

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES



Trabajo Final de Carrera

**“Mecanismos de acción de *Trichoderma harzianum* para el biocontrol de
Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis”**

Modalidad: Investigación

Área temática: Fitopatología

Carrera: Ingeniería Agronómica

Alumno: Enzo Pastor Esteche

Legajo: 28853/9

DNI: 42675117

E-mail: enzo.epe@gmail.com

Teléfono: (0221) 5312474

Directora: Msc. Jorgelina Rolleri

Co-directora: Dra. Marina Stocco

Fecha de entrega: 2023

AGRADECIMIENTOS

A todos los maestros que la vida me dió.

A Jorgelina y Marina por su guía y paciencia.

A mi familia y amigos, especialmente a mi madre, pilar fundamental de mi vida.

A Cambium y a la Universidad Pública, gratuita y de calidad, a la lucha de aquellos que estuvieron antes por el derecho a estudiar, los que sueñan y se organizan para construir un país y un mundo mejor.

Mecanismos de acción de *Trichoderma harzianum* para el biocontrol de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

RESUMEN

La enfermedad conocida como “marchitamiento y cancro bacteriano” causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* es una de las enfermedades de origen bacteriano de mayor importancia económica en el país para el cultivo de tomate de invernadero. Debido a que no existen alternativas químicas eficientes para su control, una de las estrategias de manejo más estudiada ha sido el empleo de agentes biocontroladores, especialmente el hongo antagonista *Trichoderma* spp.. El objetivo general de este trabajo fue conocer los mecanismos de acción llevados a cabo por las cepas de *T. harzianum* frente a la bacteria patógena en ensayos *in vitro*. De este modo, se determinó la existencia de un efecto de inhibición de la bacteria a partir de metabolitos difusibles y volátiles, mientras que en ensayos de germinación y en invernáculo se observó el efecto sobre el crecimiento de plantines de tomate. Cada tratamiento se analizó mediante ANOVA, comparando sus medias con la prueba de Fisher para un nivel de significancia del 5% ($P < 0,05$) mediante el programa Infostat®. Si bien no se registraron diferencias significativas en los ensayos de laboratorio, se demostró que el crecimiento bacteriano se inhibió por el efecto de los metabolitos volátiles del hongo antagonista. En cuanto a los metabolitos difusibles se observó una inhibición estadísticamente significativa para el quinto día de ensayo. Por otro lado, se evidenció la promoción del crecimiento, siendo que el porcentaje de germinación, la longitud de la radícula y parte aérea fue significativamente superior en el ensayo de germinación, mientras que en plantines de tomate se observaron diferencias significativas para las variables peso fresco de raíz y parte aérea, y la variable peso seco de raíz.

INTRODUCCIÓN

Importancia del cultivo de tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es la segunda hortaliza de mayor importancia a nivel mundial después de la papa (Viteri *et al.*, 2013). Lozano (2012) sostiene que la producción de hortalizas en Argentina tiene como uno de sus principales protagonistas el cultivo de tomate especialmente bajo el sistema de cultivos protegidos. Según Argerich *et al.* (2011) la producción estimada de hortalizas es de 10.500.000 toneladas, de cuales el 65% corresponde a nueve especies entre ellas el tomate.

La producción promedio anual de tomate argentino del 2011 al 2021 se ubica en torno a 1.100.000 toneladas y 17.000 hectáreas productivas, aproximadamente un 60-70 % se destina a mercado para consumo en fresco y un 30-40 % para industria (SAGyP, 2023). El aporte del Cinturón Hortícola del Gran Buenos Aires es de suma importancia debido a que su producción tiene como principal destino los doce millones de habitantes del área metropolitana de Buenos Aires, la población de la provincia de Buenos Aires y otros mercados nacionales distantes. De las 2.000 hectáreas que componen esta gran zona productiva el 70% de esta superficie y las plantaciones de tomate están ubicadas en el Partido de La Plata y alrededores formando el Cinturón Hortícola Platense (Argerich *et al.*, 2011). Los rendimientos en cultivos protegidos promedian las 100 t/ha, llegando incluso a superar las 200 t/ha. Sin embargo, el potencial productivo de los cultivares de tomate en la región se ve afectado constantemente por problemas de carácter fitosanitario (Polack & Mitidieri, 2005).

Las altas temperaturas y alta humedad relativa en un período de tiempo prolongado, características de los invernáculos, favorecen tanto la proliferación y dispersión de agentes causantes de enfermedades y plagas (Vera Bahima, 2020). Como consecuencia, estas condiciones conllevan a una mayor aplicación de plaguicidas para el manejo de las mismas, en muchas situaciones sin un debido diagnóstico ni monitoreo, utilizando productos de amplio espectro. Estos casos representan un riesgo para la salud de los trabajadores y la población, provocando la contaminación del ambiente, fenómenos de plagas resistentes a productos químicos y la reducción de la abundancia y diversidad de enemigos naturales. El tomate es susceptible a más de 200 enfermedades de diversa etiología (Agrios, 2005; Vera Bahima, 2020), entre ellas las de mayor importancia económica causantes de marchitamiento son: Fusariosis (*Fusarium oxysporum* f. sp.

lycopersici), Tizón tardío (*Phytophthora capsici* y *P. nicotianae*), Marchitamiento y cancro bacteriano del tomate (*Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*), Necrosis de médula (*Pseudomonas corrugata*) y el Marchitamiento bacteriano (*Ralstonia solanacearum*).

Marchitamiento y Cancro bacteriano

La enfermedad conocida como “marchitamiento y cancro bacteriano del tomate” causada por *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Davis *et al.*, 1984) es la enfermedad de origen bacteriano de mayor importancia económica en el país tanto por las pérdidas de plantas, frutos de menor tamaño o en menor cantidad como también por las dificultades en poder realizar un control efectivo (Borboa *et al.*, 2009; Flores, 2012). Argerich *et al.* (2011) indican que es la enfermedad vascular más importante en el cultivo de tomate de invernadero, confirmando el estatus que mantiene a nivel mundial como uno de los mayores problemas sanitarios del cultivo de tomate (Gartemann *et al.*, 2003; Sandoval, 2004).

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

Según Flores (2012), el “marchitamiento y cancro bacteriano” es una enfermedad sistémica y policíclica que puede localizarse en la semilla, el tallo, las hojas y el fruto. La diseminación se efectúa por semillas infectadas, agua y labores de tutorado, poda y desbrote. Asimismo, puede permanecer en el suelo en rastros de cultivo, malezas y estructuras como plásticos, cintas de riego, tutores, postes y herramientas. Las condiciones predisponentes son temperaturas moderadas de 18-25°C, alta humedad relativa y excesos de fertilización nitrogenada.

Cuando la bacteria ingresa por las aberturas naturales (estomas, hidátodos) o heridas superficiales como tricomas rotos aparecen primero los síntomas de infección localizada. En este caso el síntoma que se observa es la necrosis en folíolos color marrón claro y en algunos casos las manchas pueden estar acompañadas de halo clorótico. En los frutos

pueden presentarse lesiones pequeñas de color bronceado con halos blancos, llamadas manchas en “ojo de pájaro”, mientras que si la bacteria proviene de la semilla o bien ingresa en el momento del desbrote, dónde toma contacto inmediatamente con el sistema de conducción (xilema) se produce la infección sistémica, dónde el síntoma principal es el marchitamiento. Los folíolos pueden marchitarse unilateralmente, lo que termina en la muerte de la hoja. La médula y el tejido vascular pueden tener aspecto harinoso, si se realiza un corte transversal del tallo puede observarse la salida de un exudado amarillento. En tallos y pecíolos pueden formarse canchales (EPPO, 2023; Gleason y col., 1993; Tancos, 2013).

Manejo integrado del Marchitamiento y Cancro bacteriano

A nivel mundial no existen alternativas químicas eficientes para el control de las enfermedades bacterianas en el tomate (Balestra *et al.*, 2009). El uso de compuestos cúpricos, como oxiclóruo de cobre, óxido de cobre o hidróxido de cobre, y antibióticos han mostrado efecto sobre el patógeno (Milijacevic *et al.*, 2009; Sandoval, 2004) a costa de los efectos tóxicos y su potencial acumulación en los suelos y organismos vivos. Actualmente no existen formulaciones comerciales inscritas por las empresas asociadas a la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE) con los principios activos recomendados para el marchitamiento del tomate “estreptomina + oxitetraciclina” y “gentamicina + oxitetraciclina”. Sin embargo, en el mercado sólo se encuentra una formulación comercial de kasugamicina, salvando las precauciones por sus efectos sobre la salud humana al ser un irritante ocular y dermal (CASAFE, 2015). Asimismo, tampoco existen materiales con resistencia genética haciendo de esta enfermedad una de las más difíciles de controlar en el cultivo de tomate (Burokiene, 2006).

Adicionalmente, existe mayor presión social para la búsqueda de alternativas de control más amigables con el ambiente y que no tengan efectos negativos sobre la salud (Borboa *et al.*, 2010; Pouvova *et al.*, 2008; Zanón, 2009).

Generalmente, las enfermedades en las plantas se controlan con altas dosis y frecuencias de aplicación de agroquímicos sintéticos, eliminando una gran cantidad de microorganismos y reduciendo la biodiversidad (Mónaco, 2014). No obstante, al ser una enfermedad vascular, el control químico es prácticamente imposible. Esto se agrava ya que cuando los síntomas se manifiestan ya es tarde y todas las plantas aparecen infectadas. Estos problemas han llevado a la búsqueda de alternativas de control que se

inserten en el desarrollo de agroecosistemas sostenibles, basados en un manejo integrado del cultivo sin alterar el equilibrio del sistema.

En este marco, el manejo integrado de enfermedades adquiere gran relevancia, ya que este contempla la selección y uso de técnicas orientadas a reducir las enfermedades a un nivel tolerable, teniendo por objeto disminuir la incidencia de las enfermedades en los agroecosistemas, minimizando o eliminando así los daños en el ambiente. Por citar algunas técnicas, se puede nombrar el control biológico, el manejo cultural, el uso de cultivos de cobertura, la solarización y el uso de agroquímicos de banda verde.

Como el cancro bacteriano es una enfermedad de muy difícil manejo es necesario partir de prácticas preventivas tales como: no utilizar campos infectados para plantaciones de tomate, utilizar semilla de calidad garantizada y desinfectada, no efectuar labores de desbrote y deshoje en condiciones de alta humedad. En caso de no estar seguros de la calidad sanitaria de la semilla, se puede recurrir a su desinfección con hipoclorito de sodio al 1% por 20 a 25 minutos, o tratamientos con agua caliente a 56 °C por treinta minutos (Sandoval, 2004).

Una vez establecido el cultivo, se recomienda evitar la dispersión del inóculo secundario a través de la desinfección de herramientas, dónde distintos autores han obtenido buenos resultados utilizando hipoclorito de sodio al 10% (Flores, 2012), hipoclorito de sodio o calcio (Kawaguchi & Tanina, 2014) y cloruro de benzalconio al 1% (Rolleri, 2015). Durante el ciclo de cultivo, Argerich (2011) además recomienda evitar excesos en la fertilización nitrogenada, así como también favorecer la ventilación en el invernadero para disminuir la humedad y la temperatura del ambiente, durante las labores culturales usar guantes desinfectados, lavarse las manos continuamente, pincelar las heridas con esmalte sintético para evitar el ingreso de otros patógenos y empezar a trabajar por los lotes menos afectados para terminar por los más comprometidos (Sandoval, 2004). Al siguiente ciclo, es recomendable emplear rotaciones con otras especies de otra familia botánica distinta de Solanáceas y transplantar plantines una vez rustificados ya que son más resistentes.

En sintonía con lo antedicho, una de las estrategias de manejo más estudiada ha sido el empleo de agentes biocontroladores, especialmente el hongo antagonista *Trichoderma* spp. (Infante et al., 2009). *Trichoderma* es un género de hongos fácil de aislar, de cultivar y de propagar en diversos substratos y la mayoría de las especies tienen un buen comportamiento y una serie de mecanismos de acción para controlar un buen número de fitopatógenos (Papavizas, 1985).

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

El género *Trichoderma* pertenece al Reino *Fungi*, Phylum *Ascomycota*, Subphylum *Pezizomycotina*, Clase *Sordariomycetes* (antes *Pyrenomycetes*), Orden *Hypocreales*, Familia *Hypocreaceas*. Se caracterizan por ser hongos saprófitos con gran plasticidad ecológica, los cuales son muy comunes en diversos suelos, principalmente en aquellos que son ácidos y ricos en materia orgánica. Los aislamientos demuestran un crecimiento inicial rápido, durante el cual producen un micelio aéreo abundante color blanco grisáceo, que luego cambia al verde oscuro al desarrollar conidios. Los conidióforos son ramificados, generalmente apareados, con fiálides terminales de donde surgen esporas asexuales o conidios. Sus estructuras de resistencia ante el estrés nutricional y factores adversos como la desecación son clamidosporas.

La especie *Trichoderma harzianum* ha sido hasta el momento el hongo antagonista más utilizado en el control de enfermedades de las plantas (Martinez *et al.*, 2013), ya que posee una alta capacidad para reducir las infecciones causadas por un amplio rango de patógenos tales como: *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*, *Fusarium roseum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii.*, *Sclerotinia spp.*, *Pythium spp.*, *Phytophthora spp.*, *Alternaria spp.*, entre otros (El-Fiki & Ahmed, 2017; Harman *et al.*, 2004; Hjeljord & Tronsmo, 1998). Esto se debe en parte a que los mecanismos de acción utilizados por *Trichoderma* son complejos, variados y se complementan en forma sinérgica (Benitez *et al.*, 2004; Howell, 2003).

Los mecanismos de acción de los antagonistas microbianos pueden ser directos, es decir, que actúan directamente sobre el patógeno, entre ellos se encuentra la competencia, el parasitismo y la antibiosis (Mónaco, 2014). Los otros mecanismos son de acción indirecta, actúan alterando la fisiología de la planta y no sobre el patógeno, tales como la promoción del crecimiento y la estimulación de la resistencia inducida.

La competencia se refiere al comportamiento diferencial entre dos o más organismos ante un mismo nicho ecológico, habiendo una reducción de la cantidad de espacio o cantidad de recursos disponibles para los demás (Benitez *et al.*, 2004). *Trichoderma* puede competir por nitrógeno, carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminarina y pectinas) y microelementos (Infante *et al.*, 2009).

En segundo lugar, se ha estudiado también el parasitismo por parte de *Trichoderma*. El mismo consiste en una secuencia de pasos que abarca una etapa de localización del hospedante y crecimiento quimiotrópico hacia el mismo; adhesión y posterior enrollamiento de las hifas y penetración, en la que se diferencian estructuras especializadas tales como apresorios (Ezziyani *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004; Mónaco, 2014). En esta última ocurre la producción de enzimas extracelulares, fundamentalmente celulasas, glucanasas, lipasas, proteasas y quitinasas, que degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas.

Otro mecanismo denominado antibiosis involucra la acción directa de compuestos de bajo peso molecular, los cuales son metabolitos producidos por *Trichoderma* que ejercen un efecto tóxico sobre otros microorganismos sensibles. Algunos ejemplos son trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina. Se sabe que en el llamado "hiperparasitismo enzimático" los antibióticos volátiles generan un efecto fungistático sobre patógenos fúngicos, que los hacen más sensibles a los antibióticos. Por otro lado, la producción de metabolitos tiene cierta especificidad, siendo el efecto antibiótico variable entre cepas y el grado de sensibilidad de los otros microorganismos (Samuels, 2006).

Entre los mecanismos de acción indirecta, se encuentra aquel que involucra la promoción del crecimiento de las plantas. *Trichoderma* posee la capacidad de reconocer y penetrar las primeras capas de células de las raíces de las plantas, así como también puede producir metabolitos semejantes a las citoquininas, mejorando de este modo el crecimiento y desarrollo de las raíces, la productividad de los cultivos, la resistencia al estrés abiótico, la absorción y el uso de nutrientes (Benitez *et al.*, 2004). Estos fenómenos son producto de la biofertilización, la promoción del desarrollo radical y la producción de ácidos orgánicos como el ácido glucónico, cítrico y fumárico, que favorecen la solubilización de fosfatos, micronutrientes y cationes como el hierro, manganeso y magnesio.

Finalmente, otro modo de acción indirecto se basa en la estimulación de mecanismos de defensa, mediante el cual se opera modificando la fisiología de la planta, aumentando así su capacidad de resistencia al ataque del patógeno, lo cual se denomina protección sistémica o resistencia inducida. Dicha resistencia es producto del incremento de metabolitos y enzimas como la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la chalcona sintasa (CHS), asociadas a la biosíntesis de peroxidases, fitoalexinas, quitinasas y glucanasas (Benitez *et al.*, 2004; Infante *et al.*, 2009).

En este contexto, dada su versatilidad al momento de actuar frente a los patógenos, *Trichoderma* sp. ofrece amplio rango de acción que no ha sido superado fácilmente por otros agentes de control biológico (Bogumil *et al.*, 2013; Harman *et al.*, 2004; Samuels, 2006). Por estos motivos varias especies de *Trichoderma* han sido exitosamente usadas tanto para aplicaciones en invernáculo como en plantaciones en campo (Hjeljord & Tronsmo, 1998).

Por lo expuesto, los objetivos del presente proyecto son:

Objetivos generales

Conocer los mecanismos de acción llevados a cabo por las cepas de *Trichoderma harzianum* frente a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en ensayos *in vitro* y determinar su efecto en el crecimiento en plantines de tomate.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los metabolitos volátiles sobre el crecimiento *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis in vitro*.
- Evaluar el efecto de los metabolitos difusibles volátiles sobre el crecimiento *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.
- Evaluar el efecto *in vitro* de *T. harzianum* sobre la germinación de semillas de tomate.
- Evaluar la respuesta de crecimiento de plantines de tomate, peso fresco y peso seco frente a la aplicación de *T. harzianum* sobre plantines de tomate.

Hipótesis

El éxito del control biológico de las cepas de *T. harzianum* se debe a la combinación de diferentes mecanismos de acción como la promoción del crecimiento sobre el hospedante y la producción de metabolitos que afectan el crecimiento de la bacteria patógena.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayos en laboratorio

Obtención de cepas de Trichoderma harzianum y Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis

Tanto los aislamientos de *Trichoderma harzianum* (Th118 y Th5CC) como el del patógeno, *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Cmm), fueron aislados, seleccionados y conservados hasta la actualidad en un cepario en el Centro de Investigaciones en Fitopatología (CIDEFI) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata (Argentina).

La cepa Th118 fue originalmente aislada del filoplano de hojas de tomate y probada previamente en otros ensayos de invernáculo para el biocontrol de *Botrytis cinerea*, mientras que Th5CC fue aislada del filoplano de trigo y probada como antagonista de *Zymoseptoria tritici* (Rolleri *et al.*, 2021). Ambas cepas se encontraban conservadas en papel de filtro según la técnica descrita por Stocco *et al.* (2010). Para obtener las colonias madres, se sembraron en cajas de Petri con APG 2% (Agar Papa Glucosado) una fracción de papel colonizado con las cepas de *Trichoderma* y posteriormente se incubaron a $25\text{ °C} \pm 2$ durante 7 días.

Efecto de los metabolitos volátiles sobre el crecimiento bacteriano

El porcentaje de inhibición del crecimiento de la colonia bacteriana por efecto de metabolitos volátiles se determinó a partir de una adaptación del método descrito por Vipin *et al.* (2014) y Ommati & Zaker (2012).

Las cepas de *T. harzianum* se sembraron en el centro de una caja de Petri con medio Agar Nutritivo colocando un disco de micelio de 5 mm tomado de un cultivo de 3 días de edad mantenido en APG. Luego se incubaron a $25 \pm 2\text{ °C}$ durante 2 días. La parte superior de cada caja de Petri se reemplazó con la parte inferior de una caja inoculada con Cmm. Ambos fondos se sellaron con Parafilm® y posteriormente se incubaron a $25 \pm 2\text{ °C}$ durante 7 días. Para el testigo, se procedió de la misma manera utilizando cajas sin el antagonista. Se realizaron 5 repeticiones para cada tratamiento.

Las mediciones fueron hechas durante 4 días, determinando el área de crecimiento del patógeno en centímetros cuadrados, multiplicando el largo de la línea de siembra (4 cm) por el ancho promedio, el cual estimado en función de tres mediciones como se señala en la Figura 1. A la izquierda de la misma se visualiza una caja de Petri (A) con desarrollo del antagonista en la cara inferior mientras que en la cara superior se muestra la línea donde se sembró el patógeno Cmm. A la derecha (B), se detallan las tres líneas de medición a partir de las cuales se estimó el ancho promedio; A1, A2, y A3; y el largo de la línea de siembra (L = 4 cm).

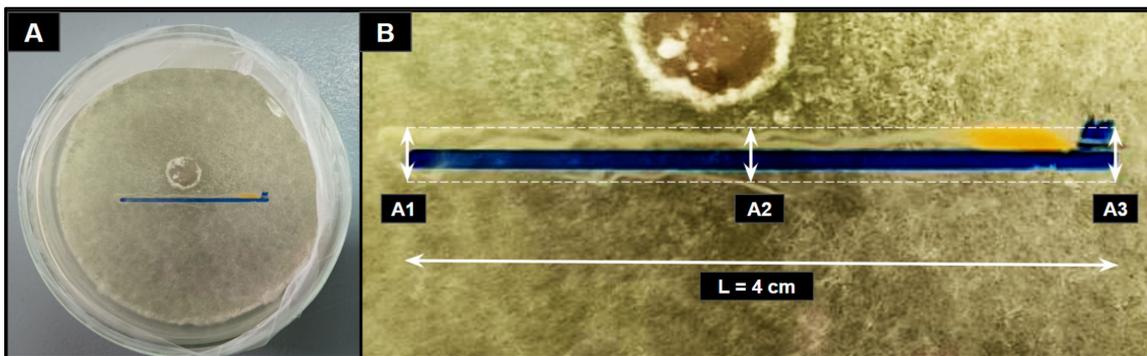


Figura 1: Caja de Petri con siembra de Cmm y *Trichoderma* (A) junto a un detalle de los puntos de medición (B).

Se estimó el área del patógeno durante los 4 días después de la incubación, y se determinó la inhibición del crecimiento de la colonia bacteriana. El porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó usando la siguiente ecuación (Vipin *et al.*, 2014):

$$I (\%) = (C-T/C) \times 100$$

Donde I: es el porcentaje de inhibición; T: es el diámetro de la colonia en presencia de *T. harzianum* y C: es el diámetro de la colonia sin la presencia de *T. harzianum*.

Efecto de los metabolitos difusibles sobre el crecimiento bacteriano

El efecto inhibitorio de metabolitos no volátiles de las cepas de *T. harzianum* sobre el crecimiento de colonias de Cmm se realizó sobre el medio Agar Nutritivo en cajas de Petri donde se colocó 1 capa de papel celofán estéril, de 9 cm de diámetro (Ommati & Zaker, 2012). Sobre el mismo se sembró un disco de 7 mm de diámetro de una colonia de *T. harzianum* de 7 días de edad.

Después de 48 h se retiraron los papeles de celofán y se sembró la bacteria patógena sobre el medio de cultivo en una línea de 4 cm. Al primer, segundo y quinto día

posteriores a la siembra de Cmm se evaluó el crecimiento de la colonia bacteriana en los diferentes tratamientos en forma de área. Para ello se consideró el largo de 4 cm de la línea de siembra y el ancho promedio. Este último valor fue calculado a partir de una medición efectuada en el centro de la línea y dos mediciones a sus extremos. Para el testigo se procedió de la misma manera sin sembrar el antagonista. Se realizaron 4 repeticiones para cada tratamiento.

Ensayo de germinación de semillas de tomate

El ensayo de germinación se realizó colocando las semillas de tomate en cajas de Petri con papel de filtro humedecido. Se colocaron 15 semillas en cada una de ellas, se humedecieron con 5 ml de suspensión de esporas de cada cepa del antagonista y para el testigo se agregaron 5 ml de agua destilada estéril. Se realizaron 5 repeticiones para cada uno de los tratamientos. Las cajas de Petri se colocaron en cámara de germinación bajo condiciones de ciclos alternados de 12 h de luz y oscuridad y temperatura 25°C adecuadas para la germinación de las semillas de tomate (Ezziyani *et al.*, 2004).

Se evaluó la germinación a las 72 h de iniciado el ensayo, considerando la emergencia de la radícula como parámetro de germinación. Además, a los 7 días se midió la longitud de la raíz y la longitud de la parte aérea de la semilla germinada para cada tratamiento.

Ensayo en invernáculo

El ensayo se realizó en plantas de tomate en el invernáculo del CIDEFI, correspondiente a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. El diseño experimental fue completamente aleatorizado con 5 repeticiones por tratamiento. Las dos cepas del antagonista se aplicaron por única vez en forma de riego al momento de la siembra, colocando en cada celda una semilla con 10 ml de suspensión de esporas (Rolleri *et al.*, 2021). Los parámetros de crecimiento que se evaluaron a los 80 días de la siembra fueron peso total (g), peso de raíz (g) y peso de parte aérea (g), en fresco y en seco.

La suspensión de esporas se preparó con ambas cepas del antagonista, habiendo sido desarrolladas en medio APG, durante 8 días de crecimiento. Para ello, se agregó agua estéril sobre la caja de Petri colonizada y se raspó con un ansa estéril. Luego se ajustó a

1×10^7 esporas/ml con cámara de Neubauer. A los tratamientos testigos se les aplicó 10 ml de agua destilada estéril.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los ensayos en laboratorio (crecimiento bacteriano bajo el efecto de los metabolitos volátiles, longitud de la radícula y plúmula) y en invernáculo (parámetros de crecimientos de las plantas de tomate) de cada uno de los tratamientos se analizaron mediante ANOVA, comparando sus medias con la prueba de Fisher para un nivel de significancia del 5% ($P < 0,05$). En el caso de los datos que no cumplan con los supuestos de normalidad, homocedasticidad y aleatoriedad, se aplicó la estadística no paramétrica mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Los resultados del ensayo *in vitro* de efectos de compuestos difusibles se analizó con la Prueba t para muestras independientes con un nivel de significancia del 5% ($P < 0,05$). Para el análisis de todas las variables se utilizó el programa estadístico Infostat® (Di Rienzo et al., 2015).

RESULTADOS

Ensayos en el laboratorio

Efecto de los metabolitos volátiles sobre el crecimiento bacteriano

Se evaluó en forma indirecta el efecto de los metabolitos volátiles luego de haber incubado durante 4 días a la bacteria Cmm en presencia del antagonista.

Los resultados del análisis estadístico para el primer día mostraron que el p-valor para la variable crecimiento de Cmm resultó ser mayor a 0,05, por lo tanto no hubo diferencia entre los tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis de la Varianza de crecimiento de Cmm al primer día.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,03	2	0,02	0,25	0,7795
Tratamientos	0,03	2	0,02	0,25	0,7795
Error	0,77	12	0,06		
Total	0,80	14			

Como se observa en la Figura 2, los tratamientos no se diferenciaron entre sí presentando valores estadísticamente similares. Los valores medios de área de Cmm fueron de 0,88 cm² para el testigo, 0,96 cm² para el tratamiento con la cepa Th5CC y 0,99 cm² para Th118.

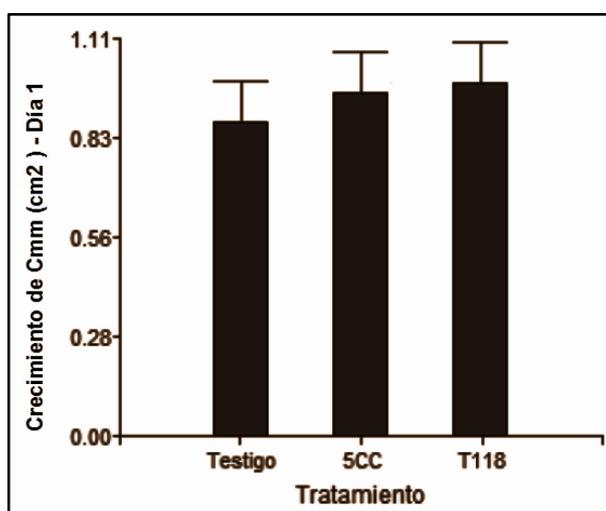


Figura 2. Crecimiento del patógeno Cmm al primer día.

Para el segundo día, la variable crecimiento de Cmm demostró tener un p-valor mayor a 0,05, por lo tanto no hubo diferencia entre los tratamientos (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de la Varianza de crecimiento de Cmm al día 2.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,9E-0,3	2	1,9E-0,3	0,03	0,9747
Tratamientos	3,9E-0,3	2	1,9E-0,3	0,03	0,9747
Error	0,91	12	0,08		
Total	0,91	14			

Como se observa en la Figura 3, los tratamientos no se diferenciaron entre sí presentando valores estadísticamente similares. Los valores medios del área de Cmm fueron de 1,08 cm² para el testigo, 1,12 cm² para Th5CC y 1,11 cm² para Th118.

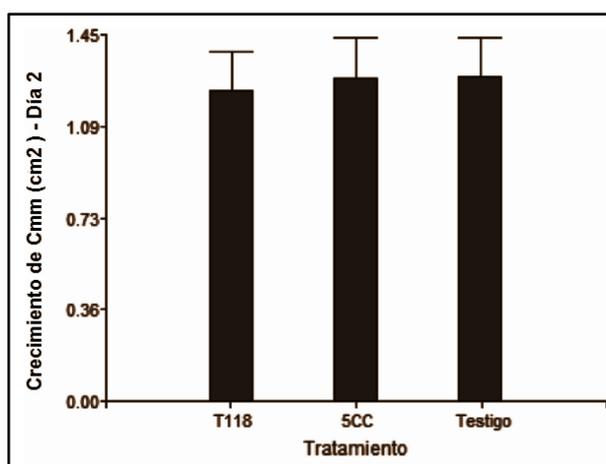


Figura 3. Crecimiento del patógeno Cmm al segundo día.

Para la variable crecimiento de Cmm al tercer día, el p-valor fue mayor a 0,05, por lo tanto no hubo diferencia entre los tratamientos (Tabla 3). A pesar de ello, se destaca que en el tercer día ocurrió un cambio en la tendencia con la cual evolucionaba comparativamente el efecto inhibitorio del antagonista.

Tabla 3. Análisis de la Varianza de crecimiento de Cmm al día 3.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,01	2	4,9E-0,3	0,04	0,9621
Tratamientos	0,01	2	4,9E-0,3	0,04	0,9621
Error	1,51	12	0,13		
Total	1,52	14			

En la Figura 4, se muestra que los tratamientos no se diferenciaron entre sí, presentando valores estadísticamente similares. Los valores medios de área de Cmm fueron de 1,28 cm² para el testigo, 1,28 cm² para Th5CC y 1,23 cm² para Th118, se destaca que estos valores tendieron a asemejarse. En el tercer día se observó un cambio en la dinámica de crecimiento de la colonia bacteriana. Si bien los valores son estadísticamente similares, a partir de este día, para el tratamiento Th118, hubo cierto grado de inhibición del crecimiento de Cmm, y en el caso del tratamiento Th5CC se empieza a ralentizar. Por otro lado, el área de Cmm en el testigo, que se incubó en ausencia del antagonista continuó creciendo sin restricciones.

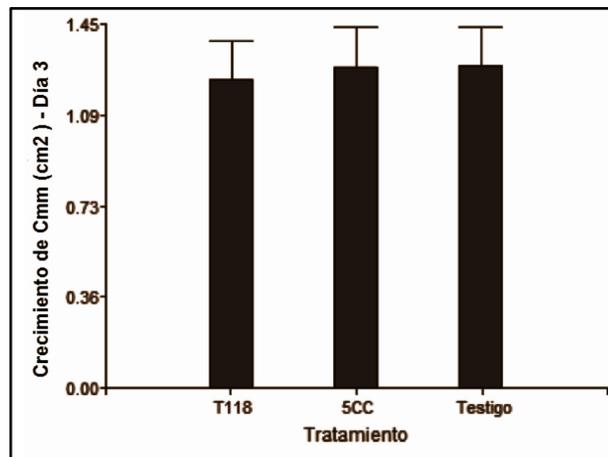


Figura 4. Crecimiento del patógeno Cmm al tercer día en área (cm²).

Para la variable crecimiento de Cmm al cuarto día, el p-valor fue mayor a 0,05 por lo tanto no hubo diferencia entre los tratamientos (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de la Varianza de crecimiento de Cmm al día 4.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,67	2	0,33	0,75	0,4952
Tratamientos	0,67	2	0,33	0,75	0,4952
Error	5,37	12	0,45		
Total	6,04	14			

En la Figura 5, se muestra que los tratamientos no se diferenciaron entre sí presentando valores estadísticamente similares. Los valores medios de área de Cmm fueron de 1,81 cm² para el testigo, 1,73 cm² para Th5CC y 1,33 cm² para Th118.

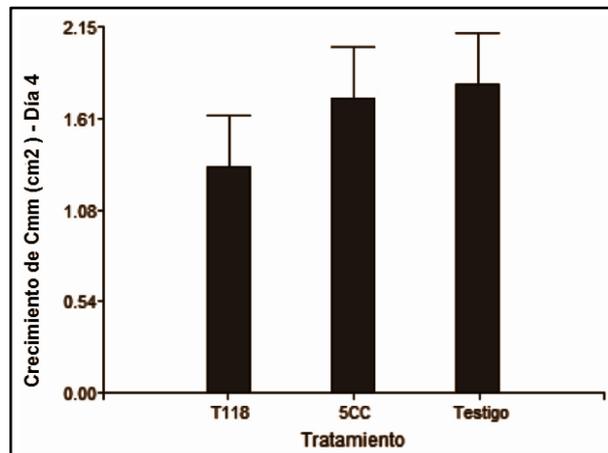


Figura 5. Crecimiento del patógeno Cmm al cuarto día.

La variación del crecimiento, medida como área de Cmm, en los cuatro días del ensayo fue graficada en la Figura 6. En la misma se puede visualizar una etapa inicial de poco crecimiento bacteriano que va desde el primer día hasta el tercero, y una etapa posterior entre el tercer y el cuarto día de desarrollo notable de las colonias, especialmente para el testigo, que se ubica en primer lugar, seguido del tratamiento con el antagonista Th5CC y finalmente con un menor desarrollo se ubica el tratamiento en presencia de la cepa Th118.

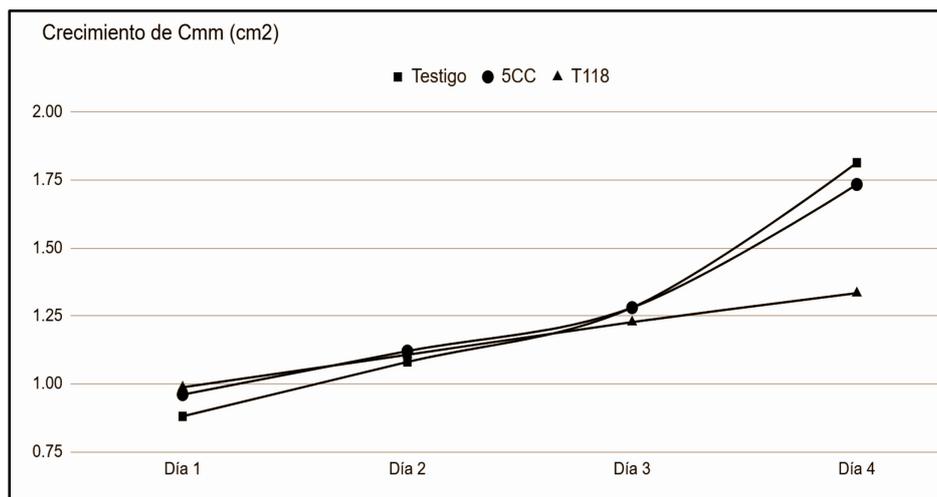


Figura 6. Evolución del crecimiento de Cmm en cuatro días medido en cm².

El porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó usando la ecuación de Vipin *et al.* (2014), dando valores hacia el cuarto día del 26% de inhibición del crecimiento respecto del testigo y del 4% para los tratamientos Th118 y Th5CC respectivamente. Dichos porcentajes fueron estimados y graficados como se presentan en la Figura 7. En la misma se observa que no hubo inhibición del crecimiento en los primeros dos días del ensayo. Aún así, el efecto inhibitorio que ejerce la presencia de *Trichoderma* sobre el patógeno tiende a crecer progresivamente, tomando valores positivos a partir del tercer y cuarto día de incubación.

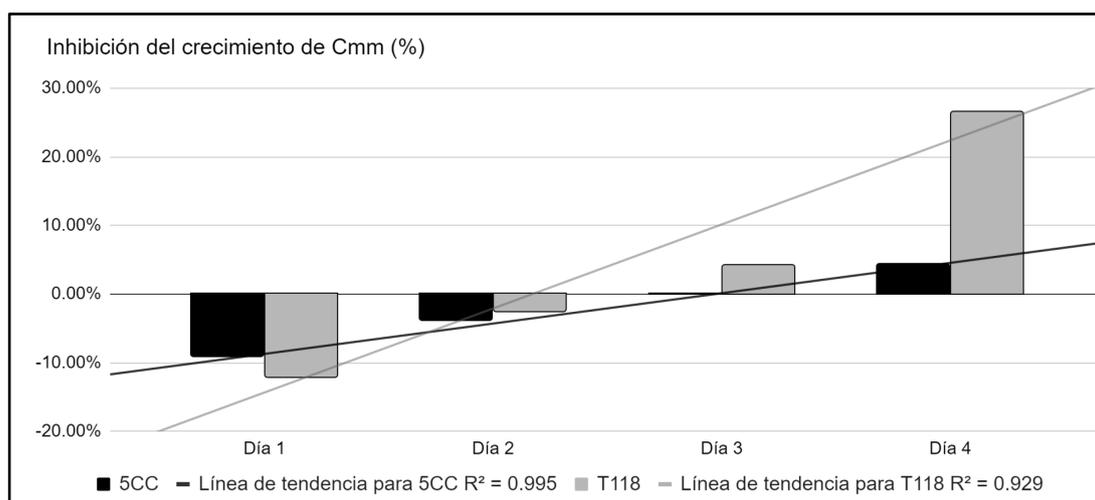


Figura 7. Evolución del efecto inhibitorio del antagonista sobre el crecimiento de Cmm a partir de la producción de metabolitos volátiles.

Efecto de los metabolitos difusibles sobre el crecimiento bacteriano

Después de 48 h de incubación de *Trichoderma* se retiraron los papeles de celofán del medio Agar Nutritivo y se sembró sobre el medio la bacteria patógena en una línea de 4 cm, posteriormente se evaluó su área de crecimiento al primer, segundo y quinto día.

Debido a la pérdida de repeticiones por contaminación se decidió analizar tratamientos con *Trichoderma* y testigos sin antagonista. Por lo tanto, para el análisis de los resultados, se realizó una Prueba de t, la cual partió del contraste de hipótesis, donde la hipótesis nula (H_0) se basó en que las medias de los tratamientos son iguales, mientras que la hipótesis alternativa (H_1) determina que las medias son diferentes. El nivel de significancia utilizado fue del 5%.

Como se observa en la Tabla 5, en lo que respecta al crecimiento de Cmm al primer día, el p-valor resultó ser menor de 0,05 (p-valor = 0,0198), por lo tanto se rechazó la hipótesis nula que dice que las medias son iguales. Se puede afirmar entonces que existen diferencias significativas entre los tratamientos con *Trichoderma*, presentando los mismos una media de crecimiento de 7,49 mm² y el testigo una media de 13,32 mm².

Tabla 5. Prueba t para muestras independientes para la variable crecimiento a las 24 h.

Media 1 - Media 2	5,84
LI (95)	1,30
LS (95)	10,37
PHomVar	0,1308
gl	6
p-valor	0,0198

Como se observa en la Tabla 6, en lo que respecta al crecimiento de Cmm al segundo día, el p-valor resultó ser menor de 0,05 (p-valor = 0,0363), por lo tanto se rechazó la hipótesis nula. Se puede afirmar entonces que también existen diferencias significativas entre los tratamientos con *Trichoderma*, presentando los mismos una media de crecimiento de 7,87 mm² y el testigo una media de 15,86 mm².

Tabla 6. Prueba t para la variable crecimiento a las 48 h.

Media 1 - Media 2	7,99
LI (95)	0,96
LS (95)	15,02
PHomVar	0,0006
T	3,62
gl	6
p-valor	0,0363

Finalmente, en la Tabla 7 se visualiza que para el quinto día, el p-valor resultó ser menor de 0,05 (p-valor = 0,0037), por lo tanto se rechazó la hipótesis nula. Se puede afirmar entonces que existen diferencias significativas entre los tratamientos con *Trichoderma*, presentando los mismos una media de crecimiento de 9,65 mm² y el testigo una media de 18,08 mm², siendo este último valor casi el doble del primero, con un diferencial del 87%.

Tabla 7. Prueba t para la variable crecimiento al quinto día.

Media 1 - Media 2	8,43
LI (95)	5,20
LS (95)	11,67
PHomVar	0,0265
T	8,30
gl	3
p-valor	0,0037

En la Figura 8, se puede apreciar la evolución del crecimiento de Cmm para los tratamientos con y sin *Trichoderma*. En este último, se destaca la ocurrencia de un rápido desarrollo de la colonia bacteriana en las primeras 24 horas y una etapa de crecimiento más lento desde el segundo día. En contraste, en el tratamiento con el antagonista se observó una reducción del crecimiento del patógeno durante el primer día, el cual se mantuvo casi constante hasta el quinto día. Asimismo, la inhibición por efecto de metabolitos difusibles manifestó un carácter creciente, siendo máxima alrededor de las 48 h (50%), y levemente descendente en los días posteriores (hasta un 47%). Adicionalmente, el crecimiento del primer al quinto día de ensayo fue del 29% y del 36% para el tratamiento con y sin *Trichoderma* respectivamente.

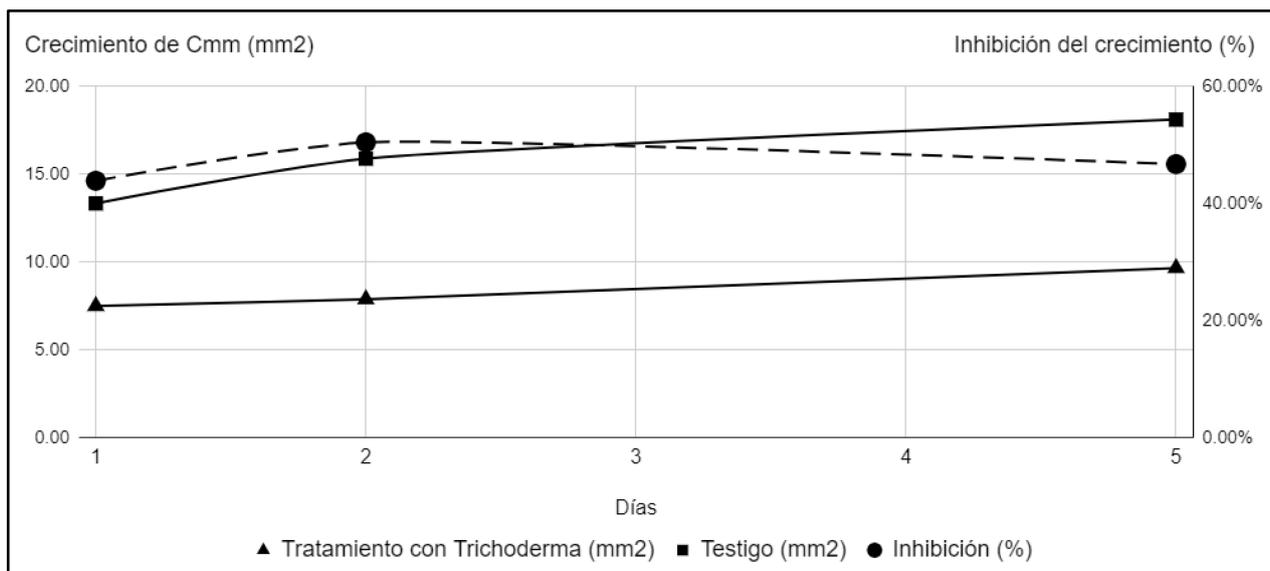


Figura 8. Evolución del crecimiento de Cmm y su inhibición por metabolitos difusibles.

1. Ensayo de germinación de semillas de tomate

Se evaluó la germinación a las 72 h iniciado el ensayo, considerando la emergencia de la radícula como parámetro de germinación. Además, a los 7 días se midió la longitud de la radícula y de la parte aérea de la semilla germinada para cada tratamiento.

Los resultados del análisis estadístico (ANOVA) del porcentaje de germinación a las 72 horas (Tabla 8) demuestran que existen diferencias significativas entre los tratamientos, dado que el p-valor es menor a 0,05 ($< 0,0001$).

Tabla 8. Análisis de la Varianza del porcentaje de germinación a las 72 h.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9498,42	2	4749,21	27,16	< 0,0001
Tratamientos	9498,42	2	4749,21	27,16	< 0,0001
Error	2097,98	12	147,83		
Total	11596,40	14			

En la Figura 9, se observa el porcentaje de germinación para los tratamientos en dos grupos homogéneos con diferencias significativas. Por un lado los tratamientos con *Trichoderma* demostraron porcentajes de germinación significativos, del 57% y 55% para las cepas Th5CC y Th118 respectivamente. Por otro lado, el porcentaje de germinación para el testigo con agua estéril fue del 3% a las 72 h.

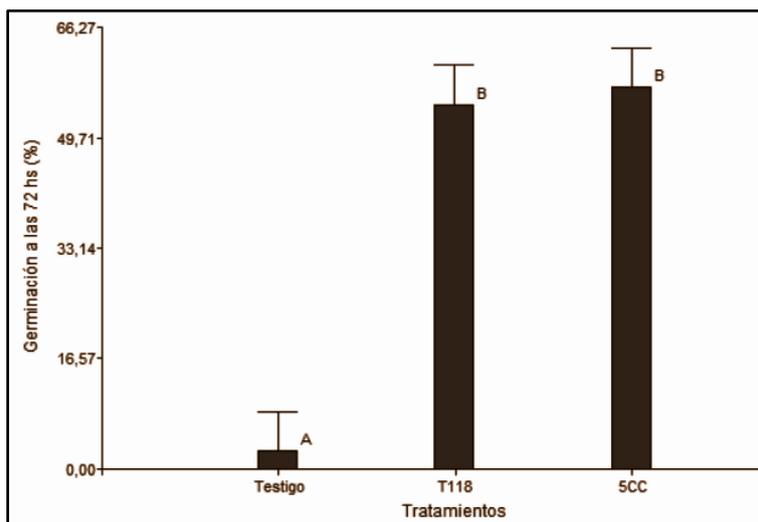


Figura 9. Germinación de semillas de tomate (%) a las 72 h, los valores seguidos por las mismas letras no son significativamente diferentes según el test LSD a $P = 0,05$.

Como se observa en la Figura 11, las semillas que fueron tratadas con la suspensión de *Trichoderma* (A) presentaron mayores porcentajes de germinación a partir de las 72 h respecto de aquellas tratadas con agua estéril (B).



Figura 11. Germinación a las 72 h para el tratamiento con el hongo (A) y el testigo (B).

Los resultados del ANOVA a los 7 días de evaluación (Tabla 9) demuestran que existen diferencias significativas entre los tratamientos, dado que el p-valor es menor a 0,05 ($< 0,0003$).

Tabla 9. Análisis de la Varianza de germinación ANOVA a los 7 días de evaluación.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8787,68	2	4393,84	16,95	< 0,0003
Tratamientos	8787,68	2	4393,84	16,95	< 0,0003
Error	3110,94	12	259,25		
Total	11898,63	14			

La Figura 10 representa el porcentaje de germinación a los 7 días. En ella se visualiza a los tratamientos categorizados en dos clases con diferencias significativas. Aquellos con un mayor valor fueron los tratamientos con *Trichoderma*, los cuales demostraron porcentajes de germinación significativos, del 79% y 77% correspondientes a las cepas Th5CC y Th118 respectivamente. Por otro lado, el porcentaje de germinación para el testigo con agua estéril fue del 27%.

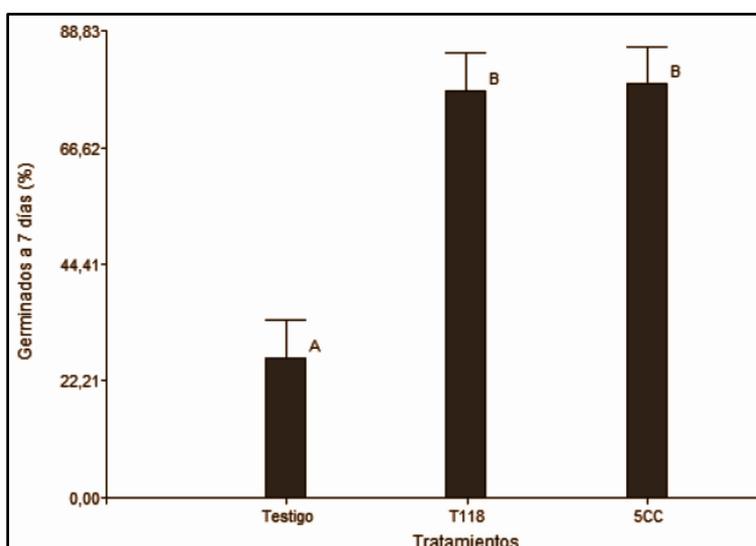


Figura 10. Germinación de semillas de tomate (%) a los 7 días. Los valores seguidos por las mismas letras no son significativamente diferentes según el test LSD a $P = 0,05$.

Para la evaluación de la longitud de raíz a los 7 días de germinación, los datos fueron transformados con el \log_{10} . Los resultados demuestran que el p-valor es menor a 0,05 ($< 0,0001$) por lo tanto hay diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis de la Varianza de longitud de raíz ANOVA.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9,73	2	4,87	109,95	< 0,0001
Tratamientos	9,73	2	4,87	109,95	< 0,0001
Error	0,53	12	0,04		
Total	10,26	14			

En la Figura 12, se muestra que los tratamientos con *Trichoderma* se diferenciaron significativamente del testigo para la variable longitud de radícula. Los valores medios de la misma fueron de 4,37 mm para el testigo, 75,54 mm para Th5CC y 69,46 mm para Th118.

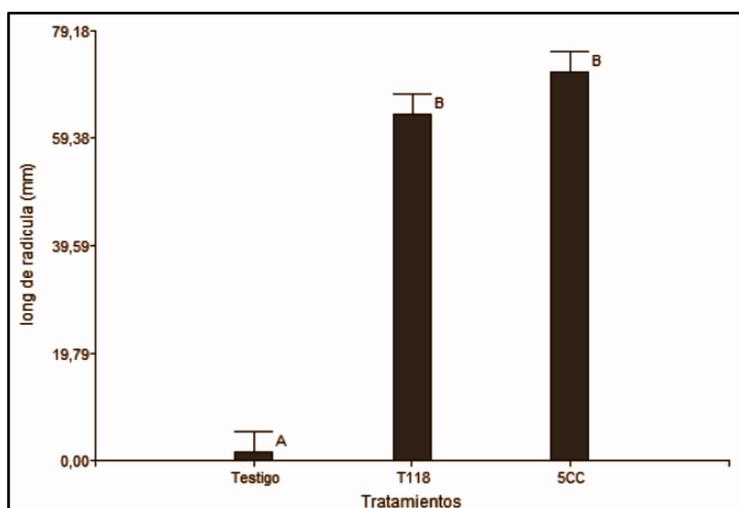


Figura 12. Longitud de la radícula (mm). Los valores seguidos por las mismas letras no son significativamente diferentes según el test LSD a $P = 0,05$.

Para la evaluación de la longitud de parte aérea a los 7 días de germinación, no se cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad, por lo tanto se realizó un análisis no paramétrico de las medianas. Para este análisis se recurrió a la prueba de Kruskal Wallis, donde el p-valor resultó ser $< 0,0001$, por lo tanto hubo diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 11).

Tabla 11. Prueba de Kruskal Wallis para longitud de parte aérea.

Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	C	H	p
5CC	75	19,47	14,59	26,00	2	0,86	78,81	< 0,0001
T118	75	22,43	14,16	26,00				< 0,0001
Testigo	75	0,00	0,00	0,00				

En la Figura 13, se muestra que los tratamientos con *Trichoderma* tuvieron un comportamiento superior en comparación con el testigo para la variable longitud de parte aérea, debido fundamentalmente a que en este último no se observó emergencia de la plúmula durante los 7 días de ensayo. En contraste, los valores medios de la longitud de parte aérea para los tratamientos con el hongo fueron de 28,80 mm para Th5CC y 29,73 mm para Th118.

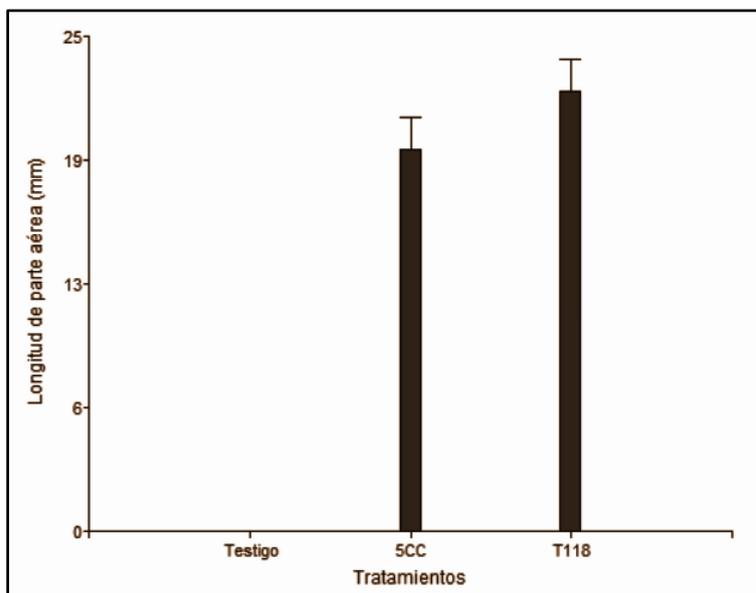


Figura 13. Longitud de la parte aérea (mm).

En la Figura 14, se puede visualizar el detalle de semillas germinadas tratadas con la cepa Th5CC comparadas con el testigo, a los 7 días de ensayo, los cuales fueron similares en comportamiento a la cepa Th118. Además, se registraron valores significativamente mayores en el porcentaje de germinación, longitud de radícula y parte aérea. Asimismo, se observa que para el testigo no se evidencia germinación.



Figura 14. Detalle de la germinación para el tratamiento Th5CC y el testigo.

Como se puede apreciar en la Figura 15, los tratamientos con *Trichoderma* demostraron valores de porcentaje de germinación significativamente mayores al testigo. Los valores variaron del 57 al 79% y del 55 al 77% para las cepas Th5CC y Th118 respectivamente. En el caso del testigo, el porcentaje de germinación fue del 3 al 27%, al ser evaluados a los 3 y 7 días.

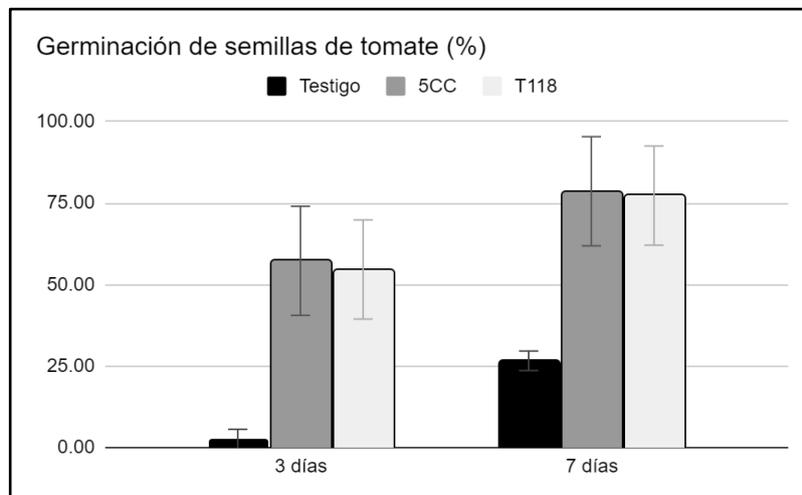


Figura 15. Porcentaje de germinación a los 3 y 7 días para tres tratamientos.

Ensayo en invernáculo

Una vez aplicado el inóculo fúngico al momento de sembrar, en el ensayo que se realizó en plantas de tomate, los parámetros de crecimiento evaluados en plantines de 80 días fueron peso total (g), peso de raíz (g) y peso de parte aérea (g) en fresco y en seco.

Peso fresco

Para la parte aérea en fresco, los resultados del ANOVA en plantines de tomate (Tabla 12) demuestran que existen diferencias significativas entre los tratamientos, dado que el p-valor es menor a 0,05 ($< 0,0383$).

Tabla 12. Análisis de la Varianza de parte aérea en fresco.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,05	2	2,02	3,53	0,0383
Tratamientos	4,05	2	2,02	3,53	0,0383
Error	24,10	42	0,57		
Total	28,15	44			

En la Figura 16, se observa el peso fresco de parte aérea para los tratamientos en dos grupos homogéneos con diferencias significativas. Los valores seguidos por las mismas letras no son significativamente diferentes según el test LSD a $P = 0,05$. Por un lado los plantines en los tratamientos con *Trichoderma* demostraron un mayor peso fresco, con valores medios de 3,05 g y 2,99 g para las cepas Th5CC y Th118 respectivamente. Por otro lado, el valor para el testigo regado con agua estéril fue de 2,26 g.

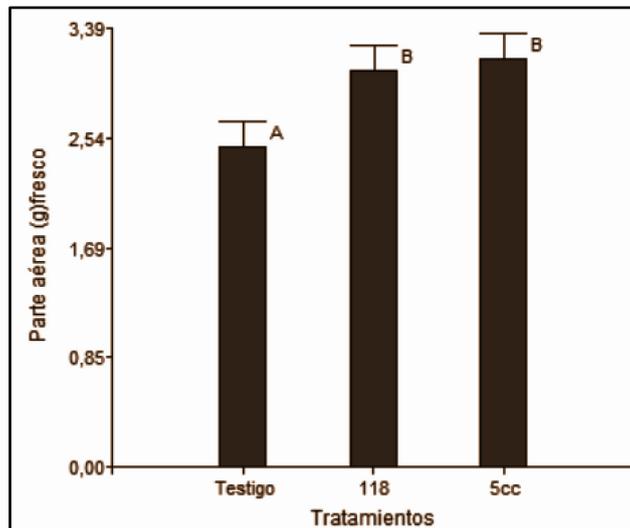


Figura 16. Peso de parte aérea (g) en fresco. Los valores seguidos por las mismas letras no son significativamente diferentes según el test LSD a $P = 0,05$.

Raíz peso fresco (g)

En la determinación de peso de raíz en fresco como no se cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se realizó un análisis no paramétrico. Se usó la prueba de Kruskal Wallis, donde el p-valor resultó ser $< 0,0001$, por lo tanto hubo diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 13).

Tabla 13. Prueba de Kruskal Wallis para peso de raíz en fresco.

Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	C	H	p
Th118	15	0,51	0,16	0,47	1,00	25,77	$< 0,0001$
Th5CC	15	0,86	0,32	0,99			
Testigo	15	0,30	0,12	0,34			

En la Figura 17, se observa el peso fresco de raíz para los tratamientos en tres grupos homogéneos con diferencias significativas. Los valores seguidos por las mismas letras no son significativamente diferentes ($P = 0,05$). En primer lugar, los plantines en los tratamientos con *Trichoderma* demostraron un mayor peso fresco de raíz, con valores medios de 0,79 g para la cepa Th5CC y, en segundo lugar, resultó en 0,49 g para el tratamiento Th118. En tercer lugar, el valor medio para el testigo regado con agua estéril fue de 0,26 g. El mayor desarrollo de raíces se puede observar en la Figura 18.

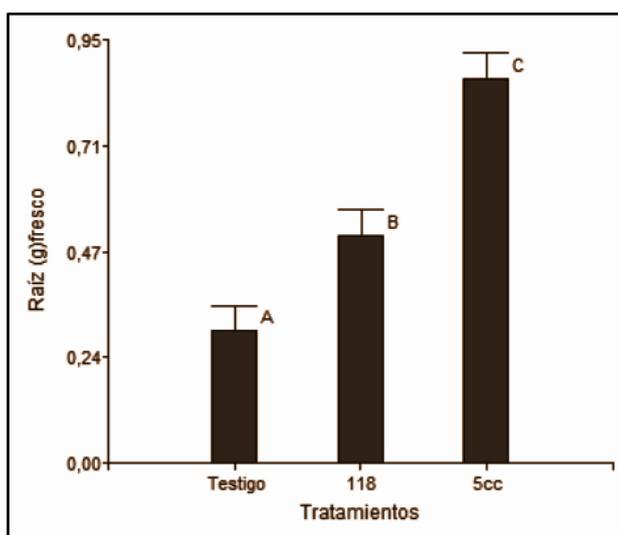


Figura 17. Peso de raíz (g) en fresco. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).



Figura 18. Detalle del crecimiento radical diferencial en los tres tratamientos.

Peso seco

En la evaluación de peso seco de raíz en plantines de tomate, los resultados del ANOVA (Tabla 13) indican que existen diferencias significativas entre los tratamientos, dado que el p-valor es menor a 0,05 ($< 0,0407$).

Tabla 14. Análisis de la Varianza de peso seco de raíz.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,8E-03	2	8,9E-04	3,46	0,0407
Tratamientos	1,8E-03	2	8,9E-04	3,46	0,0407
Error	0,01	42	2,6E-04		
Total	0,01	44			

Como se observa en la Figura 19, para la variable peso seco de la raíz, se obtuvo que el tratamiento Th118 se diferenció estadísticamente respecto del testigo. Los valores seguidos por las mismas letras no son significativamente diferentes según el test LSD a $P = 0,05$. Por lo tanto, se evidenció que el tratamiento con la cepa Th5CC es estadísticamente similar al testigo y al tratamiento Th118. Asimismo, los plantines en los tratamientos con *Trichoderma* demostraron un mayor peso seco de raíz, con valores medios de 0,051 g y 0,042 g para las cepas Th118 y Th5CC respectivamente. En contraste, el valor para el testigo regado con agua estéril fue de 0,032 g.

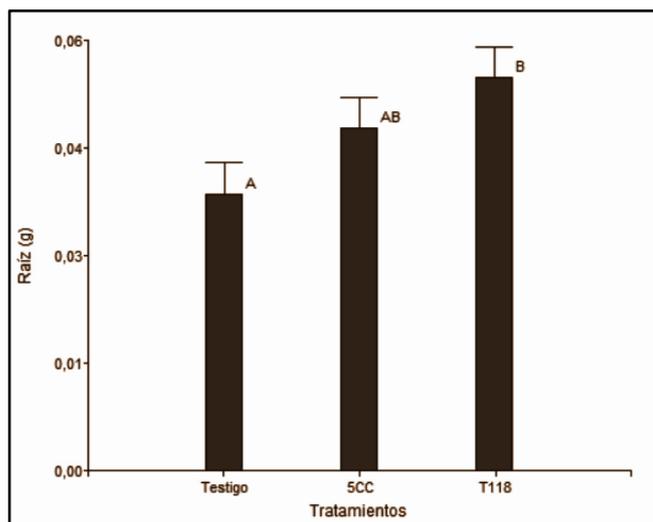


Figura 19. Peso seco de raíz (g). Los valores seguidos por las mismas letras no son significativamente diferentes según el test LSD a $P = 0,05$.

En la Figura 20, se observa el desarrollo aéreo y radical de los plantines de tomate una vez secados hasta peso constante en estufa, a partir de los cuales se hizo la determinación de peso seco.



Figura 20. Detalle de *plantines secados hasta peso constante*.

Finalmente, en la evaluación de peso seco de la parte aérea, los resultados del ANOVA en plantines de tomate (Tabla 14) señalan que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, dado que el p-valor es mayor a 0,05 ($< 0,1302$). De todos modos, los plantines en los tratamientos con *Trichoderma* demostraron un mayor peso seco de la parte aérea, con valores medios de 0,25 g y 0,24 g para las cepas Th118 y Th5CC

respectivamente. En contraste, el valor medio para el testigo regado con agua estéril fue de 0,18 g.

Tabla 15. Análisis de la Varianza de peso seco aéreo ANOVA.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,02	2	0,01	2,14	0,1302
Tratamientos	0,02	2	0,01	2,14	0,1302
Error	0,21	42	4,9E-03		
Total	0,23	44			

DISCUSIÓN

El marchitamiento y cancro bacteriano del tomate provocada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* es una enfermedad de muy difícil control que ocasiona grandes pérdidas de rendimiento, donde los tratamientos químicos no resultan efectivos e incluso implican el riesgo de externalidades tales como los efectos de toxicidad sobre el ambiente, aplicadores y consumidores (Borboa *et al.*, 2010; Pouvova *et al.*, 2008; Zanón, 2009). Entre las estrategias de manejo disponibles se insertan aquellas tendientes a la utilización de antagonistas microbianos como controladores biológicos (Guerrero *et al.*, 2017; Mónaco, 2014; Rolleri *et al.*, 2021). En este contexto, la incorporación de dichos agentes podría significar un cambio de paradigma productivo capaz de producir en cantidad y ofrecer alimentos sanos, inocuos y de alta calidad a mercados cada vez más exigentes.

La especie *Trichoderma harzianum* ha sido hasta el momento el hongo antagonista más utilizado en el control de enfermedades de las plantas (Martinez *et al.*, 2013). Esto es debido a su fácil aislamiento y cultivo. Adicionalmente, poseen una gran plasticidad ecológica, una alta capacidad enzimática para degradar sustratos, un metabolismo versátil, resistencia a inhibidores microbianos y fundamentalmente un buen comportamiento como biocontrolador como consecuencia de una serie de mecanismos de acción para controlar un amplio número de fitopatógenos y estimular el crecimiento de los cultivos (Bogumil *et al.*, 2013; Infante *et al.*, 2009).

Es importante considerar que estos mecanismos son complejos y variados, y están influenciados por factores ambientales tales como el tipo de suelo, la temperatura, el pH, la humedad de la planta, e inclusive por otros miembros de la microflora (Howell, 2003; Benitez *et al.*, 2004). La importancia del conocimiento de los mismos es clave para dilucidar la aptitud de uso y el potencial de aplicación de este antagonista para un manejo integrado de enfermedades más óptimo. En este sentido, Infante *et al.* (2009) afirma que cuando un aislamiento de *Trichoderma* manifiesta varios de modos de acción, más eficiente y duradero será el control sobre el patógeno, ya que a diferencia del manejo químico de las enfermedades, existirá una menor probabilidad de que surjan y prevalezcan formas resistentes.

Como se ha comentado anteriormente, la antibiosis es uno de estos mecanismos de acción, el cual involucra la acción directa de metabolitos con efecto tóxico sobre otros microorganismos sensibles (Infante *et al.*, 2009). Una variable a tener en cuenta es que la

producción de metabolitos tiene cierta especificidad, siendo el efecto antibiótico distinto entre cepas y el grado de sensibilidad de los microorganismos en cuestión (Samuels, 2006).

En el presente estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para el ensayo *in vitro* de metabolitos volátiles. Sin embargo, se reportó una leve tendencia inhibitoria en los últimos dos días del ensayo, donde la cepa de *Trichoderma harzianum* Th118 redujo el crecimiento de Cmm. Se destaca que en el tercer día luego de exponer al patógeno ante el antagonista ocurrió un cambio en la dinámica en la cual evolucionaba comparativamente el efecto inhibitorio de este último. Se observó que los valores medios de crecimiento de Cmm tendieron a asemejarse, por un lado porque el crecimiento del testigo continuó sin restricciones por antibiosis, pero también porque empezó a manifestarse el efecto inhibitorio de *Trichoderma* hacia el tercer día en los tratamientos con las cepas Th5CC y Th118, las cuales presentaron colonias de Cmm con un menor desarrollo. El porcentaje de inhibición del crecimiento hacia el cuarto día fue del 26% y del 4% para los tratamientos Th118 y Th5CC respectivamente. A pesar de no haber observado inhibición del crecimiento en los primeros dos días del ensayo, el efecto inhibitorio en presencia de *Trichoderma* sobre el patógeno aumentó progresivamente, alcanzando valores positivos a partir del tercer y cuarto día de incubación. El mayor crecimiento de Cmm en los primeros días de ensayo podría deberse a una baja concentración de metabolitos volátiles, la cual debe aumentar para que se manifieste un efecto inhibitorio. En lo que respecta a la evaluación de metabolitos difusibles, en el tratamiento con el antagonista se observó una reducción significativa del crecimiento del patógeno durante el primer día. Asimismo, la inhibición por efecto de metabolitos difusibles manifestó un carácter creciente en aquellos tratamientos con *Trichoderma*, siendo máxima alrededor de las 48 h (50%), y levemente descendente en los días posteriores (hasta un 47% al quinto día). Por lo tanto, las colonias bacterianas desarrolladas en ausencia del biocontrolador manifestaron un mayor crecimiento, aproximadamente el doble respecto de los tratados (un 87% más grandes).

Otro mecanismo de acción presentado en *Trichoderma* es la promoción del crecimiento en la planta. Los resultados del ensayo de germinación en este estudio mostraron un efecto significativo de *Trichoderma* en los mecanismos fisiológicos que regulan la germinación. Los tratamientos exhibieron porcentajes de germinación significativos del 79% y 77% para las cepas Th5CC y Th118, respectivamente, en comparación con el 27% en el grupo de control con agua estéril. Consecuentemente, los tratamientos con

Trichoderma tuvieron un comportamiento superior en comparación con el testigo para las variables longitud de parte aérea y longitud de radícula. En el ensayo en invernáculo donde se evaluó el crecimiento radical y aéreo de plantines, se demostró que existe un crecimiento significativo tanto para parte aérea como raíz en fresco, en favor de aquellos tratamientos inoculados al momento de la siembra con las cepas Th118 y Th5CC. Además, el tratamiento Th118 mostró una diferencia significativa superior en cuanto al peso seco de la raíz en comparación con el control. Asimismo, los plantines en los tratamientos con *Trichoderma* demostraron un mayor peso seco de raíz. Ezziyyani *et al.* (2004) obtuvieron resultados similares en pimiento (*Capsicum annuum* L.). Los mismos señalan que en ensayos *in vivo* las plantas crecidas a partir de semillas tratadas mostraron un peso seco superior a las testigo.

Conforme a los estudios previos de Rolleri *et al.* (2021), la cepa Th118 aplicada como riego a los plantines en el momento de la siembra, podría ser una buena alternativa dentro de un plan de manejo integrado de enfermedades en el cultivo de tomate. Se demostró que con dicha cepa, se puede obtener una menor cantidad de hojas afectadas por Cmm y valores promedio más altos de peso de frutos. Resultados similares fueron reportados por Guerrero *et al.* (2017), quienes señalan una reducción de hasta un 50% en la severidad de la sintomatología de Cmm en tomate inoculado con *T. harzianum*. Estos autores observaron también un aumento en el peso seco y fresco de las raíces, lo cual puede correlacionarse con la mayor tolerancia al estrés abiótico, la resistencia a las enfermedades y el mayor potencial de crecimiento.

Finalmente, de acuerdo con los resultados de este estudio, se puede afirmar que la combinación de diferentes mecanismos de acción, como la antibiosis a través de la producción de metabolitos y la promoción del crecimiento, hace que *Trichoderma harzianum* sea una alternativa viable como agente de biocontrol de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en el cultivo de tomate.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos realizados, la hipótesis planteada en este trabajo: “el éxito del control biológico de las cepas de *T. harzianum* se debe a la combinación de diferentes mecanismos de acción como la promoción del crecimiento sobre el hospedante y la producción de metabolitos que afectan el crecimiento de la bacteria patógena”, no se rechaza.

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos realizados, se demostró que el crecimiento bacteriano fue inhibido por el efecto de los metabolitos volátiles del hongo antagonista. En cuanto a los metabolitos difusibles se observó una inhibición estadísticamente significativa para el quinto día de ensayo. Por otro lado, se evidenció la promoción del crecimiento, siendo que el porcentaje de germinación, la longitud de la radícula y parte aérea fue significativamente superior en el ensayo de germinación, mientras que en plantines de tomate se observaron diferencias significativas para las variables peso fresco de raíz y parte aérea, y la variable peso seco de raíz.

BIBLIOGRAFÍA

- Publicaciones periódicas

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

Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7: 249–260.

Bogumił, A., Paszt, L.S., Lisek, A., Trzciński, P. and Harbuzov. A. 2013. Identification of new *Trichoderma* strains with antagonistic activity against *Botrytis cinerea*. *Polish Society for Horticultural Sci.*, 25(2): 123-132.

Borboa Flores, J., Rueda Puente, E. O., Acedo Félix, E., Ponce, J. F., Cruz, M., Grimaldo Juárez, O., García Ortega, A. M. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en el tomate en el Estado de Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32: 319-326.

Borboa Flores, J., Rueda-Puente, E., Acedo-Félix E., Ponce J., Cruz-Villegas, M., García- Hernández , J., Ortega-Nieblas M. 2010. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 12(3): 539-547.

Burokiene, D. 2006. Early detection of *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* in tomato seedlings. *Agron. Res.* 4:151-156.

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

De Souza, J., B.A. Bailey, E. Pomella, C. Erbe, Murphy, H. Bae & P. Hebbar. 2008. Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. Biological Control, 46: 36-45.

EPPO. 2015. EPPO Global Database *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (CORBMI) Consulta: 111/23. <https://gd.eppo.int/taxon/CORBMI/distribution>

Ezziyyani M., Pérez Sánchez C., Sid Ahmed A., Requena M. E. & Candela M. E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) Anales de Biología. 26: 35-45.

Gartemann, K.-H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., y Burger, A. 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: First steps in understanding of virulence of a gram-positive phytopathogenic bacterium. Journal of Biotechnology 106:179-191.

Gleason, M.L., Gitaitis, R.D., y Ricker, M.D. 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. Plant Disease 77: 1069-1076.

Guerrero, R., Mónaco, C., Stocco, M., Rolleri, J., Guerrero N. 2017. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. para el control del cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*) del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

Harman, G., Howell, C., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews. Microbiology, 2(1):43–56. Microbiology, 2(1): 43-56.

Hjeljord, L. & A. Tronsmo. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. En G. Harman, & C. Kubicek, *Trichoderma & Gliocladium*. Bristol: Francis & Taylor. 2: 131-154

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

Infante, D., B. Martínez, N. González & Y. Reyes. 2009 Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.* 1: 14-21

Kawaguchi A. y Tanina, K. 2014. Genetic groups of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* identified by DNA fingerprinting and the effects of inoculation methods on disease development. *European Journal of Plant Pathology* 1: 399–406.

Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1-11.

Milijasevic, S., Todorovic, B., Potocnik, I., Rekanovic, E., & Stepanovic, M. 2009. Effects of copper-based compounds, antibiotics and a plant activator on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouse tomato seedlings. *Pesticide and Phytomedicine*. 24: 19-27.

Ommati, F. & Zaker, M. 2012. In vitro and greenhouse evaluation of *Trichoderma* isolates for biological control of potato wilt disease (*Fusarium solani*). *Archives of Phytopathology and plant protection*, 45 (13):1715-17.

Pouvova, D., Kokoskova, B., Pavela, R., & Rysanek, P. 2008. Effectivity of plant essential oils against *Clavibacter michiganensis*, in vitro. *Zemdirbyste Agriculture*, 95(3): 440-446.

Rolleri, J., Stocco M., Moya, P. y Mónaco, C. 2021. Posibilidades del uso de *Trichoderma harzianum* en el biocontrol del marchitamiento y cancro bacteriano del tomate. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*. 120(2):1-12.

Samuels, G.J., 2006. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*. 96: 195-206.

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

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

Stocco M., Mónaco C., Cordo C. 2010. A comparison of preservation methods for *Trichoderma harzianum* cultures. Rev Iberoam Micol 27:213

Tancos, M. A., Chalupowicz, L., Barash, I., Manulis-Sasson, S. y Smart, C. D. 2013. Tomato fruit and seed colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through external and internal routes. Applied and Environmental Microbiology 79:6948-6957.

Vipin P, Ashok A, Singh G., Verma A., Sharma I. & Singh Saharan, M. 2014. Efficacy of foliar spray of *Trichoderma* isolates against *Fusarium graminearum* causing head blight (head scab) of wheat. Journal of Wheat Research 6: 1-10

- **Capítulos de libros**

Mónaco C. 2014. Principios de Manejo Ecológico de Enfermedades de cultivos. Capítulo 12. En: Libros de Cátedra. Agroecología: bases teóricas para el diseño y manejo de Agroecosistemas sustentables. Eds. Sarandon S., Flores C. Editorial EDULP Editorial de la Universidad de La Plata pp 314-341.

- **Libros**

Agrios, G. 2005. *Plant Pathology. 5th Edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam, 26-27398-401.*

Argerich, C., Troilo, L., Rodriguez, M., Izquierdo, J., Strassca, M., Balcaza, L., & Iribarren, M. 2011. Buenas Prácticas agrícolas en la cadena de Tomate. (A. Argerich, & L. Troilo, Edits.) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación – FAO.

CASAFE, 2015. Guía de productos Fitosanitarios 2017-2019.

Flores, C. 2012. Enfermedades de tomate: guía de consulta. INTA.

Polack, A., & Mitidieri, M. 2005. Producción de tomate diferenciado: Protocolo preliminar de manejo integrado de plagas y enfermedades. INTA Documento Divulgativo, 13.

Sandoval, C. 2004. Manual técnico de manejo integrado de enfermedades en cultivos hidropónicos (1 ed.). FAO; Universidad de Talca.

Viteri, M., Ghezán, G., & Iglesias, D. 2013. Tomate y Lechuga: producción, comercialización y consumo. INTA, Estudio socioeconómico de los sistemas agroalimentarios y agroindustriales N°14. 165 p.

- **Tesis, informes, etc.**

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

Lozano, J. 2012. La producción de hortalizas en Argentina. Informe Corporación del Mercado Central de Buenos Aires. Recuperado el 13 de Noviembre de 2015, de http://www.mercadocentral.gob.ar/ziptecnicas/la_produccion_de_hortalizas_en_argentina.pdf. 29 pp.

Rolleri, J. 2015. Cancro bacteriano del tomate: diagnóstico y prevención de su dispersión en el cultivo. M. Sc. Tesis. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina, 77 pp.

SAGyP, 2023 Producción de tomate en Argentina Evolución del cultivo hasta la temporada 2021/22. Recuperado de www.argentina.gob.ar/sites/default/files/produccion-tomate-en-argentina-hasta-2021-2022.pdf. Último acceso 10 de mayo del 2023. 21 pp.

Vera Bahima, J. 2020. Hongos causantes de la mancha gris de la hoja en *Lycopersicon esculentum* Mill., su variabilidad y el rol de la resistencia sistémica adquirida (RSA) en la reducción de su incidencia. Tesis doctoral. Facultad de Cs Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata.

Zanón Alonso, MJ. 2009. Efecto de la biofumigación y biosolarización en el control de agentes fitopatógenos [Tesis doctoral no publicada]. Universitat Politècnica de València.