



UNL • FACULTAD DE
CIENCIAS AGRARIAS

Tesis presentada para optar por el grado académico de

DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

**“CONTROL BIOLÓGICO DE *Verticillium dahliae* KLEB.
CON CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. DE LA
PROVINCIA DE CATAMARCA”**

Ing. Agr. María Valeria González Basso

DIRECTOR: *Dr. Gustavo Ribero*

Esperanza – Santa Fé

2025

DEDICATORIA

A mi hija, Martina

A mis padres y hermanas

A la memoria de mis abuelos

“CONTROL BIOLÓGICO DE *Verticillium dahliae* KLEB. CON CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. DE LA PROVINCIA DE CATAMARCA”

RESUMEN

El género fúngico *Trichoderma* spp. es uno de los microorganismos más estudiados y utilizados como agente de biocontrol. Mientras que *Verticillium dahliae* es un hongo fitopatógeno que causa grandes problemas, afectando la sanidad de diferentes cultivos, como por ejemplo en el olivo (*Olea europaea* L.) en el cual produce la verticilosis del mismo. Esta enfermedad produjo grandes pérdidas económicas tanto a nivel mundial como regional; en la zona olivarera de nuestro país afecta las provincias de Catamarca y La Rioja, entre otras. En este trabajo se partió del supuesto que cepas nativas de *Trichoderma* tendrían capacidad de controlar biológicamente a *Verticillium dahliae* Kleb y su acción antagónica estaría condicionada por la especificidad de la cepa y por factores abióticos (temperatura, humedad, nutrientes, tipos de suelo). Por lo cual, se planteó: aislar, identificar y caracterizar funcionalmente cepas nativas del hongo *Trichoderma* con actividad biocontroladora sobre el fitopatógeno *V. dahliae* de la provincia de Catamarca y zonas aledañas productoras de olivo. Se tomaron muestras de suelo y de material vegetal para realizar el aislamiento de los microorganismos antagonistas y del fitopatógeno, respectivamente. Se efectuaron ensayos microbiológicos *in vitro* y en condiciones de cámara de cultivo e invernáculo, en los que se evaluaron características de crecimiento y desarrollo de cepas de *Trichoderma* spp. aisladas, y las cepas promisorias como biocontroladoras se enfrentaron con el fitopatógeno para evaluar la capacidad antagónica, en condiciones *in vivo* utilizando plantines de olivo var. manzanilla. Se determinó que la cepa TM5A (*Trichoderma hamatum*) ejerció actividad biocontroladora y se constató la presencia de hongos micorrícicos nativos colonizando simultáneamente la raíz de los plantines de olivo con cepas de *V. dahliae* y *Trichoderma*. Se evidenció el biocontrol ejercido por la cepa de TM5A en consorcio con hongos micorrícicos nativos presentes y la compatibilidad entre estos hongos tuvo un efecto estimulante del crecimiento vegetal. A partir de los resultados obtenidos se destaca la importancia de este estudio como base para un potencial control biológico de enfermedades radicales que afectan a cultivos de interés regional.

PALABRAS CLAVES: Olivo; Cepas nativas; Antagonismo, Consorcio microbiano.

“BIOLOGICAL CONTROL OF *Verticillium dahliae* KLEB. WITH STRAINS NATIVE OF *Trichoderma* spp. FROM THE PROVINCE OF CATAMARCA”

SUMMARY

The fungal genus *Trichoderma* spp. is one of the most studied microorganisms used as a biocontrol agent. While *Verticillium dahliae* is a phytopathogenic fungus that causes great problems, affecting the health of different crops, such as olive trees (*Olea europaea* L.) in which it produces verticillium wilt. This disease causes great economic losses both globally and regionally, in the olive growing area of our country it affects the provinces of Catamarca and La Rioja, among others. In this work, it was assumed that native strains of *Trichoderma* will have the capacity to biologically control *Verticillium dahliae* Kleb and its antagonistic action will be conditioned by the specificity of the strain and by abiotic factors (temperature, humidity, nutrients, soil types). Therefore, it was proposed: to isolate, identify and functionally characterize native strains of the *Trichoderma* fungus with biocontrolling activity on the phytopathogen *V. dahliae* from the province of Catamarca and surrounding olive producing areas. Soil and plant material samples were taken to isolate the antagonistic microorganisms and the plant pathogen, respectively. Microbiological assays were carried out *in vitro* and under in culture chamber and greenhouse conditions in which growth and development characteristics of *Trichoderma* spp. isolates were evaluated, and the promising strains as biocontrollers were confronted with the phytopathogen to evaluate the antagonistic capacity, under *in vivo* conditions olive var. chamomile. It was determined that the TM5A (*Trichoderma hamatum*) strain exerted biocontrolling activity and the presence of native mycorrhizal fungi was confirmed, simultaneously colonizing the root of olive seedlings with strains of *V. dahliae* and *Trichoderma*. The biocontrol exerted by the TM5A strain in consortium with native mycorrhizal fungi was evidenced and the compatibility between these fungi had a stimulating effect on plant growth. Based on the results obtained, the importance of this study as a basis for a potential biological control of root diseases affecting crops of regional interest is highlighted.

KEYWORDS: Olive tree; Native strains; Antagonism; Microbial consortium.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	- 1 -
I.1. Control biológico	- 1 -
I.1.1. Definición e importancia	- 1 -
I.1.2. Interacción planta – patógeno – biocontrolador	- 5 -
I.1.3. Usos del control biológico	- 8 -
I.1.4. Tipos de control biológico	- 8 -
I.1.4.1. Biocontrol con extractos vegetales	- 8 -
I.1.4.2. Biocontrol con microorganismos.....	- 9 -
I.2. <i>Trichoderma</i> spp.	- 11 -
I.2.1. Generalidades	- 11 -
I.2.2. Modo de acción como antagonista	- 13 -
I.2.2.1. Micoparasitismo	- 14 -
I.2.2.2. Antibiosis.....	- 15 -
I.2.2.3. Competencia por sustrato	- 15 -
I.2.3. Usos de <i>Trichoderma</i>	- 16 -
I.2.3.1. Como biorremediador	- 16 -
I.2.3.2. Agrícola	- 16 -
I.3. <i>Verticillium dahliae</i> Kleb	- 20 -
I.3.1. Generalidades	- 20 -
I.3.1.1. Morfología de <i>V. dahliae</i>	- 21 -
I.3.1.2. Patogenia.....	- 24 -
I.3.1.3. Hospedantes	- 25 -
I.3.2. Enfermedades principales	- 26 -
I.3.2.1. <i>Verticillium</i> en girasol.....	- 26 -
I.3.2.2. Verticilosis del olivo	- 26 -
I.4. Hipótesis.....	- 28 -

I. 5. Objetivo general	- 29 -
I. 6. Objetivos específicos.....	- 29 -
MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 29 -
II.1. Muestreo y aislamiento de <i>V. dahliae</i>	- 29 -
II.1.1. Obtención de cultivos puros y selección de cepas	- 31 -
II.1.2. Identificación morfológica y conservación de cepa.....	- 31 -
II.1.3. Identificación molecular.....	- 32 -
II.2. Aislamiento y selección de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	- 32 -
II.2.1. Muestreo de suelos	- 32 -
II.2.2. Preparación del sustrato y siembra de suelo.....	- 32 -
II.2.3. Aislamiento, identificación morfológica y conservación de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	- 33 -
II.3. Biocontrol en condiciones <i>In Vitro</i>	- 34 -
II.3.1. Preparación de cultivos madres de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	- 34 -
II.3.2. Evaluación de crecimiento de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en Agar Nutritivo (AN) (<i>Ensayo 1</i>)	- 35 -
II.3.3. Evaluación de crecimiento y desarrollo de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en diferentes medios de cultivo (<i>Ensayo 2</i>).....	- 35 -
II.3.4. Preparación de cultivos madre de la cepa del fitopatógeno	- 36 -
II.3.5. Evaluación de crecimiento de cepas antagónicas de <i>Trichoderma</i> spp. con <i>V. dahliae</i> en diferentes medios de cultivo artificiales (<i>Ensayo 3</i>)	- 37 -
II.3.6. Identificación Molecular	- 38 -
II.3.7. Ensayos de cultivo dual:.....	- 38 -
II.3.7.a. Ensayo de cultivo dual con cepas de <i>Trichoderma</i> spp. (<i>Ensayo 4</i>)	- 38 -
II.3.7.b. Ensayo de cultivo dual en 2 fotoperíodos y 2 pH diferentes (<i>Ensayo 5</i>) ..	- 40 -
II.3.8. Ensayo de evaluación de metabolitos volátiles en 2 fotoperíodos y 2 pH diferentes (<i>Ensayo 6</i>)	- 41 -
II.3.9. Microcultivos (<i>Ensayo 7</i>).....	- 42 -

II.4. Biocontrol en condiciones controladas en cámara de cultivo y en invernáculo-	43
-	
II.4.1. Preparación del inóculo.....	43 -
II.4.1.a. Preparación de cultivos madre de cepas antagonistas y del fitopatógeno .-	43 -
II.4.1.b. Preparación de suspensiones conidiales.....	43 -
II.4.1.c. Multiplicación de cepa antagonista.....	44 -
II.4.1.d. Preparación de inoculante.....	44 -
II.4.2. Inoculación de material vegetal.....	45 -
II.4.2.a. Evaluación de cepa nativa seleccionadas, de <i>T. hamatum</i> (TM5A) como antagonista y <i>V. dahliae</i> como fitopatógeno en plantines de olivo, var. manzanilla en cámara de cultivo.....	45 -
II.4.2.b. Evaluación de cepa nativa seleccionada, como antagonista y <i>V. dahliae</i> como fitopatógeno en plantines de olivo, var. manzanilla en invernáculo.....	47 -
II.4.2.b.1. Evaluación sanitaria de plantines de olivos al inicio del ensayo.....	47 -
II.4.2.b.2. Inoculación de plantines de olivo.....	47 -
II.4.2.b.3. Constatación de presencia de <i>V. dahliae</i> en plantines de olivo y otras estructuras fúngicas.....	48 -
II.4.3. Siembra de material vegetal para reaislamiento de <i>V. dahliae</i> en olivo.....	49 -
RESULTADOS.....	49 -
III.1. Muestreo y aislamiento de <i>V. dahliae</i>	49 -
III.1.1. Obtención de cultivos puros y selección de cepas.....	50 -
III.1.2. Identificación morfológica y conservación de cepa.....	52 -
III.1.3. Identificación molecular.....	54 -
III.2. Aislamiento y selección de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	54 -
III.2.1. Muestreo de suelos.....	54 -
III.2.3. Aislamiento, identificación morfológica y conservación de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	55 -
III.3. Biocontrol en condiciones <i>In Vitro</i>	58 -

III.3.2. Evaluación de crecimiento de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en Agar Nutritivo (AN) (<i>Ensayo 1</i>).....	- 58 -
III.3.3. Evaluación de crecimiento y desarrollo de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en diferentes medios de cultivo (<i>Ensayo 2</i>).....	- 59 -
III.3.5. Evaluación de crecimiento de cepas antagonicas de <i>Trichoderma</i> spp. con <i>V. dahliae</i> en diferentes medios de cultivo artificiales (<i>Ensayo 3</i>)	- 64 -
III.3.6. Identificación Molecular	- 67 -
III.3.7. Ensayos de cultivo dual:	- 68 -
III.3.7.a. Ensayo de cultivo dual con cepas de <i>Trichoderma</i> spp. (<i>Ensayo 4</i>).....	- 68 -
III.3.7.b. Ensayo de cultivo dual en 2 fotoperíodos y 2 pH diferentes (<i>Ensayo 5</i>).-	68 -
III.3.8. Ensayo de evaluación de metabolitos volátiles en 2 fotoperíodos y 2 pH diferentes (<i>Ensayo 6</i>)	- 73 -
III.3.9. Microcultivos (<i>Ensayo 7</i>).....	- 75 -
III.4. Biocontrol en condiciones controladas en cámara de cultivo y en invernáculo ...	- 77 -
III.4.2. Inoculación de material vegetal	- 77 -
III.4.2.a. Evaluación de cepa nativa seleccionada, como antagonista y <i>V. dahliae</i> como fitopatógeno en plantines de olivo var. manzanilla en cámara de cultivo	- 77 -
III.4.2.b. Evaluación de cepa nativa seleccionada, como antagonista y <i>V. dahliae</i> como fitopatógeno en plantines de olivo, var. manzanilla en invernáculo.....	- 79 -
III.4.2.b.1. Evaluación sanitaria de plantines de olivos al inicio del ensayo	- 79 -
III.4.2.b.2. Inoculación de plantines de olivo	- 80 -
III.4.2.b.3. Constatación de presencia de <i>V. dahliae</i> en plantines de olivo y otras estructuras fúngicas.....	- 81 -
III.4.3. Siembra de material vegetal para reaslamiento de <i>V. dahliae</i> en olivo	- 85 -
IV. DISCUSIÓN.....	- 86 -
V. CONCLUSIONES.....	- 91 -
VI. BIBLIOGRAFÍA	- 94 -
VII. ANEXO	- 114 -

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
1	Características de microorganismos biocontroladores.	10
2	Taxonomía del género <i>Trichoderma</i> .	11
3	Características morfológicas del género <i>Trichoderma</i> spp.	12
4	Taxonomía del género <i>Verticillium</i> .	21
5	Características morfológicas de <i>V. dahliae</i> .	23
6	Características de los microsclerocios de <i>V. dahliae</i> según el tipo de aislado.	24
7	Incidencia de minerales en el accionar de <i>V. dahliae</i> .	24
8	Medios de cultivo y sustrato agroindustrial utilizados para evaluar el crecimiento y desarrollo de <i>Trichoderma</i> spp.	36
9	Escala de clases de Bell <i>et al.</i> (1982).	40
10	Tratamientos planteados para evaluación de antagonismo con 2 fotoperíodos (8 y 16 h luz) y 2 pH (4,5 y 6,5).	41
11	Muestreos realizados en Agropecuaria Arphi S.A., provincia de Catamarca en los meses de septiembre – octubre.	51
12	Mediciones micrométricas promedio de las estructuras de <i>V. dahliae</i> con objetivo 40X.	53
13	Aislamientos de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. de la provincia de Catamarca.	57
14	Crecimiento de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en AN (Agar Nutritivo). En Lab. de Fitopatología. Catamarca.	59
15	Descripción cualitativa del crecimiento de las cepas de <i>Trichoderma</i> en diferentes medios de cultivo. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	60
16	Dinámica del crecimiento de diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> en distintos medios de cultivo.	63
17	Identificación Molecular y Número de Identificación (Genbank) de cepas antagonistas de <i>Trichoderma</i> .	68

18	Porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC), Tiempo de contacto (TC) y Clase de 3 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. vs. <i>V. dahliae</i> .	69
19	Antagonismo <i>in vitro</i> con diferentes fotoperíodos (8 y 16 h luz) y pH (4,5 y 6,5) con <i>V. dahliae</i> y TM5A (<i>T. hamatum</i>). En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	70
20	Antagonismo <i>in vitro</i> con diferentes fotoperíodos (8 y 16 h luz) y pH (4,5 y 6,5) con <i>V. dahliae</i> y TVL1 (<i>T. asperellum</i>). En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	71
21	Antagonismo <i>in vitro</i> con diferentes fotoperíodos (8 y 16 h luz) y pH (4,5 y 6,5) con <i>V. dahliae</i> y TPam3 (<i>T. asperellum</i>). En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	72
22	Evaluación de metabolitos volátiles con diferentes fotoperíodos (8 y 16 h luz) y pH (4,5 y 6,5) con cepas de <i>Trichoderma</i> sp. (TM5A, TPam3 y TVL1) frente a <i>V. dahliae</i> . En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	74
23	Evaluación de la interacción hifal con diferentes fotoperíodos (8 y 16 h luz) y pH (4,5 y 6,5) entre cepas antagonistas de <i>T. asperellum</i> (TVL1 y TPam3) y <i>T. hamatum</i> (TM5A) con <i>V. dahliae</i> . En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	77
24	Crecimiento de plantines de olivo var. manzanilla en sustrato de suelo estéril (100 %), expresado en: longitud de raíz (Long raíz) y longitud de parte aérea (Long aérea), peso fresco de raíz (PF raíz) y de parte aérea (PF aéreo) y peso seco de raíz (PS raíz) y de parte aérea (PS aérea) de los diferentes tratamientos. Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	78
25	Crecimiento de plantines de olivo var. manzanilla en sustrato suelo y arena estéril (1:1), expresado en: longitud de raíz (Long raíz), longitud de parte aérea (Long aérea), peso fresco de raíz (PF raíz) y de parte aérea (PF aéreo), peso seco de raíz (PS raíz) y de parte aérea (PS aérea). En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	79

26	Crecimiento de plantines de olivo var. manzanilla en sustrato suelo estéril con perlita (1:1), expresado en: longitud de raíz (Long raíz), longitud parte aérea (Long aérea), peso fresco de raíz (PF raíz) y parte aérea (PF aérea), peso seco de raíz (PS raíz) y parte aérea (PS aérea). Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	80
27	Crecimiento en plantines de olivo variedad manzanilla, luego de inocularlos con el fitopatógeno <i>V. dahliae</i> y el antagonista M5A (<i>T. hamatum</i>). En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	82
28	Colonización fúngica en raíces de olivo procedentes de los tratamientos de inoculación. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	83
29	Presencia de cepas nativas <i>V. dahliae</i> y TM5A en plantines de olivo en invernáculo. Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	86
30	Muestreo de material vegetal para el aislamiento de <i>V. dahliae</i> en las provincias de Catamarca y La Rioja.	115
31	Muestreo de suelos para el aislamiento de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> , de la prov. de Catamarca.	116
32	Análisis químico para determinar pH, conductividad eléctrica, materia orgánica, N, F y K, de orujos de vid (<i>Vitis vinífera</i>) tinta y blanca.	117
33	Análisis de actividad biológica de orujos de vid (<i>Vitis vinífera</i>) tinta y blanca.	118

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Factores que afectan las plantas. (Fuente: https://ciencia.unam.mx/leer/943/bienvenido-2020-ano-internacional-de-la-sanidad-vegetal-por-la-salud-de-las-plantas).	3
2	Interacción Planta – Fitopatógeno – ACB – Microorganismos rizosféricos vs. Factores abióticos (Fuente: https://docplayer.es/58898171-Interaccion-de-microorganismos-beneficos-en-plantas.html).	4
3	Acción de ACB sobre las plantas huésped.	5
4	Factores predisponentes para que la planta se enferme o encuentre sana.	7
5	Mecanismos de acción molecular de agentes fitopatógenos vs. reacción molecular de defensa de la planta hospedante (Fuente: https://www.encuentrosenlabiologia.es/2016/03/la-coevolucion-como-un-sistema-de-defensa-en-la-interaccion-planta-patogeno/). Referencias: PTI : PAMP-triggered immunity; PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns; ETI : Effector Triggered Immunity.	8
6	Ciclo de patogénesis causada por <i>V. dahliae</i> (Fuente: Carrero Carrón, 2016).	26
7	Elección y recolección de muestra vegetal de olivo: A y B) olivo con necrosis sectorial; C) rama con hojas con clorosis apical; D) corte transversal de ramas de olivo con presencia de tejido interno color castaño. Finca Arphi S.A. Valle Viejo, Catamarca.	32
8	Desinfección y siembra de muestra vegetal de olivo. A : desinfección de ramitas, con hipoclorito de sodio; B : descortezamiento superficial de ramitas; C : tejido descortezado (córteX - xilema) y D : desinfección	32

	superficial de material vegetal a sembrar. E: siembra de material vegetal en APG. Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	
9	Orujos secos de vid A: uva tinta; B: uva blanca.	34
10	Preparación de orujo de vid blanca y tinta para el aislamiento de <i>Trichoderma</i> . A: hidratación; B: escurrimiento y C: envasado de orujo en frascos de vidrio.	35
11	Diagrama de flujo indicativo de la secuencia de ensayos realizados.	36
12	Esquema de siembra de tacos de diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> spp. para evaluar crecimiento y desarrollo en diferentes medios de cultivo (cada color representa una cepa).	38
13	Esquema de siembra de tacos de diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> spp. para evaluar el antagonismo frente al fitopatógeno (cada color representa una cepa, siendo el rojo, <i>V. dahliae</i>).	39
14	Esquema de la ubicación de los tacos de las diferentes colonias en las cajas de Petri. <u>Referencias:</u> rojo: <i>V. dahliae</i> y verde: <i>Trichoderma</i> .	44
15	Preparación de inóculos de cepa antagonista <i>T. hamatum</i> (TM5A) y del fitopatógeno <i>V. dahliae</i> .	46
16	Evaluación de plantines de olivo var. manzanilla: long de plantines y peso fresco (PF). En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	48
17	Colonias de <i>V. dahliae</i> en APG A: micelio blanco algodonoso, B: colonias en forma de estrellas, formadas por microesclerocios. Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	51
18	Campo olivícola muestreado. Recolección de muestras con síntomas de verticilosis, de la que se obtuvo la cepa aislada. Agropecuaria Arphi S.A. Valle Viejo. Catamarca.	53

19	Observación morfológica de la colonia, con microscopio estereoscópico A:2.0 X.	55
20	Microfotografía de <i>V. dahliae</i> : A: fructificación, A:40X (<i>f</i> = <i>fialides</i> , <i>c</i> = <i>conidios</i> , <i>Hf</i> = <i>hifa</i>). B: Colonia de microesclerocios, A:2.0 X. C: microesclerocio, A: 10 y 40X.	55
21	Obtención de las cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. A: Orujo con crecimiento de colonias de <i>Trichoderma</i> ; B: Siembra en APG del orujo que contiene la <i>Trichoderma</i> ; C: Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp. Lab. Fitopatología. UNCa. Catamarca.	56
22	Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. formando anillos concéntricos Lab. de Fitopatología, UNCa. Catamarca.	57
23	Pigmentos característicos, difusibles en el medio de cultivo APG, de las diferentes cepas aisladas de <i>Trichoderma</i> spp.: A: TM15C (pigmento color levente amarillenta); B: TM5A (pigmento color blanquecino); C: TM15B (pigmento color ámbar) y D: TM24 (pigmento color verde amarillento). Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	58
24	Observación de <i>Trichoderma</i> (<i>f</i> = <i>fialides</i> ; <i>c</i> = <i>conidios</i> ; <i>mic</i> = <i>micelio</i>), con microscópico óptico, A: 10 y 40 X. Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	59
25	Conservación de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en pico de flauta con medio de cultivo APG.	59
26	Cepas de <i>Trichoderma</i> spp. con crecimiento en medio de cultivo agar nutritivo (AN), A: TM5A; B: TA203. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	60
27	Crecimiento de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en medios de cultivo: A y B: Amilolítico (Amil) y C y D: Sabouraud (Sab). A y C: crecimiento del anverso y B y D: crecimiento del reverso, cepas: TPaM3, TN-nogal, TAC2, TSN1.	63

28	Evaluación de crecimiento de cepas antagónicas de <i>Trichoderma</i> spp. frente al fitopatógeno <i>V. dahliae</i> , en medio de cultivo APG, a los días 1 a 3.	66
29	Evaluación de crecimiento de cepas antagónicas de <i>Trichoderma</i> spp. frente al fitopatógeno <i>V. dahliae</i> , en medio de cultivo Sabouraud, a los días 1 a 3.	67
30	Evaluación de crecimiento de cepas antagónicas de <i>Trichoderma</i> spp. frente al fitopatógeno <i>V. dahliae</i> , en medio de cultivo HyL, a los días 1 a 3.	67
31	Crecimiento de cepas antagonistas de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>V. dahliae</i> , en diferentes medios de cultivo: A y B : APG, C y D : Sab y E y F : HyL; cepas: TPam3, TM5A, TAC2 y TSN 1. Lab. de Fitopatología, UNCa. Catamarca.	68
32	Ensayo de evaluación de antagonismo de <i>Trichoderma asperellum</i> (TVL1): A : Fotoperíodo 16 h con pH 6,5; B : Fotoperíodo 16 h con pH 4,5; C : Fotoperíodo 8 h con pH 6,5 y D : Fotoperíodo 8 h con pH 4,5. Y la cepa de <i>Trichoderma asperellum</i> (TPam3): E : Fotoperíodo 8 h con pH 6,5; F : Fotoperíodo 8 h con pH 4,5; G : Fotoperíodo 16 h con pH 6,5 y H : Fotoperíodo 16 h con pH 4,5. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	74
33	Fialides formando verticilos con presencia de conidios, de <i>V. dahliae</i> en condiciones de 8 h luz y pH 6,5 A:10X. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	78
34	Acción antagónica de la TM5A: A : coiling o enrollamiento, A:10X; B : micoparasitismo, emisión de haustorios, A:40X. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca. <u>Referencias</u> : Hf a : Hifa antagonista, Hf p : Hifa patógeno.	79
35	Colonización de hongos endofíticos oscuros (ESO), micorrizas vesículo arbusculares (MVA) y hongos micorrícicos vesiculares (HMV) en raíces de olivo. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	82

36	Tratamiento T3 (con <i>V. dahliae</i>). A: Colonización fúngica de <i>V. dahliae</i> . B: colonización de hongos endofíticos oscuros (ESO) y micorrizas vesículo arbusculares (MVA); C: colonización de hongos endofíticos oscuros (ESO) y hongos micorrícicos vesiculares (HMV) en raíces de olivo. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca. <u>Referencia:</u> Hifa del patógeno (Hf p).	85
37	Tratamiento T1 (testigo). A-B: Colonización de hongos endofíticos oscuros (ESO) y micorrizas vesículo arbusculares (MVA); B: colonización de hongos endofíticos oscuros (ESO) en raíces de olivo. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	85
38	Tratamiento T4 (consociado, Vert + TM5A). A-B: Colonización de hifas del antagonista (Hf a) TM5A. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	86
39	Tratamiento T3 (contról de Vert.) hifas melanizadas y hongos endófitos septados oscuros (ESO). En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.	86

ABREVIATURA, SIGLAS Y SÍMBOLOS

A: Antagonista

AC: Área de Crecimiento

ACB: Agentes de Control Biológico

APG: Papa Glucosa Agar

AN: Agar Nutritivo

Amil: Amilolítico

c: Conidios

C: coilling

Ca: Calcio

CC: capacidad de campo

cf: Conidióforos

Cd: Cadmio

CB: Control Biológico

CF: Colonizacion fungica

°C: Grado Centígrado o Grado Celsius

cm: Centímetro

CP: Crecimiento en paralelo

Cr: Cromo

CZP: Czapek

D: Defoliante

Ø: Diámetro

E: Entrecruzamiento

ESO: Endofíticos septados oscuro

ETI: Effector Triggered Immunity

ET: Etileno

F: Fiálides

Fotop.: Fotoperíodo

FAHC: Frecuencia de aparición de hifas cenocíticas

FAHT: Frecuencia de aparición de hifas tabicadas

FAV: Frecuencia de aparición de vesiculares

g: Gramo

h: horas

H: Haustorio

Hf: Hifas

Hf a: Hifa antagonista

Hf p: Hifa patógeno

HT: hifas tabicadas

ha.: Hectárea

HMV: Hongos Micorrízicos vesiculares

HyL: Hongo y Levadura

H°: Humedad

HR: Humedad relativa

IAF: Índice de Área Foliar

JA: Ácido jasmónico

K: Potasio

Long: longitud

m: metro

mic: Micelio

M: molar

Mg: Magnesio

MIPE: Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades

ME: Microesclerocios

mm: Milímetros

m.o.: materia orgánica

MP: micoparasitismo

msnm: Metros sobre el nivel del mar

mm/año: Milímetros por año

mL: Mililitro

min: Minuto

MVA: Micorrizas vesículo del tipo arbusculares

µm: Micrómetro

NBS – LRR: Nucleotide-binding siteleucine-rich repeats

N: Nitrógeno

ND: No Defoliante

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NH₃: Amoniac

PAMPs: Pathogen Associated Molecular Patterns

P: patógeno

pH: Potencial Hidrógeno

PIC: Porcentaje de inhibición del crecimiento

PTI: (PAMP-triggered immunity)

PF: Peso Fresco

PS: Peso Seco

RLK: Receptor Like Kinasa

rpm: revoluciones por minuto

SAB: Sabouraud

SA: Ácido Salicílico

seg: segundos

T°: temperatura

TC: Tiempo de Contacto

Trich: *Trichoderma*

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

var.: variedad

VB: Vid blanca

V. dahliae: *Verticillium dahliae*

Vert: *Verticillium dahliae*

VO: Verticilosis del olivo

VC: Verde claro

VOs: Verde oscuro

VT: Vid Tinta

X: insipiente

XX: escaso

XXX: denso

XXXX: abundante

“CONTROL BIOLÓGICO DE *Verticillium dahliae* KLEB. CON CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. DE LA PROVINCIA DE CATAMARCA”

INTRODUCCIÓN

I.1. Control biológico

I.1.1. Definición e importancia

El Control Biológico (CB) con microorganismos antagonistas comenzó a ser investigado de forma constante a partir de los años 80 (Guédez *et al.*, 2009). Dentro del Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades (MIPE), el uso de Agentes de Control Biológico (ACB) se ha considerado una importante alternativa sustentable para mitigar los efectos negativos que refieren a la calidad y productividad de los cultivos agrícolas (Villarreal Delgado *et al.*, 2018).

El CB consiste en el control de organismos o microorganismos perjudiciales a través de organismos o microorganismos benéficos. En los años 70 definieron al CB como “la reducción de la densidad de inóculo o de la actividad de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedero o de antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar” Mondino (2006). Posteriormente, en el año 2001 Eilenberg, Hajek, & Lomer lo definieron como “el uso de organismos vivos para suprimir una plaga, para reducir su población o el impacto de ésta, haciéndola menos abundante o dañina” (Cotes, 2018).

Por otro lado, hace ya algunos años que la agricultura se ha vuelto dependiente del uso de plaguicidas químicos para controlar organismos fitopatógenos, lo que provoca resistencia en plagas, variación de la microflora microbiana, contaminación ambiental debido a la acumulación de toxinas en niveles nocivos para seres humanos y el ecosistema (Wisniewski *et al.*, 2007; Guédez *et al.*, 2009; Goudjal *et al.*, 2014; Hernández Melchor *et al.*, 2019; Sood *et al.*, 2020) e incide también en organismos benéficos y además en los costos de producción (Rey *et al.*, 2000; Vinale *et al.*, 2008; Sood *et al.*, 2020). Un informe del Consejo Nacional de Investigaciones de EE. UU. indicó que los productos químicos producen un 60 % de riesgos oncogénicos, por lo que luego sectores agro-comerciales mostraron gran interés en el desarrollo de estrategias ecológicas y rentables para el

manejo de enfermedades en plantas, debido al gran interés en la seguridad alimentaria mundial (Wisniewski *et al.*, 2007; Sood *et al.*, 2020).

Esto llevó al incremento de las inversiones destinadas a la investigación y al desarrollo agrícola para mejorar la productividad en el mundo, especialmente en países en desarrollo (Hernández Melchor *et al.*, 2019), permitiendo una producción de alimentos inocuos y con menores costos de producción agrícola (Villarreal Delgado *et al.*, 2018).

Como para el año 2050 se prevé que la población mundial alcance aproximadamente 9.100 millones de personas, se estima necesario aumentar la producción agrícola de alimentos en un 70 % (Cotes, 2018; Sood *et al.*, 2020). Pero problemas como el calentamiento global y la contaminación ambiental repercuten en la productividad de las plantas, ocasionando estrés tanto biótico como abiótico y pérdidas de rendimiento. Siendo esta pérdida, de entre un 31 – 42 %, provocada por los factores bióticos (hongos, bacterias, virus, nematodos, malezas e insectos) (Figura 1).

Los fitopatógenos de origen fúngico están entre los más importantes factores bióticos, ya que limitan la producción de cultivos en todo el mundo (Sood *et al.*, 2020). Siendo los fitopatógenos de suelo de gran importancia debido a que afectan un amplio espectro de hospederos.

Las especies de hongos de suelo causales de enfermedades pertenecen principalmente a los géneros: *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Aphanomyces* y *Verticillium* (Acosta Durán *et al.*, 2009), por lo cual se considera de interés encontrar alternativas para su control que se enmarquen en la agricultura sostenible. En la actualidad, ha cobrado un gran auge el uso de métodos alternativos, no agresivos para el ambiente, siendo el CB uno de los más prometedores y es un componente primordial en las iniciativas de la agricultura sostenible de varias instituciones y organizaciones (López Herrera *et al.*, 1999; Rey *et al.*, 2000; Rodríguez Limach, 2011; Zin y Badaluddin, 2020).

En los últimos años adquirió gran importancia la búsqueda de microorganismos biocontroladores que inhiban o maten a fitopatógenos, especialmente aquellos que se desarrollan en el mismo nicho ecológico, con persistencia más o menos prolongada y con posibilidad de una inoculación eficaz mediante el desarrollo de una formulación que pueda producirse posteriormente a gran escala (Di Barbaro *et al.*, 2015).



Figura 1: Factores que afectan las plantas. (Fuente: <https://ciencia.unam.mx/leer/943/bienvenido-2020-ano-internacional-de-la-sanidad-vegetal-por-la-salud-de-las-plantas>).

La importancia del CB es que modifica la manera tradicional de controlar las enfermedades (uso de agroquímicos), desplazando de manera natural a los agentes infecciosos (Torres *et al.*, 2008).

Para el éxito del manejo de patógenos se recomienda la implementación de estrategias de control integrado de las enfermedades combinando métodos: físicos, culturales, químicos y biológicos (Ruano Rosa *et al.*, 2015), ya que proporcionan un uso más sostenible de fitosanitarios químicos cuando no es posible acudir a alternativas que los excluyan de forma significativa, teniendo presente que el éxito del CB depende del equilibrio complejo de interacciones entre patógeno, el hospedero, el ACB y el medio ambiente (López Escudero y Mercado Blanco, 2011).

La aplicación de ACB con concentraciones reducidas de químicos estimula la supresión de enfermedades de forma similar a las dosis altas de tratamientos con fungicidas químicos (Sood *et al.*, 2020).

Para el uso del CB en enfermedades de suelo, existen mecanismos de reconocimiento e interacciones entre los ACB, la planta hospedante, el fitopatógeno y los microorganismos de la rizósfera que se encuentran supeditados a variaciones en diferentes períodos de tiempo (lluvia, sequía), concentraciones de sales, pH, entre otros, por lo que conocer la ecología de los ACB es significativo para comprender la relación entre antagonistas y los

componentes de la rizósfera, siendo esto de gran importancia para la implementación del biocontrolador (Figura 2).

Cuando se analiza el CB se necesitan realizar estudios antagónicos sobre los diversos fitopatógenos, sin generalizar o extrapolar su eficacia a un amplio rango de hongos, ya que entre los antagonistas y los fitopatógenos existe cierta especificidad que se debe evaluar (Hoyos Caravajal *et al.*, 2008).

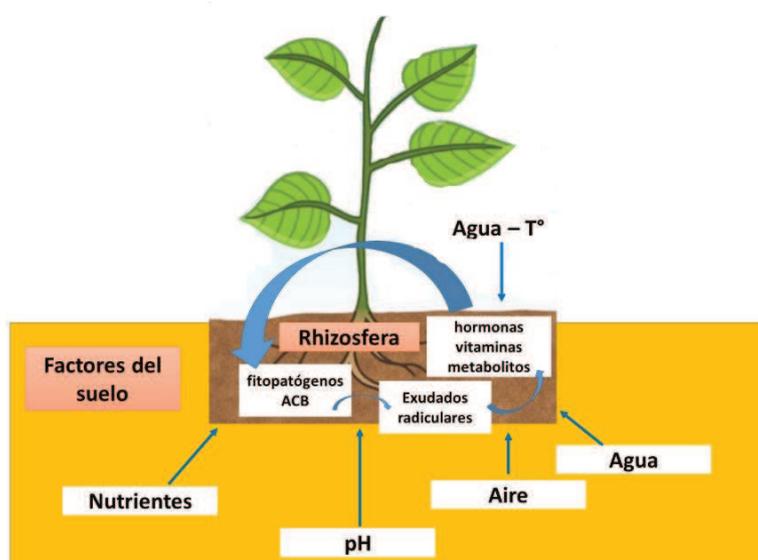


Figura 2: Interacción Planta – Fitopatógeno – ACB – Microorganismos rizosféricos vs. Factores abióticos (Fuente: <https://docplayer.es/58898171-Interaccion-de-microorganismos-beneficos-en-plantas.html>).

Existen varias formas de lograr un CB efectivo, a veces puede darse de manera natural, sin intervención antrópica, y otras veces puede ocurrir por el uso de prácticas culturales (rotación de cultivos, solarización y condiciones de almacenamiento en poscosecha) de manera de favorecer a los antagonistas naturales y desfavorecer al fitopatógeno en el sitio de acción.

También puede ocurrir aplicando de manera masiva microorganismos antagonistas previamente seleccionados, buscando que estos antagonistas no sean foráneos, sino que formen parte de la microflora normalmente presente en esos lugares para asegurar, una rápida adaptación al lugar donde se espera que ocurra el biocontrol (Vero, 2006 a).

La colonización de ACB en raíces puede ser tanto endofítica como superficial; ambas formas tienen la capacidad de inducir respuestas sistémicas como localizadas por parte del hospedero, que limitan el ingreso de fitopatógenos (Moreno Velandia *et al.*, 2018). Este es un proceso dinámico en el que actúan diferentes factores: disponibilidad de agua, temperatura, pH, tipo de suelo, composición de exudados de raíces, presencia de otros microorganismos, planta hospedera, ACB, etc. (Infante Martínez, 2014) (Figura 3). Los factores mencionados determinan cómo los ACB del suelo pueden establecerse en la rizósfera y/o dentro de la raíz de la planta (López Escudero y Mercado Blanco, 2011), donde ellos ejercen el control sobre los fitopatógenos ya que la rizósfera representa la primera línea de defensa de la planta contra organismos fitopatógenos edáficos, evitando así el establecimiento de éstos en la raíz (Villarreal Delgado *et al.*, 2018).

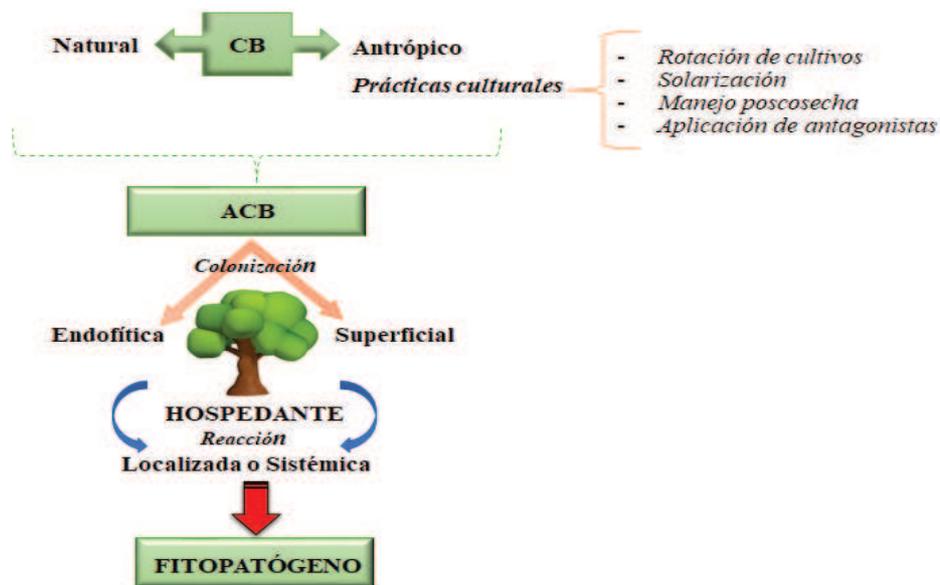


Figura 3: Acción de ACB sobre las plantas huésped.

I.1.2. Interacción planta – patógeno – biocontrolador

Continuamente las plantas se encuentran sometidas a condiciones ambientales cambiantes, siendo éstas en ocasiones desfavorables, debiendo adaptarse para sobrevivir, de igual modo que lo hacen frente a microorganismos potencialmente perjudiciales (virus, bacterias, hongos, entre otros), hasta con insectos y nematodos. Sin embargo, cuando la planta es un hospedero natural de un patógeno, se establece una interacción entre la planta y el patógeno, pudiendo concluir en el desarrollo de la enfermedad. Caso contrario ocurre cuando no es hospedero natural de un organismo patógeno, la cual es la situación más

La colonización microbiana en los vegetales está regulada por señales e intercomunicaciones hormonales. El sistema de defensa vegetal reconoce patrones moleculares que emite el patógeno (PAMPs: Pathogen Associated Molecular Patterns) y emite en su defensa PTI (PAMP-triggered immunity), por lo que el patógeno para evadir el PTI segrega moléculas defectoras las cuales son superadas en plantas resistentes y emite una mayor defensa, que puede llevar a la muerte celular o necrosis tisular programada (Effector Triggered Immunity o ETI). Los vegetales tienen también receptores extracelulares en las membranas, como los RLK (receptor like kinasa) que reconoce los PAMPs e intracelulares como los NBS – LRR (Nucleotide-binding site/leucine-rich repeats) que reconoce los efectores. Dentro de las hormonas vegetales involucradas en la defensa de las plantas frente al ataque de fitopatógenos se encuentran: el ácido salicílico (SA), que actúa frente a organismos bio o hemibiotrópicos, mientras que el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) se activan frente a microorganismos necrotrofos, siendo antagonistas entre sí el SA y JA (Figura 5). Pero en el caso de *Trichoderma* la relación biocontroladores y el hospedero no está bien definida, donde los ACB obtienen sacarosa de las plantas a cambio de contar con la capacidad de promover el crecimiento vegetal y protegerla de los fitopatógenos.

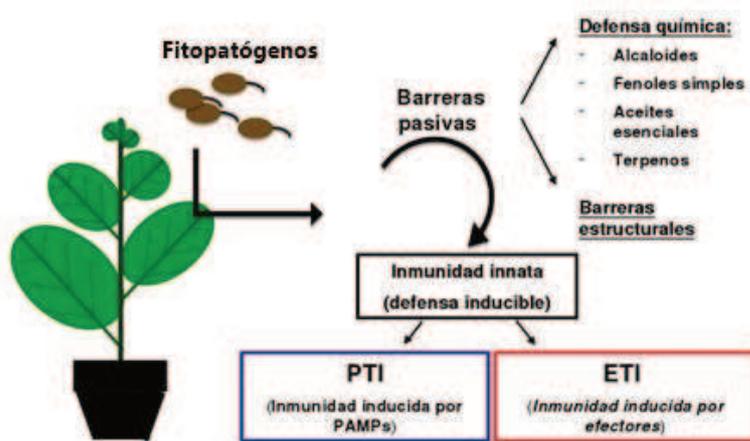


Figura 5: Mecanismos de acción molecular de agentes fitopatógenos vs. reacción molecular de defensa de la planta hospedante (Fuente: <https://www.encuentrosenlabiologia.es/2016/03/la-coevolucion-como-un-sistema-de-defensa-en-la-interaccion-planta-patogeno/>). Referencias: **PTI:** PAMP-triggered immunity; **PAMPs:** Pathogen Associated Molecular Patterns; **ETI:** Effector Triggered Immunity.

I.1.3. Usos del control biológico

El uso de ACB se inició a principios del siglo XIX utilizando organismos vivos o sus metabolitos para mitigar las enfermedades en cultivos agrícolas (Villarreal Delgado *et al.*, 2018), pudiendo ser utilizado de manera preventiva o paliativa, si es aplicado antes o después de la siembra.

Así también dada las cualidades, el CB se puede combinar con otras herramientas de control para lograr un manejo integrado, como lo es la refrigeración y el uso de productos químicos (métodos tradicionales para controlar pudriciones postcosecha). En poscosecha se posibilita el control de los factores como: temperatura; humedad, etc., lo que beneficia a los agentes de biocontrol y facilita el manejo (Pal y Gardener, 2006; Wisniewski *et al.*, 2007). Por otro lado, es importante porque los fungicidas posibles de emplear en poscosecha son muy reducidos y cada vez tienen mayor restricción higiénico sanitaria, ya que son potenciales agentes oncogénicos cuando se aplican a frutas y verduras. Esto hace que el CB resulte una práctica adecuada e inocua para los seres humanos debido a que no deja efecto residual en frutas y verduras a diferencia de los agroquímicos (Guédez *et al.*, 2009).

I.1.4. Tipos de control biológico

Hay una variedad de estrategias de CB disponibles, de manera más amplia, el término CB también se ha aplicado al uso de productos naturales extraídos o fermentados, de diversas fuentes. Pueden ser mezclas muy simples, de ingredientes naturales con actividades específicas o mezclas complejas con múltiples efectos sobre el huésped, así como la plaga o patógeno objetivo. Ejemplo de estos son:

I.1.4.1. Biocontrol con extractos vegetales

Los extractos vegetales son considerados bioinsumos, obtenidos a partir de plantas y tienen un efecto beneficioso para el crecimiento y la sanidad de cultivos, minimizando el daño producido por agentes fitopatógenos. Así también es una práctica sustentable que permite la conservación de los recursos naturales y el cuidado de la salud humana. La obtención de los extractos puede realizarse a través de varios métodos: extracción mecánica, destilación, extracción con fluidos supercríticos y extracción con solventes (Amaguaña Rojas y Churuchumbi Rojas, 2018).

Como ejemplo se puede citar que a partir de hojas de frutilla (*Fragaria vesca*) se realizó un extracto que posee fenoles con propiedades antimicrobianas e inductoras de la defensa

vegetal contra fitopatógenos (Di Peto, 2017). También se evaluó el efecto que ejerce la *Moringa oleifera* (Moringa), *Persea americana* (Palta o Aguacate), *Equisetum hymale* (Cola de caballo), *Larrea tridentata* (Gobernadora), *Gnaphalium semiamplexicaule* (Gordolobo), *Peumus boldus* (Boldo), *Brickellia squarrosa* (Prodigiosa), *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Physalis coztomatl* (Costomate), sobre los hongos: *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *Rhizoctonia solani*, y los resultados manifiestan una excelente alternativa al control y manejo de fitopatógenos (Rodríguez Castro *et al.*, 2020). López Benítez *et al.* (2005) evaluaron la inhibición que ejercían los extractos acuosos de ajo (*Allium sativum*), gobernadora (*Larrea tridentata*), hojásén (*Flourensia cernua*), clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y mango (*Mangifera indica*) sobre los hongos de suelo de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *R. solani* y *V. dahliae*.

I.1.4.2. Biocontrol con microorganismos

La mayoría de los ACB son de especies de los géneros *Pseudomonas*, *Trichoderma* y *Bacillus*, este último posee características como, estimulante de crecimiento y biocontrolador con alta sobrevivencia por la capacidad que posee de formar endosporas (Moreno Velandia *et al.*, 2018). En cambio, *Trichoderma* es de gran uso por su estabilidad en la colonización radicular, siendo endofítico con capacidad de micoparasitar, competir por nutrientes, generar antibiosis y por ser inductor de resistencia en las plantas. Mientras que *Pseudomonas* posee gran versatilidad metabólica, es capaz de colonizar la raíz de manera endofítica, producir sideróforos y promotores de crecimiento, como así también se adapta a condiciones de estrés (Moreno Velandia *et al.*, 2018) (Tabla 1). Tanto *Trichoderma* spp. como *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp., son conocidos como biocontroladores de fitopatógenos de suelo, como son: *Pythium oligandrum*, *Coniothyrium minitans*, *Sporidesmium sclerotivorum* y *F. oxysporum* (Moreno Velandia *et al.*, 2018).

Las rizobacterias, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Arthrobacter* y *Stenotrophomonas*, son promotoras de crecimiento vegetal y producen compuestos volátiles que pueden prevenir enfermedades en plantas. Pueden tener acción directa sobre fitopatógenos o estimular la resistencia sistémica en las plantas (Ramírez y Kloepper, 2011).

Tabla 1: Características de microorganismos biocontroladores.

Microorganismos	Características
<i>Pseudomonas</i>	<ul style="list-style-type: none">• Coloniza el sistema radicular• Produce sideroforos• Es promotor de crecimiento vegetal• Se adapta a condición de estrés
<i>Trichoderma</i>	<ul style="list-style-type: none">• Coloniza el sistema radicular• Micoparásita• Compete por nutrientes• Antibiosis• Inductor de resistencia vegetal
<i>Bacillus</i>	<ul style="list-style-type: none">• Estimulante de crecimiento vegetal• Biocontrolador• Formador de endosporas

1.1.4.2.1. Biocontrol con Trichoderma spp.

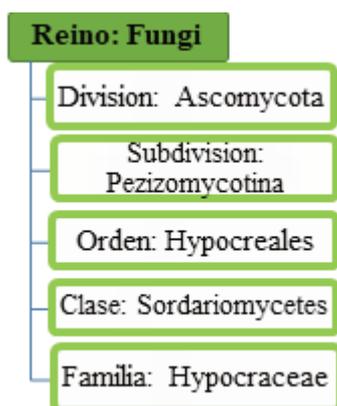
El uso de *Trichoderma* en agricultura es efectivo no solo contra patógenos vegetales, sino también contra plagas de insectos. Actualmente *Trichoderma* spp. es muy utilizado como ACB en la agricultura, por su capacidad para micoparasitar. Se conoce la capacidad que presenta para controlar insectos plagas, por vía directa, por su capacidad para parasitar y producir metabolitos que actúan como insecticida o repelente, como así también el control indirecto que ejerce en las respuestas de defensa de las plantas, ya que actúa como estimulante del sistema de respuesta (Poveda, 2021). Además, se encuentra en estudio el control que ejerce sobre los nematodos fitófagos (TariqJaveed *et al.*, 2021). Este género tiene la capacidad de actuar como agente de biocontrol de manera efectiva, siendo de bajo costo su producción, no causa daño ambiental y no perjudica a organismos útiles que contribuyen al equilibrio del ambiente (Michel Aceves *et al.*, 2008; Sood *et al.*, 2020). Según estudios llevados a cabo, *Trichoderma* resultó ser un hongo con eficiencia para reducir fitopatógenos que producen infecciones, como los que ocasionan enfermedades vasculares o enfermedades foliares en plantas (Martínez *et al.*, 2013 a; Guerrero, 2016).

I.2. *Trichoderma* spp.

I.2.1. Generalidades

El género *Trichoderma* se ubica taxonómicamente en la familia *Hypocreaceae* (Tabla 2), se caracteriza por no presentar un estado sexual determinado (Moreno Velandia *et al.*, 2018; Sánchez Hernández *et al.*, 2018). Este género cuenta con más de 30 especies, todas con efectos benéficos para la agricultura y otras ramas (Valdés Ríos, 2014).

Tabla 2: Taxonomía del género *Trichoderma*.



En algunos aislamientos se describió el estado sexual, dentro de los géneros *Hypocrea*, *Podostroma*, *Sarawakus*, *Aphysiostroma* y *Protocrea*, siendo *Trichoderma* un grupo de derivados clonales que perdió la capacidad de completar el ciclo sexual. Por lo que *Trichoderma* es de reproducción asexual con micelio y abundante cantidad de conidios (o esporas) color verde, se forman a partir de células desnudas de su cuerpo fructífero, es de crecimiento rápido y con amplia producción de enzimas (Martínez *et al.*, 2013 a). Los conidios son de forma ovoidal formados a partir de conidióforos muy ramificados y tabicados (Tabla 3). También cuenta con estructuras de resistencia, denominadas clamidosporas formadas sobre el micelio con gruesa y rugosa pared celular. Las especies más usadas para el CB son: *T. atroviride*; *T. hamatum*; *T. asperellum* y *T. harzianum* (López Mondéjar, 2011).

Trichoderma es un hongo de vida libre, aerobio facultativo, simbioses de plantas, avirulento. Es fácil encontrarlo en los suelos agrícolas, como también en otros ambientes y particularmente en raíces (Martínez *et al.*, 2013 a; Valdés Ríos, 2014).

Por otro lado, se identificó recientemente *Hypocrea lixii* como estado sexual de *T. harzianum*, especie muy citada en control biológico (López Mondéjar, 2011).

Tabla 3: Características morfológicas del género *Trichoderma* spp.

<i>Trichoderma</i> spp.	Características morfológicas	<ul style="list-style-type: none"> • Reproducción asexual • Micelio abundante • Conidios verdes (abundantes, rápido crecimiento). • Fiálides • Conidióforos (ramificados) • Clamidosporas
	Características fisiológicas	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de enzimas • Producción de metabolitos (volátiles y no volátiles)

Este género posee gran capacidad de colonización y adaptabilidad, cuenta con posibilidad de habitar diferentes suelos (agrícolas, forestales, ácidos), sustratos con diferentes contenidos de materia orgánica y amplio rango de temperaturas. Por sus diferentes capacidades es ubicado en el grupo de hongos hipogeos, lignolícolas (Harman *et al.*, 2004; Morán Diez, 2008 y Martínez *et al.*, 2013 a).

Las mejores condiciones para el crecimiento y desarrollo de este hongo son:

1. Temperatura de desarrollo; 15 – 35 °C, siendo la T° óptima 25 °C.
2. Humedad Relativa: crece con 20 a 80 %, con óptima de 70 %
3. pH: sobrevive en amplio rango ya que tiene capacidad de acidificar el medio en que se encuentra (secreción de ácidos orgánicos), siendo el rango óptimo para el desarrollo de 6 a 6,5 (Sánchez Pérez, 2009).
4. La luz es un factor de gran importancia para el desarrollo, la esporulación y la producción de metabolitos secundarios (Martínez *et al.*, 2013 a).

Algunas cepas de *Trichoderma* colonizan sitios puntuales en la superficie de la raíz, por ejemplo, toda la capa superficial (epidermis) o las primeras o segundas capas debajo de esta (Harman *et al.*, 2004).

La correcta elección de una cepa promisorio de *Trichoderma* de acuerdo con las cualidades deseables que presente, genera beneficios en los modos de acción y aptitudes ecológicas, siendo estas específicas de las especies o cepa en particular para desarrollar todo su potencial en un producto comercial exitoso (Martínez *et al.*, 2013 a; Moreno Velandia *et al.*, 2018). También *Trichoderma* spp. es conocida por su variada aplicación, desde el recubrimiento de semillas hasta la poscosecha, y desde el suelo hasta las hojas (Moreno Velandia *et al.*, 2018). La capacidad como biocontrolador se debe a los múltiples mecanismos que posee: sintetiza compuestos volátiles y no volátiles (trichodermina, metabolitos peptídicos, gliotoxina y viridina, suzukacilina, dermadina, trhocziamina, gliovinirna y diterpenos tetracíclicos, triterpeno viridin y sesquiterpenos (Infante *et al.*, 2009; Hernández Melchor *et al.*, 2019), como compuestos antagónicos (proteínas, enzimas y antibióticos) y promotores de crecimiento vegetal (hormonas y vitaminas) (Hernández Melchor *et al.*, 2019), así también genera competencia por nutrientes, espacio y micoparasita (Howell, 2003; Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004; López Escudero y Mercado Blanco, 2011; Moreno Velandia *et al.*, 2018; Sood *et al.*, 2020).

A su vez, *Trichoderma* tiene diversas ventajas como ACB; toma nutriente de los hongos (a los cuales degrada) y de la materia orgánica ayudando a su descomposición, por lo cual las incorporaciones de materia orgánica y compostaje lo favorecen (Valdés Ríos, 2014). Entre los requerimientos nutricionales de *Trichoderma* se encuentran los sustratos complejos como: almidón, pectina y celulosa entre otros que pueden ser degradados, así también puede asimilar compuestos nitrogenados como: nitritos, urea, aminoácidos y sulfato de amonio, mientras que los elementos traza requeridos para su crecimiento son: hierro, zinc, cobre, molibdeno, manganeso y vitaminas, siendo requeridos en concentraciones de alrededor 10^{-9} M. (Agamez Ramos *et al.*, 2008).

I.2.2. Modo de acción como antagonista

Los antagonistas pueden presentar más de una manera de accionar, esto resulta de gran interés al momento de la elección del ACB (Martínez *et al.*, 2013 b; Infante Martínez, 2014), de este modo también se evita la resistencia de las cepas (Vero, 2006 b). Por lo que los mecanismos dependen de cada cepa de *Trichoderma* y de las condiciones ambientales. El mecanismo de acción antagónico de *Trichoderma* se demostró en 1932 por Weindling, actualmente se conocen acciones indirectas y directas, estas últimas regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos (Moran Diez, 2008; Infante *et al.*, 2009;

Martinez *et al.*, 2013 a; Infante Martinez, 2014) como son: micoparasitismo, antibiosis, competencia (por nutriente y espacio), siendo para Guédez *et al.* (2009) el micoparasitismo el principal mecanismo de acción de estos hongos y el más conocido (Howell, 2003).

I.2.2.1. Micoparasitismo

Es el impacto directo de *Trichoderma* sobre otra especie de hongo. Actualmente se conocen 75 especies de *Hypocrea* / *Trichoderma* con esta capacidad. Los procesos que se describen a continuación ocurren de manera secuencial y continua (Hoyos Caravajal *et al.*, 2008; Infante *et al.*, 2009; Sood *et al.*, 2020; Erazo *et al.*, 2021).

1. Crecimiento quimiotrófico: Es el crecimiento directo hacia un estímulo químico. En la etapa de localización del hospedante, *Trichoderma* puede detectar al fitopatógeno a la distancia y sus hifas crecen en dirección a él.

2. Reconocimiento: El reconocimiento se realiza a través de interacciones lectinas-carbohidratos, encontrándose los carbohidratos presentes en la pared celular de *Trichoderma*, mientras que las lectinas en fitopatógenos. Luego el proceso continúa con el desarrollo de las hifas y apresorios. Según investigaciones realizadas estas son efectivas solo contra fitopatógenos específicos, por lo que el reconocimiento molecular entre *Trichoderma* y el fitopatógeno (hospedante) es esencial para el antagonismo.

3. Adhesión y enrollamiento: Posterior al reconocimiento, las hifas de *Trichoderma* se adhieren a las del hospedante mediante hifas y apresorios que se enrollan alrededor del hospedante, la adherencia de las hifas de *Trichoderma* ocurre a través de la asociación carbohidrato – lectina.

4. Actividad lítica: En esta etapa hay producción de enzimas líticas extracelulares (quitinasa, celulasa, glucanasa y proteasas), que degradan la pared celular del fitopatógeno y estructuras de resistencia que posibilitan la penetración de las hifas del antagonista, como también facilitan la inserción de estructuras especializadas (hifas, haustorios) para la absorción de nutrientes del interior del fitopatógeno. Finalmente, el micoparasitismo termina con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula del fitopatógeno. El citoplasma restante se encuentra rodeando las hifas invasoras, con síntomas de disgregación, retracción de la membrana plasmática y desorganización del citoplasma (Harman *et al.*, 2004; Infante *et al.*, 2009; Guédez *et al.*, 2009; Infante Martinez, 2014).

Algunas de las investigaciones muestran el accionar de *Trichoderma* frente a *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*; *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea*, *Pythium* spp. y *Ustilago maydis* donde se constata el deterioro de los fitopatógenos (Sood *et al.*, 2020). En estudios a través de observaciones microscópicas destacan que no siempre es factible visualizar estas interacciones, ya que depende del aislamiento de *Trichoderma* y el agente fitopatógeno en cuestión (Infante Martínez, 2014).

I.2.2.2. Antibiosis

Es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro. Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos, no llegando al contacto físico, tales sustancias inhibidoras se las considera antibióticos. Se conocen más de 180 metabolitos secundarios producidos por el género *Trichoderma*, los que se agrupan en peptaibol, policétido y terpeno según su origen biosintético. La habilidad que tiene una cepa de *Trichoderma* de producir simultáneamente diferentes compuestos antifúngicos, reduce el riesgo de resistencia en los microorganismos (Infante Martínez, 2014). Como en el caso de *T. viride* que produce gran variedad de antibióticos, entre ellos tricotoxinas A y B, tricodeceninas, tricolorinas y tricocelinas (Sood *et al.*, 2020) y *T. virens* que inhibió el crecimiento de *Pythium ultimum* y una especie de *Phytophthora*, pero no ocurrió lo mismo con *Rhizoctonia solani*, *Thielaviopsis basicola*, *Phymatotrichum omnivorum*, *Rhizopus arrhizus* o *V. dahliae* (Howell, 2003). También se comprobó que la enzima producida por *Botrytis cinerea*, para degradar la pared celular vegetal es degradada por enzima segregada por *T. harzianum*, al igual que la fitotoxina que produce *R. solani*, que es degradada por α -glucosidasa excretada por *T. viride* (Infante Martínez, 2014).

I.2.2.3. Competencia por sustrato

Se da cuando dos o más organismos tienen requerimientos iguales, pero alguno de ellos es más competitivo, lo que reduce la cantidad disponible para los demás. *Trichoderma* debido a la velocidad de crecimiento y desarrollo que posee, tiene capacidad de competir por: sustrato, nutrientes, espacio, oxígeno (Infante *et al.*, 2009; Cano, 2011; Infante Martínez, 2014; Sood *et al.*, 2020), tal es el caso de la competencia por carbono (C) entre *Trichoderma* y hongos fitopatógenos como: *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporium*, como así también por puntos de infección con fitopatógenos de la rizósfera (Sood *et al.*, 2020). A su vez *Trichoderma* en comparación con otros microorganismos tiene gran

eficiencia para movilizar y absorber nutrientes del suelo también puede reducir el pH del suelo por medio de la biosíntesis y la capacidad de liberar ácidos orgánicos que facilitan la solubilización de micronutrientes. Asimismo, *Trichoderma* posee la capacidad de generar sideróforos dejando al Fe (Fe^{2+}) disponible o de la misma manera también puede insolubilizarlo impidiendo la disponibilidad para los patógenos (Cano, 2011; Sood *et al.*, 2020).

Este género puede ser agregado al suelo o aplicado como tratamientos de semillas y crece fácilmente junto con el sistema radicular de la semilla tratada (Howell, 2003), esto es muy importante para un ACB ya que de otra manera no podría competir si no tuviera esa capacidad. En la competencia también influyen factores abióticos como: tipo de sustrato, pH y temperatura, entre otros, encontrándose *Trichoderma* adaptada para tomar nutrientes disponibles o sobrevivir (como clamidosporas) cuando son escasos (Infante Martínez, 2014).

I.2.3. Usos de *Trichoderma*

I.2.3.1. Como biorremediador

Trichoderma cuenta con la capacidad de generar enzimas capaces de degradar materia orgánica como así también sustancias tóxicas para el ambiente, importantes para el proceso de biorremediación (Zin y Badaluddin, 2020). Se conoce que *Trichoderma* actúa como agente biodegradante de productos fitosanitarios y degrada grupos de pesticidas de alta persistencia en el ambiente, sirviendo como descontaminante del suelo (Valdés Ríos, 2014). En un estudio de biodegradación de herbicidas de cloroacetanilida, como alaclor y metolaclor, a través de ocho cepas de *Trichoderma* spp., se lograron biodegradar entre un 80 y 99 % de alaclor y entre un 40 y 79 % de metolaclor después de 7 días de incubación (Nykiel Szymańska *et al.*, 2020). Así mismo, Sood *et al.* (2020) en investigaciones realizadas con diferentes cepas de *Trichoderma* encontraron efectividad como descontaminantes, tal es el caso de *T. harzianum* en la degradación de fenoles, cianuro y nitrato, como así también en la desintoxicación de suelo con cadmio (Cd), mientras que *T. inhamtum* redujo la concentración de cromo (Cr).

I.2.3.2. Agrícola

En la agricultura, *Trichoderma* es muy utilizado por las diversas capacidades que posee, entre ellos como agente de biocontrol contra organismos fitopatógenos, bacterias,

nematodos y hongos en plantas enfermas, también actúa de manera indirecta, mejorando la resistencia en las plantas atacadas por agentes biológicos, igualmente lo hace como estimulante de crecimiento y desarrollo de las plantas (Liu *et al.*, 2020; Sood *et al.*, 2020). Está presente también en procesos de descomposición de desechos orgánicos, coopera en la mineralización y reutilización de residuos como así también promueve la absorción y el uso eficiente de nutrientes y fertilizantes (Hernández Melchor *et al.*, 2019; Zin y Badaluddin, 2020; Sood *et al.*, 2020).

- **Obtención industrial**

Trichoderma cuenta con la gran capacidad de crecer en diferentes residuos agroindustriales, generando así subproductos de gran valor para el control biológico.

Actualmente, la obtención de estos subproductos de calidad y en cantidad suficiente para aplicaciones masivas, a través de tecnologías sencillas, económicas y efectivas, es un tema de estudio importante debido a la diversidad y volumen de residuos agroindustriales que se generan en zonas productivas.

Se encuentran diferentes estudios que evalúan la producción de esporas viables y en cantidad de *Trichoderma*. Generalmente se usa la cascarilla o paja de arroz, de trigo y productos de la industria azucarera para la multiplicación de *Trichoderma* a través de fermentación líquida y/o sólida. La utilización de productos agrícolas con alto contenido celulósico son una posibilidad de reemplazar el uso del arroz y trigo ya que éstos presentan altos costos (Agamez Ramos *et al.*, 2008; Michel Aceves *et al.*, 2008). Es por ello que se presenta como alternativa el uso de la cascara de tomate (cáliz maduro); arroz (glumas y lemas); ajo (catáfilas coriáceas); cacao (testa de la semilla); maní (pericarpio del fruto), granos de: arroz, sorgo, alpiste y maíz y rastrojo de soja y maíz (Michel Aceves *et al.*, 2008), como también el de semillas de árboles (*Artocarpus incisa*), que pueden ser utilizadas para enriquecer sustratos dado a su alto poder nutritivo (ricas en azúcares, con 20 a 37 % de carbohidratos, calcio, hierro, fósforo y niacina, etc.) (Agamez Ramos *et al.*, 2008). También se estudió el efecto que presenta la inoculación de la cepa *T. viride* 137 en el bagazo de caña de azúcar fermentado con la microbiota propia (Valiño *et al.*, 2003). Por lo que Allori Stazzonelli *et al.* (2017) consensuaron que es factible el uso de residuos de la industria azucarera (bagazo y melaza) para la producción artesanal de *Trichoderma*, a través de la fermentación sólida.

- Uso como biocontrolador

El género *Trichoderma*, forma parte del 60 % de los biofungicidas registrados en el mundo (Sood *et al.*, 2020), donde el 67 % está constituido por una sola especie de *Trichoderma* y el resto son combinaciones entre dos o más especies del mismo género o con hongos formadores de micorrizas, bacterias u otros compuestos biológicos. Las formulaciones de los biofungicidas pueden ser tanto líquidas como sólidas, formuladas en talcos, vermiculita, salvado de trigo, cáscara de café, aceite vegetal o mineral, y desechos de banano. Las especies más utilizadas son *T. viride*, *T. virens* y en mayor proporción *T. harzianum* (González Cárdenas *et al.*, 2005; Hernández Mendoza *et al.*, 2011; López Mondéjar, 2011; Hernández Melchor *et al.*, 2019). El género *Trichoderma* no solo produce sustancias antibióticas, sino que también estimula a las plantas a producir sus propios compuestos antimicrobianos (Harman *et al.*, 2004). En estudios realizados por Sood *et al.* (2020) con *T. harzianum* se evaluó la asimilación de quitinasa en plantas de papa y tabaco y obtuvieron plantas transgénicas con resistencia tanto a enfermedades de suelo como foliares, producidas por ejemplo por *Rhizoctonia solani* y *Alternaria alternata*, respectivamente.

Son varias las investigaciones sobre el uso de *Trichoderma*, como ser, en la etapa de poscosecha para la protección de frutas y verduras durante el almacenamiento, hay trabajos donde se emplearon 10 aislados de *T. harzianum* y *T. viride* para el control de *Lasiodiplodia theobromae* (patógeno de la pudrición del fruto del banano), como así también se aplicó una emulsión de *T. harzianum* en manzana para prevenir la descomposición causada por el moho azul, luego de la cosecha (Sood *et al.*, 2020). Hay experiencias en invernaderos con la cepa *T. harzianum* (cepa T-22) para el control de enfermedades, la cual tiene mayor duración que los agroquímicos y es de menor costo (Harman *et al.*, 2004). Así también, un estudio llevado a cabo por Santamarina y Roselló (2006) con *T. harzianum* evidenció la capacidad antagónica frente a *V. dahliae* y *Rhizoctonia solani* inhibiendo el crecimiento micelial (Alonso Bahena, 2020). En tanto Benouzza *et al.* (2020) evaluaron la capacidad antagónica de diferentes cepas de *Trichoderma* nativas de Argelia como antagonista frente a dos cepas de *V. dahliae*, las cepas de *T. artroviride* y las de *T. harzianum* son las que presentaron mayor capacidad antagónica frente al fitopatógeno, así también controlaron el marchitamiento en plantas de tomate. Mientras que otros ensayos de antagonismo entre cepas de *Trichoderma* frente al *V. dahliae* resultaron con potencialidad antagónica y se evidenció la emisión de varios

compuestos (Reghmit *et al.*, 2021). Estudios realizados sobre el crecimiento, la severidad de la enfermedad y la defensa de plantas de berenjena con verticilosis, tratadas con cepas de *T. atroviride* y *T. virens* combinados también con cepas promotoras de crecimiento como rizobacterias (Bilginturan y Karaca, 2021) mostraron que redujeron la severidad de la enfermedad e incrementaron los parámetros de crecimiento. En tanto, en preparados biológicos con proteína Harpin (Messenger Gold), Mycorrhiza ERS - *Trichoderma harzianum* (T22 Planter Box) y junto al caldo bordolés en diferentes combinaciones lograron eficiencia en el control de la marchitez originada por *V. dahliae*. Entre otros antagonistas, *T. flavus* es uno más utilizados para controlar el marchitamiento por *Verticillium* en berenjena, papa, algodón y tomate (Puri *et al.*, 2021). Antecedentes a nivel regional de los dos microorganismos de interés, *Trichoderma* spp. y *V. dahliae* no fueron encontrados.

- **Uso como estimulante de crecimiento**

Trichoderma en los últimos años ha sido utilizado también como biofertilizante por su capacidad de estimular el crecimiento, el desarrollo y el rendimiento de las plantas, en especial del sistema radicular debido a la secreción de fitohormonas inductoras del crecimiento del tejido meristemático primario (Infante Martínez, 2014), como también por su capacidad para incrementar la disponibilidad y la absorción de nutrientes (solubles o insolubles) y mejorar la tolerancia al estrés biótico y abiótico (González Salgado *et al.*, 1999; Cupull Santana *et al.*, 2003; Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008; Infante *et al.*, 2009; Sood *et al.*, 2020).

Existe referencia sobre la capacidad de *T. virens* y *T. atroviride* en aumentar la producción de biomasa y el desarrollo de raíces laterales en *Arabidopsis silvestre*. Como así también, hay referencia que *T. atroviride* promueve el crecimiento de *Capsicum annuum* y *T. hamatum* promueve el crecimiento tanto de raíz y en altura de *Pinus radiata*. Este efecto que produce *Trichoderma* en las plantas es perdurable en el tiempo, en plantas anuales se aplica en pequeñas cantidades o en semillas (Liu *et al.*, 2020).

Harman *et al.* (2004) plantearon que el crecimiento de las plantas puede también incrementarse por presencia de otros microorganismos benéficos y/o hongos micorrícicos.

- Uso como inductor de resistencia

La producción de compuestos inhibidores segregados por *Trichoderma* poseen también acción biorreguladora induciendo mecanismos de defensa fisiológica y bioquímica en las plantas, activando compuestos y logrando resistencia frente al ataque de microorganismos dañinos. Este proceso puede ser: sistémico, producido por xilanasas y celulasas, o localizado y transitorio relacionado con la síntesis del etileno en las plantas (Harman *et al.*, 2004; Infante *et al.*, 2009; Valdés Ríos, 2014). Como ejemplo, *T. virens*, *T. asperellum*, *T. atroviride* y *T. harzianum* inoculadas en plantas, inducen cambios metabólicos que aumentan la resistencia a una amplia gama de fitopatógenos y virus produciendo respuesta efectiva. Las esporas u otras estructuras propagativas de *Trichoderma*, se agregan al suelo y toman contacto con las raíces de las plantas, germinan y crecen en la superficie de estas y llevan a producir al menos tres clases de sustancias como respuestas de defensa de las plantas, impidiendo infecciones causadas por fitopatógenos en las raíces. Estos inductores incluyen péptidos, proteínas y compuestos de bajo peso molecular (Harman *et al.*, 2004).

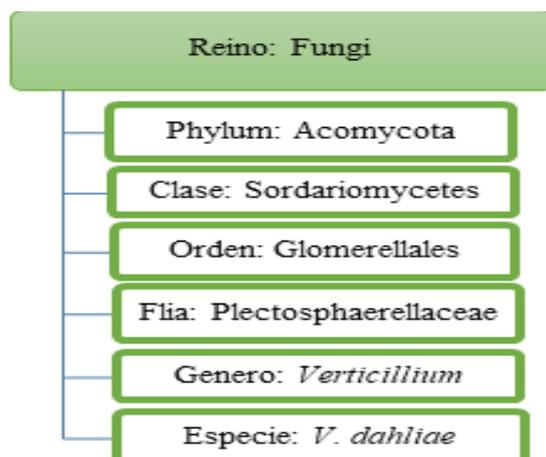
La inducción de la resistencia producida por *Trichoderma*, es un componente importante del control de las enfermedades de las plantas, sin embargo, diferentes mecanismos podrían ser responsables del biocontrol causado por diferentes cepas y en diferentes plantas. Estudios han demostrado que la colonización de cepas de *Trichoderma* en raíces, dan como resultado niveles de enzimas vegetales mayores a los normales relacionadas con la defensa, incluidas varias peroxidasas, quitinasa, β -1,3-glucanasa y los de la ruta de la lipoxigenasa hidropéroxido liasa (Harman *et al.*, 2004).

I.3. *Verticillium dahliae* Kleb

I.3.1. Generalidades

El género *Verticillium* se ubica taxonómicamente según se describe en la Tabla 4 (Kirk, 2019):

Tabla 4: Taxonomía del género *Verticillium*.



V. dahliae Kleb es un hongo de suelo, hemibiotrofo, de gran importancia mundial, debido a que produce daño en cultivos de importancia económica, como en: *Allium sativum*, *Beta vulgaris*, *Capsicum annuum*, *Glycine max*, *Helianthus annuum*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum*, *Persea indica*, *Solanum tuberosum*, *Spinacia oleracea*, *Cicer arietinum*, *Gossypium hirsutum* (Palomo Gil *et al.*, 2003; Mercado Cárdenas y Berruezo, 2021; Vicente *et al.*, 2011; Shabani *et al.*, 2022). Este fitopatógeno provoca pérdidas de rendimientos de hasta el 80 %, siendo difícil su control (León Ttacca *et al.*, 2019). No se conoce estado sexual y posee estructuras de resistencia denominadas microesclerocios (López Escudero y Mercado Blanco, 2011). Según citan diferentes autores fue encontrado por primera vez en Italia por Rugeri en 1946 y posteriormente se lo identificó en diferentes países productores de olivo como Grecia, Francia, Turquía entre otros (Fernández Valiela, 1979; Tawil *et al.*, 1991), en los que causó grandes daños por la capacidad infectiva y de desarrollar la enfermedad de la Verticilosis del Olivo (VO) (Trapero *et al.*, 2013).

I.3.1.1. Morfología de *V. dahliae*

V. dahliae presenta micelio y conidióforos o fiálides mononucleares, hialinas al igual que los conidios de forma ovoide que se originan a partir de la punta de las fiálides, estas últimas se disponen formando verticilos erectos (López Escudero *et al.*, 2003; López Escudero y Mercado Blanco, 2011). Este fitopatógeno cuenta con dos fases: la parasítica, a partir de la infección de la planta u hospedero y la no parasítica, donde se originan los microesclerocios (López Escudero y Mercado Blanco, 2011), que son estructuras de resistencia de forma y medidas variables (15-20 μ de diámetro) (Fernández Valiela,

1979), de color oscuro, melanizadas que le confiere la capacidad de supervivencia durante alrededor de 14 años, pudiendo soportar diferentes condiciones adversas (López Escudero y Mercado Blanco, 2011; Carrero Carrón *et al.*, 2016) (Tabla 5). Así también, este fitopatógeno puede persistir en residuos vegetales de plantas infectadas a través de sus estructuras vegetativas, conidios y/o micelio (Fernández Valiela, 1979), o a través de los microesclerocios posibilitando su perpetuación en el suelo o en tejido vegetal en descomposición (López Escudero *et al.*, 2005), en contraste con las hifas y conidios que pierden su viabilidad en suelos en corto plazo. La diferencia de los microesclerocios producidos por aislamientos altamente virulentos es que son alargados, presentan una relación longitud / ancho promedio de 4,06, mientras que los producidos por aislamientos ligeramente virulentos son más redondeados con una relación promedio de 2,92 (López Escudero y Mercado Blanco, 2011) (Tabla 6).

Tabla 5: Características morfológicas de *V. dahliae*.

<i>V. dahliae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Reproducción asexual • Micelio hialino • Conidios ovoidales • Fiálides/conidióforos: hialinos, formando verticilos • Conidios ovoides • Microesclerocios: oscuros, melanizados, de tamaño y forma variable
--------------------------	---

Tabla 6: Características de los microesclerocios de *V. dahliae* según el tipo de aislado.

Microesclerocios	Tamaño (relación longitud / ancho)
De aislamientos altamente virulentos	4,06 – alargados
De aislamientos ligeramente virulentos	2,92 – redondeado

En cuanto a las condiciones predisponentes para el crecimiento de *V. dahliae*, López Escudero y Mercado Blanco (2011) manifiestan que la mayor densidad de inóculo del

fitopatógono se encuentra en suelos húmedos, se ubican alrededor de goteros del sistema de riego, haciendo que el manejo inadecuado del riego pueda constituir un factor predisponente para la enfermedad, ya que el crecimiento de las raíces aumenta en el perfil de suelo húmedo al igual que el patógeno. Del mismo modo, la nutrición influye en el crecimiento de las plantas y sus mecanismos de defensa contra ataques de fitopatógenos. Experiencias en olivo indican que la fertilización excesiva con nitrógeno (N) relacionada con abundante riego, favorecen el rápido crecimiento de *V. dahliae*, pudiendo esto aumentar la incidencia y gravedad de las infecciones (López Escudero y Mercado Blanco, 2011). También se encontró que la fertilización con N en forma de amoníaco (NH₃) reduce el número de propágulos de *V. dahliae* en el suelo y aumenta la actividad biológica de los antagonistas del patógeno. La reducción de los niveles de calcio (Ca) o el aumento de magnesio (Mg) (por ejemplo, mediante la aplicación de ciertas enmiendas orgánicas) en los suelos, disminuyen la gravedad de la enfermedad, mientras que la incidencia del potasio (K) sobre la enfermedad es contradictoria, debido a la escasez de este tipo de estudios. Estos efectos pueden estar relacionados con diferentes factores como: textura del suelo, contenido de materia orgánica, microbiota del suelo entre otros (López Escudero y Mercado Blanco, 2011). Mientras que la influencia del pH en suelo, en la verticilosis del olivo se manifiesta a pH neutros a alcalinos (pH 6 a 9) y para su control con aplicación de enmiendas orgánicas puede tornarse un pH ácido (por debajo de 5,5) que resulta inhibitor de crecimiento de microorganismos y de estructuras de supervivencia (microesclerocios) del patógeno. Así también estudios demuestran que suelos de naturaleza salina o de salinidad inducida aumentan la incidencia y severidad de enfermedades de la marchitez: en papa, tomate, alfalfa, azúcar y arce (López Escudero y Mercado Blanco, 2011) (Tabla 7).

Tabla 7: Incidencia de minerales en el accionar de *V. dahliae*.

Minerales vs. Cantidades	Acción de <i>V. dahliae</i>
N – exceso	Rápido crecimiento
K	¿?
NH₃	Reduce los propágulos
Ca – deficiente	Reduce los propágulos
Mg – alto	Reduce los propágulos

pH alcalino	Induce a la verticilosis
Suelos salinos	Induce a la verticilosis

I.3.1.2. Patogenia

El desarrollo epidémico de la enfermedad es muy dependiente del manejo agronómico que se le realiza al cultivo. *V. dahliae* es un hongo telúrico, permanece en los suelos infestados mediante propágulos como: esporas, conidios, hifas melanizadas y microesclerocios individuales o en grupos adheridos a partículas de suelo o restos vegetales donde se forman, siendo su control complicado debido a la capacidad de supervivencia que poseen los microesclerocios en ausencia del hospedero (López Escudero *et al.*, 2003; Ruíz Olmos *et al.*, 2012). La enfermedad comienza cuando, en el suelo, los propágulos tienen capacidad para germinar (Figura 6) encontrándose con condiciones ambientales propicias: temperatura entre 20 a 25 °C, humedad en el suelo de aproximadamente 65% (Gómez Gálvez, 2018) y presencia de exudados radiculares que estimulan la germinación de los microesclerocios (López Escudero *et al.*, 2003; López Escudero y Mercado Blanco, 2011; Carrero Carrón *et al.*, 2016). Las hifas emergen y penetran las raíces a través de heridas, colonizan los vasos xilemáticos formando conidios hasta llegar a la parte aérea de la planta. No se descarta que el patógeno también pueda ingresar a la planta a través de la parte aérea (Gil y Abarello, 2011). Esto induce daños debido a la acumulación de sustancias gomosas que provocan el taponamiento de los vasos y los síntomas de la enfermedad en la planta provocando deterioro, acelerando la senescencia y reduciendo la producción de los cultivos (Tawil *et al.*, 1991; Gil y Albarellos, 2011; López Escudero y Mercado Blanco, 2011; Ruíz Olmos *et al.*, 2012; Carrero Carrón *et al.*, 2016).

Los microesclerocios que se encuentran en latencia se dispersan a través de movimiento en el suelo o por agua, aire, riego, maquinaria, etc. (López Escudero y Mercado Blanco, 2011). Los tejidos infectados, una vez que se descomponen, liberan al suelo microesclerocios, pudiendo incorporarse al suelo o a través del estiércol de animales que se hayan alimentado con restos de plantas enfermas, quedando estos como fuente de dispersión y así causar nuevas infecciones (Jiménez Díaz *et al.*, 2003; De la Cruz Blanco y Guisado López, 2008).

Una vez que el fitopatógeno se encuentra en el sistema vascular de la raíz, la colonización de patógenos en el sistema vascular aéreo puede ser muy rápida y eventualmente puede llegar a los peciolos de las hojas. De hecho, *V. dahliae* puede progresar a lo largo de toda la planta usando un proceso cíclico (Rodríguez Navarro, 2006). Se encontró la presencia de conidios tanto en raíz como en tallo y peciolos (Fernández Valiela, 1979).

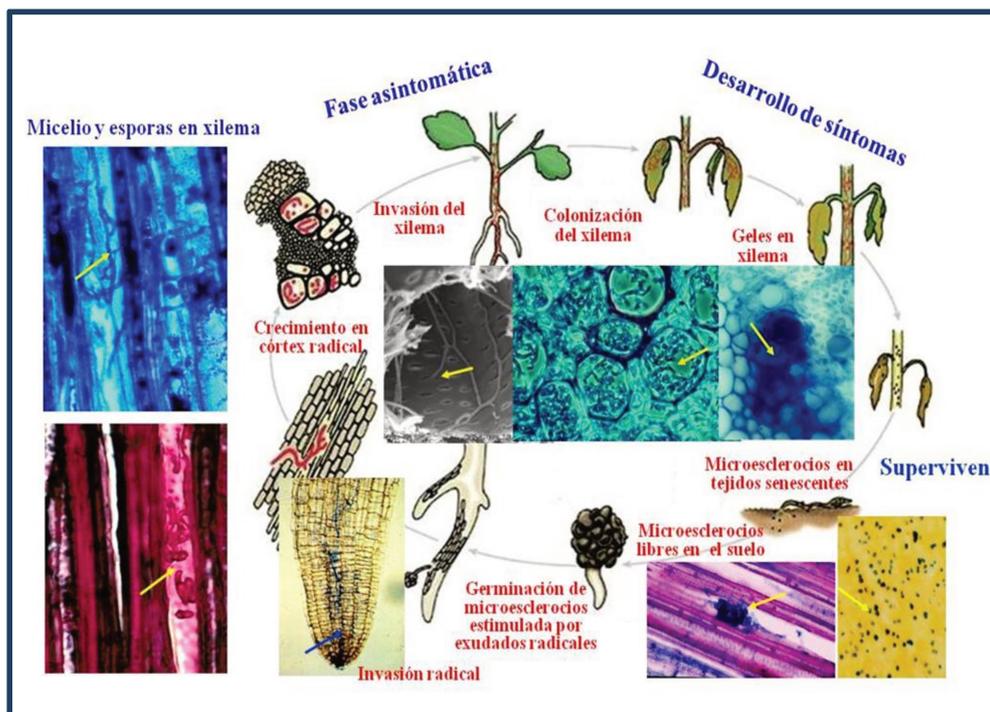


Figura 6: Ciclo de patogénesis causada por *V. dahliae* (Fuente: Carrero Carrón, 2016).

Además, es importante remarcar que la gravedad de los ataques en la verticilosis depende de la virulencia del patotipo de *V. dahliae* que infecta a la planta (López Escudero y Mercado Blanco, 2011).

I.3.1.3. Hospedantes

El fitopatógeno *V. dahliae*, produce la verticilosis y presenta un amplio rango de hospedantes susceptibles, tanto herbáceas (entre ellas malezas) como leñosas, pudiendo ser consideradas de interés ornamental, forestal y agronómico, como lo son en nuestro país el: olivo (*Olea europea*), vid (*Vitis vinífera*), almendro (*Prunus dulcis*), girasol (*Helianthus annuus*), algodón (*Gossypium hirsutum*), berenjena (*Solanum melongena*), papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), garbanzo (*Cicer arietinum*),

lentejas (*Lens culinaris*), habas (*Vicia faba*), entre otros (Fernández Valiela, 1979; Carneros *et al.*, 2015; Puri *et al.*, 2021). Cabe aclarar, que estos pueden presentar sintomatologías características o ser asintomáticas al momento de padecer verticilosis. (Ruiz Heredia, 2014; Gómez Gálvez, 2018; Herrero, 2019).

I.3.2. Enfermedades principales

I.3.2.1. *Verticillium* en girasol

En 1970 por primera vez se describió en España la verticilosis ocurrida con mayor frecuencia en cultivares no oleaginosos. La verticilosis es de gran importancia en EEUU y Argentina, siendo esta enfermedad la principal para el girasol afectando anualmente el 50 % de la superficie con cultivo. Para este cultivo, se conocen varios patotipos de *V. dahliae* que lo afectan y la medida de control más eficaz es la resistencia genética de los cultivares (Carneros *et al.*, 2015; Domínguez *et al.*, 2022).

La caracterización de patógenos es esencial, pero también es importante el manejo de las enfermedades del cultivo, entre otras cosas, de esta manera se asegura el rendimiento y la rentabilidad del cultivo (Molinero Ruiz, 2019).

Este fitopatógeno ocasiona marchitamiento en toda la planta, ataca al xilema y dificulta la circulación de agua, por lo que disminuye la tasa fotosintética y de transpiración, el cierre de estomas produce incremento en la temperatura del canopeo y la defoliación. El avance de la enfermedad es desde la base hacia el ápice, afectando ramas y hojas (Maldonado Arteaga, 2020; Domínguez *et al.*, 2022). La sintomatología se observa en hojas inferiores con áreas cloróticas internervales, pudiendo llegar a fusionarse. El tejido clorótico luego se necrosa y queda rodeado de tejido clorótico, la sintomatología avanza hacia el ápice con menor severidad. También pueden originar parches negros alargados en la parte inferior del tallo, el tejido vascular infectado toma coloración rojiza y el tejido medular puede oscurecerse. Ya que el patógeno realiza una infección sistémica puede encontrarse distribuido por toda la planta (Ryley *et al.*, 2021).

I.3.2.2. Verticilosis del olivo

La Verticilosis del olivo (VO) es una enfermedad ampliamente distribuida en todos los países donde se cultiva olivo, su importancia en Argentina se manifiesta principalmente en las provincias productoras como: Catamarca, La Rioja, Córdoba y Mendoza (Rattalino

et al., 2021). Relevamientos indican un incremento en los últimos años, pudiéndose observar en plantaciones tradicionales esta patología de manera crónica, mientras que en plantaciones intensivas puede producir la muerte en plantas jóvenes (Otero *et al.*, 2019). La VO ocasiona pérdidas económicas de importancia debido a la disminución en los rendimientos, como así también a la muerte de los hospedantes. Se estimó que la pérdida de rendimiento en frutos de olivos var. Picual inoculado con *V. dahliae*, asciende al 75% - 89% del tercer al quinto año después de la siembra en suelo (Carrero Carrón *et al.*, 2016). Es importante resaltar que estudios de identificación molecular de este patógeno son escasos, a nivel regional, en la Argentina. En tanto, resultados de identificaciones moleculares dieron como resultado presencia de cepas del patotipo No defoliante (ND) (Rattalino *et al.*, 2021; Gonzalez *et al.*, 2021).

La VO se ha convertido en uno de los principales problemas para este cultivo en las últimas décadas (Ruano Rosa *et al.*, 2015).

La marchitez localizada es característica de la VO, se debe a la producción de sustancias tóxicas y estructuras acumuladas en el xilema, producto de la presencia del fitopatógeno *V. dahliae* y a su vez por cambios fisiológicos sufridos por el hospedante como el engrosamiento del sistema vascular. Como señalan Palazón y Palazón (1989), los síntomas del síndrome VO dependen del momento de la infección, si se da al inicio del cultivo se detiene el desarrollo de las plantas pudiendo llegar a la muerte, mientras que en etapas más avanzadas también se produce defoliación, aunque puede permanecer un poco más en los árboles, lo cual también está ligado a las condiciones climáticas, en especial la temperatura (González Vera *et al.*, 2012; Ruíz Olmos *et al.*, 2012). Eventualmente algunos árboles pueden superar la enfermedad, como resultado producen nuevos tejidos alrededor de tejidos necróticos, lesiones precedentes y ramas recuperadas de árboles afectados pueden alcanzar niveles normales de rendimiento en los sucesivos períodos de crecimiento (López Escudero *et al.*, 2010; López Escudero y Mercado Blanco, 2011).

Aunque también Landa del Castillo *et al.* (2008) indicaron que la recuperación se debe a la inactivación del patógeno en el tejido vegetal, y para continuar el desarrollo de la enfermedad, es necesario que el patógeno reinfecte el tejido, encontrándose esto acompañado por factores que estimulen la continuidad de su ciclo y la gravedad de los síntomas, como por ejemplo: la susceptibilidad del cultivar (olivo), la densidad del inóculo en el suelo, el tipo de cepa de *V. dahliae* y las condiciones ambientales (Fernández

Valiela, 1979; Jiménez Díaz, 2009; López Escudero y Mercado Blanco, 2011; González Vera *et al.*, 2012). Cuando la infección alcanza cierto nivel, se manifiestan los síntomas característicos de la enfermedad de la VO, pudiendo expresar las plantas diferente sintomatología: “declive lento” originado por la cepa de *V. dahliae*, No Defoliante (de Virulencia Moderada) o “decaimiento rápido o apoplejía”, originado por cepas “Defoliante” (de Virulencia Severa). La primera se inicia a principios de primavera hasta el verano y tiene la característica de presentar síntomas que se desarrollan gradualmente, como el necrosamiento y posterior momificación de hojas, flores y frutos. En donde las hojas de los brotes afectados se tornan color verde mate y eventualmente se caen. Mientras que el “decaimiento rápido o apoplejía” ocurre al final del invierno hacia principio de primavera y presenta brotes y ramas secas con presencia de coloración morada, que avanza desde el extremo a la base, se manifiesta la caída temprana de las hojas asintomáticas. A veces se muestran las hojas de coloración pardas y abarquillándose hacia el envés, quedando estas adheridas al tejido afectado. El crecimiento del hongo en el tejido xilemático toma coloración púrpura o marrón (López Escudero y Mercado Blanco, 2011; González Vera *et al.*, 2012; Carrero Carrón *et al.*, 2016). Síntomas similares pueden deberse a deficiencias de nutrientes, asfixia radical o infección producida por otros hongos de suelo.

En otros hospedantes, como ser tomate, papa, pimiento, etc., la infección resulta en la reducción del crecimiento, con síntomas de epinastía, marchitamiento, clorosis foliar que puede progresar a necrosis, oscurecimiento de los vasos xilemáticos y abscisión foliar (Ruíz Olmos, 2012).

I.4. Hipótesis

Se parte del supuesto de que cepas nativas o naturalizadas del hongo *Trichoderma* tendrán capacidad de controlar biológicamente al hongo fitopatógeno nativo, *Verticillium dahliae* Kleb, y su acción antagónica estará condicionada por factores abióticos (temperatura, humedad, nutrientes, tipos de suelo).

I. 5. Objetivo general

Aislar, identificar y caracterizar funcionalmente cepas nativas del hongo *Trichoderma* con actividad antifúngica sobre el hongo fitopatógeno *V. dahliae* Kleb, agente causal de la verticilosis del olivo de zonas productoras.

I. 6. Objetivos específicos

1. Aislar, seleccionar y caracterizar cepas de *V. dahliae* de la provincia de Catamarca y zonas aledañas como agente fitopatógeno del cultivo de olivo (*Olea europaea* Linneo).
2. Aislar y seleccionar cepas de *Trichoderma* spp. de zonas cultivadas y no cultivadas de la provincia de Catamarca.
3. Determinar la capacidad de biocontrol *in vitro* de *Trichoderma* spp. frente a *V. dahliae* Kleb.
4. Determinar la capacidad de biocontrol de *Trichoderma* spp. frente a *V. dahliae* Kleb en cámara de cultivo y en condiciones de invernáculo.
5. Seleccionar y caracterizar cepas eficientes de *Trichoderma* spp. antagonistas de *V. dahliae* Kleb en olivo, como controlador biológico para el manejo de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos plateados se trabajó con los siguientes materiales llevando adelante los procedimientos que se plantean a continuación.

II.1. Muestreo y aislamiento de *V. dahliae*

En los meses de septiembre a noviembre (primavera) de 2015 se muestrearon un total de 25 productores olivícolas, 13 ubicadas en las provincias de Catamarca, en los Dptos. de Capital, Valle Viejo, Pomán y Tinogasta y 12 en provincia de La Rioja en el dpto. Arauco (Anexo –Tabla 30). Las plantaciones presentaban lotes de diferentes edades y con diferentes variedades tales como: Arauco, Manzanilla Sevillana, Picual, Misión, Barnea, Arbequina y Frantoio. Se recorrieron lotes donde las plantas presentaron síntomas

característicos de la enfermedad VO (Figura 7: A - D). Las muestras fueron recolectadas siguiendo el protocolo sugerido por González Vera *et al.* (2012), y luego fueron conservadas en heladera a 4 °C. Posteriormente se realizó el aislamiento de *V. dahliae* siguiendo la metodología recomendada por Blanco López *et al.* (1984) y Roca de Esteva (2015). Por lo cual, se cortaron ramitas de 20 a 30 cm de largo, retirando las hojas y posteriormente se lavaron fuertemente con esponja y detergente diluido. Luego se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % durante 2 min. Se lavaron con agua corriente por 45 – 60 min y posteriormente con agua destilada estéril (Figura 8: A). En cámara de flujo laminar se procedió al descortezamiento superficial de las ramitas con bisturí. Se cortaron segmentos de material vegetal (córtez - xilema) de 5 cm que fueron desinfectados nuevamente con hipoclorito de sodio al 1 % por 15 seg, luego se lavaron con agua destilada estéril y secaron sobre papel tipo tissue estéril. Se sembraron 5 a 6 trozos del material vegetal en placas de Petri con papa glucosa agar (APG) estéril y se incubaron en oscuridad a 25 ± 1 °C durante 14 días (Figura 8: B – E).



Figura 7: Elección y recolección de muestra vegetal de olivo: **A y B)** olivo con necrosis sectorial; **C)** rama con hojas con clorosis apical; **D)** corte transversal de ramas de olivo con presencia de tejido interno color castaño. Finca Arphi S.A. Valle Viejo, Catamarca.



Figura 8: Desinfección y siembra de muestra vegetal de olivo. **A:** desinfección de ramitas, con hipoclorito de sodio; **B:** descortezamiento superficial de ramitas; **C:** tejido descortezado (córtez - xilema) y **D:** desinfección superficial de material vegetal a sembrar. **E:** siembra de material vegetal en APG. Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

II.1.1. Obtención de cultivos puros y selección de cepas

Para garantizar que se estuviera trabajando con un cultivo puro se realizaron aislamientos por agotamiento en superficie, se sembraron en estrías en medio de cultivo APG a partir de las colonias identificadas como *V. dahliae*. Se incubaron en condiciones de oscuridad a 25 ± 1 °C por 7 a 10 días. Luego con ayuda de microscopio estereoscópico Olympus SZ 11 - CTV se observaron las características de la colonia y posteriormente con microscopio óptico Olympus BH-2 A :40, se confirmó lo observado en relación con la sintomatología presente en las plantas muestreadas. La elección de la cepa se realizó según las características sintomatológicas y la severidad que presentó la planta hospedante, las características morfológicas de la colonia y del fitopatógeno y la agresividad de la misma.

II.1.2. Identificación morfológica y conservación de cepa

La cepa aislada del fitopatógeno *V. dahliae*, se identificó morfológicamente a nivel de género por medio de observaciones macroscópicas de la colonia y microscópicas utilizando el microscopio óptico Olympus BH-2 con aumento de 10 y 40 X. El material fúngico fue coloreado con azul de algodón y expuesto a diferentes mediciones siguiendo la técnica de French y Herbert (1980). La cepa se conservó en tubos de ensayo con APG pico de flauta a 4 °C.

II.1.3. Identificación molecular

La cepa aislada de *V. dahliae*, se envió al laboratorio Macrogen – Corea, donde se procedió a la extracción del material genético, la amplificación de las regiones ITS1 – ITS4, con los primer: ITS1: 5´ (TCC CTA GGT GAA CCT GCT G) 3´ y ITS4: 5´ (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3´ (León Ttacca *et al.*, 2019, Cheng *et al.*, 2020, Inderbitzin *et al.*, 2020). Para la secuenciación se utilizó el kit: Big Dye terminator cycle sequencing Kit v 3.1, en el secuenciador Applied Biosystems model 3730XL, automated DNA sequencing system de Macrogen. Con estos resultados se procedió a la identificación molecular, mediante comparaciones de las secuencias obtenidas con la base de datos del GenBank, específicamente tomando como referencia la base de datos ARNr/ITS para hongos, la cual contiene registros curados y reanotados de las secuencias de la región ITS específicas del grupo Fungi. La muestra secuenciada fue identificada con la ayuda del software BlastN Report. Además, se calculó el porcentaje de similitud de las secuencias obtenidas con la cepa patrón, utilizando herramientas disponibles en la página del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

II.2. Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* spp.

II.2.1. Muestreo de suelos

En los meses de septiembre, octubre y abril se tomaron muestras de suelo y se georreferenciaron 58 sitios diferentes (cultivados y no cultivados) de la provincia de Catamarca. Éstos no tenían antecedentes de aplicación de bioinsumos. El muestreo se realizó siguiendo la metodología planteada por Vargas Gil *et al.* (2017). Las muestras se acondicionaron en bolsas y se llevaron al laboratorio, donde fueron conservadas a 4 °C, posteriormente se procesaron y utilizaron como inóculo en el sustrato para el aislamiento de cepas de *Trichoderma*.

II.2.2. Preparación del sustrato y siembra de suelo

Los sustratos empleados fueron orujos de vid tinta (VT) y blanca (VB) (Figura 9), de productores de la zona, se hidrataron con agua corriente durante 24 h, posteriormente se los escurrió y se colocaron en frascos de vidrio de 400 mL, completando el volumen de éstos en un 75 % (Figura 10: A - C). Los frascos se taparon con papel de aluminio y se esterilizaron en autoclave con vapor saturado a presión de 1 atm, 121 °C y durante 20 min (Allori Stazzonelli *et al.*, 2017). Las muestras de suelo fueron sembradas por triplicado,

en cámara de flujo laminar, espolvoreando 20 g de suelo sobre el sustrato estéril. Luego se tapó con papel de aluminio y agitó, llevando a incubación con fotoperíodo de 16 h de luz y 26 ± 1 °C, durante 7 a 10 días. Se realizaron observaciones periódicas hasta la aparición de colonias típicas de *Trichoderma*, corroborando sus características con microscopio estereoscópico. Posteriormente se confirmó la presencia de conidios y micelio característicos del género mediante la observación con microscopio óptico a 10 y 40 X de aumento (González Basso *et al.*, 2018). Los frascos que presentaron contaminación fueron desechados, quedando seleccionados aquellos que presentaron solo colonias típicas del género *Trichoderma*.

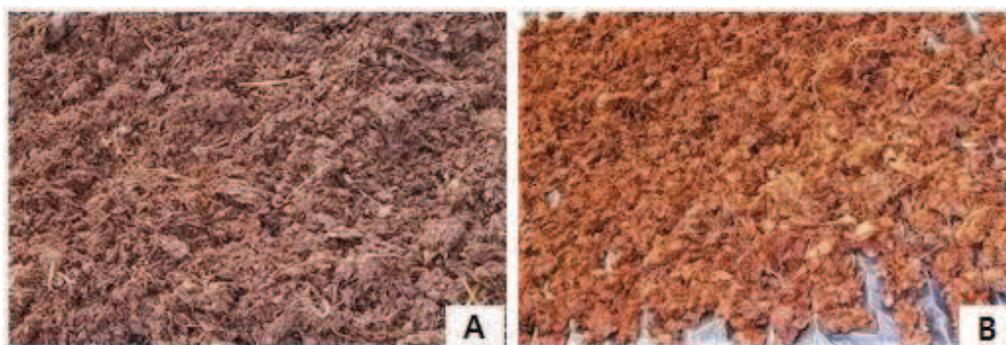


Figura 9: Orujos secos de vid **A:** uva tinta; **B:** uva blanca.

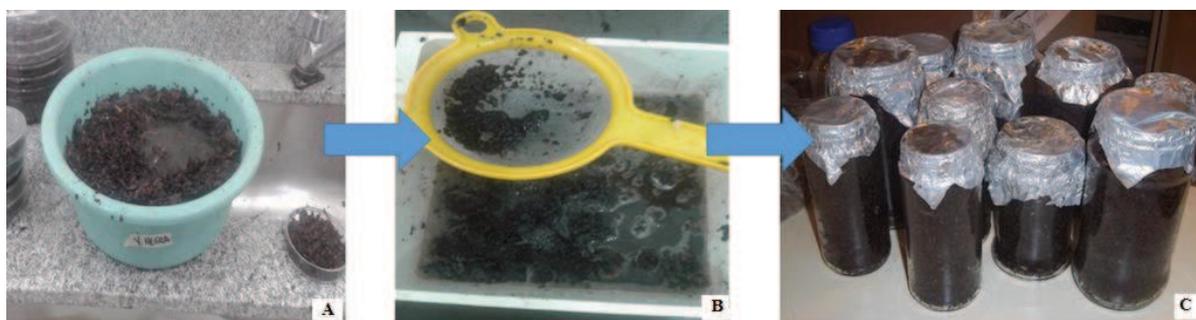


Figura 10: Preparación de orujo de vid blanca y tinta para el aislamiento de *Trichoderma*. **A:** hidratación; **B:** escurrimiento y **C:** envasado de orujo en frascos de vidrio.

II.2.3. Aislamiento, identificación morfológica y conservación de cepas de *Trichoderma* spp.

Se tomó el inóculo contenido en el orujo y se realizaron aislamientos por agotamiento en superficie con siembra en estrías en la superficie del medio de cultivo APG, y se incubaron con fotoperíodo de 16 h de luz/ 8 h de oscuridad, a 25 ± 1 °C. Las cepas aisladas se identificaron teniendo en cuenta características macroscópicas de la colonia, como ser:

aspecto y color y características morfológicas a nivel de género observadas por medio de microscopio óptico a 10 y 40 X de aumento (González Basso *et al.*, 2018) tales como: conidios, fiálides individuales y/o grupales, verticiladas o no (Sánchez Pérez, 2009). Posteriormente, se repicó cada aislamiento para su conservación en tubos de ensayo en pico de flauta con APG y sellados con papel film (Figura 25). Luego de la incubación se mantuvieron a 4 °C (García López y Urriburu Fernández, 2000, Guédez *et al.*, 2012; Samaniego Fernández *et al.*, 2018).

II.3. Biocontrol en condiciones *In Vitro*

La determinación de la capacidad de biocontrol *in vitro* de *Trichoderma* spp. frente a *V. dahliae* Kleb. se realizó según la Figura 11.

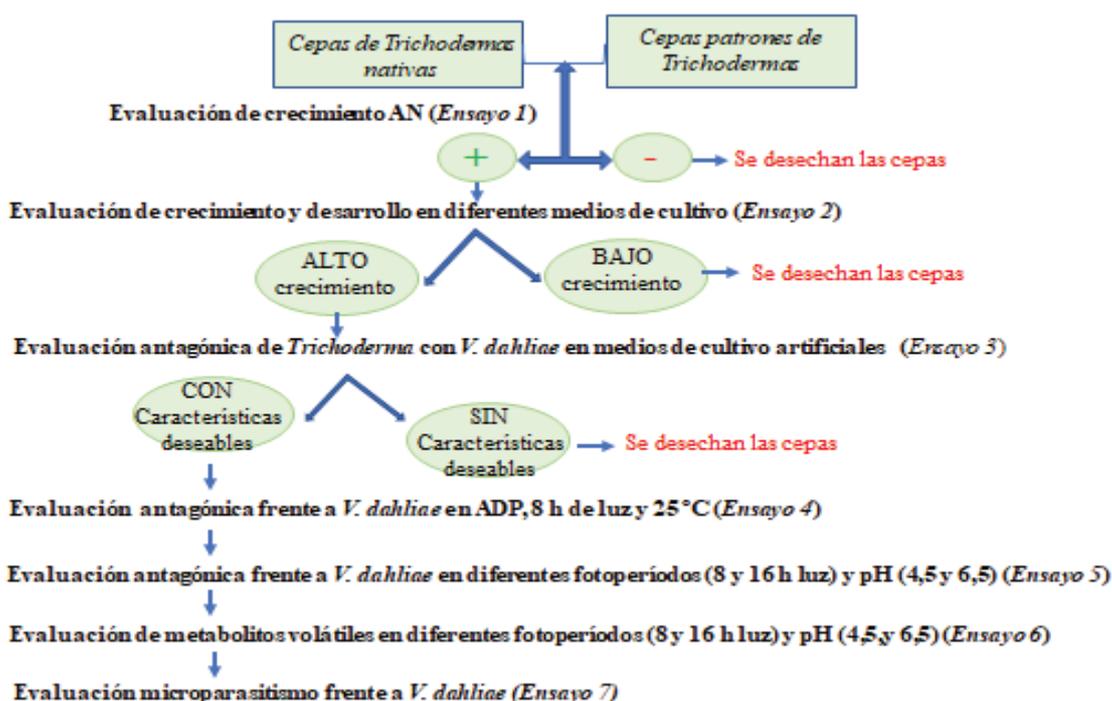


Figura 11: Diagrama de flujo indicativo de la secuencia de ensayos realizados.

II.3.1. Preparación de cultivos madres de cepas de *Trichoderma* spp.

Los cultivos madre de *Trichoderma* se prepararon con el objetivo de contar con el inóculo suficiente para la realización de los diferentes ensayos. Estos se efectuaron a partir de las cepas nativas aisladas de *Trichoderma* spp. y dos cepas patrón de *Trichoderma* spp.,

pertenecientes al laboratorio de Fitopatología de la UNCa. En cámara de flujo laminar se sembraron por duplicado, utilizando cajas de Petri de 9 cm de Ø, con APG estéril, que luego se incubaron a 25 ± 1 °C con fotoperíodo de 16 h de luz, durante 3 a 5 días.

II.3.2. Evaluación de crecimiento de cepas de *Trichoderma* spp. en Agar Nutritivo (AN) (Ensayo 1)

Este ensayo se realizó para evaluar la capacidad de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* spp. en un medio de cultivo general. Para esto, en cámara de flujo laminar se sembraron en cajas de Petri con AN, en estrías en superficie a partir de los cultivos madres de *Trichoderma*. Se incubaron en condiciones controladas a 25 ± 1 °C, con fotoperíodo de 16 h de luz, durante 7 días. Posteriormente se evaluaron las cepas según la capacidad de crecimiento, en positivas, con crecimiento de micelio y/o de conidios o negativas sin crecimiento.

II.3.3. Evaluación de crecimiento y desarrollo de cepas de *Trichoderma* spp. en diferentes medios de cultivo (Ensayo 2)

A partir de las cepas de *Trichoderma* spp. que prosperaron en AN, se realizaron pruebas de evaluación de crecimiento y desarrollo en diferentes medios de cultivo. Se probaron 5 medios de cultivos artificiales y uno natural (sustrato agroindustrial, orujo de vid tinta) (Tabla 8).

Tabla 8: Medios de cultivo y sustrato agroindustrial utilizados para evaluar el crecimiento y desarrollo de *Trichoderma* spp.

MEDIOS DE CULTIVO	SINTÉTICOS	I. Papa glucosa agar (APG)
		II. Sabouraud (SAB)
		III. Amilolítico (Amil)
		IV. Czapek (CZP)
		V. Selectivo de Hongo y Levadura (HyL)
	NATURALES	VI. Orujo de vid tinta (VT)

El sustrato de VT previo a su uso fue hidratado 24 h y esterilizado siguiendo el procedimiento explicado en II.2.1 (Preparación del sustrato y siembra de suelo).

Se sembraron por triplicado 4 cepas de *Trichoderma* por caja de Petri, la combinación de las cepas sembradas en la misma caja fue al azar. En cada caja de Petri se trazaron 2 líneas perpendiculares quedando delimitados cuatro cuadrantes de igual área. En el centro de cada uno de los cuatro cuadrantes se sembraron discos de APG de 5 mm de Ø, con crecimiento activo de cada una de las cepas de los cultivos madre de *Trichoderma* (Figura 12). Mientras que en orujo de VT se colocó solo un disco en el centro de la caja. Seguidamente se incubaron en condiciones controladas a 25 ± 1 °C, con fotoperíodo de 16 h de luz durante 48 h, se evaluó la dinámica de crecimiento ($\text{mm}^2/\text{tiempo}$) de cada una de las cepas en los diferentes medios de cultivo y se marcaron los bordes del área de crecimiento de cada una de las colonias. Posteriormente las cajas de Petri fueron fotografiadas de manera individual para luego calcular el Área de crecimiento (AC) de cada colonia mediante el software Image J y observar sus características de crecimiento y desarrollo. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) y las medias fueron comparadas mediante Prueba de LSD (Mínima diferencia significativa) de Fisher a un nivel de significancia de 0,05 empleando el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2020).

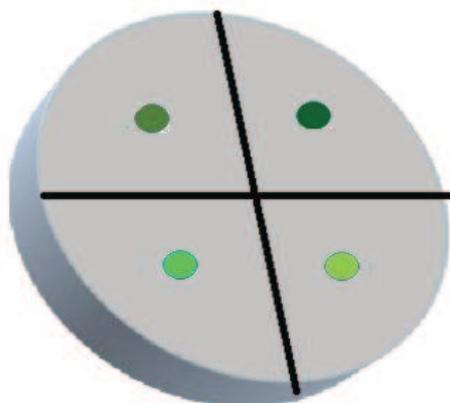


Figura 12: Esquema de siembra de tacos de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. para evaluar crecimiento y desarrollo en diferentes medios de cultivo (cada color representa una cepa).

II.3.4. Preparación de cultivos madre de la cepa del fitopatógeno

Los cultivos madre de *V. dahliae* se prepararon con el objetivo de contar con el inóculo suficiente para la realización de los diferentes ensayos. Se realizó la siembra del

fitopatógono en cajas de Petri de 9 cm de Ø con APG estéril, luego se incubaron a 25 ± 1 °C en oscuridad durante 10 días.

II.3.5. Evaluación de crecimiento de cepas antagónicas de *Trichoderma* spp. con *V. dahliae* en diferentes medios de cultivo artificiales (Ensayo 3)

Este ensayo se realizó a partir de los cultivos madres de cepas *Trichoderma* spp. obtenidas como resultado del ensayo II.3.3 y con igual criterio se seleccionaron los medios de cultivo artificiales: APG, SAB y HyL. El medio de cultivo natural no fue considerado ya que por las características físico química que posee, esta técnica de evaluación no es factible realizar.

En el ensayo se plantearon 3 factores de evaluación: **1°**: 3 medios de cultivos; **2°**: 11 cepas de *Trichoderma* spp. y **3°**: 1 cepa de *V. dahliae*, dando un total de 33 combinaciones y 4 repeticiones. Las cepas de *Trichoderma* fueron elegidas al azar y la siembra se realizó en cajas de Petri, en las cuales se trazaron 2 líneas perpendiculares, quedando divididas en cuatro cuadrantes de igual área. En la intersección de las dos líneas se sembró a partir del cultivo madre del fitopatógono un disco de APG de 5 mm de Ø (Figura 13), se incubó durante 48 h y posteriormente en el centro de cada cuadrante se sembró un disco de APG de 5 mm de Ø de la colonia de la cepa de *Trichoderma*. Luego se incubaron con fotoperíodo de 8 h de luz, a T° de 25 ± 1 °C, durante 3 días. Se evaluó la capacidad antagónica de cada una de las cepas de *Trichoderma* frente al hongo fitopatógono mediante el análisis del AC. Cada una de las cajas fueron fotografiadas para su medición mediante el software Image J y posteriormente los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) y las medias fueron comparadas mediante Prueba de LSD (Mínima diferencia significativa) de Fisher a un nivel de significancia de 0,05 empleando el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2020).

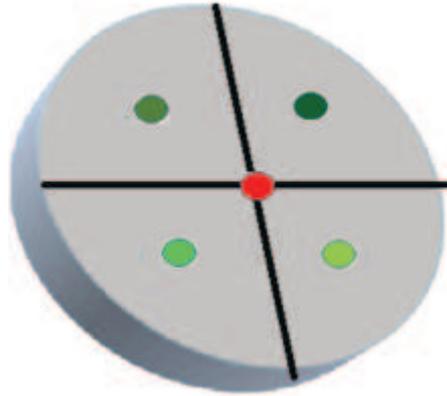


Figura 13: Esquema de siembra de tacos de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. para evaluar el antagonismo frente al fitopatógeno (cada color representa una cepa, siendo el rojo, *V. dahliae*).

II.3.6. Identificación Molecular

Las cepas con potencialidad antagonista se enviaron al laboratorio Macrogen – Corea, donde se realizó la extracción del material genético, la amplificación de las regiones ITS1 – ITS4, con los primer: ITS1: 5´ (TCC CTA GGT GAA CCT GCT G) 3´ y ITS4 5´ (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3´ (Hernández Mendoza *et al.*, 2011; Moya *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020; Allende Molar *et al.*, 2022). El procedimiento de secuenciación se realizó de igual modo al descrito en el ensayo precedente II.1.3.

II.3.7. Ensayos de cultivo dual:

II.3.7.a. Ensayo de cultivo dual con cepas de *Trichoderma* spp. (Ensayo 4)

El siguiente ensayo se realizó para evaluar la capacidad antagónica de las cepas obtenidas como resultado del ensayo precedente III.3.5. Se realizaron 4 tratamientos con cada una de las cepas, con 5 repeticiones.

T1: Testigo, solo *V. dahliae* (Vert)

T2: Combinado de *V. dahliae* + *T. hamatum* (Vert + TM5A)

T3: Combinado de *V. dahliae* + *T. asperellum* (Vert + TPam3)

T4: Combinado de *V. dahliae* + *T. asperellum* (Vert + TVL1)

Posteriormente se siguió la técnica usada por García Velasco *et al.* (2021), con modificaciones. En cajas de Petri, con APG estéril se colocó un disco de 5 mm de Ø que contenía al fitopatógeno, distante del borde, se incubó con fotoperíodo de 8 h luz a 25 ± 1 °C durante 48 h, luego a 3 cm de distancia se sembraron las cepas con potencialidad antagonista, contenidas en disco de APG de 5 mm de Ø. Luego se continuó incubando en las condiciones controladas ya descriptas durante cuatro días. La acción antagonista se evaluó diariamente mediante tres parámetros:

- 1) **Tiempo de Contacto (TC)** Antagonista – Patógeno, es el número de días en el cual ambas cepas entran en contacto.
- 2) **Clase**, es la competencia de sustrato a través de la Escala de clases de Bell *et al.* (1982), citado por Martínez *et al.* (2013 b) (Tabla 9).
- 3) **Porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC)**, determinado con el área de crecimiento del fitopatógeno (mm^2),

$$\text{PIC} = [(C1 - C2) / C1] \times 100$$

Siendo:

C1: el área de crecimiento del fitopatógeno (mm^2), tratamiento testigo

C2: el área de crecimiento del fitopatógeno combinado con *Trichoderma*, en el cultivo dual.

Lo que define el efecto inhibitorio, tomando el PIC calculado a los 4 días. El área de crecimiento diario (C1 y C2) se midió de la manera descripta en ensayos sobre la recta que marca los 3 cm de distancia entre ambos microorganismos. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) y las medias fueron comparadas mediante Prueba de LSD (Mínima diferencia significativa) de Fisher a un nivel de significancia de 0,05 empleando el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2020).

Tabla 9: Escala de clases de Bell *et al.* (1982).

CLASE 1	<i>Trichoderma spp.</i> crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio de cultivo.
CLASE 2	<i>Trichoderma spp.</i> crece al menos sobre las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.
CLASE 3	<i>Trichoderma spp.</i> y el patógeno cubren aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo.
CLASE 4	El patógeno crece al menos en las dos terceras partes del medio de cultivo limitando el crecimiento de <i>Trichoderma spp.</i>
CLASE 5	El patógeno crece sobre la colonia de <i>Trichoderma spp.</i> ocupando toda la superficie del medio de cultivo.

Referencia: Los aislamientos de *Trichoderma spp.* que estén en la clase 1 ó 2 se consideran altamente antagonistas (CET, 2004).

II.3.7.b. Ensayo de cultivo dual en 2 fotoperíodos y 2 pH diferentes

(Ensayo 5)

En este ensayo se continuaron evaluando las mismas cepas de *Trichoderma* con el objeto de estudiar la influencia de 2 pH y 2 fotoperíodos. El ensayo se realizó por triplicado con diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 4 x 2 x 2, el primer factor “cepa” con cuatro (4) niveles: uno (1) el fitopatógeno *V. dahliae* solo y las 3 cepas de *Trichoderma* combinadas con *V. dahliae*, el segundo factor “fotoperíodo” con dos niveles: de 8 y 16 h de luz y el tercer factor “pH” con dos niveles: 4,5 y 6,5 generando un total de 16 tratamientos con 5 repeticiones cada uno (Tabla 10).

Tabla 10: Tratamientos planteados para evaluación de antagonismo con 2 fotoperíodos (8 y 16 h luz) y 2 pH (4,5 y 6,5).

CEPA \ FACTOR	FACTOR FOTOPERÍODO	FACTOR pH	TRATAMIENTOS
Vert	8 hs	4,5	T. 1 (control)
		6,5	T. 2 (control)
	16 hs	4,5	T. 3 (control)
		6,5	T. 4 (control)

Vert +TM5A	8 hs	4,5	T. 5
		6,5	T. 6
	16 hs	4,5	T. 7
		6,5	T. 8
Vert +TVL1	8 hs	4,5	T. 9
		6,5	T. 10
	16 hs	4,5	T. 11
		6,5	T. 12
Vert + TPaM3	8 hs	4,5	T. 13
		6,5	T. 14
	16 hs	4,5	T. 15
		6,5	T. 16

Las siembras se realizaron en APG con pH modificado con ácido láctico e incubado con los fotoperíodos señalados a 25 ± 1 °C durante 5 días. Los ensayos duales se efectuaron siguiendo la técnica descrita en el ensayo precedente (II.3.7.a). La acción antagónica se evaluó diariamente, mediante tres parámetros: 1) Tiempo de Contacto (TC), 2) Clase, 3) Porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC). Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) y las medias fueron comparadas mediante Prueba de LSD (Mínima diferencia significativa) de Fisher a un nivel de significancia de 0,05 empleando el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2020).

II.3.8. Ensayo de evaluación de metabolitos volátiles en 2 fotoperíodos y 2 pH diferentes (Ensayo 6)

En este ensayo se evaluó la capacidad de producir metabolitos volátiles de las cepas en estudio de *Trichoderma* y la influencia de 2 pH y 2 fotoperíodos. El ensayo se realizó por triplicado con diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 4 x 2 x 2, el primer

factor “cepa” con 4 niveles: 1 el fitopatógeno *V. dahliae* solo y las 3 cepas de *Trichoderma* combinadas con *V. dahliae*, el segundo factor “fotoperíodo” con dos niveles: con 8 y 16 h de luz y el tercer factor “pH” con dos niveles: 4,5 y 6,5 generando un total de 16 tratamientos con 3 repeticiones cada uno. Estas fueron sembradas en APG con pH modificado e incubado con los fotoperíodos señalados a 25 ± 1 °C. El ensayo se realizó siguiendo el método de las cajas superpuestas (Baiyee *et al.*, 2019 b), que consiste en dos bases de dos cajas de Petri se colocó medio de cultivo y luego se sembró en el centro de una de las cajas un disco de 5 mm de Ø que contenía a *V. dahliae*, a las 48 h de incubación se incorporó a cada uno de los tratamientos las (3 cepas de *Trichoderma* en la caja restante (Figura 14), las cajas fueron enfrentadas y selladas con papel film y luego colocadas en incubación. A partir del segundo día de incubación del fitopatógeno se midió con regla el radio de crecimiento diario durante 10 días y se calculó el PIC (Porcentaje de Inhibición de Crecimiento). Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) y las medias fueron comparadas mediante Prueba de LSD (Mínima diferencia significativa) de Fisher a un nivel de significancia de 0,05 empleando el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2020).

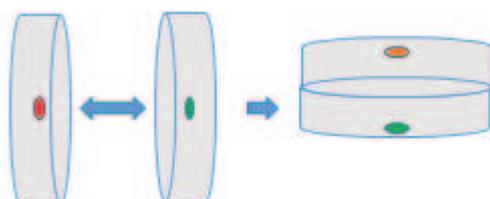


Figura 14: Esquema de la ubicación de los tacos de las diferentes colonias en las cajas de Petri. Referencias: **rojo:** *V. dahliae* y **verde:** *Trichoderma*.

II.3.9. Microcultivos (*Ensayo 7*)

Se determinó la acción y tipo de parasitismo de las cepas antagonistas en estudio, frente al fitopatógeno. Se efectuó un ensayo con un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 3 x 2 x 2, el primer factor “antagonistas” con 3 cepas de *Trichoderma* en estudio, un segundo factor “pH” con 2 niveles de pH (6,5 y de 4,5) y el tercer factor “fotoperíodo” con dos niveles de iluminación (8 y 16 h de luz). Los microcultivos se realizaron siguiendo la técnica de Martins Corder y de Melo (1998). En cajas de Petri de

15 cm se acondicionaron en cámara húmeda portaobjetos estériles y sobre ellos se colocó APG estéril con los pH establecidos, sobre este colocó al fitopatógeno contenido en disco de 5 mm de Ø de APG y luego un cubreobjeto. A las 48 h de incubación se colocaron enfrente las cepas con potencialidad antagónica, contenidas en disco de APG de 5 mm de Ø. Posteriormente se incubó en condiciones controladas con T° de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y en las condiciones de iluminación controladas. Se realizaron evaluaciones diarias para determinar si presentaban algún tipo de parasitismo, tales como: coilling o enrollamiento, micoparasitismo, emisión de haustorios e hinchamiento y vacuolización de las hifas (Martínez Salgado *et al.*, 2021). Para lo cual se tomó el cubreobjeto y se lo colocó en un portaobjeto con azul de algodón y mediante observaciones diarias, con microscopio óptico a 40 X de aumento, se evaluaron las características micoparasíticas que presentaban.

II.4. Biocontrol en condiciones controladas en cámara de cultivo y en invernáculo

II.4.1. Preparación del inóculo

II.4.1.a. Preparación de cultivos madre de cepas antagonistas y del fitopatógeno

Estas preparaciones tuvieron como objetivo contar con la cantidad suficiente de microorganismos al momento de la realización de los ensayos. La cepa antagonista, *T. hamatum* (TM5A) se repicó en placas de Petri con APG estéril, se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con fotoperíodo de 16 h de luz. De igual manera en botella de 500 mL, con APG estéril se sembró en pico de flauta el fitopatógeno *V. dahliae* y luego se incubó en condiciones de oscuridad a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

II.4.1.b. Preparación de suspensiones conidiales

Para la obtención del inoculante de *V. dahliae* y del antagonista se procedió al preparado en cámara de flujo laminar. Se realizaron las diluciones a partir de los cultivos madres (Figura 15). La cepa antagonista cultivada fue vertida en botellas de vidrio de 1000 mL y suspendida en 500 mL agua corriente estéril, posteriormente se llevó a agitación constante durante 2 períodos de 2 h a 100 r.p.m. Mientras que al cultivo madre de *V. dahliae* se le agregó aproximadamente 300 mL de agua corriente estéril y se llevó a agitación constante

durante 2 períodos de 4 h a 100 r.p.m. Finalmente ambas diluciones en cámara de flujo laminar fueron filtradas a través de gasa estéril.

II.4.1.c. Multiplicación de cepa antagonista

Dada la eficiencia de la reproducción de *Trichoderma* en orujo de VT utilizado como sustrato, se procedió a la multiplicación de la cepa antagonista TM5A en botellas de vidrio que contenían orujo de VT, hidratado y esterilizado, tal como se describió en el apartado II.2.2. Se agregaron 5 mL/ frasco de la suspensión de conidios del antagonista obtenido en el ensayo precedente (II.4.1.b.), se tapó con el papel de aluminio y agitó buscando una mezcla homogénea, se incubó en fotoperíodo de 16 h de luz a 25 ± 1 °C durante 7 a 10 días. Posteriormente se realizaron observaciones periódicas hasta el crecimiento de *Trichoderma* en el sustrato.

II.4.1.d. Preparación de inoculante

En cámara de flujo laminar se agregó agua corriente estéril al orujo inoculado, completando el 75 % del volumen de la botella que lo contenía (Figura 15), luego se llevó a agitación constante durante 2 períodos de 10 h a 100 r.p.m. y se filtró con gasa estéril. Para ambos inoculantes (cepas de *V. dahliae* y de TM5A) se procedió al conteo de conidios y microconidios a través de la cámara de Neubauer y se agregó agua corriente estéril hasta lograr la concentración deseada para cada uno de los microorganismos, siendo de 10^6 para ambos (Mercado Blanco *et al.*, 2001; López Escudero *et al.*, 2004; Tavera Zavala *et al.*, 2017; Díaz *et al.*, 2020; Ruiz Sánchez *et al.*, 2022; Ait Rahou *et al.*, 2022).

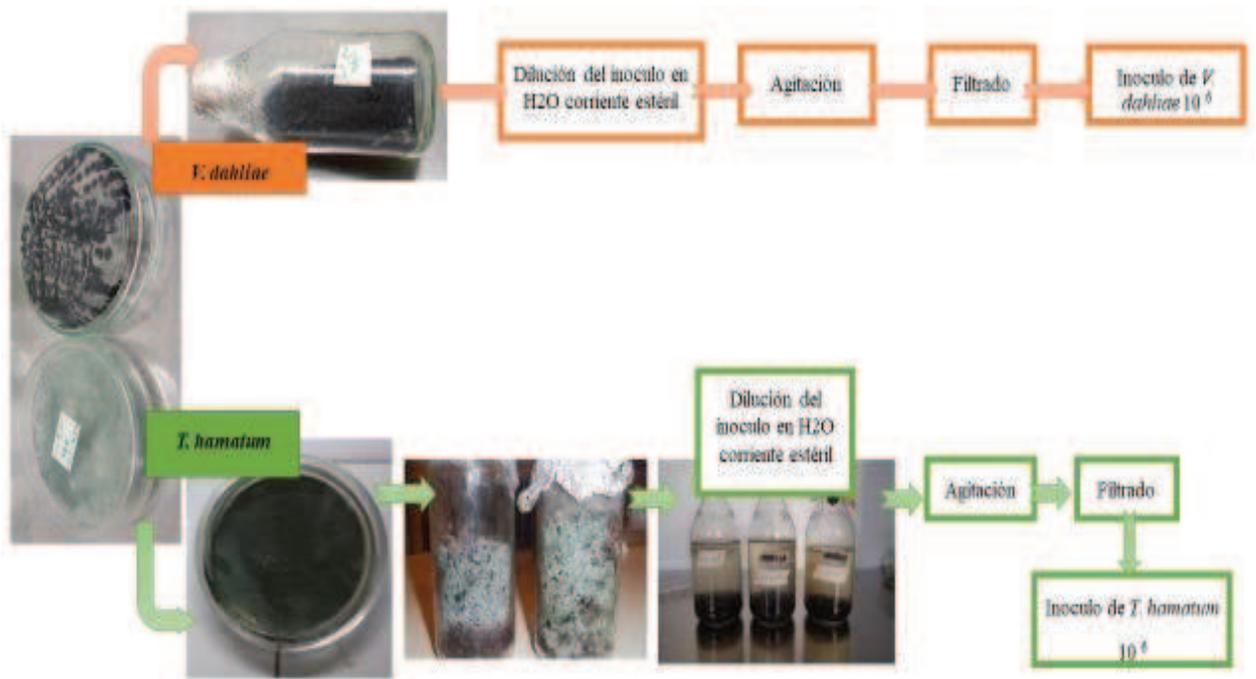


Figura 15: Preparación de inóculos de cepa antagonista *T. hamatum* (TM5A) y del fitopatógeno *V. dahliae*.

II.4.2. Inoculación de material vegetal

Los siguientes ensayos se realizaron para evaluar mediante características agronómicas la capacidad antagonista de la cepa TM5A como antagonista frente al fitopatógeno *V. dahliae* en diferentes hospedantes y en condiciones controladas de cultivo.

II.4.2.a. Evaluación de cepa nativa seleccionadas, de *T. hamatum* (TM5A) como antagonista y *V. dahliae* como fitopatógeno en plantines de olivo, var. manzanilla en cámara de cultivo

Para evaluar las características agronómicas en plantines de olivo, inoculados con: *Trichoderma*, TM5A y *V. dahliae*, se realizaron 3 ensayos diferentes, con 4 tratamientos cada uno y 6 unidades experimentales por tratamiento:

Ensayo I: plantines de 42 días se trasplantaron en suelo estéril y se inoculó con 7 mL de la cepa TM5A y posteriormente a los 20 días se inoculó con 7 mL de Vert.

Ensayo II: plantines de 50 días se trasplantaron en suelo estéril + arena (1:1) y se inoculó con 5 mL del TM5A y a los 13 días posteriores se inoculó con 5 mL del Vert.

Ensayo III: plantines de 50 días se trasplantaron en suelo estéril + perlita (1:1) y se inoculó con 5 mL de TM5A y luego de 13 días se inoculó 5 mL del fitopatógeno.

Se utilizó un inoculo de la cepa antagonica TM5A en una concentración de $1,8 \times 10^6$ conidios/mL, mientras que el inóculo de *V. dahliae* fué de $2,7 \times 10^6$ microconidios/mL. El trasplante se realizó a contenedores plásticos de 200 mL y las inoculaciones se realizaron a nivel de cuello de plantín. Los tratamientos fueron:

T1: Testigo, sin inocular

T2: Control de *Trichoderma*

T 3: Control de *V. dahliae*

T4: Combinado TM5A + Vert

Los ensayos se colocaron en cámara de cultivo durante 80 días. El riego se realizó con agua corriente estéril, manteniendo la H° a CC. Se evaluó: altura de plantín, PF de planta discriminando, raíz y parte aérea (tallo + hojas) (Figura 16). El material se colocó en estufa hasta PS para su medición. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) y las medias fueron comparadas mediante Prueba de LSD (Mínima diferencia significativa) de Fisher a un nivel de significancia de 0,05 empleando el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2020). Se corroboró también la presencia del fitopatógeno mediante técnicas de reislamiento.



Figura 16: Evaluación de plantines de olivo var. manzanilla: long de plantines y peso fresco (PF). En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

II.4.2.b. Evaluación de cepa nativa seleccionada, como antagonista y *V. dahliae* como fitopatógeno en plantines de olivo, var. manzanilla en invernáculo

II.4.2.b.1. Evaluación sanitaria de plantines de olivos al inicio del ensayo

Para determinar el estado general y sanitario de los plantines de olivo a utilizarse en el ensayo de evaluación de cepas nativas TM5A y *V. dahliae*, se realizaron los siguientes estudios: **I)** observación microscópica de estructuras fúngicas teñidas dentro de la raíz, mediante metodologías de clarificación y tinción, y **II)** desinfección del material vegetal con hipoclorito de sodio al 1 % durante 30 segundos, luego se realizó doble enjuague con agua destilada estéril (Allori Stazzonelli, 2017), se cortaron en segmentos de 3 a 4 cm y se realizaron las siembras en APG. Posteriormente se incubaron en condiciones de 25 °C con 8 h de luz durante 7 a 10 días para evaluar presencia de fitopatógenos.

II.4.2.b.2. Inoculación de plantines de olivo

Este ensayo se llevó a cabo para determinar el efecto del fitopatógeno y del antagonista en plantines de olivo variedad manzanilla de 6 meses de edad. Se realizaron 3 ensayos con 4 tratamientos cada uno, con 5 plantines por tratamiento.

T1: Testigo, con agua corriente estéril

T2: Control de TM5A

T3: Control de Vert

T4: Combinado TM5A + Vert

Las inoculaciones se realizaron introduciendo la pipeta en el suelo de la maceta, próximo al cuello del plantín. Al tratamiento testigo, T1 se le agregó 10 mL de agua corriente estéril/maceta, a los tratamientos con el antagonista (T2 y T4), se agregaron 10 mL del inoculante con el antagonista a concentración $1,6 \times 10^6$ conidios/mL, mientras que la inoculación con el fitopatógeno se realizó a los 10 días posteriores y se añadió 5 mL/maceta a $2,9 \times 10^6$ microconidios/mL a los tratamientos con el fitopatógeno (T3 y T4). La evaluación de los plantines se realizó durante 10 meses, midiendo una vez por semana la altura de las plantas, finalizado el ensayo se verificó la presencia del fitopatógeno

usando la técnica de Phillips y Hayman (1970) y a través de la siembra de material vegetal en APG para el aislamiento del fitopatógeno.

II.4.2.b.3. Constatación de presencia de *V. dahliae* en plantines de olivo y otras estructuras fúngicas

Tratamiento de raíces: Las muestras de raíces se recolectaron al azar de cinco plantas de olivo de cada tratamiento del ensayo precedente (II.4.2.b.2.). Las raíces se lavaron con agua corriente, luego se seleccionaron las más delgadas, las que se clarificaron y tiñeron siguiendo la metodología de Phillips y Hayman (1970), para la detección de estructuras de micorrizas. La tinción se realizó con solución de colorante triple de Gueguén que permite teñir en los hongos y evidenciar simultáneamente a las proteínas de azul, el almidón de violeta, a las grasas de rojo (Sarasola y Rocca, 1975) y el glicógeno en caoba (Verna y Herrero, 1952).

Exámen microscópico: Las raíces se montaron entre porta y cubreobjetos, por cada tratamiento se realizaron preparados microscópicos. Las raíces fueron observadas utilizando microscopio óptico con objetivos estándar de 10, 40 y 100X.

Cuantificación de infección: Para cada tratamiento se cuantificó el porcentaje de colonización fúngica por cuantificación microscópica, por el método de intersección de línea de Giovannetti y Mosse (1980). Para ello, de cada tratamiento se tomaron 15 segmentos de las raíces tratadas y coloreadas. Se distribuyeron al azar sobre un portaobjeto cuadrulado y mediante observación microscópica (10 y 40X) se registró la presencia-ausencia de estructuras fúngicas en las intersecciones horizontales y verticales entre raíces y líneas de la cuadrícula.

De cada tratamiento se realizaron tres repeticiones, cuantificándose al menos 100 intersecciones por preparado y se calculó la frecuencia de infección fúngica,

$$M_{\text{Giovannetti}} (\%) = (\text{SI} \times 100) / \text{SO}, \quad \text{donde:}$$

SI: corresponde al número de segmentos infectados (hifas + arbusculos + vesículas) y

SO: al número de segmentos observados totales (hifas + arbusculos + vesículas + sin infección).

También se calculó la frecuencia de aparición hifas cenocíticas, hifas tabicadas y vesículas (Covacevich *et al.*, 2001), cuantificándose hifas de micorrizas, *Trichoderma* y

Verticillium, además se registró el porcentaje de hifas de ESO (Endofíticos septados oscuros) y de microesclerocios en raicillas de olivo.

II.4.3. Siembra de material vegetal para reaislamiento de *V. dahliae* en olivo

Para corroborar la presencia del fitopatógeno se procedió a su reaislamiento siguiendo la metodología ya descrita (en II.1), para la siembra de tallos de los olivos incubados en invernáculo. Mientras que para las raíces y tallos de olivo incubados en cámara de cultivo, se modificó la técnica debido a la fragilidad del material vegetal, por lo que se procedió según lo sugerido por Fernández Herrera *et al.* (2013) al lavado con detergente al 1 % con agitación durante 1,5 min, enjuague con agua corriente por 3 veces, luego con hipoclorito de sodio al 1,5 % durante 1,5 min con agitación y se enjuagó 3 veces con agua destilada estéril. Se escurrió y se dejó secar en papel tissue estéril en cámara de flujo laminar. El material se sembró en APG e incubó en condiciones de oscuridad a 25 °C durante 10 a 14 días.

RESULTADOS

III.1. Muestreo y aislamiento de *V. dahliae*

Se determinó la presencia de *V. dahliae* en el 70 % de las fincas olivícolas muestreadas de Catamarca, mientras que el 50 % de las muestreadas en La Rioja. El total de muestras vegetales recolectadas y procesadas fue de 94, de las cuales, en 25 muestras se logró aislar al fitopatógeno de interés. La sintomatología observada en los hospederos muestreados fue necrosis sectorizada de ramas secundarias, donde las hojas presentaron abarquillamiento abaxial y hojas con clorosis apical acompañada de una leve defoliación. En corte transversal de ramillas se observó tejido interno color castaño claro correspondiente con los vasos xilémicos (Figura 7: D). También se tuvo en cuenta la incidencia y severidad de la enfermedad y las características de la colonia aislada. Las variedades que se verificaron como hospederas y positivas por la presencia de *V. dahliae* fueron Arauco, Arbequina, Manzanilla, Picual y Frantoio. Se observó la presencia de contaminantes bacterianos y fúngicos. Los agentes fúngicos contaminantes predominantes, determinados a través de observaciones microscópicas fueron: *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp.

III.1.1. Obtención de cultivos puros y selección de cepas

En los 25 aislamientos de *V. dahliae* se observaron las características coloniales típicas. Las colonias de microesclerocios obtenidas presentaron formas de estrella con distribución regular, de coloración oscura brillante, con presencia de exudados (Figura 17: B), el micelio blanco algodonoso y de crecimiento definido (Figura 17: A). Además, con microscopio se observó micelio hialino y tabicado. Para los posteriores estudios de biocontrol de esta tesis se seleccionó solo una cepa, de acuerdo a características típicas del género y especie. La cual fue la aislada en el Dpto. Capayán, provincia de Catamarca, del olivo variedad Arauco, georeferenciada en 28°55'20,48''S, 65°46'4,98''O. Muestra 11 (Figura 18 – Tabla 11).

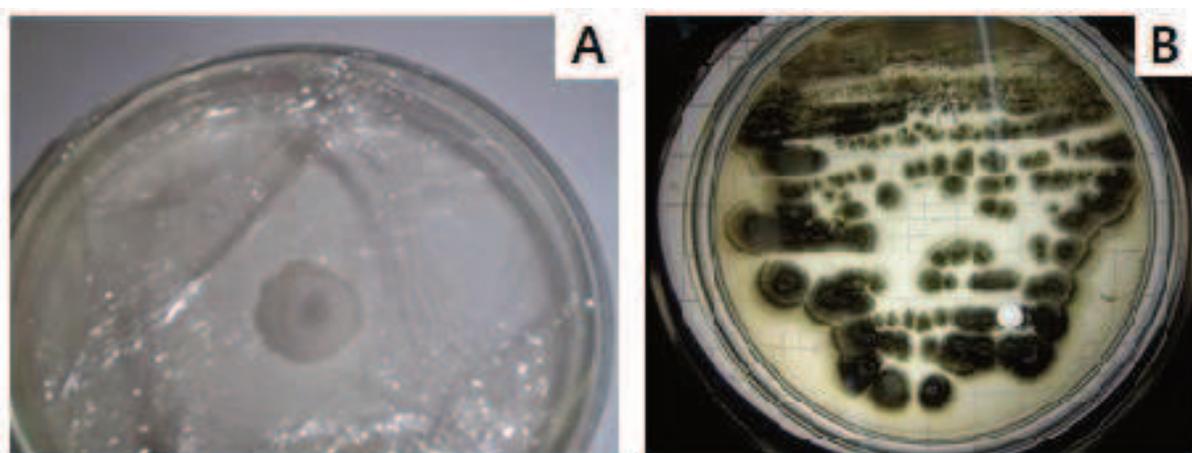


Figura 17: Colonias de *V. dahliae* en APG **A:** micelio blanco algodonoso, **B:** colonias en forma de estrellas, formadas por microesclerocios. Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

Tabla 11: Muestreos realizados en Agropecuaria Arphi S.A., provincia de Catamarca en los meses de septiembre – octubre. La muestra 11 es el hospedero del cuál se obtuvo el aislamiento de *V. dahliae* seleccionado para el presente trabajo.

Muestra	Planta	Coordenadas	Variedad	Lote	Observaciones	Toma de muestra
1	1	S 28° 55.342 W 65° 46.087	Picual	P 5	Ojo de pavo, fumagina, eriófidios, antracnosis	Parte aérea

2	1	S 28°54'64,3 W 65°46'630	Picual	A5	Planta con sectores secos, necrosados	Parte aérea
3	2	S 28° 55.910 W 65° 45.382	Picual	P 4	Completamente seca con rebrotes	Parte aérea y hojarasca con micelio blanco
4	2	S 28°55'301 W 65°46'08	Picual	P5	Planta con sectores secos, necrosados	Parte aérea
5	3	S 28° 55.979 W 65° 45.557	Picual	P 4	Planta seca	Parte aérea
6	4	S 28° 55.975 W 65° 45.611	Picual	P 4	Tocón de planta extraída	Parte aérea
7	5	S 28° 55.974 W 65° 45.609	Picual	P 4	Planta seca con rebrote	Parte aérea
8	5	S28°55'95.30 W65°54'58	Picual	A3	Planta con sectores secos, necrosados	Parte aérea
9	6	S 28° 55.962 W 65° 45.609	Picual	P 4	Planta seca con rebrote	Parte aérea
10	7	S 28° 54.651 W 65° 45.626	Barnea	A 3	Síntomas de tuberculosis, agallas	Parte aérea
11	10	S 28° 55.48'' W 65° 46.498	Arauco	A 5	Planta podada en forma de vaso, heladas	Parte aérea
12	9	S 28° 55.780 W 65° 47.066	Arbequina	A 8	Planta con ramas secas	Parte aérea
13	10	S 28° 54.639 W 65° 46.640	Barnea	A 3	Síntomas de tuberculosis, agallas	Parte aérea
14	9	S 28° 54.653 W 65° 46.654	Barnea	A 3	Planta con ramas secas	Parte aérea



Figura 18: Campo olivícola muestreado. Recolección de muestras con síntomas de verticilosis, de la que se obtuvo la cepa aislada. Agropecuaria Arphi S.A. Valle Viejo. Catamarca. Referencia: La planta señalada es de la cual se obtuvo la cepa aislada y seleccionada.

III.1.2. Identificación morfológica y conservación de cepa

Las colonias observadas a los 10 días de incubación obtuvieron 7 ± 2 cm de \emptyset . Las colonias de microesclerocios observadas fueron de distribución regular, al igual que el tamaño de los microesclerocios, predominando la forma esférica, sobre algunas más achatadas y formando masas densas, color castaño oscuro, melanizadas, con pequeñas gotitas de exudado (Figuras 19 y 20: B y C). Las medidas obtenidas de las diferentes estructuras de *V. dahliae* se detallan en Tabla 12.

Tabla 12: Mediciones micrométricas promedio de las estructuras de *V. dahliae* con objetivo 40X.

Estructura de <i>V. dahliae</i>	en micrones (μm)
Micelio	Diámetro: 0,96
Fiálides	Largo: 5,76 – 9,6 /Ancho: 0,96
Microesclerocios	diámetro: 16,3
Conidios	diámetro: 10,32
Clamidosporas	diámetro: 1,92

Se observó micelio aéreo blanquecino, abundante, denso, con algunas gotas de exudado. Al microscopio las hifas se observaron hialinas, tabicadas, de paredes lisas. Las fiálides (conidióforos: cf) de 3 o más, formaban verticilos, siendo más estrechas en el ápice, hialinas y dispuestas de manera erectas o inclinadas. Los conidios, también fueron hialinos de paredes lisas, unicelulares de forma redondeada u ovalada, encontrándose en grupos de a 3 o más (Figura 20: A).

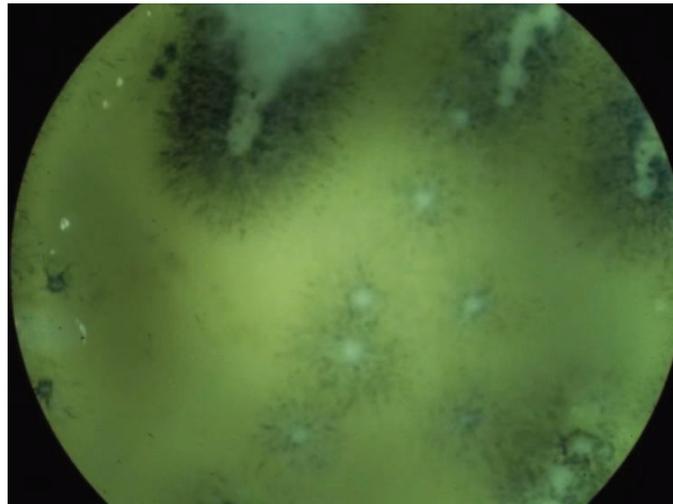


Figura 19: Observación morfológica de la colonia, con microscopio estereoscópico A:2.0 X.

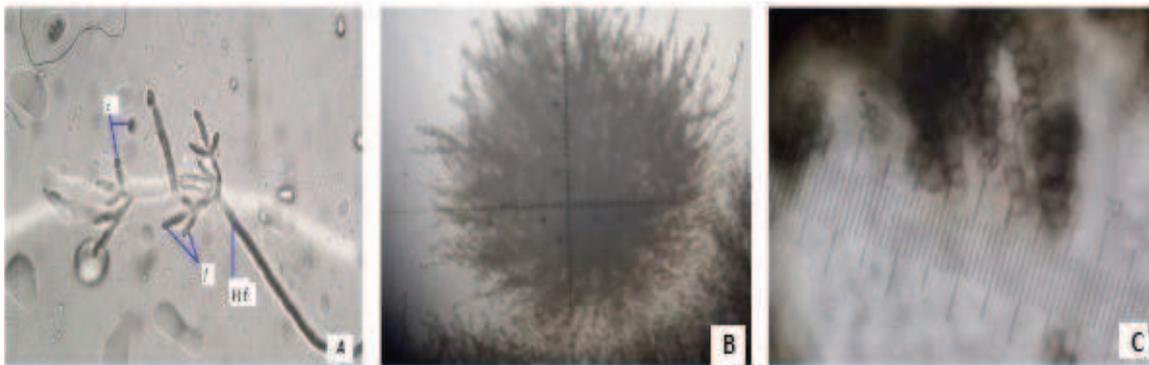


Figura 20: Microfotografía de *V. dahliae*: **A:** fructificación, A:40X (*f*= fiálides, *c*=conidios, *Hf*=hifa). **B:** Colonia de microesclerocios, A:2.0 X. **C:** microesclerocio, A: 10 y 40X.

III.1.3. Identificación molecular

La cepa fitopatógena nativa aislada se identificó como *V. dahliae* Kleb., mostró un 99% de porcentaje de homología respecto a las bases de datos proporcionados por el NCBI y un 68% de porcentaje de similitud con la cepa patrón (Genbank: MW229266). Esta diferencia podría deberse a variaciones naturales dentro de la misma especie o que la cepa en estudio pertenezca a una especie diferente dentro del mismo género.

III.2. Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* spp.

III.2.1. Muestreo de suelos

Se obtuvieron 58 muestras compuestas de suelo (Anexo - Tabla 31) de diferentes ecorregiones de la provincia de Catamarca, como: Prepuna; Chaco Árido y Semi Árido, Selva Montana y pedemonte y Yungas con diferentes condiciones agronómicas.

A partir del tercer a cuarto día de incubación, se observaron en la periferia del orujo alrededor del 25% del área en crecimiento de colonias dispersas de micelio. En días subsiguientes la cantidad de colonias en formación comenzó a aumentar y las existentes continuaron con su desarrollo, formando conidios con diferentes tonalidades de color verde: claro, oscuro o colonias de micelio blanquecino bien concentrado y denso (Figura 21). En controles posteriores, se observó mayor crecimiento y desarrollo de las colonias, ubicándose las más grandes en la periferia en comparación con las que se encontraban en el interior.

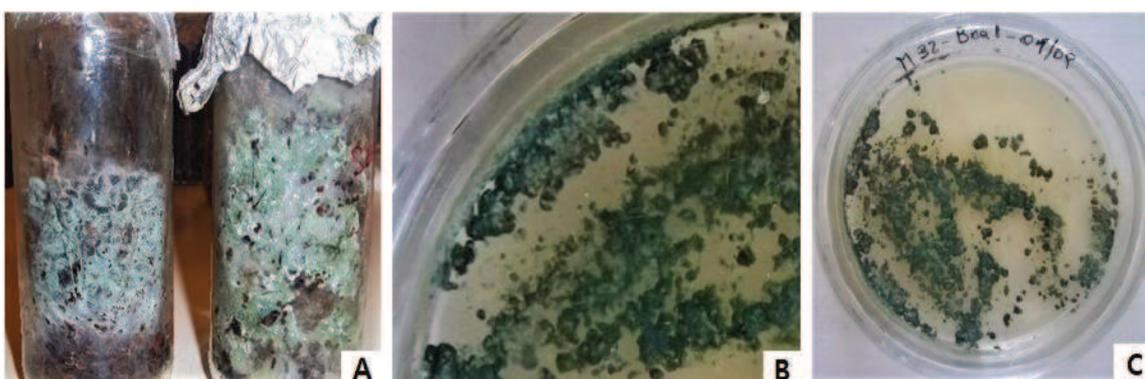


Figura 21: Obtención de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. **A:** Orujo con crecimiento de colonias de *Trichoderma*; **B:** Siembra en APG del orujo que contiene la *Trichoderma*; **C:** Aislamiento de *Trichoderma* spp. Lab. Fitopatología. UNCa. Catamarca.

III.2.3. Aislamiento, identificación morfológica y conservación de cepas de *Trichoderma* spp.

De las 58 muestras de suelo, se obtuvieron 17 aislados de cepas nativas de *Trichoderma* spp. (Tabla 13), 12 aislamientos resultaron del Chaco árido, 4 de las Yungas y 1 de la ecorregión Monte, en su mayoría corresponden a suelos con cultivos a excepción de una cepa, obtenida de monte natural. Las cepas se identificaron por características morfológicas típicas del género. Durante el crecimiento y desarrollo de las colonias, se observaron formaciones de pequeñas colonias color verdes, con diferentes tonalidades y micelio blanquecino, también se formaron anillos concéntricos, que con el transcurrir de los días estos se unieron y en algunos aislados se observó emisión de pigmentos difusibles en el medio de cultivo con variadas tonalidades: ámbar, verde, levemente amarillo y blanquecino (Figura 22 - 23). A nivel morfológico se observaron estructuras típicas del género *Trichoderma*, clamidosporas, hifas hialinas, conidios de color verde con diferentes tonalidades, fiálides (tipo botella), otras más alargadas, solitarias o en grupo, cada cepa presentó distribución y tamaño diferente en sus estructuras (Figura 24).

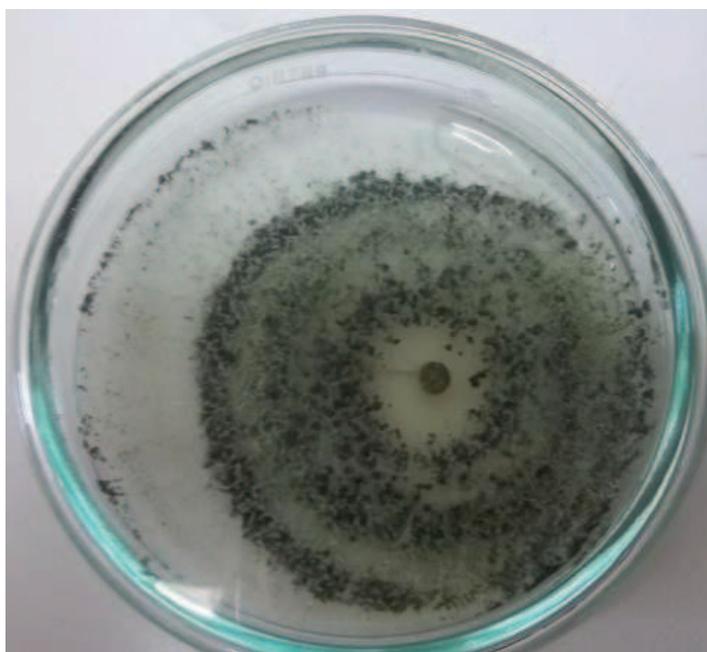


Figura 22: Crecimiento de *Trichoderma* spp. formando anillos concéntricos Lab. de Fitopatología, UNCa. Catamarca.

Tabla 13: Aislamientos de cepas nativas de *Trichoderma* spp. de la provincia de Catamarca.

N°	Ecorregiones	Denominación
1	Chaco Árido	TVL1
2	Chaco Árido	TN- Nogal
3	Monte	Trich. 53
4	Yunga	TM26
5	Chaco Árido	TAC3
6	Chaco Árido	TM5A
7	Chaco Árido	TAC2
8	Chaco Árido	TFN Pomán
9	Chaco Árido	TT.P.
10	Chaco Árido	TL. B. Haba
11	Chaco Árido	TYacón
12	Yunga	TSN 1
13	Yunga	TSN 2
14	Chaco Árido	TMz
15	Yunga	TLT2
16	Chaco Árido	TA203
17	Chaco Árido	TM15C

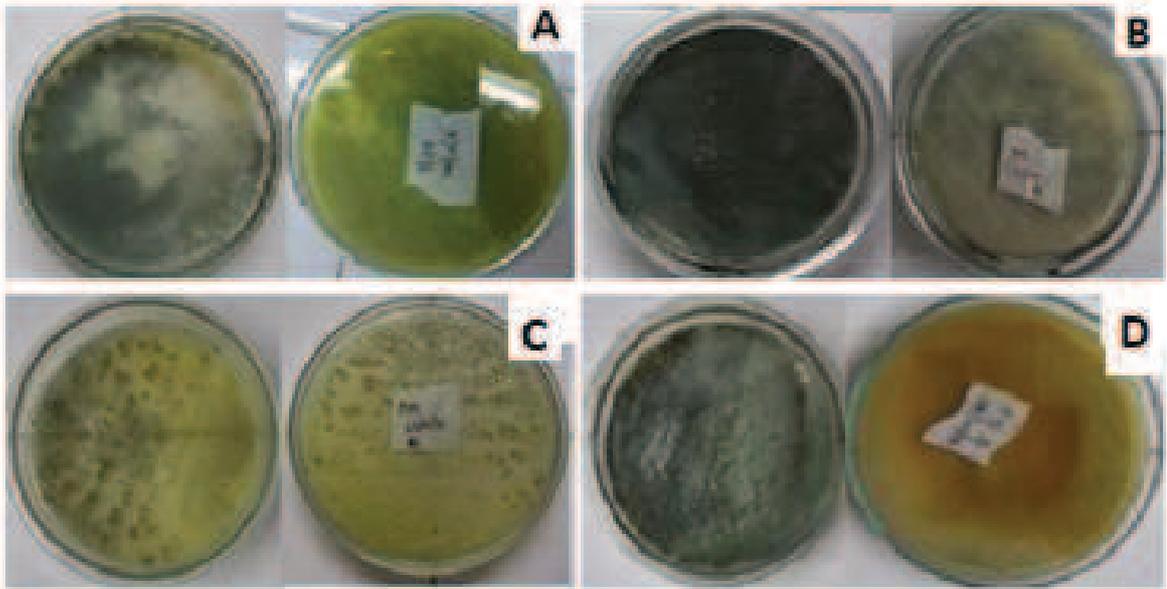


Figura 23: Pigmentos característicos, difusibles en el medio de cultivo APG, de las diferentes cepas aisladas de *Trichoderma* spp.: **A:** TM15C (pigmento color levente amarillenta); **B:** TM5A (pigmento color blanquecino); **C:** TM15B (pigmento color ámbar) y **D:** TM24 (pigmento color verde amarillento). Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

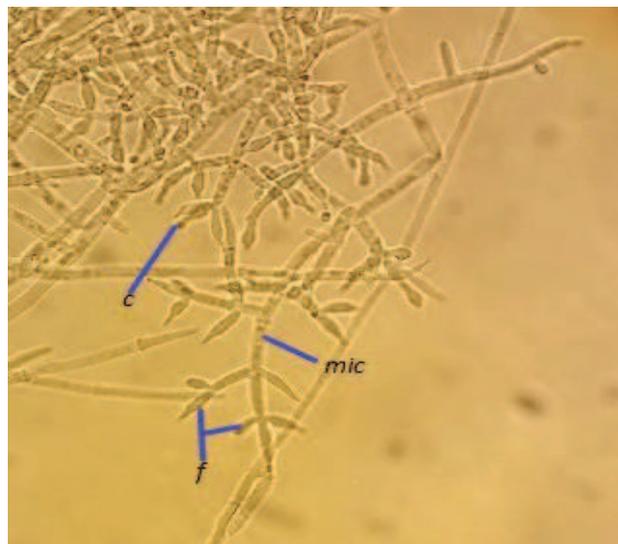


Figura 24: Observación de *Trichoderma* (*f*= filalides; *c* =conidios; *mic*=micelio), con microscópico óptico, A: 10 y 40 X. Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

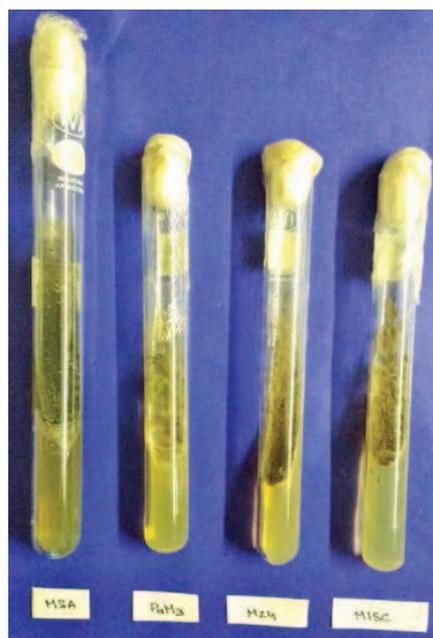


Figura 25: Conservación de cepas de *Trichoderma* spp. en pico de flauta con medio de cultivo APG.

III.3. Biocontrol en condiciones *In Vitro*

III.3.2. Evaluación de crecimiento de cepas de *Trichoderma* spp. en Agar Nutritivo (AN) (*Ensayo 1*)

De 19 cepas de *Trichoderma* spp. sembradas crecieron 11, lo que representa un 58% (Tabla 14), las cuales tuvieron crecimiento micelial blanquecino y escaso (Figura 26).

Tabla 14: Crecimiento de cepas de *Trichoderma* spp. en AN (Agar Nutritivo). En Lab. de Fitopatología. Catamarca.

	POSITIVOS	NEGATIVO
CEPAS	TVL1	
	TN- Nogal	
	TAc 3	Trich. 53
	TM5A	TM26
	TAc 2	TFN Pomán
	TYacón	TT.P.
	TSN 1	TL.B. Haba
	TLJ2	TSN 2
	TA203	TMz
	TT	TM15C
	TPaM3	

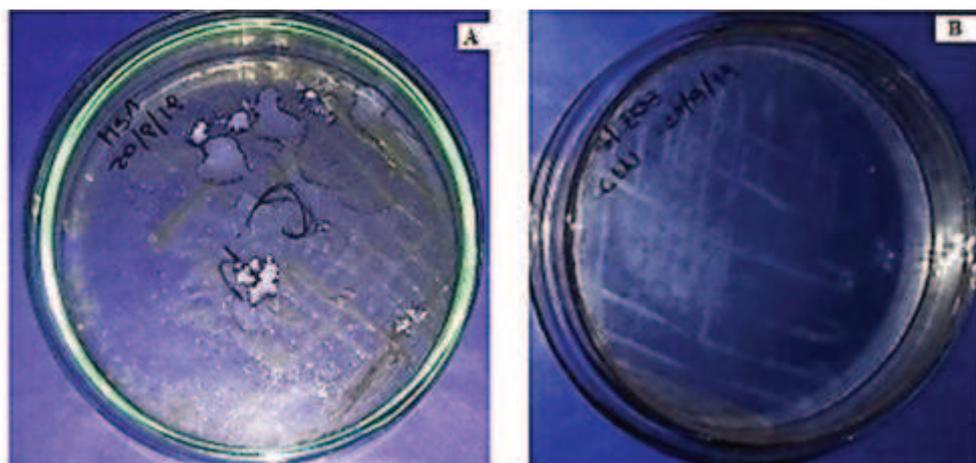


Figura 26: Cepas de *Trichoderma* spp. con crecimiento en medio de cultivo agar nutritivo (AN), **A:** TM5A; **B:** TA203. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

III.3.3. Evaluación de crecimiento y desarrollo de cepas de *Trichoderma* spp. en diferentes medios de cultivo (*Ensayo 2*)

Las 11 cepas de *Trichoderma* que desarrollaron en AN presentaron diferentes características cualitativas en los diferentes medios de cultivos tanto artificiales como medio natural, las cuales se presentan en Tabla 15 y Figura 27.

Tabla 15: Descripción cualitativa del crecimiento de las cepas de *Trichoderma* en diferentes medios de cultivo. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

Cepas	Características de crecimiento	Medios de Cultivo					
		SAB	AMIL	APG	CZP	H y L	VT
TPaM ³	Micelio	XXX	X	XX	XX	XXX X	XXX
	Conidios	-	-	-	VO	-	-
	AC sobrepasa su limite	SI	-	SI	-	-	SI
	Pigmento	-	-	-	-	-	-
TN-nogal	Micelio	XXX	XXX	XXX	XX	XXX	XXX X
	Conidios	-	-	-	-	-	-
	AC sobrepasa su limite	-	SI	-	SI	SI	SI
	Pigmento	-	-	-	-	VC	-
TAC2	Micelio	XXX	XXX	XXX	XX	XXX X	XXX X
	Conidios			VC	VO	VO	VO
	AC sobrepasa su limite	SI	SI	-	SI	SI	-

	Pigmento	VC	-	VC	-	VO	-
TSN1	Micelio	XXX	X	XXX X	X	XXX X	XX
	Conidios	-	-	VO	VO	-	-
	AC sobrepasa su limite	-	-	-	-	-	-
	Pigmento	VC	-	-	-	-	-
TM5 A	Micelio	XXX	X	XXX X	XXX	XXX	XXX X
	Conidios	VC	VO	VO	VO	VC	VO
	AC sobrepasa su limite	-	-	SI	SI		SI
	Pigmento	VC	-	-	-		-
TLT2	Micelio	XXX	X	XXX X	X	XXX X	XXX
	Conidios	-	-	-	-	-	-
	AC sobrepasa su limite	SI	-	-	SI	-	-
	Pigmento	VC	-	-	-	-	-
TAC3	Micelio	XXX	X	XXX	X	XXX X	XXX X
	Conidios	-	-	-	-	-	-
	AC sobrepasa su limite	SI	SI	SI	-	-	-
	Pigmento	VC	-	-	-	-	-
TA20 3	Micelio	XXX	X	XXX X	XX	XXX	XXX X
	Conidios	VC	-	VC	VO	-	VO
	AC sobrepasa su limite	-	SI	-	-	SI	SI
	Pigmento	VC	-	VC	-		-
TVL1	Micelio	XXX	X	XXX X	XXXX	XXX	XXX X
	Conidios	-	-	VO	-	VC	VO
	AC sobrepasa su limite	SI	SI	SI	-	SI	-
	Pigmento	-	-	-	-	VC	-
TYac ón	Micelio	XX	X	XX	XXXX	XX	XXX
	Conidios	-	-	VC	-	VO	VC
	AC sobrepasa su limite	SI	SI	SI	SI	-	SI
	Pigmento	VO	-	-	-	VO	-
TT	Micelio	XXX	XX	XXX	XX	XXX	XXX X
	Conidios	-	-	VO	-	VC	VO
	AC sobrepasa su limite	SI	SI	SI	SI	SI	SI
	Pigmento	-	-	-	-	VC	-

Referencias: Sabouraud (**Sab**); Amfólítico (**Amil**); Papa Glucosa Agar (**APG**); Czapek (**Czp**); Hongo y Levadura (**HyL**) y Orujo de vid tinta (**VT**). **X**: incipiente; **XX**: escaso;

XXX: denso; **XXXX:** abundante. Conidio / pigmentos: **(VC):** verde claro; **(VOs):** verde oscuro; **AC:** Área de Crecimiento.

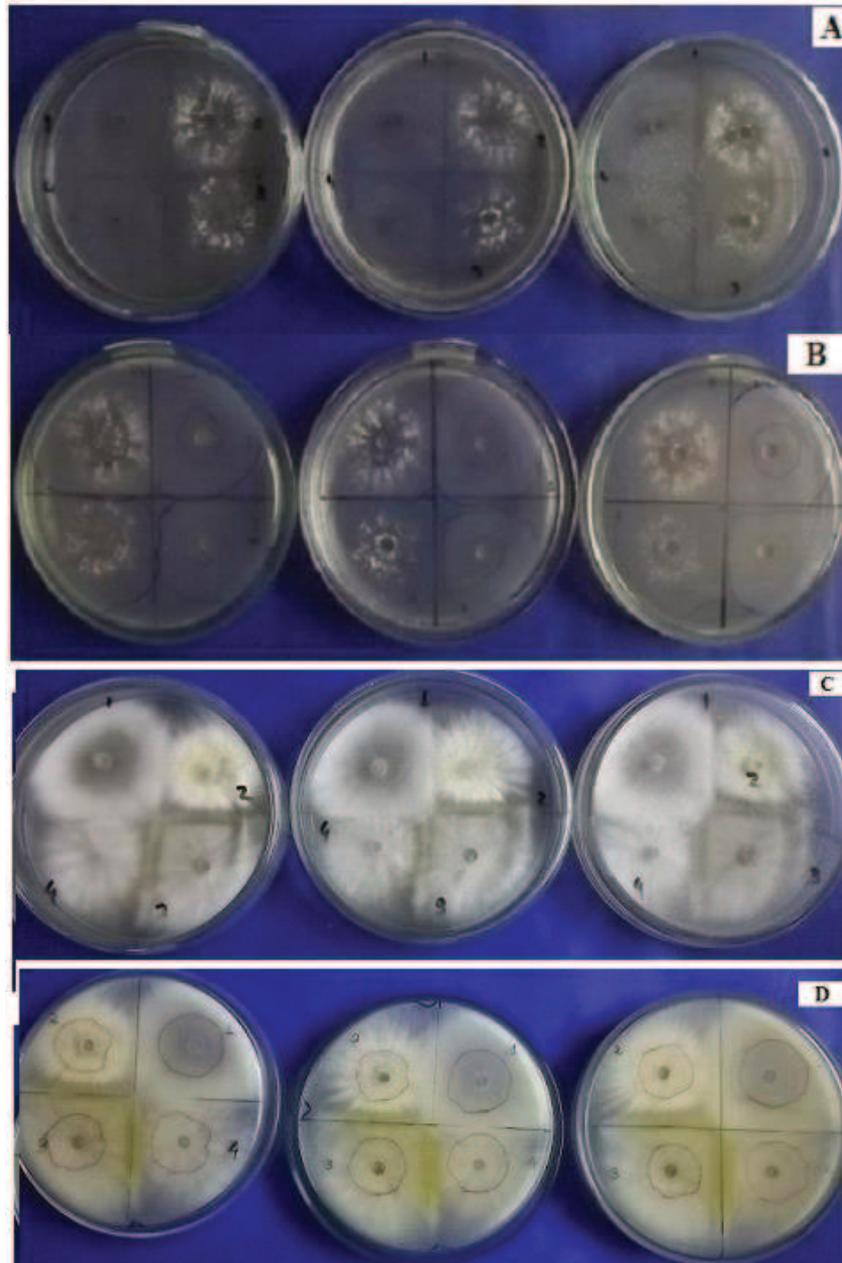


Figura 27: Crecimiento de cepas de *Trichoderma* spp. en medios de cultivo: **A** y **B:** Amilolítico (Amil) y **C** y **D:** Sabouraud (Sab). **A** y **C:** crecimiento del anverso y **B** y **D:** crecimiento del reverso, cepas: TPam3, TN-nogal, TAC2, TSN1.

Se encontraron diferencias significativas en la interacción cepa y medio de cultivo a las 24 h ($p < 0,001$) y a las 48 h ($p < 0,001$) en el área de crecimiento (mm^2). Como así

también en los efectos principales de cepas (24 h: $p < 0,001$ y 48 h: $p: 0,03$) y de medios de cultivo (24 h: $p < 0,001$ y 48 h: $p < 0,001$). Por lo tanto se exploró dinámica del crecimiento de diferentes cepas de *Trichoderma* en distintos medios de cultivo. Las áreas de crecimiento (mm^2) en los diferentes medios de cultivos se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16: Dinámica del crecimiento de diferentes cepas de *Trichoderma* en distintos medios de cultivo.

CEPA	MEDIO DE CULTIVO	ÁREA DE CRECIMIENTO (mm^2) 24 h		ÁREA DE CRECIMIENTO (mm^2) 48 h	
TA203	CZP	4988	A	90858	A
	AMIL	9066	AB	123289	A
	SAB	15090	AB	130322	A
	APG	19662	B	92337	A
	HyL	19690	B	103427	A
	VT	50898	C	475576	B
TAC 2	CZP	18283	A	143703	A
	AMIL	20052	A	126637	A
	SAB	21192	A	285588	B
	APG	25395	A	133811	A
	HyL	30101	A	157591	A
	VT	30425	A	137696	A
TAC3	CZP	8897	A	62809	A
	AMIL	17430	AB	128575	A
	SAB	36082	CD	139334	A
	APG	26209	BC	105922	A
	HyL	26980	BC	126140	A
	VT	43282	D	355965	B
TLT2	CZP	14015	A	103617	A
	AMIL	16682	AB	104444	A
	SAB	27447	B	111324	A
	APG	22883	AB	124243	A
	HyL	17956	AB	104409	A
	VT	52486	C	414717	B
TM5A	CZP	4112	A	91293	A
	AMIL	12216	A	77193	A
	SAB	28403	B	111184	A
	APG	30444	B	123563	A
	HyL	37192	B	114110	A

	VT	53009	C	501725	B
	CZP	10629	A	110099	A
	AMIL	22469	AB	126819	A
TN- Nogal	SAB	25145	B	132793	A
	APG	24465	B	117117	A
	HyL	30133	B	119540	A
	VT	65555	C	707642	B
	CZP	4010	A	98696	A
	AMIL	19712	B	111501	A
TPaM3	SAB	35983	CD	125989	A
	APG	47410	DE	124080	A
	HyL	33797	C	111454	A
	VT	53787	E	462505	B
	CZP	6399	A	58561	A
	AMIL	14545	AB	99413	A
TSN1	SAB	33667	C	143664	A
	APG	25163	BC	113672	A
	HyL	15925	AB	79075	A
	VT	36714	C	337810	B
	CZP	12777	AB	116671	A
	AMIL	21378	BC	147684	A
TT	SAB	23386	BC	126078	A
	APG	7149	A	82029	A
	HyL	33086	C	141040	A
	VT	54000	D	600115	B
	CZP	9252	A	95565	A
	AMIL	8623	A	99134	A
TVL1	SAB	16442	AB	122171	A
	APG	19797	AB	99472	A
	HyL	24834	B	104584	A
	VT	50743	C	492587	B
	CZP	12217	A	118679	A
	AMIL	14974	A	127966	A
TYacón	SAB	19796	A	140159	A
	APG	18469	A	123453	A
	HyL	14233	A	126555	A
	VT	24249	A	459012	B

Letras diferentes en una misma variable denotan diferencias significativas según Prueba de LSD (Mínima diferencia significativa) para $P < 0,05$.

A las 24 y 48 h de la siembra la mayoría de las cepas de *Trichoderma* tuvieron mayor crecimiento en el sustrato VT, con diferencias significativas. Solo la cepa AC2 a las 48 h obtuvo el mayor crecimiento con diferencia significativa en SAB. Esto coincide con lo obtenido en las características cualitativas evaluadas. Por lo que las cepas que mayor crecimiento y desarrollo expresaron, tanto cuantitativo como cualitativo fueron las cepas: TA203 – TAC2- TM5A – TPaM3 – TSN1 – TT – TVL1 y TYacón.

III.3.5. Evaluación de crecimiento de cepas antagónicas de *Trichoderma* spp. con *V. dahliae* en diferentes medios de cultivo artificiales (Ensayo 3)

Los resultados de las áreas de crecimiento (AC) obtenidas por las diferentes cepas antagónicas en estudio frente al hongo fitopatógeno *V. dahliae* se muestran en las Figuras 28 a 30, mientras que en la Figura 31 se observa el crecimiento de las colonias en cultivo *in vitro*.

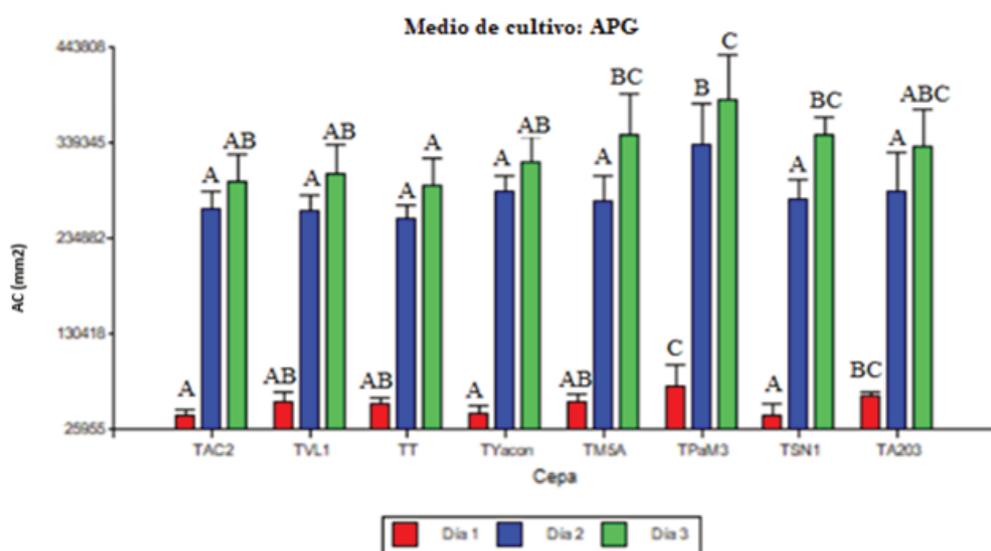


Figura 28: Evaluación del AC de cepas antagónicas de *Trichoderma* spp. frente al fitopatógeno *V. dahliae*, en medio de cultivo APG, a los 1 a 3 días.

Letras diferentes en una misma variable denotan diferencias significativas según Prueba de LSD (Mínima diferencia significativa) de Fisher para $P < 0,05$. Referencia: AC: Área de crecimiento (en mm^2).

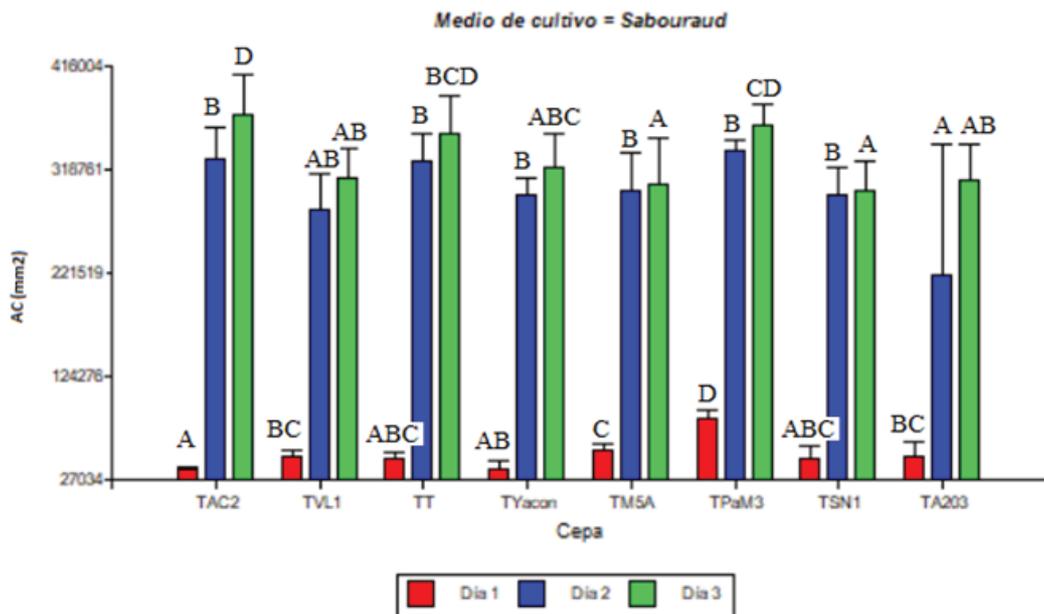


Figura 29: Evaluación del AC de cepas antagónicas de *Trichoderma* spp. frente al fitopatógeno *V. dahliae*, en medio de cultivo Sabouraud, a los 1 a 3 días.

Letras diferentes en una misma variable denotan diferencias significativas según Prueba de LSD (Mínima diferencia significativa) de Fisher para $P < 0,05$. Referencia: AC: Área de crecimiento (en mm^2).

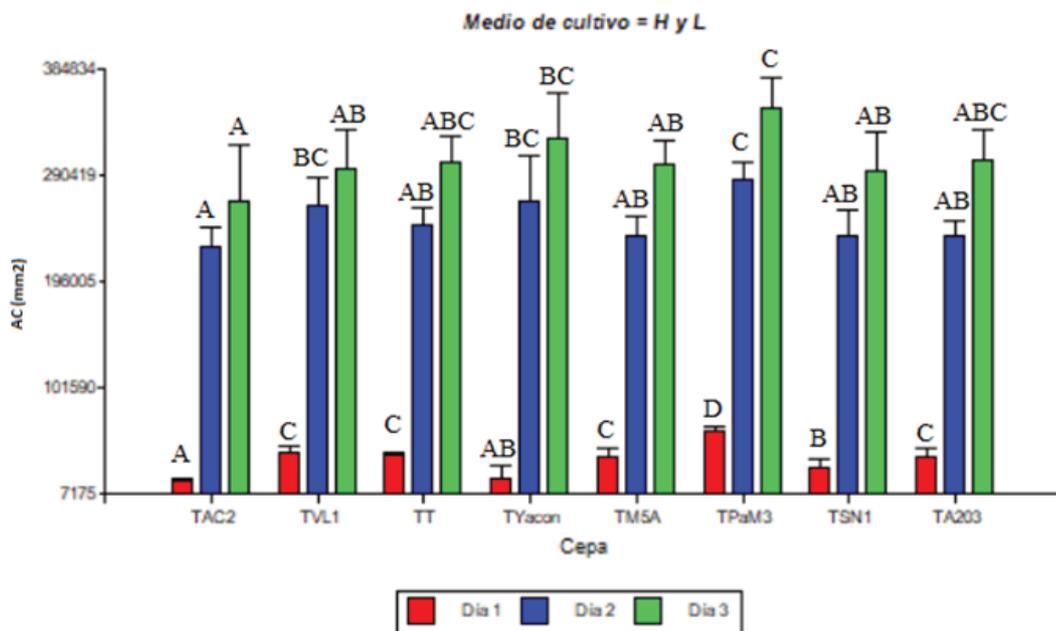
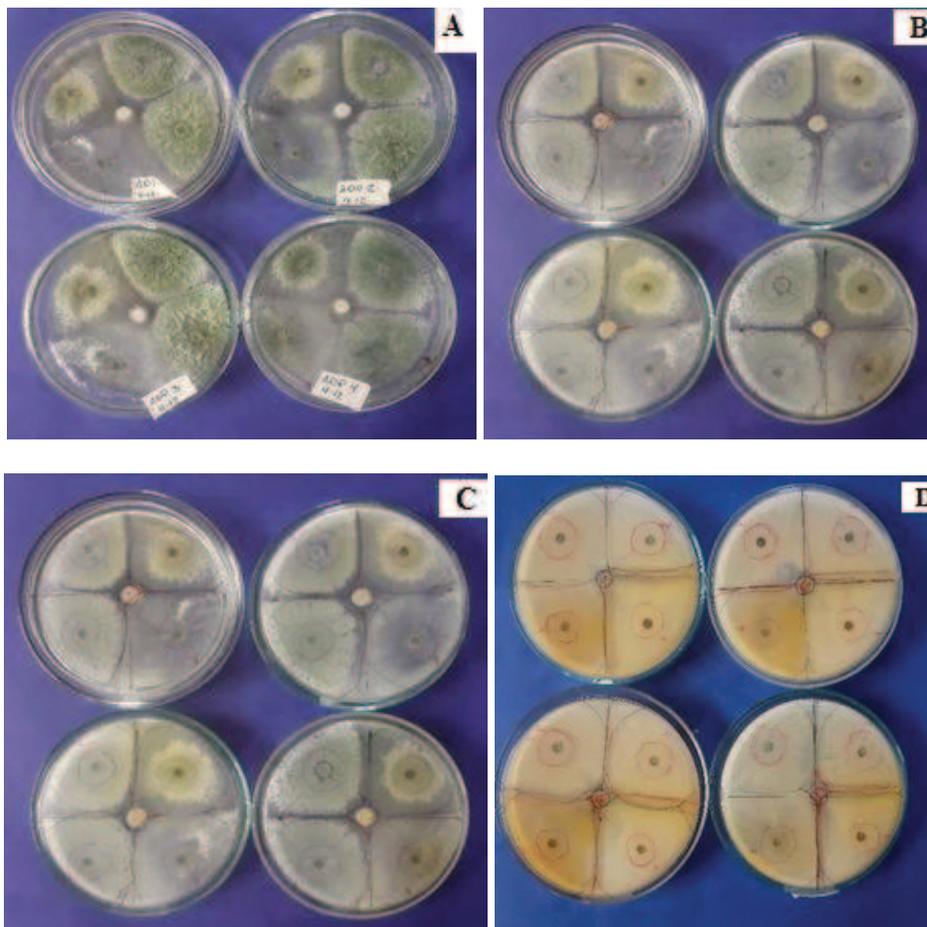


Figura 30: Evaluación del AC de cepas antagónicas de *Trichoderma* spp. frente al fitopatógeno *V. dahliae*, en medio de cultivo HyL, a los 1 a 3 días.

Letras diferentes en una misma variable denotan diferencias significativas según Prueba de LSD (Mínima diferencia significativa) de Fisher para $P < 0,05$. Referencia: AC: Área de crecimiento (en mm^2).

En los medios de cultivo evaluados las cepas de *Trichoderma* tuvieron crecimiento homogéneo, al segundo día presentaron AC exponencial y la cepa TPam3 obtuvo crecimiento con diferencia significativa. El medio APG es en el que mayor AC lograron las cepas antagonistas, mientras que el menor se obtuvo en HyL. En tanto las cepas TPam3, TVL1 y TM5A, son las que resultan más promisorias como antagonistas de *V. dahliae* ya que mostraron y mantuvieron diferentes comportamientos en el crecimiento (AC mayor, intermedio y menor) y pudieron ejercer el biocontrol.



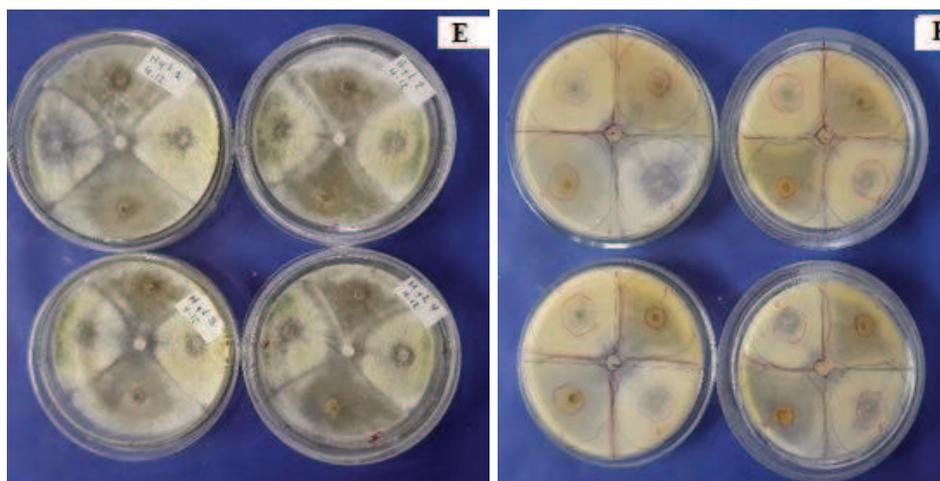


Figura 31: Crecimiento de cepas antagonistas de *Trichoderma* spp. frente a *V. dahliae*, en diferentes medios de cultivo: **A** y **B**: APG, **C** y **D**: Sab y **E** y **F**: HyL; cepas: TPaM3, TM5A, TAC2 y TSN 1. Lab. de Fitopatología, UNCa. Catamarca.

III.3.6. Identificación Molecular

Se identificaron tres cepas nativas con potencialidad antagónica, pertenecientes al género *Trichoderma* spp. y a las especies *T. hamatum* y *T. asperellum*. Las cepas mostraron un alto porcentaje de similitud respecto a las bases de datos proporcionadas por el NCBI. Además, se observó la variación del porcentaje de similitud de las diferentes cepas con respecto a la cepa patrón tomada de Genbak (Tabla 17).

Tabla 17: Identificación Molecular y Número de Identificación (Genbank) de cepas antagonistas de *Trichoderma*.

N°	Nombre	Identificación Morfológica	Identificación Molecular	Identificación NCBI	Similitud con cepa Patrón (GenBank)	Número de Identificación (Genbank)
1	TVL1	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>T. asperellum</i>	97%	87%	MW295648
2	TM5A	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>T. hamatum</i>	94%	96%	MW228415
3	TPaM3	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>T. asperellum</i>	96%	88%	MW295649

III.3.7. Ensayos de cultivo dual:

III.3.7.a. Ensayo de cultivo dual con cepas de *Trichoderma* spp.

(Ensayo 4)

La cepa TPam3, de *T. asperellum* fue la que mayor control ejerció sobre el crecimiento de la colonia del fitopatógeno en las condiciones de incubación establecidas con diferencias significativas $P < 0,05$. Esta cepa presentó el mayor PIC respecto a las otras, mientras que la clase fue intermedia respecto a las cepas restantes, con capacidad de colonizar el área de crecimiento del fitopatógeno. En tanto el TC fue igual para las 3 cepas antagonistas (Tabla 18).

Tabla 18. Porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC), Tiempo de contacto (TC) y Clase de 3 cepas de *Trichoderma* spp. vs. *V. dahliae*.

Tratamientos	PIC (%)	TC (día)	Clase
TM5A x Vert	56,96 ± 3,68 a	3,00 ± 0,00 a	1,00 ± 0,00 a
TPam3 x Vert	71,26 ± 4,96 b	3,00 ± 0,00 a	1,17 ± 0,41 a
TVL1 x Vert	52,46 ± 8,81 a	3,00 ± 0,00 a	1,67 ± 0,52 b

Letras distintas en una misma variable denotan diferencias significativas según Prueba de LSD (Mínima diferencia significativa) para $P < 0,05$.

III.3.7.b. Ensayo de cultivo dual en 2 fotoperíodos y 2 pH diferentes

(Ensayo 5)

El tratamiento combinado con la cepa *T. hamatum* (TM5A) presentó superior capacidad antagonica sobre *V. dahliae*, dado que obtuvo un PIC de 79 %, con fotoperíodo de 16 h de luz y pH 6,5 y superior al 56 % a igual pH y con fotoperíodo de 8 h y crecimiento con diferencias significativas en ambos casos (Tabla 19). Mientras que las cepas TVL1 y TPam3 (Figura 32) frente a *V. dahliae* obtuvieron un PIC menor al 46 % en los pH y fotoperíodos estudiados (Tablas 20 y 21). Los menores resultados de TC los obtuvo la cepa TM5A en condiciones de pH 4,5 con ambos fotoperíodos y la clase 1 se presentó en todos los tratamientos y condiciones estudiadas.

Tabla 19: Antagonismo *in vitro* con diferentes fotoperíodos (8 y 16 h luz) y pH (4,5 y 6,5) con *V. dahliae* y TM5A (*T. hamatum*). En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

Fotoperíodo	pH	Variable	Tratamientos	
			Testigo (Vert)	Vert + TM5A
8	4,5	Día 1 Crec. (mm/día)	2,50 ± 0,00 a	2,51 ± 0,03 a
		Día 2 Crec. (mm/día)	2,55 ± 0,07 a	2,54 ± 0,08 a
		Día 3 Crec. (mm/día)	2,70 ± 0,15 a	2,70 ± 0,25 a
		TC (días)		2,00 ± 0,00
		CLASE		1,00 ± 0,00
		PIC (%)		0,00 ± 0,00
	6,5	Día 1 Crec. (mm/día)	4,34 ± 0,39 b	3,09 ± 0,61 a
		Día 2 Crec. (mm/día)	6,51 ± 1,01 b	3,43 ± 0,73 a
		Día 3 Crec. (mm/día)	8,30 ± 1,33 b	3,60 ± 0,77 a
		TC (días)		2,60 ± 0,51
		CLASE		1,00 ± 0,00
		PIC (%)		56,75 ± 9,24
16	4,5	Día 1 Crec. (mm/día)	2,73 ± 0,23 b	2,50 ± 0,00 a
		Día 2 Crec. (mm/día)	2,81 ± 0,24 b	2,57 ± 0,10 a
		Día 3 Crec. (mm/día)	3,00 ± 0,29 b	2,70 ± 0,15 a
		TC (días)		2,00 ± 0,00
		CLASE		1,00 ± 0,00
		PIC (%)		10,07 ± 0,47
	6,5	Día 1 Crec. (mm/día)	4,05 ± 0,68 b	2,50 ± 0,00 a
		Día 2 Crec. (mm/día)	7,69 ± 1,59 b	2,59 ± 0,12 a
		Día 3 Crec. (mm/día)	12,80 ± 4,47 b	2,70 ± 0,15 a
		TC (días)		3,00 ± 0,00
		CLASE		1,00 ± 0,00
		PIC (%)		79,03 ± 0,85

Letras diferentes en una misma variable denotan diferencias significativas según Prueba de LSD (Mínima diferencia significativa) de Fisher para $P < 0,05$. Referencias: TC

(Tiempo de contacto), **Clase** (Nivel de competencia), **PIC** (Porcentaje de inhibición de crecimiento).

Tabla 20: Antagonismo *in vitro* con diferentes fotoperíodos (8 y 16 h luz) y pH (4,5 y 6,5) con *V. dahliae* y TVL1 (*T. asperellum*). En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

Fotoperíodo	pH	Variable	Tratamientos	
			Testigo (Vert)	Vert + TVL1
8	4,5	Día 1 Crec. (mm/día)	2,50 ± 0,00 a	2,55 ± 0,15 a
		Día 2 Crec. (mm/día)	2,71 ± 0,22 a	2,73 ± 0,20 a
		Día 3 Crec. (mm/día)	2,96 ± 0,47 a	2,91 ± 0,35 a
		TC (días)		3,00 ± 0,00
		CLASE		1,00 ± 0,00
	6,5	PIC (%)		0,96 ± 11,73
		Día 1 Crec. (mm/día)	3,59 ± 1,03 a	3,86 ± 0,90 a
		Día 2 Crec. (mm/día)	5,50 ± 1,40 b	4,77 ± 0,64 a
		Día 3 Crec. (mm/día)	6,90 ± 2,43 b	5,26 ± 0,50 a
		TC (días)		3,00 ± 0,00
16	4,5	CLASE		1,00 ± 0,00
		PIC (%)		23,82 ± 6,91
		Día 1 Crec. (mm/día)	4,07 ± 6,29 a	2,34 ± 1,43 a
		Día 2 Crec. (mm/día)	3,88 ± 1,88 b	2,55 ± 1,55 a
		Día 3 Crec. (mm/día)	5,20 ± 2,27 b	2,83 ± 1,62 a
	6,5	TC (días)		2,88 ± 0,34
		CLASE		1,00 ± 0,00
		PIC (%)		45,90 ± 31,15
		Día 1 Crec. (mm/día)	4,19 ± 1,27 a	3,69 ± 0,85 a
		Día 2 Crec. (mm/día)	5,86 ± 1,73 b	4,75 ± 0,63 a
6,5	Día 3 Crec. (mm/día)	6,78 ± 1,81 b	5,08 ± 0,63 a	
	TC (días)		2,00 ± 0,00	

CLASE	1,00 ± 0,00
PIC (%)	25,21 ± 9,09

Letras diferentes en una misma variable denotan diferencias significativas según Prueba de LSD (Mínima diferencia significativa) de Fisher para $P < 0,05$. Referencias: **TC** (Tiempo de contacto), **Clase** (Nivel de competencia), **PIC** (Porcentaje de inhibición de crecimiento).

Tabla 21: Antagonismo *in vitro* con diferentes fotoperíodos (8 y 16 h luz) y pH (4,5 y 6,5) con *V. dahliae* y TPam3 (*T. asperellum*). En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

Fotoperíodo	pH	Variable	Tratamientos	
			Testigo (Vert)	Vert + TPam3
8	4,5	Día 1 Crec. (mm/día)	3,97 ± 1,05 b	2,97 ± 0,64 a
		Día 2 Crec. (mm/día)	5,13 ± 1,08 b	3,18 ± 0,72 a
		Día 3 Crec. (mm/día)	6,21 ± 1,04 b	3,39 ± 0,89 a
		TC (días)		3,00 ± 0,00
		CLASE		1,00 ± 0,00
		PIC (%)		45,46 ± 0,00
		8	6,5	Día 1 Crec. (mm/día)
Día 2 Crec. (mm/día)	6,04 ± 1,56 b			3,78 ± 0,73 a
Día 3 Crec. (mm/día)	7,12 ± 1,73 b			4,34 ± 1,04 a
TC (días)				2,88 ± 0,34
CLASE				1,00 ± 0,00
PIC (%)				40,62 ± 14,61
16	4,5			Día 1 Crec. (mm/día)
		Día 2 Crec. (mm/día)	3,46 ± 0,48 b	3,20 ± 0,28 a
		Día 3 Crec. (mm/día)	3,75 ± 0,58 b	3,47 ± 0,29 a
		TC (días)		2,88 ± 0,34
		CLASE		1,00 ± 0,00

	PIC (%)	7,35 ± 8,83
6,5	Día 1 Crec. (mm/día)	4,36 ± 0,91 b 3,47 ± 0,72 a
	Día 2 Crec. (mm/día)	6,43 ± 1,34 b 4,26 ± 1,19 a
	Día 3 Crec. (mm/día)	7,47 ± 1,66 b 4,58 ± 1,33 a
	TC (días)	2,63 ± 0,49
	CLASE	1,00 ± 0,00
	PIC (%)	38,61 ± 18,44

Letras diferentes en una misma variable denotan diferencias significativas según Prueba de LSD (Mínima diferencia significativa) de Fisher para $P < 0,05$. **Referencias:** **TC** (Tiempo de contacto), **Clase** (Nivel de competencia), **PIC** (Porcentaje de inhibición de crecimiento).

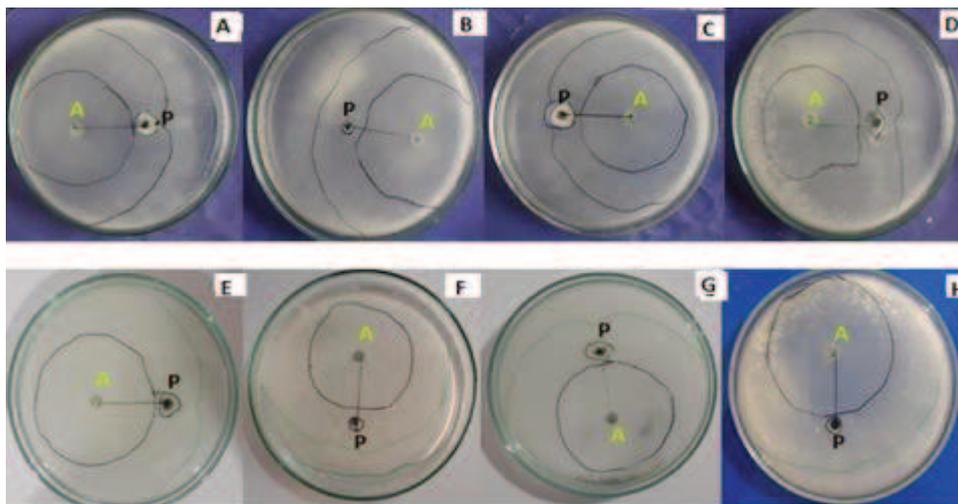


Figura 32: Ensayo de evaluación de antagonismo de *Trichoderma asperellum* (TVL1): **A:** Fotoperíodo 16 h con pH 6,5; **B:** Fotoperíodo 16 h con pH 4,5; **C:** Fotoperíodo 8 h con pH 6,5 y **D:** Fotoperíodo 8 h con pH 4,5. Y la cepa de *Trichoderma asperellum* (TPaM3): **E:** Fotoperíodo 8 h con pH 6,5; **F:** Fotoperíodo 8 h con pH 4,5; **G:** Fotoperíodo 16 h con pH 6,5 y **H:** Fotoperíodo 16 h con pH 4,5. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca. **Referencias:** **P:** patógeno (*V. dahliae*), **A:** antagonista (cepas de *Trichoderma*).

III.3.8. Ensayo de evaluación de metabolitos volátiles en 2 fotoperíodos y 2 pH diferentes (*Ensayo 6*)

En Tabla 22 se presentan los crecimientos de *V. dahliae* y los porcentajes de inhibición de crecimiento (PIC) del fitopatógeno producido por metabolitos volátiles emitidos por las cepas de *Trichoderma* en estudio.

Tabla 22: Evaluación de metabolitos volátiles con diferentes fotoperíodos (8 y 16 h luz) y pH (4,5 y 6,5) con cepas de *Trichoderma* sp. (TM5A, TPaM3 y TVL1) frente a *V. dahliae*. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

Fotoperíodo 8					
pH	Variable	Tratamientos			
		Testigo	Vert + TM5A	Vert + TPaM3	Vert + TVL1
4,5	Día 2	2,00 ± 0,89 a	2,00 ± 0,89 a	2,00 ± 0,89 a	2,00 ± 0,89 a
	Día 3	5,00 ± 0,00	2,50 ± 0,00	5,00 ± 0,00 a	2,50 ± 0,00
	Día 4	5,00 ± 0,00	2,50 ± 0,00	5,00 ± 0,00 a	2,50 ± 0,00
	Día 5	5,33 ± 0,52 c	2,50 ± 0,00 a	5,00 ± 0,00 b	2,50 ± 0,00 a
	Día 6	5,33 ± 0,52 c	2,50 ± 0,00 a	5,00 ± 0,00 b	2,50 ± 0,00 a
	Día 7	6,67 ± 0,52 c	2,50 ± 0,00 a	5,00 ± 0,00 b	2,50 ± 0,00 a
	Día 8	7,47 ± 1,34 c	2,50 ± 0,00 a	5,00 ± 0,00 b	2,50 ± 0,00 a
	Día 9	8,67 ± 1,86 c	2,50 ± 0,00 a	5,00 ± 0,00 b	2,50 ± 0,00 a
	Día 10	8,81 ± 1,87 c	2,64 ± 0,15 a	5,15 ± 0,16 b	2,63 ± 0,14 a
		PIC		70,08 ± 1,18 c	41,64 ± 0,74 b
6,5	Día 2	8,00 ± 1,15 b	6,68 ± 0,80 a	7,48 ± 0,92 ab	7,16 ± 0,97 ab
	Día 3	14,28 ± 3,50 a	13,08 ± 1,85 a	12,00 ± 2,34 a	13,68 ± 2,11 a
	Día 4	21,52 ± 6,25 b	19,40 ± 4,92 ab	16,28 ± 5,19 a	20,72 ± 3,61 ab
	Día 5	27,40 ± 11,65 a	23,60 ± 6,72 a	23,24 ± 6,03 a	28,80 ± 3,16 ab
	Día 6	32,40 ± 10,68 b	23,60 ± 6,72 a	23,40 ± 6,17 a	28,80 ± 3,16 a
	Día 7	34,88 ± 11,65 b	23,60 ± 6,72 a	24,20 ± 6,94 a	28,80 ± 3,16 ab
	Día 8	37,20 ± 13,37 b	23,60 ± 6,72 a	25,00 ± 7,42 a	29,20 ± 2,86 a
	Día 9	37,60 ± 14,14 b	24,00 ± 8,64 a	25,60 ± 7,71 a	29,20 ± 2,86 a

Día 10	37,75 ± 14,14 b	24,14 ± 8,64 a	25,75 ± 7,71 a	29,33 ± 2,86 a	
PIC		36,05 ± 22,90 b	31,79 ± 20,4 b	22,30 ± 7,58 b	
Fotoperíodo 16					
pH	Variable	Tratamientos			
		Testigo	Vert + TM5A	Vert + TPam3	Vert + TVL1
4,5	Día 2	2,00 ± 0,89 a	2,00 ± 0,89 a	2,00 ± 0,89 a	2,00 ± 0,89 a
	Día 3	5,00 ± 0,00 a	5,00 ± 0,00 a	5,00 ± 0,00 a	5,00 ± 0,00 a
	Día 4	5,17 ± 0,41 a	5,00 ± 0,00 a	5,00 ± 0,00 a	5,00 ± 0,00 a
	Día 5	5,25 ± 0,61 a	5,00 ± 0,00 a	5,00 ± 0,00 a	5,00 ± 0,00 a
	Día 6	5,35 ± 0,86 a	5,33 ± 0,52 a	5,08 ± 0,20 a	5,25 ± 0,28 a
	Día 7	5,67 ± 1,63 a	6,00 ± 0,89 a	5,17 ± 0,26 a	5,42 ± 0,49 a
	Día 8	5,95 ± 2,33 a	6,47 ± 1,56 a	5,33 ± 0,52 a	5,73 ± 0,84 a
	Día 9	7,33 ± 3,61 a	8,17 ± 3,54 a	5,33 ± 0,52 a	5,82 ± 0,98 a
	Día 10	7,48 ± 3,62 a	8,31 ± 3,44 a	5,48 ± 0,42 a	5,96 ± 0,86 a
	PIC		-11,64 ± 48,08 b	26,68 ± 6,60 c	20,07 ± 13,02 bc
6,5	Día 2	2,00 ± 0,89 a	2,00 ± 0,89 a	2,00 ± 0,89 a	2,00 ± 0,89 a
	Día 3	8,33 ± 1,86 b	6,33 ± 0,52 a	8,00 ± 0,89 b	7,00 ± 0,89 ab
	Día 4	16,00 ± 1,79 c	8,33 ± 1,86 a	13,00 ± 0,89 b	9,67 ± 1,37 a
	Día 5	22,67 ± 4,50 c	9,33 ± 2,73 a	17,67 ± 1,86 b	12,00 ± 1,79 a
	Día 6	30,67 ± 5,75 c	9,33 ± 2,73 a	23,00 ± 10,08 b	13,33 ± 2,73 a
	Día 7	32,33 ± 4,59 c	9,33 ± 2,73 a	23,00 ± 10,08 b	13,33 ± 2,73 a
	Día 8	32,67 ± 4,50 c	9,33 ± 2,73 a	23,00 ± 10,08 b	12,67 ± 2,07 a
	Día 9	32,67 ± 4,50 c	8,67 ± 2,07 a	23,00 ± 10,08 b	12,33 ± 1,86 a
	Día 10	32,81 ± 4,50 c	8,81 ± 2,07 a	23,15 ± 10,08 b	12,46 ± 1,87 a
	PIC		73,17 ± 6,30 c	29,46 ± 30,72 b	62,02 ± 5,68 c

Letras diferentes en una misma variable denotan diferencias significativas según Prueba de LSD (Mínima diferencia significativa) de Fisher para $P < 0,05$. Nota: Valores de crecimiento, expresados en mm.

Los resultados obtenidos muestran que los tratamientos con *T. hamatum* (Vert + TM5A) y con *T. asperellum* (Vert + TVL1) tanto en fotoperíodo de 8 h luz con pH 4,5 como en

fotoperíodo de 16 h luz con pH 6,5 presentaron PIC alrededor del 70 % pero sin diferencias estadísticamente significativas. En las dos condiciones los tratamientos testigo obtuvo mayor crecimiento y el tratamiento con *T. asperellum* (Ver + TPaM3), obtuvo menor PIC con diferencias significativas.

En condiciones de fotoperíodo de 8 h luz con pH 6,5, el mayor crecimiento radial se observó en el tratamiento testigo, teniendo en algunos crecimientos significativos, mientras que en los otros tratamientos el ritmo de crecimiento fue alto, hasta el quinto día, sin superar al tratamiento testigo, posteriormente tuvieron menores variaciones.

Respecto a los resultados obtenidos con fotoperíodo de 16 h luz y pH 4,5 el crecimiento radial del tratamiento testigo fue menor que en el de 8 h luz con igual pH. Y la cepa TM5A no ejerció control sobre el patógeno bajo las condiciones establecidas en este ensayo. El fitopatógeno obtuvo mayor crecimiento radial al noveno día, y el PIC con resultado negativo se debe a que el fitopatógeno en este tratamiento tuvo mayor crecimiento que el testigo.

III.3.9. Microcultivos (*Ensayo 7*)

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 23. En el tratamiento combinado con *T. hamatum* (Vert + TM5A) se observó que en fotoperíodo de 8 h luz con pH 6,5 ambos microorganismos presentaron fructificación (Figura 33), mientras que con el mismo pH y 16 h luz en el tratamiento combinado con *T. asperellum* (Vert + TVL1) solo se observó fructificación en el fitopatógeno. En tanto que con fotoperíodo 8 h luz y pH de 4,5, el tratamiento combinado con *T. asperellum*, (Vert + TPaM3), también se presentó fructificación. La acción ejercida por la cepa TM5A sobre *V. dahliae* se observa en la Figura 34.

Tabla 23: Evaluación de la interacción hifal con diferentes fotoperíodos (8 y 16 h luz) y pH (4,5 y 6,5) entre cepas antagonistas de *T. asperellum* (TVL1 y TPaM3) y *T. hamatum* (TM5A) con *V. dahliae*. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

Condiciones de Incubación		Vert + TVL1	Vert + TPaM3	Vert + TM5A
Fotoperíodo	pH			
8 h luz	4,5	CP - E - C - MP - H	H - CP - C - MP - E	CP - C - MP - H

16 h luz	6,5	H - MP - CP - E	CP - H	C
	4,5	CP - H - C - MP	CP - H - MP - E	C - MP
	6,5	H - CP - MP - C	CP - H - MP - E	CP - C - MP

Referencias: **(CP)**: Crecimiento paralelo; **(C)**: Coiling o enrollamiento; **(MP)**: Micoparasitismo; **(H)**: Haustorios; **(E)**: Entrecruzamiento.



Figura 33: Fialides formando verticilos con presencia de conidios, de *V. dahliae* en condiciones de 8 h luz y pH 6,5 A:10X. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

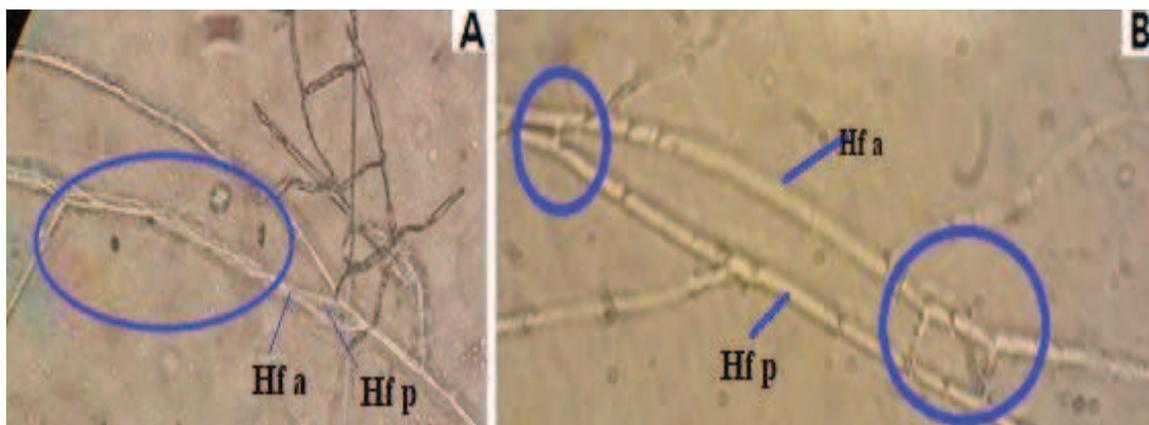


Figura 34: Acción antagonica de la cepa TM5A: **A:** coiling o enrollamiento, A:10X; **B:** micoparasitismo, emisión de haustorios, A:40X. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca. Referencias: **Hf a:** Hifa antagonista, **Hf p:** Hifa patógeno.

III.4. Biocontrol en condiciones controladas en cámara de cultivo y en invernáculo

III.4.2. Inoculación de material vegetal

III.4.2.a. Evaluación de cepa nativa seleccionada, como antagonista y *V. dahliae* como fitopatógeno en plantines de olivo var. manzanilla en cámara de cultivo

Ensayo I (Sustrato: suelo estéril, 100 %): Las variables PF y PS raíz y PS aéreo del tratamiento combinado, Vert+TM5A, presentaron los mayores resultados con diferencias estadísticas significativas. Mientras que en el mismo tratamiento las variables restantes también obtuvieron los mayores resultados, sin diferencias significativas (Tabla 24).

Tabla 24: Crecimiento de plantines de olivo var. manzanilla en sustrato de suelo estéril (100 %), expresado en: longitud de raíz (**Long raíz**) y longitud de parte aérea (**Long aérea**), peso fresco de raíz (**PF raíz**) y de parte aérea (**PF aéreo**) y peso seco de raíz (**PS raíz**) y de parte aérea (**PS aérea**) de los diferentes tratamientos. Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

Variable	Tratamientos			
	Testigo	TM5A	Vert	Vert + TM5A
Long de Raíz (cm)	9,43 ± 4,09 a	10,83 ± 3,76 a	9,32 ± 4,08 a	10,10 ± 1,79 a
Long de Aéreo (cm)	15,15 ± 9,10 a	15,65 ± 3,15 a	13,22 ± 2,38 a	18,70 ± 4,56 a

PF Raíz (g)	1,98 ± 1,75 a	2,18 ± 0,47 a	1,52 ± 1,14 a	4,5 ± 2,32 b
PF Aéreo (g)	2,82 ± 1,75 a	3,08 ± 0,44 a	2,33 ± 1,33 a	5,01 ± 3,44 a
PS Raíz (g)	0,55 ± 0,33 a	0,57 ± 0,16 a	0,30 ± 0,19 a	0,99 ± 0,20 b
PS Aéreo (g)	1,25 ± 0,33 a	1,25 ± 0,30 a	0,80 ± 0,16 a	1,86 ± 0,26 b

Letras no comunes en una misma variable denotan diferencias significativas según Prueba de LSD (Mínima diferencia significativa) para $P < 0,05$.

Ensayo II [Sustrato: suelo estéril + arena (1:1)]: Las variables estudiadas en los tratamientos y condiciones planteadas no presentaron diferencias estadísticas significativas. El mayor resultado de la variable PF aéreo se obtuvo en el tratamiento TM5A, siendo un 61 % mayor que el tratamiento testigo (Tabla 25).

Tabla 25: Crecimiento de plantines de olivo var. manzanilla en sustrato suelo y arena estéril (1:1), expresado en: longitud de raíz (**Long raíz**), longitud de parte aérea (**Long aérea**), peso fresco de raíz (**PF raíz**) y de parte aérea (**PF aéreo**), peso seco de raíz (**PS raíz**) y de parte aérea (**PS aérea**). En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

Variable	Tratamientos			
	Testigo	TM5A	Vert	Vert + TM5A
Long Raíz (cm)	9,15 ± 6,70 a	8,30 ± 1,94 a	5,45 ± 3,86 a	11,25 ± 3,18 a
Long Aéreo (cm)	2,10 ± 8,29 a	14,82 ± 2,97 a	12,50 ± 11,09 a	12,70 ± 2,37 a
PF Raíz (g)	1,62 ± 1,42 a	2,65 ± 1,59 a	2,20 ± 2,39 a	2,85 ± 0,70 a
PF Aéreo (g)	2,25 ± 2,08 a	3,62 ± 2,09 a	1,35 ± 1,16 a	2,12 ± 0,87 a
PS Raíz (g)	1,00 ± 1,07 ab	2,06 ± 1,24 b	0,55 ± 0,60 a	1,42 ± 0,35ab
PS Aéreo (g)	1,62 ± 1,70 a	1,88 ± 1,09 a	0,90 ± 0,77 a	1,74 ± 0,71 a

Letras no comunes en una misma variable denotan diferencias significativas según Prueba de LSD (Mínima diferencia significativa) para $P < 0,05$.

Ensayo III [Sustrato: suelo + perlita (1:1), estéril]: Las variables estudiadas en los tratamientos y condiciones planteadas no presentaron diferencias estadísticas significativas. Los mayores resultados de las variables estudiadas se obtuvieron en el tratamiento combinado, Vert+TM5A, siendo la variable PF aéreo un 72 % mayor que el tratamiento testigo (Tabla 26).

Tabla 26: Crecimiento de plantines de olivo var. manzanilla en sustrato suelo estéril con perlita (1:1), expresado en: longitud de raíz (**Long raíz**), longitud parte aérea (**Long aérea**), peso fresco de raíz (**PF raíz**) y parte aérea (**PF aérea**), peso seco de raíz (**PS raíz**) y parte aérea (**PS aérea**). Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

Variables	Tratamientos			
	Testigo	TM5A	Vert	Vert + TM5A
Long Raíz (cm)	11,00 ± 5,77 a	10,80 ± 5,52 a	8,42 ± 2,40 a	11,53 ± 1,65 a
Long Aéreo (cm)	14,07 ± 3,56 a	18,22 ± 2,87 a	16,92 ± 2,41 a	16,87 ± 2,76 a
PF Raíz (g)	1,37 ± 0,66 a	2,57 ± 0,60 a	1,73 ± 1,10 a	2,77 ± 0,57 a
PF Aéreo (g)	1,76 ± 0,84 a	2,79 ± 0,64 a	2,30 ± 1,56 a	3,03 ± 0,85 a
PS Raíz (g)	0,20 ± 0,09 a	0,41 ± 0,09 a	0,32 ± 0,20 b	0,73 ± 0,15 b
PS Aereo (g)	0,98 ± 0,47 a	0,92 ± 0,21 a	1,07 ± 0,72 a	1,67 ± 0,47 a

Letras no comunes en una misma variable denotan diferencias significativas según Prueba de LSD (Mínima diferencia significativa) para $P < 0,05$.

III.4.2.b. Evaluación de cepa nativa seleccionada, como antagonista y *V. dahliae* como fitopatógeno en plantines de olivo, var. manzanilla en invernáculo

III.4.2.b.1. Evaluación sanitaria de plantines de olivos al inicio del ensayo

Se observaron estructuras típicas de endomicorrizas como hifas, arbusculos y vesículas del tipo vesículo arbuscular (MVA) y hongos endofíticos septados oscuros (ESO) con hifas tabicadas, melanizadas y con numerosos microsclerocios. Se determinó un alto nivel de colonización fúngica con ocurrencia simultánea de MVA y hongos ESO (Figura 35).

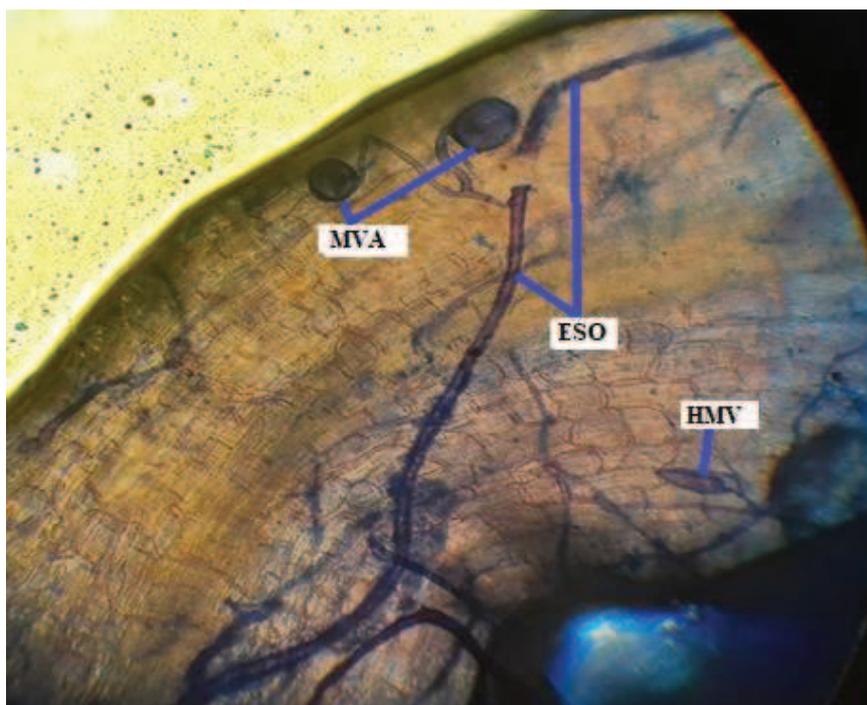


Figura 35: Colonización de hongos endofíticos oscuros (**ESO**), micorrizas vesículo arbusculares (**MVA**) y hongos micorrícicos vesiculares (**HMY**) en raíces de olivo. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

No se observó presencia de fitopatógenos, como tampoco de cepas de *Trichoderma* spp.

III.4.2.b.2. Inoculación de plantines de olivo

Los resultados de las variables evaluadas que reflejan las características cuantitativas en los plantines de olivo se observan en la Tabla 27.

La sintomatología característica de la verticilosis solo se vió en plantines del tratamiento control de Vert, donde, en el 40 % de los plantines se observó necrosis en todo el plantín causando la muerte de los mismos, y en el restante 60% se observó amarillamiento de hojas apicales y posterior defoliación de la zona afectada. En las variables estudiadas de PF y PS en hoja en el tratamiento control de *V. dahliae* se presentaron los menores crecimientos con diferencias significativas. Mientras que las demás variables en los tratamientos planteados, arrojaron valores similares, considerándose que este efecto puede deberse a la presencia de micorrizas nativas encontradas ya que fue el microorganismo común en todos los tratamientos y que probablemente haya atenuando el efecto del fitopatógeno en el plantín.

Tabla 27: Crecimiento en plantines de olivo variedad manzanilla, luego de inocularlos con el fitopatógeno *V. dahliae* y el antagonista M5A (*T. hamatum*). En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

Variable	Tratamientos			
	Testigo	TM5A	Vert	Vert + TM5A
Long. total (cm)	99,40 ± 17,05 a	96,00 ± 7,65 a	93,60 ± 6,07 a	95,20 ± 6,72 a
Altura (cm)	82,00 ± 16,75 a	81,00 ± 7,38 a	81,40 ± 6,69 a	79,60 ± 7,83 a
Peso Fresco raíz (g)	80,96 ± 16,78 b	79,94 ± 7,39 b	80,32 ± 6,73 b	47,52 ± 12,04 a
Peso Seco raíz (g)	20,53 ± 8,20 a	31,52 ± 12,83 a	19,70 ± 13,58 a	18,78 ± 6,27 a
Peso Fresco tallo (g)	6,28 ± 7,16 a	16,89 ± 12,87 a	7,48 ± 13,09 a	8,49 ± 6,19 a
Peso Seco tallo (g)	5,15 ± 1,99 a	5,17 ± 1,04 a	4,04 ± 1,44 a	4,56 ± 1,61 a
Peso Fresco hoja	25,94 ± 4,67 b	26,08 ± 3,17 b	13,92 ± 11,62 a	24,94 ± 3,03 b
Peso Seco hojas (g)	12,66 ± 2,91 b	12,47 ± 1,72 b	6,83 ± 5,74 a	11,59 ± 1,81 b
IAF	2,85 ± 1,10 a	2,59 ± 0,44 a	3,88 ± 1,52 a	3,09 ± 1,66 a

Letras no comunes en una misma variable denotan diferencias significativas según Prueba de LSD (Mínima diferencia significativa) para $P < 0,05$.

III.4.2.b.3. Constatación de presencia de *V. dahliae* en plantines de olivo y otras estructuras fúngicas

En el tratamiento combinado (Vert+TM5A), solo se observó presencia de *Trichoderma*. Se observaron vesículas, estructuras típicas de las micorrizas vesiculares (MV) en raíces de todos los plantines de olivo recolectadas, procedentes de los cuatro tratamientos. También se observaron hifas continuas finas y gruesas, y numerosas vesículas de morfología diversa (esféricas, ovaladas, ahusadas e irregulares), por lo que se infiere que las raicillas de este vegetal estaban colonizadas por varias especies o géneros de hongos micorrícicos nativos (Figura 36: B y C, 37: A y B y 38: A y B), Mientras que las hifas finas y sin colorear fueron similares a las que produce *Trichoderma*. En tanto en el tratamiento control de *V. dahliae* se observó presencia del fitopatógeno (Figura 36: A),

con finas hifas cenocíticas y presencia de verticilos, junto a hifas melanizadas y con microesclerocios del tipo de hongos ESO (Figura 39).

Las raíces de olivo procedentes del tratamiento de inoculación con *Trichoderma* presentaron un alto nivel de colonización fúngica (89,1 %), con ocurrencia simultánea con hongos micorrícicos y hongos ESO (Tabla 28). El alto nivel de colonización fúngica con ocurrencia simultánea de micorrizas vesiculares y hongos ESO fueron observados en los plantines de todos los tratamientos estudiados. Se estima que estas interacciones microbianas con raíces de olivo son de microorganismos nativos debido a que el cultivo se realizó con suelo sin esterilizar.

Tabla 28. Colonización fúngica en raíces de olivo procedentes de los tratamientos de inoculación. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

Tratamientos	Infección Fúngica (%)			Hongos Micorrícicos	Hongos ESO
	CF	FAHC	FAHT	FAV (%)	FA (%)
Testigo	85,9	82,4	12,2	49,1	3,5
TM5A	89,1	87,1	7,9	42,5	2,9
Vert	83,8	67,7	58	43	4,3
TM5A + Vert	88,1	88,1	20	47,2	3,6

Referencias: (CF): Colonización fúngica, (FAHC): Frecuencia de aparición de hifas cenocíticas, (FAHT): Frecuencia de aparición de hifas tabicadas, (FAV): Frecuencia de aparición de vesículas.



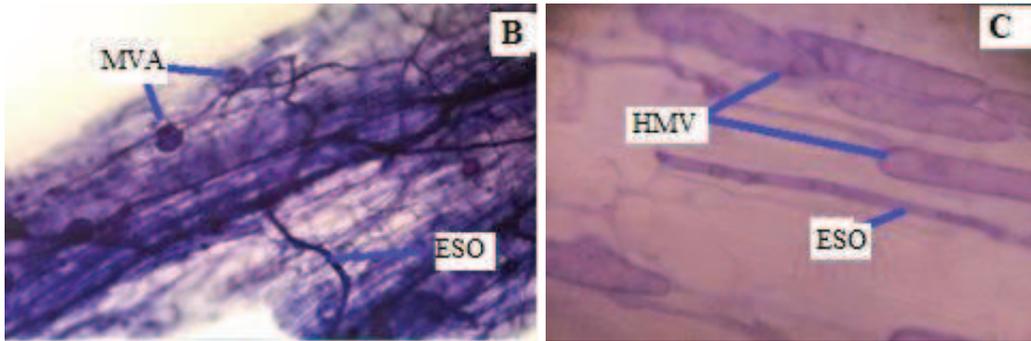


Figura 36: Tratamiento T3 (con *V. dahliae*). **A:** Colonización fúngica de *V. dahliae*. **B:** colonización de hongos endofíticos oscuros (ESO) y micorrizas vesículo arbusculares (MVA); **C:** colonización de hongos endofíticos oscuros (ESO) y hongos micorrícicos vesiculares (HMY) en raíces de olivo. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca. Referencia: Hifa del patógeno (Hf p).

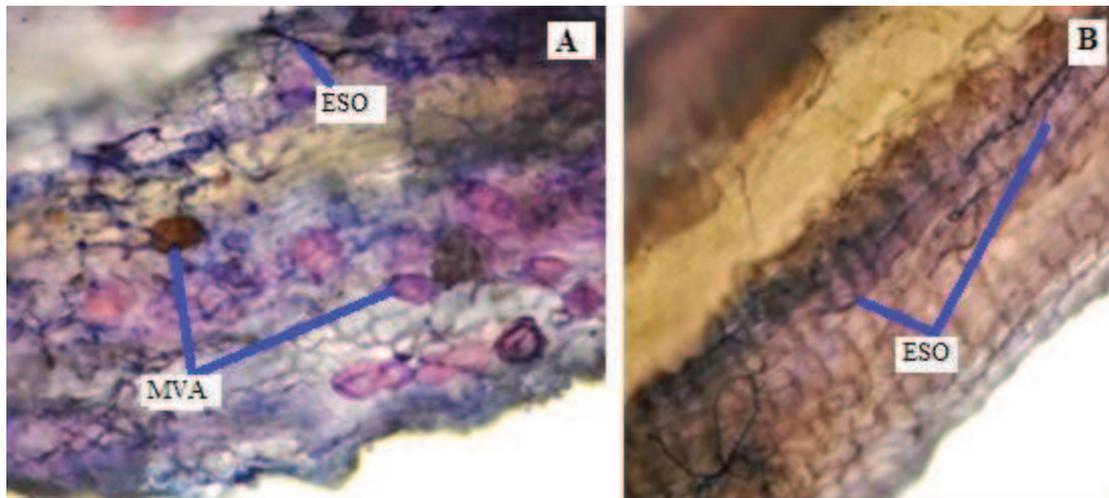


Figura 37: Tratamiento T1 (testigo). **A-B:** Colonización de hongos endofíticos oscuros (ESO) y micorrizas vesículo arbusculares (MVA); **B:** colonización de hongos endofíticos oscuros (ESO) en raíces de olivo. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

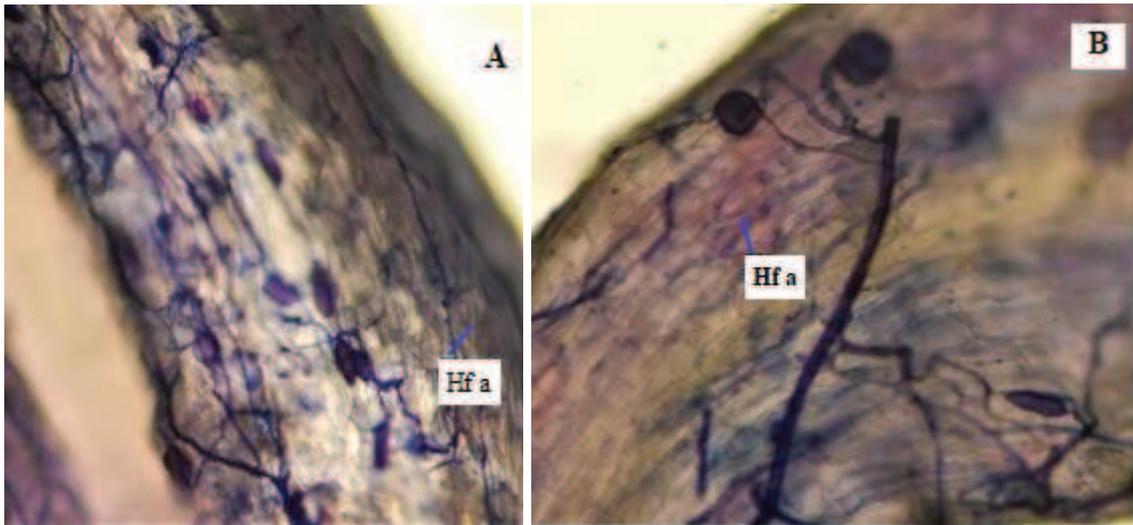


Figura 38: Tratamiento T4 (consociado, Vert + TM5A). **A-B:** Colonización de hifas del antagonista (**Hf a**) TM5A. En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

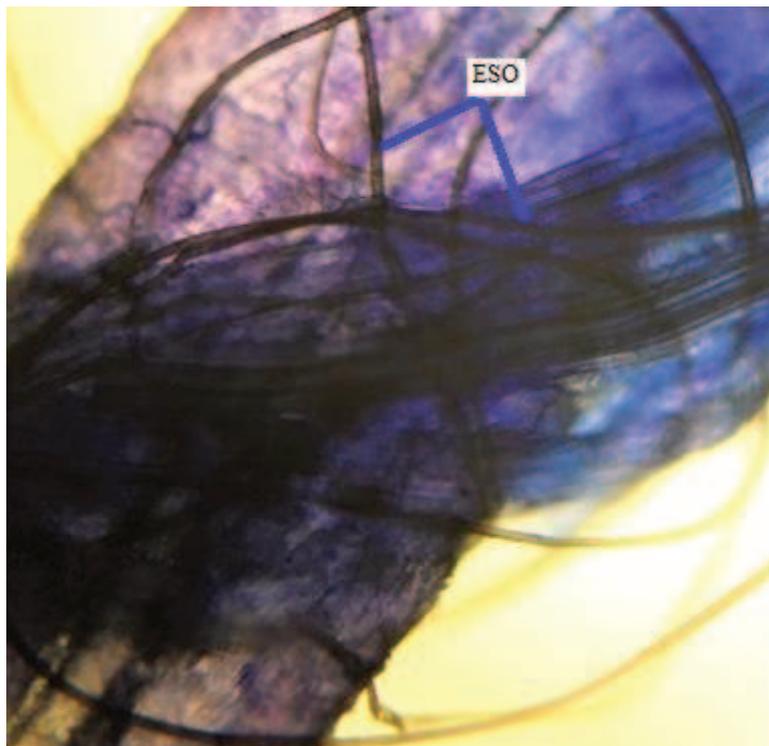


Figura 39: Tratamiento T3 (contról de Vert.) hifas melanizadas y hongos endófitos septados oscuros (**ESO**). En Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

III.4.3. Siembra de material vegetal para reaislamiento de *V. dahliae* en olivo

En muestras de plantines de olivo se determinó la presencia del fitopatógeno en el tratamiento control de *V. dahliae* y en el tratamiento combinado Vert+TM5A. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 29.

Tabla 29: Presencia de cepas nativas *V. dahliae* y TM5A en plantines de olivo en invernáculo. Lab. de Fitopatología. UNCa. Catamarca.

Trat Parte	Testigo	Control <i>V. dahliae</i>	Control Trich.	Combinado: M5A + Vert
Raíz	-	Vert	TM5A	TM5A
Tallo	-	-	-	TM5A

Referencias: - : ausencia; **Vert:** *V. dahliae*; **TM5A:** *T. hamatum*.

En Síntesis: Cepa nativa de *Trichoderma* como antagonista de *V. dahliae*

La cepa nativa TM5A, fue aislada de la ecorregión Chaco Árido, presentó crecimiento en medio de cultivo AN, como así también en los diferentes medios de cultivo (artificiales y natural), logrando crecimiento y desarrollo característico del género, y del mismo modo en la dinámica de crecimiento. Luego a través de identificación molecular se la constató como *T. hamatum*.

Dicha cepa evaluada como antagonista frente a *V. dahliae* obtuvo diferentes tipos de comportamiento, en su mayoría con AC de intermedias a altas durante 3 días, logrando el biocontrol del fitopatógeno. Mientras que en ensayos de cultivo dual evaluados con dos fotoperíodos y 2 pH diferentes ejerció el biocontrol a pH 6,5 con los 2 fotoperíodos, siendo estos mayores al 55%. Además, la acción de TM5A sobre *V. dahliae* se constató en los microcultivos observados.

En el ensayo con olivo var. manzanilla en cámara de cultivo, solo en algunas variables se logró obtener resultados estadísticamente significativos de la cepa TM5A frente a *V. dahliae*, mientras que en el ensayo en invernáculo no se obtuvieron resultados significativos en el tratamiento con Vert + TM5A, probablemente esto puede deberse a la diferencia de edad entre los plantines de los diferentes ensayos y a las condiciones de

cultivo. En este último ensayo se determinó la presencia del consorcio microbiano, de la cepa de *Trichoderma* en estudio con hongos micorrícicos nativos, observándose efectos positivos en el crecimiento vegetal y también el biocontrol del fitopatógeno.

IV. DISCUSIÓN

Si bien los resultados obtenidos en muchos casos son muy variables, varios se asemejan a los obtenidos por diferentes autores, ya que son varias las razones que pueden explicarlo.

La época del año en que se muestreó el material de estudio en plantas de olivo es la más favorable esto coincide con Morera *et al.* (2005) y Rattalino *et al.* (2021).

La metodología usada permitió el aislamiento de *V. dahliae*. La sintomatología encontrada en las plantas infectadas concuerda con las descritas por otros investigadores (López Escudero *et al.*, 2004; López Escudero y Mercado Blanco, 2011; Pérez Rodríguez, 2016; Santos Rufo, 2017), entre las que se observó, hojas abarquilladas sin marcada defoliación y con prevailecimiento de necrosis. A su vez el oscurecimiento interno que se observó en tallo es similar a lo hallado en raíz por León Ttacca *et al.* (2019).

Si bien todas las plantas analizadas presentaron síntomas característicos de la enfermedad, en algunos casos de manera más marcada que en otros, los resultados obtenidos no conciben con los estudios precedentes. Ya que el fitopatógeno se aisló de planta de variedad Frantoio, la cual está clasificada como variedad resistente (López Escudero *et al.*, 2004; López Escudero y Mercado Blanco, 2011; Trapero *et al.*, 2013). Este aislamiento obtenido se considera un dato relevante, teniendo en cuenta que podría tratarse de un hospedante susceptible a la cepa de *V. dahliae* nativa aislada.

Las características morfológicas del fitopatógeno en estudio, *V. dahliae* coinciden con lo descrito por Inderbitzin *et al.* (2011) y León Ttacca *et al.* (2019).

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo expuesto por Rattalino *et al.* (2021) y González *et al.* (2021) quienes aislaron cepas de este fitopatógeno en la provincia de Catamarca.

Para la verificación de la identidad de *V. dahliae* se utilizaron técnicas moleculares por su efectividad (Morera *et al.*, 2005). Los primers ITS 1 / ITS 4 permitieron definir género y especie del fitopatógeno en concordancia con lo utilizado por León Ttacca *et al.* (2019).

Y con un 32 % de diferencia de homogeneidad del resultado obtenido de la cepa fitopatógena estudiada.

Las cepas nativas de *Trichoderma* aisladas fueron un 29 % respecto al total muestreado, se considera un bajo porcentaje, pudiendo estar relacionado con la ubicación y las condiciones de humedad del muestreo (Michel Aceves, 2001). En cambio, hay antecedentes en los que se obtuvo mayor porcentaje de aislados de la rizósfera de diferentes plantas y de suelo cercano a las raíces (Ávila Cubillo *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2020).

Los parámetros cualitativos estudiados en los aislados de *Trichoderma* como ser segregación de pigmentos y coloración de conidios concuerdan con los de Liu *et al.* (2020) y Miranda *et al.* (2021).

Las condiciones de incubación resultaron adecuadas. Algunos aislados mostraron variabilidad fisiológica, que podría relacionarse con los orígenes de las cepas, esto coincide con Infante Martínez (2014).

Así también las condiciones de conservación no presentaron dificultad para la viabilidad de las cepas y fueron acordes teniendo en cuenta el tipo de hongos en estudio (Gato Cárdenas, 2010; Samaniego Fernández *et al.*, 2018).

En la evaluación del crecimiento y desarrollo de las diferentes cepas de *Trichoderma* el escaso crecimiento en AN se debe a que se trata de un medio de cultivo general, en el cual las fuentes de C y N presentes son sintéticas y se encuentran en bajas concentraciones. Siendo óptimo para microorganismos con bajo requerimiento nutricional. A pesar de esto, las cepas de *Trichoderma* lograron la supervivencia, dado que no produjeron estructuras de resistencias ni reproductivas (Kubicek Pranz, 2002; Cuervo Mulet *et al.*, 2010).

En tanto, en el mismo ensayo con diferentes medios de cultivo, las cepas de *Trichoderma*, pueden haberse encontrado afectadas debido a la combinación e influencia que ejerce cada una de ellas por sus particularidades, en el consorcio o grupos de cepas evaluados.

La plasticidad de las cepas de *Trichoderma* para adaptarse a los diferentes medios de cultivo y continuar su crecimiento y desarrollo se evidencia en el poco crecimiento que presentaron y en la presencia de conidios en CZP. Este medio cuenta con fuentes orgánicas de C (sacarosa) e inorgánicas de N (nitrato de sodio), entre otros minerales como Na, Fe y K. Esto coincide con los resultados obtenidos por Michel Aceves *et al.*

(2008), donde *Trichoderma* produce micelio y esporas viables sustratos orgánicos con alto porcentaje de humedad y bajo contenido mineral.

Así también se logró solo el crecimiento micelial de *Trichoderma* en medio para amilolíticos que contienen solo almidón como fuente de C, además de N y otros nutrientes en bajas concentraciones.

En tanto, el mayor crecimiento y desarrollo de las cepas de *Trichoderma* se obtuvo con los otros medios de cultivo empleados, ya que contienen fuente de C, aminoácidos, vitaminas y factores de crecimiento. El orujo de VT está constituido por fuentes orgánicas de C (como la fructosa), de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) presentes y a su disponibilidad (Anexo Tabla 32 y 33: Análisis biológicos y químicos orujos), también está compuesto por lignina y celulosa que son requeridos para la nutrición de estos microorganismos (González Basso *et al.*, 2015; Fernández Mayer, 2021). Resultados similares a los de este estudio se obtuvieron en otros sustratos de origen agrícolas (Agamez Ramos *et al.*, 2008; Arévalo *et al.*, 2017; Allori Stazzonelli *et al.*, 2017; Nugra Sánchez, 2018). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la potencialidad que tiene el orujo VT para la multiplicación a gran escala de *Trichoderma*. Siendo este medio de cultivo natural un recurso abundante en nuestra zona, ya que es un residuo agroindustrial. Por lo que el uso de este bioinsumo posibilitará la reproducción del inóculo en grandes volúmenes y de manera económica, lo cual permitirá el manejo agroecológico con la incorporación de antagonistas a bajo costos.

Las evaluaciones de antagonismo de las cepas de *Trichoderma* spp. frente a *V. dahliae* se hicieron en condiciones para el éxito del manejo de patógenos. Se recomienda la implementación de estrategias para lograr el crecimiento y desarrollo de ambos microorganismos, teniendo en cuenta que las condiciones de oscuridad son óptimas para el fitopatógeno y la cantidad de horas luz no afectó su crecimiento. Así también las 8 h de luz establecidas resultan un estímulo para las cepas antagonistas. La T° fué adecuada para ambos microorganismos (Fernández Gamarra *et al.*, 2017; Gómez Gálvez, 2018).

La capacidad antagónica puede encontrarse con efecto sinérgico al evaluar las cuatro cepas de *Trichoderma* de manera conjunta, ya que pueden coexistir metabolitos volátiles y difusibles como así también enzimas con capacidad para detener el crecimiento de *V. dahliae*. Similares resultados fueron los obtenidos en consorcio de diferentes microorganismos (Zubieta Coronado *et al.*, 2021).

La identificación molecular de las cepas de *Trichoderma* concuerda con trabajos donde se evaluaron los ITS 1/ ITS 4 (Mousumi Das *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2020; Jambhulkar *et al.*, 2022) y también con la contratación del servicio para la identificación molecular (Umaña Castro *et al.*, 2019; Alonso Bahena, 2020; Miranda *et al.*, 2021). Los resultados obtenidos por estos autores concuerdan con la alta homología de identificación de las cepas de *Trichoderma* de este estudio, siendo superior al 85 %.

En el análisis de antagonismo, los resultados de PIC en los ensayos de cultivo dual, indican la especificidad de las cepas para ejercer el biocontrol frente a *V. dahliae*, siendo al igual que los de otros autores (Rivera Méndez *et al.*, 2016; He *et al.*, 2019; García Velasco *et al.*, 2021) alrededor del 60%. Esto muestra la capacidad que presenta para adaptarse y mantener sus características y eficiencia antagonista.

Los PIC logrados en el ensayo de antagonismo en condiciones de fotoperíodo de 8 y 16 hs luz a pH 6,5 resultan las más propicias para la cepa *T. hamatum* (TM5A) y concuerdan con los de otros autores (García Velasco *et al.*, 2021) con resultados de 60 y 90 % de PIC. Las condiciones de pH evaluadas coinciden con los rangos de pH estudiados por Valencia Albello (2004). Y la Clase I obtenida en todos los tratamientos realizados y con las distintas cepas indica una buena competencia de sustrato por parte de *Trichoderma*, igual lo describen los siguientes autores (Infante Martínez, 2014. Carrero Carrón, 2016) que obtuvieron los mismos resultados.

En la evaluación de metabolitos los tratamientos (Vert + TM5A) y (Vert+TVL1) con fotoperíodo de 8 h luz a pH 4,5 y en 16 h luz a pH 6,5 presentaron PIC del 70 % siendo superiores a los publicados por otros investigadores, pudiendo deberse esto a las condiciones de incubación dadas (Alonso Bahena, 2020; García Velasco *et al.*, 2021).

En el ensayo de microcultivos resultados análogos fueron los obtenidos por Alonso Bahena (2020) y Rajani *et al.* (2021), mientras que otros solo encontraron enrollamiento (Guédez *et al.*, 2012; Maza *et al.*, 2012; García Velasco *et al.*, 2021; Kowalska, 2021).

En tanto, el estudio realizado evidencia el comportamiento tanto de las cepas de *Trichoderma* como de *V. dahliae* en las diferentes condiciones establecidas, demostrando la capacidad que poseen de adaptación a los factores evaluados (pH, fotoperíodo y T°). También la capacidad que presentan las cepas de *Trichoderma* en expresar diferentes comportamientos como agentes de biocontrol las hace idóneas para ser seleccionadas como cepas eficientes en el control del fitopatógeno.

En los ensayos *in vivo* que se realizaron con plantines de olivo en cámara de cultivo, en el tratamiento combinado (Vert + TM5A), con 100 % suelo, se observó la adaptación de la cepa antagonista para manifestar su capacidad como biocontrolador y promotor de crecimiento.

En el ensayo de crecimiento de plantines de olivo en invernáculo, los resultados sanitarios de este estudio concuerdan con lo obtenido en especies arvenses (Blanco Valdes y Leyva Galan, 2022). En el ensayo de plantines inoculados, en el tratamiento (Vert + TM5A) se estima que la acción conjunta de la cepa de *Trichoderma* (TM5A) con hongos micorrícicos presentes en los plantines de este estudio, lograron aminorar el efecto del fitopatógeno ya que los resultados fueron similares al resto de los tratamientos con *Trichoderma*. Esto coincide con lo planteado por algunos autores (García Molano y Jaramillo García, 2015; Kowalska, 2021), siendo que hongos micorrícicos inducen la tolerancia en plantas y en el crecimiento vegetal. Hay antecedentes en los que hongos micorrícicos mejoraron la resistencia contra *Verticillium*, como lo describe Goicoechea *et al.* (2010). Y también donde *Trichoderma* logró controlar hongos fitopatógenos de suelo (Macías Rodríguez *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2020). La evaluación de estos efectos es complicada ya que son varios los microorganismos que se encuentran en un mismo lugar (Harman *et al.*, 2004). Sería interesante, profundizar estudios relacionados con la interacción de este tipo de consorcios microbianos, ya que las observaciones de este trabajo indicarían una acción sinérgica, con *Trichoderma*.

Los resultados obtenidos en el ensayo de constatación de *V. dahliae* en plantines de olivo son similares a los publicados por diferentes autores que encontraron colonización rizosférica de *Trichoderma*, tanto a nivel superficial como endofítica (Rabeendran *et al.*, 2006; López *et al.*, 2021; Morel *et al.*, 2021). La capacidad que cepas de *Trichoderma* colonicen raíces de plantas en presencia de micorrizas que se encontraban presentes previamente, concuerda con lo encontrado por otros investigadores (Sood *et al.*, 2020; Macías Rodríguez *et al.*, 2020 y Kowalska, 2021). Harman *et al.* (2004) expresaron que más de un microorganismo puede promover mejores resultados respecto a que sea solo uno. Los porcentajes de colonización de hongos micorrícicos en los tratamientos testigo y en control de *Trichoderma* (TM5A) son similares a los obtenidos por Sosa Rodríguez *et al.* (2006). En este trabajo predominó la colonización natural de micorrizas en el tratamiento testigo respecto al tratamiento con *Trichoderma*. Si bien hubo un efecto de

primero colonización por parte de las micorrizas, la cepa TM5A logró colonizar de manera endofítica las raíces de los plantines de olivo.

Di Barbaro (2020) muestra la eficiencia en el consorcio de microorganismos de cepas nativas en el crecimiento de diferentes cultivos, lo que concuerda con los resultados alcanzados en nuestro trabajo, con la cepa TM5A.

V. CONCLUSIONES

- Se logró el aislamiento y la identificación morfológica, funcional y genética de una cepa nativa de *V. dahliae* como agente fitopatógeno de la verticilosis, en planta de olivo var. Arauco de la provincia de Catamarca.
- Se logró el aislamiento de 17 cepas nativas de *Trichoderma* spp. de suelos de diferentes ecoregiones de la provincia de Catamarca.
- El medio de cultivo natural de orujo de vid tinta empleado para lograr el aislamiento resultó adecuado al igual que las condiciones de incubación que permitieron obtener e identificar morfológicamente las cepas y luego conservarlas.
- Por su comportamiento antagónico frente a *V. dahliae*, las cepas de *Trichoderma* evaluadas en las condiciones estudiadas resultaron eficientes como biocontroladoras frente al fitopatógeno en estudio.
- Se pudo determinar que los factores de fotoperíodo y pH no limitan el crecimiento del fitopatógeno, mientras que el control antagónico depende de cada cepa de *Trichoderma* para adaptarse a las condiciones en estudio. Siendo la cepa TM5A la que mejor controló al fitopatógeno de manera *in vitro*. Por lo que es necesario continuar el estudio para determinar la cepa que presente mayores acciones como controlador biológico.
- Como resultado de este estudio se verificó la capacidad de cada cepa para ejercer los diferentes tipos de parasitismo en las condiciones establecidas. Esto es considerado de gran interés ya que se evidencia el control del fitopatógeno a través del contacto físico de ambos microorganismos.

- Por primera vez se describió la capacidad biocontroladora *in vitro* de cepas de *Trichoderma* spp. nativas de la provincia de Catamarca. Las mismas presentan una amplia variabilidad en el crecimiento y desarrollo, lo que indica la importante biodiversidad de este género fúngico. Esta biodiversidad es la que permitió encontrar cepas con características deseables para controlar biológicamente a *V. dahliae*, siendo de gran interés para la producción agrícola orgánica y sustentable. Con lo cual no se cierra la búsqueda y selección de cepas para el control de *V. dahliae* como de otros fitopatógenos. Es de interés e importancia continuar el estudio del consorcio de varias cepas de *Trichoderma* para controlar de manera conjunta a *V. dahliae* u otros fitopatógenos.
- Este estudio es pionero con la cepa nativa estudiada, por lo que es promisorio para ejercer biocontrol en hospedantes infectados con *V. dahliae*.
- Se registró un alto nivel de colonización fúngica en raíces de olivo, con la co-ocurrencia de *T. hamatum* (TM5A), *V. dahliae*, hongos micorrícicos y endófitos septados oscuros nativos de la provincia de Catamarca. Con esto se evidencia la diversidad de microorganismos presentes en el vegetal, que consociados presentan capacidad de biocontrol con lo cual se traduce en un mejor crecimiento vegetal.
- La ausencia de síntomas también es posible que se deba a una resistencia inducida por la presencia de *T. hamatum* (TM5A) en el olivo. Es necesario el estudio en profundidad de esta cepa antagónica en diferentes cultivos.
- Dado el consorcio microbiano establecido y la capacidad de biocontrol ejercida por las micorrizas nativas y la cepa TM5A de *T. hamatum*, se considera pertinente evaluar el comportamiento de estos microorganismos en diferentes condiciones abióticas (T°, pH, H°, etc.) para conocer el comportamiento y establecer el posible manejo. Es también de interés el aislamiento del hongo micorrícico y posterior inoculación junto a la cepa TM5A para ser probada en otros cultivos frente a *V. dahliae*.
- Se considera necesario conocer la vida útil del inoculante preparado con la cepa TM5A (*T. hamatum*) y el comportamiento que esta presenta frente a diferentes aditivos que se le pueda agregar para lograr una mejor aplicación.
- Es necesario evaluar el comportamiento de la cepa biocontroladora TM5A (*T. hamatum*) en condiciones de campo con el fin de evaluar su crecimiento y

funcionalidad, que ejerce en un medio donde las condiciones de crecimiento no son controladas.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta Durán CM, Acosta Peñaloza D, Nava Gómez LM. 2009. Control biológico de hongos fitopatógenos del suelo. *Investigación Agropecuaria*, 6(1) :27-42.
- Agamez Ramos EY, Zapata Navarro RI, Oviedo Zumaqué LE, Barrera Violeth JL. 2008. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10 (2) :23-34.
- Ait Rahou Y, Boutaj H, Ait El Mokhtar M, Anli M, Boutasknit A, Tahiri A I, Meddich A. 2022. Effect of beneficial indigenous microorganisms on tomato growth performance, productivity, and protection against *Verticillium dahliae*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 129(5) :1163-1180.
- Alonso Bahena A. 2020. Actividad antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Rosellinia necatrix*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea*, patógenos del cultivo de rosa. Tesis de grado. Tenancingo, Estado de México Centro universitario UAEM Tenancingo. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Allende Molar R, Báez Parra KM, Salazar Villa E, Rojo Báez I. 2022. Biodiversity of *Trichoderma* spp. In Mexico and its potencial use in agriculture. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 25(3).
- Allori Stazzonelli E, Yasem de Romero L, Ploper LD. 2017. Evaluación de sustratos para la producción de esporas de *Trichoderma* y estudio del crecimiento en arroz de las cepas antagonistas TPT03, TPT02, MRT35 y MRT40. *Rev. Agron. Noroeste Argent*, 37(1) :57-66.
- Allori Stazzonelli E. 2017. Utilización de hongos antagonistas nativos para el control biológico el moho blanco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* en el poroto y hortalizas en el noroeste argentino. Tesis doctoral. Tucumán. Universidad Nacional de Tucumán.
- Amaguaña Rojas FJ y Churuchumbi Rojas EF. 2018. Estandarización fitoquímica del extracto de caléndula (*Calendula officinalis*). Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: Ingenieras en biotecnología de los recursos naturales Quito. Universidad politécnica Salesiana, Sede Quito.

- Arévalo E, Cayotopa J, Olivera D, Gárate M, Trigoso E, Costa D B, y León B. 2017. Optimización de sustratos para la producción de conidias de *Trichoderma harzianum* por fermentación sólida en la región de San Martín. Perú. Revista de Investigaciones Altoandinas, 19(2) :135-144.
- Ávila Cubillo C, Goretti Ramirez M y Lizcano Toledo R. 2014. Aislamiento de *Trichoderma* sp. en las unidades productivas agrícolas del Centro de Formación Agroindustrial La Angostura de Campoalegre (Huila). Revista agropecuaria y agroindustrial La Angostura, 1(1) :15-20.
- Baiyee B, Itoe SI, Sunpapa A. 2019 a. *Trichoderma asperellum* T1 mediated antifungal activity and induced defense response against leaf spot fungi in lettuce (*Lactuca sativa* L.). Physiological and Molecular Plant Pathology, 106 :96-101.
- Baiyee B, Pornsuriya C, Ito SI, Sunpapao A. 2019 b. *Trichoderma spirale* T76-1 displays biocontrol activity against leaf spot on lettuce (*Lactuca sativa* L.) caused by *Corynespora cassiicola* or *Curvularia aeria*. Biological control, 129 :195-200.
- Blanco López MA, Jiménez Díaz RM, Caballero JM. 1984. Symptomatology, incidence and distribution of *Verticillium* wilt of olive trees Andalusia. Phytopath. Medit. 23 :1-8.
- Blanco Valdes Y, Leyva Galán Á. 2022. Las arvenses como hospedantes de micorrizas residentes arbusculares en un sistema sucesional maíz frijol. Cultivos Tropicales, 43(3) :1-5.
- Bell D K, Wells H D, Markam C R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. against six fungal pathogens. Phytopathology, 72 :379-382.
- Beltrán EG, de la Torre FN. 2016. La coevolución como un sistema de defensa en la interacción planta patógeno. Encuentros en la biología, 9(157) :79-81. En: <https://www.encuentrosenlabiologia.es/2016/03/la-coevolucion-como-un-sistema-de-defensa-en-la-interaccion-planta-patogeno/>
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Int. Microbiol. 7 :249-260.
- Benouzza S, Bellahcene M, Fortas Z. 2020. Biocontrol of *Verticillium dahliae* by native *Trichoderma* strains isolated from Algeria. Mycopath, 18(2).

- Bilginturan M, Karaca GH. 2021. Effects of *Trichoderma* and PGPR applications on growth and *Verticillium* wilt of eggplant. *Mediterranean Agricultural Sciences*. 34(3) :267-272.
- Cano MA. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. una revisión. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 14(2) :15-31.
- Carneros AG, Ruiz JRG, Ruiz MLM. 2015. *Verticillium dahliae* patógeno del girasol: análisis genético y molecular. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*. (266) :40-47.
- Carrero Carrón I. 2016. Aproximación molecular al antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Verticillium dahliae* para el biocontrol de la verticilosis en genotipos de *Olea europaea* susceptibles y resistentes al patotipo defoliante. Tesis doctoral. Córdoba: Universidad de Córdoba. En: <https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/13800/2016000001474.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Carrero Carrón I, Trapero Casas JL, Olivares García C, Monte E, Hermosa R, Jiménez Díaz R. 2016. *Trichoderma asperellum* is effective for biocontrol of *Verticillium* wilt in olive caused by the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Crop Protection*, 88 :45-52.
- CET (Centro de Educación y Tecnología). 2004. Manual de producción y utilización de *Trichoderma* spp. Fundación para la Innovación Agraria (FIA). Gobierno de Chile, :26 p.
- Cheng Y, Tang X, Gao C, Li Z, Chen J, Guo, L., Wang T, Xu J. 2020. Molecular diagnostics and pathogenesis of fungal pathogens on bast fiber crops. *Pathogens*, 9(3) :223 p.
- Cotes AM. 2018. Conceptos de control biológico y sus premisas fundamentales. En: Santos Díaz AM *et al.* Ed. Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros. Vol. I: Agentes de Control biológico. Editora: Cotes AM. :40- 54.
- Covacevich F, Echeverría HE, Aguirrezabal LAN. 2001. Comparación de dos técnicas de cuantificación de infección micorrícica. *Cienc. del Suelo*, 19(2) :155-158.

- Cuervo Mulet RA, Ledesma JA, Duran Vanegas JA, Argote Vega FE. 2010. Aislamiento y control microbiológico de *Leuconostoc mesenteroides*, en un ingenio para optimizar el rendimiento de azúcar y etanol. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 8(2) :31-40.
- Cupull Santana R, Rodríguez CMA, Pérez Navarro C, Delgado Pérez D y Cupull Santana M del C. 2003. Efecto de *Trichoderma viride* como estimulante de la germinación, en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn. Centro Agrícola, 1 :21-25.
- De la Cruz Blanco JI, Guisado López AJ. 2008. Verticilosis de frutales de hueso, *Verticillium dahliae*. Ficha técnica de sanidad vegetal 27. Junta de Extremadura Conserjería de Agricultura y Desarrollo Rural.
- Díaz G, Rodríguez G, Montana L, Miranda T, Basso C, Arcia M. 2020. Efecto de la aplicación de bioestimulantes y *Trichoderma* sobre el crecimiento en plántulas de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims) en vivero. Bioagro, 32(3) :195-204.
- Di Barbaro G; González Basso V, Alurralde AL, Abel de López M, Batallan Morales S. 2015. Capacidad de biocontrol in vitro de *Azospirillum brasilense* (Tarrand, Krieg & Döbereiner) sobre *Verticillium dahliae* KLEB. X Reunión nacional científico técnica de biología del suelo. II Congreso nacional de biología molecular de suelos. San Salvador de Jujuy, 2 al 4 de septiembre de 2015.
- Di Barbaro, MG. 2020. Interacción de *Azospirillum brasilense* (Tarrand, Krieg & Döbereiner) y hongos micorrícicos del suelo en *Helianthus tuberosus* L. y *Smallanthus sonchifolius* [(Poeppig & Endlicher) H. Robinson]. Santa Fé. Universidad Nacional del Litoral.
- Di Peto PA. 2017. Desarrollo de estrategias de biocontrol para un manejo fitosanitario sustentable de cultivos de importancia regional. Tesis doctoral. Tucumán. Universidad Nacional de Tucumán.
- Di Rienzo J. A.; Casanoves F.; Balzarini M. G.; Gonzalez L.; Tablada M. y Robledo C. W. 2020. InfoStat. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. En: <http://www.infostat.com.ar>
- Domínguez M, Montecchia JF, Nicosia SM, Fernandez PDC, Troglia CB, Gonzalez JH, Paniego NB. 2022. Implementación de herramientas de fenotipado de alto

- rendimiento para evaluar el marchitamiento por *Verticillium dahliae* en girasol. Rev. de tecnología agropecuaria, 10(41) :35-43.
- Erazo JG, Palacios SA, Pastor N, Giordano FD, Rovera M, Reynoso MM, Venisse SJ, Torres AM. 2021. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 against peanut brown root rot caused by *Fusarium solani* RC 386. Biological Control, 164 - 104774.
- Ezziyyani M, Requena ME, Pérez Sánchez C, Candela ME. 2005. Efecto del sustrato y la temperatura en el control biológico de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.). Anales de Biología, 27 :119-126.
- Fernández Herrera E, Uribe Rivera SE, Guerrero Ruíz JC, Rueda Puente EO. 2013. Hongos fitopatógenos asociados a pudriciones de raíz y cuello en sandía en la costa de Hermosillo, Sonora. In Congreso Internacional de Ciencias Agrícolas. Mexicali BC, México, :566-570.
- Fernández Gamarra MA, Ojeda MM, Maldonado GAE. 2017. Identificación molecular y tasa de crecimiento de cepas nativas de *Trichoderma* spp. aisladas de la Región Norte del Paraguay. Investigación Agraria, 19(2) :127-132.
- Fernández Mayer A. 2021. Orujo de uva rico en compuestos fenólicos con “actividad antioxidante” para producir carne y leche saludable. Vet comunicación y equipamiento para el sector veterinario. En: <https://uvasargentinas.com.ar/orujo-de-uva-rico-en-compuestos-fenolicos-para-producir-carne-y-leche/>
- Fernández Valiela MV. 1979. 3° Edición. Bs. As. Rep. Argentina. Colección Científica del INTA. Impreso en Talleres Gráficos I.S.A.G. Tomo III – Vol. IV: 316; 317; 334-342.
- French ER, Herbert TT. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. El microscopio Editora M de la Cruz M, :57-96.
- García López MD, Uriburu Fernández F. 2000. La conservación de cepas microbianas. SEM@ foro, (30) :12-16.
- García Molano JF, Jaramillo García LS. 2015. Comunidad microbiana en la rizósfera del olivo en Boyaca – Colombia. Cultura científica 13.
- García Velasco R, Alonso Bahena A, Domínguez Arizmendi G, Aguilar Medel S, Mora Herrera ME, Companioni González B. 2021. Efecto antagónico de cepas nativas de

- Trichoderma* spp. contra el hongo fitopatógeno *Rosellinia necatrix* en México. *Agronomía Tropical* 71: e4605221.
- Gato Cárdenas Y. 2010. Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Fitosanidad*, 14(3) :189-195.
- Gil C, Albarellos M. 2011. Enfermedades del olivo - Descripción, síntomas y métodos de lucha del repílo, el emplomado, la seca y la tuberculosis; Cuaderno de Campo, :29-33.
- Goicoechea N, Garmendia I, Sanchez Diaz M, Aguirreolea J. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) as bioprotector agents against wilt induced by *Verticillium* spp. in pepper: a review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8 :25-42.
- Giovannetti M, Mosse B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytol.* En: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x>
- Gómez Gálvez FJ. 2018. Potencial de la desinfestación química del agua de riego y/o suelo para el control de la Verticilosis del olivo. Tesis doctoral. Córdoba. Universidad de Córdoba.
- González V, Paccioretti M, Rattalino D, Taborda R J, Carrasco F, Arias F, Otero ML. 2021. Determinación de patotipos de *Verticillium dahliae* Kleb. provenientes de las regiones olivícolas del centro y oeste de Argentina y pruebas de virulencia en algodón. *Agriscientia*, 38 :59 - 69. En: <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/agris/article/view/26937/33999>
- González Basso V, Di Barbaro G, Alurralde A, Rizo M, Espeche E, Montalván LD. 2015. Utilización de diferentes residuos agroindustriales como sustratos para el crecimiento de *Trichoderma* sp. X Reunión nacional científico técnica de biología del suelo. II Congreso nacional de biología molecular de suelos. 2 al 4 de setiembre de 2015. San Salvador de Jujuy.
- González Basso MV, Di Barbaro G, Rearte N, Bellone C. 2018. Aislamientos de cepas nativas de *Trichoderma* sp. en la provincia de Catamarca (R.A.). IV Congreso argentino de microbiología y I jornada de microbiología general. 11 al 13 de abril. Mar del Plata. A24.

- González Cárdenas JC, Maruri García JM, González Acosta A. 2005 Evaluación de diferentes concentraciones de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum* agente causal de la pudrición de plántulas en papaya (*Carica papaya* L.) en Tuxpan, Veracruz, México. UDO Agrícola, 5(1) :45-47.
- González Salgado CH, Rodríguez Larramendi L, Arjona C, Puertas A, Fonseca M. 1999. Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* R. sobre la composición cuantitativa de bacterias, hongos y actinomicetos de la rizósfera de *Solanáceas* y su influencia en el crecimiento vegetativo. Investigación agraria. Producción y protección vegetales, 14(1) :297-306.
- González Vera CA, Seleme F, Juri C, González Basso MV, Díaz, Y. 2012 Verticilosis o Parálisis Parcial del Olivo, *Verticillium dahliae* Kleb. Revista de divulgación técnica agrícola y agroindustrial, 17 :1-4. En: <https://editorial.unca.edu.ar/Publicacione%20on%20line/rebea/2012-marzo/69-74-GonzalezVera.pdf>
- Goudjal Y, Toumatia O, Yekkour A, Sabaou N, Mathieu F, Zitouni A. 2014. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. Microbiological Research, 169 :59 - 65.
- Guédez C, Cañizález L, Castillo C, Olivar R. 2009. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp.). Rev. Soc. Ven. Microbiol, 29 (1) :34-38.
- Guédez C, Cañizález L, Castillo C, Olivar R. 2012. Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 32 :44-49.
- Guerrero R. 2016. Selección y efectividad del uso de aislamientos de *Trichoderma* spp. para el control del Cancro Bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Tesis de maestría. La Plata. Universidad Nacional de La Plata.

- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1) :43-56. En: <https://www.researchgate.net/publication/8666568>
- He AL, Jia L, Wang XH, Zhang QG, Wei SONG, Jie CHEN. 2019. Soil application of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 granules promotes growth and resistance to *Fusarium graminearum* in maize. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(3) :599-606. En: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095311918620891>
- Hernández Melchor DJ, Ferrera Cerrato RF, Alarcón A. 2019. *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia*, 35(1) :98-112.
- Hernández Mendoza, J. L.; Sánchez Pérez, M. I.; García Olivares, J. G.; Pérez, N. M.; González Prieto, J. M. y Di Carlo Quiroz Velásquez, J. 2011. Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma* spp. nativos del noreste de México. *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XIII N°. 2 :176-185.
- Herrero FD. 2019. Verticilosis del olivo en el sudoeste de la provincia de Buenos Aires. 49 pp. En: <https://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/4733>
- Hoyos Caravajal L, Chaparro P, Abramsky M, Chet I, Orduz S. 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfti* bajo condiciones in vitro y de invernadero. *Agronomía Colombiana*, 26(3) :451- 458.
- Howell CR. 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. En: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>
- Inderbitzin P, Bostock RM, Davis RM, Usami T, Platt HW, Subbarao KV. 2011. Phylogenetics and Taxonomy of the Fungal Vascular Wilt Pathogen *Verticillium*, with the Descriptions of Five New Species. *Plosone*, 6(12) :1-22.
- Inderbitzin P, Robbertse B, Schoch C L. 2020. Species identification in plant associated prokaryotes and fungi using DNA. *Phytobiomes journal*, 4(2) :103-114.
- 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.

- Infante Martínez, D. 2014. Caracterización Morfo-Fisiológica Patogénica, bioquímica y Molecular de aislamientos de *Trichoderma* sp. Tesis Doctoral. Centro nacional de sanidad agropecuaria La Habana, Cuba.
- Interacción de microorganismos beneficios en plantas. Innovak News. <https://docplayer.es/58898171-Interaccion-de-microorganismos-beneficos-en-plantas.html>
- Jambhulkar PP, Raja M, Singh B, Katoch S, Kumar S, Sharma P. 2022. Potential native *Trichoderma* strains against *Fusarium verticillioides* causing post flowering stalk rot in winter maize. *Crop Protection*, 152, 105838.
- Jiménez Díaz RM. 1996. Interacciones planta – hongos: mecanismos de infección, patogénesis y resistencia. En: Llácer G, López MM, Trapero A, Bello A, editores. *Patología vegetal*, :739-767.
- Jiménez Díaz RM, Rodríguez Jurado D, Navas Cortes JA, Mercado Blanco J, Trapero Casas JL. 2003. Estrategias de Control de la Verticilosis del Olivo Sostenible. Dossier Olivar, :1-5. En: https://www.researchgate.net/publication/28278791_Estrategias_de_control_de_la_Verticilosis_del_olivo
- Jiménez Díaz RM. 2009. Verticilosis del olivo: Problemas y perspectivas para su manejo integrado. *Phytoma*, 209 :1-6.
- Jiménez Díaz RM, Cirulli M, Bubici G, Jiménez Gaso M del M, Antoniou PP, Tjamos EC. 2012. *Verticillium* wilt treat to olive productions: current status and future prospects for its management. *Plant Disease*, 96(3) :304-329.
- Kirk P. M. 2019. Species Fungorum (versión Oct 2017). In: Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019 Annual Checklist (Roskov Y., Ower G., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., Nieukerken E. van, Zarucchi J. Penev L., eds.). En: www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands
- Kowalska, B. 2021. Management of the soil-borne fungal pathogen *Verticillium dahliae* Kleb. causing vascular wilt diseases. *Journal of Plant Pathology*, 103(4) :1185-1194.
- Kubicek Pranz EM. 2002. Nutrition, cellular structure and basic metabolic pathways in *Trichoderma* and *Gliocladium*. Kubiecek CP, Harman GE, editores. *Trichoderma*

y *Gliocladium*. Basic biology, taxonomy y genetics. Taylor & Francis e-Library, :95-111.

Landa del Castillo BB, Jiménez-Díaz RM, Navas Cortés JA. 2008. Control de enfermedades causadas por microorganismos. Junta de Andalucía. Conserjería de Agricultura y Pesca. Editor: Sostenibilidad de la producción de olivar en Andalucía, :314 p.

León Ttacca B, Arévalo Gardini E, Bouchon AS. 2019. Muerte repentina de *Theobroma cacao* L. causado por *Verticillium dahliae* Kleb. en el Perú y su biocontrol in vitro. Cienc Tecnol Agropecuaria, Mosquera, 20(1) :117-132. En: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-87062019000100117&script=sci_arttext

Liu B, Jib S, Zhangc H, Wang Y, Liua Z. 2020. Isolation of *Trichoderma* in the rhizosphere soil of *Syringa oblata* from Harbin and their biocontrol and growth promotion function. Microbiological Research, (235) :126445 p.

López AC, Alvarenga AE, Zapata PD, Luna MF, Villaba LL. 2021. Caracterização de isolamento de *Trichoderma* endofítico de raiz de yerba mate como microorganismos potenciais que promovem o crescimento de planta. A face transdisciplinar das ciências agrárias, :97-107.

López Benítez A, López Betancourt SR, Vázquez Badillo ME, Rodríguez Herrera SA, Mendoza Elos M, Padrón Corral E. 2005. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. mediante extractos vegetales acuosos. Revista Mexicana de Fitopatología, 23(2) :183-190.

López Escudero FJ, Núñez Santos D, Blanco López MA. 2003. Aislamiento de *Verticillium dahliae* de suelo y Caracterización Morfológica de sus Microesclerocios. Bol. San. Veg. Plagas, 29 :613-626.

López Escudero FJ, del Río C, Caballero JM, Blanco López MA. 2004. Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. European Journal of Plant Pathology, 110 :79-85.

López Escudero FJ, Martos Moreno C, Raya Ortega MC, Blanco López MA. 2005. Resistencia del olivo a la verticilosis causada por *Verticillium dahliae*. Vida Rural, :48-54.

- López Escudero FJ, Mercado Blanco J, Roca JM, Valverde Corredor A, Blanco López MA. 2010. *Verticillium* wilt of olive in the Guadalquivir Valley (southern Spain): relations with some agronomical factors and spread of *Verticillium dahliae*. *Phytopathol. Mediterr*, 49 :370-380.
- López Escudero FJ, Mercado Blanco J. 2011. *Verticillium* wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil borne pathogen. *Plant Soil*, 344 :1-50.
- López Herrera CJ, Pérez Jiménez RM, Llobel A, Monte Vázquez E, Zea Bonilla T. 1999. Estudios *in vivo* de *Trichoderma* como agente de biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en aguacate. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5 :261-265.
- López Mondéjar R. 2011. Detección y Cuantificación de *Trichoderma harzianum*, y Detección de su Actividad Biocontrol Frente a la Fusariosis Vascular del Melón Mediante la Aplicación de Herramientas Moleculares. Tesis doctoral. Alicante. Universidad de Alicante.
- Lu ZX, Tu GP, Zhang T, Li YQ, Wang XH, Zhang QG, Jie CHEN. 2020. Screening of antagonistic *Trichoderma* strains and their application for controlling stalk rot in maize. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(1) :145-152.
- Macías Rodríguez L, Contreras Cornejo HA, Adame Garnica SG, Del Val E, Larsen J. 2020. The interactions of *Trichoderma* at multiple trophic levels: Inter kingdom communication. *Microbiological Research*, (240) :126552 p.
- Maldonado Arteaga RM. 2020. Principales enfermedades en el cultivo de girasol (*Helianthus annuus*). Trabajo de grado. Babahoyo. Universidad técnica de Babahoyo. En: <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/8015/E-UTB-FACIAG-ING%20AGROP-000075.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Martínez B, Infante D, Reyes Y. 2013 a. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Protección Veg.*, 28(1) :1-11.
- Martínez B, Pérez J, Infante D, Duarte Y, Moreno M. 2013 b. Antagonismo de aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm. *Rev. Protección Veg.*, 28(3) :192-198.

- Martins Corder MP, de Melo I S. 1998. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. Scientia Agricola (55). Consultado el: 30/01/2020. En: <https://www.scielo.br/j/sa/a/4xSwwkhzZHNfrgRn5MCDVJk/>
- Martínez Martínez TO, Guerrero Aguilar BZ, Pecina Quintero V, Rivas Valencia P, González Pérez E, Angeles Núñez JG. 2020. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* contra la fusariosis del garbanzo y su efecto biofertilizante. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 11(5) :1135-1147.
- Martínez Salgado SJ, Andrade Hoyos P, Romero Arenas O, Villa Ruano N, Landeta Cortés G, Rivera Tapia JA. 2021. Control *in vitro* de *Fusarium* sp. asociado al cultivo de cebolla mediante *Trichoderma harzianum*. Revista mexicana de fitopatología, 39(2) :314-328.
- Maza M, Allori Stazonelli E y Yasem de Romero MG. 2012. Evaluación *in vitro* de aislamientos nativos de *Trichoderma* como agentes de biocontrol y promoción del crecimiento inicial en soja. Revta. Agron. N. O. Argent, 32(1-2) :55-62.
- Mercado Blanco J, Rodríguez Jurado J, Pérez Artes E, Jiménez Díaz RM. 2001. Detection of the nondefoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. Plant Pathology, 50 :609-619. En: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1365-3059.2001.00601.x>
- Mercado Cárdenas GE, Berruezo LA. 2021. Enfermedades radicales y de la base del tallo en el cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum*) en la provincia de Salta. Boletín de la asociación Argentina de fitopatólogos, 8 :11 p.
- Michel Aceves AC. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp. Euascomycetes: Hypocreales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes: Hyphales). Tesis doctoral. Colima, México. Universidad de La Colina.
- Michel Aceves AC, Otero Sánchez MA, Martínez Rojero RD, Rodríguez Moran NL, Ariza Florez R, Barrios Ayala A. 2008. Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. Revista Chapingo Serie Horticultura, 14(2) :185-191.
- Miranda MDS, Mayorga LFM, Aguilera LAP. 2021. Identificación morfológica y molecular de especies autóctonas *Trichoderma* spp., aisladas de suelos de importancia agrícola. Revista Ciencia y Tecnología El Higo, 11(1) :26-42.

- Molinero Ruiz L. 2019. Recent advances on the characterization and control of sunflower soilborne pathogens under climate change conditions. OCL, 26, 2. En: <https://www.ocl-journal.org/articles/oclj/pdf/2019/01/oclj180046s.pdf>
- Mondino P. 2006. Control Biológico. En: Mondino P, Vero S. Control Biológico de patógenos en plantas. Editor: Uriarte G. :21-25. En: <https://hdl.handle.net/20.500.12008/20224>
- Morán Diez ME. 2008. Aislamiento, Caracterización y Análisis del Gen *Thpg1* de *Trichoderma harzianum*; Tesis doctoral. Centro Hispano Luso de Investigaciones Agrarias Dpto. de Microbiología y Genética – Universidad de Salamanca.
- Morel M, Castillo Y, García S, Conce M, de Dios Moya J, Reynoso T, Alonzo K. 2021. Evaluación de la capacidad endófito de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en casa malla. APF, 10(1) :25-40.
- Moreno Velandia CA, Cotes AM, Beltrán Acosta C, Bettiol W, Elad Y. 2018. Control biológico de fitopatógenos del suelo. En: Santos Díaz AM et al. Ed. Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros. Vol. I: Agentes de Control Biológico. Editora: Alba Marina Cotes, :144-221.
- Morera B, Páez JI, Vega JM, Montes F. 2005. Comparación de métodos de diagnóstico de *Verticillium dahliae* en olivo: aislamiento en medio de cultivo y PCR. Bol. San. Veg. Plagas, 31 :267-275.
- 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. En: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104152>
- Mousumi Das M, Haridas M, Sabu A. 2019. Biological control of black pepper and ginger pathogens, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*, using *Trichoderma* spp. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 17 :177-183.
- Nykiel-Szymańska J, Bernat P, Słaba M., 2020. Biotransformation and detoxification of chloroacetanilide herbicides by *Trichoderma* spp. with plant growth-promoting activities. Pesticide Biochemistry and Physiology, 163 :216-226.
- Nugra Sánchez AN. 2018. Evaluación de sustratos orgánicos para la propagación del *Trichoderma* spp. Tesis de grado. Ecuador. Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca.

- Ortiz CM. 2017. Etiología de la enfermedad punta de cigarro en plantaciones de banana en las provincias de Salta y Jujuy. Tesis de maestría. Balcarce. Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Otero ML, Roca M, Zapata R, Ladux JL, Ortiz J, Zanelli M, Matias C, Pérez BA. 2014. Effect of solarization, organic matter, and *Trichoderma* on the severity of *Verticillium* wilt in olive trees (*Olea europaea* L.) and soil inoculum density. In VII International Symposium on Olive Growing 1057. Septiembre. :121-126.
- Otero, M. L., Gonzalez, V. M., Rattalino, D., & Paccioretti, M. A. 2019. *Verticilosis del Olivo*. WebPal KK y Mc Spadden Gardener B. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health, :25 p. En: <https://repositorio.inta.gob.ar/handle/20.500.12123/10479>
- Pal KK, Gardener BM. 2006. Biological control of plant pathogens, :1-25.
- Palazón C, Palazón I. 1989. Estudios epidemiológicos sobre la «tristeza» del pimiento en la zona del Valle Medio del Ebro. Boletín Sanidad Vegetal Plagas, 15 :233-262.
- Palomo Gil A, Godoy Ávila S, Gaytán Mascorro, A, García Castañeda EA. 2003. CIAN Precoz: a cotton variety of short cycle and tolerant to the "late drying" disease (*Verticillium dahliae* K.).
- Pérez Rodríguez M. 2016. Influencia del riesgo sobre la Verticilosis del olivo. Tesis doctoral. Córdoba. Universidad de Córdoba.
- Phillips JM, Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. En: [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)
- Poveda J. 2021. *Trichoderma* as biocontrol agent against pests: New uses for a mycoparasite. Biological Control, 159 :104634.
- Puri KD, Hu X, Gurung S, Short DP, Sandoya GV, Schild M, Subbarao KV. 2021. *Verticillium klebahnii* and *V. isaacii* isolates exhibit host-dependent biological control of *Verticillium* wilt caused by *V. dahliae*. PhytoFrontiers, 1(4) :276-290.
- Rabeendran N, Jones EE, Moot DJ, Stewart A. 2006. Biocontrol of *Sclerotinia lettuce* drop by *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma hamatum*. Biological control, 39(3) :352-362.

- Rajani P, Rajasekaran C, Vasanthakumari MM, Olsson SB, Ravikanth G, Shaanker RU. 2021. Inhibition of plant pathogenic fungi by endophytic *Trichoderma* spp. through mycoparasitism and volatile organic compounds. *Microbiological research*, 242 :126595.
- Ramírez CA, Kloepper JW. 2011. Rhizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. En: Hoyos Carabajal, LM. *Enfermedades de plantas: Control biológico*. ECOE ediciones, :32 p.
- Rattalino DL, Otero ML, Moriconi DN, Rivera PC. 2021. Mejora de la detección del patotipo no defoliante de *Verticillium dahliae* en olivo mediante PCR anidada. *Agriscientia*, 38 :79-91. En: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1668-298X2021000100111&script=sci_arttext
- Reghmit A, Benzina tihar F, López Escudero FJ, Halouane Sahir F, Oukali Z, Bensmail S, Ghozali N. 2021. *Trichoderma* spp. isolates from the rhizosphere of healthy olive trees in northern Algeria and their biocontrol potentials against the olive wilt pathogen, *Verticillium dahliae*. *Organic Agriculture*, 11 :639-657.
- Rey M, Delgado Jarana J, Rincón AM, Limón C, Benítez T. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. *Rev. Iberoam. Micol.*, 17 :31-36.
- Rivera Méndez W, Meneses Montero K, Zúniga Vega C, Brenes Madriz JA. 2016. Antagonismo de *Trichoderma* sp. ante el patógeno *Stromatinia cepivora* en el cultivo de cebolla. *Revista tecnología en marcha*, 29 :22-30. En: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0379-39822016000700022
- Roca de Esteva MEM. 2015. Revisión de antecedentes, presencia, incidencia, severidad, frecuencia de agentes asociados y mermas de rendimiento para “rama seca” del olivo en la provincia de La Rioja. Tesis de maestría en: *Protección Vegetal*. Buenos Aires. Universidad Nacional de La Plata.
- Rodríguez Castro A, Torres Herrera S, Domínguez Calleros A, Romero García A, Silva Flores M. 2020. Extractos vegetales para el control de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*, una alternativa sostenible para la agricultura. *Abanico Agroforestal*, 2 :1-13. En:

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico/index.php/abanico-agroforestal/article/view/265/506>

- Rodríguez Limach VJ. 2011. Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofíticos contra *Rhizotocnia solani* un fitopatógeno causante de Damping off en plantas de tomate. Tesis de maestría en Microbiología. Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Rodríguez Navarro E. 2006. Estudio epidemiológico de la verticilosis del olivo (*Verticillium dahliae* [Klheb 1913]) en la provincia de Granada. Tesis doctoral. Granada. Universidad de Granada.
- Ruano Rosa D, Valverde Corredor A, Gómez Lama Cabanás C, Sesmero Carrasco R, Mercado Blanco J. 2015. Caracterización de nuevos agentes de control biológico bacterianos efectivos frente a *Verticillium dahliae* y otros patógenos de interés en el olivar. XII Simposio científico-técnico expoliva © fundación del olivar, :6 – 8 de mayo, Jaén, :1-6.
- Ruiz Heredia L. 2014. Diferenciación patogénica de *Verticillium dahliae* en diferentes cultivos. Trabajo de grado. Universidad de Jaén.
- Ruiz Olmos CA, Boix Ruiz A, Marín Guirao JI, García Rodríguez C, Gómez Tenorio MA, De Cara García M, Palmero Llamas D, Díaz Pérez M, Camacho Ferre F, Tello Marquina JC. 2012. Evaluación de la patogenicidad de *Verticillium dahliae* en diversas especies hortícolas y su implicación en la búsqueda de resistencia genética en pimiento. X Congreso SAE y VI Encuentro Iberoamericano de Agroecología. Albacete. 26 – 29 de septiembre 2012. :372 p.
- Ruiz Sánchez M, Echeverría Hernández A, Muñoz Hernández Y., Martínez Robaina AY, Cruz Triana A. 2022. Aplicación de dos cepas de *Trichoderma asperellum* S. como estimulante de crecimiento en el cultivo del arroz. Cultivos Tropicales, 43(1) :10 p.
- Ryley M, Gulya T, Mathew F, Thompson S, Block C, Markell S, Harveson R. 2021. Sunflower wilt diseases: Charcoal roat, Phialophora yellow, and *Verticillim* wilt. Plant health progress, 22(1) :75-85.
- Samaniego Fernández LM, Maimouna Harouna M, Corbea O, Rondón Castillo AJ, Placeres Espinosa I. 2018. Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. antagonistas de patógenos del suelo. Revista de Protección Vegetal, 33(3).

- San Segundo B. 2011. Aplicaciones biotecnológicas para mejorar la resistencia a plagas y enfermedades. *Biotecnología aplicada a la Agricultura*, :79.
- Sánchez Hernández L, Arias Mota RM, Rosique Gil JE, Pacheco Figueroa CJ. 2018. Diversidad del género *Trichoderma* (*Hypocraceae*) en un Área Natural Protegida en Tabasco, México. *Acta botánica mexicana*, 123 :167-182.
- Sánchez Pérez MI. 2009. Aislamiento y caracterización molecular y agronómica de *Trichoderma* spp. nativos del norte de Tamaulipas. Tesis de maestría. México. Instituto politécnico nacional. Centro de biotecnología genómica.
- Santamarina MP, Rosello J. 2006. Influence of temperature and water activity on the antagonism of *Trichoderma harzianum* to *Verticillium* and *Rhizoctonia*. *Crop protection*, 25(10) :1130-1134.
- Santos Rufo A. 2017. El riego en relación a la Verticilosis del olivo: manejo del agua de riego para reducir de manera integrada la enfermedad. Tesis doctoral. Córdoba. Universidad Nacional de Córdoba.
- Sarasola A, Rocca M. 1975. Fitopatología. Curso moderno. Tomo IV. Fisiogénicas – Práctica en Fitopatología. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires. :191-192.
- Shabani MH, Naraghi L, Maleki M, Negahban, M. 2022. Evaluation of the efficacy of different concentrations of nano-capsules containing *Talaromyces flavus* with two forms of powder and suspension in reducing the incidence of cotton *Verticillium* wilt. *Brazilian Journal of Biology*, :84 p.
- Sood M, Kapoor D, Kumar V, Sheteiwy MS, Ramakrishnan, M, Landi M, Sharma A. 2020. *Trichoderma*: The “secrets” of a multitalented biocontrol agent. *Plants*. 9(6) :762 p.
- Sosa Rodríguez T, Sánchez Nieves J, Morales Gutiérrez E, Cruz Cortés F. 2006. Interacción micorrizas arbusculares *Trichoderma harzianum* (Moniliaceae) y efectos sobre el crecimiento de *Brachiaria decumbens* (Poaceae). *Acta biológica colombiana*, 11(1) :43-54.
- TariqJaveed M, Farooq T, Al Hazmi AS, Hussain MD, Rehman AU. 2021. Role of *Trichoderma* as a biocontrol agent (BCA) of phytoparasitic nematodes and plant growth inducer. *Journal of Invertebrate Pathology*, 183 :107626 p.
- Trapero C, Serrano N, Arquero O, del Río C Trapero A, López-Escudero FJ. 2013. Evaluación de la resistencia de cultivares de olivo a *Verticillium dahliae* en suelos

infestados por el patógeno. VII Congreso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Hortícolas. Madrid, España. 26 – 29 de agosto de 2012. Madrid. :1087-1092.

Tavera Zavala DD, Hernández Escareño JJ, Ulibarri G, Sánchez Yáñez J M. 2017. Inoculation of *Trichoderma harzianum* on *Zea mays* its effect on the addition of nitrogen fertilizer at 50%. Journal of the Selva Andina Research Society, 8(2) :115-123.

Tawil MZ, Halak HA, Abdin MM. 1991. Introducción a la lucha contra el *Verticillium dahliae* del olivo. Olivae, 39 :36-40.

Torres E, Iannacone J, Gómez H. 2008. Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. Bragantia, Campinas, 67(1) :169-178.

Umaña Castro J, Orozco Cayasso S, Umaña Castro R, Molina Bravo R. 2019. Identificación molecular y características fisiológicas de aislamientos de *Trichoderma* para el biocontrol de dos patógenos en la piña. Revista de Ciencias Ambientales, 53(1) :125-142.

UNAM Ciencia. Dirección General de Divulgación de la Ciencia de la UNAM Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 2023. En: <https://ciencia.unam.mx/leer/943/bienvenido-2020-ano-internacional-de-la-sanidad-vegetal-por-la-salud-de-las-plantas>
<https://ciencia.unam.mx/leer/1264/el-arsenal-de-las-plantas-para-la-batalla-contrael-estres-ambiental>

Valdés Ríos EL. 2014. Caracteres principales, ventajas y beneficios agrícolas que aporta el uso de *Trichoderma* como control biológico. Revista Agroecosistemas, 2(1): 254 - 264.

Valencia Albello JC, Castro Caicedo BL. 2004. Aspectos biológicos de aislamientos de *Trichoderma sp.* antagonicos de Rosellinabudones. Cenicafe, 55(1) :16-28.

Valiño E, Elías A, Carrasco T, Albelo N. 2003. Efecto de inoculación de la cepa *Trichoderma viride* 137 en el bagazo de caña de azúcar autofermentado. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 37 (1):43 - 49.

- Vargas Gil, S; Benintende, S; Toresani, S 2017. 2da Ed. Microbiología General. En: Metodología de muestreo de suelo y ensayos a campo. Protocolos básicos comunes. Ed.: Santos, D. J.; Wilson, M. G. y Ostinelli, M.M. Ediciones INTA, :94- 99.
- Verna LC, Herrero FJ. 1952. Micología. Morfología, biología, experimentación. El Ateneo. Buenos Aires, :209-210.
- Vero S. 2006 a. Antagonistas microbianos como agentes de biocontrol. En: Mondino P, Vero S. Control Biológico de patógenos en plantas. Editor: Uriarte G. :27-47. En: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/20224>.
- Vero S. 2006 b. Mecanismos de biocontrol. En: Mondino P, Vero S. Control Biológico de patógenos en plantas. Editor: Uriarte G. :49-74. En: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/20224>.
- Vicente LP, Fundora JA, Miranda MP, de la Parte EM, Figueroa MP. 2011. Eficacia del benomyl y el fludioxonil para el control de *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold y *V. dahliae* Klebahn en semillas de vegetales. Fitosanidad, 15(2) :107-115.
- Villarreal Delgado MF, Villa Rodríguez ED, Cira Chávez LA, Estrada Alvarado MI. 2018. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. Revista Mexicana de Fitopatología, 36(1) :95-130.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti E, Marra R, Woo S, Lorito A. 2008. *Trichoderma* plant pathogen interactions. Soil Biology & Biochemistry, 40 :1-10.
- Wisniewski M, Wilson C, Droby S, Chalutz E, El Ghaouth A, Stevens C. 2007. Postharvest biocontrol: new concepts and applications. In Biological control: A global perspective, 29 :262-273.
- Zin NA, Badaluddin NA. 2020. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. Annals of Agricultural Sciences, 65(2) :168-178.
- Zhou C, Guo R, Ji S, Fan H, Wang J, Wang Y, Liu Z. 2020. Isolation of *Trichoderma* from forestry model base and the antifungal properties of isolate TpsT17 toward *Fusarium oxysporum*. Microbiological research, 231 :126371p.
- Zubieta Coronado DA, Echeverry Prieto LC, Zafra Mejía C. A. 2021. Antagonismo *in vitro* por consorcios de *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp. contra el fitopatógeno

Sclerotinia sp. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 19(1)
:16-31.

VII. ANEXO

Tabla 30: Muestreo de material vegetal para el aislamiento de *V. dahliae* en las provincias de Catamarca y La Rioja.

N° de Fincas	Cantidad de Muestras	Procedencia	Dpto.	Provincia	Variedad de planta
1	3	Orellana	Pomán	Catamarca	Arauco
2	4	Indalo	Pomán	Catamarca	Manzanilla - Manzanilla Sevillana - Picual
3	1	La Angelica	Aimogasta	La Rioja	Arauco
4	2	Rosario	Pomán	Catamarca	Manzanilla
5	4	Sr. Cano	Tinogasta	Catamarca	Arauco
6	5	Compañía del Valle	Valle Central	Catamarca	Manzanilla - Picual
7	20	Huaycama	Capayán	Catamarca	Picual - Misión
8	3	Complejo Mediterraneo	Valle Central	Catamarca	Picual
9	3	Gorostiaga	Pomán	Catamarca	Manzanilla - Picual
10	46	Acosta	Valle Central	Catamarca	Arauco
11	47	La esperanza	Aimogasta	La Rioja	Arauco
12	7	Machigasta	Arauco	La Rioja	Arauco - Picual
13	4	Colonia del Valle	Capayán	Catamarca	Arbequina - Manzanilla - Picual
14	2	Machigasta	Arauco	La Rioja	Arauco
15	2	B° Talacam - Aimogasta	Arauco	La Rioja	Arauco
16	1	Aimogasta	Arauco	La Rioja	Picual
17	2	Aimogasta	Arauco	La Rioja	Manzanilla fina
18	1	Aimogasta	Arauco	La Rioja	Manzanillam fina
19	1	B° Centro Aimogasta	Arauco	La Rioja	Arauco
20	1	Aimogasta	Arauco	La Rioja	Arauco
21	1	Valle Central	Valle Central	Catamarca	Picual - Barnea - Arbequina
22	3	Finca Guaja	Arauco	La Rioja	Manzanilla
23	3	Olivos Argentinos	Aimogasta	La Rioja	Barnea
24	2	Sumalao	Valle Viejo	Catamarca	Picual
25	4	El Portezuelo	Valle Viejo	Catamarca	Frantoio - Picual

Tabla 31: Muestreo de suelos para el aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma*, de la prov. de Catamarca.

N° de Muestras	Denominación	Procedencia	cultivo / sin cultivo	Ecoregión
1	Nogal INTA	Valle Viejo	nogal	Chaco Arido
2	M5	Colonia del Valle	Eucaliptus - (Calle 3)	Chaco Arido
3	M2	Colonia del Valle	Olivo (Calle 3)	Chaco Arido
4	M11	Colonia del Valle	Monte (Calle 4)	Chaco Arido
5	M6	El Rodeo - Ambato	Membrillo	Yungas
6	M1	El Rodeo - Ambato	nogal	Yungas
7	M10	Polcos - Valle Viejo	Alfalfar	Chaco Arido
8	M3	Pomancillo - Fray Mamerto Esquiú	Hortalizas	Chaco Arido
9	M8	Sumalao - Valle Viejo	alfalfar	Chaco Arido
10	M4	Pomán	Olivo Arauco	Chaco Arido
11	M12	Huillapima - Capayán	Olivo	Chaco Arido
12	M13	Coneta - Capayán	Mandarina	Chaco Arido
13	M14	Coneta - Capayán	Alamo - Acequia	Chaco Arido
14	M 15	Coneta - Capayán	Alfalfa	Chaco Arido
15	M16	Coneta - Capayán	Cañaberal (quinta)	Chaco Arido
16	M 17	Huillapima - Capayán	Rosas	Chaco Arido
17	M18	Huillapima - Capayán	Represa	Chaco Arido
18	M 19	Huillapima - capayán	Monte Natural	Chaco Arido
19	M 20	Las Juntas - Ambato	Lote con vegetación herbacea (90%) y arbustiva (10%)- Lomada	Yungas
20	M 22	Mutquin - Pomán	Nogales	Yungas
21	M 23	Chañarito - Cpayán	comino	Chaco Arido
22	M24	Paclín	natural	Selva montana y pedemontana
23	M25	Paclín	cencrus	Yungas
24	M26	Paclín	nogal	Yungas
25	M27	Santa Maria	pimenton	Monte
26	M28	Santa Maria	pimenton	Monte
27	M29	Santa Maria	pimenton	Monte
28	M30	Tinogasta	Cultivo de Vid - muestra cerca de la bodega de Longo-	Prepuna
29	M31	Tinogasta	s/ cultivo	Prepuna
30	M32	Tinogasta	Olivo	Prepuna
31	M33	Tinogasta	Vid	Prepuna
32	M34	Tinogasta	s/ cultivo	Prepuna
33	M35	El Rodeo	Suelo cubierto con grama	Yungas
34	M36	El Rodeo	cipreces	Yungas
35	M37	El Rodeo	nogales	Yungas
36	M38	El Rodeo	Nogales	Yungas
37	M39	Las Esquinas - Valle Viejo	cencrus	Chaco Arido
38	M40	RN 60	orilla del camino - salinas	Chaco Arido
39	M41	Nueva Coneta - Capayan	Citrus	Chaco Arido
40	Trich53	Santa Maria	pimiento para pimenton	Monte
41	M54	Santa Maria	pimiento para pimenton	Monte
42	AC1	San Antonio - Fray M. Esquiú	Alfalfa	Chaco Arido
43	AC2	San Antonio - Fray M. Esquiú	alfalfa	Chaco Arido
44	AC3	San Antonio - Fray M. Esquiú	Acosta Guido	Chaco Arido
45	AC3	San Antonio - Fray M. Esquiú	alfalfa	Chaco Arido
46	VL1	Tres Puentes - Valle Viejo	flores	Chaco Arido
47	FN Poman	Poman	Olivos	Chaco Arido
48	TP	Valle Central	Topinambur	Chaco Arido
49	LB Haba	Santa Maria	L. B. Haba	Chaco Arido
50	yacon	Fray Mamerto Esquiú	Yacon	Chaco Arido
51	SN1	La Puerta - Ambato	nogales	Yungas
52	SN2	La Puerta - Ambato	sin cultivo	Yungas
53	MZ	Pomancillo - Fray Mamerto Esquiú	Hortalizas	Chaco Arido
54	LT2	Las Juntas	nogales	Yungas
55	A203	Arphi - Valle Viejo	olivo	Chaco Arido
56	TP 2	El Alto	sorgo	Chaco Semiárido
57	MZ	Capayan	sin cultivo	Chaco Arido
58	LT	Paclín	sin cultivo	Yungas

Tabla 32: Análisis químico para determinar pH, conductividad eléctrica, materia orgánica, N, F y K, de orujos de vid (*Vitis vinífera*) tinta y blanca.

Descripción	Vid Tinta	Vid Blanca	Valores adecuados
Muestra N°	1	2	
pH (1:2,5 en Agua)	4,3	4,0	7,0 - 8,0
Cond. Eléctrica (dS/m)	6,67	5,98	
Nitrógeno (%)	1,53	1,48	1,5 - 1,8
Fosforo (%)	0,27	0,31	0,8 - 1,0
Potasio (%)	2,89	2,20	> 1,0
Materia Orgánica (%)	70	71	35- 40
Carbono Orgánico (%)	41,2	41,9	
Cenizas (%)	30	29	
C/N			16 – 20

Metodología:

pH: potenciometría. En suspensión de suelo agua en relación (1:2,5).

Conductividad eléctrica por potenciometría en el extracto de saturación.

Materia orgánica: Calcinación, por diferencia total de cenizas.

Nitrógeno: Digestión húmeda por el método microKjeldahl.

Fósforo y Potasio por digestión húmeda perclórica y lectura de fosforo en espectrofotómetro y potasio en fotometría de llama.

Tabla 33: Análisis de actividad biológica de orujos de vid (*Vitis vinífera*) tinta y blanca.

<i>Muestra</i>	<i>Absorvancia</i>	<i>Absorbancia media</i>	<i>Actividad biológica</i>
Uva tinta a	0,163	0,1734	Baja
Uva tinta b		0,174	
Uva tinta c		0,178	
Uva tinta d		0,177	
Uva tinta e		0,175	
Uva blanca a	0,457	0,4638	Moderada a baja
Uva blanca b		0,472	
Uva blanca c		0,458	
Uva blanca d		0,473	
Uva blanca e		0,459	

Método: Determinación de la actividad biológica por el método de hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA) (Schnürer and Roswall, 1982):

Fundamento: Metodología usada para evaluar la actividad microbiana. El Diacetato de Fluoresceína (FDA) es un compuesto susceptible de ser hidrolizado por varias enzimas (estearasas, lipasas y proteasas) de las células vivas. La fluoresceína permanece en la célula causando fluorescencia intracelular que puede ser visualizada por microscopía de fluorescencia y/o cuantificada por espectrofotometría.

