCGCTCATTGTACCCCTCAAGCTTGTGGTGTGGGCGTCTTGTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCC TTAAAGTAATTGGCAGCCGGCTACTGTTTTCGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCA TTAAGCCTTTTTTCAACTTTTACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGA
LBM 231 ₉	<i>Colletotrichum</i>	GGTCCTTCCTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTTACCGCTCTATAACCTTTGTGAACATACTAACCGTT GCTTCCGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCCTCCCGGCCCGCCACCACGGGACCGGGCGCCCGC CGGAGGAAACCAAACCTATTTACACGACGTCTCTGAGTGGCACAAGCAAATAATTAACCTTTTAAACACGGATCT CTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCGAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT TTGAACGCACATTGCGCTCGCCAGCATTCTGGCGAGCATGCCTGTTGAGCGCTCATTCAACCTCAAGCACCCTGGT TTGGGGCCCGCAGGACACGTTGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCTCCCGGAGCCTCTTTGGTGTAACTAACG TCTCGACTGGGATTCGAGGGACTCTTCCGCTAAAACCCCAATTTTTTACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA CCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
LBM 232 ₉		GGTCCTTCCTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTTACCGCTCTATAACCTTTGTGAACATACTAACCGTT GCTTCCGCGGGCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCTCCCTCCCGGCCCGCCACCACGGGACCGGGCGCCCGC CGGAGGAAACCAAACCTATTTACACGACGTCTCTGAGTGGCACAAGCAAATAATTAACCTTTTAAACACGGATCT CTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCGAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT TTGAACGCACATTGCGCTCGCCAGCATTCTGGCGAGCATGCCTGTTGAGCGCTCATTCAACCTCAAGCACCCTGGT TTGGGGCCCGCAGGACACGTTGGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCTCCCGGAGCCTCTTTGGTGTAACTAACG TCTCGACTGGGATTCGAGGGACTCTTCCGCTAAAACCCCAATTTTTTACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA CCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
LBM 228 ₇	<i>Epicoccum</i>	TTTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCTAGAGTTGTAGGCTTTCCTGCTATCTTACCCTATGCTTTTG AGTACCTTACGTTTTCTCGGTGGGTTCCGCCACCGATTGGACAAATTTAAACCTTTTGCAGTTGAAATCAGCGTCTGAAA AAACTTAATAGTTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCGAGGAAATGCGATAAGTAG TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTT CGAGCGTCAATTTGACCTTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTTTGTCTCTGTAGACTCGCTCAAAAACAAATGGCAGCC GGCGTATTGATTCGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTCGACTCATAACGACGACATCCAAAAGTACATTTTACACTCTT GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAA
LBM 227 ₅		<i>Pestalotiopsis</i>
LBM 207 ₁	<i>Phoma</i>	CTTCCGTAGGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCTAGAGTTGTAGGCTTTCCTGCTATCTTACCCTATGCTTTTGTAGT ACCCTACGTTTTCTCGGTGGGTTAATTTAAACCTTTGAGTTGAAATCAGCGTCTGAAAAACCTTAATAGTTACAACCTTC AACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCGAGGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGT AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGCTCATTGTACCTTCAA GCTCTGTTGGTGTGGGTTTGTCTCTGTAGACTCGCTCAAAAACAAATGGCAGCCGGCTATTGATTTGCGGAGCGC AGTACATC
LBM 189 ₅		TCCGTAAGGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCTAGAGTTGTAGGCTTTCCTGCTATCTTACCCTATGCTTTTGTAGTA CCTTCTGTTTCTCGGTGGGTTCCGCCCGGATTGGACAAACCTTAAACCTTTTGTAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAA TAATAGTTACAACCTTCAACAACGGATCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCGAGGAAATGCGATAAGTAGTGTGA ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAGC GTCTTTGTACCTTCAAGCTCTGTTGTTGGTGTGGTGTCTCGCTTTCGCTGTAGACTCGCTCAAAAACAAATGGCA CCCGCGTATTGATTCGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTCGACTCATAACGACGACGCTCAAAAAGTACATTTTACA CTTGTACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA
LBM 208 ₄	<i>Pilidium</i>	GACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTGTGAAACACAATCTCCCTTTCTGTTGTTGACCGGTTGCCTTGCCTTCGGG CAGGATTATCTGAATCAGTGTCTGAGTACTTTTATAACTATAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT CGATGAAGAACGCGAGGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGACACCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG CGCCCTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCACTACACTTCTCGGAGTATTGACAGTGGCTACGCTT GTCTAAAACCTTGGTGTAACTATCAATCAGCATAGTAATCTCTGCGAAGGTGGATAGGTAACACTGAAAACCTTCTT GTTTACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

ANEXO 4

4.5.1 Determinaciones enzimáticas *in vitro*

A continuación, se muestran las imágenes de los resultados de las determinaciones realizadas *in vitro* para los aislamientos de *Trichoderma*.

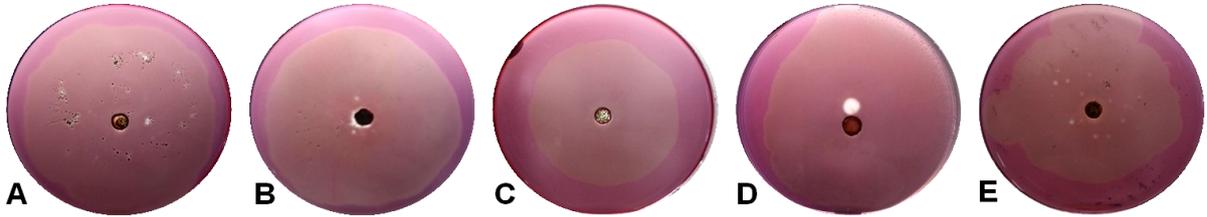


Figura A.4.1. Imágenes representativas del resultado de la determinación de celulasas. A. *T. asperelloides* LBM 193, B. *T. asperellum* LBM 199, C. *T. hamatum* LBM 200, D. *Trichoderma* sp. LBM 202, E. *T. strigosellum* LBM 205.

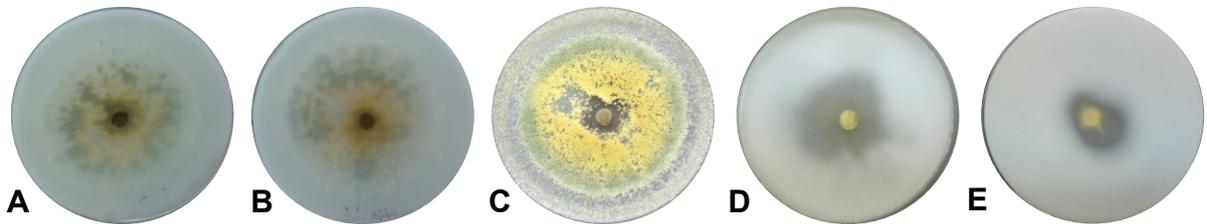


Figura A.4.2. Imágenes representativas del resultado de la determinación de proteasas. A. *T. asperelloides* LBM 206, B. *T. asperellum* LBM 203, C. *T. hamatum* LBM 200, D. *Trichoderma* sp. LBM 202, E. *T. strigosellum* LBM 205.

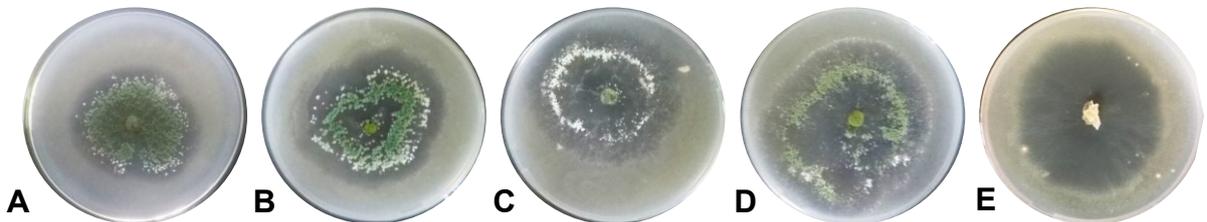


Figura A.4.3. Imágenes representativas del resultado de la determinación de quitinasas con quitina coloidal. A. *T. asperelloides* LBM 198, B. *T. asperellum* LBM 199, C. *T. hamatum* LBM 200, D. *Trichoderma* sp. LBM 202, E. *T. strigosellum* LBM 201.

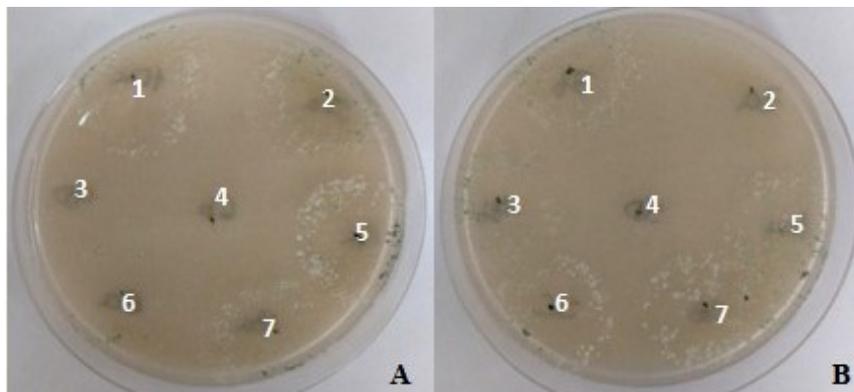


Figura A.4.4. Imágenes del resultado de la determinación de quitinasas en medio con quitina no coloidal. A. 1: *T. asperelloides* LBM 206, 2: *T. asperelloides* LBM 198, 3: *T. strigosellum* LBM 205, 4: *T. strigosellum* LBM 201,

5: *T. asperellum* LBM 203, 6: *Trichoderma sp.* LBM 202, 7: *T. asperelloides* LBM 193. **B.** 1: *T. asperelloides* LBM 197, 2: *T. strigosellum* LBM 196, 3: *T. asperelloides* LBM 194, 4: *T. hamatum* LBM 200, 5: *T. asperelloides* LBM 195, 6: *T. asperellum* LBM 199, 7: *T. asperelloides* LBM 204.

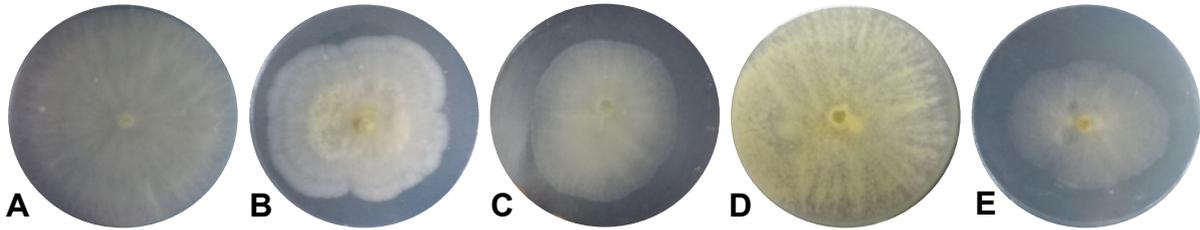


Figura A.4.5. Imágenes representativas del resultado de la determinación de lipasas. A. *T. asperelloides* LBM 195, B. *T. asperellum* LBM 199, C. *T. hamatum* LBM 200, D. *T. reeseii* LBM 202 y E. *T. strigosellum* LBM 205.

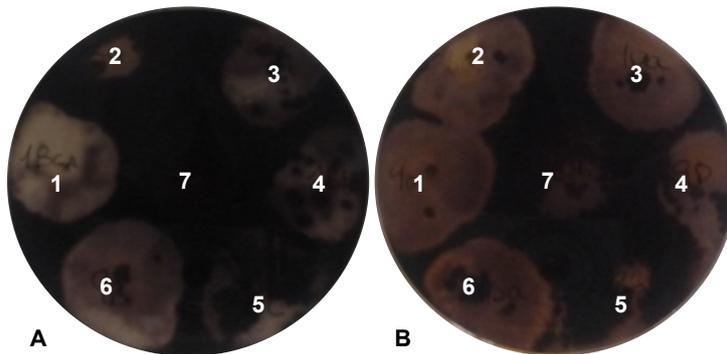


Figura A.4.6. Imágenes del resultado de la determinación de amilasas. A. 1 LBM 195, 2 LBM 196, 3 LBM 197, 4 LBM 194, 5 LBM 199, 6 LBM 204 y 7 LBM 200 B. 1 LBM 203, 2 LBM 198, 3 LBM 206, 4 LBM 205, 5 LBM 202, 6 LBM 193 y 7 LBM 201.

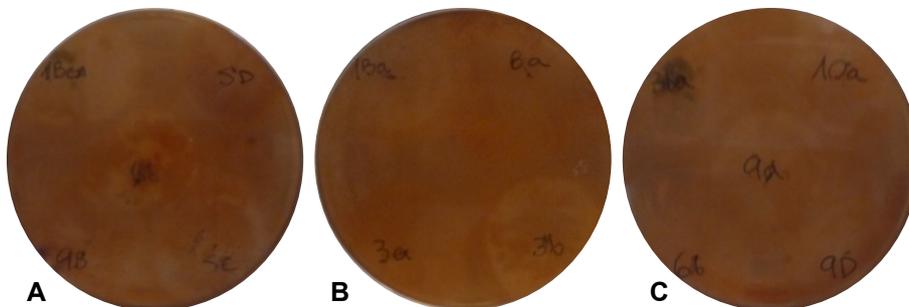


Figura A.4.7. Imágenes del resultado de la determinación de pectinasas. A. 1Ba LBM 195, 5D LBM 200, 5C LBM 199, 9B LBM 204 y 1Bb (medio) LBM 194 B. 1Ba LBM 193, 8a LBM 202, 3B LBM 197 y 3A LBM 196 B. 3Ba LBM 198, 10A LBM 206, 9D LBM 205, 6B LBM 201 y 9a LBM 203.

4.5.2 Curva de calibración de las determinaciones cuantitativas de actividades enzimáticas y auxinas

4.5.2.1 Actividad β -1,3-glucanasa

En la figura A.4.8 se muestra la curva de calibración utilizada para la determinación de la actividad β -1,3-glucanasa. Con esta curva de calibración se logró obtener la ecuación de la recta que nos permitió calcular la concentración de glucosa utilizando los valores de absorbancia de las muestras y luego, calcular la actividad β -1,3-glucanasa.

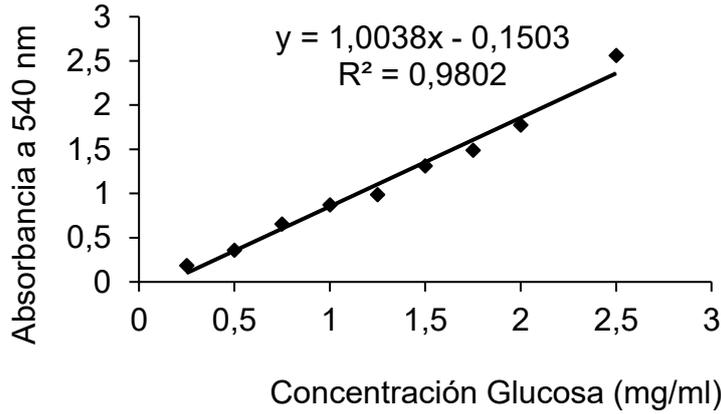


Figura A.4.8. Curva de calibración para la determinación de la actividad enzimática de β-1,3-glucanasas.

4.5.2.2 Actividad quitinasa

En la Figura A.4.9 se observa la recta obtenida a partir de los resultados de absorbancia a diferentes concentraciones de N-acetilglucosamina (NAG). La ecuación de la recta nos permitió calcular la concentración de NAG para cada una de las muestras utilizadas en esta determinación.

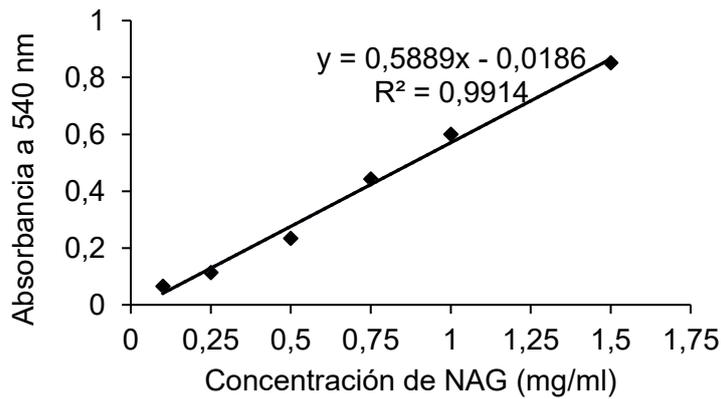


Figura A.4.9. Curva de calibración para la determinación de la actividad quitinasa.

4.5.2.3 Actividad celulasa

En la figura A.4.10 se muestra la recta y la ecuación obtenida para determinar la concentración de glucosa de las muestras. La curva de calibración se realizó utilizando como patrón diferentes concentraciones de glucosa.

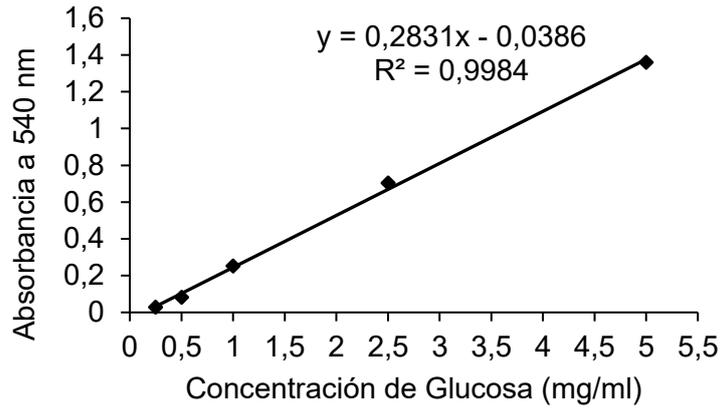


Figura A.4.10. Curva de calibración para la determinación de la actividad celulasa.

4.5.2.4 Actividad endoglucanasa

En la figura A.4.11 se observa la recta obtenida a partir de los resultados de absorbancia a diferentes concentraciones de glucosa. La ecuación de la recta nos permitió calcular la concentración de glucosa para cada muestra.

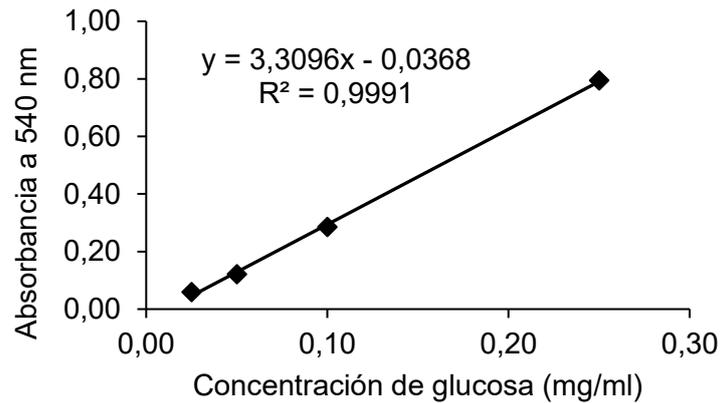


Figura A.4.11. Curva de calibración para la determinación de actividad endoglucanasa.

4.5.2.5 Determinación cuantitativa de auxinas y/o análogos

En la Figura A.4.12 se observan los valores de absorbancia a 530 nm según las diferentes concentraciones de AIA para las *Trichoderma* spp. La ecuación de la recta nos permitió calcular la concentración de AIA, y así estimar la cantidad de auxinas producidas por las *Trichoderma* spp.

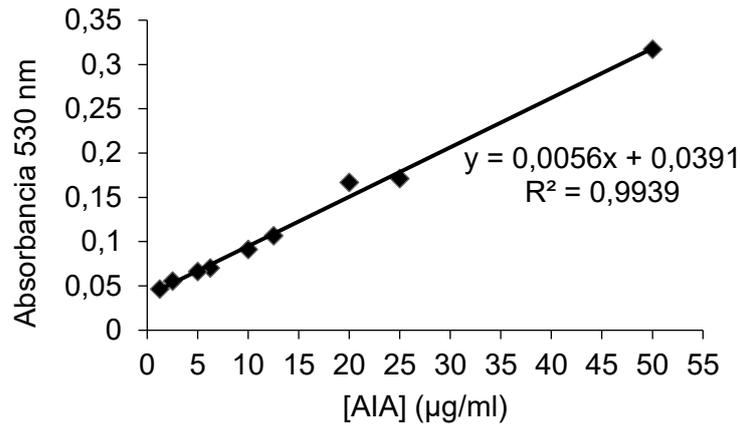


Figura A.4.12. Curva de calibración para la determinación cuantitativa de auxinas utilizando como patrón AIA.

4.5.3 Determinación de producción de sideróforos y de solubilización de compuestos insolubles de fósforo

A continuación, se muestran imágenes representativas de los resultados de las determinaciones de producción de sideróforos y de solubilización de compuestos insolubles de fósforo para los aislamientos de *Trichoderma*.

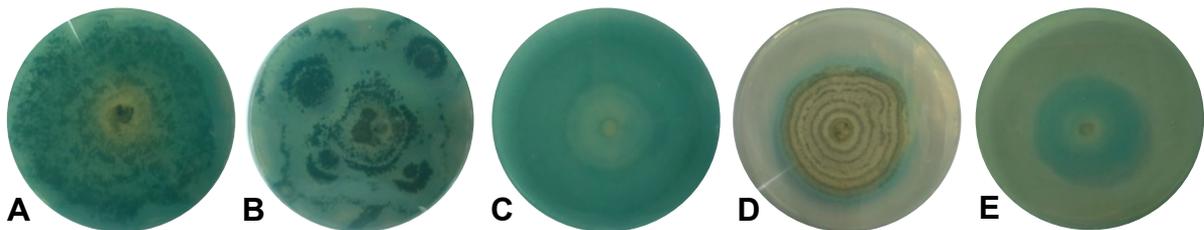


Figura A.4.13. Imágenes representativas del resultado de la determinación de sideróforos en medio CAS. A. *T. asperelloides* LBM 193, B. *T. asperellum* LBM 199, C. *T. hamatum* LBM 200, D. *Trichoderma* sp. LBM 202, E. *T. strigosellum* LBM 196.

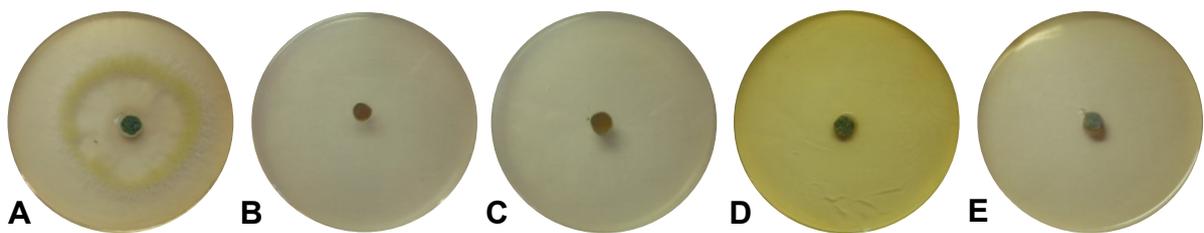


Figura A.4.14. Imágenes representativas del resultado de la determinación de sideróforos en medio con 8HQ. A. *T. asperelloides* LBM 206, B. *T. asperellum* LBM 199, C. *T. hamatum* LBM 200, D. *Trichoderma* sp. LBM 202, E. *T. strigosellum* LBM 205.

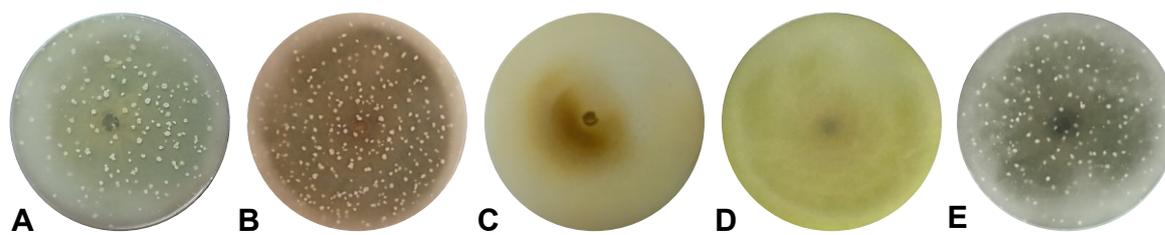


Figura A.4.15. Imágenes representativas del resultado de la determinación de solubilizadores de compuestos insolubles de fósforo. A. *T. asperelloides* LBM 195, B. *T. asperellum* LBM 203, C. *T. hamatum* LBM 200, D. *Trichoderma* sp. LBM 202 E. *T. strigosellum* LBM 205.

ANEXO 5

5.5.1 Transferencia del formulado de *Trichoderma* a productor independiente en yerba mate

Los 4 formulados de *Trichoderma* seleccionados fueron entregados a un productor misionero de yerba mate para su aplicación en platas de yerba mate de su chacra ubicada en la localidad de Aristóbulo del Valle, Misiones (Figura A.5.1). Se les dieron indicaciones de cómo manipular el formulado y la forma de aplicación. Las inoculaciones se realizaron en tiempo y forma para poder llegar al año siguiente a la época de traspaso de las plantas a campo, por lo cual el productor utilizó el formulado según la necesidad de las plantas. Es de destacar que, si bien en un principio el productor trabajó con los 4 aislamientos de *Trichoderma* y realizó controles, luego de un tiempo de comenzadas las inoculaciones (6 meses), decidió utilizar el aislamiento *T. asperelloides* LBM 193₁, ya que las plantas mostraron mayor altura, vigor y mayor desarrollo de la parte aérea de la planta. Además, debido a la elevada cantidad de plantas y a la demanda del formulado para poder inocular todas las plantas, se le explicó cómo realizar la producción de *Trichoderma* de forma artesanal y se le cedió el LBM 193₁. Existió un trabajo en conjunto constante, actualmente el productor utiliza solamente el producto sólido de *T. asperelloides* LBM 193₁.

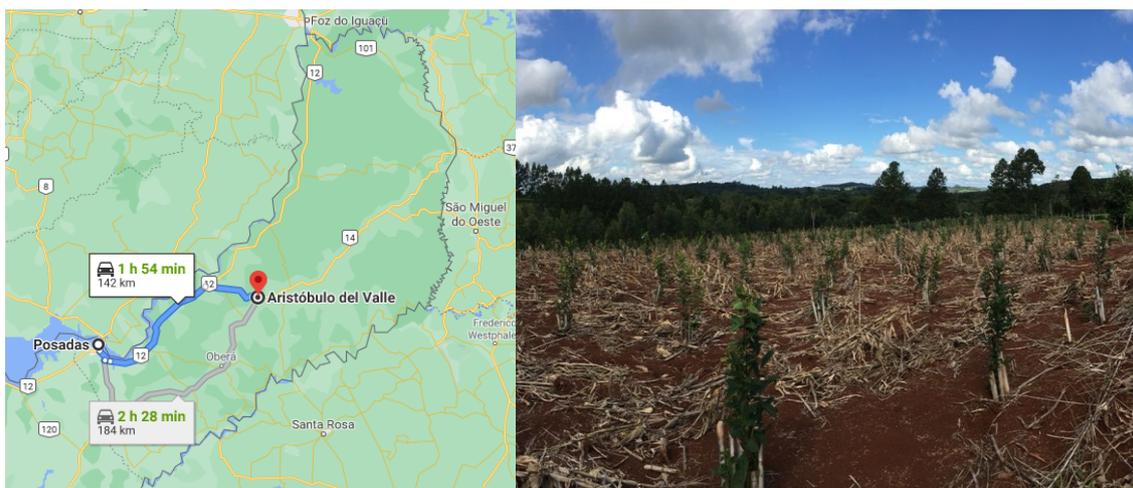


Figura A.5.1. A la izquierda se muestra la ubicación de Aristóbulo del Valle, Misiones. A la derecha se muestran plantaciones de yerba mate donde se llevó a cabo la inoculación.

Debido a que el productor no puede cosechar las plantas para su análisis en el laboratorio, a modo informativo, se realizó una serie de preguntas con el fin de recaudar datos que sean relevantes para futuros ensayos. La encuesta nos permitirá determinar si el formulado utilizado fue capaz de promover el crecimiento vegetal en plantas de yerba mate en etapas previas al trasplante y a campo. La idea final de estas preguntas, es poder utilizar los datos aportados por el productor para poder ajustar la producción de *Trichoderma* para futuros ensayos, así como también, enriquecer los lazos científico-tecnológicos y las actividades de transferencia al sector yerbatero y, además, se espera encontrar un producto amigable y acorde a las necesidades de los productores yerbateros locales.

Encuesta al realizada al productor:

1. ¿Cuántas hectáreas de cultivo de yerba tiene?

Diez hectáreas.

2. ¿Qué producto comercial o qué prácticas realizaba al cultivo antes de utilizar el producto sólido de *Trichoderma*?

Utilizaba abono con nitrógeno y potasio (YPF) suelo seco y/o abono orgánico (compost), además de fertilizante líquido aplicado sobre las hojas (nitrofosca).

3. ¿Cómo aplicó el formulado de *Trichoderma*? ¿Resultó sencilla su preparación y aplicación?

El formulado se aplicó como polvo al principio y cuando se terminó, se agregó el grano de arroz colonizado, ya que la producción del formulado estaba a cargo del productor y no contaba con equipamiento para realizar la molienda. Siempre fue aplicado sobre el suelo, tapado de la luz solar. En las plantas que se encontraban en tubetes y en las plantas en el campo, se inoculó a 10 cm y a 50 cm de profundidad en el suelo cerca del tal, respectivamente.

La preparación y aplicación del producto resultó sencilla. Excepto por el tiempo de producción del cultivo del hongo en arroz que fue de 15 a 20 días.

4. ¿Cuántas veces aplicó el formulado a las plantas de yerba mate?

Fue aplicado tres veces en dos años. La primera aplicación fue al momento del trasplante a campo y luego cada seis meses.

5. ¿Observó cambios con respecto a las prácticas que utilizaba antes de utilizar el formulado?

Sí, se observó que las plantas aumentaron su velocidad de crecimiento; los brotes duplicaron su tamaño (más grandes que lo normal) y presentaron una mayor altura. En los yerbales adultos, se observó un mayor rendimiento en cantidad de kilogramos por cosecha en comparación a los productos que se utilizaban antes. También se observó, que el aspecto general de las plantas mejoró, presentaron menos ataque por insectos, patógenos, entre otros.

6. Algunas otras observaciones y/o comentarios acerca del formulado y sus efectos en los yerbales.

Se observó una mejor brotación de las plantas, hojas más grandes y verdes. En general, las plantas se desarrollaron mejor y mucho más rápido, lo que permitió realizar el trasplante de las plantas a campo antes de lo previsto.

Este trabajo realizado, nos permitió validar la efectividad como biofertilizante *in vivo* de *T. asperelloides* LBM 193₁ sobre plantas de yerba mate de diferentes edades. El productor notó diferencias en las plantas tratadas con LBM 193₁ en comparación a las plantas tratadas con los demás aislamientos y el control, y decidió utilizar sólo LBM 193₁. En plantas de un año inoculadas con LBM

193₁ notó que el trasplante a campo pudo realizarse 6 meses antes de lo previsto, debido a que las plantas crecieron a una velocidad mayor de la esperada.

Este ensayo, demostró una vez más la capacidad de LBM 193₁ para actuar como PGPM en plantas de yerba mate en etapas previas a campo y en esta etapa. Además, cabe destacar que el ensayo se realizó en una localidad diferente a la que fueron obtenidos los aislamientos de *Trichoderma*, donde las condiciones climáticas son similares pero la composición del suelo suele ser diferente, demostrando que LBM 193₁ es un microorganismo que se asocia eficientemente a la raíz del cultivo del cual fue aislado, sin importar el lugar geográfico del aislamiento. Estos resultados son prometedores y allanan el camino hacia futuros proyectos de extensión con productores yerbateros de diferentes localidades de Misiones y de la región.

Muchas veces, resulta difícil lograr la coordinación y la transferencia de un proyecto de investigación hacia diferentes sectores (agrícola, industria, entre otros), por lo general debido a la falta de acuerdo entre las distintas partes. Por esto, la finalidad de este ensayo fue poder realizar un trabajo de transferencia con un productor del sector yerbatero que conozca el formulado a base de *Trichoderma*, amigable con el medio ambiente, fácil de aplicar y producir por sus propios medios, así como los efectos benéficos sobre las plantas de yerba mate.

Como perspectiva a futuro, esperamos que este producto pueda ser aplicado en plantas de yerba mate en diferentes localidades de la provincia de Misiones y Corrientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aceves, A., Otero, M., Martínez, R., Rodríguez, N., Ariza, R., & Barrios, A. (2008). Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 14(2), 185–191.
- Adney, B., & Nrel, J. B. (1996). Measurement of cellulase activities, LAP-006NREL Analytical Procedure. In *Golden, CO, USA: National RenewableEnergy Laboratory*.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology* (Elsevier). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-047378-9.50017-8>
- Altomare, C., Norvell, W. A., Björkman, T., & Harman, G. E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 2926–2933.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402.
- Amerio, N. S., Castrillo, M. L., Bich, G. A., Zapata, P. D., & Villalba, L. L. (2020). *Trichoderma* en la Argentina: Estado del arte. *Ecología Austral*, 30, 113–124.
- Anisa, S. K., & Girish, K. (2014). Pectinolytic Activity of *Rhizopus* sp., and *Trichoderma viride*. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology*.
- Atanasova, L. (2014). Ecophysiology of *Trichoderma* in Genomic Perspective. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, 25–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00002-3>
- Aveskamp, M. M., Gruyter, J. De, Woudenberg, J. H. C., Verkley, G. J. M., & Crous, P. W. (2010). Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*, 65, 1–60. <https://doi.org/10.3114/sim.2010.65.01>
- B. Martínez, Infante, D., & Belkis Peteira. (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Revista de Protección Vegetal*, 30(5), 11–22.
- Bader, A. N., Salerno, G. L., Covacevich, F., & Consolo, V. F. (2020). *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization , promote growth and control wilt disease on tomato (*Solanum lycopersicum* L .). *Journal of King Saud University - Science*, 32(1), 867–873. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.04.002>
- Bader, N., Salerno, G. L., Covacevich, F., & Consolo, F. (2020). Bioformulación de *Trichoderma harzianum* en sustrato sólido y efectos de su aplicación sobre plantas de pimiento. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 119, 1–9.
- Bae, H., Sicher, R. C., Kim, M. S., Kim, S. H., Strem, M. D., Melnick, R. L., & Bailey, B. A. (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, 60(11), 3279–3295. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp165>
- Balatti, P., Larran, S., Malbran, I., Mónaco, C., Mourellos, C., Perello, A., Rolleri, J., Sisterna, M., & Stocco, M. (2019). *Curso de Fitopatología - Guía de Trabajos Prácticos*.
- Balzarini, M. G., Gonzalez, L. A., Tablada, E. M., Casanoves, F., Rienzo, J. A. Di, & Robledo, C. W. (2008). InfoStat, versión 2008. Manual de Usuario. In *Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, Editorial Brujas Argentina*. (Issue January).
- Bamisile, B. S., Dash, C. K., Akutse, K. S., Keppanan, R., & Wang, L. (2018). Fungal Endophytes : Beyond Herbivore Management. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00544>
- Bara, M. T. ., Lima, A. L., & Ulhoa, C. J. (2003). Purification and characterization of an exo- β -1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiology Letters*, 219, 81–85. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01191-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01191-6)
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi* (APS Press).
- Bashan, Y., De-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant Soil*, 378, 1–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4), 249–260. <https://doi.org/10.2436/im.v7i4.9480>

- Bergottini, V. (2015). Assessing the role of native Plant Growth- Promoting Rhizobacteria as bio-inoculants for Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*). <http://doc.rero.ch/record/261276/files/00002466.pdf>
- Bergottini, V. M., Otegui, M. B., Sosa, D. A., Zapata, P. D., Mulot, M., Rebord, M., Zopfi, J., Wiss, F., Benrey, B., & Junier, P. (2015). Bio-inoculation of yerba mate seedlings (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) with native plant growth-promoting rhizobacteria: a sustainable alternative to improve crop yield. *Biology and Fertility of Soils*, 51(6), 749–755. <https://doi.org/10.1007/s00374-015-1012-5>
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K., & Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(3), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>
- Bissett, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, 69.
- Błaszczak, L., Popiel, D., Chetkowski, J., Koczyk, G., Samuels, G. J., Sobieralski, K., & Siwulski, M. (2011). Species diversity of *Trichoderma* in Poland. *Journal of Applied Genetics*, 52(2), 233–243. <https://doi.org/10.1007/s13353-011-0039-z>
- Błaszczak, L., Siwulski, M., Sobieralski, K., Lisiecka, J., & Jędrzycka, M. (2014). *Trichoderma* spp. - Application and prospects for use in organic farming and industry. *Journal of Plant Protection Research*, 54(4), 309–317. <https://doi.org/10.2478/jppr-2014-0047>
- Bóffano Chebataroff, A., & Mosqueira Campos, M. A. (2012). EVALUACIÓN DE LA REPUESTA DE CINCO DIFERENTES HÍBRIDOS DE *Eucalyptus grandis*, CON *Trichoderma harzianum* Y QUITOSANO EN VIVERO Y PLANTACIÓN. UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA FACULTAD DE AGRONOMÍA.
- Bolívar-Anillo, H., Garrido, C., & Collado, I. G. (2020). Endophytic microorganisms for biocontrol of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Phytochem Rev*, 19, 721–740. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09603-5>
- Bridge, P. D., Spooner, B. M., & Roberts, P. J. (2005). The Impact of Molecular Data in Fungal Systematics. *Advances in Botanical Research*, 42(04). [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(04\)42002-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(04)42002-3)
- Buduba, B. C. (2011). Mutagénesis y antimutagénesis en extractos acuosos, clorofórmicos y acetónicos de *Ilex paraguariensis* var . *paraguariensis* e *Ilex dumosa* var . *dumosa*.
- Burtnik, O. J. (2006). Yerba mate : Manual de producción. INTA – Agencia de Extensión Rural Santo Tomé - Corrientes, 03756, 1–52.
- Cabrera, M. G. (2015). Hongos fitopatógenos. Anamorfos I. *Curso de Posgrado Hongos Fitopatógenos.*, 30.
- Cai, F., & Druzhinina, I. S. (2021). In honor of John Bissett : authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. In *Fungal Diversity* (Issue 0123456789). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00464-4>
- Cano, J., Guarro, J., & Gene, J. (2004). Molecular and Morphological Identification of *Colletotrichum* Species of Clinical Interest. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6), 2450–2454. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2450>
- Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), 15–31. <https://doi.org/10.31910/rudca.v14.n2.2011.771>
- Capellari, P. B., Burgos, A. M., Cabrera, M. G., Dalurzo, H. C., Dávalos, M., Dirchwolf, P., Dolce, N. R., Fediuk, A., Holowaty, S. A., Llera, V., Maiocchi, M., Medina, R. D., Molina, S. P., Pinto Ruiz, G., Mayol, M., Tarragó, J., & Yacovich, M. (2017). YERBA MATE. Reseña Histórica y Estadística. Producción e industrialización en el siglo XXI (R. D. Medina & E. Al. (eds.); Conshéjo, Vol. 1).
- Carvalho, V. G. (2008). COMUNIDADES DE FUNGOS EM SOLO DO CERRADO SOB VEGETAÇÃO NATIVA E SOB CULTIVO DE SOJA E ALGODÃO.
- Chagas, L. F. B., Chagas Junior, A. F., & Castro, H. G. de. (2017). PHOSPHATE SOLUBILIZATION CAPACITY AND INDOLE ACETIC ACID PRODUCTION BY *Trichoderma* STRAINS FOR BIOMASS INCREASE ON BASIL AND MINT PLANTS. *BRAZILIAN JOURNAL OF AGRICULTURE - Revista de Agricultura*, 92(2), 176. <https://doi.org/10.37856/bja.v92i2.3221>
- Chalie-u, R., & Jakhar, S. R. (2018). Prospects of *Trichoderma* in Agriculture-Fundamentals and Applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(06), 3519–3527. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.706.413>

- Chaverri, P., Gazis, R. O., & Samuels, G. J. (2011). *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. *Mycologia*, *103*(1), 139–151. <https://doi.org/10.3852/10-078>
- Chaverri, P., & Samuels, G. J. (2003). *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. *Studies in Mycology*, *2003*(48), 1–113.
- Chávez-garcía, M., Montaña-lara, J. S., Martínez-salgado, M. M., Mercado-Reyes, M., Rodríguez, M. X., & Quevedo-Hidalgo, B. (2009). Efecto del sustrato y la exposición a la luz en la producción de una cepa de *Trichoderma* sp. *Universitas Scientiarum*, *13*(3), 245–251.
- Chen, Q., Jiang, J., Chang, G., Cai, L., & Crous, P. (2015). Resolving the *Phoma* enigma. *Studies in Mycology*, *82*, 137–217. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.003>
- Collavino, M. M., Sansberro, P. A., Mroginski, L. A., & Aguilar, O. M. (2010). Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biol Fertil Soils*, *46*, 727–738. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0480-x>
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, *42*(5), 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome : Ecology , functions , and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, *19*, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- Consolo, C., Mónaco, C. I., Cordo, C. A., & Salerno, G. L. (2012). Characterization of novel *Trichoderma* spp . isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. *World J Microbiol Biotechnol*, *1389–1398*. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0938-5>
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Beltrán-Peña, E., Herrera-Estrella, A., & López-Bucio, J. (2011). *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal- and camalexin-independent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Signaling and Behavior*, *6*(10), 1554–1563. <https://doi.org/10.4161/psb.6.10.17443>
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., & López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *arabidopsis*. *Plant Physiology*, *149*(3), 1579–1592. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130369>
- Córdoba, M., Bruno, C., M, B., & Costa, J. L. (2012). Análisis de componentes principales con datos georreferenciados An application in precision agriculture. *Rev. FCA UNCUYO*, *44*(1), 27–39.
- Covacevich, F., & Consolo, F. (2014). *Manual de protocolos, Herramientas para el estudio y manipulación de Hongos Micorrícicos Arbusculares y Trichoderma*.
- Crespo, J. M., Boiardi, J. L., & Luna, M. F. (2011). Mineral phosphate solubilization activity of *gluconacetobacter diazotrophicus* under P-limitation and plant root environment. *Agricultural Sciences*, *2*(1), 16–22. <https://doi.org/10.4236/as.2011.21003>
- Cubilla-ríos, A. A., Ruíz-díaz-mendoza, D. D., & Romero-rodríguez, M. C. (2019). Antibiosis de proteínas y metabolitos en especies de *Trichoderma* contra Antibiosis of proteins and metabolites of three species of *Trichoderma* against paraguayana isolates of *Macrophomina phaseolina* Resumen. *Agron. Mesoam.*, *30*(1), 63–77. <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.34423>
- Cubillos-Hinojosa, J., Valero, N., & Mejía, L. (2009). *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var . *flavicarpa* Degener). *Agronomía Colombiana*, *27*(1), 81–86. <http://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/11363/37730>
- Cumagun, C. J. R. (2014). Advances in Formulation of *Trichoderma* for Biocontrol. In *Biotechnology and Biology of Trichoderma* (Issue 3, pp. 527–531). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00039-4>
- Cummings, N. J., Ambrose, A., Braithwaite, M., Bissett, J., Roslan, H. A., Abdullah, J., Stewart, A., Agbayani, F. V., Steyaert, J., & Hill, R. A. (2016). Diversity of root-endophytic *Trichoderma* from Malaysian Borneo. *Mycological Progress*, *15*(5). <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1192-x>

- Darby, J., Edzel, T., Jennelyn, E., Rodel, B., & Balendres, M. A. (2020). Pathogenicity of *Epicoccum sorghinum* towards dragon fruits (*Hylocereus* species) and in vitro evaluation of chemicals with antifungal activity. *Journal of Phytopathology*, 1–8. <https://doi.org/10.1111/jph.12893>
- Deb, P., Talukdar, S. A., Mohsina, K., Sarker, P. K., & Sayem, S. M. A. (2013). Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *SpringerPlus*, 2(154), 1–12.
- Dellacassa, E., Cesio, V., Vázquez, A., Echeverry, S., Soule, S., Menéndez, P., Ferreira, F., & Heinzen, H. (2007). Yerba mate. Historia, uso y propiedades. *Rev. Asoc. Quím. Farm. Uruguay*, 51, 16–20.
- Dou, K., Lu, Z., Wu, Q., Ni, M., Yu, C., & Wang, M. (2018). A novel polyphasic identification system for genus *Trichoderma*. *BioRxiv*.
- Dou, K., Lu, Z., Wu, Q., Ni, M., Yu, C., Wang, M., Li, X., Xie, H., Chen, J., & C. Zhang. (2020). MIST : A multiloci identification system for *Trichoderma*. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.01532-20>
- Druzhinina, I., & Kubicek, C. P. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: From aggregate species to species clusters. *Journal of Zhejiang University: Science*, 6 B(2), 100–112. <https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B0100>
- Dyer, P. S., & Kück, U. (2017). Sex and the Imperfect Fungi. In *The Fungal Kingdom* (pp. 193–214). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0043-2017>
- Esaú López-Jácome, L., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología*. 3. www.medigraphic.org.mx
- FAO. (2015). *Construyendo una visión común para la agricultura y alimentación* (FAO).
- Fletcher, J., Barnaby, N. G., Burans, J., Melcher, U., Luster, D. G., Nutter, F. W., Scherm, H., Schmale, D. G., Thomas, C. S., & Corona, F. M. O. (2020). Forensic plant pathology. In *Microbial Forensics* (pp. 49–70). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815379-6.00005-2>
- Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 337–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>
- Gaiero, J. R., McCall, C. A., Thompson, K. A., Day, N. J., Best, A. S., & Dunfield, K. E. (2013). INSIDE THE ROOT MICROBIOME: BACTERIAL ROOT ENDOPHYTES AND PLANT GROWTH PROMOTION. *American Journal of Botany*, 100(9), 1738–1750. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200572>
- Gao, F., Dai, C., & Liu, X. (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 4(13), 1346–1351.
- Giberti, G. C. (2011). La “yerba mate” (*Ilex paraguariensis*, Aquifoliaceae) en tempranos escritos rioplatenses de Bonpland y su real distribución geográfica en Sudamérica austral. *Bonplandia*, 20(2), 203–212.
- Gil Rivero, A. E., López Medina, S. E., & López Zavaleta, A. (2017). Aclimatación de plántulas in vitro de *Saintpaulia ionantha* H . Wendl . (Gesneriaceae) “ violeta africana ” a condiciones de invernadero Acclimation of in vitro seedlings of *Saintpaulia ionantha* H . Wendl . (Gesneriaceae) “ African violet ” to greenho. *Arnaldoa*, 24(1), 343–350.
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria : Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 15.
- Gonçalves Ribeiro, J., Ribeiro De Sousa Serra, I. M., & Peixoto Araújo, M. U. (2016). Uso de produtos naturais no controle de antracnose causado por *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. *Summa Phytopathol.*, 42(2), 160–164.
- Granero, C. M., Hinojosa, C. P., Flores, G. M., Pérez-Madero, L. N., & Guerrero, L. J. (n.d.). *Protocolo para la evaluación de la calidad del ADN obtenido de muestras biológicas para su uso en diagnóstico e investigación biomédica*. <http://fisabio.san.gva.es/documents/10157/5fcfee6c-0f1d-4e59-9237-cb287a08ec1f>
- Gravel, V., Antoun, H., & Tweddell, R. J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), 1968–1977. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.02.015>
- Grosch, R., Scherwinski, K., Lottmann, J., & Berg, G. (2006). Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community. *Mycological Research*, 110(12),

1464–1474. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.09.014>

- Guarro, J., Gené, J., & Stchigel, A. M. (1999). Developments in fungal taxonomy. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 12, Issue 3). <https://doi.org/10.1128/cmr.12.3.454>
- Guzmán-Guzmán, P., Porras-Troncoso, M. D., Olmedo-Monfil, V., & Herrera-Estrella, A. (2019). Trichoderma species: Versatile plant symbionts. *Phytopathology*, *109*(1), 6–16. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW>
- Hageskal, G., Vrålstad, T., Knutsen, A. K., & Skaar, I. (2008). Exploring the species diversity of Trichoderma in Norwegian drinking water systems by DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, *8*(6), 1178–1188. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02280.x>
- Hanada, R. E., de Jorge Souza, T., Pomella, A. W. V., Hebbar, K. P., Pereira, J. O., Ismaiel, A., & Samuels, G. J. (2008). Trichoderma martiale sp. nov., a new endophyte from sapwood of Theobroma cacao with a potential for biological control. *Mycological Research*, *112*(11), 1335–1343. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.06.022>
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., & Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *79*(3), 293–320. <https://doi.org/10.1128/mubr.00050-14>
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). Trichoderma species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(1), 43–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Harper, L. A., Derbyshire, M. C., & Lopez-Ruiz, F. J. (2019). Identification and characterization of Botrytis medusae, a novel cryptic species causing grey mould on wine grapes in Australia. *Plant Pathology*, *68*(5), 939–953. <https://doi.org/10.1111/ppa.13005>
- Heck, C. I., & De Mejia, E. G. (2007). Yerba mate tea (Ilex paraguariensis): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*, *72*(9). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x>
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of Trichoderma and of its genes. *Microbiology*, *158*(1), 17–25. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052274-0>
- Hernández-Melchor, D. C., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). Revisión Trichoderma : IMPORTANCIA AGRÍCOLA , BIOTECNOLÓGICA , Y SISTEMAS DE FERMENTACIÓN PARA PRODUCIR BIOMASA Y ENZIMAS DE INTERÉS INDUSTRIAL. *Chilean J. Agric. Anim. Sci.*, *35*(1), 98–112.
- Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). Revisión Trichoderma : IMPORTANCIA AGRÍCOLA , BIOTECNOLÓGICA , Y SISTEMAS DE FERMENTACIÓN PARA PRODUCIR BIOMASA Y ENZIMAS DE INTERÉS INDUSTRIAL Review Trichoderma : AGRICULTURAL AND BIOTECHNOLOGICAL IMPORTANCE , AND FERMENTATION SYSTEMS FOR PRODUCING BIOM. *Chilean J. Agric. Anim. Sci.*, *35*(1), 98–112.
- Hernández, J. M., Romero, M. G., Becerra, C. V., & Parra, E. A. (2016). Variación de la distribución de carbono entre la raíz y la parte aérea en tres especies de pino. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, *7*(38), 59–66.
- Holmes, S. (2003). Bootstrapping Phylogenetic Trees : Theory and Methods. *Statistical Science*, *18*(2), 241–255.
- Horbach, R., Navarro-Quesada, A. R., Knogge, W., & Deising, H. B. (2011). When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology*, *168*(1), 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.06.014>
- Horta Crivelente, M. A., Filho Ferreira, J. A., Murad, N. F., de Oliveira Santos, E., Aparecido dos Santos, C., Sales Mendes, J., Mendes Brandão, M., Azzoni, S. F., & Pereira de Souza, A. (2018). Network of proteins , enzymes and genes linked to biomass degradation shared by Trichoderma species. *Scientific Reports*, *8*(1341), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19671-w>
- Hossain, M. M., Sultana, F., & Islam, S. (2017). Plant Growth-Promoting Fungi (PGPF): Phytostimulation and Induced Systemic Resistance. In *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological* (pp. 135–191).
- Howe, T. G. B., & Ward, J. M. (1976). The utilization of tween 80 as carbon source by Pseudomonas. *Journal of General Microbiology*, *92*(1), 234–235. <https://doi.org/10.1099/00221287-92-1-234>
- Hoyos-Carvajal, Liliana, Orduz, S., & Bissett, J. (2009). Growth stimulation in bean (Phaseolus vulgaris L.) by Trichoderma. *Biological Control*, *51*(3), 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.07.018>

- Hoyos-Carvajal, Lilliana, & Bissett, J. (2011). Biodiversity of Trichoderma in Neotropics. In O. Grillo & G. Venora (Eds.), *The dynamical processes of biodiversity – case studies of evolution and spatial distribution* (Intech, Vol. 1, p. 13). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.12.014>
- Hoyos-Carvajal, Lilliana, Orduz, S., & Bissett, J. (2009). Genetic and metabolic biodiversity of Trichoderma from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genetics and Biology*, 46(9), 615–631. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.04.006>
- Imathiu, S. M., Ray, R. V, Back, M., Hare, M. C., & Edwards, S. G. (2009). Fusarium langsethiae pathogenicity and aggressiveness towards oats and wheat in wounded and unwounded in vitro detached leaf assays. *Eur J Plant Pathol* (2009), 124, 117–126. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9398-7>
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de Trichoderma frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.*, 24(1), 14–21.
- Jangir, M., Pathak, R., & Sharma, S. (2017). Trichoderma and Its Potential Applications. In D. P. Singh (Ed.), *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological* (Springer, pp. 323–339).
- Kotasthane, A. S., Agrawal, T., Waris, N., & Singh, Z. U. S. (2017). Identification of siderophore producing and cynogenic fluorescent Pseudomonas and a simple confrontation assay to identify potential bio-control agent for collar rot of chickpea. *3 Biotech*, 7(2), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0761-2>
- Kredics, L., Chen, L., Kedves, O., Büchner, R., Hatvani, L., Allaga, H., Nagy, V. D., Khaled, J. M., Alharbi, N. S., & Vágvölgyi, C. (2018). Molecular tools for monitoring Trichoderma in agricultural environments. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01599>
- Kredics, L., Hatvani, L., Naeimi, S., Körmöczy, P., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., & Druzhinina, I. (2014). Biodiversity of the Genus Hypocrea/Trichoderma in Different Habitats. In *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00001-1>
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2012). DNA Barcodes : Methods and Protocols. In *Methods in MOlecular Biology* (pp. 3–8). <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6>
- Kubicek, C. P., & Harman, G. E. (1998). *Trichoderma and Gliocladium* (C. P. Kubicek & G. E. Harman (eds.); Taylor & F, Vol. 1).
- Kubicek, C. P., Herrera-estrella, A., Seidl-seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-flores, S., Horwitz, B. A., Mukherjee, P. K., Mukherjee, M., Kredics, L., Alcaraz, L. D., Aerts, A., Antal, Z., Atanasova, L., Cervantes-badillo, M. G., Challacombe, J., Chertkov, O., ... Grigoriev, I. V. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of Trichoderma. *Genome Biology*, 12, 1–15.
- Kubicek, C. P., Steindorff, A. S., Chenthamara, K., Manganiello, G., Henrissat, B., Zhang, J., Cai, F., Kopchinskiy, A. G., Kubicek, E. M., Kuo, A., Baroncelli, R., Sarrocco, S., Noronha, E. F., Vannacci, G., Shen, Q., Grigoriev, I. V., & Druzhinina, I. S. (2019). Evolution and comparative genomics of the most common Trichoderma species. *BMC Genomics*, 20(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5680-7>
- Kullnig, C., Szakacs, G., & Kubicek, C. P. (2000). Molecular identification of Trichoderma species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycological Research*, 104(9), 1117–1125. <https://doi.org/10.1017/S0953756200002604>
- Kumar, D., Maurya, N., Bharati, Y. K., Kumar, A., Srivastava, K., Chand, G., Kushwaha, C., Singh, S. K., Michra, R. K., & Kumar, A. (2014). Alternaria blight of oilseed Brassicas : A comprehensive review. *African Journal of Microbiology Research*, 8(30), 2816–2829. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6434>
- Kumar, Sanjeev, Thakur, M., & Rani, A. (2014). Trichoderma : Mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases. *African Journal of Agricultural Research*, 9(53), 3838–3852. <https://doi.org/10.5897/AJAR2014>.
- Kumar, Sudhir, Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7 . 0 for Bigger Datasets. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kvaček, Z., Teodoridis, V., & Wang, Q. (2009). Ilex geissertii sp. n. (Aquifoliaceae), a fossil ancestor of Ilex sect. Ilex in the upper Miocene and Pliocene of Europe. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 157(3–4), 192–210. <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2009.04.011>

- Laczeski, M. E., Onetto, A. L., Cortese, I. J., & Gisela, Y. (2020). Isolation and selection of endophytic spore-forming bacteria with plant growth promoting properties isolated from *Ilex paraguariensis* St. Hil. (yerba mate). *An Acad Bras Cienc*, 92, 1–20. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020181381>
- Lagler, J. C. (2017). BIOINSUMOS : DISTINTAS PERCEPCIONES BIOLOGICAL INPUTS : DIFFERENT PERCEPTIONS MAKING FOCUS IN THE BIOLOGICAL FERTILIZATION. *Agronomía & Ambiente*, 37(1), 73–89.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., Mcwilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Lima, N. B., Conforto, C., Roca, M., & Gil, S. V. (2019). First Report of White Thread Blight Caused by *Ceratobasidium niltonsouzanum* on Yerba Mate in Argentina. *Plant Disease*, 8–10. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-19-1603-PDN>
- Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., Geraldine, A. M., Brandão, R. S., Monteiro, V. N., Júnior, M. L., Coelho, A. S. G., Ulhoa, C. J., & Silva, R. N. (2012). Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology*, 116(7), 815–824. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.04.015>
- López-Quintero, C. A., Atanasova, L., Franco-Molano, A. E., Gams, W., Komon-Zelazowska, M., Theelen, B., Müller, W. H., Boekhout, T., & Druzhinina, I. (2013). DNA barcoding survey of *Trichoderma* diversity in soil and litter of the Colombian lowland Amazonian rainforest reveals *Trichoderma strigosellum* Sp. Nov. and other species. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 104(5), 657–674. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9975-4>
- López Alcántara, Y. M. (2018). *Producción y formulación de Trichoderma asperellum para el manejo de patógenos de la raíz de caña de azúcar*.
- Louden, B. C., Haarmann, D., & Lynne, A. M. (2011). Tips and Tools Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *JOURNAL OF MICROBIOLOGY & BIOLOGY EDUCATION*, 12(1), 51–53. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v12i1.249>
- Lu, B., Druzhinina, I. S., Fallah, P., Chaverri, P., Gradinger, C., Kubicek, C. P., & Samuels, G. J. (2004). Hypocrea/*Trichoderma* species with pachybasium-like conidiophores: Teleomorphs for *T. minutisporum* and *T. polysporum* and their newly discovered relatives. *Mycologia*, 96(2), 310–342. <https://doi.org/10.1080/15572536.2005.11832980>
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541–556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- Maharachchikumbura, S.S.N., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., & Crous, P. W. (2014). *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, 79, 121–186. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.005>
- Maharachchikumbura, Sajeewa S N, Hyde, K. D., Jones, E. B. G., Mckenzie, E. H. C., Bhat, J. D., Dayarathne, M. C., & Huang, S. (2016). Families of Sordariomycetes. *Fungal Diversity*, 79, 1–317. <https://doi.org/10.1007/s13225-016-0369-6>
- Maidana Ojeda, M., Chamorro, N., Barzalá, M., & Fretes, E. (2016). Primer reporte de la mancha negra en yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) causada por *Calonectria sphaatulata* en Paraguay. *Investigación Agraria*, 18(2), 111–115. <https://doi.org/10.18004/investig.agrar.2016.diciembre.111-115>
- Manzo Sánchez, G., Canto Canché, B., & Kay, A. J. (2005). Hongos patógenos: enemigos versátiles. In *Ciencia*.
- Mari, M., Bertolini, P., & Pratella, G. C. (2003). Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 761–766.
- McNear Jr., D. (2013). The rizosphere - Roots, Soil and Everything In Between. 4(3):1. *Nature Education Knowledge*, 4(2).
- Mercader, G. M., Flores, S. Z., Vargas, G. G., & Von Stowasser, E. S. (2006). Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. *Bosque*, 27(2), 126–134. <https://doi.org/10.4067/s0717-92002006000200007>
- Montagnini, F., Eibl, B. I., & Barth, S. R. (2011). Organic Yerba Mate: an Environmentally, Socially and Financially Suitable Agroforestry System. *BOI S E T FORÊ T S DES TROP IQUES*, 308(2), 59–74.
- Moya, P., Barrera, V., Cipollone, J., Bedoya, C., Kohan, L., Toledo, A., & Sisterna, M. (2020). New isolates of *Trichoderma* spp. as biocontrol and plant growth-promoting agents in the pathosystem *Pyrenophora teres*-barley in Argentina. *Biological Control*, 141, 104152. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104152>

- Mulaw, T. B., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., & Atanasova, L. (2013). Novel Endophytic Trichoderma spp. Isolated from Healthy Coffea arabica Roots are Capable of Controlling Coffee Tracheomyces. *Diversity*, 5, 750–766. <https://doi.org/10.3390/d5040750>
- Ochoa, J. L., Hernández-Montiel, L. G., Latisnere-Barragán, H., León De La Luz, J. L., & Larralde-Corona, C. P. (2007). Isolation and identification of pathogenic fungi from orange Citrus sinensis L. Osbeck cultured in Baja California Sur, Mexico. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(5), 352–359. <https://doi.org/10.1080/11358120709487712>
- Pal, K. K., & McSpadden Gardener, B. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*, 1–25. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02.Biological>
- Panahian, G., Rahnama, K., & Jafari, M. (2015). Mass production of Trichoderma spp and application. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 3(2).
- Patwardhan, A., Ray, S., & Roy, A. (2014). Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 2(2). <https://doi.org/10.4172/2329-9002.1000131>
- Pérez, M. L. (2016). *Caracterización de microorganismos contaminantes en sistemas de micropropagación de yerba mate (Ilex paraguariensis)*.
- Pérez, M. L., Collavino, M. M., Sansberro, P. A., Mroginski, L. A., & Galdeano, E. (2016). Diversity of endophytic fungal and bacterial communities in Ilex paraguariensis grown under field conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(4), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2016-5>
- Pérez, S. R., Arone, M. A. C., Calzadillo, J. S., Rodríguez, I. A. A., & Serrat, M. J. (2016). Determinación de biomasa fúngica y su utilidad en procesos biotecnológicos. *AFINIDAD LXXIV*, 577, 60–67.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789–799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Pierre, J., Baret, P., & Serratrice, G. (2003). Hydroxyquinolines as Iron Chelators. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 1077–1084.
- Pimentel, I., Kuczkowski, F., Chime, M., & Auer, C. (2006). Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (Ilex paraguariensis A. St.-Hil.). *Floresta*, 36(1), 123–128.
- Piontelli. (2011). *Manual de microhongos filamentosos comunes I* (Escuela de).
- Poletto, I. (2010). *Caracterização E Manejo Do Patossistema*.
- Poletto, I., Brião Muniz, M. F., Ceconi, D. E., Deconto Weber, M. N., & Blume, E. (2007). Primeira ocorrência de Pythium sp. e Rhizoctonia sp. causando podridão-de-raízes em ervais no Rio Grande Do Sul. *Ciência Florestal, Santa Maria*, 17(1), 65–69.
- Prat Kricun, S. D. (2011). Compartiendo Tecnología. Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul. *Apuntes Sobre El Mejoramiento Genético De La Yerba Mate*, 1, 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Pretty, J. (2008). Agricultural sustainability : concepts , principles and evidence. *Phil.Trans. R. Soc.*, 363, 447–465. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2163>
- Qualhato, T. F., Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., Brandão, R. S., Jesuino, R. S. A., & Ulhoa, C. J. (2013). Mycoparasitism studies of Trichoderma species against three phytopathogenic fungi: Evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 35(9), 1461–1468. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1225-3>
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 80, 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Ramírez-Valdespino, C. A., Casas-Flores, S., & Olmedo-Monfil, V. (2019). Trichoderma as a model to study effector-like molecules. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01030>
- Rentería, V. (2011). *Producción de Trichoderma sp y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo*. <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis286.pdf>
- Richardson, A. E., Barea, J., McNeill, A. M., & Prigent-combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil*, 321, 305–339.

<https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2>

- Rolim Borges, L., Noemberg Lazzari, S. M., Chapaval Pimentel, I., & Xavier Vila Nova, M. (2011). Diversidade de fungos filamentosos em solo de monocultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Revista Acadêmica: Ciência Animal*, 9(2), 185–194. <https://doi.org/10.7213/cienciaanimal.v9i2.11786>
- Rossi, C., & Romero, G. (2010). EVALUACIÓN DE *Trichoderma harzianum* COMO AGENTE BIOPROMOTOR Y DE BIOCONTROL EN PLANTINES DE *Eucalyptus dunnii* MAIDEN . In *Jornada de Protección Forestal*.
- Rossmann, A. Y. R., Aime, M. C. A., Farr, D. F. F., Kastlebury, L. A. C., Kristin, R., Peterson, P., & Leahy, R. L. (2004). The coelomycetous genera *Chaetomella* and *Pilidium* represent a newly discovered lineage of inoperculate discomycetes. *Mycological Progress*, 3(4), 275–290.
- Rybak, M., Rybak, R., Cabrera, G., & Alvarez, R. (2014). *Enfermedades de yerba mate y té en Misiones y Norte de Corrientes*. 2 ed. (INTA EEA CERRO AZUL (ed.); 2 ed.). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Samuels, G. J. (2006). *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 96(2), 195–206. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0195>
- Samuels, G. J., & Ismaiel, A. (2009). *Trichoderma evansii* and *T. lieckfeldtii* : two new *T. hamatum* -like species. *Mycologia*, 101(1), 142–156. <https://doi.org/10.3852/08-161>
- Samuels, G. J., Ismaiel, A., Bon, M. C., De Respinois, S., & Petrini, O. (2010). *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia*, 102(4), 944–966. <https://doi.org/10.3852/09-243>
- Samuels, G. J., Ismaiel, A., Mular, T. B., Szakacs, G., Druzhinina, I., Kubicek, C. P., & Jaklitsch, W. M. (2012). The Longibrachiatum Clade of *Trichoderma* : a revision with new species. *Fungal Diversity*, 55, 77–108. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0152-2>
- Samuels, G. J., Lieckfeldt, E., & Nirenberg, H. I. (1999). *Trichoderma asperellum*, a new species with waited conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia*, 51(1), 71–88.
- Samuels, G. J., Suarez, C., Solis, K., Holmes, K. A., Thomas, S. E., Ismaiel, A., & Evans, H. C. (2006). *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America. *Mycological Research*, 110(4), 381–392. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.01.009>
- Sawant, I. S., Wadkar, P. N., Ghule, S. B., Salunkhe, V. P., & Chavan, V. (2020). Induction of systemic resistance in grapevines against powdery mildew by *Trichoderma asperelloides* strains. *Australasian Plant Pathology*, 49, 107–117.
- Sayed, M. A., Tahany, M. A., Abdel-rahman, Ragab, A. A., & Abdellatif, A. A. M. (2019). Biocontrol of Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita* by Chitinolytic *Trichoderma* spp. *Egypt. J. Agronematol*, 18(1), 30–47. <https://doi.org/10.21608/EJAJ.2019.52842>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schoch, C. L., Sung, G. H., López-Giráldez, F., Townsend, J. P., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., Robbertse, B., Matheny, P. B., Kauff, F., Wang, Z., Gueidan, C., Andrie, R. M., Trippe, K., Ciuffetti, L. M., Wynns, A., Fraker, E., Hodkinson, B. P., Bonito, G., Groenewald, J. Z., ... Spatafora, J. W. (2009). The ascomycota tree of life: A phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic Biology*, 58(2), 224–239. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syp020>
- Schulz, B., & Boyle, C. (2006). What are Endophytes? In *Microbial Root Endophytes*. *Soil Biology* (Springer, Vol. 9).
- SENASA. (2013). *Calidad de productos biológicos y políticas públicas*.
- Sharma, R., Magotra, A., Manhas, R. S., & Chaubey, A. (2017). Antagonistic potential of a psychrotrophic fungus: *Trichoderma velutinum* ACR-P1. *Biological Control*, 115(February), 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.024>
- Shoresh, M., Harman, G. E., & Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 21–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114450>
- Shuping, D. S. S., & Eloff, J. N. (2017). THE USE OF PLANTS TO PROTECT PLANTS AND FOOD AGAINST FUNGAL PATHOGENS : A REVIEW. *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, 14(4), 120–127.

- Siemering, G. S., Ruark, M., & Gevens, A. (2018). The value of Trichoderma for crop production. *UNIVERSITY OF WISCONSIN-EXTENSION*, July 2016.
- Silva, B. D. S., Ulhoa, C. J., Batista, K. A., Yamashita, F., & Fernandes, K. F. (2011). Potential fungal inhibition by immobilized hydrolytic enzymes from trichoderma asperellum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(15), 8148–8154. <https://doi.org/10.1021/jf2009815>
- Silva, D. D. de, Groenewald, J. Z., Crous, P. W., Ades, P. K., Nasruddin, A., Mongkolporn, O., & Taylor, P. W. J. (2019). Identification, prevalence and pathogenicity of Colletotrichum species causing anthracnose of Capsicum annuum in Asia. *IMA Fungus*, 10(8), 1–32.
- Sivila, N., & Alvarez, S. (2013). Producción Artesanal de Trichoderma. In *Universidad Jujuy Argentina*. <http://www.library.umaine.edu/auth/EZProxy/test/authej.asp?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=lfh&AN=9008131796&site=ehost-live>
- Skromeda, M. M. (2019). *EVALUACIÓN DE LA BROTAJÓN EN YERBA MATE BAJO DISTINTOS NIVELES NUTRICIONALES*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA Lugar.
- Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., & Sheteiwy, M. S. (2020). Trichoderma : The “ Secrets ” of a Multitalented. *Plants*, 9(762).
- Souza Medeiros, A. C. (2001). *Aspectos de dormência em sementes de espécies arbóreas*.
- Stephenson, S. L., & Schnittler, M. (2017). Myxomycetes. In *Handbook of the Protists*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6>
- Stewart, A., & Hill, R. (2014). Applications of Trichoderma in Plant Growth Promotion. In *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00031-X>
- Stocco, M. C., Mónaco, C. I., Abramoff, C., Lampugnani, G., Salerno, G., Kripelz, N., Cordo, C. A., & Consolo, V. F. (2016). Selection and characterization of Argentine isolates of Trichoderma harzianum for effective biocontrol of Septoria leaf blotch of wheat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(3), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1989-9>
- Takayanagi, T., Ajisaka, K., Takiguchi, Y., & Shimahara, K. (1991). Isolation and characterization of thermostable chitinases from Bacillus licheniformis X-7u. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1078(3), 404–410. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(91\)90163-T](https://doi.org/10.1016/0167-4838(91)90163-T)
- Tapwal, A., Singh, U., Teixeira, J. A., Singh, G., Garg, S., & Kumar, R. (2011). In vitro antagonism of Trichoderma viride against five phytopathogens. *Pest Technology*, 2–5.
- Teather, R. M., & Wood, P. J. (1982). Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(4), 777–780.
- Ting, A. S. Y., & Chai, J. Y. (2015). Chitinase and β -1,3-glucanase activities of Trichoderma harzianum in response towards pathogenic and non-pathogenic isolates: Early indications of compatibility in consortium. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(1), 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.cbab.2014.10.003>
- Torbati, M., Arzanlou, M., Abed-ashtiani, F., & Golmohammadi, H. (2019). Occurrence of fruit rot on cornelian cherry caused by Pilidium lythri in Iran. *Crop Protection*, 125(July), 104884. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104884>
- Torres-De la Cruz, M., Ortiz-García, C. F., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J. A., Ávalos-Contreras, N., Cappello-García, S., & De la Cruz-Pérez, A. (2015). Diversidad de Trichoderma en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86, 947–961. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.07.012>
- Vargas-hoyos, H. A., & Gilchrist-ramelli, E. (2015). Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagónica de Trichoderma asperellum sobre dos cepas de Fusarium aisladas de cultivos de tomate (Solanum lycopersicum). *Revista Mexicana de Micología*, 42, 9–16.
- Venturoso, L. R., Bacchi, L. M. A., Gavassoni, W. L., Pontim, B. C. A., & Conus, L. A. (2010). Influência de diferentes metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 12(4), 499–505. <https://doi.org/10.1590/s1516-05722010000400014>
- Viera, W., Noboa, M., Bermeo, J., Báez, F., & Jackson, T. (2018). Parámetros de calidad de cuatro tipos de formulaciones a base de Trichoderma asperellum y Purpuricillium lilacinum Quality. *Agronomía*, 9(4), 1–8. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v9n4.348>

- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>
- Vinale, Francesco, Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>
- Vinodkumar, S., Indumathi, T., & Nakkeeran, S. (2017). *Trichoderma asperellum* (NVTA2) as a potential antagonist for the management of stem rot in carnation under protected cultivation. *Biological Control*. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.07.001>
- Weining, S., & Langridge, P. (1991). Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. *Theoretical and Applied Genetics*, 82(2), 209–216. <https://doi.org/10.1007/BF00226215>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS* (Issue 1). Academic Press, Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M., & Lorito, M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, 96(2), 181–185. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0181>
- Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M., & Crous, P. W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75, 171–212. <https://doi.org/10.3114/sim0015>
- Xia, X., Lie, T. K., Qian, X., Zheng, Z., Huang, Y., Ecology, S. M., April, N., Xia, X., Lie, T. K., & Qian, X. (2016). Species Diversity, Distribution, and Genetic Structure of Endophytic and Epiphytic *Trichoderma* Associated with Banana Roots Linked references are available on JSTOR for this article : with Banana Roots Species Diversity , Distribution , and Genetic Stru. *Microbial Ecology*, 61(3), 619–625. <https://doi.org/10.1007/s00248-01>
- Yadav, A. N., Mishra, S., Kour, D., Yadav, N., & Kumar, A. (2020). *Agriculturally Important Fungi for Sustainable Agriculture* (Vol. 2).
- Yedidia, I., Benhamou, N., & Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1061–1070. <https://doi.org/10.1128/aem.65.3.1061-1070.1999>
- Zapata, R., Quiroga, M., Murillo, B., Agüero, D., Lisi, B., & Mena, P. (2012). *TRICHODERMA* spp BIOCONTROLADOR Y PROMOTOR DE CRECIMIENTO: UNA ALTERNATIVA AL USO DE AGROQUÍMICOS EN CULTIVOS INTENSIVOS. *Avances En Energías Renovables y Medio Ambiente*, 16, 47–55. <https://www.mendoza-conicet.gob.ar/asades/modulos/averma/trabajos/2012/2012-t001-a009.pdf>
- Zapata, Y., Galviz-quezada, A., & Osorio-Echeverri, V. M. (2018). Cellulases production on paper and sawdust using native *Trichoderma asperellum*. *Univ. Sci.*, 23(3), 419–436. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC23-3.cpop>