

Evaluación de la capacidad antagónica de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Verticillium dahliae* en la provincia de Catamarca

González Basso, M.V.¹; Picón, M.C.²; Ribero, G.³ & Bellone, C.⁴

RESUMEN

Se evaluó la capacidad antagónica de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Verticillium dahliae* en diferentes condiciones de cultivo e incubación. Se realizó el aislamiento e identificación molecular de cepas nativas antagónicas y del fitopatógeno. Los mismos fueron evaluados en dos ensayos *in vitro*, empleando medio de cultivo ADP en dos condiciones de pH e incubados bajo dos condiciones de iluminación. Mediante técnicas de cultivo dual se efectuó un ensayo con diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 2 x 2 x 2, y de microcultivos. Se evaluó la capacidad antagonista de dos cepas nativas de *Trichoderma*, TT (*T. hamatum*) y M5A (*T. hamatum*) sobre la cepa del fitopatógeno nativo (*Verticillium dahliae*). Los resultados obtenidos demostraron que la cepa TT a pH 6.5 con 16 h luz/8 h oscuridad tuvo el menor Tiempo de Contacto y mayor Porcentaje de Inhibición de Crecimiento con 8 h de luz/16 h. de oscuridad. En ambos ensayos y tratamientos se obtuvo Clase 1, siendo ambas eficientes en la competencia por sustrato y espacio. Se observó que la cepa nativa M5A y la cepa patrón TT parasitan al fitopatógeno. Por lo que se concluye que la cepa TT presenta mayores atributos de antagonismo frente al fitopatógeno *V. dahliae*, en condiciones de 8 h luz/ 16 h oscuridad.

Palabras clave: biocontrol, parasitismo, orujo de vid, fotoperiodo, pH.

1.- Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Catamarca. Avda. Belgrano y Maestro Quiroga. (4700) Catamarca, Argentina. Emails: valegb82@hotmail.com; valegb82@gmail.com

2.Facultad de Ciencias Naturales e IML. Universidad Nacional de Tucumán. Miguel Lillo 205. San Miguel de Tucumán (4000), Tucumán, Argentina.

3. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Litoral. Kreder 2805. (3080) Esperanza, Santa Fe, Argentina.

4. Laboratorio San Pablo. San Pablo, (4129) Tucumán, Argentina.

Manuscrito recibido el 3 de junio de 2020 y aceptado para su publicación el 4 de marzo de 2021.

ABSTRACT

Evaluation of the antagonistic capacity of native strains of *Trichoderma* spp. in front of *Verticillium dahliae* in the province of Catamarca.

The antagonistic capacity of native strains of *Trichoderma* spp. against *Verticillium dahliae*, under different culture and incubation conditions. The isolation and molecular identification of antagonistic native strains and the phytopathogen were carried out. They were evaluated in two *in vitro* tests, using ADP culture medium in two pH conditions and incubated under two lighting conditions. By means of dual culture techniques, a trial was carried out with a completely randomized design with a 2 x 2 x 2 factorial arrangement, and microcultures. The antagonistic capacity of two native strains of *Trichoderma*, TT (*T. hamatum*) and M5A (*T. hamatum*) on the native phytopathogen strain (*Verticillium dahliae*) was evaluated. The results obtained showed that the TT strain at pH 6.5 with 16 h light / 8 h Darkness had the shortest Contact Time and the highest Growth Inhibition Percentage with 8 h of light /16 h. of darkness. Class 1 was obtained in both tests and treatments, both being efficient in the competition for substrate and space. It was observed that the native strain M5A and the standard strain TT, parasitize the phytopathogen. Therefore, it is concluded that the TT strain has greater antagonistic attributes against the phytopathogen *V. dahliae*, under conditions of 8 h light / 16 h dark.

Key words: biocontrol, parasitism, grape marc, photoperiod, pH.

INTRODUCCIÓN

El hongo fitopatógeno *Verticillium dahliae* Kleb ocasiona la marchitez del olivo (*Olea europea* L.), enfermedad que causa graves daños al cultivo, pudiendo llegar a producir defoliación, muerte de ramas y plantas (14; 25; 3). Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en todas las regiones productoras de olivo a nivel mundial (26; 24) ocasionando considerables pérdidas económicas (19). Este hongo de suelo causa graves daños en el cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*) (6) como así también en especies frutales, forestales, hortícolas y en malezas, produciendo marchitez localizada (14). Las malezas tienen un papel epidemiológico considerable, pueden actuar como reservorio de inóculo del hongo, manteniendo o aumentando el nivel

en el suelo y contribuyendo a la dispersión del patógeno (14). *V. dahliae* crece en oscuridad, a pH neutros a alcalinos (pH 6–9) (14) se desarrolla y coloniza el xilema de plantas, produciendo micelio y conidios que son trasladados por la corriente transpiratoria, la que facilita el crecimiento fúngico aéreo (8). El hongo posee estructuras vegetativas de supervivencia (microesclerocios) que se producen en plantas senescente o tejidos muertos (24) pudiendo persistir en el suelo aproximadamente 15 años (8; 14; 15), permitiendo la dispersión y epidemiología (26). El largo periodo de supervivencia de los microesclerocios, el amplio rango de hospedantes que posee y el crecimiento parasítico en el xilema, obstaculiza la accesibilidad de productos químicos, lo que dificulta su control (13). Si bien la aplicación de productos químicos es la manera tradi-

cional para el control de enfermedades en cultivos (11), ha sido cuestionada por los efectos que genera sobre el ambiente, la salud humana y la resistencia que desarrollan los microorganismos. Por lo que es necesaria la búsqueda de alternativas que sean eficientes y amigables con el ambiente (4; 11). El Control Biológico (C.B.) es sostenible, inocuo con el medio ambiente y compatible con otras herramientas para realizar un sistema integrado de manejo de enfermedades (14). El éxito de la estrategia depende de un equilibrio complejo de interacciones entre el patógeno, la planta huésped, el antagonista y el medio ambiente (14). Teniendo presente lo mencionado por Ezziyyani *et al.* (7), una de las condiciones del C.B. es que deben utilizar microorganismos antagónicos específicos contra el patógeno y que no ocasionen daño a la planta cultivada.

El hongo filamentoso *Trichoderma* es uno de los más utilizados como antagonista de fitopatógenos (29), ya que cuenta con múltiples mecanismos como la competencia por nutrientes y espacio, antibiosis y micoparasitismo, pudiendo también promover el crecimiento de las plantas y la activación de las respuestas de defensa de éstas (11; 23). Otra característica importante que presenta *Trichoderma*, es que posee fácil y rápido crecimiento y reproducción, en diferentes medios de cultivos (18) y sustratos, con rango de pH de 5.5 a 8.5 (18). Es viable su desarrollo en diversos medios artificiales: líquido, sólidos o semisólido, pudiéndose utilizar residuos agroindustriales, como por ejemplo granos de cereales y arroz; siendo este último el más utilizado para la producción de *Trichoderma* spp. a partir de procesos de fermentación artesanal e industrial (1).

Diversos estudios han demostrado que

Trichoderma es un antagonista efectivo contra hongos fitopatógenos (21), ya que limitan el desarrollo de hongos dañinos como *Rhizoctonia solani*; *Fusarium oxysporum* y *V. dahliae* (11; 23).

El objetivo del presente trabajo es evaluar *in vitro* la capacidad antagónica de cepas nativas, de *Trichoderma* spp. frente al fitopatógeno *V. dahliae*, en diferentes condiciones de incubación del cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo y aislamiento del fitopatógeno:

Se tomaron muestras de ramillas con síntomas característicos de Verticilosis, de una plantación de olivo, en el Dpto. Capayán, provincia de Catamarca (28°28'00 S; 65°47'00 O). Las muestras fueron recolectadas siguiendo el protocolo sugerido por González Vera *et al.* (10) y luego fueron conservadas a 6°C. Posteriormente se realizó el aislamiento de *V. dahliae* siguiendo la metodología sugerida por Roca (22). Se cortaron las ramitas de entre 20 a 30 cm., retirando las hojas, posteriormente se lavó fuertemente con esponja y detergente diluido y enjuagó. Luego se desinfectó con hipoclorito de sodio 2 %, durante 2 min. Se enjuagó bajo el chorro del grifo por 45 – 60 min. Se continuó en cámara de flujo laminar con el descortezamiento superficial de las ramitas, realizado con bisturí. Se cortaron segmentos de material vegetal (cortex - xilema) de 5 cm., que fueron desinfectados con hipoclorito de sodio 1 %, por 15 s, enjuagados en agua destilada estéril y secados sobre papel tipo tissue estéril. Se continuó con la siembra de 5 a 6 trozos del material vegetal por placas de Petri con agar dextrosa papa

(ADP) estéril e incubadas en oscuridad a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (26; 24) durante 14 días.

Aislamiento de antagonistas: En los meses de septiembre, octubre y abril, se tomaron muestras de suelo y georreferenciaron 58 sitios diferentes (cultivados y no cultivados) de la provincia de Catamarca, siguiendo la metodología planteada por Vargas Gil *et al.* (28). Las muestras fueron acondicionadas y llevadas al laboratorio de fitopatología de la Facultad de Cs. Agrarias (UNCa.), donde fueron procesadas y luego utilizadas como inóculo en el sustrato.

Preparación del sustrato y siembra de suelo: Los sustratos empleados fueron orujos de vid tinta y blanca; se hidrataron durante 24 h, posteriormente se los escurrió y colocó en frascos de vidrio de 400 ml., completando el volumen de estos en un 75 %. Los frascos se taparon con papel de aluminio y se esterilizaron en autoclave con vapor saturado a presión a 1 atm., 121°C durante 20 min. (1). Cada muestra de suelo fue sembrada por triplicado, en cámara de flujo laminar, espolvoreando 20 g de suelo sobre el sustrato estéril. Posteriormente se tapó con el papel de aluminio y agitó, llevando a incubación con fotoperíodo de 16 h de luz y $26 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 7 a 10 días. Se realizaron observaciones periódicas hasta la aparición de colonias típicas de *Trichoderma*, se corroboraron las características de estas con ayuda de microscopio estereoscópico Olympus SZ 11 - CTV y posteriormente se confirmó la presencia de conidios y micelio característicos del género mediante la observación con microscopio óptico Olympus BH-2 a 40 X de aumento (9). Los frascos que presentaron contaminación fueron desechados, quedando seleccionados aquellos que presentaron solo colonias características de *Trichoderma*.

Aislamiento y conservación de cepas de *Trichoderma spp.*: Se tomó el inóculo contenido en el orujo y se realizaron aislamientos por agotamiento en superficie con siembras en estrías en medio de cultivo ADP y se incubó con fotoperíodo de 16 h de luz/ 8 h de oscuridad, a $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Las cepas aisladas fueron identificadas morfológicamente a nivel de género por medio de microscopio óptico, con aumento 40 X. Luego fueron conservadas en tubos de ensayo pico de flauta con ADP a 5°C .

Identificación Molecular: Las cepas nativas con potencialidad antagonista y el fitopatógeno se enviaron al laboratorio Macrogen – Corea donde se realizó la extracción del material genético. Y 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' (11; 20; 29). Para la secuenciación se utilizó el kit: Big Dye terminator cycle sequencing Kit v 3.1. Y 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. Las muestras secuenciadas para cada cepa fueron identificadas 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).

Preparación de cultivos madre: Los cultivos se realizaron en placas de Petri con cuatro cepas de *Trichoderma* spp. y el fitopatógeno *V. dahliae*. Se seleccionaron dos cepas de *Trichoderma* spp. que presentaron mejores características para evaluar la capacidad antagonica contra el fitopatógeno *V. dahliae*. Se prepararon cultivos madres de las cepas en placas de Petri con ADP estéril, se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con fotoperíodo de 16 h de luz para las cepas de *Trichoderma* spp. y en oscuridad para *V. dahliae*, durante cinco días para las primeras y de 12 días para *V. dahliae*.

Ensayo de cultivo dual – (Bioensayo N° 1): Este ensayo se realizó en dos oportunidades, replicado en idénticas condiciones, con cinco repeticiones cada uno. Se efectuó un ensayo con un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial $3 \times 2 \times 2$, un factor de tres cepas, el fitopatógeno y dos cepas antagonistas (M5A y TT), un segundo factor de dos pH distintos de 6.5 y 4,1 (acidificado con ác. láctico) y el tercer factor de 8 y 16 h. de luz. Los ensayos duales se prepararon en placas de Petri con ADP estéril, con dos pH de 6.5 y de 4.1 y se enfrentaron las cepas con potencialidad antagonista, contenidas en disco de ADP de 5 mm de diámetro con el fitopatógeno *V. dahliae*. Cada tratamiento conto con un testigo que consistió en un disco de ADP de 5 mm de diámetro del fitopatógeno. Posteriormente se incubó en condiciones controladas con fotoperiodos de 8 h de luz/16 h de oscuridad y otro de 16 h de luz/8 h de oscuridad (T1 y T2 respectivamente) a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante cinco días. La acción antagonica se evaluó diariamente, mediante tres parámetros:

1) Tiempo de Contacto (T.C.) 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 Bell *et al.* (2), citado por Martínez *et al.* (18).

3) Porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) determinado con el crecimiento radial del fitopatógeno, $\text{PIC} = [(C1 - C2) / C1] \times 100$; siendo C1: el crecimiento radial del fitopatógeno, testigo y C2: el crecimiento radial del fitopatógeno, en el cultivo dual. Lo que define el efecto inhibitorio, tomando el porcentaje de inhibición del crecimiento calculado a los 5 días. El crecimiento diario (C1 y C2) se midió sobre la recta que marca los tres cm. de distancia entre ambos microorganismos. Según la técnica propuesta por Reyes Ramírez *et al.* (21).

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con el software estadístico Infostat (5).

Microcultivos – (Bioensayo N° 2): Se determinó la acción micoparasitica de las cepas antagonistas seleccionadas frente al fitopatógeno. Se efectuó un ensayo con un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial $2 \times 2 \times 2$, un factor de dos cepas antagonistas (M5A y TT), un segundo factor de dos pH diferentes de 6.5 y de 4,1 y el tercer factor de 8 y 16 h de luz. Los microcultivos se acondicionaron en cuatro placas de Petri de 15 cm en cámara húmeda. Posteriormente se incubó en condiciones controladas con temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y en las condiciones de iluminación establecidas. Se realizaron evaluaciones diarias para determinar el tipo de parasitismo que se presentaban mediante observaciones con microscopio óptico a un aumento de 40 X. Según la técnica de Martins Cordery y de Melo (17).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento del fitopatógeno: Se aisló *V. dahliae* de una planta de olivo, variedad Arauco (Tabla 1).

Aislamiento de antagonista: Se aislaron un total de 19 cepas de *Trichoderma* spp. Las que fueron observadas e identificadas con microscopio óptico (aumento 40 X). Mediante ensayos preliminares de crecimiento y actividad antagonista se seleccionaron las cepas M5A y TT para realizar los bioensayos, siendo la primera una cepa nativa y la

última una cepa patrón, procedente del cepario de la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Catamarca (FCA - UNCa).

Identificación Molecular: Se identificaron cinco cepas nativas con potencialidad antagonista pertenecientes al género *Trichoderma*, las especies *T. hamatum*, *T. asperellum* y *T. longibrachiatum*, de las que fueron seleccionadas solo dos por presentar mejores características; mientras que el fitopatógeno se identificó como *Verticillium dahliae* (Tabla 1). Las cepas muestran un alto por-

Tabla 1: Georeferencia de los aislamientos, Identificación Molecular y Número de Identificación (Genbank) de cepas nativas antagonistas y del fitopatógeno.

Table 1: Georeference of isolates, Molecular Identification and Identification Number (Genbank) of native antagonist strains and of the phytopathogen.

N°	Geo-referencia	Zonas: Cultivadas (C)/No Cultivadas (NC)	Denominación	Identificación Morfológica	Identificación Molecular	% Identificación NCBI	% Similitud con la Cepa Patrón	Número de Identificación (Genbank)
1	Cepa Patrón		TT	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>T. hamatum</i>	96%	100%	MW295636
2	28° 26'36,21" S - 65° 43'28,82" O - 527 m.s.n.m.	C	VL1	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>T. asperellum</i>	97%	87%	MW295648
3	28°38'52,09 S - 65°53'25,68" O - 465 m.s.n.m.	NC	M5A	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>T. hamatum</i>	94%	96%	MW228415
4	Cepa Patrón		Pa M3	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>T. asperellum</i>	96%	88%	MW295649
5	28°34'38,03" S - 65°54'05,35" O - 597 m.s.n.m.	C	M15C	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>T. longibrachiatum</i>	97%	69%	MW303918
6	28°28'00 S; 65°47'00 O - 341 m.s.n.m.		Vert	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	99%	68%	MW229266

centaje de identificación respecto a las bases de datos proporcionadas por el NCBI. Además, se puede observar la variación del porcentaje de similitud de las diferentes cepas con la cepa patrón.

Ensayo de cultivo dual (Bioensayo N°1):

Los resultados muestran que de acuerdo con el comportamiento presentado en condiciones de pH 6,5 e incubación de 16 h de luz/8 h de oscuridad la cepa *T. hamatum* (TT) obtuvo el mejor TC al tercer día; mientras que con fotoperíodo de 8 h de luz/16 h de oscuridad el TC fue un 5,6 % mayor que el fotoperíodo de 16 h. luz/8 h. oscuridad. En tanto *T. hamatum* (M5A) tuvo un comportamiento de aproximadamente 15 y 10 % superior que TT con fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad, en los respectivos fotoperíodos. En cuanto a PIC, la mayor inhibición la presentó TT con fotoperíodo de 8 h luz/16 h oscuridad, con un 35,33 %, siendo 10 % inferior con fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad; mientras que la cepa M5A fue menos eficiente en un 40 % y 24 % en los respectivos fotoperíodos, respecto a la cepa TT 8 h luz/16 h oscuridad. Por lo que en iguales condiciones de incubación ambas cepas tienen comportamientos dispares. Respecto a la variable Clase, evaluada en los diferentes fotoperíodos, se clasificó como Clase 1 al quinto día logrando sobrepasar al fitopatógeno, lo que determina gran competencia por nutrientes y espacio por parte de las cepas antagonistas, logrando crecer y desarrollarse sobre la colonia del patógeno y cubrir el total de la superficie del medio de cultivo. El crecimiento y desarrollo de las cepas de *Trichoderma* no se vieron afectadas por las horas de luz, similar a lo expresado por Valencia Abello y Castro Caicedo (27) quienes

no obtuvieron diferencia entre los valores de pH de 4.5 y 6, en la concentración de inóculo de *Trichoderma* (espóras/ml. g de arroz) y las horas de luz tampoco afectaron el crecimiento. Según los resultados obtenidos se evidenció mejor C.B. con la cepa TT, logrando mayor eficiencia que M5A, tanto en fotoperíodo de 16 y 8 horas de luz respectivamente, con pH de 6,5. Mientras que el pH de 4,1 se evidenció que no afecta el crecimiento de las cepas antagonistas evaluadas en coincidencia con Valencia Abello y Castro Caicedo (27); en *V. dahliae* crecimiento fue nulo. Es importante destacar que en el crecimiento del fitopatógeno no se observó presencia de coloración negruzca como indicio de presencia de microesclerocios. Por lo que a pH de 4,1 (con los dos fotoperíodos) la acción biocontroladora no pudo ser evaluada, caso contrario a lo planteado por Ezziyyani *et al.* (7) que en ensayo *in vitro* con *T. harzianum* frente a *Phytophthora capsici*, obtuvo mayor inhibición a pH ácidos. El pH es de vital importancia para el crecimiento de los vegetales, la disponibilidad de nutriente en el suelo y la actividad biológica. Por lo que regular el pH en el manejo del cultivo puede ser una estrategia para el manejo de las enfermedades causadas por *V. dahliae*, ya que el pH ácido (por debajo de 5.5) inhibe del crecimiento y la producción de microesclerocios y supervivencia. (14). De igual manera las condiciones de luz no afectan la actividad antagónica de *Trichoderma*, pero si regula la producción de conidios, siendo la oscuridad las condiciones óptimas para el crecimiento y desarrollo del patógeno (Tabla 2).

Tabla 2: Parámetros de antagonismo de *V. dahliae*, con fotoperiodos de 8 y 16 horas de luz y pH 6.5 del sustrato ADP.

Table 2: Antagonism parameters of *V. dahliae*, with photoperiods of 8 and 16 hours of light and pH 6.5 of the ADP substrate.

Fotoperiodo	Variables	Vert. + M5A	Vert. + TT
		pH 6.5	pH 6.5
8	TC	31,31 ± 1,40 A	3,17 ± 0,41 A
8	PIC	21,44 ± 33,18 A	35,33 ± 38,9 A
16	TC	3,44 ± 1,31 A	3 ± 0 A
16	PIC	26,94 ± 41,27 A	31,83 ± 35,41 A

Los resultados se expresan como la media ± su error estándar. Letras iguales, indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos, según el test de LSD ($p < 0.5$).

Microcultivos: El crecimiento y las interacciones antagónicas de las cepas TT (*T. hamatum*) y M5A (*T. hamatum*) variaron, según las condiciones de pH y fotoperiodos en el que se incubaron. La mejor interacción (crecimiento en paralelo, coilling, micoparasitismo y presencia de haustorios) la presentó la cepa M5A con pH 4.1 y fotoperíodo de 8 h de luz/16 h de oscuridad. Mientras que en ambos tratamientos de fotoperiodo con pH 6,5 para las dos cepas antagónicas, se observaron 3 tipos de interacciones específicas (crecimiento en paralelo, coilling, micoparasitismo) por lo que se percibe que las condiciones de incubación no son limitantes para el proceso micoparasítico de estos antagonistas (Tabla 3). En la Figura N° 1, se observa el parasitismo de la cepa TT en hifas de *V. dahliae*, fenómeno similar a lo encontrado en los otros tratamientos que se evaluaron.

Por los resultados observados se presume que las cepas en estudio tienen capacidad antagónica en las diferentes condiciones de incubación evaluadas (fotoperiodo y pH) y presentan actividad lítica frente a *V. dahliae* logrando micoparasitarlo.

En ambas cepas antagónicas se observó la colonización y producción de conidios sobre la colonia del fitopatógeno, por lo que se evidencia la capacidad de éstas para desarrollarse a expensas del contenido celular, sobre la cepa nativa de *V. dahliae* siendo eficientes controladores biológicos. Se estima que este proceso es coincidente con lo descrito por Infante *et al.* (12) y Maza *et al.* (16), quienes señalaron que las cepas antagonistas crecen quimiotrópicamente en dirección al fitopatógeno, coincidente con M5A y TT frente a *V. dahliae*, se produce un reconocimiento entre *Trichoderma* y *Verticillium* que al ser positivo las cepas de

Trichoderma prosiguieron con la adhesión de hifas y coiling (o enrollamiento) a las hifas de *V. dahliae*. Martins Corder y de Melo (17) encontraron similares acciones antagonicas entre las cepas de *Trichoderma* sp. y *V. dahliae*, por lo que suponen que la reproducción de conidios de *Trichoderma* sobre *V. dahliae* se debe a que ciertos fitopatógenos estimulan la reproducción de los antagonistas. También se considera que la

ausencia de microesclerocios de *V. dahliae*, puede deberse al desarrollo de conidios de TT sobre el fitopatógeno, con lo que el antagonista genera inhibición de la formación de estructuras de resistencia, como lo muestran Hernández Mendoza *et al.* (11). Sin embargo, a pH 4.1 y fotoperíodo de 16 h de luz/ 8 h de oscuridad, se observó la formación de verticilos y de conidios de *V. dahliae*.

Tabla 3: Interacciones parasíticas de las cepas.

Table 3: Parasitic interactions of the strains.

Cepa	Fotoperíodo	16 h	8 h
M5A	pH 6.5	CP – C – MP	C
	pH 4.1	C – MP	CP – C – MP – H
TT	pH 6.5	CP – C	CP – C – MP
	pH 4.1	MP – C	MP

Referencias: (CP) Crecimiento paralelo; (C) Coiling; (MP) Micoparasitismo; (H) Haustorios.

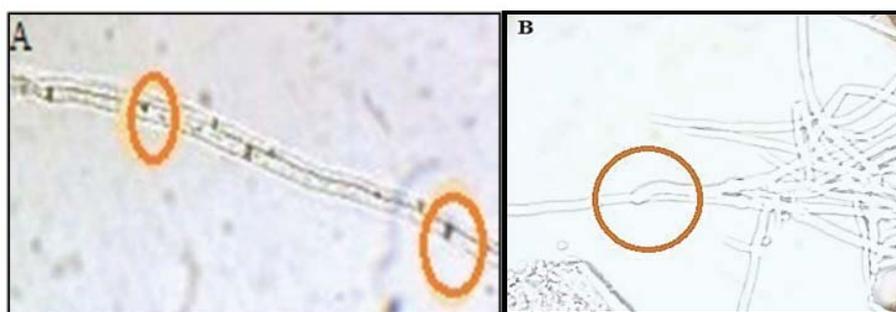


Figura 1: Microfotografías de *T. hamatum* (TT) con *V. dahliae* en A: se observa crecimiento en paralelo de ambas cepas y TT parasitando a *V. dahliae*, y en B: la cepa TT parasitando a *V. dahliae*.

Figure 1: Photomicrographs of *T. hamatum* (TT) with *V. dahliae* in A: parallel growth of both strain and TT is observed parasitizing *V. dahliae*, and in B: the TT strain parasitizing *V. dahliae*.

CONCLUSIÓN

Las cepas TT y M5A presentan capacidad antagonista frente a *V. dahliae* en condiciones de 8 h de luz / 16 h de oscuridad. Dicho fotoperíodo actúa como factor estimulante de la actividad antagonista característica deseable y de interés para la agricultura sustentable, ya que el patógeno tiene crecimiento en condiciones de oscuridad.

Las cepas M5A y TT seguirán siendo evaluadas con el objetivo de determinar su capacidad antagonista sobre plantines en invernáculo, con el propósito de evaluar su incorporación a un manejo integrado de enfermedades del olivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Allori Stazonelli, E.; Yasem de Romero, M. G. y Ploper, L. D. 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. <http://www.scielo.org.ar/pdf/ranar/v37n1/v37n1a06.pdf> Consultado el: 20/02/18.
- Bell D. K.; Wells H. D. y Markam C. R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. against six fungal pathogens. *Phytopathology.* 72: 379 - 382.
- 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. Universidad de Córdoba. <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/13800?show=full>, Consultada el 02/02/2020.
- Cupull Santana, R.; Rodríguez, C. M. A.; 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*, año 30, N° 1.
- 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. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Erdogan, O. y Benlioglu, K. 2010. Biological control of *Verticillium* wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions. *Biological Control* N° 53 : 39 - 45.
- Ezziyyani, M.; Requena, M. E.; Pérez-Sánchez, C. y Candela, M. E. 2005. Efecto del sustrato y la temperatura en el control biológico de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.). Murcia, España. *Anales de Biología* 27: 119 - 126.
- Gil, C. y Albarelos, M. 2011. Enfermedades del olivo - Descripción, síntomas y métodos de lucha del repílo, el emplomado, la seca y la tuberculosis. Cuaderno de Campo N° 46. : p. 29-33.
- González Basso, M. V.; Di Barbaro, G.; Rearte, N. y Bellone, C. 2018. Aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma* sp. en la provincia de Catamarca (R.A.) IV CAMYA (IV Congreso Argentino de Microbiología y Ambiental) y I MicroGen (I Jornada de Microbiología General). Mar del Plata, 11 al 13 de abril de 2018. En: <https://sites.google.com/view/camaya2018/programa/libro-de-res%C3%BAmenes>.

- González Vera, C.; Seleme, F.; Juri, C. M.; González Basso, V. y Díaz, Y. 2012. Verticilosis o Parálisis Parcial del Olivo *Verticillium dahliae* Kleb. Revista de Divulgación Técnica Agrícola y Agroindustrial. Facultad de Ciencias Agrarias – UNCa - Revista N° 17:1 - 4.
- 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.
- Infante, D.; Martínez, B.; González, N. y Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Rev. Protección Veg. Vol. 24 N° 1: 14- 21.
- Jiménez Díaz, R. M.; Rodríguez Jurado, D.; Navas Cortes, J. A.; Mercado Blanco, J. y Trapero Casas, J. L. 2003. Estrategias de control de la verticilosis del olivo. Vida Rural p.5.
- López Escudero, F. J. y 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 Escudero, F. J.; Roca, J. M.; Valverde Corredor, A. y Mercado Blanco, J. 2012. Correlation between virulence and morphological characteristics of microsclerotia of *Verticillium dahliae* isolates infecting olive. Journal Phytopathology 160:431–433.
- Maza, M.; Allori Stazonelli, E. y Yasem de Romero, M. G. 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.
- Martins - Corder, M. P. y de Melo, I. S. 1998. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. Scientia Agrícola Vol.55. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90161998000100002> - Consultado el: 30/01/2020.
- Martínez, B.; Infante, D. y Reyes, Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Rev. Protección Veg. Vol. 28 N°. 1: 1-11
- Michel Aceves, A. C.; Otero - Sánchez, M. A.; Ariza-Flores, R.; Barrios-Ayala, A. y Alarcón-Cruz, N. 2013. Eficiencia biológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en el control de *Sclerotium rolfsii* Sacc., en cacahuate. Avances en Investigación Agropecuaria 17(3): 89-107.
- Moya, P.; Barrera, V.; Cipollonea, J.; Bedoya, C.; Kohan, L.; Toledo, A. y 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 (2020) 104152 :p. 8 (Consulta octubre 2020) <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104152> .
- Reyes Ramírez, A.; Cristóbal Alejo, J.; Ruiz Sánchez, E. y Tun Suárez, J. M. 2012. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Fusarium* sp. aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis*) con hongos antagonistas. Fitosanidad 16(3) 161-165.
- Roca de Esteva, M. E. M. 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. Carrera de Magister Scientiae en Protección Vegetal - Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales – Universidad Nacional de La Plata.
- Sood, M.; Kapoor, D.; Kumar, V.; Sheteiw, M. S.; Ramakrishnan M.; Landi, M., Araniti, F. y Anket Sharma, A. 2020. *Trichoderma*: The “Secrets” of a Multitalented Biocontrol Agent. Plan 9, 762.
- 24.- Trapero, C.; Roca, L. F.; Alcantara, E. y López Escudero, F. J. 2011. Colonization of Olive Inflorescences by *Verticillium dahliae* and its Significance for Pathogen Spread. Journal Phytopathol 159:638 – 640.

M.V. González Basso *et al.*

- Trapero C.; Serrano, N.; Arquero, O.; del Río, C., Trapero, A. y López Escudero, F. J. 2013. Evaluación de la resistencia de cultivares de olivo a *Verticillium dahliae* en suelos infestados por el patógeno. Ref. N° C0333.
- Varo, A.; Raya - Ortega, M. C. y Trapero, A. 2016. Selection and evaluation of microorganisms for biocontrol of *Verticillium dahliae* in olive. *Journal of Applied Microbiology* 121, 767-777
- Valencia Abello, J. C. y Castro Caicedo, B. L. 2004. Aspectos Biológicos de Aislamientos de *Trichoderma* sp. Antagónicos a *Rosellina bunodes*. *Cenicafé*, 55 (1): 16-28.
- 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.
- Zhou, C.; Guo, R.; Ji, S.; Fan, H.; Wang, J.; Wang, Y. y Liu, Z. (2020) Isolation of *Trichoderma* from forestry model base and the antifungal properties of isolate TpsT17 toward *Fusarium oxysporum*. *Microbiological Research* 231.