

Manejo de hongos de suelo patógenos de Solanáceas ornamentales: Integración de prácticas sustentables

Tesis de doctorado presentada para optar por al título de Doctor de
la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

Ing. Agr. Nicolas Pablo Borrelli

Directora: Dra. Marta Carolina Rivera

Co Directores: Dra. Cecilia Mónaco y Dr. Eduardo Roberto Wright

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

2023

AGRADECIMIENTOS

A Marta y Eduardo por contagiarme su pasión, compartirme sus conocimientos con total humildad y cariño y haber confiado en mí para avanzar en este largo camino. Seguimos caminando juntos...

A Cecilia por su acompañamiento y aportes que hicieron posible este trabajo.

A Luci, quien incondicionalmente estuvo a mi lado para atravesar los momentos difíciles y para festejar cada logro.

A mi familia y amigos que siempre tuvieron las palabras justas para alentarme a transitar esta etapa.

A todos mis compañeros y compañeras del Instituto de Floricultura del INTA por su predisposición para tenderme una mano cuando la necesité y por compartirme sus saberes.

A Claudia, Romina, Marina y Darío del CEPAVE-CONICET por permitirme aprender de ustedes desinteresadamente. Gracias por brindarme su tiempo y todo su conocimiento.

A Ismael Malbrán por guiarme en el complejo mundo de la taxonomía de *Fusarium*.

A Sebastián Stenglein y Virginia Moreno por sus aportes en la identificación molecular de patógenos.

A María del Carmen Fabricio por su invaluable guía y aporte en el análisis estadístico de los datos.

Listado de publicaciones y actividades relacionadas con la tesis

Trabajos científicos en revistas con referato

Borrelli NP, Stancanelli S, Hagiwara JC, Rivera MC. 2018. Enfermedades foliares en *Calibrachoa hybrida*. Revista Agronómica del Noroeste Argentino. Suplemento 38(1): 61. ISSN 0080-2069.

Borrelli NP, Stancanelli S, Hagiwara JC, Rivera MC. 2018. Primer reporte de *Rhizoctonia solani* como patógeno de *Calibrachoa hybrida* en Buenos Aires. Revista Agronómica del Noroeste Argentino. Suplemento 38(1): 27.

Borrelli NP, Papone M, Moreno MV, Stenglein SA, Stancanelli S, Wright ER, Hagiwara JC, Rivera MC. 2020. First report of basal rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* on *Calibrachoa hybrida*. Plant Disease 104(12): 3254. DOI: 10.1094/PDIS-04-20-0767-PDN

Borrelli NP, Stancanelli S, Papone M, Moreno MV, Stenglein SA, Wright ER, Hagiwara JC, Rivera MC. 2020. Leaf spots of calibrachoa caused by *Nigrospora oryzae*. Ornamental Horticulture 26(4): 591-597. DOI: 10.1590/2447-536X.v26i4.2177

Borrelli NP, Moreno MV, Stenglein S, Stancanelli S, Wright ER, Rivera MC. 2022. *Ceratobasidium* sp. AG-A, root pathogen of *Calibrachoa hybrida*. Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences 38(2): 207-213. DOI: 10.29393/CHJAA38-20CANM60020

Presentaciones en congresos

Borrelli NP. 2018. Manejo de hongos de suelo patógenos de solanáceas ornamentales: Integración de prácticas sustentables. Resúmenes VIII Jornadas de Jóvenes Investigadores. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. P. 21. <http://www.fvet.uba.ar/archivos/investigacion/Libro-de-resumenes.pdf>

Borrelli NP, Stancanelli S, Hagiwara JC, Papone ML, Rivera MC. 2018. Enfermedades fúngicas de *Calibrachoa hybrida* en Buenos Aires. 3º Encuentro REVINA (Red de Viveros de Plantas Nativas). Universidad Nacional de Luján. Buenos Aires.

Borrelli NP, Stancanelli S, Hagiwara JC, Rivera MC. 2018. Manejo de hongos de suelo patógenos de calibrachoa: Integración de prácticas sustentables. Resúmenes 40º Congreso Argentino de Horticultura. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. P. 281. <file:///D:/Marta%20Rivera/Downloads/Res%C3%BAmenes%20de%20Otras%20Tem%C3%A1ticas%20-%20XL%20Congreso%20Argentino%20de%20Horticultura.pdf>

Borrelli NP, Papone ML, Stancanelli S, Silva SB, Hagiwara JC, Rivera MC. 2019. Necesidad de implementar principios agroecológicos en la producción florícola: investigación sobre manejo de hongos patógenos de Solanáceas ornamentales. Resúmenes Primer Congreso Argentino de Agroecología. Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. P. 798.

Borrelli NP, Cureses D, Calicanton SA, Stancanelli S, Hagiwara JC, Wright ER, Rivera MC. 2021. Respuesta de cultivares de calibrachoa a *Alternaria tenuissima* y *Nigrospora oryzae*. Resúmenes

5^{to} Congreso Argentino de Fitopatología y 59th Meeting of the APS Caribbean Division. Virtual. P. 379. https://inta.gob.ar/sites/default/files/libro_de_resumenes_5ocaf_2021.pdf

Borrelli NP, Hagiwara JC, Stancanelli S, Wright ER, Rivera MC. 2021. Interacción cepa-variedad para el patosistema *Fusarium oxysporum-Calibrachoa hybrida*. Resúmenes 5^o Congreso Argentino de Fitopatología y 59th Meeting of the APS Caribbean Division. Virtual. P. 185. https://inta.gob.ar/sites/default/files/libro_de_resumenes_5ocaf_2021.pdf

Borrelli NP, Stancanelli S, Hagiwara JC, Wright ER, Rivera MC. 2021. Primer reporte de *Sclerotinia sclerotiorum* causando tizón en *Calibrachoa hybrida*. Resúmenes 5^o Congreso Argentino de Fitopatología y 59th Meeting of the APS Caribbean Division. Virtual. P. 185. https://inta.gob.ar/sites/default/files/libro_de_resumenes_5ocaf_2021.pdf

Borrelli NP, Zumárraga MP, Wright ER, Rivera MC. 2021. Control *in vitro* de *Fusarium oxysporum* patógeno de calibrachoa con aislados rizosféricos de *Trichoderma*. Resúmenes 5^o Congreso Argentino de Fitopatología y 59th Meeting of the APS Caribbean Division. Virtual. P. 386. https://inta.gob.ar/sites/default/files/libro_de_resumenes_5ocaf_2021.pdf

Borrelli NP, Karlanian M, Rubio E, Leva P, Pitarch R, Rivera MC. 2022. Promoción de crecimiento de calibrachoa mediante la aplicación de aislados de *Trichoderma*. Resúmenes VII Jornadas Bonaerenses de Microbiología de Suelos para una Agricultura Sustentable (JOBMAS). Universidad Nacional de Hurlingham. Buenos Aires.

Borrelli NP, Stancanelli S, Rivera MC. 2022. Evaluación de la capacidad controladora de la marchitez de la calibrachoa causada por aislados de *Fusarium proliferatum* mediante el enriquecimiento de un sustrato con aislados de *Trichoderma*. Resúmenes XVII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires, Pergamino.

Publicaciones de divulgación

Borrelli NP, Martínez MA, Rivera MC, Alderete LM, Hagiwara JC, Díaz BM, Karlanian M, Fernández MN, García Lager E, Tombion L. 2022. Calibrachoa. Plagas y manejo. INTA. Instituto de Floricultura. Buenos Aires. 26 pp. https://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/12849/INTA_CIRN_InstitutodeFloricultura_Borrelli_Calibrachoa_Plagas_y_manejo..pdf?sequence=1

Distinciones

Mención académica otorgada por la Universidad de Buenos Aires el día 11 de diciembre de 2018 en reconocimiento a la obtención de la beca doctoral otorgada (Res. del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas 939, del 9/5/2017) por INTA-CONICET para el desarrollo de esta tesis.

Resumen

La floricultura es una actividad intensiva que coexiste con la horticultura en áreas periurbanas. En Argentina hay 2.500 ha destinadas a esta producción, 25 % de las cuales se realizan bajo invernadero, con alta dependencia de fungicidas, fertilizantes y reguladores de crecimiento que pueden contaminar el ambiente. El Instituto de Floricultura INTA ha generado 29 variedades ornamentales con germoplasma nativo. *Calibrachoa* es un género emparentado con *Petunia* del que se han obtenido las variedades Pampa Salmón, Overá Fucsia INTA e INTA 06575. *Nierembergia* es otro género Solanáceo ornamental. La producción en contenedores es muy afectada por hongos de suelo. *Trichoderma* es un género con aptitudes tanto para la protección contra fitopatógenos como para la promoción del crecimiento vegetal. Como alternativas para el manejo integrado de enfermedades, se encuentran el uso de genotipos resistentes que podría complementarse aplicaciones de hongos benéficos y quitosano. Los objetivos de este trabajo fueron: a) aislar hongos asociados a pudriciones basales y comprobar su patogenicidad; b) obtener aislados rizosféricos de *Trichoderma* spp., evaluar su capacidad antagónica frente a los patógenos principales, caracterizar los mecanismos de acción, evaluar su capacidad para promover el crecimiento vegetal y desarrollar técnicas de multiplicación del inóculo sobre sustratos sólidos; c) evaluar la eficiencia del quitosano para el control de los patógenos de suelo en estudio y su compatibilidad con cepas de *Trichoderma* sp. preseleccionadas; d) comparar el comportamiento de las distintas variedades frente a la infección por los fitopatógenos de suelo prevalentes y; e) ensayar estrategias de integración combinando: variedad-*Trichoderma*. Entre mayo de 2017 y octubre de 2019 se colectaron calibrachos con pérdida de turgencia y clorosis. En todos los casos se obtuvieron aislados fúngicos, de los cuales el 80 % perteneció al género *Fusarium*, el 10 % a *Sclerotinia* y el 10 % a *Rhizoctonia*. De los nueve aislados de *Fusarium*, cinco fueron identificados como *F. oxysporum*, tres como *F. proliferatum* y uno como *F. fujikuroi*. Su comportamiento frente a las distintas variedades de calibrachoa fue muy diverso. INTA IF-535 (*F. proliferatum*) fue constante en la generación de daños aéreos y radicales y en la disminución del peso seco radical. INTA IF-536 (*F. proliferatum*) también causó importantes daños en la parte aérea y radical y disminuyó el peso aéreo y radical. INTA IF-559, INTA IF-566 e INTA IF-567 (*F. oxysporum*) produjeron daños aéreos o radicales de menor magnitud. *F. proliferatum* INTA IF-534, 535 y 536 y *F. oxysporum* INTA IF-559 se comportaron, además, como patógenos de petunia mientras que *F. oxysporum* INTA IF-559 y 566 fueron patógenos de nierembergia. *Sclerotinia sclerotiorum* INTA IF-533 fue capaz de infectar nierembergia y petunia sin causar enfermedad en tomate y coral. *Ceratobasidium* sp. AG-A INTA IF-568 afectó a nierembergia sin generar daños en petunia, tomate y coral. En octubre de 2019, plantas de calibrachoa desarrollaron manchas

foliares de color marrón, irregulares, más frecuentes en las hojas basales. El patógeno se identificó como *Nigrospora oryzae* INTA IF-540. Por otro lado, de muestras de suelo rizosférico de calibrachoa provenientes de distintas zonas del país, se obtuvieron 38 aislados de *Trichoderma* sp. Con 31 de ellos se realizaron evaluaciones *in vitro* e *in vivo* frente a *F. proliferatum* INTA IF-535 y 536. Los aislados INTA IF-549, 612, 613, 614 y 630 sobresalieron como controladores *in vitro*, INTA IF-613 y 630 como controladores *in vivo*, INTA IF-549, 612, 613, 614 y 630 por su capacidad para colonizar un sustrato comercial e INTA IF-613 por la promoción de crecimiento de calibrachoa. Los aislados INTA IF-549, 612 y 630 presentan homología con *Trichoderma longibrachiatum* e INTA IF-613 y 614 con *T. koningiopsis*. El comportamiento de las variedades de calibrachoa frente a *F. proliferatum* fue variado. La más resistente (mayor peso seco de las raíces y menor severidad de daño aéreo) fue Pampa Salmón-INTA. En cuanto al quitosano, el pH influyó en su actividad. A pH 4 inhibió el crecimiento de *Sclerotium rolfsii*, a pH 6 inhibió el de *S. sclerotiorum* y disminuyó el de *S. rolfsii*, *F. oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. En relación con su compatibilidad con los aislados de *Trichoderma*, en líneas generales no inhibió el crecimiento. En síntesis, este trabajo permitió conocer las enfermedades más prevalentes en el cultivo de calibrachoa y determinar la patogenicidad de los microorganismos sobre calibrachoa, nierembergia y petunia. A partir de la caracterización de la agresividad de los aislados y la respuesta de los cultivares se obtuvo información útil para planteos con diferente presión de enfermedad. Se determinó la capacidad del quitosano para el biocontrol y su inocuidad sobre *Trichoderma* sp. Se aislaron y categorizaron cepas de *Trichoderma* con actividad de biocontrol y promoción del crecimiento de calibrachoa que pueden ser una herramienta clave para disminuir el uso de insumos químicos en las producciones florícolas.

Índice

Resumen.....	5
1. Introducción	9
1.1. Antecedentes	10
1.2. Objetivos	16
1.3. Hipótesis.....	16
1.4. Bibliografía	18
2. Hongos patógenos.....	24
2.1. <i>Fusarium</i> spp.	25
2.1.1. Introducción	25
2.1.2. Materiales y métodos	29
2.1.3. Resultados y discusión	37
2.1.4. Conclusiones	67
2.2. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	69
2.2.1. Introducción	69
2.2.2. Materiales y métodos	71
2.2.3. Resultados y discusión	72
2.2.4. Conclusiones	78
2.3. <i>Ceratobasidium</i> spp.....	80
2.3.1. Introducción	80
2.3.2. Materiales y métodos	81
2.3.3. Resultados y discusión	83
2.3.4. Conclusiones	89
2.4. <i>Nigrospora oryzae</i>	90
2.4.1. Introducción	90
2.4.2. Materiales y métodos	91

2.4.3. Resultados y discusión	92
2.4.4. Conclusiones	96
2.5. Conclusiones del capítulo.....	97
2.6. Bibliografía	98
3. Hongos benéficos	114
3.1. Trichoderma spp.	115
3.1.1. Introducción	115
3.1.2. Materiales y métodos	119
3.1.3. Resultados y discusión	128
3.2. Conclusiones del capítulo.....	193
3.3. Bibliografía	194
4. Resistencia varietal y actividad del quitosano	205
4.1. Resistencia varietal.....	206
4.1.1. Introducción	206
4.1.2. Materiales y métodos	208
4.1.3. Resultados y discusión	208
4.1.4. Conclusiones	215
4.2. Quitosano	216
4.2.1. Introducción	216
4.2.2. Materiales y métodos	217
4.2.3. Resultados y discusión	219
4.2.4. Conclusiones	225
4.3. Conclusiones del capítulo.....	226
4.4. Bibliografía	227
5. Conclusiones generales	232
6. Anexo.....	234

1. Introducción

1.1. Antecedentes

La floricultura es una actividad intensiva que coexiste con la horticultura en áreas periurbanas. En Argentina hay 2.500 ha destinadas a esta producción, 25 % de las cuales se encuentran en invernadero (1.700 ha en La Plata y la periferia bonaerense). El 58 % del área florícola nacional se ubica en Buenos Aires, el 12 % en Santa Fe, el 6,8 % en Corrientes y el 22 % en el resto del país (Morisigue *et al.*, 2013). Los datos censales indican la existencia de un gran componente de floricultores de tipo familiar, que trabajan y residen en los establecimientos. En estas áreas productivas la interfase urbano rural no está claramente definida y genera gran cercanía entre los cultivos y las viviendas.

A escala global, las exportaciones de flores, follaje, plantas y bulbos de flores fueron por 8.500 millones de dólares en 2001, 21.100 millones de dólares en 2011 y 20.600 millones de dólares en 2013 (van Rijswijk, 2015). En el año 2019 el valor de las exportaciones ascendió a 38.400 millones de dólares con una tasa de incremento promedio anual de alrededor del 10 %. Los principales países exportadores son Holanda (44 %), Colombia (6,9 %), Alemania (5,3 %), Italia (4,7 %), Ecuador (4,5 %), Kenia (4,2 %), Bélgica (3,1 %), España (2,5 %), China (2,2 %) y Estados Unidos (2,1 %). Estos diez países concentran el 80 % de las exportaciones mundiales de productos florícolas (United Nations Comtrade Database, 2020). La contribución de la Argentina corresponde al 0,017 % mundial; con el mercado interno como destino principal.

La producción florícola se desarrolla con alta dependencia de fungicidas, fertilizantes y reguladores de crecimiento que pueden permanecer en los suelos o ser movilizados a través del aire y el agua (Sequinatto *et al.*, 2013) y así contaminar el ambiente (Wightwick *et al.*, 2010). Esta actividad se realiza bajo una modalidad que utiliza elevada cantidad de fitosanitarios de diversa peligrosidad. En La Plata (Buenos Aires) se registraron 58 agroquímicos diferentes y el 58 % de los productores utilizaron al menos un producto de las categorías toxicológicas I y II (extremadamente tóxicos y altamente tóxicos respectivamente) (Sarandon *et al.*, 2015). El uso inadecuado de estos productos puede ser riesgoso para la salud de los productores y trabajadores, sus familias y el entorno (Querejeta *et al.*, 2012). El manejo sobre bases agroecológicas (Altieri, 1987) constituiría una estrategia para disminuir este daño ya que propicia entre otras prácticas el uso de productos de baja toxicidad e impacto ambiental, en especial bioinsumos.

En relación con las especies cultivadas, la escasa disponibilidad y diversidad de variedades ornamentales adaptadas a las condiciones locales y la preponderancia de material genético mejorado en el exterior (a menudo con germoplasma argentino) generan dificultades de manejo además de elevados costos por el pago de regalías. Con el objetivo de aportar soluciones a este

problema, en el Instituto de Floricultura INTA se generaron 29 variedades ornamentales con germoplasma nativo que se hallan inscritas en el Registro Nacional de Cultivares (INASE, 2022). El género *Petunia* (Solanaceae) tiene preponderancia en la floricultura internacional. *Calibrachoa* es un género emparentado (Greppi *et al.*, 2013) del que se han generado las variedades Pampa Salmón y Overá Fucsia INTA para el mercado local y Superbells Garden Rose (en Argentina INTA 06575) destinada al mercado norteamericano (Figura 1.1). También están registradas las variedades Luna INTA JICA, Estrella INTA JICA, Nieve INTA y Cielo INTA del género *Nierembergia* (Solanaceae) (Figura 1.2). Como resultado de ensayos de comportamiento de las variedades en diferentes territorios se obtuvieron datos alentadores en las áreas de incumbencia de las Estaciones Experimentales Agropecuarias Bariloche (San Martín de los Andes, El Bolsón), Famaillá y San Pedro. Estas variedades pertenecen al grupo de los “plantines florales” cultivados y comercializados en macetas (Figura 1.3).



Figura 1.1. Variedades de calibrachoa. A) Pampa Salmón INTA en maceta; B) Overá Fucsia INTA en maceta; C) Superbells Garden Rose en maceta; D) Detalle de flor de Pampa Salmón INTA; E) Detalle de flor de Overá Fucsia INTA; F) Detalle de flor de Superbells Garden Rose.

Calibrachoa Cerv. es un género neotropical de Solanaceae perteneciente al clado *Petunieae*. Comprende 27 especies que crecen predominantemente en áreas abiertas del sur de América del Sur (Fregonezi *et al.*, 2012). La mayoría se encuentra en Brasil (Stehmann y Greppi, 2011) y 12 de ellas crecen en Argentina, principalmente en el este de la región mesopotámica (Stehmann y Greppi, 2011; Fregonezi *et al.*, 2012; Greppi *et al.*, 2013). Las calibrachos (*Calibrachoa*

hybrida) se caracterizan por una profusa producción de flores de colores vivos durante la primavera y el verano (Borrelli *et al.*, 2022). Este género ornamental tiene una importancia creciente debido a la existencia de muchas variedades exitosas para cultivar en interiores en contenedores o plantar en el jardín y el paisaje (Facciuto *et al.*, 2009).

El género *Nierembergia* (Solanaceae) comprende alrededor de 20 especies, todas ellas nativas de Sudamérica, excepto una de origen mejicano. En la Argentina habitan 15 especies en zonas subtropicales desde el nivel del mar hasta la alta montaña a 3500 m.s.n.m. (Cocucci y Hunziker, 1995). Las provincias de Catamarca y Tucumán son las que presentan mayor diversidad de especies (Cocucci, 1991). La mayoría de ellas tiene valor ornamental por sus flores moradas o blancas y su largo período de floración (Shizukawa y Mii, 1997). Muestra escasa variabilidad en cuanto a forma y color de la flor, pero presenta un excelente comportamiento en condiciones de cultivo, con baja susceptibilidad a plagas y enfermedades. Otro aspecto interesante de este género es que, aunque perenne, tiene características de ciclo anual (Soto, 2007). Como plantas espontáneas algunas especies tienen un aspecto negativo porque pueden ser tóxicas para el ganado; otro factor destacable es el contenido de cardenólidos con actividad antitumoral de uso potencial farmacológico (Buschi y Pomilio, 1987; Gil *et al.*, 1995; Hunziker, 2001).

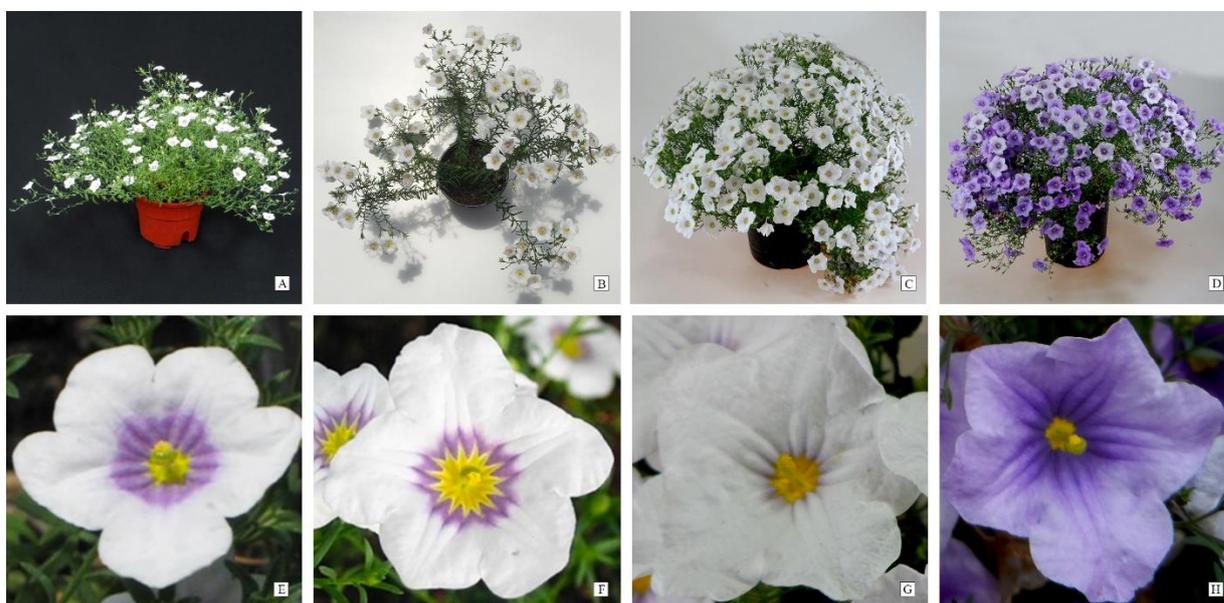


Figura 1.2. Variedades de *Nierembergia* en maceta. A) Luna INTA JICA; B) Estrella INTA JICA; C) Nieve INTA; D) Cielo INTA; E) Detalle de flor de Luna INTA JICA; F) Detalle de flor de Estrella INTA JICA; G) Detalle de flor de Nieve INTA y H) Detalle de flor de Luna INTA JICA.

El género *Petunia* (Solanaceae) fue establecido por Jussieu (1803) con las especies tipo *P. parviflora* y *P. nyctaginiflora*. El híbrido *Petunia x hybrida* Vilmorin es una de las plantas ornamentales más conocidas y cultivadas en todo el mundo (Stehmann *et al.*, 2009). Actualmente se conocen 14 especies en el género *Petunia*, distribuidas, con excepción de *P.*

mantiqueirensis Ando & Hashimoto, en la región subtropical del sur de América del Sur (Stehmann *et al.*, 2009; Greppi *et al.*, 2019). Según Stehmann *et al.* (2009) se conocen principalmente dos centros de origen del género, uno en zonas altas del sur de Brasil, en el norte de Rio Grande do Sul y Santa Catarina, y el otro en zonas bajas, incluida la región pampeana al sur del estado de Rio Grande do Sul. En Argentina se reconocen siete especies: *P. patagónica* Millan, *P. axilaris* Britton, Sterns y Poggenburg, complejo *P. integrifolia* Schinz y Thellung, *P. inflata* Fries, *P. interior* Ando y Hashimoto, *P. occidentalis* Fries y *P. correntina* Greppi y Stehmann (Stehmann y Greppi, 2013; Greppi *et al.*, 2019) (Figura 1.4). En la naturaleza, las especies de *Petunia* son en su mayoría anuales con tallos herbáceos y flores violetas, blancas, rojas o rosadas (Stehmann *et al.*, 2009).

El uso de materiales mejorados de la flora nativa presenta un interés creciente por su capacidad de adaptación al ambiente (Franco *et al.*, 2006). Sin embargo, la producción en contenedores es muy afectada por las condiciones del sustrato, con alta incidencia de enfermedades ocasionadas por hongos de suelo. Sobre *Petunia x hybrida* se reportaron podredumbres basales ocasionadas por *Rhizoctonia solani* (Wright *et al.*, 2004) y *Fusarium oxysporum* (Wright *et al.*, 2007). Sobre *Calibrachoa hybrida* se observó podredumbre de raíces causada por *Fusarium* sp. (Rivera *et al.*, 2015). El conocimiento más profundo de la problemática fitosanitaria es la base para la planificación del manejo de los cultivos. Se espera que las variedades generadas a partir de germoplasma local presenten diferentes grados de resistencia a patógenos.



Figura 1.3. Variedades de calibrachoa creciendo en macetas de cultivo (Foto: Juan Carlos Hagiwara).



Figura 1.4. *Petunia correntina*. A) Planta creciendo a campo; B) Detalle de flor. (Foto: Julián Greppi).

En relación con el control biológico de enfermedades, en Argentina se realizaron numerosos estudios (Rivera y Wright, 2014), algunos orientados a la floricultura (Boschi *et al.*, 1996; Wright *et al.*, 1996; Lori *et al.*, 1998b,c; Sillon *et al.*, 1998; Wolcan *et al.*, 1998; Sillon y Fállico 1999; Sillon *et al.*; 2000; Benva *et al.*, 2004; Lori *et al.*, 2004; Wright *et al.*, 2013) pero pocos evaluados a nivel productivo (Lori *et al.*, 1998a; Bompadre *et al.*, 2001; Rivera *et al.*, 2002; Orecchia y Matoff, 2003; Yossen *et al.*, 2004; Petrone *et al.*, 2006, Cuellas *et al.*, 2011; Cuellas y Fernández, 2012). Es necesario basarse en la experiencia existente para ampliarla y así generar tecnologías sostenibles de manejo fitosanitario en los establecimientos florícolas.

El SENASA es el organismo responsable de la inscripción de productos para el agro en Argentina. El registro de insumos para la protección vegetal debe cumplir las pautas establecidas por el Manual de Procedimientos, Criterios y Alcances para el Registro de Productos Fitosanitarios por Res. 350/99 (SEAGyP, 1999). El conocimiento de los mecanismos de antagonismo (Mondino y Vero, 2006) que caracterizan a un biocontrolador es una información básica para el proceso de registro. Los biocontroladores pueden presentar también actividad como estimuladores de la germinación, del crecimiento y del desarrollo vegetal a partir de la liberación de las hormonas relacionadas con tales funciones (auxinas, giberelinas y citoquininas) (Altomare *et al.*, 1999; Vera *et al.*, 2002; Howell, 2003). Además, poseen mecanismos para otorgar resistencia a estreses bióticos y abióticos (Howell, 2003). Por otro lado, la capacidad de numerosos biocontroladores para descomponer materia orgánica y solubilizar fosfatos facilita la disponibilidad de nutrientes para los cultivos (Howell, 2003; Godeas, 2007). Es importante destacar que la inscripción de productos biofertilizantes establecido por el Decr. Ley 5769/59 (SENASA, 1959) presenta menos requerimientos que la de bioprotectores regulado por el Decr. Ley 3489/58 (SENASA, 1958).

Una vasta bibliografía evidencia la actividad de antagonistas bacterianos y fúngicos que a través de variados mecanismos controlan importantes patógenos de plantas (Whipps, 2001). *Trichoderma* es un género fúngico con aptitudes tanto para la protección contra fitopatógenos

como para la promoción del crecimiento vegetal (Elad *et al.*, 1981), es ubicuo, frecuente en suelos (Harman *et al.*, 2004) e inocuo para otros organismos benéficos (Saba *et al.*, 2012). La producción en masa de cepas de *Trichoderma* se ha vuelto el foco de la investigación sobre alternativas de manejo fitosanitario (Parkash y Saikia, 2015). El trisilicato de magnesio, determinadas arcillas (caolinita, bentonita), la lignita y la turba son los soportes más utilizados para la multiplicación del inóculo (Sathiyaseelan *et al.*, 2009). También, la fermentación sobre sustratos sólidos de bajo costo podría ser una forma eficiente y accesible de generar inóculo, en especial para productores familiares. En pocos casos se avanzó en la investigación hasta los procesos finales de desarrollo e inscripción de productos biológicos en nuestro país. Es así como en los registros de SENASA (2022) figuran solo ocho formulados de *Trichoderma* como fitosanitarios (para el control de hongos de suelo) y otros ocho como fertilizantes biológicos, no todos aplicables en floricultura, la mayoría correspondiente a desarrollos foráneos.

En la búsqueda de alternativas para el manejo integrado de enfermedades, podría considerarse al uso de quitosano como complemento de las aplicaciones de hongos benéficos. Se trata de un heteropolisacárido proveniente de la desacetilación de la quitina, abundante en la naturaleza y subproducto de la industria pesquera como parte del exoesqueleto de los crustáceos. Este biopolímero posee actividad antimicrobiana (Cretoiu *et al.*, 2013) y puede ser compatible con cepas de *Trichoderma* (Chittenden y Singh, 2009). Existen escasos antecedentes en el país sobre su evaluación como bioprotector, ninguno relacionado con la floricultura, con excepción de los estudios *in vitro* realizados por Grisancich (2019) con hongos de suelo patógenos de ornamentales. Se lo utilizó para el control de podredumbres poscosecha de zapallo (Cifone *et al.*, 1999, 2001), de poblaciones bacterianas en lechuga (Goñi *et al.*, 2010) y de la infección por *Alternaria alternata* en tomate (Yommi *et al.*, 2005), y en la preservación poscosecha de peras (Rodríguez *et al.*, 1999). En los registros de fitosanitarios (SENASA, 2022) hay una inscripción de este principio activo como fitorregulador, que a su vez se encuentra aprobado para su uso en establecimientos orgánicos, mientras que no existe ninguna inscripción como fertilizante. La compatibilidad de *Trichoderma* con otros insumos, por ejemplo quitosano, depende de la cepa (Khan y Shahzad, 2007) y debe evaluarse en cada caso.

En un sistema productivo, el manejo de las enfermedades de las plantas debe ser abordado de manera integral con otros factores como el ambiente, el cultivar y la fertilización (Pérez y Gepp, 2002), con la sostenibilidad como eje. Especialmente en cultivos periurbanos, una tecnología de manejo sanitario basada en el aprovechamiento de flora nativa (vegetal y microbiana), la minimización del uso de químicos de síntesis y la aplicación de microorganismos benéficos permitirá lograr calidad en un esquema sostenible de producción florícola.

La presente tesis fue estructurada en capítulos que contienen la introducción, los materiales y métodos, los resultados y discusión, y las conclusiones parciales. El capítulo 2 está orientado a la identificación de los hongos patógenos del cultivo de calibrachoa presentados de mayor a menor prevalencia e incluye avances sobre determinaciones en otras solanáceas. El capítulo 3 está destinado al aislamiento, la selección y la caracterización de hongos biocontroladores de *Fusarium* spp. y promotores del crecimiento de calibrachoa. Por último, en el capítulo 4 se estudia la actividad fungicida del quitosano y su compatibilidad con las cepas de biocontroladores. Además, se presenta el estudio del comportamiento de tres variedades comerciales de calibrachoa frente a enfermedades y la integración de las prácticas mencionadas. Se exponen las conclusiones generales en el capítulo 5 y por último, el detalle de las mediciones y los análisis estadísticos en el capítulo 6.

1.2. Objetivos

Este trabajo plantea mejorar la calidad de la producción florícola mediante el manejo de la sanidad de Solanáceas ornamentales con prácticas eco compatibles. Los objetivos específicos son:

- Aislar hongos asociados a pudriciones basales y comprobar su patogenicidad, determinando la importancia de las enfermedades que ocasionan.
- Comparar el comportamiento de las distintas variedades frente a la infección por los fitopatógenos de suelo prevalentes.
- Obtener aislados rizosféricos de *Trichoderma* spp., evaluar su capacidad antagónica frente a los patógenos principales, caracterizar los mecanismos de acción y evaluar técnicas de multiplicación del inóculo de *Trichoderma* sp. sobre sustratos sólidos.
- Evaluar la eficiencia del quitosano para el control de los patógenos de suelo en estudio, poniendo a prueba distintas dosis y su compatibilidad con cepas de *Trichoderma* sp. preseleccionadas.
- Ensayar estrategias de integración combinando: variedad-*Trichoderma*-quitosano.

Se da énfasis a los estudios sobre *Calibrachoa hybrida* y se complementa con evaluaciones sobre *Nierembergia* sp. y *Petunia* sp.

1.3. Hipótesis

- Mediante la integración de prácticas de manejo eco-compatibles es posible mejorar la calidad de la actividad florícola y la salud de productores y ambiente.

- Las Solanáceas, *Calibrachoa* sp., *Nierembergia* sp. y *Petunia* sp. son susceptibles a infecciones basales causadas por hongos del suelo.
- Cepas rizosféricas del género *Trichoderma* pueden presentar actividad antagónica frente a los patógenos de suelo con diversidad de mecanismos de acción, pudiendo desarrollar sobre determinados sustratos sólidos.
- El quitosano presenta potencial para el control de hongos de suelo y su uso puede ser compatible con la aplicación de cepas de *Trichoderma* sp.

1.4. Bibliografía

Altieri MA. 1987. Agroecology: the scientific basis of alternative agriculture. 2nd Ed. Westview Press, Colorado, USA. 227 pp.

Altomare C, Norvell WA, Björkman T, Harman GE. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. Appl. Environ. Microbiol. 65(7): 2926-2933.

Benva M, Wright ER, Rivera MC, Fabrizio MC. 2004. Eficiencia de preparados de ajo en el control de *Penicillium* sp., patógeno de tulipán (*Tulipa* sp.). Resúmenes II Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. Pp. 231-233.

Bompadre J, Pérgola M, Divo de Sesar M, Godeas A, Stella A, Rivera MC, Wright ER, Herrera O, Vilella F. 2001. Producción en plugs de plantines de *Viola x wittrockiana* F2 var. Saint Tropez con cepas nativas de *Glomus intradices*. Resúmenes VIII Congreso de Horticultura. Salto. Uruguay.

Borrelli NP, Moreno MV, Stenglein S, Stancanelli S, Wright ER, Rivera MC. 2022. *Ceratobasidium* sp. AG-A, root pathogen of *Calibrachoa hybrida*. Chilean J. Agric. Anim. Sci. 38(2): 207-213. DOI: 10.29393/CHJAA38-20CANM60020.

Boschi C, Wright ER, López MV, Fabrizio MC. 1996. Estudios preliminares del efecto antagónico *in vitro* de aislamientos bacterianos sobre *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Resúmenes VIII Congreso Latinoamericano de Horticultura. P. 108.

Buschi CA, Pomilio A. 1987. Pyrrole-3-carbamidine: a lethal principle from *Nierembergia hippomanica*. Phytochemistry 26(3): 863-865. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)84810-4.

Chittenden C, Singh T. 2009. *In vitro* evaluation of combination of *Trichoderma harzianum* and chitosan for the control of sapstain fungi. Biol. Control 50: 262-266.

Cifone N, Delhey R, Kiehr M, Agulló E, Martínez RS, Chaves H. 2001. Quitosano controla podredumbres de frutos de zapallo anquito (*Cucurbita moschata*). Resúmenes Taller Química de Quitina y Quitosanos y su Aplicación en Control Ambiental. Pp. 53-55.

Cifone N, Kiehr M, Delhey R, Agulló E. 1999. El potencial de quitosano y de ácido acético para controlar podredumbres de poscosecha en zapallo anquito. Resúmenes X Jornadas Fitosanitarias Argentinas. P. 85.

Cocucci AA. 1991. Pollination biology of *Nierembergia* (Solanaceae). Pl. Syst. Evol. 174: 17-35. DOI: 10.1007/BF00937691.

Cocucci AA, Hunziker AT. 1995. Estudios sobre Solanaceae. XLI. *Nierembergia linariaefolia* y *N. pulchella*: sus sinónimos y variedades. Darwiniana 33(1-4): 35-42.

Cretoiú MS, Korthals GW, Visser JHM, van Elsas JD. 2013. Chitin amendment increases soil suppressiveness toward plant pathogens and modulates the actinobacterial and oxalobacteraceal communities in an experimental agricultural field. Appl. Environ. Microb. 79: 5291-5301.

Cuellas M, Fernández R, Stocco M, Mónaco C, Balatti P. 2011. Evaluación del efecto de aplicación de *Trichoderma* sp. sobre el control de *Phytophthora* spp., en un cultivo de gerbera. Resúmenes XXXIV Congreso Argentino de Horticultura. P. 96.

Cuellas M, Fernández R. 2012. *Trichoderma* spp.: su efecto para el control de *Phytophthora* spp., en un cultivo de gerbera. Resúmenes XXXV Congreso Argentino de Horticultura. P. 238.

Elad Y, Chet I, Henis Y. 1981. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica* 9: 59-67.

Facciuto G, Pannunzio MJ, Coviella A, Bologna P, Soto S, Imhof L, Borja M. 2009. *Calibrachoa* breeding advances in Argentina. *Acta Horticulturae* 813: 121-126. DOI: 10.17660/ActaHortic.2009.813.15.

Franco JA, Martínez-Sánchez JJ, Fernández JA, Bañón S. 2006. Selection and nursery production of ornamental plants for landscaping and xerogardening in semi-arid environments. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 8: 3-17.

Fregonezi JN, Brandão de Freitas L, Bonatto SL, Semir J, Stehmann JR. 2012. Infrageneric classification of *Calibrachoa* (Solanaceae) based on morphological and molecular evidence. *Taxon* 61(1): 120-130. DOI: 10.1002/tax.611009.

Gil RR, Lin L, Chai H, Pezzuto JM, Cordell GA. 1995. Cardenolides from *Nierembergia aristata*. *J. Nat. Prod.* 58(6): 848-856. DOI: 10.1021/np50120a005.

Godeas AM. 2007. Perspectivas de los inoculantes fúngicos en Argentina. En: Izaguirre-Mayoral ML, Labanderay C, Sanjuán J. (Eds.) *Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica, científica y empresarial*. Editorial Universitaria, La Habana. Cuba. 104 pp.

Goñi MG, Moreira MR, Viacava GE, Roura SI. 2010. Aplicación de quitosano a semillas de lechuga manteca: efecto sobre la carga microbiana y la germinación. Resúmenes XXXIII Congreso Argentino de Horticultura. P. 407.

Greppi JA, Hagiwara JC, Stehmann JR. 2013. Novedades de *Calibrachoa* (Solanaceae) y notas taxonómicas sobre el género en la Argentina. *Darwiniana nueva serie* 1: 173-186.

Greppi JA, Hagiwara JC, Stehmann JR. 2019. A new species of *Petunia* (Solanaceae) from Corrientes, Argentina. *Phytotaxa* 414(6): 289-295. DOI: 10.11646/phytotaxa.414.6.3.

Grisancich N. 2019. Efecto del quitosano sobre hongos fitopatógenos de suelo. Tesis para optar por el título de Técnico en Producción Vegetal Orgánica. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004. *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 43-56.

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. DOI: 10.1094/PDIS.2003.87.1.4.

Hunziker AT. 2001. The genera of *Solanaceae* illustrated, arranged according to a new system. ARG Ganter, Königstein, Germany. 500 pp.

INASE. 2022. Catálogo Nacional de Cultivares. <https://gestion.inase.gob.ar/consultaGestion/gestiones>.

Jussieu AL. 1803. Sur le *Petunia*, genre nouveau de la famille des plantes solanées. Ann. Mus. Natl. Hist. Nat. 2: 214-216.

Khan MO, Shahzad S. 2007. Screening of *Trichoderma* species for tolerance to fungicides. Pak. J. Bot. 39: 945-951.

Lori G, Mónaco C, Ronco L, Wolcan S, Lemanceau P, Alabouvette C. 1998a. Lucha integrada contra la fusariosis del clavel. Resúmenes 1º Congreso Argentino de Control Biológico de Enfermedades de las Plantas. P. 38.

Lori G, Mónaco C, Ronco L, Wolcan S, Silvestrini P, Lemanceau P, Alabouvette C. 1998b. Dinámica poblacional de los antagonistas *Fusarium oxysporum* no patógeno Fo47 y *Pseudomonas fluorescens* C7 en suelo inoculado con *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Resúmenes 1º Congreso Argentino de Control Biológico de Enfermedades de las Plantas. P. 13.

Lori G, Ronco L, Mónaco C, Wolcan S, Silvestrini P, Lemanceau P, Alabouvette C. 1998c. Comportamiento de los microorganismos antagonistas Fo47 y C7 frente al marchitamiento del clavel en la Argentina. Resúmenes 1º Congreso Argentino de Control Biológico de Enfermedades de las Plantas. P. 15.

Lori G, Edel-Hermann V, Gautheron N, Alabouvette C. 2004. Genetic diversity of pathogenic and nonpathogenic populations of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation fields in Argentina. Phytopathology 94: 661-668.

Mondino P, Vero S. 2006. Control biológico de patógenos de plantas. Facultad de Agronomía Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 158 pp.

Morisigue DE, Mata DA, Facciuto G, Bullrich L. 2013. Pasado y presente de la floricultura argentina. Ediciones INTA, Buenos Aires. 40 pp.

Orecchia E, Matoff E. 2003. Tratamiento de sustratos para control de *Fusarium oxysporum* en clavel. Resúmenes V Jornadas Nacionales de Floricultura. 2.6 (en CD).

Parkash V, Saikia AJ. 2015. Production and multiplication of native compost fungal activator by using different substrates and Its Influence on growth and development of *Capsicum chinensis* Jacq. "Bhut Jolokia". Biotechnology Research International Article ID 481363, doi:10.1155/2015/481363. 7 pp.

Pérez C, Gepp V. 2002. Principios generales de control. Principios de Whetzel. Material didáctico. Facultad de Agronomía Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 18 pp.

Petrone E, Vega D, Rivera MC, Fabrizio M, Wright ER, Moya M, Durand P, Tito G. 2006. Uso de preparados vegetales para controlar hongos del suelo. Resúmenes Jornada de Enfermedades en Cultivos Bajo Cubierta. Pp. 76-77.

Querejeta GA, Ramos LM, Flores AP, Hughes EA, Zalts A, Montserrat JM. 2012. Environmental pesticide distribution in horticultural and floricultural periurban production units. Chemosphere 87: 566-572.

Rivera MC, Wright ER, Hagiwara JC, Galotta MF, Stancanelli S. 2015. *Fusarium* sp. causante de marchitez en calibrachoa. 2015. Resúmenes IV Jornadas de Enfermedades y Plagas Bajo Cubierta. P. 106.

Rivera MC, Wright ER, Piñero M, López MV, Pérgola M, Bompadre J, Godeas A, Herrera O, Ciarla V, Divo de Sesar M, Vilella F. 2002. Efecto de la micorrización y el fósforo en el crecimiento y sanidad de plantines de pensamiento. Resúmenes 1º Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. P. 69.

Rivera MC, Wright ER. 2014. Control biológico de enfermedades de plantas en Argentina. Pp. 9-82. En: Bettiol W, Rivera MC, Mondino P, Montealegre JR, Colmenárez YC. (Eds.). Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe. Editorial Facultad de Agronomía Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. <http://aafitopatologos.com.ar/control-biologico-de-enfermedades-de-plantas-en-america-latina-y-el-caribe/>.

Rodríguez MS, Ramos V, Pistonesi M, Delhey R, Agulló E. 1999. Preservación de peras con filmes de quitosano. Parte I. Resúmenes VIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Saba H, Vibhash D, Manisha M, Prashant KS, Farhan H, Tauseef A. 2012. *Trichoderma* - a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. *Mycosphere* 3: 524-531.

Sathiyaseelan K, Sivasakthivelan P, Lenin G. 2009. Evaluation of antagonistic activity and shelflife study of *Trichoderma viride*. *Int. J. Botany Res.* 2: 195-197.

Sarandón SJ, Flores CC, Abbona EA, Iermanó MJ, Blandi ML, Oyhamburu M. 2015. Uso de agroquímicos en la Provincia de Buenos Aires, Argentina: las consecuencias de un modelo agropecuario. Resúmenes V Congreso Latinoamericano de Agroecología - SOCLA.

SEAGyP. 1999. Resolución 350/99: Sanidad Vegetal. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-350-1999-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>.

SENASA. 1958. Decreto Ley Nacional 3489. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. <http://www.senasa.gob.ar/normativas/decreto-ley-nacional-3489-1958-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>.

SENASA. 1959. Decreto Ley Nacional 5769. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. <http://www.senasa.gob.ar/normativas/decreto-ley-nacional-5769-1959-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>.

SENASA. 2022. Registro Nacional de Terapéutica Vegetal. Productos fitosanitarios, fertilizantes e insumos aptos para producción orgánica. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de la República Argentina. <http://www.senasa.gob.ar>.

Sequinatto L, Reichert JM, Rheinheimer dos Santos D, Reinert DJ, Cruz Copetti AC. 2013. Occurrence of agrochemicals in surface waters of shallow soils and steep slopes cropped to tobacco. *Química Nova* 36: 768-772.

- Shizukawa Y, Mii M. 1997. A simple and efficient plant regeneration system for leaf protoplasts of *Nierembergia repens* by inducing single shoots on the microcolonies. *Plant Cell Rep.* 16: 545-549. DOI: 10.1007/BF01142321.
- Sillon M, Fállico L, Sutton J, Visentín B. 2000. Biodiversity in soils planted to carnation in Santa Fe (Argentina). *Proceedings 5th International PGPR Workshop.* P. 125.
- Sillon M, Fállico L. 1999. Compost de lombriz. Estudio *in vitro* de la potencial capacidad biocontroladora de patógenos. *Resúmenes XXXII Congreso Argentino de Horticultura* 6: 206. (en CD).
- Sillon M, Monte Vázquez E, García B, Fállico de Alcaraz L. 1998. Estudio de la capacidad antagónica de aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Resúmenes 1º Congreso Argentino de Control Biológico de Enfermedades de las Plantas.* P. 29.
- Soto S. 2007. Estudios de las relaciones interespecíficas en el género *Nierembergia*, como herramienta del mejoramiento. Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Stehmann JR, Lorenz-Lemke AP, Freitas LB, Semir J. 2009. The genus *Petunia*. En: Gerats T y Strommer J (Eds.). *Petunia* evolutionary, developmental, and physiological genetics. Springer, New York, pp. 1–28. DOI: 10.1007/978-0-387-84796-2_1.
- Stehmann JR, Greppi JA. 2011. Two new species of *Calibrachoa* (Solanaceae) from subtropical South America. *Phytotaxa* 25: 31-38. DOI: 10.11646/phytotaxa.25.1.4.
- Stehmann JR, Greppi J.A. 2013. *Petunia*. En: Barboza GE (Ed.). *Solanaceae. Flora Argentina: Flora vascular de la República Argentina. Dicotyledoneae.* Instituto de Botánica Darwinion, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, San Isidro. Argentina. 127 pp.
- United Nations Comtrade Database. 2020. International Trade Statistics - Import/Export Data <https://comtrade.un.org/data>.
- van Rijswijk C. 2015. World floriculture map 2015. Gearing up for stronger competition. Rabobank Industry Note #475. Utrecht, The Netherlands. 4 pp. <https://www.florisud.fr/var/florisud/storage/original/application/21f23b81f7f4301304ffd6e2485ba7a6.pdf>.
- Vera DF, Pérez H, Valencia H. 2002. Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizósfera de arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae). *Acta Biolol. Colomb.* 7(1): 33-40.
- Whipps JM. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487-511. DOI: 10.1093/jexbot/52.suppl_1.487.
- Wightwick A, Walters R, Allinson G, Reichman S, Menzies N. 2010. Environmental risks of fungicides used in horticultural production systems. Pp. 273-305. En: Carisse O (Ed.). *Fungicides.* Intech. <http://www.intechopen.com/books/fungicides/environmental-risks-of-fungicides-used-in-horticulturalproduction-systems>.
- Wolcan S, Mónaco C, Lori G. 1998. Selección de microorganismos biocontroladores de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en Argentina. *Resúmenes 1º Congreso Argentino de Control Biológico de Enfermedades de las Plantas.* P. 32.

Wright ER, Leone AM, Rivera MC, Lori G. 2007. *Fusarium oxysporum* causing crown rot on *Gazania rigens* and *Petunia x hybrida* in Argentina. J. Plant Pathol. 89(2): 302.

Wright ER, Leston C, Rivera MC, Fabrizio MC. 2013. Control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis* con caldo de cebolla. Anais do VI Congresso Brasileiro de Defensivos Agrícolas Naturais. Fitopatologia_008. P. 127.

Wright ER, Palmucci HE, Rivera MC, Delfino OSF, Fabrizio MC. 1996. Estudios preliminares del efecto antagónico de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Resúmenes V Siconbiol. Simposio de Controle Biológico. P. 122.

Wright MC, Rivera MC, Ascitutto K, Gasoni L, Barrera V, Kobayashi K. 2004. First report of petunia root rot caused by *Rhizoctonia solani* in Argentina. Plant Dis. 88:86.

Yommi A, Escande A, López Camelo A, Cendoya G, Sozzi G. 2005. Efecto del quitosano aplicado en pre-cosecha sobre la pudrición del tomate causada por *Alternaria alternata*. Resúmenes XVIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. P. 337.

Yossen V, Zumelzú G, Kobayashi K, Gasoni L. 2004. Soil reductive sterilization, an alternative to Methyl Bromide in Córdoba, Argentina. Proceedings International Seminar on Biological Control of Soilborne Plant Diseases, Japan-Argentina Joint Study. Pp. 167-174.

2. Hongos patógenos

2.1. *Fusarium* spp.

2.1.1. Introducción

Fusarium Link es un género de hongos filamentosos hialinos (Link, 1809) incluido en la lista de los diez hongos fitopatógenos con gran importancia tanto económica como científica (Dean *et al.*, 2012). Pertenece al filo Ascomycota, orden Hypocreales y familia Nectriaceae (Bahadur, 2021). Las especies se caracterizan por su rápido crecimiento, producen colonias planas, lanosas a algodonosas, pálidas o brillantes. La coloración de las colonias es blanca, crema, salmón, amarilla, roja, violeta o rosa y el reverso de las placas puede no presentar coloración o teñirse de rojo, púrpura oscuro o marrón (Rifai *et al.*, 2015). A pesar de que este género exhibe gran diversidad en sus atributos morfológicos, fisiológicos y ecológicos (Zemankova y Lebeda, 2001) todas las especies tienen una característica taxonómica en común: la producción de macroconidios de formas distintivas, multiseptados, con células apicales y basales puntiagudas, estas últimas generalmente con forma de pie. Algunas especies pueden formar microconidios aseptados o con un septo, o clamidosporas (Booth, 1971; 1984) que les permiten resistir condiciones adversas y persistir en el suelo sin el hospedante (Gordon, 1960; Dusengemungu, 2021). Algunas especies tienen un estado teleomórfico (Booth, 1981). *Fusarium* es conocido en el mundo por su amplia distribución y su rango de hospedantes y es también importante en la descomposición de materia orgánica en distintos ecosistemas. Se encontraron especies en diversos nichos ecológicos en la mayoría de las regiones del mundo (Burgess *et al.*, 1996) desde la tundra Ártica y regiones Subantárticas (Kommedahl *et al.*, 1988; Lori *et al.*, 1999) hasta los bosques tropicales húmedos (Brayford, 1993; Zemankova y Lebeda, 2001); algunas se encuentran en agua dulce y otras son parásitas de hongos o cochinillas (Burgess, 1981), humanos y animales domésticos (Leslie y Summerell, 2006). La temperatura es probablemente uno de los factores climáticos más determinantes de la distribución geográfica de *Fusarium* spp. (Lori *et al.*, 1999), cuya amplitud dificulta la determinación de un centro de origen, denota su antigüedad y permite postular la hipótesis de su aparición relativamente temprana en la evolución de los Ascomycota. La diversidad de características morfológicas y relaciones filogenéticas en el género es consistente con esta hipótesis (Summerell *et al.*, 2010). De acuerdo con la escala de tiempo establecida por Taylor y Berbee (2006), la edad mínima del género podría ser 110, 250 o 420 millones de años (Summerell *et al.*, 2010).

Fusarium incluye algunas de las especies de patógenos vegetales más importantes y destructivas y afecta a la agricultura intensiva y extensiva a nivel mundial. Pueden atacar en forma individual

o junto con otros patógenos fúngicos de plantas o nemátodos. Pueden también ser patógenos secundarios de tejidos vegetales estresados por factores abióticos o bióticos (Brayford, 1993). Hay especies productoras de micotoxinas; las cepas de climas fríos son más toxigénicas que las de climas cálidos (Abbas *et al.*, 1987). Algunas especies se reconocen cada vez más como patógenas de los seres humanos (Summerell *et al.*, 2010). Por todo lo expuesto, el género *Fusarium* puede representar una amenaza para la salud de las plantas, los animales y la seguridad alimentaria (O'Donnell *et al.*, 2013). El 80 % de las especies de plantas presentan una o más enfermedades ocasionadas por *Fusarium* (American Phytopathological Society, 2022). Entre las especies más conocidas por su potencial destructivo se encuentran *F. graminearum* (Schwabe) y *F. oxysporum* (Schltdl.), incluidas entre los diez principales patógenos (Summerell, 2019). Las enfermedades inducidas son bastante variadas al igual que su severidad y pueden incluir pudriciones de raíces o tallos, canchros, marchitamientos, pudriciones de frutos o semillas y necrosis de las hojas (Leslie y Summerell, 2006). Malhipour y Gilbert (2012) indican que diferentes especies o aislados de *Fusarium* muestran una gran variación en sus características filogenéticas, patrones de quimiotipos y patogenicidad/agresividad, lo que puede tener un gran impacto en su interacción con el hospedante. La agresividad es un factor que determina la capacidad potencial de un aislado para causar pérdidas de rendimiento (Talas *et al.*, 2012).

F. oxysporum es un complejo de especies que abarca cepas genética y fenotípicamente diversas (Kang *et al.*, 2014), es ubicuo en el suelo y está presente en diversos ecosistemas como pastizales (Opperman y Wehner, 1994), bosques (Cabello y Arambarri, 2002) y desiertos (Mandee *et al.*, 2005). Aunque comúnmente se conocen como patógenos de plantas, pueden comportarse como saprófitos en el suelo o endófitos. Se presume que la mayoría de los aislados no son patógenos, lo que impide la diferenciación de las formas patogénicas a través de la morfología (Edel *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 2014). La virulencia ha sido, y sin duda seguirá siendo, un rasgo muy útil para la caracterización de la diversidad de *F. oxysporum* (Correll *et al.*, 1987). Esta especie, en sus diversas formas patógenas, es posiblemente la más dañina del género desde el punto de vista de las enfermedades de las plantas y causa pudrición de plántulas, raíces, bulbos, cormos y marchitamiento vascular en una amplia gama de cultivos en regiones templadas y tropicales. Dentro del complejo hay cepas que pudren la raíz y/o la base del tallo (Hermann y Lecomte, 2018). Suele ser la especie más abundante en la capa arable, según el número de propágulos por gramo de suelo encontrados en campos cultivados (Smith, 2007). En contraste con la amplia gama de hospedantes de la mayoría de las integrantes del complejo, algunas cepas son específicas (Armstrong y Armstrong, 1981). *F. oxysporum* puede actuar en forma sinérgica con nematodos, con otras especies del género y con otros géneros. Los aislados que causan marchitamiento vascular suelen ser específicos y se conocen más de 100 *forma specialis* (f. sp.)

y razas (Baayen y Waalwijk, 1997; Smith, 2007). El término f. sp. se agrega al binomio *F. oxysporum* y surge del nombre que designa al hospedante (Smith, 2007; Kang *et al.*, 2014), por ejemplo, *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis* (Gerlach) afecta al género botánico *Cyclamen*. Dentro de las f. sp. se han identificado razas debido a que la susceptibilidad vegetal varía entre cultivares (Walker, 1930).

Generalmente se considera que *F. oxysporum* solo se reproduce asexualmente, porque nunca se ha observado un teleomorfo en la naturaleza o inducido en el laboratorio (Kang *et al.*, 2014). Los microconidios son ovalados o elípticos, con una o dos células y se presentan solos o en agregados en falsas cabezas. Se producen en medios de cultivo líquidos y sólidos, en la rizosfera y dentro del sistema vascular de las plantas infectadas. Los macroconidios tienen tres a cinco tabiques, son gradualmente puntiagudos y curvados hacia los extremos (con forma de hoz) y se encuentran comúnmente en la superficie de las plantas muertas (Katan *et al.*, 1997). Las clamidosporas, de paredes gruesas, aseguran la supervivencia. Se producen de forma terminal o intercalada en el micelio maduro y pueden permanecer viables en el suelo durante muchos años, lo que limita a largo plazo la producción de cultivos en campos infestados (Kang *et al.*, 2014). El crecimiento en agar papa glucosa es flocoso con abundante micelio aéreo de coloración violácea pálida a rosada y márgenes irregulares, lobulados, aserrados o filiformes, sin pigmentos difusibles (Lombard *et al.*, 2018). *F. oxysporum* está citado como patógeno en 835 hospedantes de diferente importancia económica en el mundo, entre los que se encuentran integrantes de los géneros *Allium*, *Amaranthus*, *Brassica*, *Capsicum*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Coffea*, *Glycine*, *Lycopersicon*, *Petunia*, *Rosa*, *Triticum* y *Zea* (Farr y Rossman, 2023) y se lo ranqueó quinto en un listado de patógenos de importancia científica y económica (Dean *et al.*, 2012).

El complejo *Gibberella fujikuroi* (CGF) incluye numerosas especies fitopatógenas y productoras de toxinas (Kvas *et al.*, 2009). Pertenece al taxón monofilético que corresponde a la sección *Liseola*, con algunas especies ubicadas originalmente en otras secciones como *Discolor*, *Elegans* y *Lateritium* (Nelson *et al.*, 1983; Nirenberg y O'Donnell, 1998; O'Donnell *et al.*, 1998, 2000). La clasificación de especies en el CGF de modo morfológico, biológico y filogenético (Taylor *et al.*, 2000). De estos, el morfológico fue el más utilizado y ha dominado la taxonomía del género desde su establecimiento en 1809 (Kvas *et al.*, 2009). En base a este sistema, las especies se identifican principalmente según la forma y el tamaño de los macroconidios y microconidios y otros caracteres como la disposición aérea de los microconidios, la morfología de las células conidiógenas y la presencia de clamidosporas (Booth, 1971; Gerlach y Nirenberg, 1982; Nelson *et al.*, 1983; Leslie y Summerell, 2006).

Según estudios filogenéticos basados en análisis de múltiples genes, las especies de *Fusarium* en el CGF se pueden separar en tres grandes clados que de acuerdo con la hipótesis filogeográfica

de O'Donnell *et al.* (1998) tienen un origen asociado con las plantas hospedantes y se denominan africano, estadounidense y asiático. El asiático es el más pequeño de los tres (Kvas *et al.*, 2009) e integra a *Gibberella sacchari* (Speg.), *G. fujikuroi* (Sawada) y *G. intermedia* (Kuhlman), teleomorfos de *F. sacchari* (E.J. Butler), *F. fujikuroi* (Nirenberg) y *F. proliferatum* (Matsush.) (Leslie, 1995; Samuels *et al.*, 2001; Leslie *et al.*, 2005). En términos de morfología y biología, *F. fujikuroi* y *F. proliferatum* son muy similares y la aplicación de técnicas moleculares parece ser el método más efectivo y rápido para separarlos (Leslie *et al.*, 2007). Ambas especies producen microconidios en cabezas falsas y también en cadenas a partir de poli y monofiálides (Gerlach y Nirenberg, 1982) y no producen clamidosporas (Leslie y Summerell, 2006). Filogenéticamente, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, *F. globosum* (Rheeder, Marasas & P.E. Nelson) y *F. fractiflexum* (T. Aoki, O'Donnell & K. Ichik.) forman un grupo bien sustentado dentro del cual *F. proliferatum* está más estrechamente relacionado con *F. globosum* (Aoki *et al.*, 2001). Morfológicamente, *F. globosum* es bastante similar a *F. proliferatum* y *F. fujikuroi*, pero los microconidios globosos producidos individualmente o en racimos lo distinguen de ellos (Rheeder *et al.*, 1996). *F. fractiflexum* comparte caracteres morfológicos con *F. proliferatum* y *F. fujikuroi*, pero se distingue porque produce microconidios en cadenas geniculadas sobre el micelio aéreo (Leslie y Summerell, 2006).

En relación con las micotoxinas, *F. proliferatum* produce niveles más altos de fumonisinas que *F. fujikuroi* (Rheeder *et al.*, 2002; Fandohan *et al.*, 2003; Desjardins, 2006) y también produce eniatinas, fusaproliferina y fusarinas (Marasas *et al.*, 1986). Por otro lado, a excepción de una sola cepa de *F. konzum* (Zeller, Summerell & J.F. Leslie), *F. fujikuroi* es la única especie reconocida en el CGF productora de giberelinas (Malonek *et al.*, 2005). Tanto *F. proliferatum* como *F. fujikuroi* fueron reportados como productores de beauvericina, ácido fusárico y moniliformina (Marasas *et al.*, 1986; Logrieco *et al.*, 1998; Moretti *et al.*, 2007).

F. proliferatum produce abundante micelio aéreo que inicialmente es blanco, pero puede volverse púrpura violeta a medida que pasa el tiempo. Generalmente los pigmentos se producen en el agar y varían en intensidad desde casi incoloros hasta casi negros. *F. proliferatum* se ha recuperado de numerosos entornos en el mundo donde se lo asocia a 117 hospedantes (Farr y Rossman, 2023) tales como trébol en Estados Unidos (*Trifolium vesiculosum* Savi) donde causó hiperelongación del hipocótilo y el tallo, clorosis leve y decoloración de las raíces (Pemberton *et al.*, 1998), arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en Argentina donde ocasionó pudrición de raíces (Pérez *et al.*, 2011a), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en China donde provocó pudrición de raíces y marchitamiento (Ye *et al.*, 2020), al igual que en soja (*Glycine max* L.) en Canadá (Chang *et al.*, 2015), remolacha (*Beta vulgaris* L.) en China (Cao *et al.*, 2018) y ajo (*Allium sativum* L.) y cebolla (*Allium cepa* L.) en Argentina (Salvalaggio y Ridao, 2013).

F. fujikuroi genera un micelio blanco que se vuelve gris, violeta o magenta con la edad. La pigmentación en el agar varía desde ausente hasta naranja grisáceo, gris violeta, violeta oscuro o magenta oscuro (casi negro). Actualmente se encuentran reportadas 31 interacciones planta patógeno en el mundo (Farr y Rossman, 2023) entre las cuales la más representativa de la especie corresponde a la enfermedad del bakanae en arroz (*Oryza sativa* L.) que produce clorosis y elongación de hojas primarias probablemente inducidas por la producción de giberelina por parte del patógeno (Wulff *et al.*, 2010). Otros hospedantes en los que causa pudrición de tallos o raíces son nogal (*Juglans sigillata* Dode) (Han *et al.*, 2021a), acacia (*Acacia koa* A. Gray) (Dobbs *et al.*, 2021), fruto del dragón (*Hylocereus polyrhizus* (F.A.C.Weber)) (Masratul Hawa *et al.*, 2016) y soja (*Glycine max* L.) (Chang *et al.*, 2018). También se lo encontró asociado a pudriciones de fruto de banana (*Musa* sp.) (Abd Murad *et al.*, 2017), maíz (*Zea mays* L.) (Duan *et al.*, 2020) y ciruela (*Prunus domestica* Thunb.) (Long *et al.*, 2021).

Durante visitas a producciones de calibrachoa se detectaron plantas marchitas. En observaciones y estudios de laboratorio preliminares, prevalecieron los aislados del género *Fusarium*. Esto determinó la necesidad de profundizar los estudios, con el objetivo de identificar a las especies patógenas involucradas.

2.1.2. Materiales y métodos

a. Recolección de plantas enfermas

Se recorrieron semanalmente invernaderos ubicados en la localidad de Hurlingham, Buenos Aires, en busca de calibrachos sintomáticos. De mayo a diciembre de 2017 y de abril a noviembre de 2018 se colectaron plantas de las variedades INTA 06575, Overá Fucsia-INTA y Pampa Salmón-INTA que presentaban amarillamiento y marchitez (Figura 2.1.2.1) y se llevaron al laboratorio para su procesamiento.



Figura 2.1.2.1. Variedades de calibrachoa con síntomas de amarillamiento y marchitez. A) INTA 06575 (Barra 5 cm); B) Overá Fucsia-INTA (Barra 5 cm); C) Pampa Salmón-INTA (Barra 5 cm).

b. Aislamiento y conservación de microorganismos asociados

Se retiraron las plantas de sus macetas, se lavaron las raíces con agua corriente y se observaron los daños a ojo desnudo y con lupa. De las raíces dañadas se cortaron trozos de 1 cm de largo que se colocaron en placas de Petri con agar papa glucosa al 2 % pH 7 Merck (APG) previamente desinfectados por inmersión en etanol al 70 % durante un minuto, hipoclorito de sodio (20 g Cl/L de agua) durante otro minuto y enjuagados con agua destilada estéril. Las placas se incubaron a 24 ± 2 °C durante 5 días. Las colonias de hongos desarrolladas se subcultivaron en APG a igual temperatura para obtener aislados puros. A partir de éstos se prepararon suspensiones de esporas en agua destilada estéril. Se aplicó la técnica de diluciones seriadas y la posterior siembra en agar agua para coleccionar esporas de reciente germinación y transferirlas a nuevas placas con APG a fin de obtener cultivos monospóricos.

Se conservó cada aislado mediante diversos métodos, tanto bajo refrigeración como a temperatura ambiente. Por un lado, se prepararon tubos con APG en pico de flauta, con agua destilada estéril y con vaselina líquida autoclavados en los que se cultivó cada aislado durante 7 días para luego ser conservado a 4 °C. Por otro lado, se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 40 minutos en dos días consecutivos tubos de ensayo con sustrato Terrafertil® Grow Mix Tabaco en los que se sembraron discos de APG con crecimiento micelial, que fueron mantenidos según la metodología de Schneider (1958) con modificación del sustrato (Terrafertil® Grow Mix Tabaco en lugar de la mezcla tamizada de 2 partes de arcilla, 1 de compost y 1 de arena) y de la

temperatura (ambiental en lugar de 4 °C). Las conservaciones en vaselina y en agua destilada estéril se realizaron según la metodología de Stocco *et al.* (2010) a 4 °C. En la Figura 2.1.2.2 pueden observarse tubos de ensayo con los diversos métodos de conservación. Los aislados se depositaron en la colección de cultivos INTA IF.

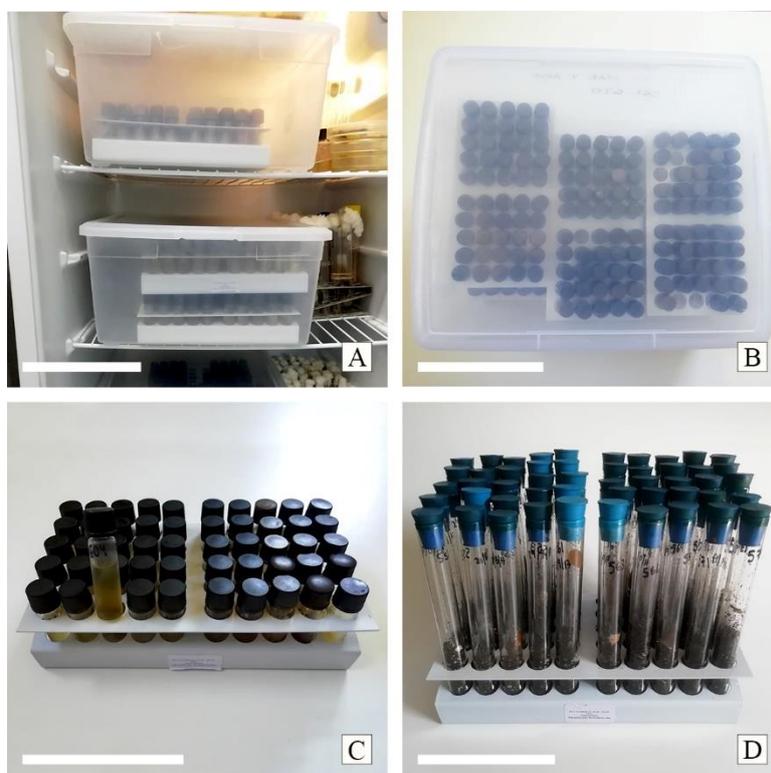


Figura 2.1.2.2. Conservación de aislados fúngicos. A) Cajas plásticas con tubos de ensayo en gradillas, en heladera a 4 °C (Barra 15 cm); B) Vista aérea de A (Barra 15 cm); C) Gradillas con tubos de ensayo a rosca con APG, agua destilada o vaselina (Barra 10 cm); D) Tubos con sustrato (Barra 10 cm).

c. Pruebas de patogenicidad

A los efectos de comprobar la patogenicidad de los aislados obtenidos, durante el mes de septiembre de 2018 se inocularon calibrachos de la variedad INTA 06575 cultivadas en macetas plásticas n° 10. El material vegetal se obtuvo por plantación de esquejes en bandejas multimacetas de 200 celdas con sustrato Terrafertil® Grow Mix Tabaco que fueron mantenidas bajo sistema Mist en invernadero y fertilización semanal con Hakaphos Rojo® (18-18-18). En el extremo basal de los esquejes se colocó la hormona de enraizamiento ácido indol butírico -IBA- en polvo (1.000 ppm). Transcurridos 60 días, los plantines fueron trasplantados a macetas n° 10 con sustrato Terrafertil® Z-Floricultura y mantenidos con adecuada provisión de riego y fertilización semanal con Hakaphos Rojo® (18-18-18) por el transcurso de 30 días (Figura 2.1.2.3).



Figura 2.1.2.3. Preparación de plantines de calibrachoa. A) Variedades en invernadero de plantas madre (Barra 15 cm); B) Esquejes de la var. INTA 06575 (Barra 5 cm); C) Colocación de IBA en esqueje (Barra 3 cm); D) Plantación de esqueje en bandeja multimaceta (Barra 3 cm); E) Bandejas con esquejes bajo sistema Mist en invernadero (Barra 20 cm); F) Plantines en macetas n° 10 bajo invernadero (Barra 30 cm).

Los aislados se cultivaron en APG durante 10 días a 24 ± 2 °C. Se obtuvieron suspensiones de esporas de los cultivos puros y se las estandarizó a una concentración de 1×10^6 conidios/mL de agua destilada estéril. Para inocular, se aplicaron las suspensiones a la base de las plantas, con gotero, a razón de 10 mL por maceta. Los testigos fueron tratados con agua destilada estéril. Se realizaron 6 repeticiones por cada tratamiento. Todas las plantas se dispusieron sobre una mesada del laboratorio y se mantuvieron a 24 ± 2 °C envueltas con bolsas de polietileno por 72 horas para favorecer el proceso de infección. Se registraron los síntomas aéreos durante 10 días y al finalizar el ensayo se retiraron las plantas de las macetas, se lavaron las raíces con agua corriente y se observaron bajo lupa. Por último, se reislaron los patógenos utilizando la metodología indicada para el aislamiento.

d. Identificación taxonómica

Los diferentes aislados de *Fusarium* se cultivaron en tubos de ensayo con APG preparado en forma artesanal (Nelson *et al.*, 1983) dispuesto en pico de flauta a 24 °C durante 7, 10, 14, 21, 25 y 28 días de modo tal de poder detectar los diversos estados de desarrollo de los cultivos. Se realizaron observaciones de las colonias a ojo desnudo y de las estructuras bajo microscopio

óptico. Se registró la coloración de las colonias tanto en el anverso como en el reverso de los tubos, el tipo de fiálides (mono o polifiálides), la disposición de los microconidios (en cadenas o falsas cabezas), el tamaño y forma de los macro y microconidios y la presencia de clamidosporas según Leslie y Summerell (2006).

Se realizaron estudios moleculares para complementar la identificación previamente descrita. Para la extracción de ADN se adaptó el protocolo de Aljanabi y Martinez (1997). Así, se cultivaron los distintos aislados en placas de Petri con 10 mL con PDB (caldo papa dextrosa) por una semana a 25 °C. Luego se procedió a recuperar el micelio y eliminar el exceso de líquido remanente utilizando papel de filtro. A cada muestra de micelio se la congeló con nitrógeno líquido y se molió hasta obtener un polvo fino que fue transferido a un tubo Eppendorf de 1,5 mL con 400 µL de buffer de extracción (NaCl 0,4 M). A cada muestra se le adicionaron 80 µL de SDS (dodecil sulfato de sodio) 2% y 20 µL de proteinasa K y se incubó a 55-65 °C durante una hora. Transcurrido ese tiempo se le añadieron 300 µL de una solución saturada de NaCl (concentración 4 M) a cada muestra, se mezclaron en un agitador Vortex 30 s a máxima velocidad y se centrifugaron 20 min a 15.000 *g*. El sobrenadante de cada muestra se transfirió a un nuevo microtubo, se le agregó isopropanol a igual volumen y se mezcló por inversión del tubo. Las muestras se incubaron hasta el día siguiente a -20 °C y se centrifugaron 15 min a 15.000 *g*. Una vez formados, los pellets se lavaron con 100 µL de etanol al 70 %, se centrifugaron durante 5 min y se secaron para suspenderlos en 50 µL de agua bidestilada estéril. La concentración de ADN se calculó con un espectrofotómetro a 260 nm.

La amplificación de fragmentos de ADN se realizó mediante la técnica de PCR en dos loci, la región TEF- α y la región IGS, con los cebadores descritos por Geiser *et al.* (2004) y Kawabe *et al.* (2005) respectivamente. Para la amplificación de la región TEF- α , los cebadores fueron: ef1: 5'-ATG GGT AAG GA(A/G) GAC AAG AC – 3' y ef2: 5'-GGA (G/A)GT ACC AGT (G/C)AT CAT GTT-3'. Para la amplificación de la región IGS, los cebadores fueron: FIGS11: 5' – GTA AGC CGT CCT TCG CCT CG – 3' y FIGS12: 5' – GCA AAA TTC AAT AGT ATG GC – 3'. En las Tablas 2.1.2.1 y 2.1.2.2 se detallan los reactivos utilizados para realizar las amplificaciones en cada caso.

Tabla 2.1.2.1. Condiciones de amplificación mediante la técnica de PCR para la región TEF- α .

Reactivo	Stock	Concentración Final	Volumen
Taq	5 U/ μ l	2,5 U	0,5 μ l
dNTPs	2 mM c/u	200 μ M c/u	5 μ l
ADN	-	70-300 ng	1 μ l
Cl ₂ Mg	25 mM	1,5 mM	3 μ l
Buffer	10x	1x	5 μ l
Primer ef1	5 μ M	0,5 μ M	5 μ l
Primer ef2	5 μ M	0,5 μ M	5 μ l
Agua	-	-	25,5 μ l

Tabla 2.1.2.2. Condiciones de amplificación mediante la técnica de PCR para la región IGS.

Reactivo	Stock	Concentración Final	Volumen
Taq	5 U/ μ l	2,5 U	0,5 μ l
dNTPs	2 mM c/u	200 μ M c/u	5 μ l
ADN	-	~ 125 ng	2,5 μ l
Cl ₂ Mg	25 mM	1,5 mM	3 μ l
Buffer	10x	1x	5 μ l
Primer FIGS11	5 μ M	0,5 μ M	5 μ l
Primer FIGS12	5 μ M	0,5 μ M	5 μ l
Agua	-	-	24 μ l

Una vez obtenidos, los productos de PCR se enviaron a Macrogen (Corea) para purificar y secuenciar en ambas direcciones. Las secuencias recibidas se limpiaron mediante el software Chromas (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>). Con el software Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) se alinearon las secuencias forward y reverse y con el software GeneDoc (<https://genedoc.software.informer.com/2.7/>) se obtuvo la secuencia consenso. Por último, para el BLAST del gen TEF- α se siguió la metodología de Torres-Cruz *et al.* (2021) que utiliza la información contenida en el Fusarium-ID para comparar las secuencias con una base de datos curada por especialistas. En cuanto a los resultados obtenidos para la región IGS, se realizó la comparación BLAST de nucleótidos con secuencias publicadas en el National Center for Biotechnology (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ya que aún no se cuenta con una base de datos definida por los especialistas.

e. Agresividad de los aislados

Una vez comprobada la patogenicidad de los aislados obtenidos como resultado del apartado 2.1.2.b, se avanzó en la caracterización estudiando su agresividad frente a distintos genotipos de calibrchoa. Para ello, se inocularon plantas de tres variedades (INTA 06575, Overá Fucsia-INTA y Pampa Salmón-INTA) con 9 aislados.

Los esquejes se plantaron en idénticas condiciones que las mencionadas en el apartado 2.1.2.c. Inicialmente se planteó un ensayo exploratorio. Se trasplantaron esquejes enraizados de las tres variedades de calibrachoa a macetas n° 12 y, transcurridos 60 días, se procedió a inocular las plantas según lo indicado en el apartado 2.1.2.c. Posteriormente se plantearon dos repeticiones del ensayo en macetas plásticas de 90 celdas de modo que cada aislado fue aplicado sobre 30 plantas de cada variedad.

El inóculo se preparó según la metodología mencionada en el apartado 2.1.2.c y se aplicó con gotero a razón de 3 mL por celda. Los testigos se trataron con agua. Las bandejas, cubiertas con bolsas de polietileno por 72 h para favorecer el proceso de infección, fueron dispuestas sobre una mesada en un diseño completamente aleatorizado (DCA) y se mantuvieron a 25° C y luz natural. Se realizaron 30 repeticiones de cada tratamiento.

Se evaluaron los siguientes parámetros: la severidad de daño aéreo (mediante una escala de síntomas y mediante el peso seco aéreo) y la severidad de daño radical (mediante una escala de síntomas y el peso seco de las raíces). Se registraron los síntomas aéreos a diario mediante una escala de severidad de 0 a 5 grados (Liu *et al.*, 1995), cuyos parámetros se presentan en la Tabla 2.1.2.4. Al finalizar el ensayo se retiraron las plantas de las celdas, se lavaron sus raíces con agua corriente y se estimaron los daños según una escala de 4 grados (Munkvold y O'Mara, 2002) que puede observarse en la Tabla 2.1.2.5.

Tabla 2.1.2.4. Escala de severidad de síntomas aéreos en ensayo de agresividad de aislados de *Fusarium* en variedades de calibrachoa.

Grado	Descripción
0	Sin síntomas
1	< 25 % de las hojas con síntomas
2	26-50 % de las hojas con síntomas
3	51-75 % de las hojas con síntomas
4	76-100 % de las hojas con síntomas
5	Planta muerta

Tabla 2.1.2.5. Escala de severidad de síntomas radicales en ensayo de agresividad de aislados de *Fusarium* en variedades de calibrachoa.

Grado	Descripción
1	Raíces laterales bien desarrolladas y leve a nula coloración marrón
2	Raíces laterales reducidas y > 0 a 25% del sistema radicular con coloración marrón
3	Raíces laterales escasas y > 25 a 50% del sistema radicular con coloración marrón
4	Raíces laterales casi ausentes y > 50% del sistema radicular con coloración marrón

Una vez evaluadas las variables previamente mencionadas, se procedió al pesaje de las plantas. Para esto, se separó la parte aérea de la radical, para pesarlas independientemente con una balanza de precisión Ohaus® Explorer E02140.

f. Rango de hospedantes de los aislados

Con el objetivo de aportar datos complementarios para caracterizar a los nueve aislados de *Fusarium* asociados con la podredumbre basal de calibrachoa, se procedió a explorar su rango de hospedantes potenciales. Para ello se utilizaron plantas de calibrachoa Pampa Salmón-INTA (*Calibrachoa hybrida*), petunia Dreams Burgundy (*Petunia × hybrida* hort. ex E. Vilm.), nierembergia Estrella INTA-JICA (*Nierembergia linariaefolia* Graham) y tomate Platense (*Lycopersicon esculentum* Mill.) de la familia Solanaceae y coral Movaje Red (*Salvia splendens* Sellow ex Nees) de la familia Lamiaceae. Las plantas de calibrachoa y nierembergia se obtuvieron por plantación de esquejes, tal como se menciona en el apartado 2.1.2.c. Los plantines de tomate, petunia y coral se obtuvieron por siembra en bandejas multimaceta de 200 celdas con sustrato Terrafertil® Grow Mix Tabaco y las plantulas fueron transferidas a macetas termoformadas n° 10 con sustrato Terrafertil® Z-Floricultura. Para la inoculación se utilizó la técnica descrita en 1.1.2.e. A los 9 aislados patógenos de calibrachoa, se agregó una cepa de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y otra de *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis* facilitadas por el CIDEFI-UNLP e ingresadas al cepario del Laboratorio de Sanidad del IF como INTA IF-648 e INTA IF-649 respectivamente. Una vez inoculadas, las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo a 24 °C con un régimen (luz:oscuridad) de 12:12 horas y riego a demanda, con 3 repeticiones por cada tratamiento.

Las plantas se observaron a diario para detectar el inicio de los síntomas y registrar su avance. Una vez finalizado el ensayo se retiraron las plantas de las macetas, se lavaron las raíces con agua corriente, se evaluó su estado general (a ojo desnudo y bajo lupa) y se realizaron observaciones de cortes (longitudinales y transversales) de tallos y ramas.

g. Análisis estadísticos

Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico InfoStat (InfoStat, 2007) y se concluyeron las pruebas a un nivel de significación del 0,05 %. Para las variables que cumplieron los supuestos de homogeneidad de las varianzas (prueba de Levene, valor $p > 0,05$) y de normalidad de los errores (prueba de Shapiro-Wilks, $p > 0,05$) y se avanzó con un análisis de varianza con la técnica DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002) para buscar diferencias entre las medias de

los tratamientos. En los casos donde al menos un supuesto no se cumplió, se realizó un ANOVA siguiendo la metodología descrita por Scheirer *et al.* (1976) con el estadístico H (cociente entre la suma de cuadrado de un efecto dividido el cuadrado medio total), que bajo la correspondiente hipótesis nula se distribuye como una variable chi-cuadrado con los grados de libertad de dicho efecto.

Para el análisis de los datos categóricos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, se generó un ranking a partir de las medias y se verificó la existencia de diferencias entre ellas. Para la comparación de las réplicas de ensayos se realizó un análisis de comparación de medias, individualizando cada tratamiento con un nivel de significación de 0,05.

Para el cálculo de la potencia se consideró la cantidad de tratamientos. La variancia se estimó con el cuadrado medio del error del ANOVA y la mínima diferencia a detectar se estableció como la diferencia de las medias muestrales.

2.1.3. Resultados y discusión

a. b. Recolección de plantas enfermas, aislamiento y conservación de microorganismos asociados

Entre los meses de mayo de 2017 y diciembre de 2018 se colectaron 34 plantas de variedades de calibrachoa con síntomas compatibles con el ataque de patógenos de suelo. En la totalidad de los casos se obtuvieron aislados fúngicos, de los cuales 80 % correspondió al género *Fusarium*, caracterizado por micelio hialino septado, y dependiendo de cada cepa, diversidad en las características de meso y microconidios. Las cepas fueron denominadas: INTA IF-534, INTA IF-535, INTA IF-536, INTA IF-538, INTA IF-559, INTA IF-566, INTA IF-567, INTA IF-569 e INTA IF-577. Todas las plantas afectadas presentaron sintomatología radical caracterizada por reducción de biomasa, coloración pardo oscura, descortezamiento y canchros, tal como puede observarse en la Figura 2.1.3.1.

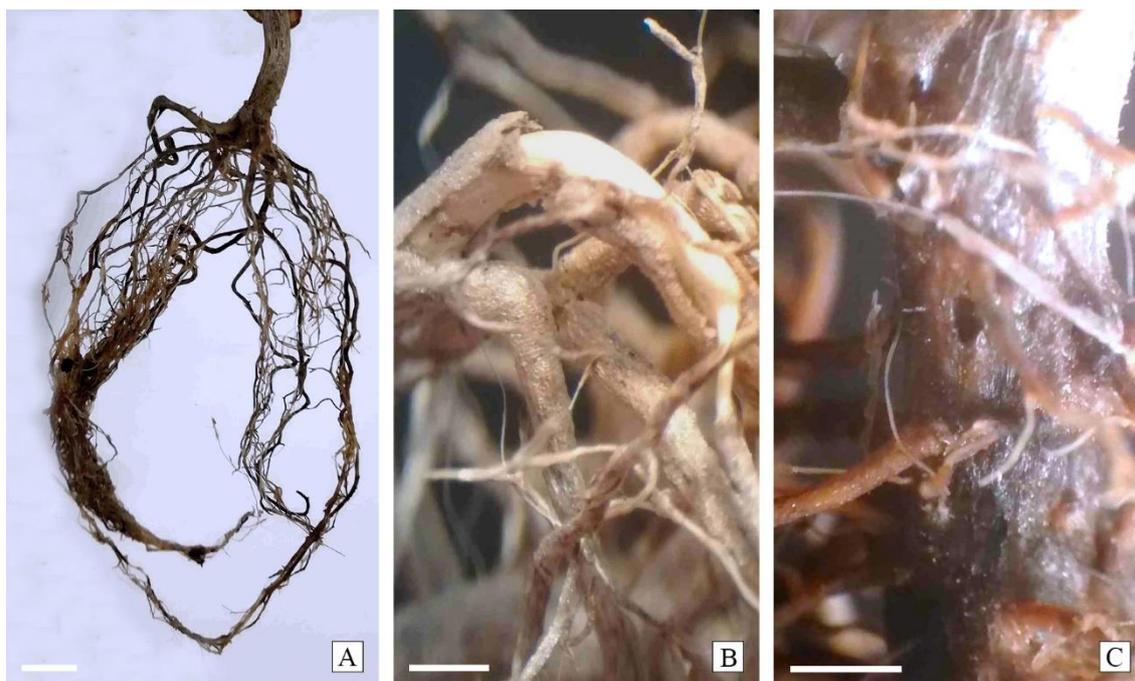


Figura 2.1.3.1. Raíces de calibrachoa con pudrición. A) Decoloración y descortezamiento (Barra 10 mm); B) Descortezamiento, pérdida de epidermis y exposición de vasos (Barra 0,25 mm); C) Cancro en raíz principal (Barra 0,5 mm).

Varias especies de *Fusarium* que se comportan como patógenos secundarios o saprófitos se aíslan con frecuencia de órganos vegetales, por lo que la identificación del agente causal de una enfermedad siempre requiere cierto conocimiento. Los postulados de Koch deben utilizarse como una herramienta para confirmar la patogenicidad, pero generalmente están más allá del alcance de los diagnósticos de laboratorio de rutina. Cuanto más tiempo haya estado enferma la planta y/o haya transcurrido desde el muestreo, más alta es la probabilidad de que otras especies de hongos además del patógeno, incluidas especies de *Fusarium*, hayan invadido el área enferma. Este problema es particularmente importante para los patógenos de suelo (Leslie y Summerell, 2006). En el caso en estudio, los monitoreos semanales permitieron realizar un seguimiento de los síntomas y observar la evolución de la enfermedad para realizar el diagnóstico de manera temprana.

Todos los aislados preservados pudieron recuperarse de la colección en los momentos necesarios para realizar los diferentes ensayos. De los cuatro medios de conservación probados (agar, agua destilada, vaselina y sustrato), los más efectivos fueron el agua destilada y la vaselina, que permitieron reestablecer las colonias en el 100 % de los casos. La conservación en sustrato fue la menos eficiente. En algunas circunstancias, los aislados conservados en agar y sustrato no crecieron. Esto motivó la repetición de las siembras o el rescate de las colonias por otro de los métodos.

Según la World Federation for Culture Collections (WFCC, 2010) el método de almacenamiento ideal mantiene la viabilidad de las cepas sin pérdida de virulencia, no provoca alteraciones en las características fisiológicas o morfológicas y permite una recuperación sencilla del material. Por seguridad, y con el fin de minimizar la probabilidad de pérdida de aislados, estos deben mantenerse mediante al menos dos procedimientos diferentes, siempre que sea posible. Es importante que los protocolos utilizados para mantener los aislados sean apropiados para cada organismo (Smith y Ryan, 2004). Windels *et al.* (1988) indicaron que la conservación en sustrato fue más eficiente a 4,5 °C que a temperatura ambiente (24 °C) por lo que sería interesante no descartar dicho método que en este estudio no resultó eficiente y evaluarlo nuevamente bajo refrigeración. Boix-Ruiz *et al.* (2015) reportaron que aislados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* expresaron patogenicidad luego de ser conservados por 23 años en vaselina. Fennell (1960) mencionó que el consumo de oxígeno de un cultivo fúngico sumergido bajo 1 cm de aceite mineral se reduce a un 10 % en pocas horas y que la disminución de la actividad metabólica se evidencia por el retraso del crecimiento y la esporulación. En lo que respecta a la conservación en medios de cultivo, la autora indica que para evitar el secado rápido del agar y el crecimiento continuo de los cultivos el almacenamiento en refrigerador a 5 °C da resultados satisfactorios para la mayoría de los hongos. Una desventaja de esta técnica es la necesidad de transferir los cultivos a otro tubo con medio de cultivo fresco con cierta periodicidad ya que los aislados no pueden permanecer indefinidamente en el mismo tubo, porque al seguir activos se acumulan productos tóxicos del metabolismo que generan el envejecimiento y muerte celular. La utilización de este método requiere disminuir la cantidad de inóculo y de ciertos nutrientes para frenar el crecimiento de manera considerable (García López y Uruburu Fernández, 2004).

c. Pruebas de patogenicidad

Para la totalidad de los aislados se completaron los postulados de Koch al observar síntomas tanto aéreos (Figura 2.1.3.2) como radicales (Figura 2.1.3.3) y reaislar los patógenos de las posteriores siembras de las raíces afectadas en medio de cultivo. Los síntomas comenzaron entre los 6 y 10 días desde la inoculación, con amarillamiento seguido de pérdida de turgencia en las zonas apicales que avanzó hacia las bases y finalizaron con la muerte de las plantas. Los aislados que generaron síntomas más prematuramente fueron INTA IF-534, 535, 536, 538 y 559 (6 días para los dos primeros y 8 para el resto). Los que mostraron mayor velocidad para generar marchitez fueron INTA IF-534, 535 y 559, con manifestación de sintomatología 16 y 18 días desde la inoculación, seguidos por INTA IF-536, 538, 566, 567 y 577 (26 días para el primero y 28 para el resto). INTA IF-569 fue el más lento en causar marchitez, que comenzó a los 30 días.

En un estudio realizado por Burlakoti *et al.* (2012) se evaluó la patogenicidad y virulencia de 98 aislados de *Fusarium* sp. en remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) se detectó que el 80 % de los aislados eran patógenos. Fueron necesarios de 13 a 23 días para la inducción de síntomas en los aislamientos altamente virulentos, de 15 a 21 para los moderadamente virulentos y de 17 a 38 para los menos virulentos. Nirmaladevi *et al.* (2016) evaluaron la patogenicidad de 69 aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate y determinaron la existencia de una población muy variable, con inicio de síntomas entre los días 15 y 20 desde la inoculación, en donde el 45 % de las cepas eran altamente virulentas, el 30 % moderadamente virulentas, el 18 % patógenas débiles y el 7 % no patógenas. Isaac *et al.* (2018) evaluaron de 40 aislados de *Fusarium* también en tomate y encontraron que los síntomas iniciaron entre los días 21 a 35 luego de la inoculación con clorosis apical y consecuente pérdida de turgencia y necrosis. En base a la evidencia presentada, se destacan los aislados INTA IF-534, 535, 536, 538 y 559 por la velocidad en la generación de síntomas en las plantas de calabrochoa y se categorizan como patógenos con elevada virulencia.

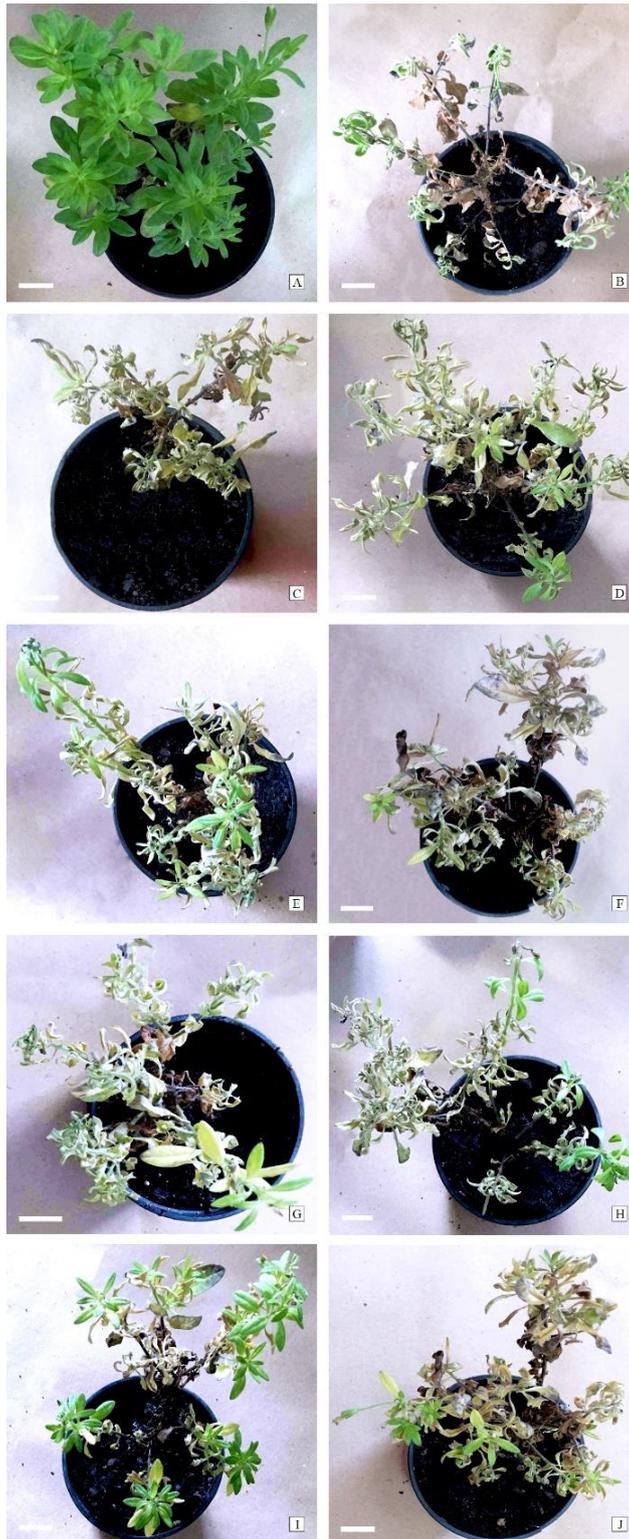


Figura 2.1.3.2. Daño aéreo ocasionado por aislados de *Fusarium* en calibrachoa INTA 06575 a los 26 días de la inoculación. A) Testigo; B) INTA IF-534; C) INTA IF-535; D) INTA IF-536; E) INTA IF-538; F) INTA IF-559; G) INTA IF-566; H) INTA IF-567; I) INTA IF-569; J) INTA IF-577. (Barras 2 cm).



Figura 2.1.3.3. Daño en raíces ocasionado por aislados de *Fusarium* en calibrachoa INTA 06575 a los 30 días de. A) Testigo; B) INTA IF-534; C) INTA IF-535; D) INTA IF-536; E) INTA IF-538; F) INTA IF-559; G) INTA IF-566; H) INTA IF-567; I) INTA IF-569; J) INTA IF-577. (Barras 2 cm).

d. Identificación taxonómica

En la Tabla 2.1.3.1 se resumen las características de los aislados utilizadas para su clasificación. Los aislados INTA IF-534, 535, 536 y 538 formaron microconidios en falsas cabezas y en cadenas a partir de mono o polifiálides, y no generaron clamidosporas. Los aislados INTA IF-559, 566, 567, 569 y 577 formaron microconidios en falsas cabezas partir de monofiálides y abundantes clamidosporas. En las Figuras 2.1.3.4, 2.1.3.5, 2.1.3.6 y 2.1.3.7 se muestra el desarrollo de los aislados de *Fusarium* en placas de Petri y en tubos de ensayo con medio de cultivo APG de obtención artesanal y el detalle de las características observadas bajo microscopio óptico. En la Tabla 2.1.3.2 se detallan los resultados de las identificaciones moleculares en donde pueden observarse los porcentajes de identidad de las cepas de *Fusarium* de calibrachoa con las que se encuentran en las bases de datos propuestas en la metodología. En tal sentido, al complementar la información molecular con los datos de las observaciones microscópicas, se confirmó la identidad de las cepas obtenidas.

Tabla 2.1.3.1. Características morfobiométricas de aislados de *Fusarium*.

Cepa	Monofiálide	Polifiálide	Falsas Cabezas	Cadenas	Largo x Ancho Microconidios (µm)	Clamidosporas	Largo x Ancho Macroconidios (µm)
INTA IF-534	Si	Si	Si	Si	7,6 (4,6-11,9) x 1,97 (1,3-2,9)	No	51,2 (33,2-74,5) x 3,0 (2,3-3,7)
INTA IF-535	Si	Si	Si	Si	8,6 (5,6-12,3) x 2,8 (1,6-4,2)	No	35,2 (30,4-47,8) x 3,7 (3,0-4,3)
INTA IF-536	Si	Si	Si	Si	7,8 (5,3-12,3) x 2,8 (1,9-3,6)	No	27,2 (21,7-37,0) x 3,1 (1,9-4,8)
INTA IF-538	Si	Si	Si	Si	7,2 (4,6-9,7) x 2,1 (1,3-2,9)	No	26,4 (21,5-30,4) x 3,3 (2,2-4,3)
INTA IF-559	Si	No	Si	No	5,8 (4,5-9,0) x 2,3 (1,6-3,6)	Si	-
INTA IF-566	Si	No	Si	No	8,1 (4,6-11,2) x 3,6 (2,6-4,9)	Si	-
INTA IF-567	Si	No	Si	No	7,2 (5,3-11,7) x 2,6 (1,9-3,4)	Si	-
INTA IF-569	Si	No	Si	No	8,8 (6,2-15,0) x 3,0 (2,5-3,7)	Si	-
INTA IF-577	Si	No	Si	No	9,5 (7,2-13,6) x 3,8 (2,3-4,8)	Si	-

La escasez general de caracteres morfológicos de diagnóstico complica la separación de especies similares y la descripción de especies nuevas dentro del CGF (Kvas *et al.*, 2009). Según el análisis de estas características, este complejo actualmente incluye 34 morfoespecies (O'Donnell *et al.*, 1998, 2000; Nirenberg y O'Donnell, 1998; Nirenberg *et al.*, 1998; Aoki *et al.*, 2001; Marasas *et al.*, 2001; Britz *et al.*, 2002; Zeller *et al.*, 2003; Geiser *et al.*, 2005), número que se amplía a 50 al utilizar análisis filogenéticos basados en las secuencias de varias regiones del ADN (Kvas *et al.*, 2009). Como *F. proliferatum* y *F. fujikuroi* no evidencian diferencias morfobiométricas que permitan su separación, es necesario complementar las observaciones con técnicas moleculares. Al margen de esto, aunque es posible reconocer todas las especies del CGF con dichas técnicas, su aplicación como método único puede producir resultados biológicamente no aceptables (Dayrat, 2005). Por lo tanto, estas técnicas generalmente se usan en combinación

con la microscopía clásica y los estudios de características biológicas (Klittich *et al.*, 1997; Zeller *et al.*, 2003). Este enfoque integrador también se extiende a las identificaciones de rutina donde los procedimientos de diagnóstico únicos no son suficientes para obtener conclusiones inequívocas (Leslie y Summerell, 2006; Dayrat, 2005; Will *et al.*, 2005; Kvas *et al.*, 2009). Los cultivos en APG de *F. proliferatum* y *F. oxysporum* parecen similares, pero estas especies se distinguen fácilmente por la presencia de microconidios en cadenas para *F. proliferatum* y la presencia de clamidosporas y microconidios en cabezas falsas para *F. oxysporum* (Leslie y Summerell, 2006) en coincidencia con la evidencia presentada en las Figuras 2.1.3.6 y 2.1.3.7.

Tabla 2.1.3.2. Identificación molecular de aislados de *Fusarium* mediante BLASTn del NCBI (IGS) y Fusarium-ID (TEF- α).

Cepa	Gen	BLAST	% Identidad	N° Acceso GeneBank
INTA_IF_534	TEF	<i>F. proliferatum</i>	99,2	OP784748
INTA_IF_534	IGS	<i>F. proliferatum</i>	99,3	OP479865
INTA_IF_535	TEF	<i>F. proliferatum</i>	99,0	OP784749
INTA_IF_535	IGS	<i>F. proliferatum</i>	99,8	OP479866
INTA_IF_536	TEF	<i>F. proliferatum</i>	99,0	OP784750
INTA_IF_536	IGS	<i>F. proliferatum</i>	99,5	OP479867
INTA_IF_538	TEF	<i>F. fujikuroi</i>	99,7	OP784751
INTA_IF_538	IGS	<i>F. fujikuroi</i>	99,8	OP479868
INTA_IF_559	TEF	<i>F. oxysporum</i>	99,8	OP784752
INTA_IF_559	IGS	<i>F. oxysporum</i>	100	OP479869
INTA_IF_566	TEF	<i>F. oxysporum</i>	99,8	OP784753
INTA_IF_566	IGS	<i>F. oxysporum</i>	100	OP479870
INTA_IF_567	TEF	<i>F. oxysporum</i>	99,4	OP784754
INTA_IF_567	IGS	<i>F. oxysporum</i>	100	OP479871
INTA_IF_569	TEF	<i>F. oxysporum</i>	99,8	OP784755
INTA_IF_569	IGS	<i>F. oxysporum</i>	100	OP479872
INTA_IF_577	TEF	<i>F. oxysporum</i>	99,7	OP784756
INTA_IF_577	IGS	<i>F. oxysporum</i>	100	OP479873

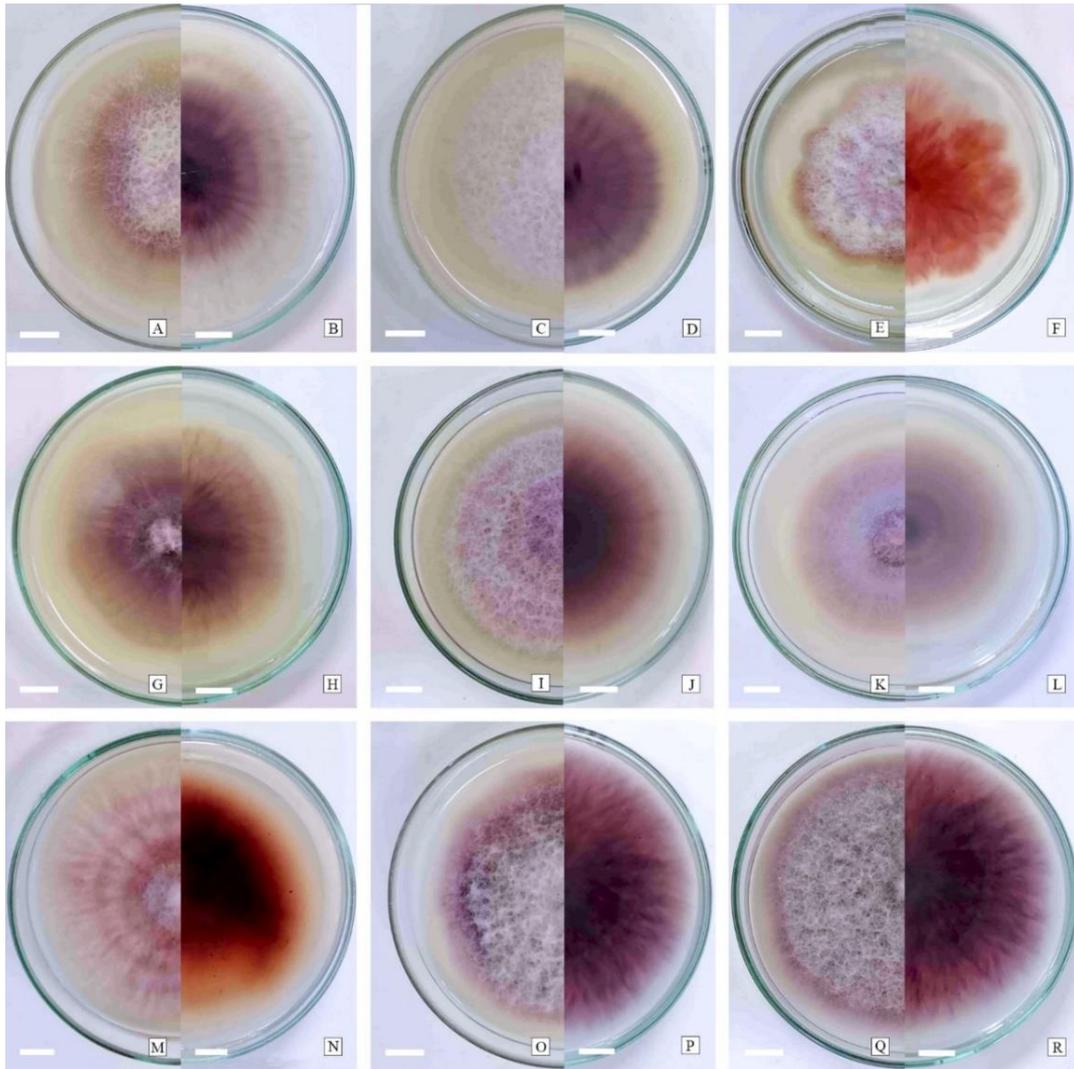


Figura 2.1.3.4. Aislados de *Fusarium* en APG. A) INTA IF-534 frente B) INTA IF-534 dorso; C) INTA IF-535 frente; D) INTA IF-535 dorso; E) INTA IF-536 frente; F) INTA IF-536 dorso; G) INTA IF-538 frente; H) INTA IF-538 dorso; I) INTA IF-559 frente; J) INTA IF-559 dorso; K) INTA IF-566 frente; L) INTA IF-566 dorso; M) INTA IF-567 frente; N) INTA IF-567 dorso; O) INTA IF-569 frente; P) INTA IF-569 dorso; Q) INTA IF-577 frente; R) INTA IF-577 dorso. (Barras 10 mm).

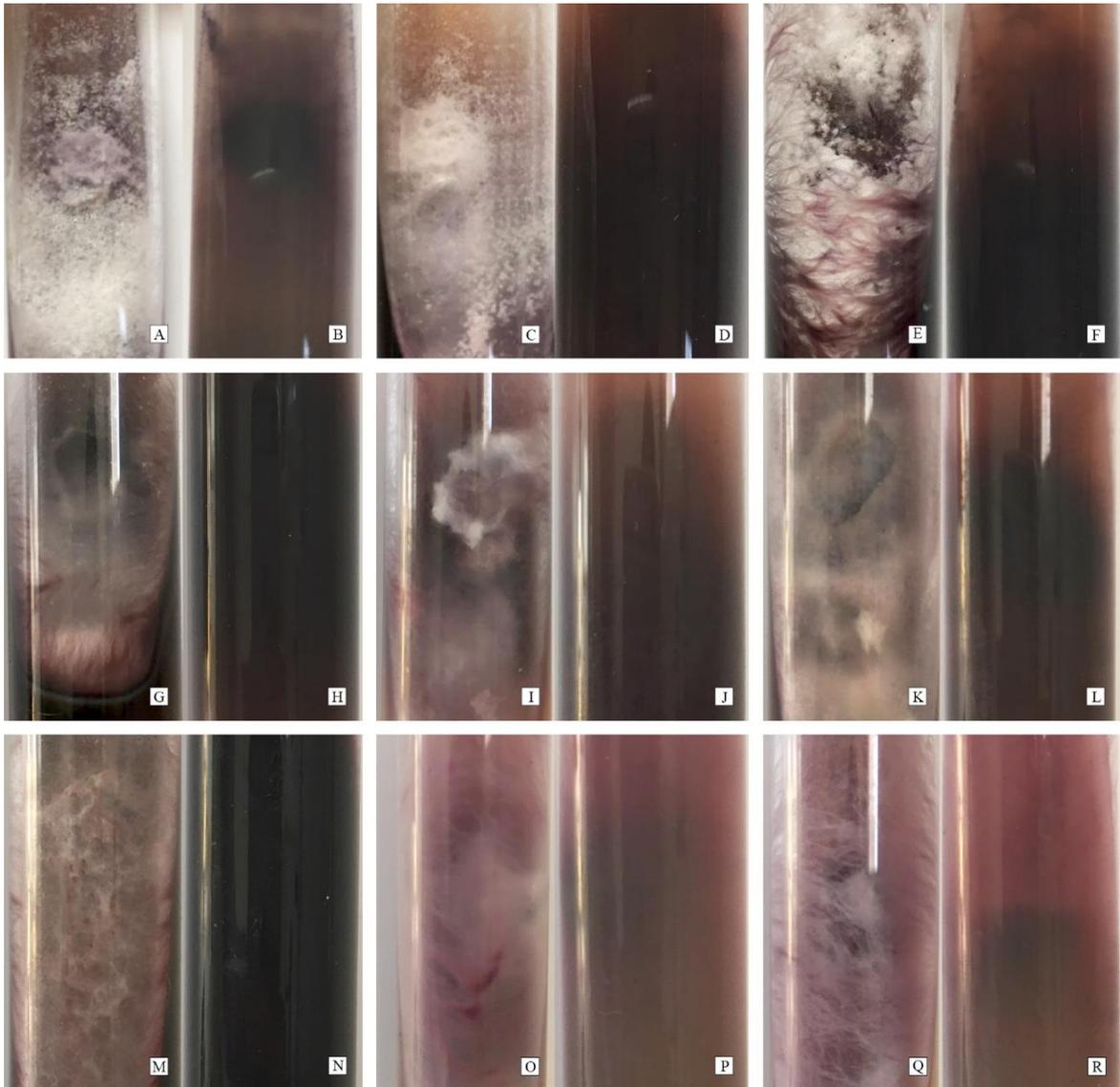


Figura 2.1.3.5. Aislados de *Fusarium* en tubos de ensayo con APG artesanal. A) INTA IF-534 frente B) INTA IF-534 dorso; C) INTA IF-535 frente; D) INTA IF-535 dorso; E) INTA IF-536 frente; F) INTA IF-536 dorso; G) INTA IF-538 frente; H) INTA IF-538 dorso; I) INTA IF-559 frente; J) INTA IF-559 dorso; K) INTA IF-566 frente; L) INTA IF-566 dorso; M) INTA IF-567 frente; N) INTA IF-567 dorso; O) INTA IF-569 frente; P) INTA IF-569 dorso; Q) INTA IF-577 frente; R) INTA IF-577 dorso.

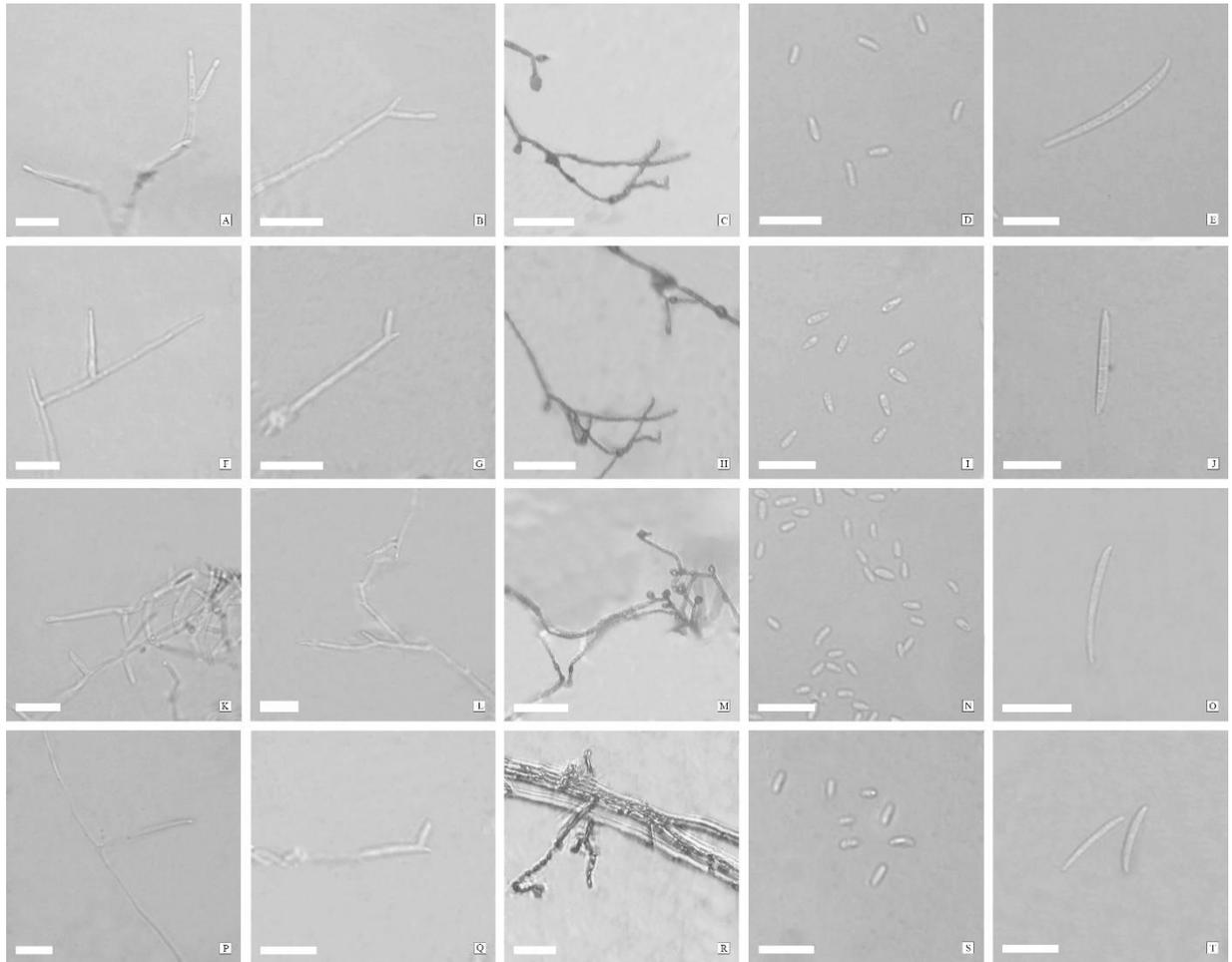


Figura 2.1.3.6. Detalle de estructuras reproductivas de *Fusarium* spp. A) Monofiálides de *F. proliferatum* (INTA IF-534) B) Polifialides de *F. proliferatum* (INTA IF-534); C) Falsas cabezas y cadenas de *F. proliferatum* (INTA IF-534); D) Microconidios de *F. proliferatum* (INTA IF-534); E) Macroconidios de *F. proliferatum* (INTA IF-534); F) Monofiálides de *F. proliferatum* (INTA IF-535); G) Polifialides de *F. proliferatum* (INTA IF-535); H) Falsas cabezas y cadenas de *F. proliferatum* (INTA IF-535); I) Microconidios de *F. proliferatum* (INTA IF-535); J) Macroconidios de *F. proliferatum* (INTA IF-535); K) Monofiálides de *F. proliferatum* (INTA IF-536); L) Polifialides de *F. proliferatum* (INTA IF-536); M) Falsas cabezas y cadenas de *F. proliferatum* (INTA IF-536); N) Microconidios de *F. proliferatum* (INTA IF-536); O) Macroconidios de *F. proliferatum* (INTA IF-536); P) Monofiálides de *F. fujikuroi* (INTA IF-538); Q) Polifialides de *F. fujikuroi* (INTA IF-538); R) Falsas cabezas y cadenas de *F. fujikuroi* (INTA IF-538); S) Microconidios de *F. fujikuroi* (INTA IF-538); E) Macroconidios de *F. fujikuroi* (INTA IF-538); (A, B, D, E, F, G, I, J, K, L, N, O, P, Q Barra = 20 μ m; C, H, M, R Barra = 50 μ m).

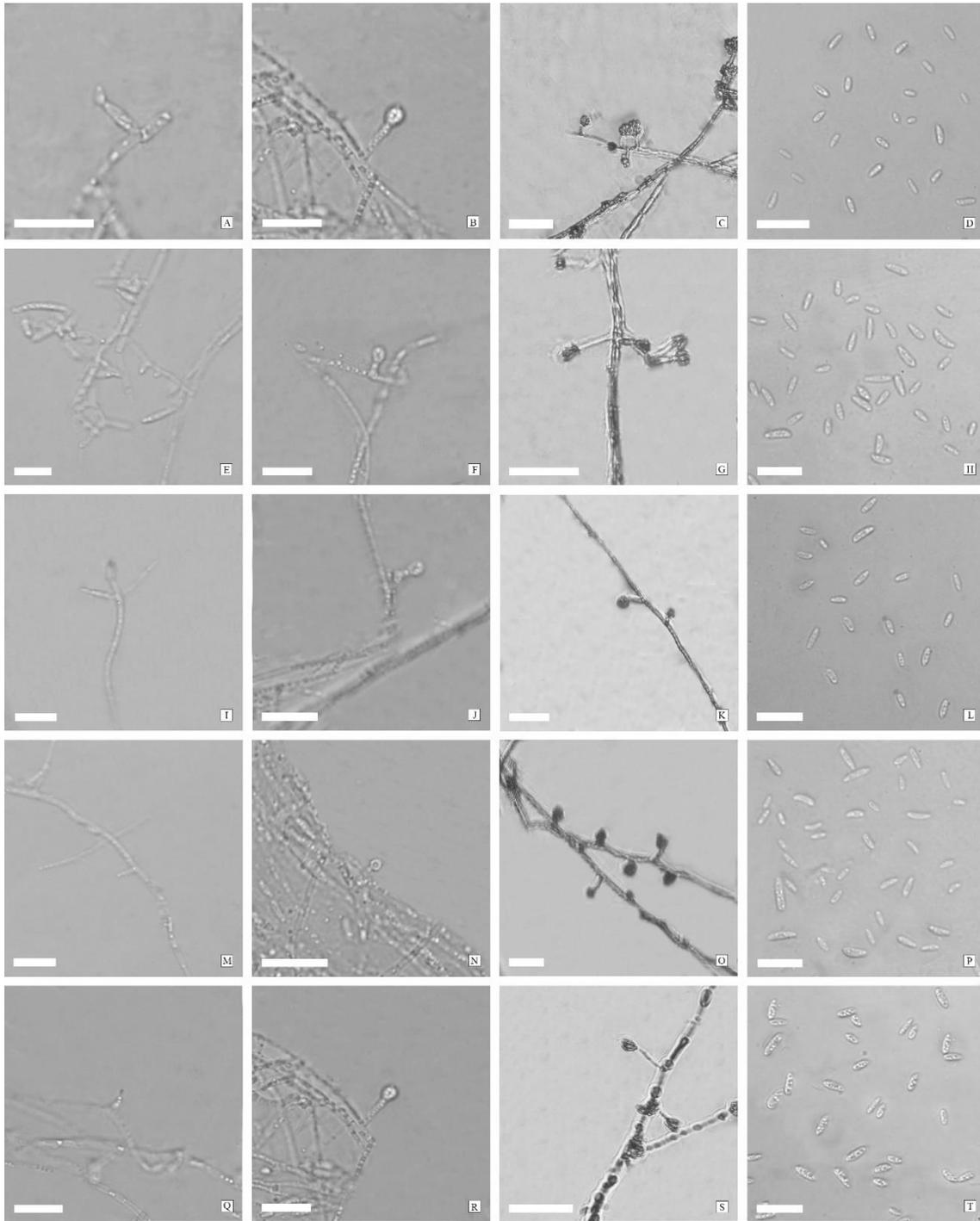


Figura 2.1.3.7. Detalle de estructuras reproductivas de *Fusarium* spp.. A) Monofiálides de *F. oxysporum* (INTA IF-559) B) Clamidosporas de *F. oxysporum* (INTA IF-559) C) Falsas cabezas de *F. oxysporum* (INTA IF-559); D) Microconidios de *F. oxysporum* (INTA IF-559); E) Monofiálides de *F. oxysporum* (INTA IF-566); F) Clamidosporas de *F. oxysporum* (INTA IF-566); G) Falsas cabezas de *F. oxysporum* (INTA IF-566); H) Microconidios de *F. oxysporum* (INTA IF-566); I) Monofiálides de *F. oxysporum* (INTA IF-567); J) Clamidosporas de *F. oxysporum* (INTA IF-567); K) Falsas cabezas de *F. oxysporum* (INTA IF-567); L) Microconidios de *F. oxysporum* (INTA IF-567); M) Monofiálides de *F. oxysporum* (INTA IF-569); N) Clamidosporas de *F. oxysporum* (INTA IF-569); O) Falsas cabezas de *F. oxysporum* (INTA IF-569); P) Microconidios de *F. oxysporum* (INTA IF-569); Q) Monofiálides de *F. oxysporum* (INTA IF-577); R) Clamidosporas de *F. oxysporum* (INTA IF-577); S) Falsas cabezas de *F. oxysporum* (INTA IF-577); T) Microconidios de *F. oxysporum* (INTA IF-577); (A, B, D, E, F, H, I, J, L, M, N, P, Q, R, T Barra = 20 μ m; C, G, K, O, S, Barra = 50 μ m).

e. Agresividad de los aislados

Severidad de daño aéreo (escala de síntomas aéreos)

En la Tabla 2.1.3.3 se muestran los grados de severidad estimados en los tres ensayos con variedades de calibrachoa inoculadas con 9 aislados de *Fusarium* de las distintas especies obtenidas, analizados en función de la agresividad del patógeno. De acuerdo con la escala utilizada, los grados más altos indican capacidad para producir síntomas más severos.

En el ensayo 1 (exploratorio), las plantas inoculadas con los aislados INTA IF-535, 536 y 566 no difirieron del testigo (tratado con agua), es decir que dichos aislados no mostraron patogenicidad mientras que el resto produjo enfermedad.

En el ensayo 2, todos los aislados generaron síntomas, INTA IF-535 y 536 ocasionaron los mayores daños.

En el ensayo 3, los aislados INTA IF-534 y 577 no mostraron patogenicidad e INTA IF-566 fue el que causó el mayor daño aéreo.

Tabla 2.1.3.3. Daños aéreos según escala en calibrachos inoculadas con aislados de *Fusarium* spp.

	Ensayo 1 exploratorio	Ensayo 2	Ensayo 3
Aislado	Escala aérea (ranking)	Escala aérea (ranking)	Escala aérea (ranking)
Testigo	22 a (0,0)	278 a (2,2)	99 a (0,2)
INTA IF-577	73 bc (2,6)	481 cd (3,8)	155 a (0,6)
INTA IF-569	72 bc (2,6)	444 bc (3,5)	304 bc (2,6)
INTA IF-535	43 ab (0,8)	523 d (4,1)	368 de (3,2)
INTA IF-566	53 ab (1,3)	412 bc (3,4)	415 e (4,1)
INTA IF-559	53 b (1,2)	392 b (3,2)	292 bc (2,3)
INTA IF-538	57 bc (1,6)	440 bc (3,5)	344 cd (2,8)
INTA IF-534	62 bc (1,6)	479 cd (3,8)	150 a (0,7)
INTA IF-536	49 ab (1,1)	523 d (4,6)	310 bcd (2,3)
INTA IF-567	67 bc (2,0)	428 bc (3,4)	268 b (1,9)

Los valores entre paréntesis indican el valor medio de escala.

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

En la Figura 2.1.3.8 se observan plantines de distintas variedades de calibrachoa inoculados, que presentan los distintos grados de severidad de la escala utilizada.

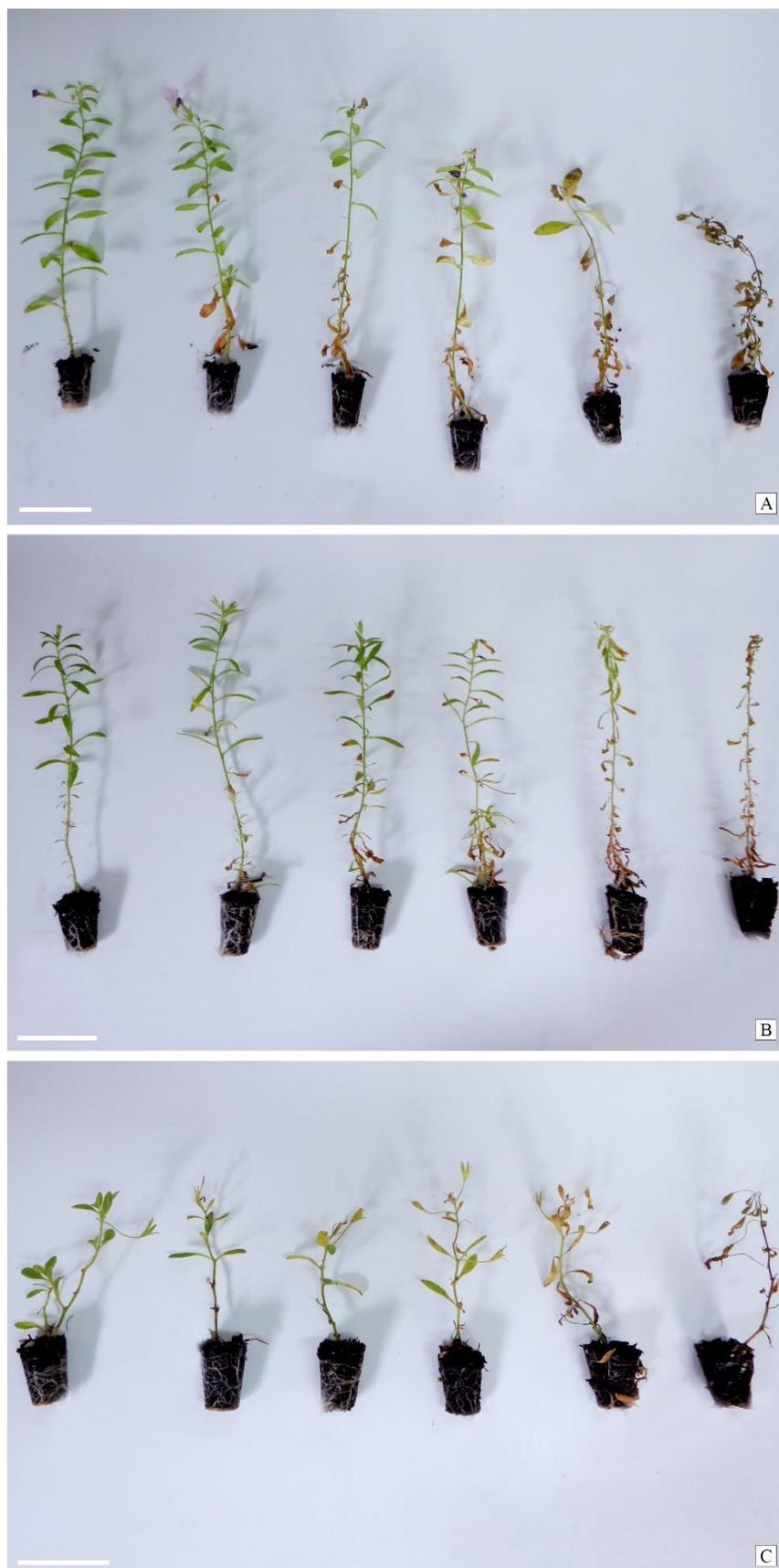


Figura 2.1.3.8. Escala de daño aéreo en variedades de calibrachoa (de izquierda a derecha, grados 0 a 5). A) INTA 06575; B) Pampa Salmón-INTA; C) Overá Fucsia-INTA. Barras 5 cm.

En la Tabla 2.1.3.4 se presenta la comparación entre los ensayos 2 y 3 respecto de los grados de daño aéreo. Se observa que únicamente el aislado INTA IF-569 no presentó diferencias significativas entre ensayos (valor $p= 0,0948$), lo que indica que tuvo un comportamiento constante. Entre los aislados restantes, sólo INTA IF-534 (valor $p < 0,0001$) y 566 (valor $p= 0,0146$) causaron síntomas más severos en el ensayo 3 que en el ensayo 2. El resto de los aislados produjo el resultado opuesto. Respecto del valor de la potencia, fue bajo (0,0658) debido a la alta variabilidad y la pequeña diferencia entre las medias muestrales.

Tabla 2.1.3.4. Daños aéreos según escala en calibrachos inoculados con aislados de *Fusarium* spp. Comparación de resultados de ensayos 2 y 3.

Aislado	Ensayo 2 (ranking)	Ensayo 3 (ranking)	Valor p
Testigo	1,5 a	0 b	0,0031
INTA IF-534	0,1 a	4 b	< 0,0001
INTA IF-535	0,1 a	4 b	< 0,0001
INTA IF-536	5 a	2 b	< 0,0001
INTA IF-538	4 a	2 b	< 0,0001
INTA IF-559	3 a	2 b	0,003
INTA IF-566	3 a	4 b	0,0146
INTA IF-567	4 a	1 b	< 0,0001
INTA IF-569	3 a	3 a	0,0948
INTA IF-577	4 a	0,6 b	< 0,0001

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Severidad de daño aéreo (peso seco de la parte aérea)

En la Tabla 2.1.3.5 se muestran los pesos secos aéreos registrados en los tres ensayos de las variedades de calibrachoa inoculadas con 9 aislados de *Fusarium*, analizados en función de la agresividad del patógeno.

En el ensayo 1 (exploratorio) no hubo diferencias significativas entre el peso seco aéreo de las plantas inoculadas y las plantas del tratamiento testigo (agua), es decir que ningún aislado disminuyó la materia seca.

En el ensayo 2 solo INTA IF-566 disminuyó el peso aéreo de las plantas respecto del testigo (34 %). En el ensayo 3, únicamente INTA IF-538, 536 y 566 redujeron el peso aéreo (en un 17, 14 y 14 % respectivamente).

Tabla 2.1.3.5. Peso seco de parte aérea en calibrachos inoculados con aislados de *Fusarium* spp.

	Ensayo 1 exploratorio	Ensayo 2	Ensayo 3
Aislado	Peso seco aéreo (mg)*	Peso seco aéreo (mg)*	Peso seco aéreo (mg)*
Testigo	743 ab	87 bcd	77 cde
INTA IF-577	777 ab	88 bcd	79 de
INTA IF-569	787 ab	78 b	68 abc
INTA IF-535	794 ab	77 b	70 abc
INTA IF-566	899 ab	57 a	66 ab
INTA IF-559	918 ab	101 d	72 bcd
INTA IF-538	926 ab	90 cd	64 a
INTA IF-534	928 ab	88 bcd	75 cde
INTA IF-536	980 b	81 b	66 ab
INTA IF-567	1036 b	85 bcd	82 e

*Valores medios. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

En la Tabla 2.1.3.6 se presentan los resultados de la comparación estadística entre los ensayos 2 y 3 para la variable peso seco aéreo. No se detectaron diferencias significativas entre las plantas testigo y las inoculadas con INTA IF-567 (valor $p = 0,6281$ y $0,8998$, respectivamente).

En el ensayo 2 hubo una menor reducción del peso seco aéreo que en el ensayo 3, para las inoculaciones con los aislados INTA IF-534, 535, 536, 538, 569 y 577 (valor $p = 0,0275$; $0,0144$; $0,0117$; $0,0175$; $< 0,0001$ y $0,0003$, respectivamente).

Por otro lado, en el ensayo 3 se observó menor reducción del peso seco aéreo que en el ensayo 2 para las inoculaciones con INTA IF-559 y 566 (ambos con valor $p < 0,0001$).

Con respecto a la potencia, tanto en los tratamientos testigo como INTA IF-567 se obtuvo un valor de 1, es decir que la comparación realizada es robusta respecto a las mínimas diferencias observadas y al nivel de significación de las pruebas.

Tabla 2.1.3.6. Peso seco de parte aérea en calibrachos inoculados con aislados de *Fusarium* spp.
Comparación de resultados de ensayos 2 y 3.

Aislado	Ensayo 2 (mg)	Ensayo 3 (mg)	Valor p
Testigo	78 a	75 a	0,6281
INTA IF-534	99 a	83 b	0,0275
INTA IF-535	85 a	67 b	0,0144
INTA IF-536	89 a	68 b	0,0117
INTA IF-538	90 a	68 b	0,0175
INTA IF-559	12 a	78 b	< 0,0001
INTA IF-566	12 a	64 b	< 0,0001
INTA IF-567	76 a	75 b	0,8998
INTA IF-569	105 a	66 a	< 0,0001
INTA IF-577	108 a	78 b	0,0003

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Severidad daño radical (escala de síntomas en raíz)

En la Tabla 2.1.3.7 se muestran los grados de severidad estimados en los tres ensayos con variedades de calibrachoa inoculadas con 9 aislados de *Fusarium*, analizados en función de la agresividad del patógeno. De acuerdo con la escala utilizada, los grados más altos indican capacidad para producir síntomas más severos.

Puede observarse que en el ensayo 1 (exploratorio) no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos.

En el ensayo 2 todos los aislados de *Fusarium* generaron daños y difirieron del testigo con aplicación de agua ($p < 0,05$). Los daños visualmente más significativos los produjeron los aislados INTA IF-567 e 566, mientras que los aislados INTA IF-559 y 538 produjeron daños más leves. En cuanto al ensayo 3, excepto para el aislado INTA IF-577, todos los restantes generaron diferencias en la escala de daño radical, con evidencia de patogenicidad. Los aislados INTA IF-569, 535 y 566 produjeron los daños más elevados mientras que los aislados INTA IF-559, 538 y 534 mostraron los más leves.

Tabla 2.1.3.7. Daño radical en calibrachoas inoculadas con aislados de *Fusarium* spp.

Aislado	Ensayo 1 exploratorio	Ensayo 2	Ensayo 3
	Escala radical (ranking)	Escala radical (ranking)	Escala radical (ranking)
Testigo	2 a (2,6)	273 a (2,5)	97 a (1,5)
INTA IF-577	3 a (2,3)	513 de (3,2)	88 a (1,4)
INTA IF-569	2 a (2,7)	395 bc (2,9)	358 c (4,3)
INTA IF-535	3 a (2,3)	451 cd (3,1)	360 c (4,3)
INTA IF-566	3 a (2,0)	581 ef (3,5)	369 c (4,3)
INTA IF-559	3 a (2,2)	362 b (2,8)	271 b (3,4)
INTA IF-538	3 a (2,4)	364 b (2,8)	289 b (3,6)
INTA IF-534	2 a (2,9)	395 bc (2,9)	277 b (3,5)
INTA IF-536	3 a (1,8)	520 de (3,3)	282 b (3,6)
INTA IF-567	2 a (2,9)	651 f (3,7)	314 bc (3,8)

Los valores entre paréntesis indican el valor medio de escala.

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

En la Figura 2.1.3.9 pueden observarse las escalas de daño radical utilizadas; las fotografías muestran plantines de cada variedad con distintos grados de severidad.

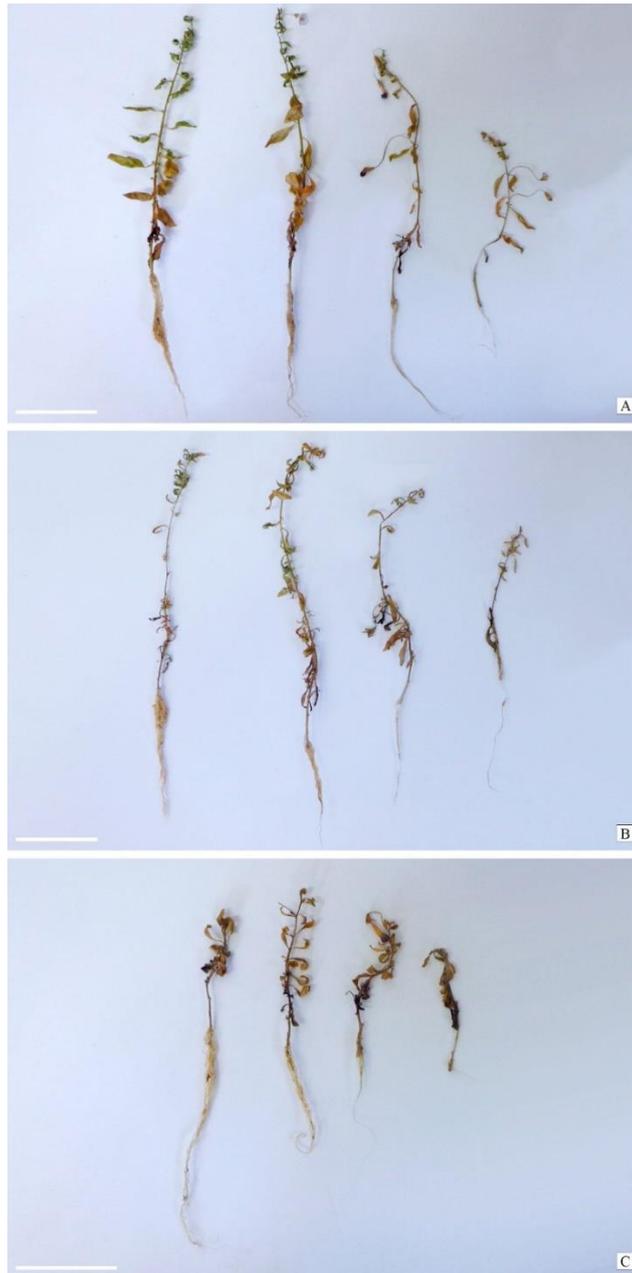


Figura 2.1.3.9. Escala de daño radical en variedades de calibrachoa (de izquierda a derecha, grados 1 a 4). A) INTA 06575; B) Pampa Salmón-INTA; C) Overá Fucsia-INTA. Barras 5 cm.

En la Tabla 2.1.3.8 se observa la comparación de los resultados de los ensayos 2 y 3 de estimaciones mediante la escala de daño radical. Los tratamientos testigo (agua) e INTA IF-577 presentaron mayor daño en el ensayo 2 que en el 3 (en ambos casos valor $p < 0,0001$). Los aislados INTA IF-535 y 569 (ambos con valor $p < 0,0001$), generaron mayor daño radical en el ensayo 3. Para el resto de los aislados (INTA IF-534, 536, 538, 559, 566 y 567) no se detectaron diferencias significativas entre ambos ensayos. Los valores de potencia para tales aislados (0,0540; 0,0523; 0,0526; 0,0538; 0,0543 y 0,0567 respectivamente) no son elevados, ya que la diferencia mínima a encontrar es baja respecto al número de repeticiones propuesto.

Tabla 2.1.3.8. Daño radical en calibrachoas inoculadas con aislados de *Fusarium* spp.
Comparación de resultados de ensayos 2 y 3

Aislado	Ensayo 2 (ranking)	Ensayo 3 (ranking)	Valor p
Testigo	2 a	1 b	< 0,0001
INTA IF-534	3 a	3 a	0,16
INTA IF-535	3 a	4 b	< 0,0001
INTA IF-536	3 a	3 a	0,87
INTA IF-538	3 a	3 a	0,36
INTA IF-559	3 a	3 a	0,86
INTA IF-566	3 a	4 a	0,08
INTA IF-567	4 a	3 a	0,26
INTA IF-569	3 a	4 b	< 0,0001
INTA IF-577	3 a	1 b	< 0,0001

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Severidad de daño radical (peso seco de raíz)

En la Tabla 2.1.3.9 se muestran los resultados (analizados según el factor cepa) de los tres ensayos con las variedades de calibrachoa inoculadas con los 9 aislados de *Fusarium* en estudio. Puede observarse que el análisis estadístico para el ensayo 1 (exploratorio) no detectó diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0,05$). Al margen de esto -numéricamente- los aislados INTA IF-569 y 577 redujeron el peso seco de las raíces de las plantas con respecto al testigo (agua).

Con respecto al ensayo 2, los aislados INTA IF-567, 577, 559, 538 y 534 fueron estadísticamente idénticos al testigo, mientras que INTA IF-536, 535 y 569 disminuyeron el peso seco radical (62, 39 y 37 % respectivamente) con evidencia de patogenicidad. En contraposición, el aislado INTA IF-566 generó aumentos en el peso seco de raíz respecto del testigo (140 %). En el tercer ensayo, tres aislados se comportaron de manera similar al testigo (INTA IF-536, 534 y 577), mientras que seis aislados tuvieron la capacidad de disminuir significativamente el peso seco de las raíces en distintos porcentajes: INTA IF-566 (61 %), 569 (36%), 538 (31%), 559 (30 %), 567 (26 %) y 535 (24 %).

Tabla 2.1.3.9. Peso seco de raíces en calibrachos inoculados con aislados de *Fusarium* spp.

	Ensayo 1 exploratorio	Ensayo 2	Ensayo 3
Aislado	Peso seco raíz (mg)*	Peso seco raíz (mg)*	Peso seco raíz (mg)*
INTA IF-569	192 a	9 ab	9 b
INTA IF-577	199 a	12 bc	16 d
Testigo	202 a	15 c	14 d
INTA IF-559	240 a	12 bc	10,5 b
INTA IF-567	247 a	10 abc	10 bc
INTA IF-534	261 a	14 c	13 cd
INTA IF-538	262 a	13 bc	10 b
INTA IF-566	289 a	36 d	5 a
INTA IF-535	298 a	9 ab	10 bc
INTA IF-536	311 a	6 a	12 cd

*Valores medios. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

En la Tabla 2.1.3.10 se muestra el resultado de la comparación estadística de los ensayos 2 y 3. La inoculación con los aislados INTA IF-536 y 577 generó peso seco significativamente mayor en el ensayo 3 que en el 2 (valor $p < 0,0001$ y $0,0031$, respectivamente). En contraposición, la inoculación con los aislados INTA IF-566 y 569 presentó mayor peso seco radical en el ensayo 2 que en el ensayo 3 (valor $p < 0,0001$ y $0,0160$, respectivamente). En el resto de los tratamientos (testigo, INTA IF-534, 535, 538, 559 y 567) no se encontraron diferencias significativas en el peso seco radical entre ambos ensayos.

Respecto de la potencia del análisis estadístico, para los tratamientos testigo, INTA IF-534, 535, 559 y 567 se obtuvieron valores bajos ($0,4793$; $0,3697$; $0,4971$; $0,3676$ y $0,2318$ respectivamente) ya que la diferencia mínima a encontrar fue baja respecta al número de repeticiones propuesto. Sin embargo, en el caso de la cepa INTA IF-538 se obtuvo un valor elevado de potencia ($0,9852$) ya que la diferencia mínima significativa fue superior a los tratamientos previamente mencionados.

Tabla 2.1.3.10. Peso seco de raíces en calibrachos inoculados con aislados de *Fusarium* spp.
Comparación de resultados de ensayos 2 y 3

Aislado	Ensayo 2 (mg)	Ensayo 3 (mg)	Valor p
Testigo	15 a	16 a	0,607
INTA IF-534	15 a	18 a	0,154
INTA IF-535	10 a	12 a	0,303
INTA IF-536	7 a	14 b	< 0,0001
INTA IF-538	13 a	13 a	0,938
INTA IF-559	12 a	10 a	0,396
INTA IF-566	79 a	7 b	< 0,0001
INTA IF-567	9 a	10 a	0,514
INTA IF-569	11 a	7 b	0,016
INTA IF-577	13 a	19 b	0,003

Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

A partir de los resultados hasta aquí presentados, puede afirmarse que el comportamiento de los aislados de *Fusarium* inoculados en las distintas variedades de calibrachoa fue muy diverso. La categorización de los aislados en estudio por su agresividad resultó dificultosa por la poca constancia de los resultados obtenidos. INTA IF-535 (*F. proliferatum*) tuvo un comportamiento constante en la generación de daños aéreos y radicales (cuantificados según grados en escalas) y en la disminución del peso seco radical. INTA IF-536 (*F. proliferatum*) mostró capacidad para infectar a las distintas variedades de calibrachoa, con un desempeño diferencial respecto del resto de los aislados. Se destacó por causar daños (según escalas) en la parte aérea y radical y por disminuir el peso aéreo y radical de las plantas. INTA IF-559, INTA IF-566 e INTA IF-567 (*F. oxysporum*) produjeron daños aéreos o radicales de menor magnitud (INTA IF-559 solo disminuyó el peso seco radical en el ensayo 3, INTA IF-566, disminuyó el peso seco aéreo en ambos ensayos, pero aumentó el peso seco radical en el ensayo 2 e INTA IF-567 disminuyó el peso seco aéreo y radical solo en el ensayo 3).

Burlakoti *et al.* (2012) evaluaron la agresividad de distintas especies de *Fusarium*, incluida *F. oxysporum*, en remolacha azucarera y concluyeron que la frecuencia de aislamientos patógenos y el grado de virulencia fue variable. Masratul Hawa *et al.* (2016) evaluaron 40 aislados de *F. fujikuroi* patógenos de fruto del dragón (*Hylocereus polyrhizus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose), detectaron diferencias significativas de agresividad y categorizaron a cinco aislados como altamente agresivos, 15 como moderadamente agresivos y 20 como de baja agresividad. En estudios desarrollados por Clavijo Castro (2014) en variedades de ají (*Capsicum annum* L.) inoculadas con *Fusarium* spp., se seleccionaron 20 aislados de los 70 bajo estudio por su elevada capacidad para provocar marchitamiento, lo que puso en evidencia la capacidad diferencial para generar daño en un hospedante.

El comportamiento desigual de los aislados evaluados de *Fusarium* spp. al establecer una relación parasítica con su hospedante podría explicarse por diferencias genéticas entre especies y cepas. Miedaner (1996) evaluó la base genética de la agresividad de 42 aislados de *F. culmorum* en centeno (*Secale cereale* L.) en cinco ambientes distintos, encontró que el comportamiento de los aislados fue similar en los ambientes estudiados y que una alta proporción de la variabilidad fenotípica estuvo controlada por varios genes. Las diferencias cuali y cuantitativas en la producción de enzimas y toxinas son posibles causas de la gran variación en agresividad. Cuomo *et al.* (2007) consideraron que las diferencias en la agresividad de *F. graminearum* como agente causal del tizón de la espiga del trigo y la cebada, estarían relacionadas con las diferencias de secuencia en los genes que se expresan durante la infección de la planta. De Vega Bartol *et al.* (2011) en estudios en poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) observaron que el factor de transcripción *ftf1* (*Fusarium* transcription factor 1) solo se expresa durante las infecciones y que las cepas altamente agresivas poseen múltiples copias de este gen. Por su parte Pariaud *et al.* (2009) mencionaron que la producción de micotoxinas (que inducen necrosis en las plantas) generalmente se considera un componente de la agresividad, pero la relación entre la severidad de la enfermedad y la producción de micotoxinas no es directa. Tradicionalmente, se supone que la agresividad está determinada poligénicamente (al igual que la mayoría de los rasgos cuantitativos), sin embargo, tanto la evidencia experimental como la teoría siguen siendo escasas, y aún queda mucho por investigar sobre las modalidades de adaptación de los patógenos a sus hospedantes para los rasgos cuantitativos. Por lo tanto, es necesario acumular conocimientos sobre determinantes genéticos y ambientales de la agresividad, y la capacidad de los patógenos para responder a las presiones de selección impuestas por las resistencias cuantitativas del hospedante (Pariaud *et al.*, 2009).

La mayoría de los estudios que vinculan la agresividad con el ambiente son limitados al efecto de la temperatura. Es bien sabido que esta influye en el desarrollo de los patógenos, así como en la expresión de la resistencia del hospedante. Su efecto sobre los componentes de agresividad se ha establecido para muchas especies patógenas y presenta un óptimo para la germinación de esporas, el desarrollo de lesiones y la esporulación. Sin embargo, la respuesta puede diferir entre individuos (Milus *et al.*, 2006).

A la vista de los resultados obtenidos, es necesario seguir profundizando mediante experimentos que clarifiquen los mecanismos mediante los cuales las especies y los aislados de *Fusarium* patógenos de calibrchoa ejercen su acción. A pesar de que en muchos casos no se observó consistencia en los resultados, el presente estudio permitió categorizar a los aislados INTA IF 535 y 536 como alta y medianamente agresivos.

f. Rango de hospedantes de los aislados

La Tabla 2.1.3.11 muestra los resultados de la inoculación de los aislados de *Fusarium* en las especies vegetales bajo estudio. En la misma pueden observarse tanto resultados positivos como negativos de patogenicidad.

Al analizar los resultados desde el punto de vista de la respuesta del hospedante, calibrachoa Pampa Salmón-INTA expresó síntomas en todos los casos, excepto cuando fue inoculada con INTA IF-649 (*F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis*) e INTA IF-648 (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*). Los síntomas se iniciaron con clorosis apical y curvado de folíolos (en 7 días para los aislados INTA IF-534, 535, 536 y 559 y en 10 a 12 días para los aislados INTA IF-538, 566, 567, 569 y 577). Se generalizó la clorosis, las plantas perdieron turgencia y se marchitaron entre los 14 a 24 días de la inoculación. Las plantas inoculadas con los aislados INTA IF-534, 535, 536 y 559, que iniciaron síntomas más tempranamente, se marchitaron más rápido (Figura 2.1.3.10).

Las plantas de nierembergia solo se enfermaron cuando fueron inoculadas con los aislados INTA IF-559 y 566. Los síntomas se iniciaron con clorosis apical (14 días desde la inoculación para el primero y 16 para el segundo), pérdida de turgencia y marchitez generalizada (25 días desde la inoculación para el primero y 23 para el segundo) tal como puede observarse en la Figura 2.1.3.11. Las plantas de petunia inoculadas con los aislados INTA IF-534, 535, 536 y 559 mostraron clorosis en las hojas apicales a los 11 días de la inoculación, seguida de pérdida de turgencia (14 días desde la inoculación para los aislados INTA IF-534, 535 y 559 y 17 días para INTA IF-536) y marchitez (18 días desde la inoculación para INTA IF-534, 535 y 559 y 23 para INTA IF-536) tal como se evidencia en la Figura 2.1.3.12.

En cuanto a las evaluaciones sobre tomate, los aislados patógenos de calibrachoa y cyclamen no generaron síntomas, mientras que el aislado INTA IF-648 (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) los produjo. A los 11 días de la inoculación comenzó a observarse clorosis en hojas basales de uno de los laterales de la planta. Las mismas perdieron turgencia y se marchitaron en 18 días, con el avance de estos síntomas en sentido acrópeto. La muerte de las plantas ocurrió a los 31 días desde la inoculación (Figura 2.1.3.13). Los testigos se mantuvieron sin síntomas.

En lo que respecta a las pruebas de patogenicidad en salvia, en todos los casos fueron negativas, ya que las plantas no mostraron síntomas.

Tabla 2.1.3.11. Pruebas de patogenicidad de 10 aislados de *Fusarium* en diversas familias botánicas.

Especie y Variedad vegetal	Aislado	Especie	Patogenicidad*
Calibrachoa Pampa Salmón-INTA	-	-	-
Calibrachoa Pampa Salmón-INTA	INTA IF-534	<i>F. proliferatum</i>	+
Calibrachoa Pampa Salmón-INTA	INTA IF-535	<i>F. proliferatum</i>	+
Calibrachoa Pampa Salmón-INTA	INTA IF-536	<i>F. proliferatum</i>	+
Calibrachoa Pampa Salmón-INTA	INTA IF-538	<i>F. fujikuroi</i>	+
Calibrachoa Pampa Salmón-INTA	INTA IF-559	<i>F. oxysporum</i>	+
Calibrachoa Pampa Salmón-INTA	INTA IF-566	<i>F. oxysporum</i>	+
Calibrachoa Pampa Salmón-INTA	INTA IF-567	<i>F. oxysporum</i>	+
Calibrachoa Pampa Salmón-INTA	INTA IF-569	<i>F. oxysporum</i>	+
Calibrachoa Pampa Salmón-INTA	INTA IF-577	<i>F. oxysporum</i>	+
Calibrachoa Pampa Salmón-INTA	INTA IF-648	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	-
Calibrachoa Pampa Salmón-INTA	INTA IF-649	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cyclaminis</i>	-
Nierembergia Estrella INTA-JICA	-	-	-
Nierembergia Estrella INTA-JICA	INTA IF-534	<i>F. proliferatum</i>	-
Nierembergia Estrella INTA-JICA	INTA IF-535	<i>F. proliferatum</i>	-
Nierembergia Estrella INTA-JICA	INTA IF-536	<i>F. proliferatum</i>	-
Nierembergia Estrella INTA-JICA	INTA IF-538	<i>F. fujikuroi</i>	-
Nierembergia Estrella INTA-JICA	INTA IF-559	<i>F. oxysporum</i>	+
Nierembergia Estrella INTA-JICA	INTA IF-566	<i>F. oxysporum</i>	+
Nierembergia Estrella INTA-JICA	INTA IF-567	<i>F. oxysporum</i>	-
Nierembergia Estrella INTA-JICA	INTA IF-569	<i>F. oxysporum</i>	-
Nierembergia Estrella INTA-JICA	INTA IF-577	<i>F. oxysporum</i>	-
Nierembergia Estrella INTA-JICA	INTA IF-648	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	-
Nierembergia Estrella INTA-JICA	INTA IF-649	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cyclaminis</i>	-
Petunia Dreams Burgundy	-	-	-
Petunia Dreams Burgundy	INTA IF-534	<i>F. proliferatum</i>	+
Petunia Dreams Burgundy	INTA IF-535	<i>F. proliferatum</i>	+
Petunia Dreams Burgundy	INTA IF-536	<i>F. proliferatum</i>	+
Petunia Dreams Burgundy	INTA IF-538	<i>F. fujikuroi</i>	-
Petunia Dreams Burgundy	INTA IF-559	<i>F. oxysporum</i>	+
Petunia Dreams Burgundy	INTA IF-566	<i>F. oxysporum</i>	-
Petunia Dreams Burgundy	INTA IF-567	<i>F. oxysporum</i>	-
Petunia Dreams Burgundy	INTA IF-569	<i>F. oxysporum</i>	-
Petunia Dreams Burgundy	INTA IF-577	<i>F. oxysporum</i>	-
Petunia Dreams Burgundy	INTA IF-648	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	-
Petunia Dreams Burgundy	INTA IF-649	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cyclaminis</i>	-
Tomate Platense	-	-	-
Tomate Platense	INTA IF-534	<i>F. proliferatum</i>	-
Tomate Platense	INTA IF-535	<i>F. proliferatum</i>	-
Tomate Platense	INTA IF-536	<i>F. proliferatum</i>	-
Tomate Platense	INTA IF-538	<i>F. fujikuroi</i>	-
Tomate Platense	INTA IF-559	<i>F. oxysporum</i>	-
Tomate Platense	INTA IF-566	<i>F. oxysporum</i>	-

Tomate Platense	INTA IF-567	<i>F. oxysporum</i>	-
Tomate Platense	INTA IF-569	<i>F. oxysporum</i>	-
Tomate Platense	INTA IF-577	<i>F. oxysporum</i>	-
Tomate Platense	INTA IF-648	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	+
Tomate Platense	INTA IF-649	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cyclaminis</i>	-
Coral Mojave Red	-	-	-
Coral Mojave Red	INTA IF-534	<i>F. proliferatum</i>	-
Coral Mojave Red	INTA IF-535	<i>F. proliferatum</i>	-
Coral Mojave Red	INTA IF-536	<i>F. proliferatum</i>	-
Coral Mojave Red	INTA IF-538	<i>F. fujikuroi</i>	-
Coral Mojave Red	INTA IF-559	<i>F. oxysporum</i>	-
Coral Mojave Red	INTA IF-566	<i>F. oxysporum</i>	-
Coral Mojave Red	INTA IF-567	<i>F. oxysporum</i>	-
Coral Mojave Red	INTA IF-569	<i>F. oxysporum</i>	-
Coral Mojave Red	INTA IF-577	<i>F. oxysporum</i>	-
Coral Mojave Red	INTA IF-648	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	-
Coral Mojave Red	INTA IF-649	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cyclaminis</i>	-

*+ plantas con síntomas; - plantas asintomáticas.



Figura 2.1.3.10. Daño aéreo ocasionado por aislados de *Fusarium* en calibrachoa Pampa Salmón-INTA a los 14 días de la inoculación. A) Testigo; B) INTA IF-534; C) INTA IF-535; D) INTA IF-536; E) INTA IF-538; F) INTA IF-559; G) INTA IF-566; H) INTA IF-567; I) INTA IF-569; J) INTA IF-577. (Barras 2 cm).



Figura 2.1.3.11. Daño aéreo ocasionado por aislados de *Fusarium* en nierembergia Estrella INTA-JICA a los 23 días desde la inoculación. A) Testigo; B) INTA IF-559; C) INTA IF-566. (Barras 2 cm).



Figura 2.1.3.12. Daño aéreo ocasionado por aislados de *Fusarium* en petunia Dreams Burgundy a los 18 días desde la inoculación. A) Testigo; B) INTA IF-534; C) INTA IF-535; D) INTA IF-536; E) INTA IF-559. (Barras 2 cm).



Figura 2.1.3.13. Daño aéreo ocasionado por aislados de *Fusarium* en tomate Platense a los 31 días desde la inoculación. A) Testigo; B) INTA IF-648. (Barras 2 cm).

A pesar de la amplia variedad de especies vegetales que pueden ser atacadas por especies de *Fusarium*, algunos aislados de *F. oxysporum* suelen ser específicos del hospedante (Matić *et al.*, 2018). La identificación de una *forma specialis* (f. sp.) se basa en ensayos de patogenicidad (Recorbet *et al.*, 2003) respaldados por herramientas de identificación molecular (Lievens *et al.*, 2012). Así, los aislados que logran establecer relaciones de patogenicidad en un hospedante se asignan a la misma f. sp. (Ma *et al.*, 2013). Evidentemente, los aislados de tomate y cyclamen inoculados en estos ensayos no pudieron afectar a las plantas de calibrachoa, nierembergia y coral por su especificidad (f. sp. *lycopersici* y f. sp. *cyclaminis*), pero sí las plantas de tomate fueran altamente afectadas por el aislado de la f. sp. *lycopersici* (Figura 2.1.3.13). Por otra parte, las cepas de *Fusarium* aisladas de calibrachoa, no tuvieron la capacidad de generar infecciones en tomate ni en salvia, pero causaron distintos daños en calibrachoa, nierembergia y petunia, géneros de la familia de las solanáceas muy emparentados con calibrachoa. En 2018, Matić *et al.* identificaron un aislado de *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* como el agente causal de la marchitez de rudbeckia (*Rudbeckia fulgida* Aiton) lo que les permitió sumar una especie a la lista de hospedantes susceptibles a este patógeno, entre los que ya se encontraban el crisantemo (*Chrysanthemum indicum* L.), la gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus), la dimorfoteca (*Osteospermum fruticosum* L.) y la margarita (*Argyranthemum frutescens* L.), todas integrantes de la familia de las asteráceas. Para los aislados INTA IF-559 e INTA IF-566 (ambos *F. oxysporum*), se deberían profundizar los estudios para establecer la especificidad con los hospedantes estudiados ya que, al margen de que no se observaron daños vasculares, la afección fue similar tanto en las plantas del género *Calibrachoa*, como en las de *Nierembergia* y *Petunia*. Vakalounakis (1996) estudió la pudrición de la raíz y base de tallo de pepino (*Cucumis sativus* L.) causada por *F. oxysporum* y detectó que esta infección era diferente a la ocasionada por las *formae specialis cucumerinum* y *cucurbitae* ya que no afectaba el sistema vascular de las plantas. Luego de inocular 18 especies de las familias quenopodiáceas, crucíferas, cucurbitáceas, leguminosas, solanáceas y umbelíferas, detectó que esta f. sp. sólo afectaba a pepino (*Cucumis sativus* L.), melón (*Cucumis melo* L.) y esponja (*Luffa aegyptiaca* Mill.) y propuso el nombre *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* Vakal. por tratarse de un patógeno específico de estas plantas, con una sintomatología diferencial. En contraposición con las experiencias mencionadas, Zhou *et al.* (2010) realizaron estudios en los que inocularon plantas de las familias cucurbitáceas, solanáceas, amarantáceas y asteráceas: cinco variedades de sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.), dos variedades de pepino (*C. sativus* L.), diez variedades de melón (*C. melo* L.), dos variedades de calabaza (*Cucurbita pepo* L.), dos variedades de calabacín (*Cucurbita* spp.), una variedad de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), una variedad de maíz (*Zea mays* L.) y una variedad de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) con 4 aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp.

niveum, aislados de sandías marchitas. En esta experiencia, sólo las plantas del género *Citrullus*, de la familia de las cucurbitáceas, fueron afectadas por marchitamiento. Esto indicó que los aislados de *Fusarium* eran específicos de sandía y que su designación válida era *f. sp. niveum*.

La especialización en diferentes plantas hospedantes es una de las características de *F. oxysporum* (Gordon y Martyn, 1997). La transferencia horizontal de genes de patogenicidad es bien conocida para dicho complejo de especies (Van der Does y Rep, 2007). Por tanto, el cultivo intensivo de un gran número de especies vegetales ofrece a este patógeno la posibilidad de nuevas especializaciones (Ortu *et al.*, 2018).

F. proliferatum tiene una gama de hospedantes notablemente amplia y se ha aislado de al menos 25 especies de plantas, incluidos múltiples géneros de dicotiledóneas, al menos dos géneros de coníferas y monocotiledóneas ampliamente cultivadas como maíz, arroz y trigo (Proctor *et al.*, 2010). En el presente estudio se ha podido comprobar que los aislados INTA IF-534, 535 y 536 poseen la capacidad de generar pudrición basal y marchitez en calabacito y petunia pero no en el resto de las plantas evaluadas. Aunque en los últimos años se han multiplicado las referencias sobre la patogenicidad de *F. proliferatum*, que incluyen varios cultivos en muy diferentes zonas climáticas, no se ha identificado una clara especificidad como ocurre en las *formae specialis* de otras especies del mismo género como *F. oxysporum* (Gálvez y Palmero, 2022). En estudios realizados en invernadero por Okello y Mathew (2019), pudo observarse que cuatro aislados de *F. proliferatum* obtenidos de soja y maíz podían generar daños en ambos cultivos sin evidenciarse especificidad en relación con alguno de ellos. Según Gálvez y Palmero (2022) *F. proliferatum* tiene una variabilidad genética muy amplia y si bien no presenta especificidad con sus hospedantes, se puede identificar cierta consistencia en su asociación con especies del género *Allium*.

2.1.4. Conclusiones

- Las cepas de *Fusarium proliferatum* INTA IF-534, 535 y 536, de *Fusarium fujikuroi* INTA IF-538 y de *Fusarium oxysporum* INTA IF-559, 566, 567, 569 y 577 causan marchitez en calabacito, debida a una pudrición basal.
- Los aislados de *Fusarium proliferatum* INTA IF-535 e INTA IF-536 son altamente agresivos, al igual que el aislado de *Fusarium oxysporum* INTA IF-569.
- Los aislados de *Fusarium oxysporum* INTA IF-566, INTA IF-559 e INTA IF-538 son moderadamente agresivos.
- El aislado de *Fusarium proliferatum* INTA IF-534 y los aislados de *Fusarium oxysporum* INTA IF-567 e INTA IF-577 son levemente agresivos.

- Los aislados de *Fusarium proliferatum* INTA IF-534, 535 y 536 y el aislado de *Fusarium oxysporum* INTA IF-559 de calibrachoa son además patógenos de Petunia Dreams Burgundy y los aislados de *Fusarium oxysporum* INTA IF-559 y 566 son patógenos de Nierembergia Estrella INTA-JICA.
- Este es el primer reporte de estos patógenos como causantes de enfermedad en calibrachoa.

2.2. *Sclerotinia sclerotiorum*

2.2.1. Introducción

El género *Sclerotinia* Fuckel se ubica en la división Ascomycota, clase Discomycetes, orden Helotiales, familia Sclerotiniaceae. *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary es una especie fitopatógena altamente destructiva con una amplia gama de hospedantes (Hou *et al.*, 2018). Fue descrita por Libert (1837) como *Peziza sclerotiorum* y cambió la denominación hasta adoptar el nombre actual en 1884. Los síntomas que ocasiona son muy variados (Bolton *et al.*, 2006). Por lo general incluyen marchitez, detención del crecimiento, muerte de plantas y destrucción de los órganos cosechados. Los tejidos invadidos por el hongo muestran una podredumbre de consistencia blanda a semiblanda, de color pardo claro a castaño (Delhey *et al.*, 2009). Purdy (1979) realizó una revisión bibliográfica en la que resumió los nombres que reciben las enfermedades causadas por este patógeno, por ejemplo, pudrición algodonosa, pudrición blanda acuosa, pudrición del tallo, pudrición de la corona, pudrición de frutos y moho blanco.

S. sclerotiorum presenta micelio blanco con hifas hialinas, septadas, ramificadas y multinucleadas, sin producción de conidios (Bolton *et al.*, 2006). Una característica con importante valor epidemiológico es su capacidad para generar esclerocios. Estos son cuerpos duros de color negro y de forma variable, que inicialmente se visualizan como agregados de micelio que exudan gotas brillantes de aspecto plateado y en pocos días adquieren su aspecto final. Cuando se desarrollan en cavidades del tejido vegetal pueden tomar la forma y el tamaño de estas (Delhey *et al.*, 2008). La corteza exterior negra de varias células de espesor contiene melanina, un compuesto que juega un papel importante en la protección contra condiciones ambientales adversas (rayos UV, desecación, etc.) y degradaciones microbianas (Bell y Wheeler, 1986; Henson *et al.*, 1999). Los esclerocios pueden sobrevivir hasta 10 años en el suelo, y constituyen la principal fuente de inóculo de la enfermedad. Su aumento en el tiempo puede darse por formación de esclerocios secundarios en el suelo o por colonización de nuevos hospedantes y formación de nuevos esclerocios (Adams y Ayers, 1979).

Las infecciones de plantas susceptibles pueden ocurrir a partir del micelio que se origina luego de la germinación de los esclerocios en el suelo (Purdy, 1979). Al principio de la infección las plantas pueden no parecer afectadas por la enfermedad. Sin embargo, a medida que el hongo avanza hacia los tallos principales, normalmente se produce la marchitez. Al envejecer las lesiones, los tejidos infectados aparecen blanqueados y a menudo se desintegran, con excepción de los haces vasculares (Bolton *et al.*, 2006).

Los daños que causa en cultivos de alto impacto económico son tales, que desde 2002 Estados Unidos posee la Iniciativa Nacional de *Sclerotinia* administrada por el Departamento de Agricultura (USDA), que financia investigaciones por un millón de dólares al año con el fin de ampliar la base de conocimiento de su biología y manejo.

Actualmente se encuentran citadas 701 especies dicotiledóneas hospedantes en el mundo (Farr y Rossman, 2023), entre las cuales se pueden mencionar la petunia (*Petunia hybrida* E.Vilm., Solanáceas) (Shaw, 1973); el clavel (*Dianthus caryophyllus* L., Caryophylláceas) (Vinod Kumar *et al.*, 2015); la dalia (*Dahlia* Cav., Asteráceas) (Connors, 1967); la begonia (*Begonia tuberosa* Sessé & Moc., Begoniáceas) (French, 1989); el poroto (*Phaseolus vulgaris* L., Fabáceas) (Abán *et al.*, 2018) y el arándano (*Vaccinium corymbosum* L., Ericáceas) (Perez *et al.*, 2011b).

Durante octubre de 2019 se observó pudrición basal en plantas de calibrachoa de la variedad INTA 06575 cultivadas en un invernadero de propagación en Hurlingham, Buenos Aires. Los síntomas incluyeron oscurecimiento y marchitamiento de las hojas (incidencia 10 %) (Figura 2.2.2.1). En la base de las plantas marchitas y en la superficie cercana del suelo era evidente la presencia de matas de micelio blanco con esclerocios que medían 2 a 8 mm. Con posterioridad, en marzo de 2020 pudo detectarse atizonamiento en plantas de la misma variedad e idéntico invernadero. El objetivo planteado fue identificar el agente causal de la sintomatología.



Figura 2.2.2.1. Calibrachoa INTA 06575. Planta marchita (izquierda) y planta sana (derecha) (Barra escala 40 mm).

2.2.2. Materiales y métodos

a. Recolección de plantas enfermas

Se tomaron muestras de plantas enfermas para su posterior observación en el laboratorio. Se describieron las características y la evolución de los síntomas.

b. Aislamiento y conservación de microorganismos asociados

Las plantas marchitas se retiraron de las macetas, se extrajo el sustrato y se lavaron las raíces con agua corriente. Se observaron tanto la base como las raíces bajo una lupa de disección Olympus® SZX9 y se fotografiaron. La técnica de desinfección superficial de las porciones enfermas fue la misma que en el apartado 2.1.2.b. También se tomó material fúngico directamente del signo constituido por micelio y esclerocios. Para las ramas de las plantas atizonadas se repitió la metodología.

Se eligió un aislado para proseguir los estudios. Se realizaron cultivos monohifales para su conservación, que se iniciaron a partir de la siembra en agar agua de puntas de hifa obtenidas de suspensiones de micelio provenientes de diluciones seriadas en agua destilada estéril.

c. Pruebas de patogenicidad

Para estudiar la patogenicidad del aislado obtenido de plantas marchitas se colocaron discos de agar de 10 mm² obtenidos de un cultivo de 7 días en APG sobre las bases de los tallos de 12 calibrachos sanas de 2 meses cultivadas en macetas n° 10. El inóculo se envolvió con algodón humedecido de modo de favorecer la infección (Choi *et al.*, 2017). Cuatro plantas tratadas con discos de APG estériles de 10 mm² cubiertos con algodón se utilizaron como testigos. Cada planta se mantuvo dentro de una bolsa de polietileno por 72 h y todas se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 20 °C.

A los efectos de evaluar la capacidad del patógeno de generar infecciones aéreas, se colocaron discos de APG con desarrollo de 7 días sobre las hojas y se cubrieron con bolsas plásticas durante 72 horas. Se realizaron 6 repeticiones por tratamiento, con y sin heridas punzantes en las bases de los tallos. Los testigos fueron tratados con trozos de APG estéril y se mantuvieron en cámara de crecimiento a 20° C.

d. Identificación taxonómica

Se observaron las características del aislado a ojo desnudo y bajo lupa. A los fines de realizar la identificación molecular, se extrajo ADN genómico según el método de Stenglein y Balatti (2006) y se amplificó la región del espaciador transcrito interno (ITS) del rDNA con los cebadores ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990). La secuencia resultante se depositó en GenBank.

e. Rango de hospedantes del aislado

Con el objetivo de aportar datos complementarios para la caracterización del patógeno, se procedió a evaluar el rango de hospedantes potenciales del aislado en estudio. Para ello se utilizó la metodología propuesta en el apartado 2.1.2.e. y se inocularon plantas de calibrachoa Pampa Salmón-INTA, nierembergia Estrella INTA-JICA, Petunia Dreams Burgundy, Tomate Platense y Coral Mojave Red.

2.2.3. Resultados y discusión

a. b. Recolección de plantas enfermas y aislamiento de microorganismos asociados

Los síntomas se iniciaron con un amarillamiento de las hojas apicales que avanzó hacia la base de las plantas (Figura 2.2.3.1 A). Con el transcurso de los días se hicieron evidentes la pérdida de turgencia y el inicio de la marchitez apical, que culminaron con la muerte de los ejemplares (Figura 2.2.3.1 B). Al retirar las plantas de las macetas, pudo observarse descortezamiento y pérdida de volumen en la base de los tallos y cambio de color en las raíces (Figura 2.2.3.1 C). Bajo lupa se detectaron zonas podridas de color pardo (Figura 2.2.3.1 D). A partir de todas las siembras de material sintomático desarrollaron colonias con micelio algodonoso blanco que comenzaron a formar un anillo periférico de esclerocios negros a los 5 días, estructuras que se encontraban plenamente desarrolladas a los 7 días (Figura 2.2.3.2 A y B). El aislado fue depositado en la colección de hongos fitopatógenos del Laboratorio de Sanidad del Instituto de Floricultura INTA con el código INTA IF-533.

Las prospecciones semanales realizadas en los invernaderos permitieron detectar los síntomas de manera temprana. El patógeno se aisló fácilmente. El trabajo con material vegetal fresco y sobre la zona de avance de la enfermedad en los tallos evitó el desarrollo de contaminantes, en coincidencia con Leslie y Summerell (2006).

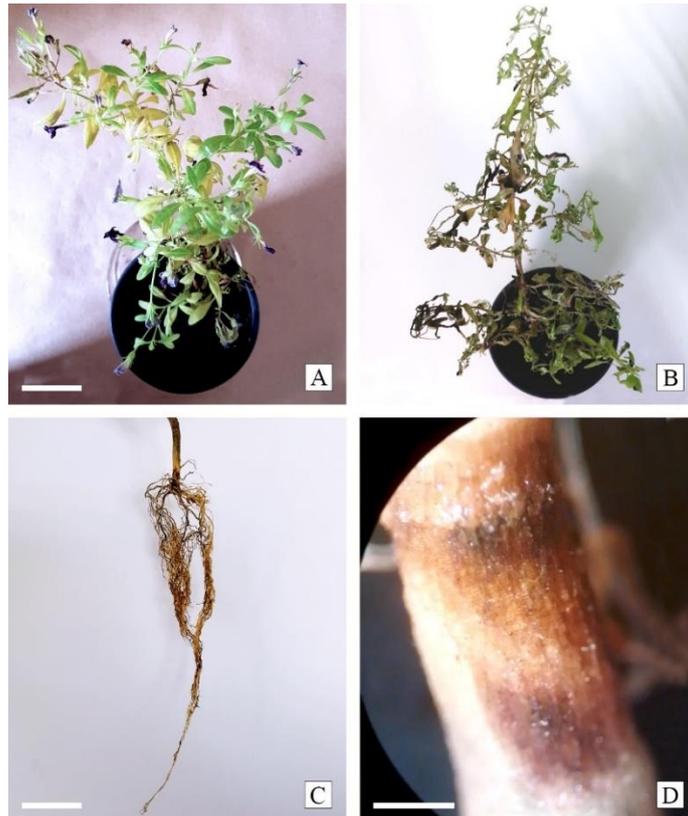


Figura 2.2.3.1. Calibrachoa INTA 06575. A) Planta clorótica (Barra escala 40 mm); B) Planta marchita (Barra escala 40 mm); C) Raíces con pérdida de volumen y coloración parda (Barra escala 40 mm); D) Detalle de raíz bajo lupa (Barra escala 0,5 mm).

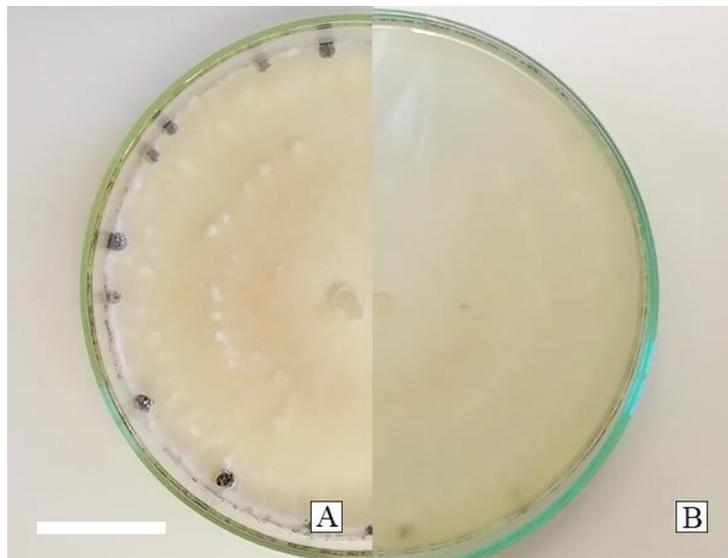


Figura 2.2.3.2. Placa de Petri con 7 días de desarrollo de *Sclerotinia sclerotiorum* en APG. A) Vista de frente; B) Vista del dorso. (Barra escala 2 cm).

c. Pruebas de patogenicidad

Las plantas inoculadas en la base presentaron hojas decoloradas después de 5 días y marchitas después de 13 días. Entre el día 5 y 7 desarrolló una masa de micelio blanquecino en la base de

los tallos que, a medida que avanzó la infección, produjo esclerocios negros (Figura 2.2.3.3 A y B). Este signo fue idéntico al observado en las plantas enfermas detectadas inicialmente durante las prospecciones.

Las plantas inoculadas en la parte aérea presentaron clorosis y pérdida de turgencia foliar luego de 5 días de la inoculación, con desarrollo conspicuo de micelio blanco sobre las hojas heridas e inermes y un avance acrópeto del atizonamiento que se generalizó, al igual que en las infecciones basales, a los 13 días (Figura 2.2.3.3 C y D). En la superficie de las hojas marchitas desarrollaron esclerocios negros.

El reaislamiento de *S. sclerotiorum* de los órganos enfermos permitió completar los postulados de Koch. Las plantas testigo no desarrollaron síntomas en ambas inoculaciones.



Figura 2.2.3.3. Pruebas de patogenicidad en calibrachoa INTA 06575. A) Micelio blanquecino con esclerocios en la base de tallo; B) Avance de infección y marchitez del follaje por infecciones basales; C) Micelio sobre el follaje en inoculaciones aéreas; D) Avance de infección y esclerocios sobre hojas muertas (Barras escala 40 mm).

Bazzalo *et al.* (1991) inocularon la base de las plantas de 8 genotipos de girasol (*Helianthus annuus* L.) con 16 aislados de *S. sclerotiorum* y detectaron que a partir del séptimo día las plantas se marchitaban. Figueirêdo *et al.* (2010) evaluaron la patogenicidad de 4 aislados de *S. sclerotiorum* en poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) y detectaron los primeros síntomas (clorosis,

lesiones húmedas y marchitamiento) a los 10 días luego de la inoculación, los cuales se volvieron severos con la consecuente muerte de las plantas a los 25 días. Por su parte, Kim y Cho (2003) realizaron inoculaciones exitosas mediante discos de APG con crecimiento miceliar de ocho aislados de *S. sclerotiorum* en tallos de dos variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.), berenjena (*Solanum melongena* L.), papa (*S. tuberosum* L.) y pimiento (*Capsicum annuum* L.). Tok *et al.* (2016) evaluaron la patogenicidad de 60 aislados de *S. sclerotiorum* luego de inocular plantas de berenjena con secciones de APG con crecimiento miceliar del patógeno y detectaron el inicio de los síntomas a las 24 horas. La información presentada permite detectar cierta variabilidad en la respuesta de las distintas especies vegetales evaluadas, incluida la calabacita, a los diferentes aislados del patógeno, que implica la necesidad de realizar estudios específicos para explicar las diferencias en la patogenicidad. Sería interesante poder evaluar si el efecto de distintas temperaturas de incubación, humedad ambiente y edad de las plantas modifican los tiempos de inicio de síntomas y marchitez de las plantas.

d. Identificación taxonómica

El hongo no produjo estructuras reproductivas asexuales ni sexuales. A partir de las características de las colonias y de los esclerocios, el patógeno se identificó como *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (Mordue y Holliday, 1976). El aislado INTA-IF-533 fue depositado en la Colección de Cultivos de Hongos Entomopatógenos de Argentina, CEPAVE, como CEP 785. Con respecto a la identificación molecular, la secuencia resultante se depositó en GenBank (número de acceso MT177216). La búsqueda BLASTn mostró un 100 % de identidad con *S. sclerotiorum* (MG931017, KX781301). Dado que no hay reportes previos, este trabajo agrega a *Calibrachoa x hybrida* como hospedante de este hongo.

Los esclerocios de *S. sclerotiorum* que germinan en forma miceliana producen hifas que infectan los tejidos a nivel del suelo, mientras que los que germinan en forma carpogénica producen apotecios con ascosporas que se dispersan a través de corrientes de aire e infectan los tejidos aéreos (Bardin y Huang, 2001). Las plantas con marchitez observadas en el invernáculo en octubre de 2019 podrían haber estado expuestas a un inóculo de *S. sclerotiorum* presente en el sustrato. La infección miceliana fue observada en diversos hospedantes como girasol (*Helianthus annuus* L.) (Brentzel, 1948), lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinnery) (Wolcan *et al.*, 1996) y gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus ex. Hook.f.) (Wolcan, 2004), petunia (*Petunia x hybrida* hort. Ex. Vilm.) (Garibaldi *et al.*, 2009) y lechuga (*Lactuca sativa* L.) (Shrestha *et al.*, 2018). Las enfermedades causadas por *S. sclerotiorum* son favorecidas por altos niveles de precipitación, lo que ayuda al establecimiento del patógeno en la planta (Koch *et al.*, 2007).

En el caso de la infección en calabacito observada en invernáculo, las plantas habían estado expuestas a niveles de riego elevados y, debido a la época del año, los valores bajos de temperatura no permitieron evapotranspirar el agua en exceso. Esta situación pudo dar lugar a condiciones de estrés por elevado contenido hídrico y, consecuentemente, generar un ambiente favorable para el desarrollo de infecciones de *S. sclerotiorum*.

Tal como se mencionó, el patógeno puede ser dispersado mediante ascosporas producidas en apotecios (Le Tourneau, 1979; Purdy, 1979; Tassara *et al.*, 1998; Bardin y Huang, 2001; Bolton *et al.*, 2006). De este modo genera lesiones húmedas en tejidos aéreos sanos o en proceso de senescencia, que se expanden rápido en forma descendente por el tallo, se necrosan y se desarrolla un micelio blanco algodonoso (Bolton *et al.*, 2006). Esta última puede haber sido la vía de infección que generó las lesiones aéreas (tizón) en las calabacitos enfermas observadas en marzo de 2020. Seguramente hubo una inadvertida producción de apotecios que generaron ascosporas, o bien una manipulación de sustrato puso en contacto el micelio de *S. sclerotiorum* con el hospedante. Son frecuentes las infecciones aéreas en girasol (*Helianthus annuus* L.) (Gulya y Vick, 1986), soja (*Glycine max* L.) (Boland y Hall, 1988), repollo (*Brassica oleracea* L.) (Mahalingam *et al.*, 2016) y haba (*Vicia faba* L.) (Chapara *et al.*, 2018). La germinación carpogénica de los esclerocios de *S. sclerotiorum* está íntimamente relacionada con la humedad del suelo asociada a períodos de abundantes precipitaciones o riego (Bolton *et al.*, 2006). En cuanto a las temperaturas que estimulan la producción de ascosporas, la información varía desde 11 a 15 °C (Abawi y Grogan, 1979), 15 a 20 °C (Clarkson *et al.*, 2007) y 10 a 20 °C (Wu y Subbarao, 2008) y, según Abawi y Grogan (1979) no se producen esclerocios a 5 o a 30 °C. Es posible que la temperatura a la que se formaron los esclerocios y el micelio que los originó determinen la temperatura de la germinación carpogénica (Huang y Kozub 1989; 1993). Por otra parte, existe un delicado equilibrio entre los procesos de acondicionamiento y germinación de los esclerocios para producir apotecios, debido a su temperatura muy diferente (Clarkson *et al.*, 2007). Estos mismos autores indican que las temperaturas por debajo de 10 °C son óptimas para el acondicionamiento y que a 5 °C, se puede completar en unos pocos días. Así, si se aplica un período prolongado de frío, los esclerocios habrán completado el acondicionamiento necesario y comenzado el proceso de germinación y, por lo tanto, los apotecios parecen producirse muy rápidamente cuando se transfieren a temperaturas más altas. Esto permitiría pensar que los esclerocios que generaron la infección basal estudiada en este trabajo podrían ser los mismos que posteriormente, transcurrido el período de acondicionamiento, dieron lugar a la infección carpogénica que infectó la parte aérea de las plantas.

En lo que respecta al proceso de infección, las ascosporas requieren alta humedad (Tu, 1989). Los tejidos senescentes aportan los nutrientes para que germinen e infecten los tejidos

aéreos de las plantas (Jamaux *et al.*, 1995; Bardin y Huang, 2001). En colza (*Brassica napus* L.) la colonización de los pétalos envejecidos permite que *S. sclerotiorum* acumule suficientes niveles de nutrientes para iniciar la infección (Garg *et al.*, 2010). La aparición de flores muertas, hojas dañadas o materia orgánica es el único requisito para la germinación de las ascosporas y la subsiguiente infección de los tejidos del hospedante (De Bary, 1887; Purdy y Bardin 1953; Natti, 1971; Newton y Sequeira, 1972; Huang y Kokko, 1992). Las toxinas y enzimas que produce el patógeno estimulan la mayor liberación de nutrientes en la zona de contacto y posibilitan el avance de la infección (Jamaux *et al.*, 1995). En tal sentido, el tizón causado por *S. sclerotiorum* en calibrachoa pudo haber tenido las condiciones necesarias para que la infección comience en flores en proceso de senescencia o bien, en aquellas que hayan caído sobre alguna hoja.

e. Rango de hospedantes del aislado

En la Tabla 2.2.3.1 pueden observarse los resultados de la inoculación del aislado de *S. sclerotiorum* patógeno de calibrachoa en las especies bajo estudio. Al analizar desde la perspectiva de la respuesta del hospedante, tanto calibrachoa Pampa Salmón-INTA como nierembergia Estrella INTA-JICA y petunia Dreams Burgundy expresaron síntomas, los cuales se iniciaron con clorosis apical y folíolos curvados a los 4 días para nierembergia, 5 días para calibrachoa y 7 días para petunia. Se generalizó la clorosis, las plantas perdieron turgencia y presentaron marchitez a los 10 días desde la inoculación para nierembergia, 13 días para calibrachoa y 14 días para petunia. En lo que respecta a coral y tomate, las plantas se mantuvieron asintomáticas. Todos los testigos permanecieron sin síntomas. En la Figura 2.2.3.4 pueden observarse los síntomas ocasionados por *S. sclerotiorum* en los diversos hospedantes. Es probable que los distintos períodos de incubación observados tengan una relación directa con la variedad afectada y que se esté expresando una relación planta-patógeno diferencial. Es interesante la falta de susceptibilidad de las plantas de tomate hacia el aislado obtenido a partir de otras solanáceas y cuya patogenicidad fue comprobada en las mismas.

Tabla 2.2.3.1. Pruebas de patogenicidad de un aislado de *S. sclerotiorum* en cuatro cultivares de Solanáceas y uno de Lamiáceas.

Especie y Variedad	Aislado	Patogenicidad*
Calibrachoa Pampa Salmón-INTA	-	-
Calibrachoa Pampa Salmón-INTA	INTA IF-533	+
Nierembergia Estrella INTA-JICA	-	-
Nierembergia Estrella INTA-JICA	INTA IF-533	+
Petunia Dreams Burgundy	-	-
Petunia Dreams Burgundy	INTA IF-533	+
Tomate Platense	-	-
Tomate Platense	INTA IF-533	-
Coral Mojave Red	-	-
Coral Mojave Red	INTA IF-533	-

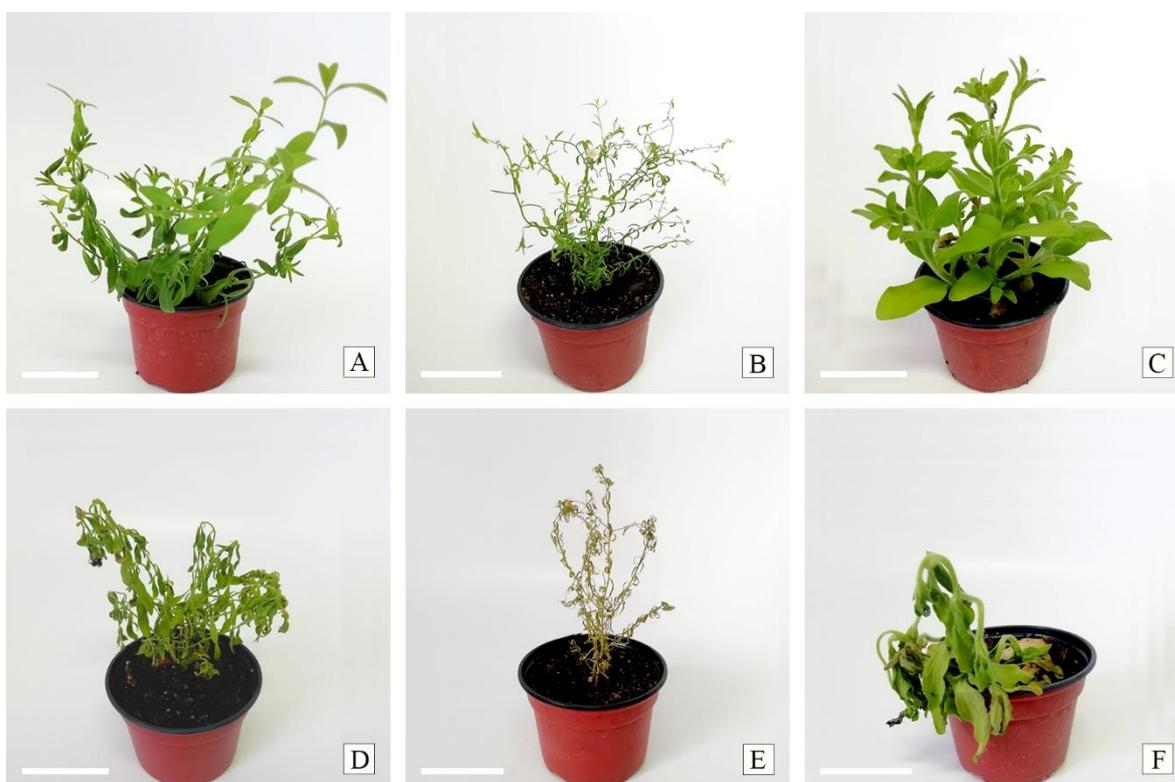


Figura 2.2.3.4. Daño aéreo ocasionado por aislado de *S. sclerotiorum* en distintas solanáceas ornamentales a los 10 días desde la inoculación: A) Testigo calibrachoa Pampa Salmon-INTA; B) Testigo nierembergia Estrella INTA-JICA; C) Testigo petunia Dreams Burgundy; D) calibrachoa Pampa Salmon-INTA + INTA IF-533; E) nierembergia Estrella INTA-JICA + INTA IF-533; y F) petunia Dreams Burgundy + INTA IF 533 (Barras 5 cm).

2.2.4. Conclusiones

- La cepa *Sclerotinia sclerotiorum* INTA IF-533 causa marchitez y tizón en calibrachoa.
- La marchitez (oscurecimiento y pérdida de turgencia de las hojas superiores) está asociada con la podredumbre de la base del tallo y la raíz.
- El tizón está asociado con la necrosis de ramas y hojas.

- Este es el primer reporte de *S. sclerotiorum* como agente causal de esta enfermedad de la calibrachoa (dos síntomas distintos) en el mundo.
- INTA IF-533 puede infectar *Nierembergia* y *Petunia* sin causar enfermedad en las variedades de tomate y coral estudiadas.
- La infección basal es originada por micelio.

2.3. *Ceratobasidium* spp.

2.3.1. Introducción

El género *Rhizoctonia* (DC.) se considera como un conjunto heterogéneo de hongos filamentosos dentro del filo Basidiomycota que presenta características tales como ausencia de esporas asexuales, presencia de hifas pigmentadas de color marrón y constricciones en los puntos de ramificación que forman ángulos rectos, y distribución mundial (González García *et al.*, 2006). Otras características comunes a algunos integrantes del género son: células moniloides y esclerocios, septos con doliporo y elevadas tasas de crecimiento (González García, 2008). Son habitantes del suelo con diversos roles tanto en ecosistemas naturales como cultivados. Algunas especies causan graves enfermedades en diversas plantas hospedantes, que dañan raíces, tallos, tubérculos, cormos, a veces hojas, con una amplia gama de síntomas (podrición de la raíz y el tallo, marchitez, damping off, manchas foliares y tizón) (Aiello *et al.*, 2017). Otras generan interacciones simbióticas con las plantas (Sharon *et al.*, 2008) y también hay grupos saprofitos en los suelos (Arakawa y Inagaqui, 2014).

Las especies de *Rhizoctonia* se pueden diferenciar por el tono del micelio, el número de núcleos por célula hifal vegetativa joven y la morfología del teleomorfo. La capacidad de las hifas para anastomosarse con aislamientos tipo y el número de núcleos en las células vegetativas son un importante criterio taxonómico para separar las especies, que pueden clasificarse en tres grupos: uninucleadas (uninucleate *Rhizoctonia*, UNR) con un núcleo por célula, patógenas de raíces de plantines de coníferas con teleomorfo en *Ceratobasidium* (D.P. Rogers) (Hietala *et al.*, 1994); binucleadas (binucleate *Rhizoctonia*, BNR) con dos núcleos por célula (raramente uno o tres) y teleomorfos en *Ceratobasidium* y *Tulasnella* (J. Schröt) y multinucleadas (multinucleate *Rhizoctonia*, MNR) con tres o más núcleos por célula y teleomorfo en *Thanatephorus* (Donk) y *Waitea* (Warcup & P.H.B. Talbot) (Parmeter *et al.*, 1967; Ogoshi, 1975; Ogoshi, 1987; Sneh *et al.*, 1991; Ogoshi, 1996; Kuninaga, 2002; Cedeño, 2008; Arakawa y Inagaqui, 2014). Para las MNR se han descrito 14 grupos de anastomosis (Carling *et al.*, 2002): 13 grupos (AG 1 a AG 13) cuyos miembros solo son capaces de fusionar sus hifas dentro del grupo y el grupo AG BI, el cual incluye integrantes capaces de fusionar sus hifas entre sí y con otros AG. En lo que respecta a las BNR, un sistema desarrollado en Japón (Ogoshi *et al.*, 1979; 1983; Hyakumachi *et al.*, 2005; Sharon *et al.*, 2008) incluye 21 grupos de anastomosis designados AG-A a AG-U (Yang y Li, 2012).

Además de las reacciones de anastomosis hifal, se han desarrollado otras técnicas para la caracterización de aislados, como la PCR-RFLP de la región ITS y la secuenciación de la región ITS

(Schneider *et al.*, 1997; Guillemaut *et al.*, 2003; Hyakumachi *et al.*, 2005; Nerey *et al.*, 2010). Las técnicas moleculares basadas en análisis de ADN superan las desventajas de la identificación morfológica ya que son rápidas, precisas, objetivas y aplicables a un gran número de muestras. Permiten diferenciar entre genotipos y establecer índices de variabilidad genética dentro de una población (Narayanasamy, 2011).

El objetivo de este apartado fue conocer la causa de la marchitez detectada en plantas de calibrachoa INTA 06575 en diversos invernaderos de producción del Instituto de Floricultura del INTA.

2.3.2. Materiales y métodos

a. Recolección de plantas enfermas

De mayo a diciembre de 2017 y de abril a noviembre de 2018 se colectaron plantas de calibrachoa de la variedad INTA 06575, cultivadas en un invernadero de polietileno en Hurlingham (Buenos Aires), que presentaron marchitez (Figura 2.3.2.1). Se observaron los cultivos para establecer el progreso de la enfermedad, su incidencia y los cultivares afectados. Para ello, se registró el número de plantas sintomáticas y se monitoreó el desarrollo de los síntomas.

b. Aislamiento y conservación de microorganismos asociados

Las plantas enfermas se retiraron de las macetas, se eliminó el sustrato y se lavaron las raíces con agua corriente. Posteriormente, se observaron las coronas y las raíces bajo una lupa de disección Olympus® SZX9. La técnica utilizada para aislar y conservar al agente causal de los tejidos sintomáticos fue la misma que en el apartado 2.1.2.b.



Figura 2.3.2.1. Calibrachoa INTA 06575. Planta de calibrachoa con síntomas de marchitez y planta sana (Barra escala 40 mm).

c. Pruebas de patogenicidad

Cuarenta plantas de calibrachoa INTA 06575 en macetas fueron producidas por propagación asexual según se indica en el apartado 2.1.2.c, para realizar los estudios de patogenicidad. Cuando las plantas tenían 2 meses, 20 de ellas fueron inoculadas colocando trozos de APG de 0,5 cm² obtenidos de colonias de 5 días del aislado, sobre el sustrato cerca de la base del tallo. De las 20 plantas, 10 fueron lesionadas en la base del tallo, previo a la inoculación. El resto de las plantas (diez controles heridos y diez sin daños) se trataron con trozos de APG estériles. Cada planta fue cubierta con una bolsa de polietileno transparente por 72 h y todas se colocaron en la mesa de laboratorio a una temperatura de 24 °C. Luego de retiradas las bolsas las plantas permanecieron en el invernadero para la observación del progreso de la enfermedad. Los síntomas aéreos se registraron durante el transcurso de 15 días y al finalizar el ensayo se retiraron las plantas de las macetas, se lavaron las raíces con agua corriente y se observaron. Para finalizar, el patógeno se reaisló utilizando el método indicado para el aislamiento (2.1.2.b).

d. Identificación taxonómica

A los efectos de realizar una descripción de las colonias del patógeno, se registró el color y crecimiento en APG y las estructuras vegetativas del aislado (hifas y tipo de ramificaciones) se observaron bajo un microscopio Olympus® BX50. Los núcleos de las células se tiñeron con safranina O, según el procedimiento desarrollado por Bandoni (1979), para observar y contar el número de núcleos por célula hifal vegetativa joven.

Para complementar la taxonomía clásica y confirmar la identidad del patógeno, se realizó una caracterización molecular mediante la amplificación y secuenciación de parte de la región del ADNr de ITS a partir de los cebadores ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). La secuencia obtenida en este estudio se envió a GenBank y se realizó la comparación BLAST de nucleótidos con secuencias publicadas en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

e. Rango de hospedantes del aislado

Con el objetivo de aportar datos complementarios para la caracterización del patógeno, se procedió a evaluar el rango de hospedantes potenciales del aislado en estudio. En tal sentido, se utilizó la metodología propuesta en el apartado 2.1.2.e.

2.3.3. Resultados y discusión

a. b. Recolección de plantas enfermas y aislamiento de patógenos

Del total de plantas colectadas con síntomas de marchitez, se detectaron en todos los casos a agentes fúngicos como los responsables. Inicialmente las hojas apicales de las plantas afectadas mostraron una ligera clorosis que se transformó en moderada seguida por pérdida de turgencia. Las plantas severamente infectadas murieron con un marchitamiento permanente de su follaje. Las raíces de las plantas marchitas exhibieron una decoloración marrón oscura a ojo desnudo (Figura 2.3.3.1 A). En observación bajo lupa se detectó que las cortezas externas y la epidermis se desprendían fácilmente, dejando los cilindros vasculares expuestos (Figura 2.3.3.1 B). A la vez, se detectaron lesiones hundidas redondas a elípticas en las raíces primarias (Figura 2.3.3.1 C), especialmente cerca del nivel del sustrato. No se observaron síntomas en la base de los tallos.



Figura 2.3.3.1. Daño en raíces de calibrachoa INTA 06575. A) Raíces de calibrachoa marchita con coloración marrón (Barra escala 5 cm); B) Detalle de raíz con desprendimiento de corteza y epidermis con cilindros vasculares expuestos (Barra escala 3 mm); C) Lesiones hundidas en raíces afectadas (Barra escala 0.4 mm).

En el 10 % de los casos se obtuvieron aislados fúngicos de rápido crecimiento, que desarrollaron a partir de las raíces sintomáticas al cabo de 5 días. Las colonias inicialmente fueron blanquecinas y se tornaron de color marrón claro, alcanzando los bordes de las placas en 5 días (Figura 2.3.3.2). El 90 % de los aislados fúngicos restantes se detalló en los apartados previamente mencionados.

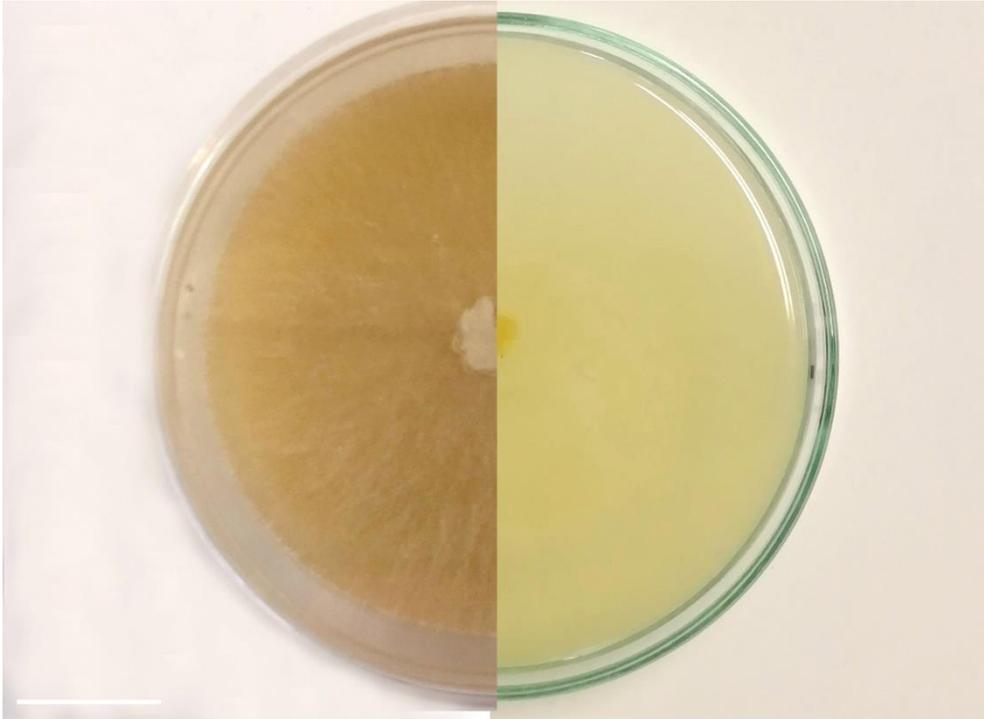


Figura 2.3.3.2. *Ceratobasidium* sp. Vista superior e inferior de crecimiento fúngico de cinco días en placa de Petri con APG (Barra escala 2 cm).

c. Pruebas de patogenicidad

Se completaron los postulados de Koch al observar síntomas ocasionados por el patógeno y reaislarlo, pudiendo observarse mayor severidad en los casos en los cuales las plantas fueron dañadas en comparación con las que no tenían heridas previas (Figura 2.3.3.3).

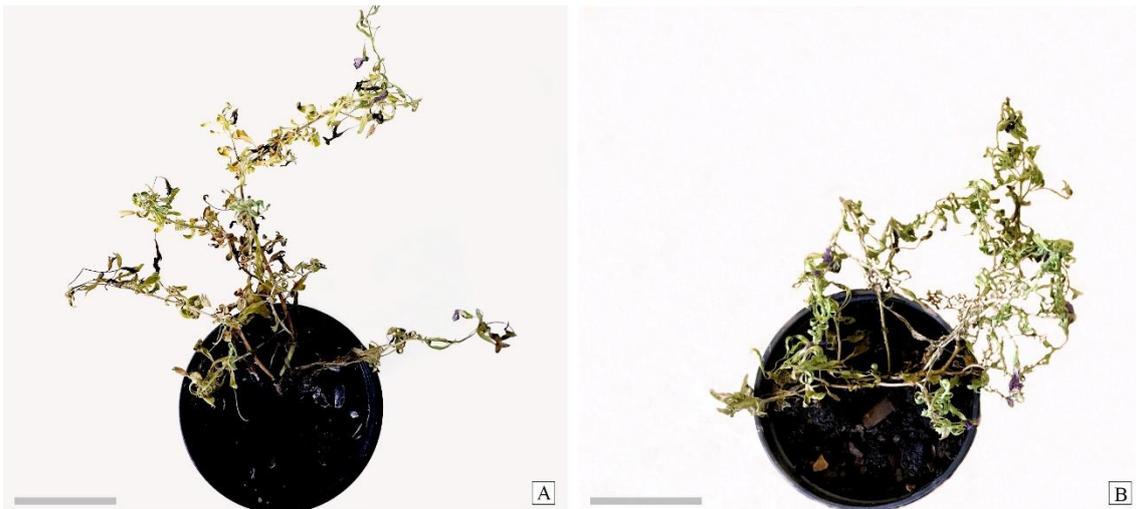


Figura 2.3.3.3. Prueba de patogenicidad, día 6. A) Calibrachoa INTA 06575 inoculada, con heridas, mostrando necrosis del follaje (Barra escala 5 cm); B) Planta inoculada, sin heridas, con intensa pérdida de turgencia (Barra escala 5 cm).

Los síntomas primarios y secundarios fueron muy similares a los descritos en los apartados 2.1.3.c y 2.2.3.c.: clorosis apical, pérdida de turgencia y posterior marchitez de las plantas. Es por ello que las enfermedades son indistinguibles entre sí a menos que se aislen los patógenos. Las únicas diferencias pueden observarse por debajo del nivel del sustrato, ya que *S. sclerotiorum* solo causó pudrición de la corona mientras que *Ceratobasidium* sp. y *Fusarium* spp. desintegraron las raíces. En cuanto al período de incubación, fue diferente entre estas tres interacciones patógeno hospedante. De hecho, los síntomas foliares fueron evidentes a los 5 días para *S. sclerotiorum*, 6 días para *Ceratobasidium* sp. y 6 días para *Fusarium* spp. mientras que la muerte de las plantas ocurrió a los 10 días para *Ceratobasidium* sp., 13 días para *S. sclerotiorum* y 16 días para *Fusarium* spp.

En estudios realizados por Miles *et al.* (2013) se inocularon plantas de papa y remolacha azucarera (*Beta vulgaris* var. *altissima* Döll) con *Rhizoctonia* binucleada AG-A (como la probada en estos ensayos) y luego de un mes el 88 % de los tallos de papa se encontraban necrosados al igual que los tubérculos. También se observó en las plantas de remolacha una disminución del crecimiento del 60 %. Erper *et al.* (2021) inocularon plantas de repollo rojo (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) con 4 aislados de *Rhizoctonia* binucleada AG-A y luego de 21 días desde la inoculación detectaron diferencias significativas en el peso seco de raíces y parte aérea de las plantas con respecto al testigo sin inocular. En estudios futuros se podría evaluar el efecto del aislado INTA IF-568 en el peso fresco y seco radical y aéreo de las distintas variedades de calibrachoa -tal como se realizó con los aislados de *Fusarium*- de modo de poder cuantificar los daños realizados y establecer puntos de comparación con los patógenos ya evaluados.

d. Identificación taxonómica

Las hifas del aislado obtenido y probado son marrones, de 5,5 (3,1 a 8,1) μm de ancho, ramificadas en ángulo recto, constreñidas en el punto de ramificación, con septos cerca de la misma (Figura 2.3.3.4 A). Estas características coinciden con la descripción del género *Rhizoctonia* (Sneh *et al.*, 1991). Las hifas presentan dos núcleos por célula (Figura 2.3.3.4 B). No se forman fíbulas, esclerocios ni basidios. El método de transferir las cepas de medios ricos en nutrientes a otros bajos (Murray, 1984) podría usarse en estudios adicionales, para inducir la reproducción sexual. El aislado se codificó como INTA-IF-568 y se depositó en BAFCCult como 6001. El género *Ceratobasidium* (syn. *Pellicularia* Cooke) pertenece a la familia Ceratobasidiaceae, filo Basidiomycota (Index Fungorum, 2021). *Ceratobasidium*, así como *Tulasnella*, son teleomorfos de las BNR (Sharon *et al.*, 2007; 2008).

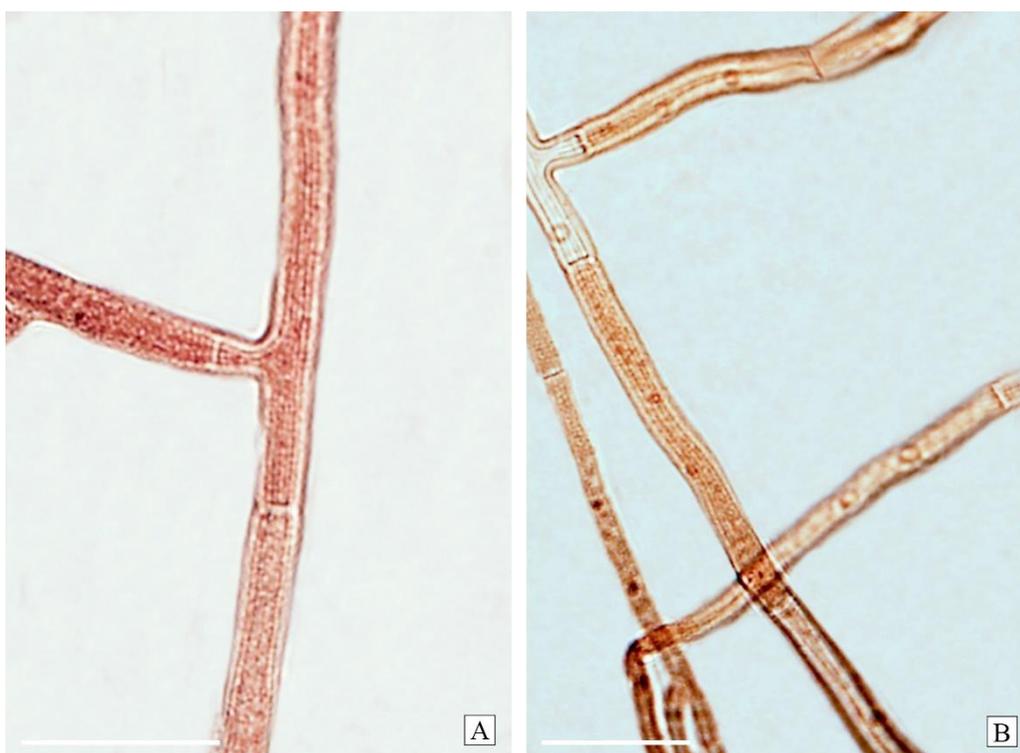


Figura 2.3.3.4. Observación de *Ceratobasidium* sp. al microscopio. A) Constricción de una hifa en el punto de ramificación (Barra escala 20 µm); B) Células binucleadas (Barra escala 20 µm).

La comparación de nucleótidos BLAST con secuencias publicadas en el NCBI presentó 99,83 % de similitud con secuencias de *Ceratobasidium* sp. AG-A (ej. KM017962, KF176587, LC549193). La cepa fue denominada INTA IF-568. La identificación del grupo de anastomosis al que pertenece es útil, especialmente para el control químico de la enfermedad, ya que los AG pueden diferir en la sensibilidad a los fungicidas (Muzhinji *et al.*, 2018). Hay 50 registros de *Ceratobasidium* sp. como agente causal de enfermedades en 39 especies de plantas en el mundo (Farr y Rossman, 2023). El grupo AG-A es patógeno de raíces de Solanáceas como papa (Miles *et al.*, 2013), Fabáceas como soja (*Glycine max* L.), arveja (*Pisum sativum* L.) y poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) (Yang *et al.*, 2005), Brasicáceas como pak choi (*Brassica rapa* subsp. *chinensis* L.) y repollo rojo (*Brassica oleracea* f. *rubra* Peterm.) (Yang *et al.*, 2005; Erper *et al.*, 2021), Amarantáceas como remolacha azucarera (*Beta vulgaris* var. *altissima* Döll) (Miles *et al.*, 2013) y Rosáceas como frutilla (*Fragaria × intermedia* (Bach)) (Fang *et al.*, 2013).

Se desconocía a la calabacita como hospedante de *Ceratobasidium* spp. A partir del estudio realizado en este trabajo, se agrega un nuevo patógeno a la lista de microorganismos que pueden limitar el cultivo de calabacita.

e. Rango de hospedantes del aislado

La Tabla 2.3.3.1 muestra los resultados de la inoculación del aislado de *Ceratobasidium* sp. AG-A en las especies bajo estudio. Al evaluar los resultados desde la perspectiva de la respuesta del hospedante, se observa que calibrachoa Pampa Salmón-INTA y nierembergia Estrella JICA-INTA expresaron síntomas. El resto de las especies evaluadas, al igual que los testigos no presentaron síntomas. Tanto en nierembergia como en calibrachoa, los síntomas se iniciaron con la decoloración de los ápices y la pérdida de turgencia de las hojas a los 3 y 5 días desde la inoculación. La sintomatología se agudizó finalizando con marchitez entre los 7 y 10 días desde la inoculación para nierembergia y calibrachoa respectivamente. En la Figura 2.3.3.5 pueden observarse los síntomas generados por el patógeno.

Tabla 2.3.3.1. Pruebas de patogenicidad de la cepa INTA IF-568 de *Ceratobasidium* sp. en plantas de cuatro cultivos de Solanaceae y una de Lamiaceae.

Especie y Variedad	Aislado	Patogenicidad*
Calibrachoa Pampa Salmón-INTA	Testigo	-
Calibrachoa Pampa Salmón-INTA	INTA IF-568	+
Nierembergia Estrella INTA-JICA	Testigo	-
Nierembergia Estrella INTA-JICA	INTA IF-568	+
Petunia Dreams Burgundy	Testigo	-
Petunia Dreams Burgundy	INTA IF-568	-
Tomate Platense	Testigo	-
Tomate Platense	INTA IF-568	-
Coral Mojave Red	Testigo	-
Coral Mojave Red	INTA IF-568	-



Figura 2.3.3.5. Daño aéreo ocasionado por la cepa INTA IF-569 de *Ceratobasidium* sp. en distintas solanaceas ornamentales a los 7 días desde la inoculación: A) Testigo calibrachoa Pampa Salmon-INTA; B) Testigo nierembergia Estrella INTA-JICA; C) calibrachoa Pampa Salmon-INTA + INTA IF-568; D) nierembergia Estrella INTA-JICA + INTA IF-568 (Barras 5 cm).

2.3.4. Conclusiones

- La cepa *Ceratobasidium* sp. AG-A INTA IF-568 causa marchitez de la calibrachoa, asociada inicialmente con clorosis seguida por pérdida de turgencia.
- Este es el primer reporte de *Ceratobasidium* sp. AG-A como agente causal de marchitez en calibrachoa en el mundo.
- La cepa INTA IF-568 de *Ceratobasidium* sp. causa marchitez en el cultivo de nierembergia sin afectar los genotipos de petunia, tomate y coral que fueron evaluados.

2.4. *Nigrospora oryzae*

2.4.1. Introducción

El nombre genérico *Nigrospora* (Zimm.) (filo Ascomycota) fue propuesto por Zimmermann (1902) para *N. panici*, endófito de hojas de *Panicum amphibium* en Indonesia. Mason (1927) transfirió a *Nigrospora* a varios géneros de hyphomycetes de esporas negras con hospedantes monocotiledóneos como *Monotospora* (Corda), *Trichosporum* (Fr.), *Hadrotrichum* (Fuckel) y *Glenospora* (Berk. & Desm.).

Nigrospora es un género importante, con una distribución cosmopolita y una amplia gama de hospedantes. Incluye especies endófitas de hojas y tallos de varias plantas, saprobias de detritos, larvas muertas u hojarasca y presentes en polvos ambientales (Mason, 1927; Wu *et al.*, 2009; Thalavaipandian *et al.*, 2011; Uzor *et al.* 2015). Se registraron como patógenas en muchos cultivos frutales y ornamentales importantes. Los reportes incluyen a *N. oryzae* (Berk. & Broome) que causó tizón del tallo en *Brassica juncea* (L.) en la India (Sharma *et al.*, 2013), *N. sphaerica* (Sacc.) que ocasionó tizón foliar en *Camellia sinensis* (L.) en China (Liu *et al.*, 2015) y en *Vaccinium corymbosum* (L.) en Argentina (Wright *et al.*, 2008) y *N. musae* (McLennan & Hoëtte) que causó la enfermedad del *squirter* en los bananos (Jones y Stover, 2000). *N. sphaerica* es un patógeno oportunista que causa onicomycosis (De Hoog *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2009) y úlcera corneal (Kindo *et al.*, 2014) en humanos. Además, algunas esporas de *Nigrospora* son responsables de la respuesta alérgica tipo I, rinitis estacional (fiebre del heno), asma o enfermedades alérgicas respiratorias (Khan y Karuppaiyl, 2012; Saha y Bhattacharya, 2015). Wu *et al.* (2004) reportaron que las esporas de *Nigrospora* tienen alta prevalencia en la atmósfera, asociadas con tormentas de polvo. *N. oryzae* fue reportada como patógena en 142 hospedantes de diferente importancia económica en el mundo (Farr y Rossman, 2023).

En octubre de 2019, plantas de calibrchoa INTA 06575 cultivadas en un invernadero de polietileno en Hurlingham desarrollaron manchas foliares sin presencia de signos. Los objetivos de este trabajo fueron describir la sintomatología, identificar al agente causal y determinar la respuesta de variedades del hospedante a la enfermedad.

2.4.2. Materiales y métodos

a. Recolección de plantas enfermas

Se tomaron muestras de plantas con manchas foliares (Figura 2.4.1) y se llevaron a laboratorio. Se describieron los síntomas.



Figura 2.4.1. Plantas de calibrachoa INTA 06575. A) Sana; B) con manchas foliares.

b. Aislamiento y conservación de microorganismos asociados

Secciones de hojas sintomáticas de calibrachoa (aproximadamente 1 cm²) se desinfectaron superficialmente en etanol al 70 % durante un minuto e hipoclorito de sodio (20 g Cl L⁻¹ de agua) por otro minuto, se enjuagaron en agua destilada estéril y se cultivaron en placas de Petri con APG a 22 °C durante 5 días. Las colonias de hongos que desarrollaron fueron subcultivadas en APG a 25 °C para obtener un aislado puro y estudiar sus características. Posteriormente se procedió a obtener cultivos monospóricos según el apartado 2.1.2.b., los cuales se conservaron en tubos con tapa a rosca en APG y en agua destilada estéril en heladera.

c. Pruebas de patogenicidad

Para los estudios de patogenicidad, veinticuatro plantas sanas de calibrachoa INTA 06575 se obtuvieron por propagación asexual y se mantuvieron en macetas de 10 cm de diámetro con sustrato Terrafertil® Z-Floricultura según lo descrito en el apartado 2.1.2.c. Transcurridos 60 días desde el trasplante, doce plantas fueron pulverizadas con suspensiones de esporas del hongo con concentraciones estandarizadas por recuentos en cámara de Neubauer y diluciones en 1 x 10⁵ conidios mL⁻¹ de agua destilada estéril. El inóculo fue preparado a partir de colonias puras con crecimiento de 14 días en APG. El tratamiento testigo consistió en doce plantas que fueron

pulverizadas con agua destilada estéril. Las plantas se colocaron individualmente en bolsas de polietileno y se dispusieron sobre mesadas de un invernadero a 24 °C. Las bolsas se retiraron después de 72 h y se registró la aparición y el desarrollo de síntomas.

d. Identificación taxonómica

A los fines de realizar la caracterización del patógeno, se cortaron discos de 5 mm de diámetro del margen de colonias en crecimiento activo en APG, se transfirieron al centro de placas de Petri con agar sintético pobre en nutrientes (SNA) y se incubaron a 28 °C (Wang *et al.*, 2017). Se observaron el frente y el dorso de las colonias en ambos medios de cultivo y se midieron los conidióforos, las células conidiógenas y los conidios. Con el fin de confirmar la identidad del aislado, se realizó su caracterización molecular mediante la amplificación y secuenciación de parte de la región ITS del ADNr con los cebadores ITS1 e ITS4 (Wang *et al.*, 2017). La secuencia obtenida fue cargada en el GenBank y se compararon las secuencias de nucleótidos con las publicadas en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.4.3. Resultados y discusión

a. b. Recolección de plantas enfermas, aislamiento y conservación de microorganismos asociados

Las lesiones foliares eran de color marrón, de formas irregulares, con dimensiones medias de 6 mm x 2 mm, más frecuentes en las hojas basales de las plantas. A partir de la siembra de las hojas infectadas desarrolló un hyphomycete cuya morfología coincidió con las descripciones del género *Nigrospora* (Mason, 1927). El mismo se codificó como INTA IF-540 y se conservó en la colección de hongos del Laboratorio de Sanidad del Instituto de Floricultura INTA.

c. Pruebas de patogenicidad

Cinco días después de la inoculación algunas áreas de las hojas basales parecían ligeramente hundidas y algo descoloridas, y se tornaron más brillantes en los dos días posteriores. Esas zonas blanquecinas se convirtieron en marrón claro en otros 2 días. A 15 días de la inoculación, las manchas presentaron formas irregulares con o sin márgenes oscuros y centros marrones hundidos (Figura 2.4.2). Las hojas apicales de las plantas inoculadas, así como todas las hojas de los controles, se mantuvieron sanas. El hongo se pudo reaislar de esas manchas.

Begum *et al.* (2018) realizaron pruebas de patogenicidad con un aislado de *N. oryzae* en plantas de aloe (*Aloe barbadensis* Miller) y observaron manchas pequeñas y circulares luego de 7 a 12 días desde la inoculación. Han *et al.* (2021b) inocularon plantas de malva (*Hibiscus mutabilis* L.) con suspensiones de esporas de un aislado de *N. oryzae* y detectaron que luego de dos semanas se produjeron manchas foliares negras, irregulares que crecían, se fusionaban y en algunos casos se pudo observar clorosis y abscisión foliar.

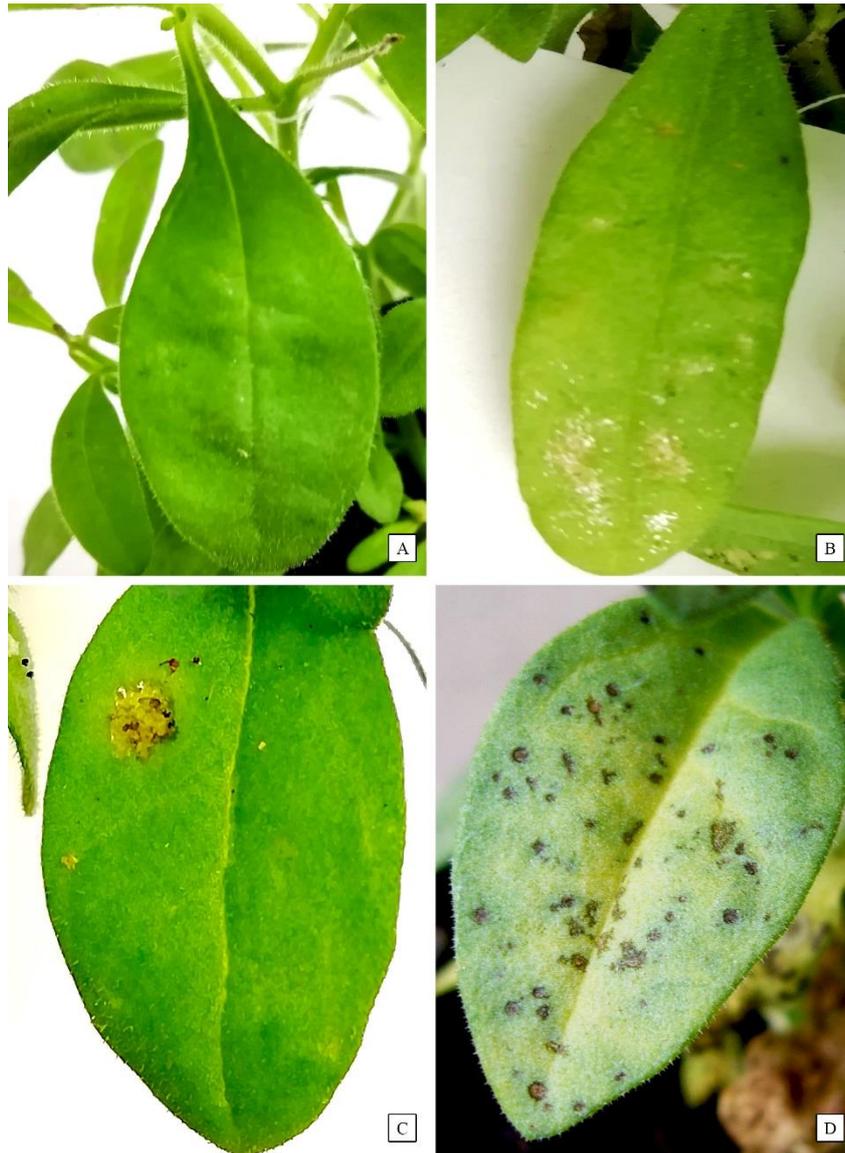


Figura 2.4.2. Manchas foliares causadas por *Nigrospora oryzae* en hojas inoculadas de *Calibrachoa hybrida*. A) áreas foliares ligeramente hundidas; B) manchas descoloridas y brillantes; C) manchas marrones claras; D) manchas foliares completamente desarrolladas.

d. Identificación taxonómica

En APG, el aislado desarrolló colonias flocosas, inicialmente blancas y luego grisáceas, que alcanzaron los 9 cm de diámetro en 7 días. En el reverso pudo observarse coloración parda en

el medio de cultivo y tonalidades más oscuras en la zona de esporulación (Figuras 2.4.3 A y B). En SNA, después de 7 días las colonias inicialmente blancas (Figuras 2.4.3 C y D) se tornaron marrón oscuro a negro con abundante micelio aéreo y alcanzaron un diámetro de 8,1 cm. En el reverso las colonias fueron idénticas al anverso. El inicio de la esporulación se produjo a partir del día 10. Se observaron hifas hialinas, ramificadas, septadas y lisas que se volvieron marrones más cerca de las células conidiógenas. Los conidióforos, de 3,4 (1,9-6,5) μm , se agregaron en esporodoquios oscuros (Figura 2.4.3 E) con células conidiógenas hialinas, monoblásticas, determinadas y ampuliformes de 6,5 (4,2-8,7) x 6,1 (3,4-9,8) μm . Se formaron abundantes conidios negros subglobosos, unicelulares, de 13,7 (11,9-16,0) x 12,4 (8,8-14,8) μm (Figura 2.4.3 F). No se observó el estado teleomórfico. La morfología del aislamiento coincidió con las descripciones de *Nigrospora oryzae* (Wang *et al.*, 2017). Se depositó un aislado monoconidial en el Colección de Cultivos de Hongos Entomopatógenos (CEPAVE-CONICET) de La Plata como CEP 786.

La secuencia fue cargada en el GenBank con el número de acceso MT177215. La comparación de nucleótidos BLAST mostró un 100 % de similitud con las secuencias de *N. oryzae* (ex. EU529994, MG182683) publicadas en el NCBI.

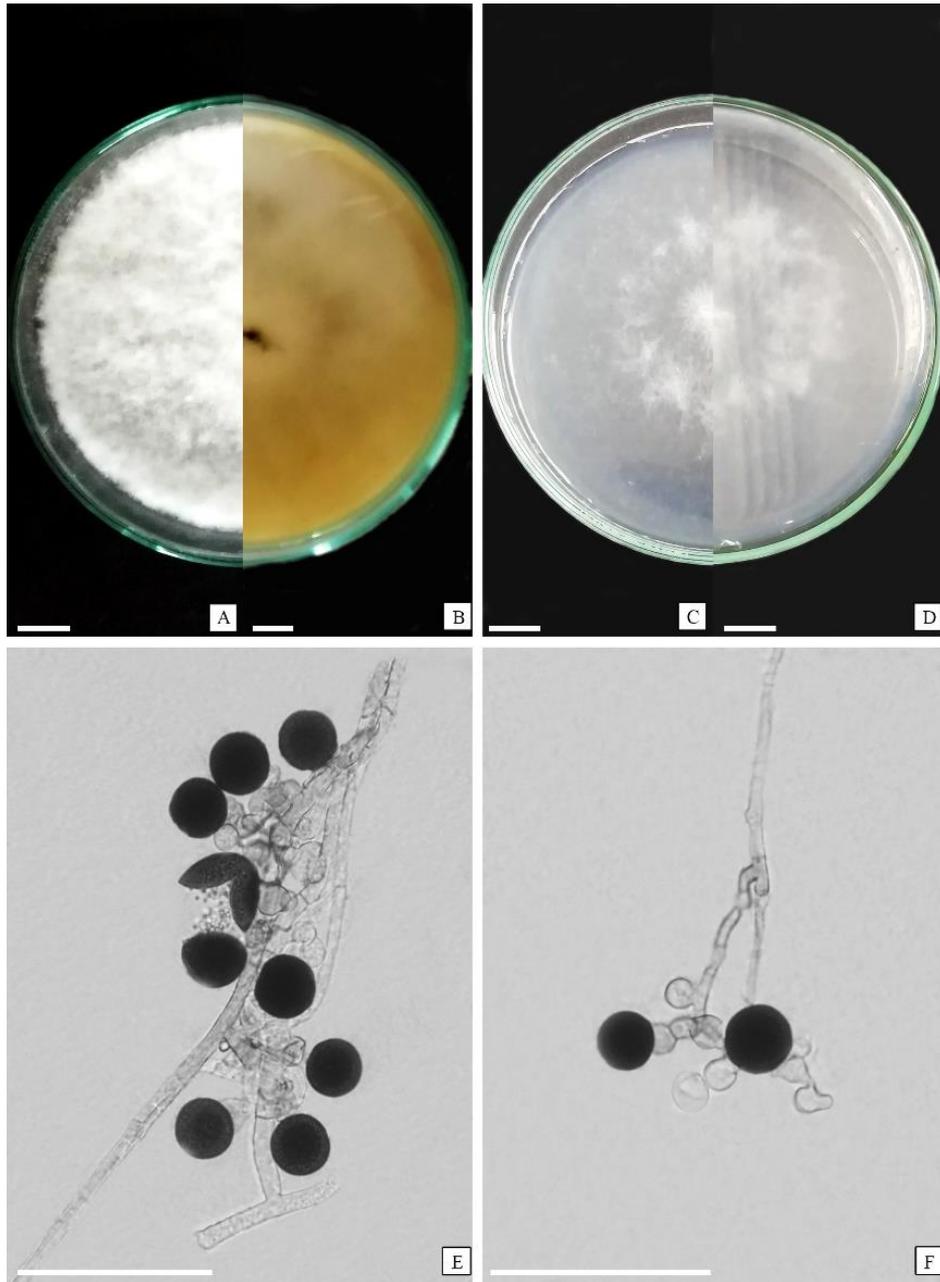


Figura 2.4.3. Cultivos de *Nigrospora oryzae*. A y B) vistas superior e inferior en APG (barra de escala = 1 cm); C y D) vistas superior e inferior en SNA (barra de escala = 1 cm); E) esporodoquios (barra de escala= 50 μ m); f) conidios (barra de escala= 50 μ m).

En este apartado se pudo comprobar la patogenicidad de un aislado de *Nigrospora oryzae* como el agente causal de manchas foliares en calibrchoa. Las especies de *Nigrospora* generalmente se consideran necrótrofos débiles con una amplia gama de hospedantes (Paul, 1982). Esto podría indicar que cualquier condición de estrés aumentaría las posibilidades de las plantas de enfermarse. Según Hao *et al* (2020) las infecciones por *Nigrospora* ocurren fácilmente en plantas debilitadas o heridas. Wright *et al.* (2008) detectaron que la infección de *N. sphaerica* fue favorecida por heridas causadas por insectos y daños por helada. De acuerdo con ello, es

necesario mantener a los cultivos de calibrachoa con adecuada fertilización y niveles de riego y evitar la aparición de plagas animales de manera de disminuir las infecciones con este patógeno.

2.4.4. Conclusiones

- La cepa *Nigrospora oryzae* INTA IF-540 causa manchas foliares en calibrachoa.
- Este es el primer reporte de *N. oryzae* como agente causal de la enfermedad, en el mundo.

2.5. Conclusiones del capítulo

- Se detectaron especies de 4 géneros fúngicos (*Fusarium*, *Sclerotinia*, *Ceratobasidium* y *Nigrospora*) como agentes causales de marchitez, tizón y manchas foliares en calibrachoa (*Calibrachoa hybrida*). El género más prevalente fue *Fusarium*.
- Se detectaron 3 grados de agresividad dentro de los aislados de *Fusarium* sp.: altamente agresivos (INTA IF-535, 536 y 569), moderadamente agresivos (INTA IF-566, 559 y 538) y levemente agresivos (INTA IF- 534, 567 y 577).
- Algunas cepas de *Fusarium* sp. presentaron la capacidad de causar marchitez en plantas de los géneros *Nierembergia* y *Petunia*.
- Estos son los primeros reportes de *Fusarium proliferatum*, *F. fujikuroi*, *F. oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Ceratobasidium* sp. y *Nigrospora oryzae* como agentes causales de enfermedades de la calibrachoa en el mundo.

2.6. Bibliografía

Abán CL, Taboada G, Spedaletti Y, Aparicio M, Curti RN, Casalderrey NB, Maggio ME, Chocobar MO, Salgado M, Galvan MZ. 2018. Molecular, morphological and pathogenic diversity of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from common bean (*Phaseolus vulgaris*) fields in Argentina. *Plant Pathol.* 67(8): 1740-1748.

Abawi GS y Grogan RG. 1979. Epidemiology of disease caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69: 899-904.

Abbas HK, Mirocha CJ, Berdal BP, Sundheim L, Gunther R, Johnsen B. 1987. Isolation and toxicity of *Fusarium* species from various areas of Norway. *Acta Agric. Scand.* 37: 427-435. DOI: 10.1080/00015128709436574.

Abd Murad NB, Izham NM, Mohamed N, Shohaimi S, Izzati NA, Zainudin M. 2017. Genetic diversity and pathogenicity of *Fusarium* species associated with fruit rot disease in banana across Peninsular Malaysia. *J. Appl. Microbiol.* 123(6): 1533-1546. DOI: 10.1111/jam.13582.

Adams PB, Ayers WA. 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69: 896-899. DOI: 10.1094/Phyto-69-896.

Aiello D, Guarnaccia V, Formica PT, Hyakumachi M, Polizzi G. 2017. Occurrence and characterisation of *Rhizoctonia* species causing diseases of ornamental plants in Italy. *Eur. J. Plant Pathol.* 148: 967-982. DOI: 10.1007/s10658-017-1150-8.

Aljanabi SM, Martinez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research* 25(22): 4692-4693. DOI: 10.1093/nar/25.22.4692.

American Phytopathological Society. 2022. Common names of plant diseases. Recuperado de: <https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/default.aspx>.

Aoki T, O'Donnell K, Ichikawa K. 2001. *Fusarium fractiflexum* sp. nov. and two other species within the *Gibberella fujikuroi* species complex recently discovered in Japan that form aerial conidia in false heads. *Mycoscience* 42: 462-478. DOI: 10.1007/bf02464343.

Arakawa M, Inagaki K. 2014. Molecular markers for genotyping anastomosis groups and understanding the population biology of *Rhizoctonia* species. *J. Gen. Plant Pathol.* 80: 401-407. DOI: 10.1007/s10327-014-0536-0.

Armstrong GM y Armstrong JK. 1981. Formae speciale and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt disease. En: Nelson PE, Toussoun TA, Cook RJ (Eds.). *Fusarium: disease, biology, and taxonomy*. Pennsylvania State University. University Park. 457 pp.

Baayen RP, Waalwijk C. 1997. Identification of physiologic races and formae speciales of *Fusarium oxysporum*. En: *Diagnosis and identification of plant pathogens*. Dehne HW, Adam G, Diekmann M, Frahm J, Mauler-Machnik A, Van Halteren P. (Eds.) *Proceedings of the 4th International Symposium of the European Foundation for Plant Pathology*. Pp 59-62.

Bahadur A. 2021. Current status of *Fusarium* and their management strategies. In: Mirmajlessi SA (Ed.). *Fusarium - An overview of the genus*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.100608.

- Bandoni RJ. 1979. Safranin O as a rapid nuclear stain for fungi. *Mycologia* 71: 873-874. DOI: 10.1080/00275514.1979.12021088.
- Bardin SD, Huang HC. 2001. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 23: 88-98. DOI: 10.1080/07060660109506914.
- Bazzalo ME, Dimarco P, Martínez F, Daleo GR. 1991. Indicators of resistance of sunflower plant to basal rot (*Sclerotinia sclerotiorum*): Symptomatological, biochemical, anatomical, and morphological characters of the host. *Euphytica* 57: 195-205. DOI: 10.1007/BF00039666.
- Begum M, Hamza A, Tanny T, Das KC, Mahmud MT, Salimullah M, Alam I. 2018. First report of leaf spot disease in aloe vera caused by *Nigrospora oryzae* in Bangladesh. *Plant Dis.* 102(7): 1461. DOI: 10.1094/PDIS-11-17-1857-PDN.
- Bell AA y Wheeler MH. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24: 411-451. DOI: 10.1146/annurev.py.24.090186.002211.
- Boix-Ruíz A, Gálvez-Patón L, de Cara-García M, Palmero-Llamas D, Camacho-Ferre F, Tello-Marquina JC. 2015. Comparison of analytical techniques used to identify tomato-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytoparasitica* 43: 471-483. DOI: 10.1007/s12600-014-0444-z.
- Boland GJ y Hall R. 1988. Epidemiology of *Sclerotinia* stem rot of soybean in Ontario. *Phytopathology* 78(9): 1241-1245.
- Bolton MD, Thomma BPHJ, Nelson BD. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol. Plant Pathol.* 7: 1-16. DOI: 10.1111/J.1364-3703.2005.00316.X.
- Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Booth C. 1981. Perfect states (teleomorphs) of *Fusarium* species. Pp. 446-452. En: Nelson PE, Toussoun TA, Cook RJ (Eds.). *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy*. University Park: Pennsylvania State University Press.
- Booth C. 1984. The *Fusarium* problem: historical, economic and taxonomic aspects. In: Moss MO y Smith JE (Eds.). *The applied mycology of Fusarium*. Cambridge University Press, Cambridge. 264 pp.
- Brayford D. 1993. *The Identification of Fusarium Species*. CAB International, UK, 119 pp.
- Brentzel WE, 1948. Plant Diseases new or rarely found in North Dakota: Root rot of sunflowers. *N. D. Agric. Exp. Stn. Bimonthly Bull.* 10:113.
- Britz H, Steenkamp ET, Coutinho TA., Wingfield BD, Marasas WFO, Wingfield MJ. 2002. Two new species of *Fusarium* Section *Liseola* associated with mango malformation. *Mycologia* 94: 722-730. DOI: 10.2307/3761722.
- Burgess LW. 1981. General ecology of *Fusaria*. Pp. 225-235. En: Nelson PE, Toussoun TA, Cook RJ (Eds.) *Fusarium: Diseases, biology and taxonomy*. The Pennsylvania State University Press, London.

Burgess LW, Summerell BA, Backhouse D, Benyon F, Levic J. 1996. Biodiversity and population studies in *Fusarium*. *Sydowia* 48(1): 1-11.

Burlakoti P, Rivera-Varas V, Secor GA, Qi A, del Rio Mendoza LE, Khan MFR. 2012. Comparative pathogenicity and virulence of *Fusarium* species on sugar beet. *Plant Dis.* 96: 1291-1296. DOI: PDIS-10-11-0908-RE.

Cabello M, Arambarri A, 2002. Diversity in soil fungi from undisturbed and disturbed *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* forests in the eastern Buenos Aires province (Argentina). *Microbiol. Res.* 157: 115–125. DOI: 10.1078/0944-5013-00138.

Cao S, Yang N, Zhao C, Liu J, Han C, Wu X. 2018. Diversity of *Fusarium* species associated with root rot of sugar beet in China. *J. Gen. Pl. Pathol.* 84(5): 321-329. DOI: 10.1007/s10327-018-0792-5.

Carling DE, Baird RE, Gitaitis RD, Brainard KA, Kuninaga S. 2012. Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 92(8): 893-899. DOI: 10.1094/PHYTO.2002.92.8.893.

Cedeño L. 2008. Método fácil y confiable para teñir núcleos en hongos del complejo *Rhizoctonia*. *Bioagro* 20(3): 215-219. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85714153009>.

Chang KF, Hwang SF, Conner RL, Ahmed HU, Zhou Q, Turnbull GD, Strelkov SE, McLaren DL, Gossen BD. 2015. First report of *Fusarium proliferatum* causing root rot in soybean (*Glycine max* L.) in Canada. *Crop Protect.* 67: 52-58

Chang X, Dai H, Wang D, Zhou H, He W, Fu Y, Ibrahim F, Zhou Y, Gong G, Shang J, Yang J, Wu X, Yong T, Song C, Yang W. 2018. Identification of *Fusarium* species associated with soybean root rot in Sichuan Province, China. *Eur. J. Plant. Pathol.* 151: 563–577. DOI: 10.1007/s10658-017-1410-7.

Chapara V, Chittem K, Mendoza LE del R. 2018. First report of white mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum* on faba beans in North Dakota. *Dis. Notes* 102(8). DOI: 10.1094/PDIS-12-17-1954-PDN.

Choi IY, Kim J, Lee WH, Cho SE, Shin HD. 2017. First report of *Sclerotinia* stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* on Chinese chives in Korea. *Plant Dis.* 101(11): 1953-1953. DOI: 10.1094/PDIS-04-17-0587-PDN.

Clarckson JP, Phelps K, Whipps JM, Young CS, Smith JA, Watling M. 2006. Forecasting *Sclerotinia* disease on lettuce: a predictive model for carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia. *Phytopathology* 97(5): 621-631. DOI: 10.1094/PHYTO-97-5-0621.

Clavijo Castro SD. 2014. Búsqueda de resistencia a la pudrición causada por *Fusarium* spp. en *Capsicum*. Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Magíster en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional De Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Coordinación General de Postgrados. Palmira, Colombia.

Connors IL. 1967. An annotated Index of plant diseases in Canada and fungi recorded on plants in Alaska, Canada and Greenland. *Res. Bra. Canada Dept. Agri.* 1251: 1-381.

- Correll JC, Klittich CJR, Leslie JF. 1987. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77(12): 1640-1646.
- Cuomo CA, Güldener U, Xu JR, Trail F, Turgeon BG, Di Pietro A, Walton JD, Ma L, Baker SE, Rep M, Adam G, Antoniw J, Bladwin T, Calvo S, Chang YL, Decaprio D, Gale LR, Gnerre S, Goswami RS, Hammond-Kosack K, Harris LJ, Hilburn K, Kennell JC, Kroken S, Magnuson JK, Mannhaupt G, Mauceli E, Mewes HW, Mitterbauer R, Muehlbauer G, Münsterkötter M, Nelson D, O'Donnell K, Ouellet T, Qi W, Quesneville H, Roncero MIG, Seong KY, Tetko IV, Urban M, Waalwijk C, Ward TJ, Yao J, Birren BW, Kistler HC. 2017. The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science* 317(5843): 1400-1402. DOI: 10.1126/science.1143708.
- Dayrat B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biol. J. Linn. Soc.* 85: 407-415. DOI: 10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x.
- Dean R, van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster GD. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13: 414-430. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x.
- De Bary A. 1887. *Comparative morphology and biology of the fungi, mycetoza and bacteria.* Oxford, UK: Clarendon Press. 525 p. DOI: 10.5962/bhl.title.56861.
- De Hoog GS, Guarro J, Gene J. 2000. *Atlas of clinical fungi.* Centraalbureau voor chimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. 777 pp.
- De Vega Bartol JJ, Martín Dominguez R, Ramos B, García Sanchez MA, Díaz Mínguez JM. 2011. New virulence groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*: The expression of the gene coding for the transcription factor *ftf1* correlates with virulence. *Phytopathology* 101: 470-479. DOI: 10.1094/PHYTO-09-10-0252.
- Delhey R, Kiehr M, Allievi MI, Justo J, Frayssinet S, Sidori Hartmann B, Kröger I, Paolini PJ, Zappacosta D, Servera A. 2008. *Sclerotinia sclerotiorum* en plantas cultivadas e invasoras del sur pampeano y norte patagónico, Argentina. *Phyton* 78: 111-115.
- Desjardins AE. 2006. *Fusarium mycotoxins: Chemistry, genetics and biology.* APS Press, St. Paul, Minnesota. 268 p. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2006.01505.x.
- Di Rienzo JA, Guzmán AW, Casanoves F. 2002. A multiple comparison method based on the distribution of the root node distance of a binary tree obtained by average linkage of the matrix of euclidean distances between treatment means. *J Agric Biol Environ Stat.* 7(2): 129-142. DOI: 10.1198/10857110260141193.
- Dobbs JT, Kim M, Dudley NS, Jones TC, Yeh A, Dumroese RK, Cannon FG, Hauff RD, Klopfenstein NB, Wright S, Stewart JE. 2021. *Fusarium* spp. diversity associated with symptomatic *Acacia koa* in Hawai'i. *For. Pathol.* 00:e12713: 1-6. DOI: 10.1111/efp.12713.
- Duan CX, Wang BB, Sun FF, Yang ZH, Zhu ZD, Wang XM. 2020. Occurrence of maize ear rot caused by *Fusarium fujikuroi* in China. *Dis. Notes* 104(2): 587. DOI: 10.1094/PDIS-01-19-0154-PDN.
- Dusengemungu, L. 2021. *Fusarium* soilborne pathogen. In: Mirmajlessi SA (Ed.). *Fusarium - An overview of the genus.* IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.100608.

Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N., and Alabouvette, C. 1997. Populations of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* associated with roots of four plant species compared to soilborne populations. *Phytopathology* 87: 693-697. DOI: 10.1094/PHYTO.1997.87.7.693.

Erper, I., G. Ozer, R. Kalendar, S. Avci, E. Yildirim, M. Alkan, and M. Turkkan. 2021. Genetic diversity and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolates associated with red cabbage in Samsun (Turkey). *J. Fungi* 7: 234-254. DOI: 10.3390/jof7030234.

Fan YM, Huang WM, Li W. 2009. Onychomycosis caused by *Nigrospora sphaerica* in an immunocompetent man. *Arch. Dermatol.* 145: 611–612. DOI: 10.1001/archdermatol.2009.80.

Fandohan P, Hell K, Marasas WFO, Wingfield MJ. 2003. Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in Africa. *Afr. J. Biotechnol.* 12: 570-579. DOI: 10.5897/AJB2003.000-1110.

Fang X, Finnegan PM, Barbetti MJ. 2013. Wide variation in virulence and genetic diversity of binucleate *Rhizoctonia* isolates associated with root rot of strawberry in Western Australia. *PLoS One.* 8(2): e55877. DOI: 10.1371/journal.pone.0055877.

Farr DF, Rossman AY. 2034. Fungal databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> (Consultado 11/01/2023).

Fennell DI. 1960. Conservation of fungous cultures. *Bot. Rev.* 26: 79-141. DOI: 10.1007/BF02860481.

Figueirêdo GS, Figueirêdo LC, Nunes Cavalcanti FC, Coimbra dos Santos A , da Costa AF, de Oliveira NT. 2010. Biological and chemical control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and pathogenicity to bean plants. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53(1): 1-9. DOI: 10.1590/S1516-89132010000100001.

French AM. 1989. California plant disease host index. Calif. Dept. Food Agric., Sacramento, 394 pp.

Gálvez L, Palmero D. 2022. *Fusarium* dry rot of garlic bulbs caused by *Fusarium proliferatum*: a review. *Horticulturae* 8(628): 1-20. DOI: 10.3390/horticulturae8070628.

García López M, Uruburu Fernández F. 2004. La conservación de cepas microbianas. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Universidad de Valencia. Recuperado de: https://www.uv.es/cect2/87_Conservacion_cepas_microbianas.

Garg H, Li H, Sivasithamparam K, Kuo J, Barbetti MJ, 2010. The infection processes of *Sclerotinia sclerotiorum* in cotyledon tissue of a resistant and a susceptible genotype of *Brassica napus*. *Ann. Bot.* 106: 897-908. DOI: 10.1093/aob/mcq196.

Garibaldi A, Bertetti D, Pensa P, Gullino ML. 2009. First report of sclerotinia blight caused by *Sclerotinia sclerotiorum* on *Petunia x hybrida* in Italy. *Plant Dis.* 93: 1353. DOI: 10.1094/PDIS-93-12-1353a.

Geiser DM, Jiménez-Gasco MM, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, O'donnell K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 473-479. DOI: 10.1023/B:EJPP.0000032386.75915.a0.

- Geiser DM, Lewis Ivey ML, Hakiza G, Juba JH, Miller SA. 2005. *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unrecognized member of the *G. fujikuroi* complex. *Mycologia* 97: 191-201. DOI: 10.3852/mycologia.97.1.191.
- Gerlach W, Nirenberg H. 1982. The genus *Fusarium* - a pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem*. 406 pp.
- González García V, Portal Onco MA, Rubio Susan V. 2006 Review. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Span. J. Agric. Res.* 4(1): 55-79. DOI: 10.5424/sjar/2006041-178.
- González García V. 2008. Aspectos de sistemática y biología del complejo *Rhizoctonia*. *Fitosanidad* 12(3): 147-159.
- Gordon WL. 1960. The taxonomy and habitats of *Fusarium* species from tropical and temperate regions. *Can. J. Bot.* 38. DOI: 10.1139/b60-058.
- Gordon TR, Martyn RD. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 111–128. DOI: 10.1146/annurev.phyto.35.1.111.
- Guillemaut C, Hermann VE, Camporota P, Alabouvette C, Molard MR, Steinberg C. 2003. Typing of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by restriction analysis of ribosomal DNA. *Can. J. Microbiol.* 49(9): 556-558. DOI: 10.1139/w03-066.
- Gulya TJ y Vick BA. 1986. Sclerotinia Head Rot of sunflower in North Dakota: 1986 Incidence, effect on yield and oil components, and sources of resistance. *Plant Dis.* 73(6): 504-507.
- Han S, Li Y, Wang M, Mo Y, Li S, Liu Y, Wan X, Qiao T, Lin T, Yang C, Zhu T. 2021a. Stem rot disease of *Juglans sigillata* Dode caused by *Fusarium fujikuroi* in China. *Dis. Notes* 105(7): 2019. DOI: 10.1094/PDIS-07-20-1579-PDN.
- Han S, Yu S, Zhu T, Li S, Qiao T, Liu Y, Lin T, Yang C. 2021b. *Nigrospora oryzae* causing black leaf spot disease of *Hibiscus mutabilis* in China. *Plant Dis.* 105(8): 2255. DOI: 10.1094/PDIS-08-20-1796-PDN
- Hao Y, Aluthmuhandiram JVS, Thilini Chethana KW, Manawasinghe IS, Li X, Liu M, Hyde KD, Phillips AJL, Zhang W. 2020. *Nigrospora* species associated with various hosts from Shandong Peninsula, China. *Mycobiology* 48(3): 169-183. DOI: 10.1080/12298093.2020.1761747.
- Henson JM, Butler MJ, ay AW. 1999. The dark side of mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 447-471. DOI: 10.1146/annurev.phyto.37.1.447.
- Hietala AM, Sen R, Lilja A. 1994. Anamorphic and teleomorphic characteristics of a uninucleate *Rhizoctonia* sp. isolated from the roots of nursery grown conifer seedlings. *Mycol. Res.* 98 (9): 1044-1050.
- Hou YP, Mao XW, Qu XP, Wang JX, Chen CJ, Zhou MG. 2018. Molecular and biological characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* resistant to the anilinopyrimidine fungicide cyprodinil. *Pestic. Biochem. Physiol.* 146: 80-89. DOI: 10.1016/j.pestbp.2018.03.001.
- Huang HC, Kokko EG. 1992. Pod rot of dry peas due to infection by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis.* 76: 597-600. DOI: 10.1094/PD-76-0597.

Huang HC, Kozub GC. 1989. A simple method for production of apothecia from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Prot. Bull. 31: 333-345.

Huang HC, Kozub GC. 1993. Influence of inoculum production temperature on carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Can. J. Microbiol. 39: 548-550. DOI: 10.1139/m93-078.

Hyakumachi M, Priyatmojo A, Kubota M, Fukui H. 2005. New anastomosis groups, AG-T and AG-U, of binucleate *Rhizoctonia* causing root and stem rot of cut-flower and miniature roses. Phytopathology 95: 784-792. DOI: 10.1094/PHYTO-95-0784.

InfoStat (2007). Grupo de Estadística y Biometría. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba.

Isaac MR, Leyva-Mir SG, Sahagún-Castellanos J, Câmara-Correia K, Tovar-Pedraza JM, Rodríguez-Pérez JE. 2018. Occurrence, identification, and pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with tomato wilt in Mexico. Not. Bot. Horti. Agrobot. 46(2): 1-11. DOI: 10.15835/AcademicPres nbha46211095.

Jamaux J, Gelie B, Lamarque C. 1995. Early stages of infection rapeseed petals and leaves by *Sclerotinia sclerotiorum* revealed by scanning electron microscopy. Plant Pathol. 44: 22-30. DOI: 10.1111/j.1365-3059.1995.tb02712.x.

Jones DR, Stover RH. 2000. Fungal diseases of banana fruit. Pp. 173-211. En: Jones DR (Ed.), Diseases of banana, abacá and enset. CABI publishing, Wallingford, UK.

Kang S, Demers J, Jimenez-Gasco MM, Rep M. 2014. *Fusarium oxysporum*. En: Dean RA, Lichens-Park A, Kole C. (Eds.). Genomics of plant-associated fungi and oomycetes: Dicot pathogens. Springer-Verlag. Berlin, Alemania. 239 pp. DOI: 10.1007/978-3-662-44056-8_5.

Kawabe M, Kobayashi Y, Okada G, Yamaguchi I, Teraoka T, Arie T. 2005. Three evolutionary lineages of tomato wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, based on sequences of IGS, MAT1, and pg1, are each composed of isolates of a single mating type and a single or closely related vegetative compatibility group. J. Gen. Plant Pathol. 71: 263-272. DOI: 10.1007/s10327-005-0203-6.

Khan AAH, Karuppayil SM. 2012. Fungal pollution of indoor environments and its management. Saudi J. Biol. Sci. 19: 405-426. DOI: 10.1016/j.sjbs.2012.06.002.

Kim WG y Cho WD. 2003. Occurrence of *Sclerotinia* rot in solanaceous crops caused by *Sclerotinia* spp. Mycobiology 31(2): 113-11. DOI: 10.4489/MYCO.2003.31.2.113.

Kindo AJ, Subramanian A, Suresh K. 2014. *Nigrospora sphaerica* causing corneal ulcer in an immunocompetent woman: a case report. Int. J. Case Rep. Imag. 5: 675-679. DOI: 10.5348/ijcri-2014119-CR-10430.

Klittich CJR, Leslie JF, Nelson PE, Marasas WFO. 1997. *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): A new species in section Liseola from sorghum. Mycologia 89: 643-652. DOI: 10.1080/00275514.1997.12026829.

Koch S, Dunker S, Kleinhenz B, Röhrig M, Von Tiedemann A. 2007. 10.1080/00275514.1997.12026829 *Phytopathology* 97(9): 1186-1194. DOI: 10.1094/PHYTO-97-9-1186.

Kommedahl T, Abbas HK, Burnes PM, Mirocha CJ. 1988. Prevalence and toxigenicity of *Fusarium* species from soils of Norway near the Arctic Circle. *Mycologia*, 80(6): 790-794. DOI: 10.2307/3807556.

Kuninaga S. 2002. Current situation of the taxonomy of the genus *Rhizoctonia* and the *R. solani* species complex. *Jpn. J. Phytopathol.* 68: 3-20. DOI: 10.3186/jjphytopath.68.3.

Kvas M, Marasas WFO, Wingfield BD, Wingfield MJ, Steenkamp ET. 2009. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Divers.* 34: 1-21. DOI: 10.1007/s13353-013-0146-0.

Leslie JF. 1995. *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. *Can. J. Bot.* 73: 282-291. DOI: 10.1139/b95-258.

Leslie JF, Anderson LL, Bowden RL, Lee YW. 2007. Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. *Int. J. Food Microbiol.* 119: 25-32. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.059.

Leslie JF, Summerell BA, Bullock S, Doe FJ. 2005. *Gibberella sacchari*: The teleomorph of *Fusarium sacchari*. *Mycologia* 97: 718-724.

Leslie JF, Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Iowa, USA, 386 pp.

Le Tourneau D. 1979. Morphology, cytology, and physiology of *Sclerotinia sclerotiorum* species in culture. *Phytopathology* 69(8): 887-890. DOI: 10.1094/Phyto-69-887.

Libert MA. 1837. *Plante Cryptogamicae arduennae (Exsiccati) No. 326*. Libert, Massachusetts.

Lievens B, Hanssen IM, Rep M. 2012. Recent developments in the detection and identification of *formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum*: from pathogenicity testing to molecular diagnostics. En: Gullino ML, Katan J, Garibaldi A (Eds) *Fusarium wilts of greenhouse vegetable and ornamental crops*. APS Press, St. Paul, pp 47–55.

Link JHF. 1809. *Observations in Ordines Plantarum naturales*. *Magazin der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin* 3: 10.

Liu L, Kloepper JW, Tuzun S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth promoting rhizobacteria. *Biol. Control* 85(6): 695-698. DOI: 10.1094/Phyto-85-695.

Liu YJ, Tang Q, Fang L. 2015. First report of *Nigrospora sphaerica* causing leaf blight on *Camellia sinensis* in China. *Plant Dis.* 100: 221. DOI: 10.1094/PDIS-04-15-0493-PDN.

Logrieco A, Moretti A, Ritieni A, Bottalico A, Corda P. 1995. Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated mycotoxins, in Italy. *Plant Dis.* 79: 727-731.

- Lombard L, Sandoval-Denis M, Lamprecht SC, Crous PW. 2018. Epitypification of *Fusarium oxysporum* – clearing the taxonomic chaos. *Persoonia* 43: 1-47. DOI: 10.3767/persoonia.2019.43.01.
- Long H, Yin X, Zhao Z, Long Y, Fan J, Shu R, Gu G. 2021. First report of fruit blotch on plum caused by *Fusarium fujikuroi* in China. *Dis. Notes* 105(8): 2256. DOI: 10.1094/PDIS-08-20-1784-PDN.
- Lori G, Salerno MI, Wolcan S, Gimenez J, Basil G. 1999. *Fusarium* species from a forest nursery soil in Western Patagonia and reduction of their population by soil solarization. *J. Plant Dis. Prot.* 106(4): 363-371. <https://www.jstor.org/stable/43216175>.
- Ma LJ, Geiser DM, Proctor RH, Rooney AP, O'Donnell K, Trail F, Gardiner DM, Manners JM, Kazan K. 2013. *Fusarium* pathogenomics. *Annu. Rev. Microbiol.* 67: 399-416. DOI: 10.1146/annurev-micro-092412-155650.
- Mahalingam T, Guruge BMA, Somachandra KP, Rajapakse CS, Attanayake RN. 2016. First report of white mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum* on cabbage in Sri Lanka. *Dis. Notes* 101(1). DOI: 10.1094/PDIS-05-16-0693-PDN.
- Malihipour A, Gilbert J. 2012. Molecular phylogenetic analysis, trichothecene chemotype patterns, and variation in aggressiveness of *Fusarium* isolates causing head blight in wheat. *Plant Dis.* 96: 1016-1025. DOI: 10.1094/PDIS-10-11-0866-RE.
- Malonek S, Bömke C, Bornberg-Bauer E, Rojas MC, Hedden P, Hopkins P, Tudzynski B. 2005. Distribution of gibberellin biosynthetic genes and gibberellin production in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Phytochemistry* 66: 1296-1311. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.04.012.
- Mandeel Q, Ayub N, Gul J. 2005. Survey of *Fusarium* species in an arid environment of Bahrain. VI: Biodiversity of the genus *Fusarium* in root-soil ecosystem of halophytic date palm (*Phoenix dactylifera*) community. *Cryptogam., Mycol.* 26: 365-404.
- Marasas WFO, Rheeder JP, Lamprecht SC, Zeller KA, Leslie JF. 2001. *Fusarium andiyazi* sp. nov., a new species from sorghum. *Mycologia* 93: 1203-1210. DOI: 10.1080/00275514.2001.12063254.
- Marasas WFO, Thiel PG, Rabie CJ, Nelson PE, Toussoun TA. 1986. Moniliformin production in *Fusarium* section *Liseola*. *Mycologia* 78: 242-247. DOI: 10.2307/3793169.
- Mason EW. 1927. On species of the genus *Nigrospora* Zimmermann recorded on monocotyledons. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 12: 152-165.
- Masratul Hawa M, Nurul Faziha I, Nik Mohamad Izham MN, Latiffah Z. 2016. *Fusarium fujikuroi* associated with stem rot of red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in Malaysia. *Ann. Appl. Biol.* 170: 434-446. DOI: 10.1111/aab.12348.
- Matić S, Gilardi G, Lodovica Gullino M, Garibaldi A. 2018. Evidence for an expanded host range of *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. *J. Plant Path.* 100: 97-104. DOI: 10.1007/s42161-018-0021-.
- Miedaner T. 1996 Review: Breeding wheat and rye for resistance to *Fusarium* diseases. *Plant Breeding* 116: 201-220.

- Miles TD, Woodhall JW, Miles LA, Wharton PS. 2013. First report of a binucleate *Rhizoctonia* (AG-A) from potato stems infecting potatoes and sugarbeet in the Pacific Northwest. *Plant Dis.* 97: 1657. DOI: 10.1094/PDIS-03-13-0292-PDN.
- Milus EA, Seyran E, McNew R, 2006. Aggressiveness of *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* isolates in the south-central States. *Plant Dis.* 90(7): 847-52. DOI: 10.1094/PD-90-0847.
- Mordue JEM, Holliday P. 1976. *Sclerotinia sclerotiorum* (sclerotial state). Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. No. 513. CMI. Ferry Lane, Kew, Surrey, UK.
- Moretti A, Mule G, Ritieni A, Logrieco A. 2007. Further data on the production of beauvericin, enniatins and fusaproliferin and toxicity to *Artemia salina* by *Fusarium* species of *Gibberella fujikuroi* species complex. *Int. J. Food Microbiol.* 118: 158-163. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.004.
- Munkvold GP, O'Mara JK. 2002. Laboratory and growth chamber evaluation of fungicidal seed treatments for maize seedling blight caused by *Fusarium* species. *Plant Dis.* 86: 143-150. DOI: 10.1094/PDIS.2002.86.2.143.
- Murray OIL. 1984. Cultural conditions influencing basidium formation in the *Ceratobasidiaceae*. *Aust. J. Bot.* 32: 101-108. DOI: 10.1071/BT9840101.
- Muzhinji, N, Woodhall JW, Truter, Van Der Waals JE. 2018. Variation in fungicide sensitivity among *Rhizoctonia* isolates recovered from potatoes in South Africa. *Plant Dis.* 102: 1520-1526. DOI: 10.1094/PDIS-09-17-1470-RE.
- Narayanasamy P. 2011. Microbial plant pathogens detection and disease diagnosis: fungal pathogens, Vol. 1. Springer. Coimbatore, India. 291 pp. DOI: 10.1007/978-90-481-9735-4.
- Natti JJ. 1971. Epidemiology and control of bean white mold. *Phytopathology* 61: 669-74.
- Nelson, PE, Toussoun TA, Marasas WFO. 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA. 193 pp.
- Nerey Y, Pannecoucq J, Hernandez HP, Diaz M, Espinosa R, De Vos S, Van Beneden S, Herrera L, Höfte M. 2010. *Rhizoctonia* spp. causing root and hypocotyl rot in *Phaseolus vulgaris* in Cuba. *J. Phytopathol.* 158: 236-243. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2009.01609.x.
- Newton HC, Sequeira L. 1972. Ascospores as the primary infective propagule of *Sclerotinia sclerotiorum* in Wisconsin. *Plant Dis. Rep.* 56: 798-802.
- Nirenberg HI, O'Donnell K, Kroschel J, Andria-naivo AP, Frank JM, Mubatanhema W. 1998. Two new species of *Fusarium*: *Fusarium brevicatenulatum* from the noxious weed *Striga asiatica* in Madagascar and *Fusarium pseudo-anthophilum* from *Zea mays* in Zimbabwe. *Mycologia* 90: 459-464.
- Nirenberg HI, O'Donnell K. 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 434-458. DOI: 10.2307/3761403.

- Nirmaladevi D, Venkataramana M, Srivastava RK, Uppalapati SR, Gupta VK, Yli-Mattila T, Tsui KMC, Srinivas C, Niranjana SR, Chandra NS. 2016. Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Sci. Rep. 6(21367): 1-14. DOI: 10.1038/srep21367.
- O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90: 465-493. DOI: 10.2307/3761407.
- O'Donnell K, Nirenberg HI, Aoki, T, Cigelnik E. 2000. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. Mycoscience 41: 61-78. DOI: 10.1007/BF02464387.
- O'Donnell K, Rooney AP, Proctor RH, Brown DW, McCormick SP, Ward TJ, Frandsen RJN, Lysøe E, Rehner SA, Aoki T, Robert VARG, Crous PW, Groenewald JZ, Kang S, Geiser DW. 2013. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. Fungal Genet. Biol. 52: 20-31. DOI: 10.1016/j.fgb.2012.12.004.
- Ogoshi A. 1975. Grouping of *Rhizoctonia solani* Kuhn and their perfect stages. J. Plant Prot. Res. 8: 93-103.
- Ogoshi A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. Annu. Rev. Phytopathol. 25: 125-143. DOI: 10.1146/annurev.py.25.090187.001013.
- Ogoshi A. 1996. Introduction - The genus *Rhizoctonia*. En: Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G. (Eds.). *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Springer. 578 pp.
- Ogoshi A, Oniki M, Sakai R, Ui T. 1979. Anastomosis grouping among isolates of binucleate *Rhizoctonia*. Trans. Mycol. Soc. Jpn. 20:33-39.
- Ogoshi A, Oniki M, Araki T, Ui T. 1983. Studies on the anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* and their perfect states. J. Fac. Agric. 61: 244-260.
- Okello PN, Mathew FM. 2019. Cross pathogenicity studies show South Dakota isolates of *Fusarium acuminatum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. solani*, and *F. subglutinans* from either soybean or corn are pathogenic to both crops. Plant Health Prog. 20: 44-49. DOI: 10.1094/PHP-10-18-0056-RS.
- Opperman L, Wehner FC. 1994. Survey of fungi associated with grass-roots in virgin soils on the springbok flats. S. African J. Bot. 60: 67-72.
- Ortu G, Bertetti D, Lodovica Gullino M, Garibaldi A. 2018. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lavandulae*, a novel *forma specialis* causing wilt on *Lavandula × allardii*. J. Plant Pathol. 100: 391-397. DOI: 10.1007/s42161-018-0084-0.
- Pariaud B, Ravigné V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, Lannou C. 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. Plant Path. 58: 409-424. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x.

Parmeter JR, Whitney HS, Platt WD. 1967. Affinities of some *Rhizoctonia* species that resemble mycelium of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 57: 218-223.

Paul AR. 1982. Winter leaf spot on borage caused by *Nigrospora oryzae*. *Australas. Plant Pathol.* 11: 9-10. DOI: 10.1071/APP9820009.

Pemberton IJ, Smith GR, Philley GL, Rouquette Jr FM, Yuen GY. 1998. First Report of *Pythium ultimum*, *P. irregulare*, *Rhizoctonia solani* AG4, and *Fusarium proliferatum* from arrowleaf clover (*Trifolium vesiculosum*): A disease complex. *Plant Dis.* 82(1): 128. DOI: 10.1094/PDIS.1998.82.1.128B.

Perez BA, Farinon OM, Berretta MF. 2011b. First report of sclerotinia rot on blueberry caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in Argentina. *Plant Dis.* 95: 774. DOI: 10.1094/PDIS-01-11-0074.

Pérez BA, Berretta MF, Carrión E, Wright ER. 2011a. First report of root rot caused by *Fusarium proliferatum* on blueberry in Argentina. *Dis. Notes* 95(11): 1478. DOI: 10.1094/PDIS-04-11-0307.

Proctor RH, Desjardins AE, Moretti A. 2010. Biological and chemical complexity of *Fusarium proliferatum*. En: Strange RN, Gullino ML (Eds.). *The role of plant pathology in food safety and food security. Plant Pathology in the 21st Century 3.* Springer Science+Business pp 97-110.

Purdy LH. 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology* 69(8): 875-880. DOI: 10.1094/Phyto-69-875.

Purdy LH y Bardin R. 1953. Mode of infection of tomato plants by the ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pl. Dis. Rep.* 37: 361- 362.

Recorbet G, Steinberg C, Olivain C, Edel V, Trouvelot S, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi S, Alabouvette C. 2003. Wanted: pathogenesis related marker molecules for *Fusarium oxysporum*. *New Phytol.* 159(1): 73–92. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2003.00795.x.

Rheeder JP, Marasas WFO, Nelson PE. 1996. *Fusarium globosum*, a new species from corn in southern Africa. *Mycologia* 88: 509-513. DOI: 10.1080/00275514.1996.12026677.

Rheeder JP, Marasas WFO, Vismar HF. 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2101-2105. DOI: 10.1128/AEM.68.5.2101-2105.2002.

Rifai M, Hassan A, Hamed M. 2015. Monograph on the genus *Fusarium*. Cairo University, Gyza, Egipto. DOI: 10.13140/RG.2.1.3104.2728.

Saha M, Bhattacharya K. 2015. Aeromycoflora over rice field and their allergenic effect on farmers of N24 Parganas, West Bengal, India. *Eur. Respir. J.* 46: 4101. DOI: 10.1183/13993003.congress-2015.PA4101.

Salvaggio AE, Ridao A del C. 2013. First report of *Fusarium proliferatum* causing rot on garlic and onion in Argentina. *Dis. Notes* 97(4): 556. DOI: 10.1094/PDIS-05-12-0507-PDN

Samuels GJ, Nirenberg HI, Seifert KA. 2001. Perithecial species of *Fusarium*. En: Summerell BA, Leslie JF, Backhouse D, Bryden WL, Burgess LW (Eds.). *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium.* APS, St. Paul, Minnesota: 1-14.

- Scheirer CJ, Ray WS, Hare N. 1976. The analysis of ranked data derived from completely randomized factorial designs. *Biometrics* 32(2): 429-434. DOI:10.2307/2529511.
- Schneider R. 1958. Untersuchungen über variabilität und taxonomie von *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. *Phytopathologische Zeitschrift* 32: 95-126. DOI: 10.1111/j.1439-0434.1958.tb01772.x.
- Schneider JHM, Salazar O, Rubio V, Keijer J. 1997. Identification of *Rhizoctonia solani* associated with field-grown tulips using ITS-rDNA polymorphism and pectic zymograms. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 607-622. DOI: 10.1023/A:1008631807006.
- Sharma P, Meena PD, Chauhan JS. 2013. First report of *Nigrospora oryzae* (Berk y Broome) Petch causing stem blight on *Brassica juncea* in India. *J. Phytopathol.* 161: 439-441. DOI: 10.1111/jph.12081.
- Sharon M, Freeman S, Kuninaga S, Sneh B. 2007. Genetic diversity, anastomosis groups and virulence of *Rhizoctonia* spp. from strawberry. *Eur. J. Plant Pathol.* 117: 247-265. DOI: 10.1007/s10658-006-9091-7.
- Sharon M, Kuninaga S, Hyakumachi M, Naito S, Sneh B. 2008. Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. *Mycoscience* 49: 93-14. DOI: 10.1007/s10267-007-0394-0.
- Shrestha U, Swilling KJ, Butler DM, Ownley BH. 2018. First report of basal drop and white mold on lettuce, broccoli, and mustard caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in Tennessee, U.S.A. *Plant Dis.* 102(1): 249. DOI: 10.1094/PDIS-07-17-1025-PDN.
- Smith SN. 2007 An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil borne pathogenic forms. *Plant Pathol. Bull.* 16: 97-120. DOI: 10.6649/PPB.200709_16(3).0001.
- Sneh B, Burpee L, Ogoshi A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. American Phytopathological Society Press. St. Paul, USA.
- Stenglein SA, Balatti PA. 2006. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 68: 158-167. DOI: 10.1016/j.pmpp.2006.10.001.
- Stocco M, Mónaco C, Cordo C. 2010. A comparison of preservation methods for *Trichoderma harzianum* cultures. *Rev. Iberoam. Micol.* 27(4): 213-215. DOI: 10.1016/j.riam.2010.06.001.
- Summerell BA, Laurence MH, Liew ECY, Leslie JF. 2010. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Divers.* 44: 3-13. DOI: 10.1007/s13225-010-0060-2.
- Summerell BA. 2019. Resolving *Fusarium*: Current status of the genus. *Annu. Rev. Phytopathol.* 57: 15-17. DOI: 10.1146/annurev-phyto-082718-100204.
- Talas F, Wurschum T, Reif JC, Parzies HK, Miedaner T. 2012. Association of single nucleotide polymorphic sites in candidate genes with aggressiveness and deoxynivalenol production in *Fusarium graminearum* causing wheat head blight. *BMC Genetics* 13: 2-10. DOI: 10.1186/1471-2156-13-14.

Tassara CA, Lopez MV, Wright ER. 1998. Ubicación y peso de micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* para producir infección en lechuga (*Lactuca sativa*). Rev. Fac. Agron. 18(1-2): 85-88.

Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. Fungal Genet. Biol. 31: 21-32. DOI: 10.1006/fgbi.2000.1228.

Taylor JW, Berbee ML. 2006. Dating divergences in the fungal tree of life: review and new analyses. Mycologia 98: 838-849. DOI: 10.3852/mycologia.98.6.838.

Thalavaipandian A, Ramesh V, Bagyalakshmi T, Muthuramkumar S, Rajendran A. 2011. Diversity of fungal endophytes in medicinal plants of Courtallam hills, Western Ghats, India. Mycosphere 2: 575-582. DOI: 10.5943/mycosphere/2/5/7.

Tok FM, Derviş S, Arslan M. 2016. Analysis of genetic diversity of *Sclerotinia sclerotiorum* from eggplant by mycelial compatibility, random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat (SSR) analyses. Biotechnol. Equip. 30(5): 921-928. DOI: 10.1080/13102818.2016.1208059.

Torres-Cruz T, Whitaker BK, Proctor RH, Broders K, Laraba I, Kim HS, Brown DW, O'Donnell K, Estrada-Rodríguez TL, Lee YH, Cheong K, Wallace EC, McGee CT, Kang S, Geiser DM. 2021. *FUSARIUM-ID* v.3.0: An updated, downloadable resource for *Fusarium* species identification. Plant Dis. 106(6). DOI: 10.1094/PDIS-09-21-2105-SR.

Tu JC. 1989. Modes of primary infection caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in navy bean. Microbios 57: 85-91.

Uzor PF, Ebrahim W, Osadebe PO. 2015. Metabolites from *Combretum dolichopetalum* and its associated endophytic fungus *Nigrospora oryzae* – evidence for a metabolic partnership. Fitoterapia 105: 147-150. DOI: 10.1016/j.fitote.2015.06.018.

Vakalounakis D. 1996. Rot and stem rot of cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-cucumerinum* f. sp. nov. Plant. Dis. 80: 313-316. DOI: 10.1094/PD-80-0313.

Van der Does HC, Rep M. 2007. Virulence genes and the evolution of host specificity in plant-pathogenic fungi. Mol. Plant-Microbe Interact. 20: 1175-1182. DOI: 10.1094/MPMI-20-10-1175.

Vinod Kumar S, Rajeshkumar P, Senthilraja C, Nakkeeran S, Fernando WGD. 2015. First report of *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot of carnation (*Dianthus caryophyllus*) in India. Plant Dis. 99: 1280-1281. DOI: 10.1094/PDIS-02-15-0240-PDN.

Walker JC. 1930. Inheritance of *Fusarium* resistance in cabbage. J. Agric. Res. 40: 721-745.

Wang M, Liu F, Crous PW, Cai L. 2017. Phylogenetic reassessment of *Nigrospora*: Ubiquitous endophytes, plant and human pathogens. Persoonia 39: 118-142. DOI: 10.3767/persoonia.2017.39.06.

WFCC. 2010. World federation for culture collections guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. Bruselas, Bélgica. 19 pp. Recuperado de: <https://www.wfcc.info/guideline>.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.). PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, California.

Will K, Mishler BD, Wheeler QD. 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Syst. Biol.* 54: 844-851. DOI: 10.1080/10635150500354878.

Windels CE, Burnes PM, Kommedahl T. 1988. Five-year preservation of *Fusarium* species on silica gel and soil. *Phytopathology* 78: 107-109. Recuperado de: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1988Articles/Phyto78n01_107.pdf

Wolcan S. 2004. Ocurrence of crown rot of gazania and gerber caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in Argentina. *J. Plant Pathol.* 86(3): 263.

Wolcan S, Ronco L, Bo ED, Lori G, Alippi H. 1996. First report of diseases on lisianthus in Argentina. *Plant Dis.* 80(2): 223. DOI: 10.1094/PD-80-0223A.

Wright ER, Folgado M, Rivera MC, Crelier A, Vasquez P, Lopez SE. 2008. *Nigrospora sphaerica* causing leaf spot and twig and shoot blight on blueberry: A new host of the pathogen. *Plant Dis.* 92(1): 171. DOI: 10.1094/PDIS-92-1-0171B.

Wu BM y Subbarao KV. 2008. Effects of soil temperature, moisture, and burial depths on carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. *Phytopathology* 98(19): 1144-1152. DOI: 10.1094/PHYTO-98-10-1144.

Wu PC, Tsai JC, Li FC, Lung SC, Su HJ. 2004. Increased levels of ambient fungal spores in Taiwan are associated with dust events from China. *Atmos. Environ.* 38(29): 4879-4886. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2004.05.039.

Wu SH, Chen YW, Shao SC, Wang LD, Yu Y, Li ZY, Yang LY, Li SL, Huang R. 2009. Two new solanapyrone analogues from the endophytic fungus *Nigrospora* sp. YB-141 of *Azadirachta indica*. *Chem. Biodivers.* 6: 79-85. DOI: 10.1002/cbdv.200700421.

Wulff EG, Sørensen JL, Lübeck M, Nielsen KF, Thrane U, Torp J. 2010. *Fusarium* spp. associated with rice Bakanae: ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity. *Environ. Microbiol.* 12(3): 649-657. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02105.x.

Yang G, Li C. 2012. General description of *Rhizoctonia* species complex. Pp. 41-52. En: Cumagun CJR (Ed.) *Plant Pathology*. IntechOpen. DOI: 10.5772/39026.

Yang, G.H., Chen HR, Naito S, Ogoshi A, Deng YL. 2005. First report of AG-A of binucleate *Rhizoctonia* in China, pathogenic to soya bean, pea, snap bean and park choy. *Journal of Phytopathology* 153: 333-336. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2005.00980.x.

Ye Q, Wang R, Ruan M, Yao Z, Cheng Y, Wan H, Li Z, Yang Y, Zhou G. 2020. Genetic diversity and identification of wilt and root rot pathogens of tomato in China. *Plant Dis.* 104(6): 1715-1724. DOI: 10.1094/PDIS-09-19-1873-RE.

Zeller KA, Summerell BA, Bullock S, Leslie JF. 2003. *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp. nov., a new biological species within the *Gibberella fujikuroi* species complex from prairie grass. *Mycologia* 95: 943-954. DOI: 10.2307/3762022.

Zemankova M, Lebeda A. 2001. *Fusarium* Species, their taxonomy, variability and significance in Plant Pathology. Plant Prot. Sci. 37(1): 25-42. DOI: 10.17221/8364-PPS.

Zhou XG, Everts KL, Bruton BD. 2010. Race 3, a new and highly virulent race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* causing *Fusarium* wilt in watermelon. Plant Dis. 94: 92-98. DOI: 10.1094/PDIS-94-1-0092.

Zimmermann A. 1902. Ueber einige an tropischen Kulturpflanzen beobachtete Pilze II. Centralbl. f. Bakt. Abt. II VIII (7): 220.

3. Hongos benéficos

3.1. *Trichoderma* spp.

3.1.1. Introducción

Las especies incluidas en el género *Trichoderma* Pers. (1794) se encuentran entre los hongos aerobios y saprófitos más frecuentemente aislados. Pertenecen al filo Ascomycota, el orden Hypocreales y la familia Hypocreaceae (Jaklitsch *et al.*, 2006). Producen colonias de crecimiento rápido y micelio aéreo hialino, lanoso, floccoso o aracnoide inicialmente sumergido en el medio de cultivo. El reverso se presenta incoloro, beige, amarillo, ámbar, rojo opaco o amarillo verdoso. En el anverso pueden observarse tonalidades verdes, amarillo verdosas o con menor frecuencia blancas, grises o marrones, debidas a la conidiación (Gams y Bissett, 2002; Samuels, 1996). Presenta conidióforos con un eje principal ramificado a intervalos regulares, con ramas sucesivas apical y distalmente más cortas y estrechas, divergentes, solitarias, en pares o en verticilos; esta última disposición puede resultar en una estructura piramidal altamente ramificada (Gams y Bissett, 2002). Bissett (1991a) realizó una descripción de los tipos de conidióforos de *Trichoderma* que, a pesar de que no fue concluyente para la diferenciación de especies, aún tiene utilidad (Jaklitsch, 2009). Las fiálides son ampuliformes a lageniformes, generalmente constreñidas en la base, más o menos hinchadas cerca de la mitad y abruptamente atenuadas cerca del ápice en un cuello subcilíndrico corto (Bissett, 1991a). Los conidios son unicelulares, globosos a elipsoidales, obovoidales o cilíndricos, con el extremo basal más o menos ahusado y truncado. El rango general de variación en las dimensiones de los conidios no es grande, sin embargo, las especies relacionadas a menudo se pueden distinguir por diferencias leves pero consistentes (Gams y Bissett, 2002). Los caracteres como tamaño y forma de conidios, muy utilizados para determinar ciertos géneros fúngicos, poseen un valor limitado en la taxonomía de *Trichoderma* (Samuels, 1996). Las clamidosporas, intercalares o terminales, suelen estar presentes tanto en el micelio sumergido como en las hifas aéreas. Pueden ser globosas a elipsoides, incoloras, amarillento pálido o verdosas, de paredes lisas, a veces gruesas (Bissett, 1991a; Samuels, 1996). Son esenciales para la supervivencia en condiciones adversas (Martínez *et al.*, 2013). Su forma no es diagnóstica de especies, pero su presencia puede serlo (Samuels *et al.*, 1990; Bissett 1991a). La mayoría de las cepas no tiene una fase sexual. Las que presentan teleomorfo normalmente no se han reportado para fines de biocontrol. Se ubica en el género *Hypocrea*, phylum Ascomycota (Monte, 2001).

En 1969, Rifai mencionó que la morfología de los anamorfos no era suficiente para caracterizar especies de *Trichoderma* ya que es variable. Así, adoptó el concepto de especie agregada, que

definió como un conjunto de especies morfológicamente muy similares y a menudo difícilmente separables. Este fue el punto de partida para que más adelante, Bissett (1984, 1991 a, b, c, 1992) y Samuels (1996) profundizaran en la temática. Nuevos conocimientos y tecnologías revolucionaron el campo de la taxonomía fúngica y permitieron avanzar en el estudio de géneros de compleja resolución como *Fusarium*, *Aspergillus* y *Trichoderma*. Si bien los estudios moleculares proporcionan información más fiable y objetiva que los caracteres fenotípicos sobre la variabilidad genética entre aislados, es difícil interpretar el significado filogenético y taxonómico de la similitud observada por lo que es necesario incluir características biológicas tales como fenotipos concordantes, perfiles de crecimiento, ciclos de vida y hábitats. La cantidad de datos moleculares que actualmente son necesarios para arribar a conclusiones filogenéticas significativas es elevada (Lieckfeldt *et al.*, 2002). La identificación molecular precisa de las especies de *Trichoderma* es un desafío considerable que requiere experiencia en micología, habilidad en biología molecular, capacitación en evolución molecular y conocimiento profundo de la literatura taxonómica. Esta dificultad se refleja en la existencia de más de 2.000 registros de *Trichoderma* en la base de datos del NCBI como *Trichoderma* sp. (Cai y Druzhinina, 2021). Las especies del género *Trichoderma* tienen la capacidad de estar presentes en diversos ecosistemas terrestres (suelos agrícolas, pastizales, bosques y desiertos) y acuáticos con comportamiento dominante como parte de la microflora del suelo (Zhang *et al.*, 2005). Esto es atribuible a la habilidad de habitar múltiples sustratos como maderas, cortezas u otros hongos, con un comportamiento avirulento frente a las plantas en la mayoría de los casos. Casi todos los suelos templados y tropicales contienen de 10^1 a 10^3 propágulos por gramo (Harman *et al.*, 2004) y, aunque sus requerimientos nutricionales son bajos, su crecimiento es favorecido por abundante materia orgánica, pH neutro a ácido, alta humedad y temperaturas de 25 a 30 °C (Papavizas, 1985).

Su alto potencial oportunista, su elevada capacidad de crecimiento y su adaptabilidad a diversas condiciones ecológicas lo convierten en un género versátil e interesante para diversas aplicaciones biotecnológicas (Jensen y Wolffhechel, 1995; Zhang *et al.*, 2005; Harman *et al.*, 2004; Cubillos-Hinojosa *et al.*, 2009; Druzhinina *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2013). No hay dudas que *Trichoderma* como género constituye un recurso valioso y estratégico que tiene potencial para resolver un sin fin de dilemas agronómicos y también industriales (Sharma *et al.*, 2019). Tal es así que durante la Segunda Guerra Mundial el ejército estadounidense observó la velocidad a la que se descomponían ciertos materiales en las zonas tropicales del Pacífico Sur, y luego de estudiar sus causas, identificó a *Trichoderma* “*viride*” (aislado QM 6a) como uno de los hongos responsables. A partir de este hito, el estudio de *Trichoderma* y su sistema celulolítico permitió

grandes avances en el conocimiento de la biosíntesis, estructura y mecanismo de degradación de la celulosa y otros polisacáridos (Kubicek y Harman, 2002).

En el año 1936, Weindling y Fawcett evaluaron la capacidad de un aislado de *Trichoderma* para antagonizar a *Rhizoctonia solani*, agente causal de damping off en cítricos. En su estudio pudieron observar que las semillas tratadas con el biocontrolador, en sustratos con distintos valores de pH, tenían respuestas diferenciales al ataque del patógeno, con más del 70 % de plantas sanas en la mayoría de las situaciones. Desde la década de 1930 a la actualidad se han realizado numerosas experiencias en distintas partes del mundo que demuestran el potencial biocontrolador del género *Trichoderma* al igual que sus capacidades como promotor del crecimiento vegetal, solubilizador de nutrientes y materia orgánica e inductor de resistencia sistémica en las plantas.

Diferentes especies de *Trichoderma* son utilizadas para el control de hongos fitopatógenos habitantes del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium* (Papavizas, 1985). Esta actividad es el resultado de mecanismos que no son excluyentes y pueden actuar de manera sinérgica (Hjeljord y Tronsmo, 2005) como la competencia, la antibiosis o el parasitismo (Chet, 1987).

Las enzimas se han vinculado al micoparasitismo necrotrófico, sobre todo en la penetración del controlador en las hifas del patógeno (Chet, 1987). Varios micoparásitos secretan enzimas como β -1,3-glucanasas, quitinasas y celulasas que degradan la pared del hospedante, y su síntesis es inducida por la presencia del patógeno o componentes de su pared celular (Deacon y Berry, 1992). El efecto inhibitor de los antibióticos en combinación con la actividad de las enzimas hidrolíticas se cita como responsable máximo del poder antagonista de *Trichoderma* (Monte, 2001; Vizcaíno *et al.*, 2006). Se han identificado y caracterizado genes responsables de micoparasitismo, competencia y antibiosis (Jiménez Díaz *et al.*, 2010). Castrillo *et al.* (2019) determinaron que el genoma de una cepa de *Trichoderma* biocontroladora de fitopatógenos era portadora de 17 genes que codifican para la síntesis de quitinasas, 10 que codifican para β -1,3-glucanasas y 4 que codifican para proteasas. Diferentes cepas producen más de 100 metabolitos que tienen actividades antibióticas conocidas, tales como viridina (producida por aislados de *T. viride* y *T. koningii*), dermadina (producida por aislados de *T. hamatum*, *T. koningii* y *T. viride*), 3,4 dihidroxicarotano (producida por aislados de *T. virens*) (Coats *et al.*, 1971; Tamura *et al.*, 1975; Brewer *et al.*, 1982; Fujiwara *et al.*, 1982; Watanabe *et al.*, 1990; Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991; Lee *et al.*, 1995; Sivasithamparam y Ghisalberti, 2002). Algunos antibióticos pueden ser los factores principales de la actividad de biocontrol de una cepa (Harman 2000).

Estudios realizados por Carrero-Carrón *et al.* (2018) con microscopía confocal han demostrado que ciertas cepas de *Trichoderma* colonizan la epidermis y el córtex de la raíz de las plantas, sin ingresar al sistema vascular. El éxito en la colonización de las raíces es indispensable para que se produzcan los efectos beneficiosos de *Trichoderma* spp. en las plantas, no solo con respecto a las actividades antagónicas y la promoción del crecimiento, sino también para inducir resistencia sistémica (Harman *et al.*, 2004; Moran-Diez *et al.*, 2009; Shoresh *et al.*, 2010; Druzhinina *et al.*, 2011; Hermosa *et al.*, 2012; Rubio *et al.*, 2014). La asociación planta-*Trichoderma* implica el reconocimiento molecular entre las dos partes a través de una red de señalización mediada por las hormonas vegetales ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET). JA y ET son moléculas de transducción de señales para la resistencia sistémica inducida (ISR) y SA lo es para la resistencia sistémica adquirida (SAR). La sacarosa de origen vegetal es un recurso importante proporcionado a las células de *Trichoderma* para la colonización de las raíces, la coordinación de los mecanismos de defensa y el aumento de la tasa de fotosíntesis (Vargas *et al.*, 2009). La colonización implica la capacidad de reconocer y adherirse a las raíces, penetrar en la planta y resistir a la acción de los metabolitos tóxicos producidos por la planta en respuesta a la invasión.

Las características antes mencionadas, sumadas a la capacidad que tienen ciertas especies de *Trichoderma* de infectar producciones de champiñón [*Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach] (Komon-Zelazowska, *et al.*, 2007) y el potencial oportunista para generar infecciones en pacientes inmunosuprimidos, explican el crecimiento de las publicaciones científicas realizadas en torno a este género fúngico (Cai y Druzhinina, 2021). Actualmente el número de registros de la palabra *Trichoderma* en PubMed Central es de alrededor de 8.100, cercano a los de *Alternaria* (≈6.800) y muy inferior a los de *Penicillium* (≈16.000), *Fusarium* (≈23.000) y *Aspergillus* (≈57.000). En lo que respecta a antecedentes a nivel nacional y en América Latina sobre el control biológico de enfermedades, Bettiol *et al.* (2014) realizaron una compilación de experiencias con *Trichoderma* spp., otros microorganismos, enmiendas, extractos o preparados naturales, solarización y biofumigación.

El mercado global de bioplaguicidas se encuentra en pleno crecimiento con tasas anuales del 15,6 % y un aporte económico para el año 2022 estimado en 5.500 millones de dólares (Markets and Markets, 2022). Según Dunham y Dunham (2015), el mercado norteamericano posee un 38 % de la cuota total, el europeo un 25 %, el de la región Asia-Pacífico un 20% y el latinoamericano un 17 %. El mercado nacional de insumos biológicos tiene sus inicios en el año 1939 con la generación de inoculantes bacterianos para semillas. Este rubro es el que representa más del 90 % del mercado que se estima en alrededor de 80 millones de dólares. El 10 % restante se reparte en el rubro de biocontroladores. A pesar de que aún es incipiente la difusión de los beneficios

del uso de bioinsumos y que el mercado es pequeño, las expectativas de crecimiento se mantienen en línea con las tendencias a nivel internacional (Starobinsky *et al.*, 2021). En el listado de productos inscriptos en el Registro Nacional de Terapéutica Vegetal del SENASA (2022) hay 48 bioinsumos destinados al manejo de adversidades, de los cuales 17 se reportan como biofungicidas (8 *T. harzianum*, 7 *Bacillus subtilis* y dos productos en base a extracto de semillas de cítricos) y los restantes como bioinsecticidas (18 *Bacillus thuringiensis*, cuatro virus de la granulosis, tres *Beauveria bassiana* y tres productos en base a extracto de ajo).

Re *et al.* (2017) obtuvieron una colección de 12 aislados de *Trichoderma* a partir de raíces sanas de plantas de calibrachoa y los diferenciaron por su actividad biocontroladora *in vitro* frente a un aislado de *Fusarium oxysporum* patógeno de dicha especie. El objetivo del presente capítulo fue obtener una colección más amplia, realizar una selección basada en el biocontrol de uno de los patógenos de calibrachoa caracterizados como importantes en el Capítulo 2 (*F. proliferatum*) y en la promoción del crecimiento vegetal.

3.1.2. Materiales y métodos

a. Recolección y aislamiento

Se colectaron muestras de la rizosfera de calibrachos provenientes de Buenos Aires, Entre Ríos, Corrientes, Misiones y Tucumán, cultivadas en Hurlingham en macetas. Las muestras se conservaron refrigeradas en heladera a 4 °C hasta su procesamiento. Se suspendieron 10 g de suelo rizosférico en 100 cc de agua destilada estéril y se agitaron por treinta minutos en un agitador magnético DLAB MS-M-S10®. Se realizaron diluciones seriadas (1:100 a 1:1000000), se sembraron 0,1 mL de las suspensiones en placas de Petri de 9 cm de diámetro con 10 mL de medio selectivo para *Trichoderma* (TSM) (Elad *et al.*, 1981) y se incubó en estufa a 24 ± 2 °C durante 7 días. De las colonias que visualmente se asemejaban a las del género *Trichoderma* se hicieron repiques a placas de Petri de 9 cm de diámetro con 10 mL de APG y se realizaron observaciones preliminares por microscopía según Samuels (1996). Por otro lado, se contó con la colección de 12 aislados de *Trichoderma* obtenida por Re *et al.* (2017).

b. Conservación

Se obtuvieron cultivos monospóricos de modo de obtener aislados sin modificaciones genéticas. Para ello se utilizaron las técnicas aplicadas en el Capítulo 2, apartado 2.1.2.b. La conservación se realizó según lo indicado en el mismo apartado, con excepción del uso de vaselina líquida,

que se reemplazó por la técnica del papel secante en tubos de ensayo de 15 cm en freezer a -18 °C según Stocco *et al.* (2010).

c. *Antagonismo in vitro*

Mediante la técnica de cultivos duales (Wright *et al.*, 1988; Grijalba *et al.*, 1992; Pakdaman *et al.*, 2013) se preseleccionaron los aislados de *Trichoderma* por su actividad frente a los aislados de *F. proliferatum* INTA IF-535 e INTA-IF 536, en ensayos independientes. Para esto, en placas de Petri de 9 cm de diámetro con 10 mL de APG, se ubicaron dos discos de 10 mm de diámetro con crecimiento micelial de 7 días, a una distancia de 6 cm entre sí, uno con desarrollo de *Fusarium* y otro con *Trichoderma* (Figura 3.1.2.1). Los testigos fueron discos de *Fusarium* frente a discos de APG estéril. Se incubó en estufa a 24 ± 2 °C. Las placas se distribuyeron en un diseño completamente aleatorizado. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento y el ensayo se repitió dos veces en el tiempo.

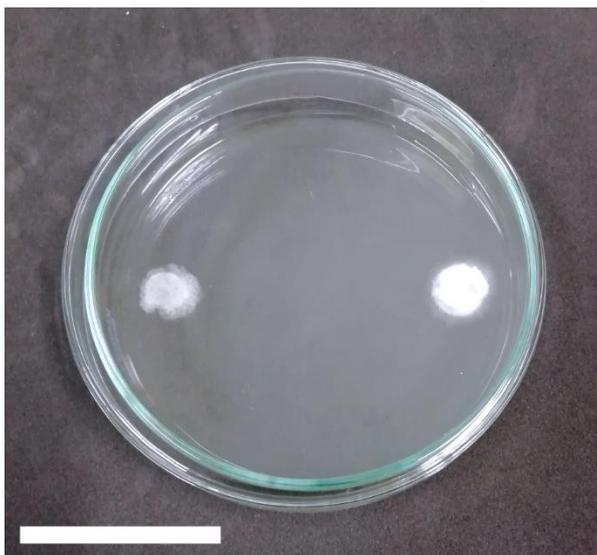


Figura 3.1.2.1. Cultivo dual en placa de Petri con dos discos con crecimiento micelial de 7 días. A la izquierda *Trichoderma* y a la derecha *Fusarium proliferatum* (Barra= 4 cm).

En todas las confrontaciones se registró el radio de ambas colonias con regla milimetrada, a diario. A los 5 días de la siembra finalizaron los ensayos y se calcularon los porcentajes de inhibición (Joshi *et al.*, 2010; Mishra, 2010; Osorio *et al.*, 2012) del crecimiento del patógeno (I), mediante la fórmula:

$$I = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Donde:

I= Porcentaje de inhibición en el crecimiento del patógeno

C= Crecimiento de *F. proliferatum* en placas testigo

T= Crecimiento de *F. proliferatum* en cultivo dual con *Trichoderma*

Los resultados se presentan para cada uno de los aislados de *F. proliferatum* de manera independiente de modo de observar la interacción de cada aislado de *Trichoderma* con cada patógeno.

d. Colonización de sustrato

Una vez preseleccionados los aislados de *Trichoderma* con elevada capacidad de biocontrol *in vitro*, se procedió a estudiar su habilidad para colonizar el sustrato comercial Z-Floricultura de Terrafertil®. El objetivo del ensayo fue conocer la dosis mínima que asegure una elevada cantidad de propágulos de *Trichoderma* en el sustrato para futuros ensayos *in vivo*.

Se colocaron 17 litros de sustrato Z-Floricultura de Terrafertil® en bandejas metálicas de 25 cm de diámetro según Wolf y Skipper (1994) y Trevors (1996). El sustrato se humedeció con agua destilada estéril para activar la germinación de propágulos de microorganismos. Luego de 48 h se autoclavó a 121 °C por 1 h. Se volvió a humedecer con agua destilada estéril para recuperar el contenido hídrico y se dejó reposar nuevamente por 48 h para repetir el autoclavado en igualdad de condiciones que las mencionadas. También se utilizó sustrato sin esterilizar.

Se autoclavaron por 20 minutos a 121 °C, 18 bolsas de polietileno de alta densidad con 250 g de arroz yamaní previamente hidratado con agua corriente. De ellas, 15 bolsas fueron inoculadas con 20 mL de suspensión de esporas (1.10^7 conidios/mL) de cada aislado de *Trichoderma* (Figura 3.1.2.2 A) previamente seleccionado (INTA IF-549, 612, 613, 614 y 630) lo que permitió obtener 3 bolsas de arroz inoculado con cada aislado. A las 3 bolsas restantes se les agregaron 20 mL de agua destilada estéril. Las bolsas fueron incubadas a 24 ± 2 °C sobre una mesada del laboratorio con luz natural por 7 días de modo que los aislados de *Trichoderma* colonizaran los granos (Figura 3.1.2.2 B y C).

Se procedió a realizar la mezcla de sustrato (esterilizado o no) con tres dosis del arroz colonizado con *Trichoderma*: 1, 5 o 10 % v/v (Figura 3.1.2.2 D a L). Las mezclas fueron transferidas a macetas termoformadas N° 9. Los testigos fueron mezclas de sustrato (estéril o no) con arroz estéril. Todas las macetas se cubrieron con bolsas de polietileno por 72 h para favorecer la colonización. De este modo, quedaron constituidos 36 tratamientos con distintas combinaciones de sustrato,

cepa y dosis. Se realizaron 3 réplicas por tratamiento y las macetas colocadas sobre una mesada del laboratorio en un diseño completamente aleatorizado fueron incubadas por 7 días a 24 ± 2 °C.

Transcurrida la incubación se colocó y homogeneizó el contenido de cada maceta en bolsas de polietileno, se suspendió 1 g en 100 mL de agua destilada estéril, se agitó durante 30 minutos en un agitador magnético y se sembraron diluciones seriadas (10^{-3} a 10^{-6}) en placas de Petri con TSM para estimar el número de unidades formadoras de colonias (UFC).



Figura 3.1.2.2. Inoculación de sustrato con aislados de *Trichoderma*. A) Arroz estéril; B) Suspensiones de esporas de *Trichoderma*; C) Arroz colonizado con *Trichoderma*; D,E,F) Secuencia de preparación del tratamiento 1 % v/v; G,H,I) Secuencia de preparación del tratamiento 5 % v/v; J,K,L) Secuencia de preparación del tratamiento 10 % v/v. (Barras = 5 cm excepto D); G); J) 2,5 cm).

e. Antagonismo *in vivo*

A los efectos de profundizar en la caracterización de los cinco aislados de *Trichoderma* que presentaron capacidad de biocontrol en los ensayos *in vitro*, se procedió a evaluar su efecto *in vivo* frente a dos aislados de *Fusarium proliferatum* patógenos de calabrocha mediante un

diseño completamente aleatorizado con seis repeticiones por tratamiento y duplicación de ensayos.

Para ello, se prepararon plantines de calibrachoa var. Pampa Salmón-INTA según la metodología utilizada en el apartado 2.1.2.c. Los esquejes enraizados fueron transferidos a sustrato comercial Z-Floricultura de Terrafertil® inoculado 7 días antes con arroz partido que contenía una concentración de 1×10^7 conidios/g de *Trichoderma* (INTA IF-549, INTA IF-612, INTA IF-613 INTA IF-614, INTA IF-630) según la metodología presentada en el apartado 3.1.2.d. Se realizó un riego de asiento y se aplicaron 10 mL de una suspensión de esporas de cada aislado de *F. proliferatum* que contenía 10^6 conidios/mL de agua. Las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo a 24 °C con provisión de luz y agua.

Se observaron las plantas a diario para detectar el inicio de los síntomas y se aplicó la escala de severidad utilizada para evaluar la agresividad de los dos aislados, apartado 2.1.2.d. Una vez finalizado el ensayo se descalzaron las plantas, se lavaron las raíces con agua corriente, se evaluaron mediante la escala y se pesó tanto la parte aérea como la radical en estado fresco y seco.

f. Promoción de crecimiento

A través de un diseño completamente aleatorizado se evaluó el efecto promotor de crecimiento de los cinco aislados de *Trichoderma* preseleccionados *in vitro* e *in vivo* por su capacidad biocontroladora de dos aislados de *Fusarium* patógenos de calibrachoa en seis variedades de *Calibrachoa hybrida*. Se plantaron esquejes de calibrachoa (variedades Pampa Salmón-INTA, Overá Fucsia-INTA, INTA 06575, Blanca, Amarilla, Violeta) en macetas n° 10 con sustrato Z-Floricultura de Terrafertil® preinoculado con arroz partido con una concentración de 1×10^7 conidios/g de *Trichoderma* (INTA IF-549, 612, 613, 614 y 630) según la metodología expuesta en el apartado 3.1.2.d con 20 repeticiones por tratamiento. Las plantas se mantuvieron sobre mesadas de un invernadero tipo parabólico con provisión de agua a necesidad. En dos oportunidades se evaluaron parámetros vegetales (peso fresco y seco aéreo y radical, cantidad de flores) y fisicoquímicos del sustrato (pH, CE, NO_3^- , P, Ca, Mg, K, Fe). En forma adicional, se verificó la incidencia de enfermedades.

g. Identificación taxonómica

Se trabajó con los aislados de *Trichoderma* INTA IF-549, 612, 613, 614 y 630, de buen comportamiento como biocontroladores de los aislados de *Fusarium* bajo evaluación. Para la identificación se aplicaron tanto técnicas de microscopía clásica como moleculares.

En lo que respecta a la microscopía clásica, según Rifai (1969) y Bissett (1984), los aislados fueron cultivados en agar extracto de malta al 2 % (AM) y en APG a 24 ± 2 °C. Se describieron las características macroscópicas de las colonias en ambos medios de cultivo, que incluyeron el color y el tipo de micelio tanto del frente como del dorso y el color de la esporulación. Entre los 3 y 5 días desde la siembra en AM, con un microscopio óptico Olympus® BX50 equipado con una cámara Olympus® DP72, se observaron preparados para describir el tipo de ramificación de los conidióforos, las fiálides, los conidios y las hifas. Se realizaron mediciones de las distintas estructuras con un n= 50. Las imágenes se procesaron con el software CellSens Standard versión 2016 de Olympus®.

Se realizaron repiques en APG y se colocaron en oscuridad durante 5 días a 24 ± 2 °C a los efectos de lograr el crecimiento del micelio y disminuir la producción de conidios. La identificación molecular se realizó en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE). La extracción de ADN se realizó mediante el DNeasy Plant Pro Kit de la empresa Qiagen® siguiendo el protocolo propuesto por los fabricantes. La concentración se cuantificó mediante el uso de un NanoDrop Thermo Fisher Scientific. La amplificación de fragmentos de ADN se realizó mediante la técnica de PCR en un termociclador Eppendorf® en dos loci, la región del espaciador transcrito interno 1 (ITS1) y el factor de elongación de la traducción 1 alfa (TEF 1 α). Para la amplificación del gen ITS1 se utilizaron los cebadores ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS 5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.*, 1990) y para el TEF 1 α se usaron 983F (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3') y 2218R (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3') (Chaverry *et al.*, 2003). Las condiciones de la PCR, variables para los diversos genes y aislados, se detallan en las Tablas 3.1.2.4. y 3.1.2.5 para los genes ITS y TEF 1 α respectivamente. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en volúmenes de 50 μ L, con 25 μ L de MasterMix, 17 μ L de agua libre de nucleasas, 2 μ L de cada cebador (forward y reverse) y 4 μ L de ADN extraído (diluido 1:10). El tamaño de los productos de amplificación se estimó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % revelado mediante un transiluminador UV.

Tabla 3.1.2.4. Condiciones de las reacciones PCR para el gen ITS.

Etapa	INTA IF-549		INTA IF-612		INTA IF-613		INTA IF-614		INTA IF-630	
	Temp. (°C)	Tiempo (s)								
Desnaturalización inicial	95	300	95	300	95	300	95	300	95	300
Desnaturalización	94	90	94	90	94	90	94	90	94	60
Hibridación	60	60	56	60	60	60	60	60	58	60
Polimerización	72	50	72	90	72	50	72	50	72	50
Polimerización final	72	300	72	300	72	300	72	300	72	300

Cantidad de ciclos para el paso 2= 40.

Tabla 3.1.2.5 Condiciones de las reacciones PCR para el gen TEF 1 α .

Etapa	INTA IF-549		INTA IF-612		INTA IF-613*		INTA IF-614		INTA IF-630	
	Temp. (°C)	Tiempo (s)	Temp. (°C)	Tiempo (s)	Temp. (°C)	Tiempo (s)	Temp. (°C)	Tiempo (s)	Temp. (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	94	120	94	120	94	120	94	120	94	120
Desnaturalización	94	30	94	30	94	30	94	30	94	30
Hibridación	53	40	53	40	51	40	53	40	53	40
Polimerización	72	30	72	30	72	30	72	30	72	30
Polimerización final	72	600	72	600	72	600	72	600	72	600

Cantidad de ciclos para el paso 2= 38. *Excepción, cantidad de ciclos para el paso 2= 40.

Los productos de PCR amplificados se enviaron a Macrogen (Corea) para purificar y secuenciar en ambas direcciones. Una vez recibidas, las secuencias de cada gen se analizaron y acondicionaron mediante el software Chromas (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>) para detectar zonas difusas o de baja calidad. Luego con el software Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) se alinearon las secuencias forward y reverse y con el software GeneDoc (<https://genedoc.software.informer.com/2.7/>) se obtuvo la secuencia consenso. Se realizó la comparación BLAST de nucleótidos con secuencias publicadas en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para cada gen.

Para los análisis filogenéticos se generó una base de datos a partir de los resultados obtenidos en el BLAST, de modo de trabajar con las especies que más cercanas se encontraban a los aislados de *Trichoderma* bajo estudio. Se realizó una búsqueda de secuencias para cada gen que cumpliera con los siguientes requisitos: cepas depositadas en un cepario reconocido internacionalmente, secuencias subidas al NCBI, cebadores utilizados idénticos a los de este estudio y un trabajo publicado. En las Tablas 3.1.2.6 y 3.1.2.7 se presenta la base de datos para cada gen.

Tabla 3.1.2.6. Base de datos de genes ITS para las especies de *Trichoderma* utilizadas en análisis filogenético.

Especie	Depósito	Código NCBI	Referencia
<i>T. afroharzianum</i>	GJS 04-186	FJ442265	Chaverry <i>et al.</i> (2015)
<i>T. arundinaceum</i>	CBS 119575	EU330928.1	Degenkolb <i>et al.</i> (2008)
<i>T. asperellum</i>	CBS 433.97	ay376058	Holmes <i>et al.</i> (2004)
<i>T. atroviride</i>	DAOM 165779	Z48817	Dodd <i>et al.</i> (2003)
<i>T. bissettii</i>	UTHSC 08-2443	KJ174235.1	Sandoval-Denis <i>et al.</i> (2014)
<i>T. dorotheopsis</i>	HZA8	MH624143	Tomah <i>et al.</i> (2020)
<i>T. gamsii</i>	GJS 04-09	DQ315459	Samuels <i>et al.</i> (2006)
<i>T. harzianum</i>	CBS 226.95	AY605713	Nagy <i>et al.</i> (2007)
<i>T. koningiopsis</i>	CBS 119075	NR131281	Samuels <i>et al.</i> (2006)
<i>T. longibrachiatum</i>	CBS 816.68	NR120298	Kuhls <i>et al.</i> (1996)
<i>T. ochroleucum</i>	CBS 119502	NR134401	Bissett <i>et al.</i> (2015)
<i>T. pollinicola</i>	LC11682	MF939592	Zhao <i>et al.</i> (2018)
<i>T. reesei</i>	ATCC 26921	KU729028	Rifai (1969)
<i>T. virens</i>	CBS 249.59	AF222865	Kullnig-Gradinger <i>et al.</i> (2002)
<i>T. viride</i>	CBS 119327	DQ677657	Jaklitsch <i>et al.</i> (2006)
<i>Hypomyces aurantius</i>	GJS 74-69	FJ442642.1	Samuels e Ismaiel (2011)

Tabla 3.1.2.7. Base de datos de genes TEF 1 α para las especies de *Trichoderma* utilizadas en análisis filogenético.

Especie	Depósito	N° NCBI	Referencia
<i>T. afroharzianum</i>	TRS835	KP008787.1	Zhao <i>et al.</i> (2021)
<i>T. arundinaceum</i>	MSX70741	KY630170.1	Rivera-Chávez <i>et al.</i> (2017)
<i>T. asperellum</i>	TRS705	KP009011.1	Skoneczny <i>et al.</i> (2015)
<i>T. atroviride</i>	CBS 693-94	KJ786838.1	Skoneczny <i>et al.</i> (2015)
<i>T. bissettii</i>	SZMC 1158	MH249948.1	Hatvani <i>et al.</i> (2019)
<i>T. dorotheopsis</i>	HZA5	MK850827.1	Tomah <i>et al.</i> (2020)
<i>T. gamsii</i>	TW20050	KU523895.1	Frascella <i>et al.</i> (2022)
<i>T. harzianum</i>	T18	KX632606.1	Tomah <i>et al.</i> (2020)
<i>T. koningiopsis</i>	18ASMA001	MT671922.1	Frascella <i>et al.</i> (2022)
<i>T. longibrachiatum</i>	S328	JQ685867.1	Ngo <i>et al.</i> (2021)
<i>T. ochroleucum</i>	GJS 01-265	DQ835494.1	Overton <i>et al.</i> (2006)
<i>T. pollinicola</i>	LC11686	MF939620.1	Zhao <i>et al.</i> (2018)
<i>T. reesei</i>	QM6a	XM_006963994.1	Bissett <i>et al.</i> (2015)
<i>T. virens</i>	Tvien3	MT081441.1	Zhou <i>et al.</i> (2021)
<i>T. viride</i>	GJS 89-127	AF534585.1	Chaverry y Samuels (2003)
<i>Hypomyces aurantius</i>	TFC 95-171	FN868743.1	Pöldmaa (2011)

Tanto las secuencias de la base de datos para cada gen, como las correspondientes a los aislados de *Trichoderma* bajo estudio, se acondicionaron mediante el uso del software GeneDoc, se alinearon con el software Clustal Omega y se concatenaron manualmente. La generación del árbol filogenético se realizó con el software MrBayes Versión 3.2.7 (<https://nbisweden.github.io/MrBayes>). Se le solicitó al programa que evalúe 1.000.000 de generaciones muestreadas cada 200 y se extendió el análisis hasta obtener una $p \leq 0,01$.

Finalizado este proceso, se trabajó con los archivos resultantes mediante el software Tracer Versión 1.7.2 (<https://beast.community/tracer>) y se evaluó el parámetro ESS (Effective sample site) para verificar que en todos los casos sus valores estén por encima de 200. Los árboles filogenéticos se generaron con el software FigTree Versión 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) y se evaluaron los valores de bootstraps para los grupos formados.

h. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico InfoStat (InfoStat, 2007) y se concluyó a un nivel de significación del 0,05. Para las variables en las que se cumplieron los supuestos de homogeneidad de las varianzas (prueba de Levene) y de normalidad de los errores (prueba de Shapiro-Wilks) se avanzó con un análisis de varianza con la técnica DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002) para buscar diferencias entre medias de tratamientos. En los casos donde al menos un supuesto no se cumplió, se procedió a realizar un ANOVA siguiendo la metodología descripta por Scheirer *et al.* (1976), con el estadístico H (cociente entre la suma de cuadrado de un efecto dividido el cuadrado medio total), que bajo la correspondiente hipótesis nula se distribuye como una variable chi-cuadrado con los grados de libertad de dicho efecto.

3.1.3. Resultados y discusión

a. Recolección y aislamiento

A partir del procesamiento de las muestras de suelo rizosférico se obtuvieron 16 aislados de plantas provenientes de ambientes diversos, posteriormente cultivadas en Hurlingham. A los aislados antes mencionados se le suman diez que fueron obtenidos de sustratos de calibrachos sanas de lotes en donde una buena porción de la población presentaba marchitez, en Hurlingham (Buenos Aires). Por último, otros 12 aislados fueron recuperados de la colección obtenida por Re *et al.* (2017) en Hurlingham. En la tabla 3.1.3.1 se resume la información de los 38 aislados de *Trichoderma*.

Tabla 3.1.3.1. Aislados de *Trichoderma* obtenidos de diversas fuentes.

Código INTA-IF	Hospedante o Sustrato	Localidad (provincia)
503	Calibrachoa rizosfera	Hurlingham (Buenos Aires)
504	Calibrachoa rizosfera	Hurlingham (Buenos Aires)
505	Calibrachoa rizosfera	Hurlingham (Buenos Aires)
506	Calibrachoa rizosfera	Hurlingham (Buenos Aires)
507	Calibrachoa rizosfera	Hurlingham (Buenos Aires)
508	Calibrachoa rizosfera	Hurlingham (Buenos Aires)
509	Calibrachoa rizosfera	Hurlingham (Buenos Aires)
510	Calibrachoa rizosfera	Hurlingham (Buenos Aires)
511	Calibrachoa rizosfera	Hurlingham (Buenos Aires)
512	Calibrachoa rizosfera	Hurlingham (Buenos Aires)
513	Calibrachoa rizosfera	Hurlingham (Buenos Aires)
514	Calibrachoa rizosfera	Hurlingham (Buenos Aires)
549	Sustrato con quitosano	Hurlingham (Buenos Aires)
550	Sustrato con quitosano	Hurlingham (Buenos Aires)
551	Calibrachoa rizosfera	Hurlingham (Buenos Aires)
552	Calibrachoa rizosfera	Hurlingham (Buenos Aires)
553	Calibrachoa rizosfera	Hurlingham (Buenos Aires)
572	Calibrachoa rizosfera	Hurlingham (Buenos Aires)
573	Calibrachoa rizosfera	Hurlingham (Buenos Aires)
574	Calibrachoa rizosfera	Hurlingham (Buenos Aires)
575	Calibrachoa rizosfera	Hurlingham (Buenos Aires)
580	Calibrachoa rizosfera	Hurlingham (Buenos Aires)
612	Suelo rizosférico	San Martín (Corrientes)
613	Suelo rizosférico	San Martín (Corrientes)
614	Suelo rizosférico	Goya (Corrientes)
615	Suelo rizosférico	Federación (Entre Ríos)
621	Suelo rizosférico	Trancas (Tucumán)
622	Suelo rizosférico	Trancas (Tucumán)
623	Suelo rizosférico	Trancas (Tucumán)
624	Suelo rizosférico	Trancas (Tucumán)
625	Suelo rizosférico	Trancas (Tucumán)
626	Suelo rizosférico	Trancas (Tucumán)
627	Suelo rizosférico	Candelaria (Misiones)
628	Suelo rizosférico	Candelaria (Misiones)
629	Suelo rizosférico	Candelaria (Misiones)
630	Suelo rizosférico	Concordia (Entre Ríos)
631	Suelo rizosférico	Santo Tomé (Corrientes)
632	Suelo rizosférico	Candelaria (Misiones)

Todos los aislados en APG desarrollaron un micelio blanco que con el tiempo adquirió diversas tonalidades verdes (Figura 3.1.3.1).

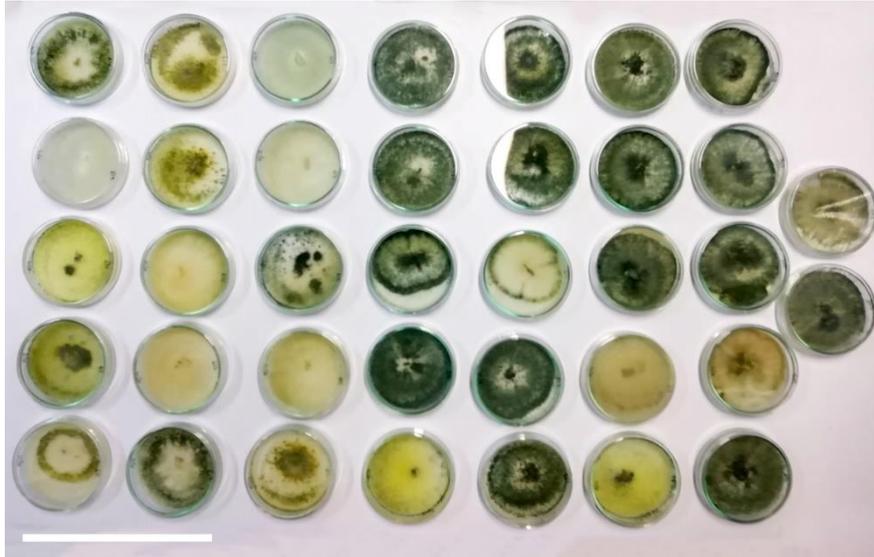


Figura 3.1.3.1. Colección de aislados de *Trichoderma* obtenidos de distintas muestras (Barra= 20 cm).

Bajo microscopio óptico se observó micelio septado, hialino, delgado (Figura 2.1.3.2.A) y conidióforos ramificados o no, con disposición piramidal (Figura 2.1.3.2.B). Las fiálides, alargadas con cuello afinado y más anchas en el centro (Figura 2.1.3.2.C), en su extremo apical dieron lugar a conidios ovados o globosos (Figura 2.1.3.2.D).

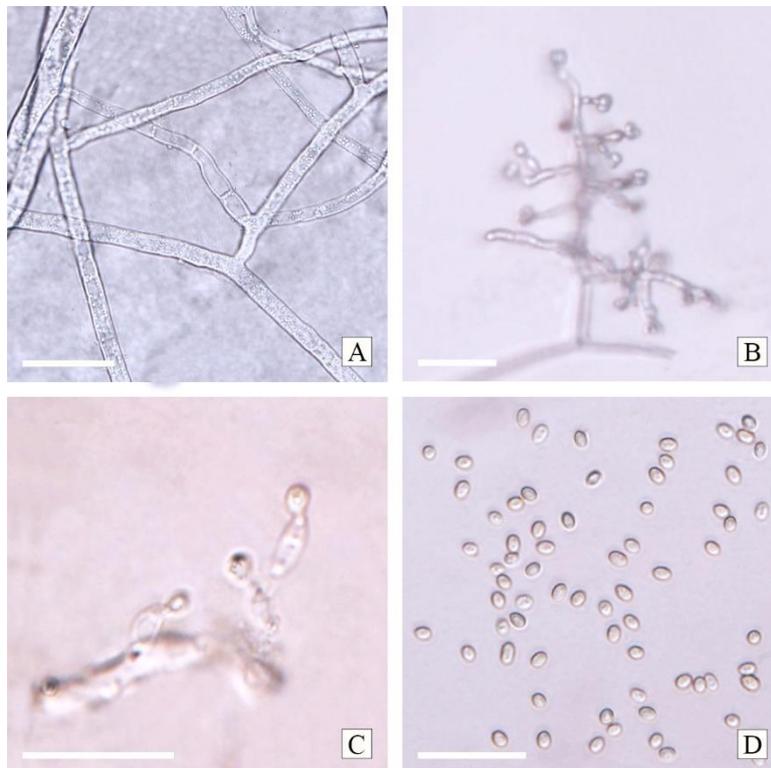


Figura 2.1.3.2. Estructuras de *Trichoderma* bajo microscopio óptico. A) Hifas (Barra= 20 μ m); B) Conidióforo (Barra= 20 μ m); C) Fiálide (Barra= 10 μ m); D) Conidios (Barra= 10 μ m).

b. Conservación

De los cuatro métodos (agar, agua destilada, sustrato y papel) los más efectivos fueron el agua destilada y el papel, que permitieron recuperar las colonias en el 100 % de los casos. Es importante mencionar que los aislados INTA IF-504, 507, 509, 574, 575, 621 y 628 no pudieron recuperarse a tiempo, por lo que no se incluyeron en los ensayos de antagonismo *in vitro*.

Por ello se plantea como esencial trabajar con diversos métodos de conservación dentro de la colección para evitar pérdidas de ejemplares.

c. Antagonismo in vitro

A partir del desarrollo de este ensayo se pudo caracterizar el comportamiento *in vitro* de los 31 aislados de *Trichoderma* sp. frente a los aislados de *F. proliferatum* patógenos de calibrachoa más agresivos. Los resultados se presentan en función de cada aislado de *F. proliferatum* al quinto día de cultivo dual enfrentado a cada uno de los 31 aislados de *Trichoderma* sp.

Fusarium proliferatum INTA IF-535

En la Figura 3.1.3.3 se exponen los resultados correspondientes al primer y segundo ensayo. Fue posible observar una elevada variabilidad de comportamiento entre los aislados de *Trichoderma* sp. y entre ensayos. En el ensayo 1, cinco aislados (*Trichoderma* sp. INTA 573, 553, 612, 549 y 630) fueron capaces de inhibir al patógeno entre un 61,1 (INTA IF-573) y un 69,9 % (INTA IF-630). En el ensayo 2, INTA IF-630, 549 y 613 fueron los de mejor comportamiento, al inhibir al patógeno un 48,1, 49,4 y 52 % respectivamente. En la Figura 3.1.3.5 se observan los cultivos duales en el último día de medición. En la Tabla 3.1.3.2 se presenta la comparación estadística de los ensayos. Solo dos aislados (INTA IF-613 y 622) fueron constantes en su capacidad de inhibición del patógeno en ambos ensayos. En el resto de los casos los resultados del ensayo 1 superaron a los del ensayo 2.

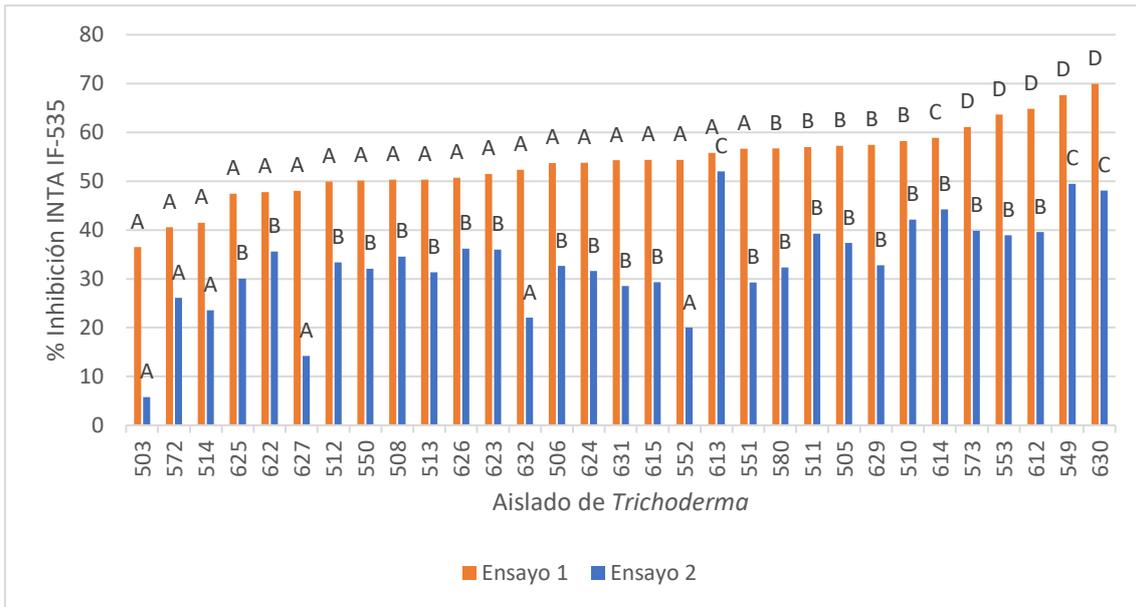


Figura 3.1.3.3. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Fusarium proliferatum* INTA IF-535 al quinto día en cultivo dual con 31 aislados de *Trichoderma* sp.

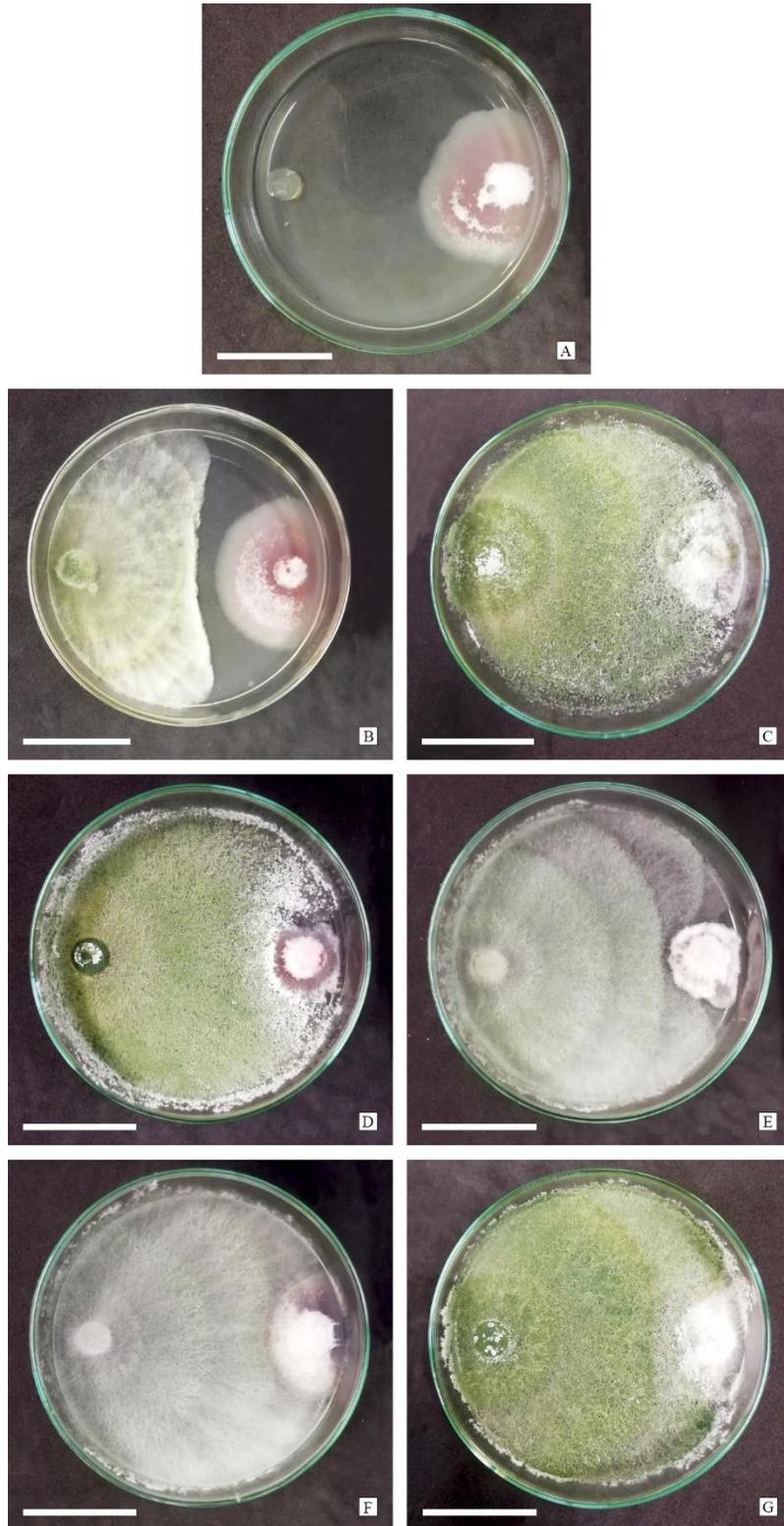


Figura 3.1.3.5. Cultivo dual de *Fusarium proliferatum* INTA IF-535. A) Testigo; B) Con *Trichoderma* INTA IF-503; C) Con *Trichoderma* INTA IF-549; D) Con *Trichoderma* INTA IF-612; E) Con *Trichoderma* INTA IF-613; F) Con *Trichoderma* INTA IF-614; G) Con *Trichoderma* INTA IF-630 (Barra= 3 cm).

Tabla 3.1.3.2. Comparación de ensayos 1 y 2 de inhibición de *Fusarium proliferatum* INTA IF-535 con *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	Ensayo 1 Inhibición (%)	Ensayo 2 Inhibición (%)	Valor p*
INTA IF-503	36,5	5,8	0,0013
INTA IF-505	57,2	37,3	0,0150
INTA IF-506	53,7	29,2	0,0004
INTA IF-508	50,3	34,5	0,0009
INTA IF-510	58,2	42,1	0,0004
INTA IF-511	57,0	39,3	0,0044
INTA IF-512	49,9	33,4	0,0205
INTA IF-513	50,3	31,3	0,0002
INTA IF-514	41,5	23,5	0,0155
INTA IF-549	67,6	49,4	0,0040
INTA IF-550	50,1	32,1	0,0037
INTA IF-551	56,6	29,3	0,0040
INTA IF-552	54,4	15,7	0,0040
INTA IF-553	63,7	39,0	< 0,0001
INTA IF-572	40,5	17,4	0,0230
INTA IF-573	61,1	39,8	0,0050
INTA IF-580	56,7	32,3	< 0,0001
INTA IF-612	64,8	39,6	0,0003
INTA IF-613	55,8	52,0	0,4100
INTA IF-614	58,9	44,2	0,1010
INTA IF-615	54,3	29,3	0,0003
INTA IF-622	47,8	31,2	0,0660
INTA IF-623	51,5	36,0	0,0114
INTA IF-624	53,8	31,6	0,0098
INTA IF-625	47,4	20,0	0,0170
INTA IF-626	50,7	36,2	0,0210
INTA IF-627	48,0	11,8	< 0,0001
INTA IF-629	57,5	32,8	0,0017
INTA IF-630	69,9	48,1	< 0,0001
INTA IF-631	54,3	28,5	0,0043
INTA IF-632	52,3	14,4	0,0060

*Valor p < 0,05 indica diferencias significativas entre ensayos.

Fusarium proliferatum INTA IF-536

En la Figura 3.1.3.4 se presentan los resultados correspondientes al primer y segundo ensayo. Tal como puede observarse en la Tabla 3.1.3.3, los valores de inhibición que se obtuvieron en el ensayo 1 y 2 son idénticos. En la Figura 3.1.3.4 se observan inhibiciones desde 24,2 (INTA IF-503) hasta 75,1 % (INTA IF-614). El aislado INTA IF-614 se agrupó sin diferencias estadísticas con INTA IF-613 y 612 con los mayores valores de media (69,6 y 68,7 % respectivamente). En la Tabla 3.1.3.3 se presenta la comparación de los ensayos 1 y 2, sin diferencias estadísticas entre ambos

ensayos, lo que evidenció una elevada estabilidad en el comportamiento de los aislados de *Trichoderma* sp. frente al patógeno.

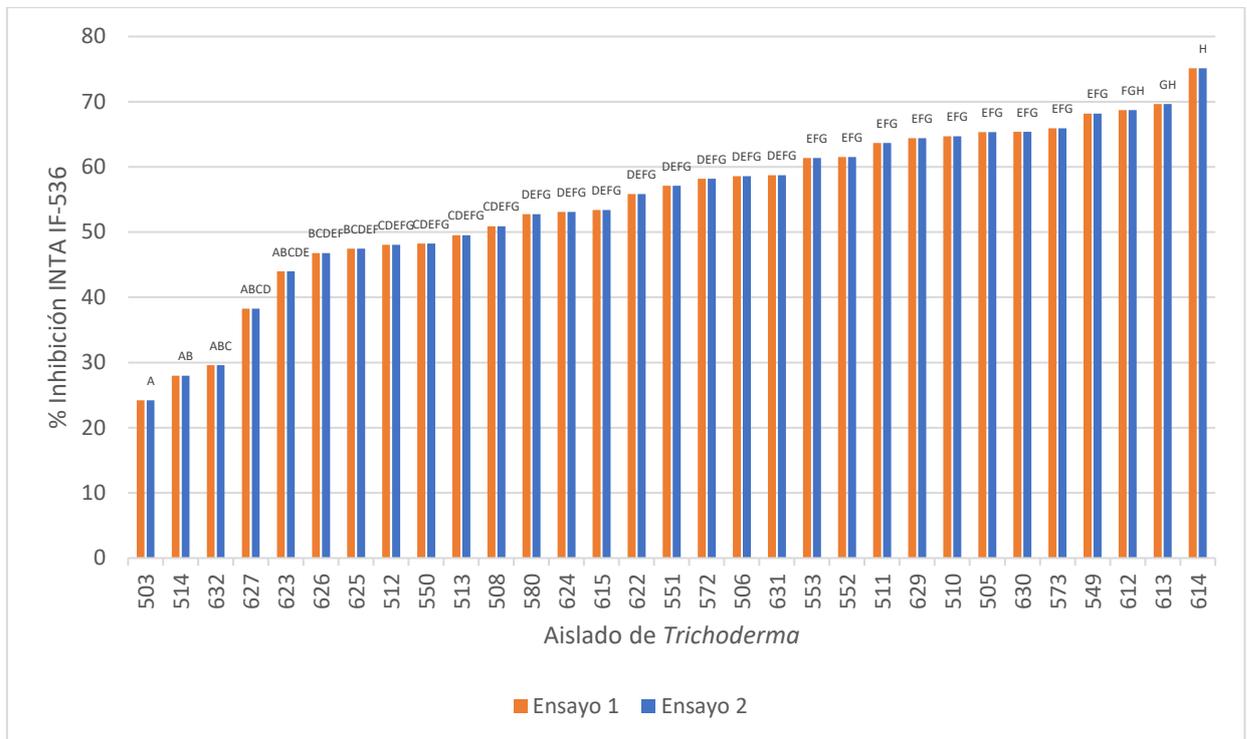


Figura 3.1.3.4. Inhibición del crecimiento in vitro de *Fusarium proliferatum* INTA IF-536 al quinto día en cultivo dual con 31 aislados de *Trichoderma* sp.

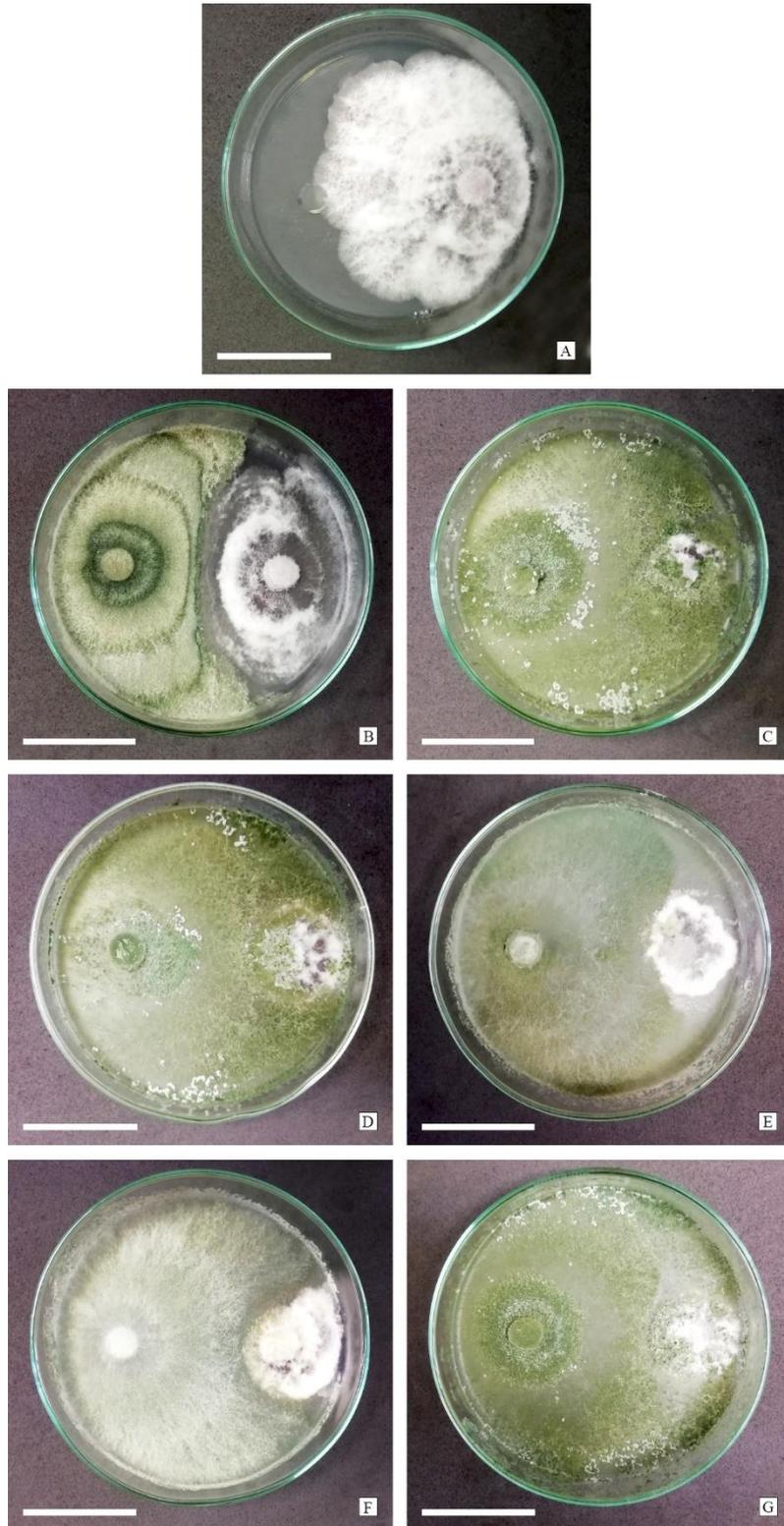


Figura 3.1.3.8. Cultivo dual de *Fusarium proliferatum* INTA IF-536. A) Testigo; B) Con *Trichoderma* INTA IF-503; C) Con *Trichoderma* INTA IF-549; D) Con *Trichoderma* INTA IF-612; E) Con *Trichoderma* INTA IF-613; F) Con *Trichoderma* INTA IF-614; G) Con *Trichoderma* INTA IF-630 (Barra= 3 cm).

Tabla 3.1.3.3. Comparación de ensayos 1 y 2 de inhibición de *Fusarium proliferatum* INTA IF-536 con *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	Ensayo 1 Inhibición (%)	Ensayo 2 Inhibición (%)	Valor p*
INTA IF-503	24,2	24,2	>0,9999
INTA IF-514	27,9	27,9	>0,9999
INTA IF-632	29,6	29,6	>0,9999
INTA IF-627	38,2	38,2	>0,9999
INTA IF-623	44,0	44,0	>0,9999
INTA IF-626	46,8	46,8	>0,9999
INTA IF-625	47,4	47,4	>0,9999
INTA IF-512	48,0	48,0	>0,9999
INTA IF-550	48,3	48,3	>0,9999
INTA IF-513	49,5	49,5	>0,9999
INTA IF-508	50,9	50,9	>0,9999
INTA IF-580	52,7	52,7	>0,9999
INTA IF-624	53,1	53,1	>0,9999
INTA IF-615	53,4	53,4	>0,9999
INTA IF-622	55,9	55,9	>0,9999
INTA IF-551	57,1	57,1	>0,9999
INTA IF-572	58,2	58,2	>0,9999
INTA IF-506	58,6	58,6	>0,9999
INTA IF-631	58,7	58,7	>0,9999
INTA IF-553	61,4	61,4	>0,9999
INTA IF-552	61,5	61,5	>0,9999
INTA IF-511	63,7	63,7	>0,9999
INTA IF-629	64,4	64,4	>0,9999
INTA IF-510	64,7	64,7	>0,9999
INTA IF-505	65,3	65,3	>0,9999
INTA IF-630	65,4	65,4	>0,9999
INTA IF-573	65,9	65,9	>0,9999
INTA IF-549	68,2	68,2	>0,9999
INTA IF-612	68,7	68,7	>0,9999
INTA IF-613	69,6	69,6	>0,9999
INTA IF-614	75,1	75,1	>0,9999

*Valor p < 0,05 indica diferencias significativas entre ensayos.

En lo que respecta a los mecanismos de acción, se observó que los aislados de *Trichoderma* sp. inhibieron el crecimiento de los patógenos por distintas vías. Según Gajera *et al.* (2013) las propiedades antagónicas de *Trichoderma* spp. se basan en la activación de múltiples mecanismos, directos e indirectos. Los indirectos comprenden la competencia por los nutrientes y el espacio, la modificación de ciertas condiciones ambientales y la inducción de mecanismos de defensa de la planta y los directos abarcan micoparasitismo y antibiosis. En observaciones microscópicas de la zona de interacción patógeno-biocontrolador se detectó un crecimiento envolvente de las hifas de *Trichoderma* sp. INTA IF-549, 612 y 630 alrededor de las de *F.*

proliferatum INTA IF-535 y 536 (Figura 3.1.3.9). Esto permite inferir que los mencionados aislados de *Trichoderma* sp. tienen la capacidad de parasitar a los aislados de *Fusarium* patógenos. Es importante mencionar que la formación de apresorios e hifas enrolladas alrededor del patógeno puede depender del patógeno o del hongo antagonista (Vinale *et al.*, 2008) ya que estas relaciones suelen tener grados de especificidad muy elevados (Chet, 1987), pero no se debe descartar la capacidad de *Trichoderma* sp. INTA IF-613 y 614 para parasitar otros patógenos. También pudieron detectarse conidios de *Trichoderma* sp. adheridos a las hifas de *Fusarium* (Figura 3.1.3.9 B y C). Cholango Martínez (2009) en estudios de antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* sp. frente a *Fusarium* sp. detectó que los aislados del biocontrolador generaban lisis de hifas. Del mismo modo, Ghanbarzadeh *et al.* (2014) detectaron apresorios de *Trichoderma* y desintegración de las hifas de *Fusarium*. Según Michel Aceves (2001) el micoparasitismo es un mecanismo característico del género *Trichoderma* e implica el contacto directo entre su micelio y el del patógeno, el enrollamiento de sus hifas alrededor de las del hospedante y la secreción de enzimas líticas que degradan la pared celular. Del mismo modo, Trivedi *et al.* (2015) detectaron por microscopía electrónica que las hifas de *T. koningiopsis* crecían paralelamente a las de *F. oxysporum* y *Rhizoctonia bataticola* y luego se enrollaban y penetraban en las hifas de los patógenos por medios mecánicos.

En lo que respecta a los mecanismos de competencia por el sustrato, en las Figuras 3.1.3.5 y 3.1.3.8 C, D, E, F y G se muestra la capacidad de los aislados de *Trichoderma* sp. para colonizar el medio de cultivo, con tasas de crecimiento mucho más elevadas que las de los patógenos. En estudios en cultivo dual, Martínez-Álvarez *et al.* (2012) registraron que un aislado de *T. viride* inhibió el crecimiento de aislados de *F. circinatum* entre un 43 y un 60 % luego de seis días. Por otro lado, Barari (2016) informó el efecto inhibitorio del crecimiento de tres aislados de *T. harzianum* frente a uno de *Fusarium oxysporum* con porcentajes que iban desde 56 a 68 %. Ambos estudios tienen relación con la capacidad de *Trichoderma* para disminuir el crecimiento *in vitro* de aislados patógenos de *Fusarium*. Por último, en la Figura 3.1.3.10 se ponen en evidencia seis casos en los que se formó un halo de inhibición en la zona de interacción, sin avance o superposición de micelios en el tiempo. En tal sentido, puede inferirse que los aislados de *Trichoderma* sp. INTA IF-503, 551, 580, 622, 625 y 627 tienen la capacidad de sintetizar metabolitos, difundirlos en el medio de cultivo y de este modo limitar el avance del patógeno. Sería interesante continuar los estudios para caracterizar las enzimas y los semioquímicos involucrados en ambos mecanismos de acción, ya que con frecuencia el agotamiento de los medios de cultivo y las observaciones en cultivos duales no permiten diferenciar la competencia de la antibiosis como mecanismos de acción de *Trichoderma* (Lockwood, 1988).

Las observaciones realizadas en este estudio son coincidentes con los eventos que caracterizan a la relación de *Trichoderma* con hongos patógenos que describen Vinale *et al.* (2008):

- Fase 1: interacciones antagónicas sin contacto (competencia)
- Fase 2: quimio-atracción y crecimiento superior de uno de los dos microorganismos
- Fase 3: parasitismo

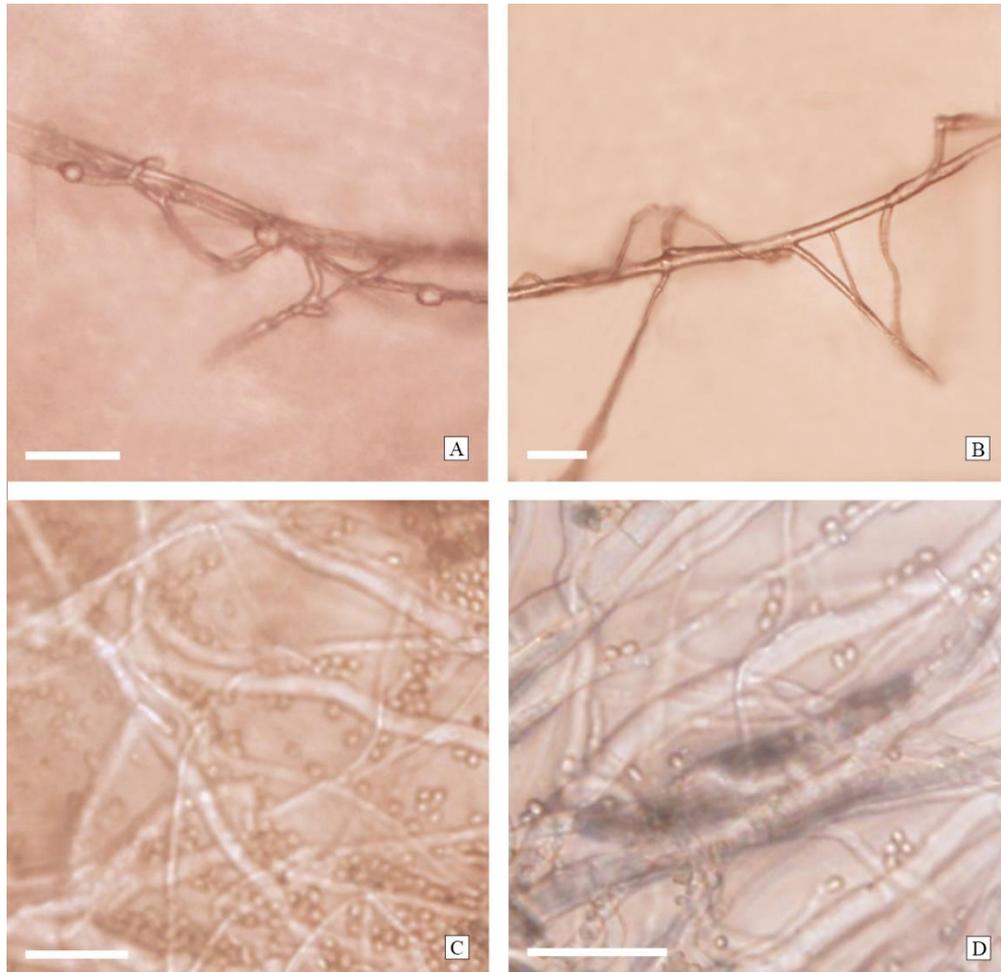


Figura 3.1.3.10. Mecanismos de acción de *Trichoderma*: Parasitismo frente a *F. proliferatum* INTA IF-535. A) Enrollamiento de INTA IF-549; B) Enrollamiento de INTA IF-549; C) Enrollamiento y conidios de INTA IF-612; D) Enrollamiento y conidios de INTA IF-630 (Barras= 25 μ m).

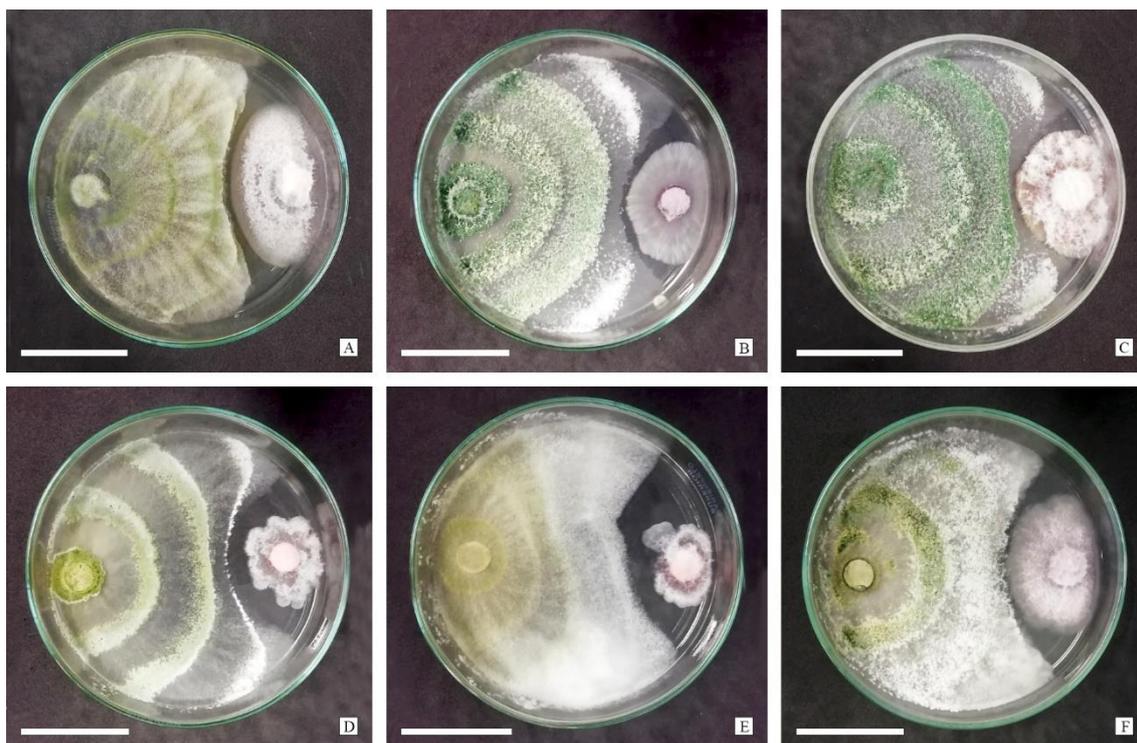


Figura 3.1.3.10. Mecanismos de acción de *Trichoderma*: Antibiosis frente a *Fusarium proliferatum* INTA IF-535. A) INTA IF-503; B) INTA IF-551; C) INTA IF-580; D) INTA IF-622; E) INTA IF-625; F) INTA IF-627 (Barras= 3 cm).

El análisis global de los resultados expuestos permitió preseleccionar aislados de *Trichoderma* sp. para estudios posteriores. De este modo, INTA IF-549, 612, 613, 614 y 630 fueron caracterizados como promisorios y consecuentemente elegidos para los ensayos de colonización de sustrato, capacidad biocontroladora *in vivo* y promoción de crecimiento de calibrchoa. El criterio de elección se construyó a partir de la habilidad de biocontrol de tales aislados en ambas pruebas *in vitro* complementada con su velocidad de crecimiento.

d. Colonización de sustrato

La Tabla 3.1.3.4 muestra la concentración de inóculo de los aislados de *Trichoderma* sp. en el sustrato. Los tratamientos sin *Trichoderma* sp. presentaron un número de UFC 3 a 4 órdenes de magnitud menor que los inoculados. En tal sentido puede afirmarse que la esterilización previa al ensayo no fue lo suficientemente efectiva, ya que a pesar de haber disminuido la población microbiana inicial del sustrato en forma significativa, no la eliminó.

En los tratamientos con los aislados INTA IF-549, 612, 630, 614 y 613, el sustrato estéril presentó respectivamente un número 16, 20, 50, 58 y 64 % menor de UFC por mL que el no esterilizado. La mayor carga de microorganismos se presentó en la combinación del aislado INTA IF-613 con

sustrato (2×10^8 UFC/mL) y la carga más baja se obtuvo con la combinación de INTA IF-614 con sustrato estéril ($1,89 \times 10^7$ UFC/mL).

Tabla 3.1.3.4. Concentración de *Trichoderma* sp. en el ensayo de colonización de sustrato.

Sustrato	Aislado	UFC/mL*
Sustrato Z estéril	-	17.250 a
Sustrato Z	-	56.833 a
Sustrato Z estéril	INTA IF-614	18.916.666 b
Sustrato Z estéril	INTA IF-630	39.416.666 c
Sustrato Z	INTA IF-614	45.333.333 d
Sustrato Z estéril	INTA IF-549	56.750.000 e
Sustrato Z estéril	INTA IF-612	57.416.666 e
Sustrato Z	INTA IF-549	65.666.666 f
Sustrato Z	INTA IF-612	71.083.333 g
Sustrato Z	INTA IF-630	79.000.000 h
Sustrato Z estéril	INTA IF-613	89.833.333 i
Sustrato Z	INTA IF-613	200.500.000 j

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

En lo que respecta a las dosis de cada aislado de *Trichoderma* sp., en la Tabla 3.1.3.5 se presentan los análisis estadísticos. La tendencia general indica que, a mayor porcentaje de inóculo, mayor concentración final (combinaciones de sustrato con INTA IF-549, 612, 613, 614 y 630 y sustrato estéril con INTA IF 613, 614 y 630). Respecto del sustrato estéril, en los tratamientos sin inóculo y con los aislados INTA IF 549 y 612 las UFC aumentaron con diferencias significativas entre las dosis 1 y 5 %.

Para los aislados INTA IF-549 y 614 inoculados en el sustrato, las concentraciones de UFC fueron del orden de 10^7 en todas las dosis. En el caso de INTA IF- 612 y 630 inoculados en sustrato, las concentraciones de UFC fueron del mismo orden para las dosis 1 y 5 % mientras que alcanzaron 10^8 cuando la dosis fue del 10 %. El aislado INTA IF-613 fue el que registró el mayor valor de UFC, con concentraciones de 10^7 para la dosis del 1 % y de 10^8 para 5 y 10 %. En las Figuras 3.1.3.9 y 3.1.3.10 se muestran las macetas que contienen los sustratos en los distintos tratamientos.

Los resultados obtenidos en este apartado son coincidentes con ensayos realizados por Marín-Guirao *et al.* (2016) en los que analizaron las UFC luego de inocular sustratos con tres concentraciones de granos de arroz que contenían micelio o suspensiones de esporas de *T. saturnisporum*. La concentración de *Trichoderma* luego de 5 días de incubación fue del orden de 1×10^7 a 1×10^8 UFC/mL en el primer caso, superior al segundo en hasta tres órdenes de magnitud. En este mismo estudio también se evaluó la concentración de esporas 30 días luego de la inoculación, que fue entre $4,5 \times 10^6$ y $9,6 \times 10^6$. La obtención de inóculo sólido sobre materiales orgánicos como cereales (arroz, cebada, trigo, avena, sorgo) podría ser eficiente

debido a que estos sustratos proporcionan nutrientes que permiten mantener un mayor nivel de inóculo, incluso en condiciones desfavorables para su establecimiento (Martínez-Medina *et al.*, 2009). Infante *et al.* (2009) mencionaron que el género *Trichoderma* se encuentra adaptado para colonizar de manera agresiva diversos sustratos y que su riqueza enzimática explica en parte dicha capacidad.

A partir de los resultados expuestos, se eligió la dosis de *Trichoderma* sp. del 1 % ya que esa baja proporción de arroz incorporada al sustrato permitió alcanzar una cantidad de inóculo elevada.

Tabla 3.1.3.5. Concentración de *Trichoderma* sp. en sustrato para cada dosis aplicada.

Sustrato	Aislado de <i>Trichoderma</i>	Dosis (% v/v)	UFC/mL*
Sustrato Z	-	1	51.250 a
Sustrato Z	-	5	58.250 a
Sustrato Z	-	10	61.000 a
Sustrato Z estéril	-	1	15.000 a
Sustrato Z estéril	-	5	17.750 b
Sustrato Z estéril	-	10	19.000 b
Sustrato Z	INTA IF-549	1	42.500.000 a
Sustrato Z	INTA IF-549	5	68.250.000 b
Sustrato Z	INTA IF-549	10	86.250.000 c
Sustrato Z estéril	INTA IF-549	1	34.750.000 a
Sustrato Z estéril	INTA IF-549	5	62.500.000 b
Sustrato Z estéril	INTA IF-549	10	73.000.000 b
Sustrato Z	INTA IF-612	1	36.500.000 a
Sustrato Z	INTA IF-612	5	64.500.000 b
Sustrato Z	INTA IF-612	10	112.250.000 c
Sustrato Z estéril	INTA IF-612	1	42.500.000 a
Sustrato Z estéril	INTA IF-612	5	64.250.000 b
Sustrato Z estéril	INTA IF-612	10	65.500.000 b
Sustrato Z	INTA IF-613	1	20.500.000 a
Sustrato Z	INTA IF-613	5	188.500.000 b
Sustrato Z	INTA IF-613	10	392.500.000 c
Sustrato Z estéril	INTA IF-613	1	45.750.000 a
Sustrato Z estéril	INTA IF-613	5	90.500.000 b
Sustrato Z estéril	INTA IF-613	10	133.250.000 c
Sustrato Z	INTA IF-614	1	13.000.000 a
Sustrato Z	INTA IF-614	5	47.250.000 b
Sustrato Z	INTA IF-614	10	75.750.000 c
Sustrato Z estéril	INTA IF-614	1	10.500.000 a
Sustrato Z estéril	INTA IF-614	5	18.500.000 b
Sustrato Z estéril	INTA IF-614	10	27.750.000 c
Sustrato Z	INTA IF-630	1	19.750.000 a
Sustrato Z	INTA IF-630	5	42.750.000 b
Sustrato Z	INTA IF-630	10	174.500.000 c
Sustrato Z estéril	INTA IF-630	1	11.000.000 a
Sustrato Z estéril	INTA IF-630	5	46.750.000 b
Sustrato Z estéril	INTA IF-630	10	60.500.000 c

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).



Figura 3.1.3.9. Sustrato Z-Floricultura Terrafertil® sin esterilizar inoculado con *Trichoderma* sp. A) Testigo 1 %; B) Testigo 5 %; C) Testigo 10 %; D) INTA IF-549 1%; E) INTA IF-549 5%; F) INTA IF-549 10 %; G) INTA IF-612 1 %; H) INTA IF-612 5 %; I) INTA IF-612 10 %; J) INTA IF-613 1 %; K) INTA IF-613 5 %; L) INTA IF-613 10 %; M) INTA IF-614 1 %; N) INTA IF-614 5 %; O) INTA IF-614 10 %; P) INTA IF-630 1 %; Q) INTA IF-630 5 %; R) INTA IF-630 10 % (Barras= 3 cm).

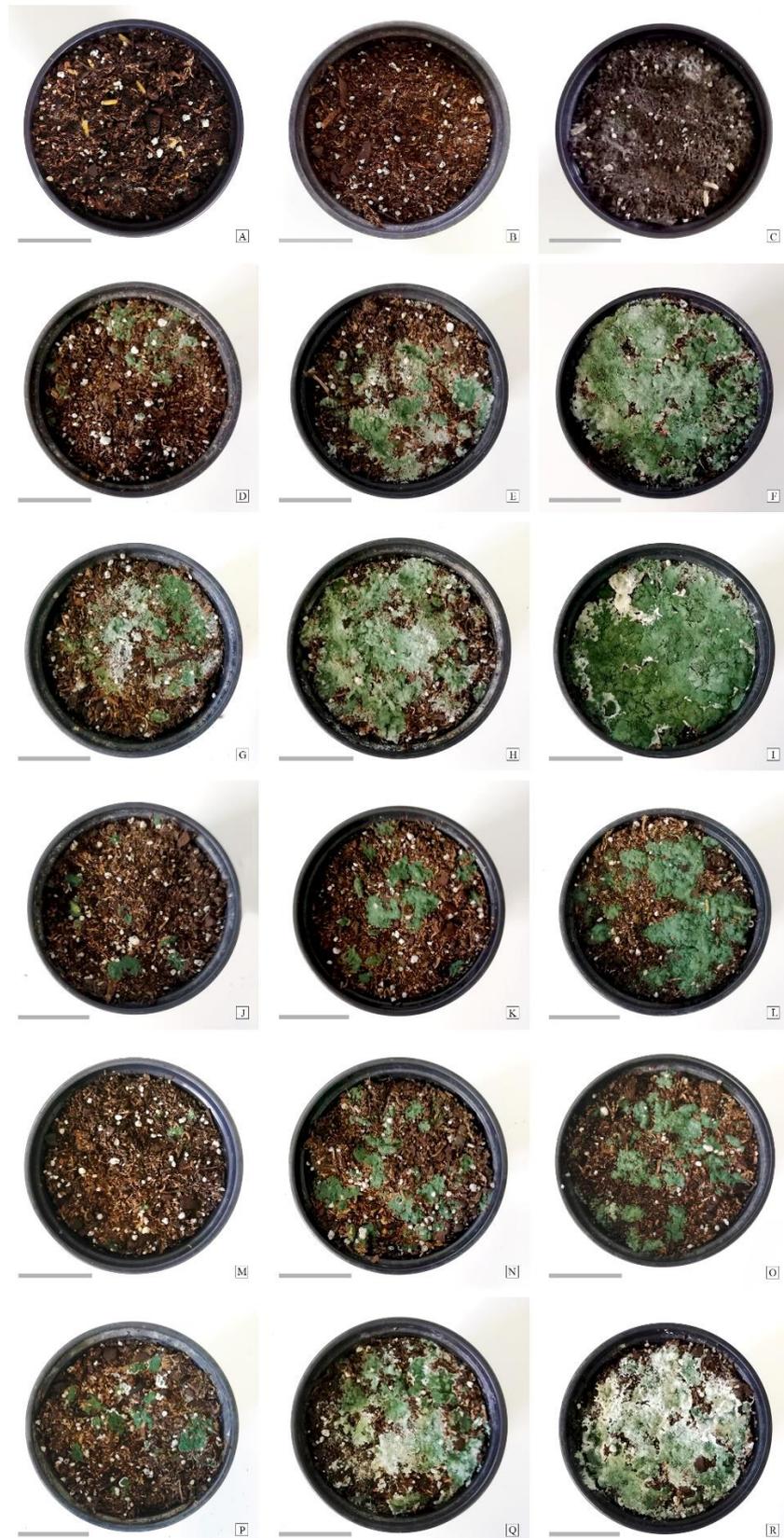


Figura 3.1.3.10. Sustrato Z-Floricultura de Terrafertil® estéril inoculado con *Trichoderma* sp. A) Testigo 1 %; B) Testigo 5 %; C) Testigo 10 %; D) INTA IF-549 1 %; E) INTA IF-549 5 %; F) INTA IF-549 10 %; G) INTA IF-612 1 %; H) INTA IF-612 5 %; I) INTA IF-612 10 %; J) INTA IF-613 1 %; K) INTA IF-613 5 %; L) INTA IF-613 10 %; M) INTA IF-614 1 %; N) INTA IF-614 5 %; O) INTA IF-614 10 %; P) INTA IF-630 1 %; Q) INTA IF-630 5 %; R) INTA IF-630 10 % (Barras= 3 cm).

e. *Antagonismo in vivo*

A continuación, se presentan los resultados de los ensayos de biocontrol *in vivo* de *F. proliferatum* INTA IF-535 y 536 con los 5 aislados de *Trichoderma* sp. preseleccionados *in vitro*.

Fusarium proliferatum INTA IF 535

En la Tabla 3.1.3.6 se muestra el peso fresco aéreo de calibrachoa Pampa Salmón-INTA en los distintos tratamientos de los ensayos 1 y 2 y la comparación entre ambos ensayos.

En el ensayo 1 las plantas inoculadas con el patógeno sin aplicación de *Trichoderma* sp. presentaron los valores más bajos de peso fresco aéreo, y esto confirmó la patogenicidad del aislado de *Fusarium*. Con pesos frescos superiores se ubicaron el testigo absoluto (sin patógeno ni *Trichoderma*) y las plantas inoculadas con *Trichoderma* sp. INTA IF 549, 612, 613 y 614, en las cuales las diferencias con el tratamiento testigo (inoculado con el patógeno) variaron de 216 hasta 275 % del peso fresco aéreo. *Trichoderma* INTA IF-630 sobresalió, ya que comparado con INTA IF-535, generó un 336 % más de peso fresco aéreo, lo que demuestra su efecto biocontrolador y promotor de crecimiento.

En cuanto al ensayo 2, la tendencia fue similar al primer ensayo. También ocuparon el primer lugar las plantas inoculadas con el patógeno sin aplicación de *Trichoderma* sp. seguidas por las plantas inoculadas con el patógeno y con *Trichoderma* INTA-IF 549, con un aumento del peso fresco aéreo de 200 %. Las plantas correspondientes al testigo absoluto y las inoculadas con *Trichoderma* INTA IF-612, 613 y 614 presentaron aumentos de peso fresco aéreo de 251 a 270 %. Nuevamente, el aislado INTA IF-630 fue el de mejor comportamiento al generar un 300 % de aumento de peso fresco aéreo con respecto al testigo inoculado con el patógeno.

En cuanto a la comparación de ensayos, puede observarse que el único caso que guardó similitud estadística fue el tratamiento INTA IF-535 sin aplicación de *Trichoderma* sp. En el resto de los casos, en el ensayo 2 las plantas presentaron un mayor peso fresco aéreo.

Tabla 3.1.3.6. Peso fresco aéreo de calibrachoa en ensayos de biocontrol de *Fusarium proliferatum* INTA IF-535 con *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Fusarium</i>	Aislado de <i>Trichoderma</i>	Ensayo 1 Peso fresco aéreo (mg)*	Ensayo 2 Peso fresco aéreo (mg)*	Valor p**
-	-	532,2 b	744,7 c	0,005
INTA IF-535	-	213,0 a	296,5 a	0,240
INTA IF-535	INTA IF-549	460,5 b	595,8 b	0,005
INTA IF-535	INTA IF-612	586,8 b	787,8 c	0,040
INTA IF-535	INTA IF-613	552,7 b	749,3 c	0,0001
INTA IF-535	INTA IF-614	553,7 b	798,5 c	0,040
INTA IF-535	INTA IF-630	716,0 c	887,3 d	0,040

*Medias con una letra común en misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

**Valor $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre ensayos.

En la Tabla 3.1.3.7 se observa el peso fresco radical de calibrachoa Pampa Salmón-INTA en los distintos tratamientos de los ensayos 1 y 2 y la comparación entre ensayos. Para ambos ensayos, las plantas testigo (inoculadas solo con el patógeno) presentaron el menor peso fresco radical, lo que demuestra el efecto del patógeno sobre la planta. Los tratamientos testigo absoluto y aquellos inoculados con el patógeno y los aislados de *Trichoderma* sp. INTA IF-549, 612, 613 y 614 mostraron similitud estadística entre sí y se diferenciaron del tratamiento con aplicación del aislado de *Fusarium*, lo cual aporta evidencia sobre su efecto biocontrolador. Por último, la aplicación del patógeno en combinación con el aislado INTA IF-630 generó el valor más elevado de peso fresco radical, diferente estadísticamente al resto de los tratamientos.

En cuanto a la comparación estadística de los ensayos, el único tratamiento con semejanzas fue el de aplicación del patógeno. En el resto, las medias de peso fresco radical en el ensayo 2 fueron superiores a los del ensayo 1. Al margen de esto, la tendencia de los resultados fue la misma en ambos ensayos.

Tabla 3.1.3.7. Peso fresco radical de calibrachoa en ensayos de biocontrol de *Fusarium proliferatum* INTA IF-535 con *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Fusarium</i>	Aislado de <i>Trichoderma</i>	Ensayo 1 Peso fresco radical (mg)*	Ensayo 2 Peso fresco radical (mg)*	Valor p**
-	-	233,7 b	456,8 b	0,0001
INTA IF-535	-	132,7 a	91,0 a	0,0600
INTA IF-535	INTA IF-549	201,8 b	399,0 b	0,0001
INTA IF-535	INTA IF-612	224,3 b	428,7 b	0,0031
INTA IF-535	INTA IF-613	211,7 b	434,8 b	0,0001
INTA IF-535	INTA IF-614	186,0 b	429,7 b	<0,0001
INTA IF-535	INTA IF-630	247,7 c	506,3 c	0,0032

*Medias con una letra común en misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

**Valor $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre ensayos.

En relación con el peso seco aéreo de calibrachoa Pampa Salmón-INTA, la Tabla 3.1.3.8 expone los resultados de los análisis estadísticos realizados para los ensayos 1 y 2 y la comparación entre ambos ensayos. En el ensayo 1 existieron diferencias significativas entre el tratamiento con aplicación del patógeno sin *Trichoderma* sp. (testigo) y los restantes (incluido el testigo absoluto), con incrementos del peso seco aéreo que van desde el 41 (INTA IF-549) hasta 76 % (INTA IF-630). Por lo tanto, puede afirmarse que, tanto el testigo absoluto (sin patógeno ni *Trichoderma* sp.) como los tratamientos con patógeno y biocontrolador -independientemente del aislado aplicado- alcanzaron valores de peso seco aéreo superiores y significativos estadísticamente respecto de las plantas testigo (con patógeno). En cuanto al ensayo 2, el peso de las plantas -sin importar el tratamiento- fue mayor al obtenido en el ensayo 1 y sólo el tratamiento INTA IF-613 difirió estadísticamente del resto. El peso seco aéreo de las plantas tratadas únicamente con patógeno, presentó los valores de media más bajos (63,8 mg), seguido por el tratamiento sin aplicación de patógeno ni biocontrolador (103,6 mg). En cuanto a la comparación estadística de los ensayos, el único tratamiento con similitud estadística fue el testigo absoluto (sin *Fusarium* ni *Trichoderma* sp.). En el resto, los valores de media del ensayo 2 fueron mayores a los del 1. En esta variable la tendencia no se repitió en ambos ensayos.

Tabla 3.1.3.8. Peso seco aéreo de calibrachoa en ensayos de biocontrol de *Fusarium proliferatum* INTA IF-535 con *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Fusarium</i>	Aislado de <i>Trichoderma</i>	Ensayo 1 Peso seco aéreo (mg)	Ensayo 2 Peso seco aéreo (mg)	Valor p**
-	-	79,9 b	103,6 a	0,07
INTA IF-535	-	48,0 a	63,8 a	0,02
INTA IF-535	INTA IF-549	67,7 b	105,5 a	0,01
INTA IF-535	INTA IF-612	80,0 b	156,6 a	0,001
INTA IF-535	INTA IF-613	75,7 b	412,0 b	0,004
INTA IF-535	INTA IF-614	76,1 b	121,1 a	0,003
INTA IF-535	INTA IF-630	84,9 b	124,4 a	0,007

*Medias con una letra común en misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

**Valor $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre ensayos.

En la Tabla 3.1.3.9 se observa el peso seco radical de calibrachoa Pampa Salmón-INTA, en los distintos tratamientos de los ensayos 1 y 2 y la comparación estadística entre ambos. En el ensayo 1, las plantas testigo (con aplicación del patógeno) tuvieron el menor peso seco radical lo que demuestra el efecto del patógeno sobre las plantas. El resto de los tratamientos se diferenciaron estadísticamente del anteriormente mencionado sin diferencias entre ellos, lo que permite pensar en un posible efecto biocontrolador. En el ensayo 2, las plantas inoculadas con

el patógeno (testigo) tuvieron el peso seco radical más bajo y diferente estadísticamente al resto de los tratamientos, en coincidencia con la tendencia observada en el ensayo 1. Las plantas tratadas con el patógeno y *Trichoderma* sp. INTA IF-549, 612, 613 y 614 generaron valores de peso seco radical superiores al testigo (con patógeno) -con diferencias estadísticas con este último-, pero sin diferencias estadísticas entre ellos. Las plantas del tratamiento testigo absoluto (sin patógeno ni *Trichoderma* sp.) presentaron un peso seco radical superior al grupo previamente descrito y se diferenciaron estadísticamente de éste, lo que evidencia un efecto biocontrolador leve. Por último, la combinación patógeno más *Trichoderma* INTA IF-630 aumentó 346 % el peso seco radical de las plantas con respecto al testigo (con el patógeno). En cuanto a la comparación estadística de ensayos, el tratamiento testigo (patógeno) fue el único con similitud estadística entre ensayos. En el resto, el ensayo 2 tuvo valores de media superiores al 1.

Tabla 3.1.3.9. Peso seco radical de calibrachoa en ensayos de biocontrol de *Fusarium proliferatum* INTA IF-535 con *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Fusarium</i>	Aislado de <i>Trichoderma</i>	Ensayo 1 Peso seco radical (mg)*	Ensayo 2 Peso seco radical (mg)*	Valor p**
-	-	19,4 b	43,6 c	<0,0001
INTA IF-535	-	11,7 a	13,2 a	0,42
INTA IF-535	INTA IF-549	16,4 b	32,1 b	0,009
INTA IF-535	INTA IF-612	20,2 b	35,4 b	0,0007
INTA IF-535	INTA IF-613	17,0 b	37,6 b	0,0002
INTA IF-535	INTA IF-614	15,9 b	40,6 b	<0,0001
INTA IF-535	INTA IF-630	18,2 b	45,5 d	<0,0001

*Medias con una letra común en misma columna no son significativamente diferentes (p > 0,05).

** Valor p < 0,05 indica diferencias significativas entre ensayos.

En la Tabla 3.1.3.10 se observan los grados en la escala de daño aéreo en los distintos tratamientos de los ensayos 1 y 2 y la comparación estadística entre ambos ensayos. Los valores más altos de los rankings generados por la prueba estadística indican medias más elevadas de los grados de severidad y, en consecuencia, mayor daño en las plantas. El patógeno generó el valor más alto del ranking (medias de grado en la escala= 4 y 4,33 en los ensayos 1 y 2, respectivamente) y se diferenció estadísticamente del resto de los tratamientos (medias de grados en la escala= 0 y 0,2). Respecto de la comparación de ensayos, en todos los casos se detectaron resultados similares. Por lo tanto, los daños del patógeno apreciados visualmente en los tratamientos se mantuvieron entre ensayos.

Tabla 3.1.3.10. Escala de daño aéreo de calibrachoa en ensayos de biocontrol de *Fusarium proliferatum* INTA IF-535 con *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Fusarium</i>	Aislado de <i>Trichoderma</i>	Ensayo 1	Ensayo 2	Valor p**
		Escala aérea (Ranking)*	Escala aérea (Ranking)*	
-	-	18,5 a (0,0)	18,0 a (0,0)	>0,99
INTA IF-535	-	38,8 b (4,0)	39,5 b (4,3)	0,60
INTA IF-535	INTA IF-549	18,5 a (0,0)	18,0 a (0,0)	>0,99
INTA IF-535	INTA IF-612	18,5 a (0,0)	18,0 a (0,0)	>0,99
INTA IF-535	INTA IF-613	18,5 a (0,0)	18,0 a (0,0)	>0,99
INTA IF-535	INTA IF-614	18,5 a (0,0)	18,0 a (0,0)	>0,99
INTA IF-535	INTA IF-630	18,5 a (0,0)	21,0 a (0,2)	0,30

Los valores entre paréntesis indican el valor medio de escala.

*Ranking con una letra común en misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

**Valor $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre ensayos.

En la Tabla 3.1.3.11 se observan los valores estimados sobre la escala de daño radical en los ensayos 1 y 2 y su comparación estadística. Los valores más altos de los rankings indican medias más elevadas de los grados de severidad en la escala y, en consecuencia, mayor daño en las plantas. En el ensayo 1, el testigo -patógeno- generó el mayor valor (media en los grados de la escala= 2,5) y difirió estadísticamente del resto de los tratamientos (media= 1 o 1,2). En cuanto al ensayo 2, del mismo modo que en el 1, la aplicación del patógeno generó el mayor valor (media= 2,2) y se agrupó estadísticamente con la aplicación del patógeno más *Trichoderma* sp. INTA IF-613 y 614 (media= 1,3), lo que evidencia que el aspecto de las raíces de las plantas tratadas con dichos aislados no fue óptimo, a pesar de tener un peso seco superior a las inoculadas solo con el patógeno. Por último, las plantas del testigo absoluto (sin patógeno ni biocontroladores) y de los tratamientos INTA IF-549, 612 y 630 presentaron los valores más bajos sobre la escala de daño y se diferenciaron estadísticamente del patógeno (media= 1). En cuanto a la comparación de ensayos, no se detectaron diferencias significativas entre estos. En tal sentido, la apreciación visual de los daños ocasionados por el patógeno en los diversos tratamientos se mantuvo entre ensayos.

Tabla 3.1.3.11. Escala de daño radical de calibrachoa en ensayos de biocontrol de *Fusarium proliferatum* INTA IF-535 con *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Fusarium</i>	Aislado de <i>Trichoderma</i>	Ensayo 1	Ensayo 2	Valor p**
		Escala radical (Ranking)*	Escala radical (Ranking)*	
-	-	17,5 a (1,0)	18,0 a (1,0)	>0,9
INTA IF-535	-	38,8 b (2,5)	32,2 b (2,2)	0,6
INTA IF-535	INTA IF-549	17,5 a (1,0)	18,0 a (1,0)	>0,9
INTA IF-535	INTA IF-612	17,5 a (1,0)	18,0 a (1,0)	>0,9
INTA IF-535	INTA IF-613	17,5 a (1,0)	21,7 ab (1,3)	0,6
INTA IF-535	INTA IF-614	20,8 a (1,2)	24,5 ab (1,3)	0,5
INTA IF-535	INTA IF-630	20,8 a (1,2)	18,0 a (1,0)	>0,9

Los valores entre paréntesis indican el valor medio de escala.

*Ranking con una letra común en misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

**Valor $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre ensayos.

En las Figuras 3.1.3.11 y 3.1.3.12 se observan las plantas de calibrachoa Pampa Salmón-INTA para cada tratamiento aplicado.



Figura 3.1.3.11. Ensayo *in vivo* de *Fusarium* INTA IF-535 frente a aislados de *Trichoderma* sp. - Parte aérea. A) Testigo absoluto; B) INTA IF-535; C) INTA IF-535 + INTA IF 549; D) INTA IF-535 + INTA IF 612; E) INTA IF-535 + INTA IF 613; F) INTA IF-535 + INTA IF 614; G) INTA IF-535 + INTA IF 630. (Barras= 2 cm).



Figura 3.1.3.12. Ensayo *in vivo* de *Fusarium* INTA IF-535 frente a aislados de *Trichoderma* sp. - Parte radical. A) Testigo absoluto; B) INTA IF-535; C) INTA IF-535 + INTA IF 549; D) INTA IF-535 + INTA IF 612; E) INTA IF-535 + INTA IF 613; F) INTA IF-535 + INTA IF 614; G) INTA IF-535 + INTA IF 630. (Barras= 2 cm).

Fusarium proliferatum INTA IF-536

En la Tabla 3.1.3.12 se observa el peso fresco aéreo de calibrachoa Pampa Salmón-INTA en los distintos tratamientos de los ensayos 1 y 2 y la comparación estadística entre ambos ensayos. En el ensayo 1 para el tratamiento testigo (patógeno) y el tratamiento con el aislado de *Trichoderma* INTA IF-614, se observaron los valores más bajos de peso fresco aéreo con similitud estadística entre ellos. En tal sentido, la aplicación del INTA IF-614 no tuvo efecto biocontrolador. El resto de los tratamientos -que incluye al testigo absoluto- generó plantas con mayor peso fresco aéreo y se diferenció estadísticamente de los tratamientos previamente descritos, sin diferencias entre ellos. El aislado de *Trichoderma* INTA IF-630 generó un aumento del 445 % en el peso fresco aéreo de las plantas de calibrachoa respecto del tratamiento con aplicación del patógeno.

En el ensayo 2, al igual que en el 1, el tratamiento con aplicación del patógeno fue el que generó el peso fresco aéreo más bajo (249,2 mg) diferente estadísticamente del resto. Esto demuestra el efecto del aislado de *F. proliferatum*. *Trichoderma* INTA IF-614 incrementó el peso fresco aéreo de las plantas (448,7 mg) y se diferenció estadísticamente del testigo (con el patógeno). Los aislados INTA IF-549 y 612 presentaron comportamiento similar entre sí, con menor merma de peso fresco aéreo causada por el patógeno que el aislado INTA IF-614. El tratamiento testigo absoluto (sin patógeno ni *Trichoderma* sp.) produjo plantas con mayor peso fresco aéreo que el grupo descrito anteriormente (837,3 mg). Por último, INTA IF-630 y 613 mejoraron el peso fresco aéreo de las plantas respecto de todos los grupos anteriormente mencionados, lo que aporta evidencia sobre sus efectos en el biocontrol y en la promoción del crecimiento. En la comparación estadística de los ensayos, el único tratamiento con similitud fue INTA IF-614. En el resto de los casos el ensayo 2 superó en peso fresco aéreo al 1.

Tabla 3.1.3.12. Peso fresco aéreo de calibrachoa en ensayos de biocontrol de *Fusarium proliferatum* INTA IF-536 con *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Fusarium</i>	Aislado de <i>Trichoderma</i>	Ensayo 1 Peso fresco aéreo (mg)*	Ensayo 2 Peso fresco aéreo (mg)*	Valor p**
-	-	532,2 b	837,3 d	0,01
INTA IF-536	-	161,2 a	249,2 a	0,04
INTA IF-536	INTA IF-549	548,0 b	744,7 c	0,01
INTA IF-536	INTA IF-612	580,8 b	751,8 c	0,02
INTA IF-536	INTA IF-613	710,8 b	972,8 e	0,01
INTA IF-536	INTA IF-614	320,8 a	448,7 b	0,18
INTA IF-536	INTA IF-630	718,7 b	929,0 e	0,01

*Medias con una letra común en misma columna no son significativamente diferentes (p > 0,05).

**Valor p < 0,05 indica diferencias significativas entre ensayos.

En la Tabla 3.1.3.13 se observa el peso fresco radical de calibrachoa Pampa Salmón-INTA en los distintos tratamientos de los ensayos 1 y 2 y la comparación estadística entre los mismos. En el ensayo 1, las plantas testigo (inoculadas con el patógeno) presentaron el peso fresco radical más bajo (126,3 mg). Luego se ubicaron los tratamientos INTA IF-614 (137,7 mg), INTA IF-549 (228,2 mg), INTA IF-612 (230,5 mg), testigo absoluto -sin patógeno ni *Trichoderma* sp.- (233,7 mg) y el aislado INTA IF-630 (251 mg). En estos existe evidencia de un posible efecto biocontrolador del patógeno. Por último, el tratamiento con *Trichoderma* INTA IF-613 generó el peso fresco radical más elevado (317,3 mg) y se infiere que existe un efecto biocontrolador y promotor del crecimiento. En el ensayo 2, la tendencia fue similar al 1. Las plantas del tratamiento testigo -con aplicación del patógeno- tuvieron el peso fresco radical más bajo (126,2 mg). Posteriormente se ubicaron las plantas del tratamiento INTA IF-614, que superó en peso fresco de la raíz al testigo, pero quedó por debajo del testigo absoluto (sin patógeno ni *Trichoderma* sp.). Las plantas de los tratamientos INTA IF-549, 612 e INTA IF-630 presentaron un peso fresco radical superior a los mencionados previamente, lo que evidenció su efecto biocontrolador. El tratamiento testigo absoluto no difirió estadísticamente de los tratamientos mencionados anteriormente. Por último, el tratamiento con el aislado de *Trichoderma* INTA IF-613 generó el mayor peso fresco radical y superó al testigo -con el patógeno- un 331 % e implicó un efecto biocontrolador y promotor del crecimiento. En cuanto a la comparación estadística de ensayos, en el único caso que se observaron similitudes fue entre los tratamientos testigo -con aplicación del patógeno-. En el resto de los casos se observó peso fresco radical mayor para el ensayo 2.

Tabla 3.1.3.13. Peso fresco radical de calibrachoa en ensayos de biocontrol de *Fusarium proliferatum* INTA IF-536 con *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Fusarium</i>	Aislado de <i>Trichoderma</i>	Ensayo 1	Ensayo 2	Valor p**
		Peso fresco radical (mg)*	Peso fresco radical (mg)*	
-	-	233,7 b	471,7 c	0,0001
INTA IF-536	-	126,3 a	126,2 a	0,9966
INTA IF-536	INTA IF-549	228,2 b	407,5 c	0,0002
INTA IF-536	INTA IF-612	230,5 b	456,8 c	0,0003
INTA IF-536	INTA IF-613	317,3 c	544,5 d	0,0006
INTA IF-536	INTA IF-614	137,7 b	244,8 b	0,0012
INTA IF-536	INTA IF-630	251,0 b	476,2 c	0,0003

*Medias con una letra común en misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

**Valor $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre ensayos.

En la Tabla 3.1.3.14 se observa el peso seco aéreo de las plantas de calibrachoa en los distintos tratamientos para los ensayos 1 y 2 y la comparación estadística entre ambos ensayos. En el

ensayo 1 no se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos, pero se detectó una tendencia similar a la observada para el peso fresco aéreo -menor peso generado por el tratamiento testigo (el patógeno) y mayor peso generado por el aislado INTA IF-613-. En cuando al ensayo 2, se observaron diferencias. Los tratamientos INTA IF-614 y el testigo (patógeno) generaron los valores de peso seco aéreo más bajo. Las plantas del testigo absoluto (sin patógeno ni *Trichoderma* sp.) y las de los tratamientos INTA IF-549, 612, 613 y 630 no difirieron estadísticamente entre sí, pero se diferenciaron de las mencionadas anteriormente. Esto permitió demostrar el efecto biocontrolador de los aislados de *Trichoderma* sp. puestos a prueba. Respecto de la comparación de ensayos, el testigo absoluto (sin patógeno ni *Trichoderma* sp.), el testigo (solo patógeno) e INTA IF-614 mostraron similitud estadística entre ensayos. En el resto de los casos el peso seco aéreo fue mayor en el ensayo 2.

Tabla 3.1.3.14. Peso seco aéreo de calibrachoa en ensayos de biocontrol de *Fusarium proliferatum* INTA IF-536 con *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Fusarium</i>	Aislado de <i>Trichoderma</i>	Ensayo 1 Peso seco aéreo (mg)*	Ensayo 2 Peso seco aéreo (mg)*	Valor p**
-	-	79,9 a	122,7 b	0,07
INTA IF-536	-	61,9 a	81,9 a	0,1
INTA IF-536	INTA IF-549	76,2 a	110,8 b	0,005
INTA IF-536	INTA IF-612	83,9 a	103,6 b	0,02
INTA IF-536	INTA IF-613	89,7 a	135,5 b	0,01
INTA IF-536	INTA IF-614	63,8 a	75,8 a	0,08
INTA IF-536	INTA IF-630	88,4 a	129,7 b	0,01

*Medias con una letra común en misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

**Valor $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre ensayos.

En cuanto al peso seco radical de las plantas de calibrachoa Pampa Salmón-INTA, en la Tabla 3.1.3.15 se observan los resultados de los ensayos 1 y 2 para cada tratamiento y su comparación estadística. En el ensayo 1, las plantas tratadas con el patógeno -testigo- e INTA IF-614 generaron el peso seco radical más bajo, lo que demuestra el efecto del patógeno sobre las plantas y la nula capacidad de biocontrol de INTA IF-614. Por otro lado, las plantas del testigo absoluto y las de los tratamientos en combinación de patógeno con *Trichoderma* sp. INTA IF-549, 612, 613 y 630 superaron en peso seco radical a los anteriores -sin diferencias estadística entre tratamientos-, lo que demuestra un efecto biocontrolador. En el ensayo 2, se detectó que las plantas tratadas con INTA IF-614 y las del testigo (patógeno) tuvieron el peso seco radical más bajo, sin diferencias estadísticas entre estos. Por otro lado, se diferenciaron estadísticamente de los tratamientos anteriormente mencionados las plantas tratadas con INTA IF-612. Por último, las plantas del testigo absoluto (sin patógeno ni *Trichoderma* sp.) y aquellas tratadas con

los aislados INTA IF-549, 613 y 630, tuvieron el peso seco radical más elevado sin diferencias estadísticas entre tratamientos. Esto permitió demostrar el efecto biocontrolador de los aislados de *Trichoderma* sp. En la comparación se observó que el único tratamiento similar estadísticamente en los dos ensayos fue el testigo -patógeno-. En el resto de los casos, los pesos secos de las raíces fueron superiores en el ensayo 2.

Tabla 3.1.3.15. Peso seco radical de calibrachoa en ensayos de biocontrol de *Fusarium proliferatum* INTA IF-536 con *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Fusarium</i>	Aislado de <i>Trichoderma</i>	Ensayo 1	Ensayo 2	Valor p**
		Peso seco radical (mg)*	Peso seco radical (mg)*	
-	-	19,4 b	43,6 c	<0,0001
INTA IF-536	-	14,1 a	20,3 a	0,9900
INTA IF-536	INTA IF-549	18,8 b	42,5 c	0,0003
INTA IF-536	INTA IF-612	18,4 b	36,0 b	<0,0001
INTA IF-536	INTA IF-613	24,8 b	49,9 c	0,0001
INTA IF-536	INTA IF-614	12,7 a	14,1 a	0,0200
INTA IF-536	INTA IF-630	20,1 b	43,7 c	<0,0001

*Medias con una letra común en misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

**Valor $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre ensayos.

En la Tabla 3.1.3.16 se observan los grados sobre la escala de daño aéreo en los distintos tratamientos de los ensayos 1 y 2 y la comparación estadística entre ambos ensayos. Los valores más altos de rankings generados por la prueba estadística indican medias más elevadas de los grados de severidad y, en consecuencia, mayor daño en las plantas. En el ensayo 1, las plantas del tratamiento testigo absoluto (sin patógeno ni *Trichoderma* sp.) y las de los tratamientos INTA IF-549, 612, 613 y 630, tuvieron los valores de ranking más bajos (grados medios sobre la escala= 0 y 0,25). El patógeno -testigo- e INTA IF-614 tuvieron los valores de ranking más elevados (medias= 4,33 y 0,85 respectivamente). En tal sentido, los daños en la parte aérea de las plantas que visualmente se estimaron como mayores coincidieron con los menores valores de peso fresco y seco aéreo detallados previamente. En el ensayo 2 las plantas tratadas con el patógeno -testigo- tuvieron el valor de ranking más alto (media sobre la escala= 4,33). Las plantas del resto de los tratamientos tuvieron valores inferiores de rankings y medias, pero sin diferencias estadísticas entre tratamientos. En cuanto a la comparación de ensayos, puede observarse que, con excepción del tratamiento INTA IF-614, todos los resultados fueron estadísticamente comparables entre ensayos. En consecuencia, la detección visual de los daños aéreos permite estimar el daño causado por el patógeno.

Tabla 3.1.3.16. Escala de daño aéreo de calibrachoa en ensayos de biocontrol de *Fusarium proliferatum* INTA IF-536 con *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Fusarium</i>	Aislado de <i>Trichoderma</i>	Ensayo 1 Escala aérea (Ranking)*	Ensayo 2 Escala aérea (Ranking)*	Valor p**
-	-	15,0 a (0,0)	16,0 a (0,0)	>0,9
INTA IF-536	-	38,7 b (4,3)	39,5 b (4,3)	>0,9
INTA IF-536	INTA IF-549	17,9 a (0,2)	22,0 a (0,3)	0,5
INTA IF-536	INTA IF-612	15,0 a (0,0)	16,0 a (0,0)	>0,9
INTA IF-536	INTA IF-613	15,0 a (0,0)	19,0 a (0,2)	0,3
INTA IF-536	INTA IF-614	33,8 b (1,3)	22,0 a (0,3)	0,02
INTA IF-536	INTA IF-630	15,0 a (0,0)	16,0 a (0,0)	>0,9

Los valores entre paréntesis indican el valor medio de escala.

*Ranking con una letra común en misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

**Valor $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre ensayos.

Por último, en la Tabla 3.1.3.17 se observan los valores de daño radical estimados sobre la escala en los distintos tratamientos de los ensayos 1 y 2 y la comparación estadística entre ambos ensayos. Los valores más altos de los rankings indican medias más elevadas de los grados de severidad en la escala y, en consecuencia, mayor daño en las plantas. En el ensayo 1, el testigo absoluto -sin patógeno ni *Trichoderma* sp.-, *Trichoderma* sp. INTA IF-549, 612 y 630 tuvieron los valores más bajos de escala, lo que implica menor daño en las plantas. Las plantas tratadas con INTA IF-613 tuvieron valores de escala estadísticamente similares a los tratamientos anteriormente mencionados. INTA IF-614 tuvo similitudes estadísticas con el tratamiento INTA IF-613 y con el tratamiento testigo -patógeno- con las medias de escala más elevadas. En el ensayo 2, los tratamientos testigo absoluto -sin patógeno ni *Trichoderma* sp.-, y los tratamientos INTA IF-549, 612, 613 y 630 tuvieron los valores más bajos de escala (medias de escala entre 1 y 1,3). INTA IF-614, tuvo similitud estadística con el grupo previamente mencionado y con el tratamiento testigo (sólo patógeno) con valores de escala superiores al resto de los tratamientos. Este último tratamiento expresó los daños visuales más evidentes para la zona radical, en concordancia con los resultados referidos al peso fresco y seco radical. Respecto de la comparación de ensayos, pudo detectarse que todos los tratamientos fueron idénticos en ambos ensayos.

Tabla 3.1.3.17. Escala de daño radical de calibrachoa en ensayos de biocontrol de *Fusarium proliferatum* INTA IF-536 con *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Fusarium</i>	Aislado de <i>Trichoderma</i>	Ensayo 1	Ensayo 2	Valor p**
		Escala radical (Ranking)*	Escala radical (Ranking)*	
-	-	14,5 a (1,0)	15,5 a (1,0)	>0,9
INTA IF-536	-	36,2 c (2,2)	37,0 b (2,2)	>0,9
INTA IF-536	INTA IF-549	14,5 a (1,0)	15,5 a (1,0)	>0,9
INTA IF-536	INTA IF-612	14,5 a (1,0)	15,5 a (1,0)	>0,9
INTA IF-536	INTA IF-613	21,3 ab (1,3)	22,3 a (1,3)	>0,9
INTA IF-536	INTA IF-614	35,0 bc (2,0)	29,2 ab (1,7)	0,1
INTA IF-536	INTA IF-630	14,5 a (1,0)	15,5 a (1,0)	>0,9

Los valores entre paréntesis indican el valor medio de escala.

*Ranking con una letra común en misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

**Valor $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre ensayos.

En las Figuras 3.1.3.13 y 3.1.3.14 se observan las plantas de calibrachoa Pampa Salmón-INTA para cada tratamiento.



Figura 3.1.3.13. Ensayo *in vivo* *Fusarium* INTA IF-536 frente a aislados de *Trichoderma* sp. - Parte aérea. A) Testigo absoluto; B) INTA IF-536; C) INTA IF-536 + INTA IF 549; D) INTA IF-536 + INTA IF 612; E) INTA IF-536 + INTA IF 613; F) INTA IF-536 + INTA IF 614; G) INTA IF-536 + INTA IF 630. (Barras= 2 cm).



Figura 3.1.3.14. Ensayo *in vivo* *Fusarium* INTA IF-536 frente a aislados de *Trichoderma* sp. - Parte radical. A) Testigo absoluto; B) INTA IF-536; C) INTA IF-536 + INTA IF 549; D) INTA IF-536 + INTA IF 612; E) INTA IF-536 + INTA IF 613; F) INTA IF-536 + INTA IF 614; G) INTA IF-536 + INTA IF 630. (Barras= 2 cm).

En los ensayos precedentes fue posible identificar una tendencia en el comportamiento biocontrolador de los aislados de *Trichoderma*, aunque existió cierto grado de variabilidad en la respuesta. Contra *F. proliferatum* INTA IF-535, *Trichoderma* INTA IF-630 tuvo capacidad de biocontrol y en algunos casos mejoró el peso de las plantas. Esta situación se observó en todos los ensayos con excepción de las cuantificaciones del peso seco aéreo y radical, donde los mejores resultados se obtuvieron con *Trichoderma* sp. INTA IF-613 y 612 respectivamente. Contra *F. proliferatum* INTA IF-536, *Trichoderma* INTA IF-613 fue el que generó los mejores resultados en peso y permitió en algunos casos superar al testigo, con evidencia de un efecto promotor del crecimiento además de biocontrolador. *Trichoderma* INTA IF-630 se posicionó también como un buen biocontrolador.

En evaluaciones en invernadero con plantas de tomate, Barari (2016) observó una disminución del 67,5 al 12,5 % en la incidencia de la marchitez causada por *F. oxysporum* luego de aplicar un aislado nativo de *Trichoderma* sp. Adicionalmente, la altura y la cantidad de frutos por planta aumentaron. Sundaramoorthy y Balabaskar (2013) evaluaron 5 aislados de *Trichoderma* sp. frente al mismo fitopatógeno en tomate y las plantas tratadas con un aislado de *T. harzianum* expresaron una reducción de marchitez del 42,4 %, un incremento de la altura y del rendimiento. Este aislado, al igual que en la experiencia realizada en el presente trabajo, se preseleccionó luego de verificar su capacidad antagonista *in vitro*. Martínez-Medina *et al.* (2009) evaluaron la efectividad de una formulación de vermiculita y bentonita con *T. harzianum* para controlar a *F. oxysporum*, agente causal de la marchitez del melón y registraron una disminución de la incidencia de un 45 % y mejoras en el peso fresco de las plantas de un 49 %.

Se han identificado muchas especies de *Trichoderma* como potenciales agentes de control biológico frente a más de cuarenta hongos fitopatógenos (Papavizas, 1985). Monte (2001) indica que esta capacidad es una característica muy estable ya que las especies estudiadas se reproducen sin recombinación genética. En los ensayos *in vitro* desarrollados en este trabajo se han podido observar algunos de los mecanismos de acción directos de *Trichoderma*. De acuerdo con Jiménez Díaz *et al.* (2010) los antibióticos y las enzimas que hidrolizan la pared celular de los hongos son los máximos responsables del efecto antagonista de *Trichoderma*. Se infiere que estos mecanismos, sumados a la capacidad de *Trichoderma* de generar resistencia sistémica inducida (ISR) en las plantas (mecanismos de acción indirectos), podrían explicar los resultados obtenidos. Se ha informado el control de una amplia gama de fitopatógenos, incluidos hongos, Oomycota, bacterias y virus a través de la inducción de resistencia por *Trichoderma* spp. (Harman *et al.*, 2004). Las plantas tienen un sistema inmune capaz de detectar dominios con rasgos estructurales conservados típicos de microorganismos, llamados patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PAMP o MAMP, respectivamente). Las respuestas de las

plantas desencadenadas por MAMP aparecen rápidamente e involucran flujos de iones a través de la membrana plasmática, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico, etileno y, más tarde, la deposición de calosa y la síntesis de compuestos antimicrobianos (Hermosa *et al.*, 2012). Ciertas proteínas que participan en la colonización de raíces por parte de *Trichoderma* pueden actuar como MAMP (Brotman *et al.*, 2008) y desencadenar respuestas frente al ataque de patógenos. Djonović *et al.* (2006) aislaron y caracterizaron una proteína denominada Sm1 que tiene la capacidad de activar ISR en plantas que se clasificó como un elicitor proteico que forma parte de las señales químicas y moleculares que activan las defensas durante la asociación simbiótica entre *T. virens* y las raíces de algodónero. Hermosa *et al.* (2012) mencionaron que probablemente las plantas desarrollaron quitinasas como mecanismo para censurar la quitina y liberar los polímeros activos de las paredes celulares de los hongos patógenos, que desencadenan respuestas de defensa. La actividad de las quitinasas de *Trichoderma* puede liberar quitooligosacáridos y contribuir indirectamente a la inducción de este mecanismo de defensa. Del mismo modo, ciertos metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma*, que ejercen un efecto antimicrobiano en dosis altas, actúan como MAMP y como compuestos similares a auxinas en concentraciones bajas. A 1 ppm, la 6-pentil- α -pirona, la harzianolida y la harzianopiridona activan los mecanismos de defensa de las plantas y regulan el crecimiento de las plantas en diversas especies vegetales (Vinale *et al.*, 2008). En estudios posteriores, será necesario evaluar los mecanismos de activación de los aislados de *Trichoderma* seleccionados.

f. Promoción de crecimiento

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el ensayo de promoción de crecimiento de seis variedades de calibrachoa con la aplicación de los cinco aislados de *Trichoderma* sp. preseleccionados como biocontroladores. Se presentan por variedad de calibrachoa, con todas las variables de crecimiento y desarrollo evaluadas. Las características del sustrato se muestran a continuación de las de las plantas. En todos los casos, los valores expresados corresponden a la última medición realizada.

Calibrachoa Pampa Salmón-INTA

En las Tablas 3.1.3.18 a 23 se observan el peso fresco y seco aéreo, el peso fresco y seco radical, el número de flores de calibrachoa Pampa Salmón-INTA y los parámetros fisicoquímicos del sustrato en respuesta a la aplicación de los aislados de *Trichoderma* sp. Las plantas tratadas con INTA IF-614 y especialmente INTA IF-549 mejoraron el peso fresco aéreo respecto del testigo y de la aplicación del aislado INTA IF-612.

Las plantas tratadas con *Trichoderma* INTA IF-612 presentaron el peso fresco aéreo más bajo, un 29 % menor al testigo. Estas y las plantas inoculadas con INTA IF-630 y 613, no presentaron diferencias estadísticas entre sí, pero se observó una tendencia por los antagonistas a incrementar el peso fresco aéreo. El aislado INTA IF-614 generó un aumento del peso fresco de las plantas del 85 % respecto del testigo. Por último, *Trichoderma* INTA IF-549 fue el aislado con mejor desempeño, que aumentó el peso fresco aéreo de las plantas un 113 %.

Tabla 3.1.3.18. Peso fresco aéreo de calibrachoa Pampa Salmón-INTA en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	Peso Fresco Aéreo (mg)*
INTA IF-612	1712,5 a
-	2444,2 b
INTA IF-630	3865,2 b
INTA IF-613	4320,7 b
INTA IF-614	4523,3 c
INTA IF-549	5210,5 d

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

En cuanto al peso seco aéreo de las plantas, la tendencia fue similar a la observada en el peso seco fresco. Las plantas tratadas con el aislado INTA IF-612 presentaron el peso seco más bajo con diferencias estadísticas con el testigo (26 %). Este último tratamiento junto con los aislados INTA IF-614 y 630, no difirieron entre sí, pero se observó una tendencia a aumentar el peso seco aéreo con la aplicación de *Trichoderma* sp. INTA IF-613 aumentó el peso seco de las plantas respecto del testigo sin *Trichoderma* sp. un 90 % e INTA IF-549 un 95 %. Estos dos últimos tratamientos evidenciaron un efecto promotor del crecimiento.

Tabla 3.1.3.19. Peso seco aéreo de calibrachoa Pampa Salmón-INTA en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	Peso Seco Aéreo (mg)*
INTA IF-612	297,7 a
-	403,3 b
INTA IF-614	629,4 b
INTA IF-630	631,0 b
INTA IF-613	766,2 c
INTA IF-549	787,1 d

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Respecto del peso fresco radical, no se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos pero se detectó que las plantas tratadas con aislados de *Trichoderma* sp. aumentaron el peso fresco de las raíces de calibrachoa Pampa Salmón-INTA.

Tabla 3.1.3.20. Peso fresco radical de calibrachoa Pampa Salmón-INTA en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	Peso Fresco Radical (mg)*
-	1722,7 a
INTA IF-614	1820,7 a
INTA IF-612	1910,5 a
INTA IF-630	1978,3 a
INTA IF-613	2044,0 a
INTA IF-549	2059,3 a

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Con respecto al peso seco radical, las plantas tratadas con los aislados INTA IF-612, 614, 549 y 630 no difirieron estadísticamente de las testigo pero tuvieron mayor peso. El aislado INTA IF-613 generó un aumento de peso respecto del testigo (45 %) y evidenció efecto promotor del crecimiento de las plantas de calibrachoa Pampa Salmón-INTA.

Tabla 3.1.3.21. Peso seco radical de calibrachoa Pampa Salmón-INTA en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	Peso Seco Radical (mg)*
-	120,2 a
INTA IF-612	127,2 a
INTA IF-614	128,1 a
INTA IF-549	146,7 a
INTA IF-630	147,7 a
INTA IF-613	174,1 b

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

En cuanto al número de flores, las plantas tratadas con el aislado INTA IF-612 generaron menor número que el testigo. Este último, al igual que los tratamientos INTA IF-614 y 549, no se diferenciaron estadísticamente pero se observó mayor número de flores en los tratamientos con *Trichoderma* sp. Los aislados INTA IF-630 y 613, aumentaron la producción de flores (67 y 74 % respectivamente) de manera significativa tanto frente a este último, como entre sí.

Tabla 3.1.3.22. Número de flores de calibrachoa Pampa Salmón-INTA en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	N° Flores*
INTA IF-612	2,0 a
-	2,7 b
INTA IF-614	3,2 b
INTA IF-549	4,3 b
INTA IF-630	4,5 c
INTA IF-613	4,7 d

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Las diferencias en el crecimiento de calibrachoa Pampa Salmón-INTA inoculada con *Trichoderma* sp. pueden observarse en la Figura 3.1.3.15.

Trichoderma INTA IF-630 disminuyó el pH del sustrato. Los pH en los tratamientos con INTA IF-614, 549 y 613 no se diferenciaron estadísticamente del testigo. El sustrato tratado con el aislado INTA IF-612 presentó un aumento en el pH del 5 %.



Figura 3.1.3.15. Plantas de calibrachoa Pampa Salmón-INTA luego de crecer en un sustrato enriquecidos con aislados de *Trichoderma* sp. A) Testigo; B) INTA IF-549; C) INTA IF-612; D) INTA IF-613; E) INTA IF-614 y; F) INTA IF-630 (Barra= 5 cm).

La conductividad eléctrica (CE) no mostró diferencias entre tratamientos. La cantidad de nitratos (NO_3^-) en el sustrato tampoco superó estadísticamente al testigo, pero fue notable la diferencia numérica producida por INTA IF-614, 613, 630. Con INTA IF-630 disminuyó el contenido de fósforo mientras se incrementó con la aplicación de INTA IF-549. El contenido de calcio fue similar entre los tratamientos testigo, INTA IF-549 y 613 y menor en los sustratos tratados con INTA IF-612 (42 %), 630 y 614. En cuanto al magnesio, los valores disminuyeron en los tratamientos con INTA IF-612, 630 y 614. Para el potasio, ningún tratamiento difirió del testigo, a excepción de INTA IF-612 que redujo el contenido un 36 %. La cantidad de hierro disminuyó con INTA IF-612, 630 y 614.

Tabla 3.1.3.23. Parámetros físicos y químicos del sustrato de calibrachoa Pampa Salmón-INTA en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Trichoderma</i> *	pH*	CE (dS/m)*	NO ₃ ⁻ *	P*	Ca*	Mg*	K*	Fe*
INTA IF-630	5,7 a	0,5 a	155,0 a	44,3 a	4,8 a	3,8 a	176,5 b	3,8 a
INTA IF-614	5,8 b	0,6 a	159,6 a	49,3 b	5,0 a	4,2 a	193,0 b	4,2 a
-	5,8 b	0,6 a	45,9 a	52,3 b	7,6 b	5,7 b	196,7 b	5,7 b
INTA IF-549	5,8 b	0,7 a	70,6 a	53,3 c	6,2 b	5,1 b	220,5 b	5,1 b
INTA IF-613	6,0 b	0,5 a	156,2 a	49,0 b	7,1 b	4,9 b	169,1 b	4,9 b
INTA IF-612	6,1 c	0,5 a	60,1 a	44,9 b	4,3 a	3,7 a	144,4 a	3,7 a

*Medias con una letra común dentro de cada columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Las unidades de los elementos analizados se expresan en mg del elemento/l de muestra húmeda.

Calibrachoa Overá Fucsia-INTA

En las Tablas 3.1.3.24, 25, 26, 27, 28 y 29 se observan el peso fresco aéreo, el peso seco aéreo, el peso fresco radical, el peso seco radical, el número de flores de calibrachoa Overá Fucsia-INTA y los parámetros fisicoquímicos del sustrato en respuesta a la aplicación de los aislados de *Trichoderma* sp.

El peso fresco aéreo de las plantas aumentó un 71,5 % con la aplicación del aislado INTA-IF 614. Para el resto de los tratamientos no se observaron diferencias con el testigo ($p > 0,05$), salvo una tendencia a aumentar el peso fresco aéreo con la aplicación de INTA IF-549 y 630.

Tabla 3.1.3.24. Peso fresco aéreo de calibrachoa Overá Fucsia-INTA en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	Peso Fresco Aéreo (mg)*
INTA IF-612	1828,2 a
INTA IF-613	2415,3 a
-	2807,2 a
INTA IF-549	2905,3 a
INTA IF-630	2987,3 a
INTA IF-614	4814,8 b

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

El peso seco aéreo de las plantas tuvo plena relación con lo observado en el peso fresco. El aislado INTA IF-614 generó un aumento de peso seco aéreo del 78 %.

Tabla 3.1.3.25. Peso seco aéreo de calibrachoa Overá Fucsia -INTA en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	Peso Seco Aéreo (mg)*
INTA IF-612	246,0 a
INTA IF-613	327,7 a
-	344,3 a
INTA IF-549	351,9 a
INTA IF-630	391,4 a
INTA IF-614	613,1 b

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Tanto el peso fresco como peso seco radical, no difirieron entre los tratamientos con o sin aplicación de microorganismos. En ambos casos hubo combinaciones de sustrato-*Trichoderma* sp. que disminuyeron (INTA IF-613 y 549) o aumentaron (INTA IF-614) su valor.

Tabla 3.1.3.26. Peso fresco radical de calibrachoa Overá Fucsia -INTA respuesta a la aplicación *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	Peso Fresco Radical (mg)*
INTA IF-613	802,7 a
INTA IF-549	920,7 a
INTA IF-630	1312,5 a
-	1432,7 a
INTA IF-614	1597,8 a
INTA IF-612	1705,2 a

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabla 3.1.3.27. Peso seco radical de calibrachoa Overá Fucsia -INTA en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	Peso Seco Radical (mg)*
INTA IF-613	59,3 a
INTA IF-549	62,4 a
INTA IF-612	77,5 a
-	78,2 a
INTA IF-630	89,4 a
INTA IF-614	104,1 a

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

En lo que respecta al número de flores, la aplicación del aislado INTA IF-614 de *Trichoderma* sp. mejoró la producción un 120 %, único tratamiento con respuesta diferente al testigo.

Tabla 3.1.3.28. Número de flores de calibrachoa Overá Fucsia -INTA en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	N° Flores*
INTA IF-613	1,5 a
INTA IF-549	2,0 a
-	2,8 a
INTA IF-630	3,0 a
INTA IF-612	3,5 a
INTA IF-614	6,2 b

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Las diferencias en el crecimiento de calibrachoa Overá Fucsia-INTA inoculada con *Trichoderma* sp. pueden observarse en la Figura 3.1.3.16.

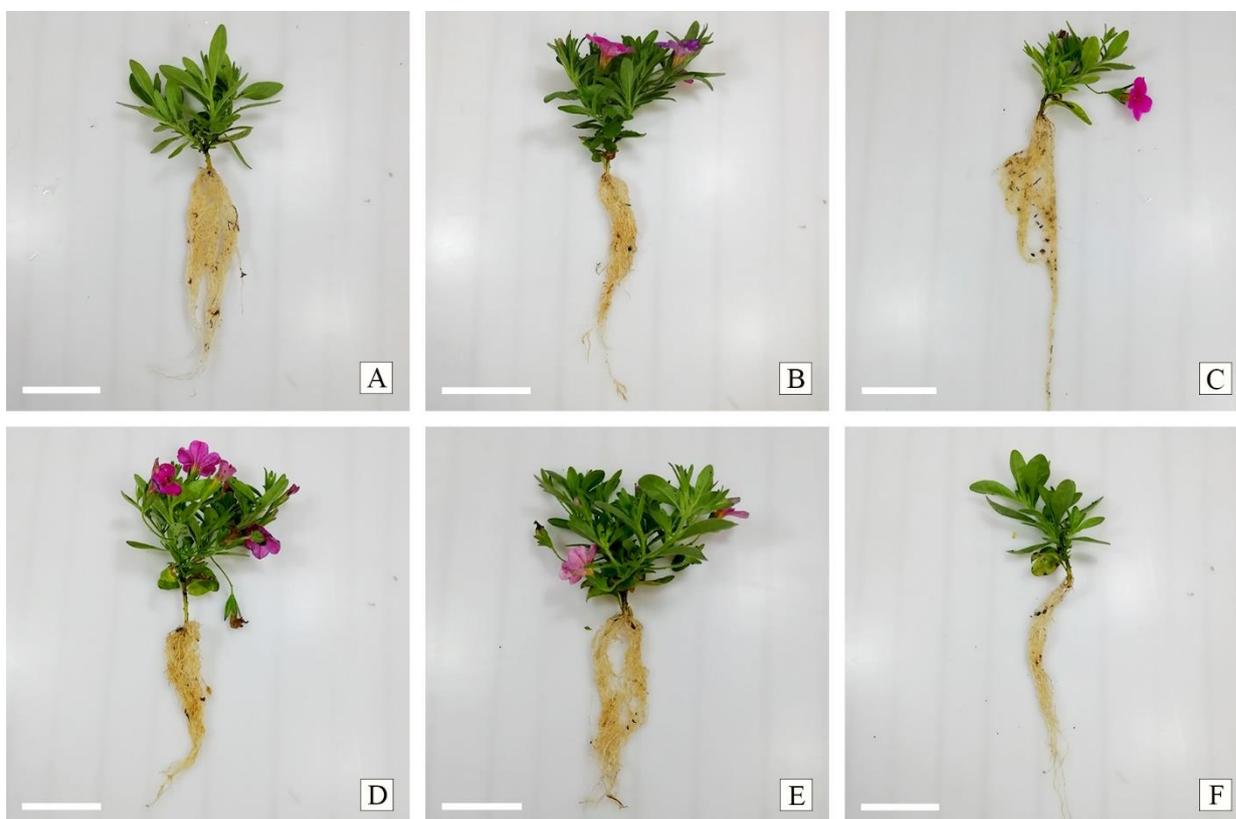


Figura 3.1.3.16. Plantas de calibrachoa Overá Fucsia-INTA luego de crecer en un sustrato enriquecidos con aislados de *Trichoderma* sp. A) Testigo; B) INTA IF-549; C) INTA IF-612; D) INTA IF-613; E) INTA IF-614 y; F) INTA IF-630 (Barra= 5 cm).

La interacción de los distintos aislados de *Trichoderma* sp. con el sustrato y la variedad Overá Fucsia-INTA generó una disminución significativa del pH del sustrato. *Trichoderma* INTA IF-630 generó la mayor modificación al disminuir el pH un 7 %. Los valores de conductividad eléctrica se incrementaron con el agregado de los aislados de *Trichoderma* sp. Al igual que para el pH, INTA IF-630 generó los valores más elevados, un 75% superiores del testigo.

El contenido de nitratos fue afectado por los distintos aislados de *Trichoderma* sp. INTA IF-612, 613, 549 y 630 lo aumentaron significativamente con alzas entre 115 (INTA IF-613) y 143 % (INTA IF-630). En cuanto al contenido de fósforo del sustrato, el aislado INTA IF-612 lo aumentó un 26 %. El sustrato con la aplicación del aislado INTA IF-614 obtuvo el menor registro, pero sin significancia estadística.

Para la variable calcio, todas las aplicaciones de *Trichoderma* sp. dieron lugar a aumentos del calcio en el sustrato, con excepción de INTA IF-613. Los valores más elevados se registraron luego de la aplicación de INTA IF-612, que superó al testigo en un 293 %. La cantidad de magnesio en el sustrato se modificó significativamente por la aplicación de los aislados INTA IF-613, 549, 612 y 630, que generaron aumentos de entre un 58 y un 227 %. La aplicación de INTA IF-614 no difirió estadísticamente del testigo pero tuvo resultados superiores a este último.

Los valores de potasio en los sustratos analizados aumentaron de manera significativa mediante la aplicación de los aislados de *Trichoderma* sp. INTA IF-549, 612, 613 y 630, mientras que INTA IF-614 no generó diferencias con el testigo.

Al analizar los aislados de *Trichoderma* sp. que aumentaron los valores de potasio en el sustrato, puede observarse 20 % (INTA IF-549), 26 y 31 % (INTA IF-612 y 613) y 39 % (INTA IF-630). Por último, las cantidades de hierro fueron similares estadísticamente entre todos los aislados de *Trichoderma* sp. y el testigo, excepto para INTA IF-612 que los disminuyó, con tendencia general de la aplicación de *Trichoderma* sp. a disminuir dicho valor.

Tabla 3.1.3.29. Parámetros físicos y químicos del sustrato de calibrachoa Overá Fucsia-INTA en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	pH*	CE (dS/m)*	NO ₃ ⁻ *	P*	Ca*	Mg*	K*	Fe*
INTA IF-630	4,4 a	0,7 c	495,9 b	52,8 a	8,0 b	6,6 c	214,4 d	13,6 b
INTA IF-612	4,5 b	0,6 b	401,4 b	63,1 b	8,2 b	6,5 c	194,5 c	6,9 a
INTA IF-549	4,5 b	0,6 b	445,3 b	52,5 a	6,9 b	5,3 b	184,0 b	13,3 b
INTA IF-613	4,5 b	0,6 b	439,5 b	53,5 a	3,0 a	4,6 b	202,0 c	17,2 b
INTA IF-614	4,6 b	0,5 a	277,6 a	47,1 a	7,2 b	3,4 a	152,8 a	12,9 b
-	4,7 c	0,4 a	204,0 a	49,9 a	2,8 a	2,9 a	153,7 a	19,6 b

*Medias con una letra común para cada columna no son significativamente diferentes (p > 0,05).
Las unidades de los elementos analizados se expresan en mg/l de sustrato húmedo.

Calibrachoa INTA 06575

En las Tablas 3.1.3.30 a 35 se observa el peso fresco aéreo, el peso seco aéreo, el peso fresco radical, el peso seco radical, el número de flores de calibrachoa INTA 06575 y los parámetros fisicoquímicos de los sustratos para los distintos tratamientos.

El peso fresco aéreo de las plantas se mantuvo sin diferencias con el testigo para todos los tratamientos con *Trichoderma* sp., excepto para INTA IF-612 que generó 55 % de merma. En el

resto de los casos, al margen de no detectarse diferencias estadísticas, el agregado de microorganismos aumentó el peso fresco aéreo hasta un 40 % (INTA IF-549). La misma tendencia pudo observarse para el caso del peso seco aéreo.

Tabla 3.1.3.30. Peso fresco aéreo de calibrachoa INTA 06575 en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	Peso Fresco Aéreo (mg)*
INTA IF-612	1763,2 a
-	3177,3 b
INTA IF-613	3641,3 b
INTA IF-630	3965,8 b
INTA IF-614	4079,5 b
INTA IF-549	4448,7 b

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabla 3.1.3.31. Peso seco aéreo de calibrachoa INTA 06575 en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	Peso Seco Aéreo (mg)*
INTA IF-612	246,2 a
-	414,6 b
INTA IF-613	423,3 b
INTA IF-630	550,9 b
INTA IF-614	565,7 b
INTA IF-549	613,4 b

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Respecto del peso fresco radical, se observó una tendencia a la disminución de la variable con la aplicación de los aislados de *Trichoderma* sp. INTA IF-613 (33 %), 612 (45 %), 549 (50 %) y 614 (67 %). En cuanto al aislado INTA IF-630, si bien no existieron diferencias estadísticas con el testigo, disminuyó el peso de las plantas de calibrachoa INTA 06575. Igual tendencia fue observada en la variable peso seco radical.

Tabla 3.1.3.32. Peso fresco radical de calibrachoa INTA 06575 en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	Peso Fresco Radical (mg)*
INTA IF-614	788,7 a
INTA IF-549	1068,3 a
INTA IF-612	1179,7 a
INTA IF-613	1423,8 a
INTA IF-630	1879,5 b
-	2123,7 b

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabla 3.1.3.33. Peso seco radical de calibrachoa INTA 06575 en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	Peso Seco Radical (mg)*
INTA IF-613	65,6 a
INTA IF-614	74,4 a
INTA IF-612	76,2 a
INTA IF-549	80,2 a
INTA IF-630	134,5 b
-	148,5 b

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Para el número de flores, sólo un aislado de *Trichoderma* (INTA IF-630) logró mejorar la producción en un 43 %. En el resto de los casos, la aplicación de *Trichoderma* sp. no tuvo diferencias estadísticas frente al testigo, con tendencia a disminuir el número de flores.

Tabla 3.1.3.34. Número de flores de calibrachoa INTA 06575 en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	N° Flores*
INTA IF-613	0,5 a
INTA IF-549	1,3 a
INTA IF-614	2,0 a
INTA IF-612	2,0 a
-	2,7 a
INTA IF-630	3,8 b

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Las diferencias en el crecimiento de calibrachoa INTA 06575 inoculada con *Trichoderma* sp. pueden observarse en la Figura 3.1.3.17.



Figura 3.1.3.17. Plantas de calibrachoa INTA 06575 luego de crecer en un sustrato enriquecidos con aislados de *Trichoderma* sp. A) Testigo; B) INTA IF-549; C) INTA IF-612; D) INTA IF-613; E) INTA IF-614 y; F) INTA IF-630 (Barra= 5 cm).

El pH del sustrato disminuyó significativamente con la aplicación de todos los aislados de *Trichoderma* sp.. Se obtuvieron mermas de 7 % (INTA IF-630) hasta 3 % (INTA IF-614). En cuanto a la conductividad eléctrica, todos los tratamientos con *Trichoderma* sp. aumentaron los valores a excepción del aislado INTA IF-614 que se mantuvo agrupado con el testigo. En el caso de INTA IF-630, se observaron aumentos del 75 %.

En cuanto a los nitratos la tendencia en la respuesta fue similar a la conductividad. Los tratamientos con los aislados de *Trichoderma* sp. INTA IF-612, 613, 549 y 630 aumentaron los valores en el sustrato entre 97 % y 143 % respecto del testigo. Este último se mantuvo sin diferencias significativas respecto del tratamiento INTA IF-614. Los valores de fósforo se mantuvieron más estables con la aplicación de los distintos aislados de *Trichoderma* sp. y solo se encontró un caso (INTA IF-613) con aumentos del 26 %.

En cuanto al calcio, todos los aislados de *Trichoderma* sp., excepto INTA IF-613, aumentaron los valores del catión en el sustrato entre un 146 (INTA IF-549) y un 193 % (INTA IF-612). Respecto del magnesio, todas las *Trichoderma* sp. aumentaron su valor de manera significativa entre 59 (INTA IF-613) y 127 % (INTA IF-630), excepto al aislado INTA IF-614 que se mantuvo sin diferencias con el testigo. El potasio presentó una tendencia similar a la del magnesio. Todos los

tratamientos, excepto el aislado INTA IF-614 aumentaron significativamente su contenido con un máximo para el tratamiento INTA IF-630 de 39 % de aumento.

Por último, el contenido de hierro del sustrato no difirió entre, excepto para el aislado INTA IF-612 que fue inferior al resto. La tendencia fue similar a la observada para las interacciones calibrachoa-*Trichoderma* sp. previas, en donde la aplicación de microorganismos redujo los niveles de hierro del sustrato.

Tabla 3.1.3.35. Parámetros físicos y químicos del sustrato de calibrachoa INTA 06575 en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	pH*	CE (dS/m)*	NO ₃ ⁻ *	P*	Ca*	Mg*	K*	Fe*
INTA IF-630	4,4 a	0,7 c	495,9 b	52,8 a	8,0 b	6,6 c	214,4 d	13,6 b
INTA IF-612	4,5 b	0,6 b	401,4 b	63,1 b	8,2 b	6,5 c	194,5 c	6,9 a
INTA IF-549	4,5 b	0,6 b	445,3 b	52,5 a	6,9 b	5,3 b	184,0 b	13,3 b
INTA IF-613	4,5 b	0,6 b	439,5 b	53,5 a	3,0 a	4,6 b	202,0 c	17,2 b
INTA IF-614	4,6 b	0,5 a	277,6 a	47,1 a	7,2 b	3,4 a	152,8 a	12,9 b
-	4,7 c	0,4 a	204,0 a	49,9 a	2,8 a	2,9 a	153,7 a	19,6 b

*Medias con una letra común para cada columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Las unidades de los elementos analizados se expresan en mg del elemento/l de muestra húmeda.

Calibrachoa Blanca

En las Tablas 3.1.3.36 a 41 se observa el peso fresco aéreo, el peso seco aéreo, el peso fresco radical, el peso seco radical, el número de flores de calibrachoa Blanca y los parámetros fisicoquímicos de los sustratos para los distintos tratamientos.

De similar modo que en las combinaciones calibrachoa-*Trichoderma* sp. ya mencionadas, el peso fresco aéreo de las plantas tratadas con el aislado INTA IF-612 disminuyó un 27 % respecto del testigo. Los aislados INTA IF-630, 549 y 614 aumentaron el peso fresco aéreo, pero sin evidenciar diferencias estadísticas significativas. Por último, la aplicación del aislado INTA IF-613 aumentó el peso fresco aéreo de las plantas un 113 % respecto del testigo.

Tabla 3.1.3.36. Peso fresco aéreo de calibrachoa Blanca en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	Peso Fresco Aéreo (mg)*
INTA IF-612	1297,0 a
-	1783,8 b
INTA IF-630	2837,2 b
INTA IF-549	2940,2 b
INTA IF-614	3324,3 b
INTA IF-613	3802,7 c

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Respecto del peso seco aéreo la tendencia fue similar al peso fresco aéreo. La aplicación del aislado INTA IF-612 lo disminuyó un 22 % con respecto al testigo. Para los aislados INTA IF-549 y 630 no se observaron diferencias significativas con este último, si bien aumentaron los valores de peso seco aéreo. La aplicación del aislado INTA IF-613 aumentó significativamente el peso de las plantas (87 %) y e INTA IF-614 un 102 % respecto del testigo.

Tabla 3.1.3.37. Peso seco aéreo de calibrachoa Blanca en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	Peso Seco Aéreo (mg)*
INTA IF-612	173,9 a
-	224,5 b
INTA IF-549	381,1 b
INTA IF-630	383,6 b
INTA IF-613	420,5 c
INTA IF-614	453,2 d

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Todos los tratamientos con aplicación de *Trichoderma* sp. aumentaron el peso fresco radical de las plantas, los aislados INTA IF-612, 630, 549 y 614 hasta un 33 % y el aislado INTA IF-613 sobresalió al generar un aumento del 64 % respecto del testigo.

Tabla 3.1.3.38. Peso fresco radical de calibrachoa Blanca en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	Peso Fresco Radical (mg)*
-	977,2 a
INTA IF-612	989,0 b
INTA IF-630	1202,7 b
INTA IF-549	1224,7 b
INTA IF-614	1299,7 b
INTA IF-613	1608,3 c

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

En cuanto al peso seco radical, la aplicación de INTA IF-612 lo disminuyó un 24 %. INTA IF-630, 549 y 613, si bien generaron valores superiores respecto del testigo, no presentaron diferencias significativas y la aplicación del aislado INTA IF-614 lo aumentó un 37 %.

Tabla 3.1.3.39. Peso seco radical de calibrachoa Blanca en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	Peso Seco Radical (mg)*
INTA IF-612	50,7 a
-	66,7 b
INTA IF-630	83,1 b
INTA IF-549	85,5 b
INTA IF-613	91,1 b
INTA IF-614	91,7 c

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Respecto del número de flores, INTA IF-612 lo disminuyó un 20 %. Los tratamientos INTA IF-630, 614 y 613, si bien lo aumentaron, no alcanzaron a generar diferencias significativas. Por último, la aplicación de INTA IF-549 generó un incremento del 55 %.

Tabla 3.1.3.40. Número de flores de calibrachoa Blanca en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	N° Flores*
INTA IF-612	3,2 a
-	4,0 b
INTA IF-630	4,3 b
INTA IF-614	5,3 b
INTA IF-613	5,3 b
INTA IF-549	6,2 c

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Las diferencias en el crecimiento de calibrachoa Blanca inoculada con *Trichoderma* sp. pueden observarse en la Figura 3.1.3.18.

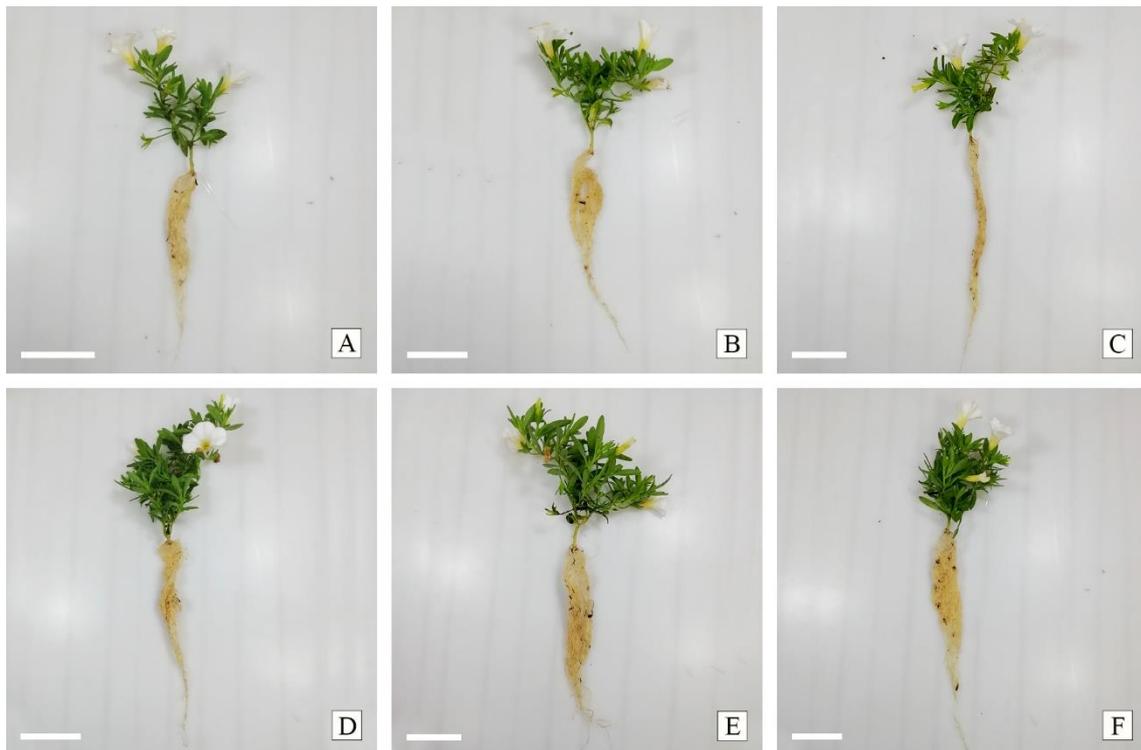


Figura 3.1.3.18. Plantas de calibrachoa Blanca luego de crecer en un sustrato enriquecidos con aislados de *Trichoderma* sp. A) Testigo; B) INTA IF-549; C) INTA IF-612; D) INTA IF-613; E) INTA IF-614 y; F) INTA IF-630 (Barra= 5 cm).

En cuanto al valor de pH del, los aislados INTA IF-614 y 612 mantuvieron niveles similares al testigo mientras que INTA IF-549, 630 y 613 lo disminuyeron levemente. En relación con la

conductividad eléctrica, el aislado INTA IF-614 la disminuyó, INTA IF-612 no difirió del testigo, INTA IF-613 y 630 la aumentaron en un 20 % e INTA IF-549 superó al testigo en un 40 %.

Respecto del contenido de nitratos, el efecto del aislado INTA IF-614 no se diferenció estadísticamente del testigo, pero determinó una media superior. El resto de los aislados produjo medias estadísticamente superiores al testigo con el valor más elevado tras la aplicación INTA IF-549 (227 %). Los valores de fósforo del sustrato también se modificaron luego de la aplicación de los diferentes aislados de *Trichoderma* sp. INTA IF-614 y 612 lo disminuyeron alrededor de 10 %, INTA IF-630 no difirió estadísticamente con el testigo, INTA IF-549 e INTA IF-613 lo aumentaron 8 y 21 % respectivamente.

Con respecto al calcio, los aislados INTA IF-549 y 613 aumentaron el contenido un 25 %, INTA IF-630 un 221 % e INTA IF-614 generó el mayor incremento con un 254 %. El contenido de magnesio del sustrato aumentó 93, 100 y 162 % luego de la aplicación de INTA IF-613, 630 y 549 respectivamente.

En cuanto al potasio, solo un aislado (INTA IF-630) aumentó su contenido en el sustrato y superó en un 20 % al testigo. INTA IF-614, 549 y 613 a pesar de que superaron en valor al testigo, esas diferencias no fueron estadísticamente significativas. El tratamiento INTA IF-612 redujo los valores de potasio en un 43 %.

Por último, la aplicación de *Trichoderma* sp. redujo la cantidad de hierro en el sustrato. El testigo presentó los valores de Fe más elevados. Los aislados INTA IF-612, 549 y 614 generaron disminuciones del 15 al 70 % e INTA IF-613 y 630 redujeron los niveles de hierro alrededor de diez veces.

Tabla 3.1.3.41. Parámetros físicos y químicos del sustrato de calibrachoa Blanca en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	pH*	CE (dS/m)*	NO ₃ *	P*	Ca*	Mg*	K*	Fe*
INTA IF-549	4,6 a	0,7 d	473,3 e	58,9 c	2,9 b	6,3 c	163,4 b	9,3 c
INTA IF-630	4,7 a	0,6 c	410,9 d	54,4 b	7,7 c	5,8 b	198,9 c	3,2 b
INTA IF-613	4,7 a	0,6 c	340,3 c	66,0 d	3,0 b	5,6 b	183,7 b	3,1 a
INTA IF-614	5,0 b	0,4 a	174,8 a	48,7 a	8,5 d	2,9 a	147,0 b	13,9 c
-	5,0 b	0,5 b	144,6 a	54,6 b	2,4 a	2,9 a	165,1 b	32,0 d
INTA IF-612	5,1 b	0,5 b	279,1 b	49,2 a	2,4 a	2,7 a	93,5 a	27,3 c

*Medias con una letra común para cada columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Las unidades de los elementos analizados se expresan en mg del elemento/l de muestra húmeda.

Calibrachoa Amarilla

En las Tablas 3.1.3.42 a 47 se observa el peso fresco aéreo, el peso seco aéreo, el peso fresco radical, el peso seco radical, el número de flores de calibrachoa y los parámetros fisicoquímicos de los sustratos en respuesta a la aplicación de los aislados de *Trichoderma* sp.

Todos los tratamientos con *Trichoderma* sp. aumentaron el peso fresco aéreo de las plantas respecto del testigo desde un 43 % (INTA IF-630) hasta un 87 % (INTA IF-549), excepto INTA IF-612 que no se diferenció del testigo.

Tabla 3.1.3.42. Peso fresco aéreo de calibrachoa Amarilla en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

<u>Aislamiento de <i>Trichoderma</i></u>	<u>Peso Fresco Aéreo (mg)*</u>
-	2717,5 a
INTA IF-612	2766,2 a
INTA IF-630	3895,8 b
INTA IF-614	4303,8 b
INTA IF-613	5042,3 b
INTA IF-549	5085,7 b

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

El peso seco aéreo tuvo la misma tendencia que el mencionado anteriormente: INTA IF-612 no se diferenció del tratamiento testigo, y el resto de los tratamientos con *Trichoderma* sp. con mejoras significativas entre un 56 % para INTA IF-614 y un 98 % para INTA IF-613 respecto del testigo.

Tabla 3.1.3.43. Peso seco aéreo de calibrachoa Amarilla en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

<u>Aislamiento de <i>Trichoderma</i></u>	<u>Peso Seco Aéreo (mg)*</u>
INTA IF-612	322,7 a
-	366,6 a
INTA IF-614	570,5 b
INTA IF-630	590,9 b
INTA IF-549	711,5 b
INTA IF-613	724,8 b

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

En cuanto al peso fresco radical, ningún tratamientos con aplicación de *Trichoderma* sp. tuvo diferencias estadísticas significativas con el testigo ($p > 0,05$). Al margen se observó una tendencia de aumento de peso con la aplicación de microorganismos, a excepción del aislado INTA IF-614 que disminuyó el peso.

Tabla 3.1.3.44. Peso fresco radical de calibrachoa Amarilla en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	Peso Fresco Radical (mg)*
INTA IF-614	1657,8 a
-	1826 a
INTA IF-612	1921,2 a
INTA IF-613	2026,2 a
INTA IF-549	2135,7 a
INTA IF-630	2378,8 a

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

En el peso seco radical se repitió la tendencia antes mencionada. Los tratamientos con aplicación de *Trichoderma* sp. mejoraron la variable en todos los casos, pero sin diferencias estadísticas significativas con el testigo. Los mayores registros los obtuvo la aplicación del aislado INTA IF-613, con un 40 % de aumento.

Tabla 3.1.3.45. Peso seco radical de calibrachoa Amarilla en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	Peso Seco Radical (mg)*
-	114,0 a
INTA IF-612	114,4 a
INTA IF-614	118,9 a
INTA IF-630	153,0 a
INTA IF-549	156,4 a
INTA IF-613	159,7 a

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Respecto del número de flores, las plantas tratadas con INTA IF-614 produjeron la menor cantidad y las tratadas con INTA IF-613 la mayor, un 50 % superior al testigo.

Tabla 3.1.3.46. Número de flores de calibrachoa Amarilla en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	N° Flores*
INTA IF-614	3,2 a
INTA IF-612	3,7 b
-	3,8 b
INTA IF-630	4,2 b
INTA IF-549	4,8 b
INTA IF-613	5,7 c

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Las diferencias en el crecimiento de calibrachoa Amarilla inoculada con *Trichoderma* sp. pueden observarse en la Figura 3.1.3.19.



Figura 3.1.3.19. Plantas de calibrachoa Amarilla luego de crecer en un sustrato enriquecidos con aislados de *Trichoderma* sp. A) Testigo; B) INTA IF-549; C) INTA IF-612; D) INTA IF-613; E) INTA IF-614 y; F) INTA IF-630 (Barra= 5 cm).

En cuanto al pH del sustrato, no se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos, pero pudo detectarse una tendencia de los aislados de *Trichoderma* sp. a disminuirlo. Respecto de la conductividad eléctrica, no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos, pero se observó para los sustratos tratados con *Trichoderma* sp. un ligero aumento, con valores máximos para los inoculados con INTA IF-612.

Los nitratos en sustratos tratados con INTA IF-612 y 613 aumentaron 48 y 90 % respectivamente. En cuanto al fósforo, INTA IF-549 disminuyó su contenido y para el resto de los tratamientos se observó una tendencia a aumentarlo. Respecto del calcio, el sustrato inoculado con INTA IF-613 superó al testigo en un 183 % y para el resto de los aislados la tendencia fue a aumentar el contenido del catión en el sustrato. Para el magnesio se observó la misma tendencia.

En el caso del potasio, se observó que a excepción del aislado INTA IF-549, el resto de los tratamientos con aplicación de *Trichoderma* sp. aumentaron su cantidad en el sustrato respecto del testigo, pero sin diferencias estadísticas significativas. Para el hierro la aplicación de *Trichoderma* sp. disminuyó su cantidad en el sustrato, siguiendo la tendencia del resto de las combinaciones calibrachoa-*Trichoderma* sp., pero sin diferencias estadísticas significativas.

Tabla 3.1.3.47. Parámetros físicos y químicos del sustrato de calibrachoa Amarilla en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	pH*	CE (dS/m)*	NO₃⁻*	P*	Ca*	Mg*	K*	Fe*
INTA IF-612	4,4 a	0,8 a	645,2 b	69,8 b	5,9 a	11,7 a	244,0 a	16,0 a
INTA IF-613	4,6 a	0,7 a	500,9 b	64,5 b	15,3 b	6,5 a	230,1 a	22,7 a
INTA IF-630	4,6 a	0,7 a	162,0 a	62,0 b	7,9 a	5,6 a	234,4 a	23,6 a
INTA IF-614	4,7 a	0,7 a	223,9 a	62,8 b	7,6 a	5,5 a	207,9 a	15,9 a
INTA IF-549	4,7 a	0,6 a	173,3 a	33,4 a	6,7 a	5,0 a	155,6 a	18,5 a
-	4,7 a	0,6 a	339,2 a	54,2 b	5,4 a	4,1 a	186,9 a	24,3 a

*Medias con una letra común para cada columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).
Las unidades de los elementos analizados se expresan en mg del elemento/l de muestra húmeda.

Calibrachoa Violeta

En las Tablas 3.1.3.48 a 53 se presenta el peso fresco aéreo, el peso seco aéreo, el peso fresco radical, el peso seco radical, el número de flores de calibrachoa Violeta y los parámetros fisicoquímicos de los sustratos en respuesta a la aplicación de los aislados de *Trichoderma* sp. Todos los tratamientos con aplicación de *Trichoderma* sp. incrementaron el peso fresco aéreo de manera significativa, excepto INTA IF-612. INTA IF-613 lo aumentó un 153 % respecto del testigo.

Tabla 3.1.3.48. Peso fresco aéreo de calibrachoa Violeta en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	Peso Fresco Aéreo (mg)*
-	1475,2 a
INTA IF-612	1656,8 a
INTA IF-630	2671,2 b
INTA IF-614	3110,2 b
INTA IF-549	3139,3 b
INTA IF-613	3482,8 b

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Respecto del peso seco aéreo, todos los tratamientos presentaron diferencias significativas con el testigo. El aislado INTA IF-612 lo aumentó un 10 %, INTA IF-630 un 74 %, INTA IF-614 un 120 %, INTA IF-549 un 130 % e INTA IF-613 un 139 %.

Tabla 3.1.3.49. Peso seco aéreo de calibrachoa Violeta en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	Peso Seco Aéreo (mg)*
-	212,7 a
INTA IF-612	235,2 b
INTA IF-630	371,0 c
INTA IF-614	471,4 c
INTA IF-549	489,5 d
INTA IF-613	509,6 e

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Para la variable peso fresco radical, si bien todos los tratamientos con aplicación de *Trichoderma* sp. generaron aumentos de su valor, no se evidenciaron diferencias a nivel estadístico.

Tabla 3.1.3.50. Peso fresco radical de calibrachoa Violeta en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	Peso Fresco Radical (mg)*
-	662,7 a
INTA IF-549	683,5 a
INTA IF-612	771,5 a
INTA IF-613	797,7 a
INTA IF-630	798,7 a
INTA IF-614	848,5 a

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

La respuesta de la variable peso seco de la raíz siguió igual tendencia que el peso fresco, pero con evidencia estadística de las diferencias. INTA IF-612 lo aumentó un 24 % e INTA IF-614 lo aumentó un 50 %, con la menor y mayor promoción del crecimiento radical en el ensayo.

Tabla 3.1.3.51. Peso seco radical de calibrachoa Violeta en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	Peso Seco Radical (mg)*
-	42,6 a
INTA IF-612	52,9 b
INTA IF-630	60,8 b
INTA IF-613	62,2 b
INTA IF-549	63,7 b
INTA IF-614	64,1 b

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

En cuanto a la producción de flores, el aislado INTA IF-612 disminuyó su cantidad (30 %). Las plantas inoculadas con INTA IF-630, 614 y 549 no registraron diferencias estadísticas con el testigo a pesar de que aumentaron la cantidad de flores. Por último, INTA IF-613 incrementó un 58 % la producción de flores respecto del testigo.

Tabla 3.1.3.52. Número de flores de calibrachoa Violeta en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	N° Flores*
INTA IF-612	2,8 a
INTA IF-630	3,0 b
INTA IF-614	3,5 b
-	4,0 b
INTA IF-549	5,2 b
INTA IF-613	6,3 c

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Las diferencias en el crecimiento de calibrachoa Violeta inoculada con *Trichoderma* sp. pueden observarse en la Figura 3.1.3.20.

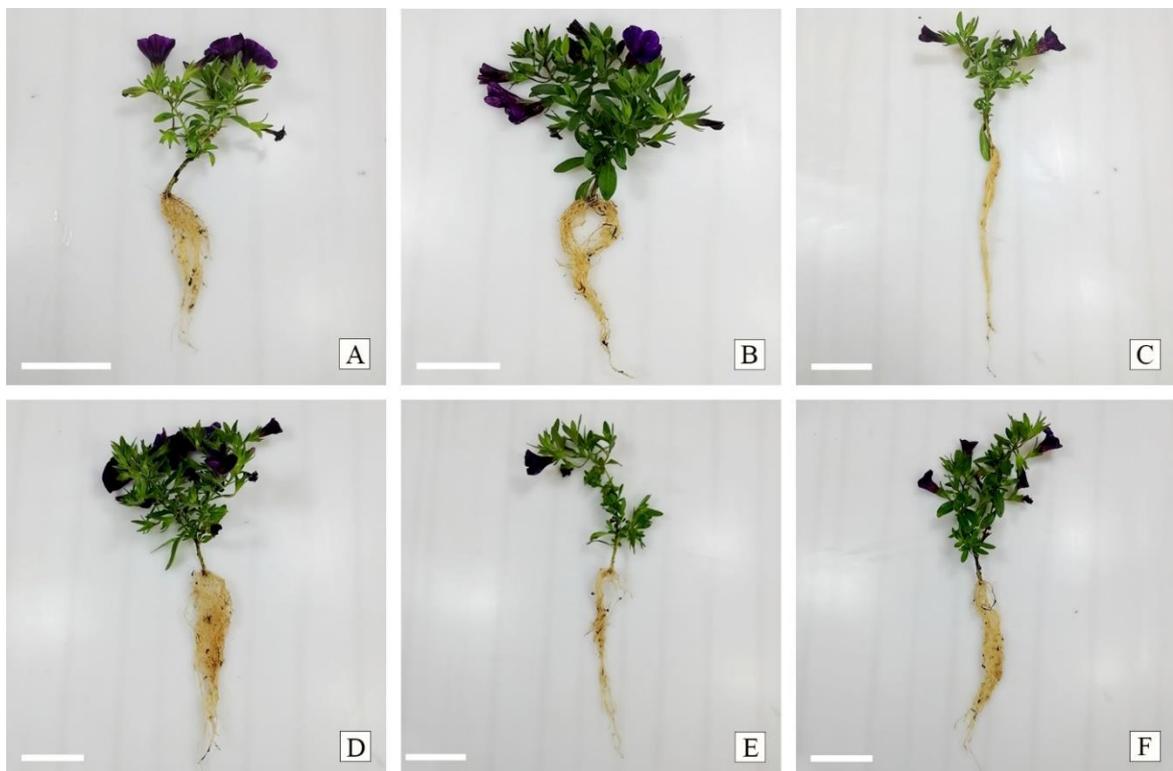


Figura 3.1.3.20. Plantas de calibrachoa Violeta luego de crecer en un sustrato enriquecidos con aislados de *Trichoderma* sp. A) Testigo; B) INTA IF-549; C) INTA IF-612; D) INTA IF-613; E) INTA IF-614 y; F) INTA IF-630 (Barra= 5 cm).

En lo que respecta a los parámetros fisicoquímicos bajo estudio del sustrato, los distintos aislados de *Trichoderma* sp. modificaron significativamente sus valores.

El aislado INTA IF-613 acidificó el pH del sustrato un 12 %. En cuanto a los aislados INTA IF-614 y 630, se observó un 6 % de disminución. Los aislados INTA IF-549 y 612 si bien disminuyeron el pH, los resultados no fueron significativos. La conductividad eléctrica también estuvo afectada por la aplicación de *Trichoderma* sp. al sustrato, el aislado INTA IF-614 la aumentó un 62 % e INTA IF-614 y 630 lo hicieron en un 20 %.

En cuanto a los nitratos, si bien todos los aislados (excepto INTA IF-612) aumentaron la cantidad de este nutriente en el sustrato, sólo las respuestas a la aplicación de INTA IF-630 y 613 se diferenciaron estadísticamente del testigo, con aumentos del 80 %. Los niveles de fósforo en el sustrato también se vieron modificados por la acción de *Trichoderma* sp. en todos los tratamientos, excepto INTA IF-549. INTA IF-613 e INTA IF-614 aumentaron la disponibilidad del nutriente entre un 44 % y 19 % respectivamente.

En cuanto a los niveles de calcio, la aplicación de los aislados INTA IF-613 y 630 produjo aumentos de entre un 259 y un 137 %. En el resto de los casos no se observaron diferencias estadísticas, pero la aplicación de INTA IF-614 y 549 aumentó la cantidad de calcio en el sustrato. Respecto de los niveles de magnesio, la aplicación de *Trichoderma* sp. aumentó la cantidad del nutriente en todos los casos, pero solo se observaron diferencias significativas con la aplicación de INTA IF-613 (214 %).

Para el potasio, la aplicación de los aislados INTA IF-614, 630 y 613 generó diferencias estadísticas frente al testigo y aumentó los niveles del nutriente en el sustrato entre un 21 y un 49 %. Para el caso del hierro, la tendencia fue similar a la interacción observada en todas las variedades de calibrachoa evaluadas anteriormente. La aplicación de *Trichoderma* sp. disminuyó los niveles del nutriente en el sustrato de manera significativa, con diferencias de un 13 (INTA IF-612) hasta un 540 % (INTA IF-630) respecto del testigo.

Tabla 3.1.3.53. Parámetros físicos y químicos del sustrato de calibrachoa Violeta en respuesta a la aplicación de *Trichoderma* sp.

Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	pH*	CE (dS/m)*	NO ₃ ⁻ *	P*	Ca*	Mg*	K*	Fe*
INTA IF-613	4,6 a	0,8 c	316,0 b	88,6 c	11,5 c	8,8 b	274,4 c	8,5 b
INTA IF-630	4,8 b	0,6 b	316,0 b	62,0 a	7,6 b	5,5 a	218,0 b	4,7 a
INTA IF-614	4,8 b	0,6 b	210,0 a	73,1 b	5,4 a	4,4 a	222,0 b	20,2 b
INTA IF-549	4,9 c	0,5 a	249,7 a	56,9 a	5,2 a	3,7 a	175,3 a	14,8 b
INTA IF-612	5,0 c	0,5 a	175,2 a	63,7 a	3,2 a	3,0 a	197,3 a	26,2 b
Testigo	5,1 c	0,5 a	175,8 a	61,4 a	3,2 a	2,8 a	183,6 a	30,1 c

*Medias con una letra común para cada columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Las unidades de los elementos analizados se expresan en mg del elemento/l de muestra húmeda.

En los ensayos desarrollados se comprobó la capacidad de los distintos aislados de *Trichoderma* sp. para promover el crecimiento de las variedades de calibrachoa. Una tendencia en la respuesta se repitió en algunas combinaciones calibrachoa-*Trichoderma* sp., pero, en líneas generales, cada interacción planta-microorganismo fue particular.

En resumen, el aislado INTA IF-613 mejoró en nueve ocasiones alguna variable (peso seco radical y número de flores en Pampa Salmón-INTA; peso fresco aéreo y radical en Blanca; peso seco aéreo y número de flores en Amarilla y Violeta), seguido por INTA IF-549 (peso fresco y seco

aéreo en Pampa Salmón-INTA; peso fresco aéreo en INTA 06575; número de flores en Blanca; peso fresco aéreo en Amarilla), INTA IF-614 (peso fresco y seco aéreo y número de flores en Overa Fucsia-INTA; peso seco aéreo en Blanca; peso seco radical en Violeta), INTA IF-630 (peso fresco y seco radical y número de flores en INTA 06575;) y por último INTA IF-612 que disminuyó las variables respecto del testigo en diez ocasiones (peso fresco y seco aéreo y número de flores en Pampa Salmón-INTA; peso fresco y seco aéreo en INTA 06575; peso fresco y seco aéreo, peso seco radical y número de flores en Blanca; número de flores en Violeta).

En lo que respecta a la modificación de parámetros fisicoquímicos del sustrato, los resultados también fueron variables, pero se pudieron detectar algunas tendencias. En cuanto al pH, INTA IF-630 lo acidificó en dos oportunidades e INTA IF-613 lo hizo en una. El aislado INTA IF-612 aumentó el pH del medio en dos ocasiones o fue idéntico al testigo. Respecto de la conductividad eléctrica, los aislados INTA IF-630, 549 y 613 generaron conductividades superiores al resto. En cuanto a la disponibilidad de nitratos, los sustratos tratados con los aislados INTA IF-614, 549, 613 y 630 favorecieron una mayor cantidad de este compuesto. Respecto del fósforo, los aislados INTA IF-549, 613 y 612 aumentaron su cantidad. La disponibilidad de calcio en el sustrato fue incrementada cuando se agregaron los aislados INTA IF-613, 614 y 612. En relación al magnesio, la aplicación de los aislados INTA IF-549, 613 y 614 dio lugar a mayor cantidad de nutriente en el sustrato. Respecto del potasio, los aislados INTA IF-630, 613 y 549 aumentaron su disponibilidad. Por último, el hierro en el sustrato fue incrementado por los aislados INTA IF-612 y 549 y se obtuvieron menores cantidades respecto del testigo con la aplicación de los aislados INTA IF-613 y 630.

La variabilidad de los resultados expuestos coincide con la observada por varios grupos de investigación que han demostrado que la mejora en el crecimiento vegetal luego de las aplicaciones de *Trichoderma* sp. es dependiente de la especie de la planta y también del genotipo (variedad) (Baker, 1988; Ousley *et al.*, 1994). Es importante comprender que no es posible realizar generalizaciones sobre la actividad de un aislado frente a diversos cultivos, ya que cada interacción es muy específica.

La presencia de *Trichoderma* spp. en la rizosfera establece una relación benéfica que estimula el crecimiento de las plantas y puede generar un mejor comportamiento frente a condiciones de estrés biótico y abiótico (Harman *et al.*, 2004; Shores *et al.*, 2010; Jiménez, 2011; Keswani *et al.*, 2014) por la producción de ciertos metabolitos (Sutton y Peng, 1993). Un requisito importante para que estos efectos puedan establecerse contempla la colonización exitosa de las raíces (Harman *et al.*, 2004; Moran-Diez *et al.*, 2009; Shores *et al.*, 2010; Hermosa *et al.*, 2012; Rubio *et al.*, 2014). Las hifas se adhieren a las raíces por medio de hidrofobinas que protegen sus extremos de los compuestos de defensa de las plantas (Viterbo y Chet, 2006). Estas

reaccionan a la invasión de *Trichoderma* mediante la síntesis y acumulación de compuestos antimicrobianos. Así, la capacidad para colonizar las raíces depende en gran medida de la tolerancia de cada cepa a estos compuestos (Hermosa *et al.*, 2012). Su ingreso a la raíz queda restringido a las capas celulares superficiales. Allí, *Trichoderma* produce pequeñas cantidades de enzimas hidrolíticas de la pared celular que facilitan el ingreso (Yedidia *et al.*, 1999). Según estudios desarrollados por Vargas *et al.* (2009) con *T. virens* en cultivos de maíz, el metabolismo de la sacarosa tuvo un papel relevante en las interacciones planta-*Trichoderma* en la rizosfera. La actividad de una invertasa intracelular fue clave para el control de la colonización de raíces. La capacidad de las especies de *Trichoderma* para usar la sacarosa en el citosol puede haber surgido de la coevolución de ambos organismos, lo que resultó en una relación de comensalismo. El aumento de la actividad de destino en las raíces representó una mayor demanda de fotoasimilados y una mayor tasa de transporte de sacarosa desde las hojas. También se bloqueó la inhibición que ejercen los azúcares en la retroalimentación, lo cual indujo al aumento del proceso fotosintético, a una mayor fijación de CO₂ y al aumento de la producción fotoquímica de energía. Este bloqueo de la inhibición del proceso fotosintético mediado por la demanda de sustancias carbonadas por parte de *Trichoderma* podría ser una de las causas del mayor crecimiento de las plantas asociadas a estos microorganismos. Además, el efecto fitoestimulante de *Trichoderma* se ha atribuido a varias causas directas e indirectas que incluyen la liberación de sustancias con actividad de auxina (indol-3-acetaldehído, indol-3-carboxaldehído e indol-3-etanol), pequeños péptidos y compuestos orgánicos volátiles que mejoran la arquitectura del sistema radicular y la asimilación/solubilización de macro (P) y micronutrientes (Fe, Mn y Zn) (Harman, 2000; Howell, 2003; Harman *et al.*, 2004; Lorito *et al.*, 2010; Hermosa *et al.*, 2012; Lorito y Woo, 2015). La promoción del crecimiento inducida por *Trichoderma* durante las primeras etapas de interacción con la planta podría atribuirse principalmente a compuestos orgánicos volátiles, más que a la liberación de auxinas u otros compuestos difusibles. La exposición a compuestos orgánicos volátiles producidos por especies de *Trichoderma* aumenta el contenido de clorofila y la biomasa de las plantas, lo que podría estar relacionado con una mayor capacidad de exploración del suelo, un mejor enraizamiento y una mayor absorción de nutrientes y agua (Hung *et al.*, 2013; Contreras-Cornejo *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016; Nieto-Jacobo *et al.*, 2017).

Tucci *et al.* (2011) evaluaron la promoción del crecimiento de plantas de tomate de diferentes genotipos mediada por dos cepas de *Trichoderma*. Se registraron aumentos de peso seco aéreo de las plantas de hasta un 158 % con ambas cepas y para todos los genotipos. Respecto de la altura de las plantas y el peso seco radical los resultados variaron según las combinaciones entre la cepa de *Trichoderma* y el genotipo de tomate. Los casos donde disminuyó el crecimiento se

explicaron por un alteración en las vías de transducción auxina-citoquinina. Algo similar pudo haber ocurrido con el aislado INTA IF-612 en el presente estudio. Tucci *et al.* (2011) relacionaron la síntesis de ácido indol-3-acético y metabolitos secundarios con efecto similar a la auxina con la promoción del crecimiento vegetal. Atribuyeron las diferencias de respuesta a la capacidad genética de las plantas para atraer y sostener la colonización de raíces por parte del hongo, por una diferente sensibilidad a los efectores producidos por *Trichoderma* o por una variabilidad en la percepción y transducción de señales de cualquiera de las hormonas implicadas.

Yedidia *et al.* (2001) estudiaron el efecto de un aislado de *T. harzianum* en el crecimiento de plantas de pepino y en la absorción de minerales en un sistema hidropónico aséptico para independizarse de la acción de posibles patógenos. Cinco días después de la inoculación, se encontraron aumentos en la longitud de la raíz (45 %), la longitud de los brotes (60 %), el peso seco de los brotes (40 %) el peso seco de las raíces (24 %), el área de la primera y segunda hoja (40% y 150%), el número de puntas de raíces (30 %), el área de raíces (37 %) y la longitud acumulada de raíces (24 %). Se registró un aumento significativo en los niveles de Ca, P, Fe, Zn, Cu, Na y Mn en las raíces y de Zn, Mn, Cu y P en los brotes de las plantas inoculadas con *T. harzianum*. Si bien en los presentes estudios no se cuantificaron los nutrientes en las plantas de calabrochó, las observaciones de Yedidia *et al.* (2001) podrían explicar algunos de los resultados. Chang *et al.* (1986) estudiaron el efecto de un aislado de *Trichoderma harzianum* en plantas de petunia (*Petunia hybrida* V.), crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* R.) y vinca (*Vinca minor* L.). En petunia, la aplicación de *Trichoderma* mejoró significativamente el peso fresco y seco de las plantas y el número de ramificaciones sin mejorar la cantidad de flores. En cuanto al crisantemo, la aplicación de *Trichoderma* mejoró todas las variables anteriormente mencionadas además de la altura de las plantas. Para el caso de las vincas, la aplicación mejoró la altura de las plantas.

Tal como se observó en este apartado, la aplicación de ciertos aislados de *Trichoderma* disminuyó el pH del sustrato. Las especies de *Trichoderma* suelen crecer mejor en condiciones ácidas con un óptimo a pH entre 4 y 6 y pueden modificar el pH de la rizosfera (Trushina *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2014). Su capacidad para reducir el pH mediante la producción de ácidos orgánicos ha sido reportada por varios autores (Promwee, 2014; Li *et al.*, 2015; Gaiind, 2016; Alori *et al.*, 2017). Otros autores indican que cuentan con capacidades para descomponer materia orgánica, secuestrar cationes y liberar diversos nutrientes lo que implica que muchos de estos se encuentren en formas disponibles para las plantas (Cunningham y Kuiack, 1992; Vera *et al.*, 2002; Howell, 2003; Valero, 2007; Azarmi *et al.*, 2011). Según Sofo *et al.* (2012) y Pelagio-Flores *et al.* (2017) la regulación del pH en la rizosfera pareciera ser un factor importante en la estimulación del crecimiento de las plantas. La modificación de la acidez del ambiente radicular

influye en la producción de compuestos hormonales activos en diversos procesos genómicos y funcionales.

Según Harman (2011), el uso de *Trichoderma* podría reducir las cantidades de fertilizantes nitrogenados utilizados entre un 40 y un 50 % sin disminuir el rendimiento de los cultivos. En estudios realizados por Harman (2000) en maíz con aplicaciones de distintas dosis de nitrógeno aportado como nitrato de amonio encontraron que, en combinación con *T. harzianum* (T22), los rendimientos máximos en granos y en silaje se obtenían con aportes de un 38 % de nitrógeno menos que los testigos sin microorganismos. El autor menciona que existe una mejor eficiencia en el uso del nitrógeno mediada por *Trichoderma*. Según Singh (2018), *Trichoderma* generaría un aumento en el contenido de nitrógeno en la planta y, consecuentemente, mayor rendimiento mediado por la activación de la enzima nitrato reductasa involucrada en la reducción de nitratos a nitritos. Además, la interacción *Trichoderma*-planta genera una mayor cantidad de raíces laterales, lo que permitiría una mayor eficiencia en el uso de nitrógeno.

Altomare *et al.* (1999), investigaron la capacidad de *T. harzianum* (T22) para solubilizar, *in vitro*, minerales insolubles o poco solubles por acidificación del medio. La cepa acidificó el medio de cultivo, pero la acidificación no fue el principal mecanismo de solubilización de roca fosfórica y de hierro (Fe_2O_3) ya que se desarrolló a valores de pH ligeramente ácidos a alcalinos. Además, no se detectaron ácidos orgánicos en los filtrados del medio de cultivo. Los autores afirman que el P podría solubilizarse y almacenarse en la biomasa de *Trichoderma* para liberarse en una forma fácilmente disponible en las proximidades de las raíces después de la lisis del micelio con la edad. En lo que respecta al hierro, detectaron quelatos en los medios de cultivo, los que pondrían este nutriente a disposición de las plantas. Li *et al.* (2015) en un estudio *in vitro* detectaron que un aislado *T. harzianum* tenía la capacidad de solubilizar Fe_2O_3 mediante múltiples mecanismos que implicaban quelación, reducción de Fe^{3+} y acidificación. Además, indicaron que la solubilización de fosfato por parte de *Trichoderma* podía ser mediada por redox, quelación (producción de sideróforos) e hidrólisis (actividad de fitasa). El proceso de quelación de hierro podría explicar la disminución de la cantidad de hierro en el sustrato en los tratamientos con aplicación de *Trichoderma*.

Singh *et al.* (2014) estudiaron el efecto de dos aislados de *T. harzianum* para mejorar la germinación y crecimiento de plantas de tomate y observaron que las plantas tratadas con algún aislado de *Trichoderma* acumulaban mayores cantidades de macro (N, P, K, Mg Y Ca) y micronutrientes (Zn, Mn, Cu y Fe). Los autores indicaron que la capacidad de acidificar el medio y solubilizar los nutrientes por liberación de diversos ácidos orgánicos producto del metabolismo de *Trichoderma*, podría darle a las plantas la capacidad de absorber mayor cantidad de nutrientes. Del mismo modo, Azarmi *et al.* (2011) obtuvieron plantas de tomate con mayor

contenido de calcio, magnesio, potasio, sodio y fósforo luego de exponer semillas y plántulas a tres aislados de *Trichoderma*. Los autores coinciden con los anteriormente mencionados en lo que respecta los mecanismos de solubilización de nutrientes.

g. Identificación taxonómica

Tal como se mencionó previamente, la caracterización taxonómica de *Trichoderma* sp. se realizó para un número reducido de aislados destacados en las diferentes pruebas hasta aquí desarrolladas. La información generada permitió alcanzar un nivel de certeza sobre la pertenencia de los aislados al género *Trichoderma*. En la Tabla 3.1.3.54 se detallan las mediciones de conidios, hifas y fiálides de los aislados INTA IF-549, 612, 613, 614 y 630. En la Tabla 3.1.3.55 se observa para cada aislado el código de acceso al NCBI por gen y el porcentaje de identidad obtenido al realizar la comparación con el banco de genes (BLASTn). En la Figura 3.1.3.21 están detalladas todas las características previamente mencionadas. Por último, en la Figura 3.1.3.22 se presenta el árbol filogenético resultado del análisis conjunto de los genes ITS y TEF1 α de los aislados INTA IF-549, 612, 613, 614 y 630 cruzados con la base de datos generada. Para los aislados INTA IF-549, 612 y 630 puede observarse que tanto mediante la herramienta BLASTn como en el árbol filogenético ($p \leq 0,01$ y $ESS > 200$ en todos los casos) existió un grado de similitud con *T. longibrachiatum*. En el caso del BLASTn, en todos los casos los porcentajes de identidad superaron el 97 % para ambos genes. Los valores de probabilidad (bootstraps) de que los aislados mencionados se identifiquen como *T. longibrachiatum* no son elevados para INTA IF-549 y 630 (0,56) pero sí para INTA IF-612 (0,93). Complementariamente, las características morfobiométricas coincidieron con las descripciones de Bissett (1984) y Samuels *et al.* (2012) para *T. longibrachiatum* con lo cual es posible afirmar que existe homología entre los aislados bajo evaluación y la especie propuesta.

El análisis realizado para los aislados INTA IF-613 y 614 también fue global con toda la información adquirida y mediante el uso de la herramienta BLASTn se obtuvieron porcentajes de identidad superiores al 99 % con la especie *T. koningiopsis*. Si se suman al análisis los datos obtenidos mediante la construcción del árbol filogenético, puede observarse que los aislados guardaron un grado elevado de similitud entre sí -ya que forman un grupo (0,88)- y que poseen un grado de parentesco elevado con varias especies de *Trichoderma* del grupo clado *Trichoderma* (1) entre las que se encuentra *T. koningiopsis*. Por último, el análisis de los caracteres morfobiométricos permitió encontrar coincidencia con las descripciones de *T. koningiopsis* realizadas por Samuels *et al.* (2006). La concomitancia de los datos fenotípicos y moleculares es importante ya que es parte de las tareas de verificación de la identificación

molecular realizada (Cai y Druzhinina, 2021). Según Lieckfeldt *et al.* (2002) los datos moleculares confirmaban la clasificación morfológica de *Trichoderma*; actualmente los datos morfológicos sirven de soporte y son requeridos para acompañar la información molecular.

Se observa en la Tabla 3.1.3.54 que los aislados fueron catalogados como *Trichoderma* sp. y que las secuencias subidas al NCBI se identificaron del mismo modo. La correcta identificación de una cepa de *Trichoderma* que presenta características deseables es muy importante, porque algunos de los beneficios y rasgos fisiológicos, ecológicos y modos de acción son típicos de ellas y necesarios para desarrollar todo su potencial en un producto comercial exitoso (Atanasova *et al.*, 2013). Los avances en la taxonomía de *Trichoderma* implican que las caracterizaciones moleculares se realicen con la información obtenida de tres genes (ITS, TEF1 α y rpb2) y no de dos, como fue realizado en este estudio. Así, las especies más estrechamente relacionadas de *Trichoderma* difieren en un 1 % (aproximadamente ocho mutaciones) de las secuencias de rpb2 y 3 % (aproximadamente 27 mutaciones) de las secuencias de TEF1 α (Cai y Druzhinina, 2021). Por lo tanto, no es posible concluir con total certeza que los aislados evaluados se correspondan con las especies propuestas hasta no ejecutar los análisis del gen RPB2. Actualmente, la utilización del gen TEF1 α es insuficiente para la identificación de *Trichoderma* a nivel de especie (Cai y Druzhinina, 2021).

Tabla 3.1.3.54. Características morfobiométricas de aislados de *Trichoderma*.

Aislado	Especie	Conidios (μ m)	Hifas (μ m)	Fiálides (μ m)
INTA IF-549	<i>Trichoderma</i> sp.	2,9 (4,0) 4,7 x 2,4 (3,0) 3,7	2,5 (4,3) 10,5	3,6 (6,9) 9,7 x 1,6 (3,1) 4,3
INTA IF-612	<i>Trichoderma</i> sp.	3,7 (4,3) 5,6 x 2,4 (2,9) 3,4	2,3 (4,5) 7,9	2,1 (6,1) 10,1 x 2,1 (2,6) 3,4
INTA IF-613	<i>Trichoderma</i> sp.	3,1 (3,8) 4,3 x 1,8 (2,5) 3,4	2,7 (5,7) 11,8	3,5 (7,5) 13,6 x 1,6 (2,5) 3,8
INTA IF-614	<i>Trichoderma</i> sp.	2,9 (3,6) 4,2 x 2,0 (2,5) 2,9	2,5 (4,8) 11,9	3,4 (6,1) 13,4 x 1,6 (2,4) 3,9
INTA IF-630	<i>Trichoderma</i> sp.	3,1 (4,1) 5,2 x 2,2 (2,9) 3,4	1,8 (3,3) 7,8	2,9 (5,9) 11,7 x 1,4 (2,3) 3,5

Tabla 3.1.3.55. Identificación molecular de aislados de *Trichoderma* mediante BLASTn del NCBI.

Aislado	Especie	Gen	BLAST	% Identidad	Código GeneBank
INTA IF-549	<i>Trichoderma</i> sp.	ITS	<i>T. longibrachiatum</i>	99,8	OP713788
INTA IF-549	<i>Trichoderma</i> sp.	TEF1 α	<i>T. longibrachiatum</i>	100	OP729506
INTA IF-612	<i>Trichoderma</i> sp.	ITS	<i>T. longibrachiatum</i>	97,1	OP713887
INTA IF-612	<i>Trichoderma</i> sp.	TEF1 α	<i>T. longibrachiatum</i>	100	OP748403
INTA IF-613	<i>Trichoderma</i> sp.	ITS	<i>T. koningiopsis</i>	99,8	OP714358
INTA IF-613	<i>Trichoderma</i> sp.	TEF1 α	<i>T. koningiopsis</i>	99,4	OP748404
INTA IF-614	<i>Trichoderma</i> sp.	ITS	<i>T. koningiopsis</i>	99,8	OP713914
INTA IF-614	<i>Trichoderma</i> sp.	TEF1 α	<i>T. koningiopsis</i>	99,7	OP748405
INTA IF-630	<i>Trichoderma</i> sp.	ITS	<i>T. longibrachiatum</i>	99,8	OP714088
INTA IF-630	<i>Trichoderma</i> sp.	TEF1 α	<i>T. longibrachiatum</i>	100	OP748406

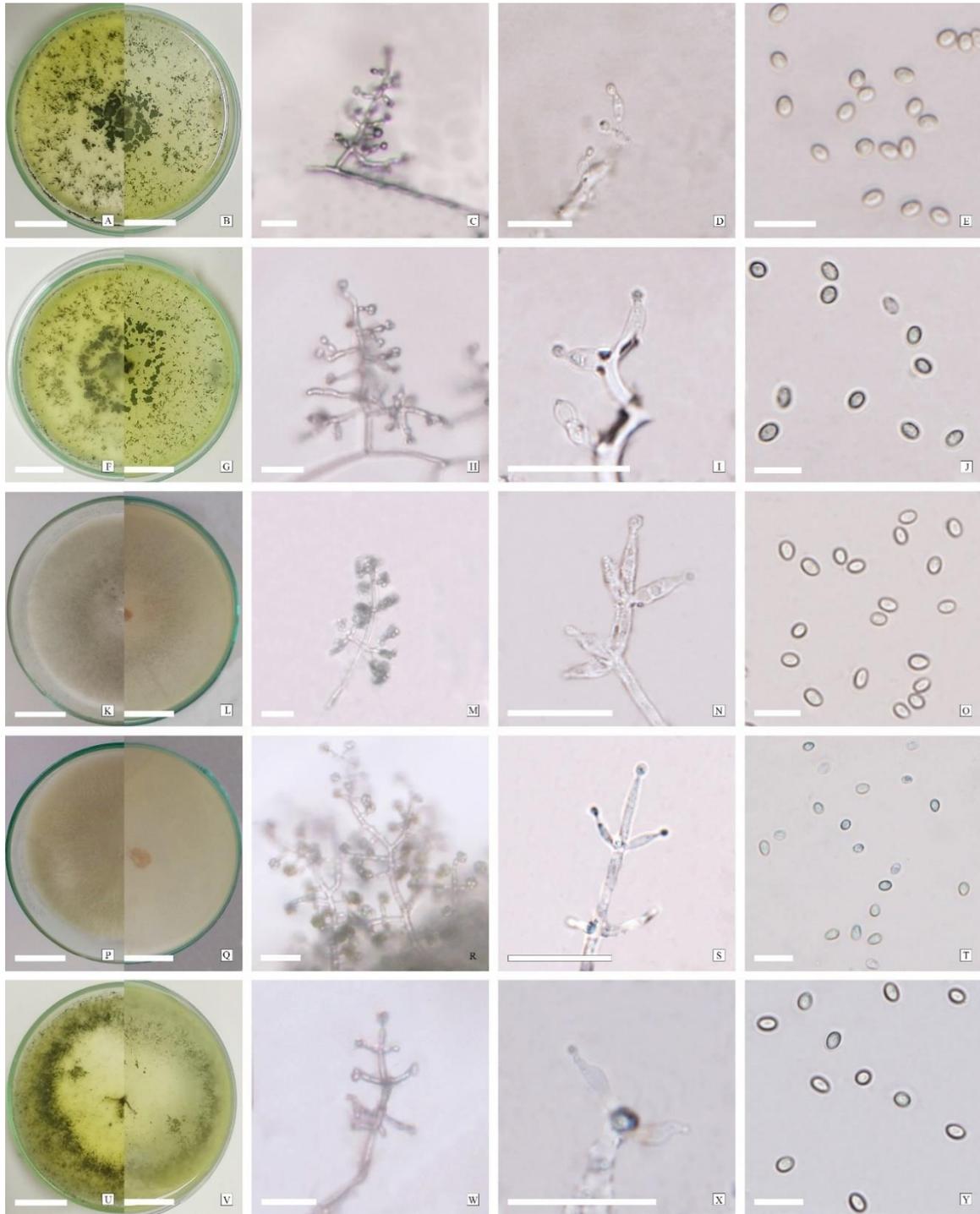


Figura 3.1.3.21. Detalle de colonias y estructuras reproductivas de *Trichoderma*. A) INTA IF-549 frente B) INTA IF-549 dorso; C) Conidióforos INTA IF-549; D) Fiálides INTA IF-549; E) Conidios INTA IF-549; F) INTA IF-612 frente; G) INTA IF-612 dorso; H) Conidióforos INTA IF-612; I) Fiálides INTA IF-612; J) Conidios INTA IF-612; K) INTA IF-613 frente; L) INTA IF-613 dorso; M) Conidióforos INTA IF-613; N) Fiálides INTA IF-613; O) Conidios INTA IF-613; P) INTA IF-614 frente; Q) INTA IF-614 dorso; R) Conidióforos INTA IF-614; S) Fiálides INTA IF-614; T) Conidios INTA IF-614; U) INTA IF-630 frente V) INTA IF-630 dorso; W) Conidióforos INTA IF-630; X) Fiálides INTA IF-630; Conidios INTA IF-630 (Barras A, B, F, G, K, L, P, Q, U y V= 2 cm; C, D, H, I, M, N, R, S, W y X= 20 μ m; E, J, O, T e Y= 10 μ m).

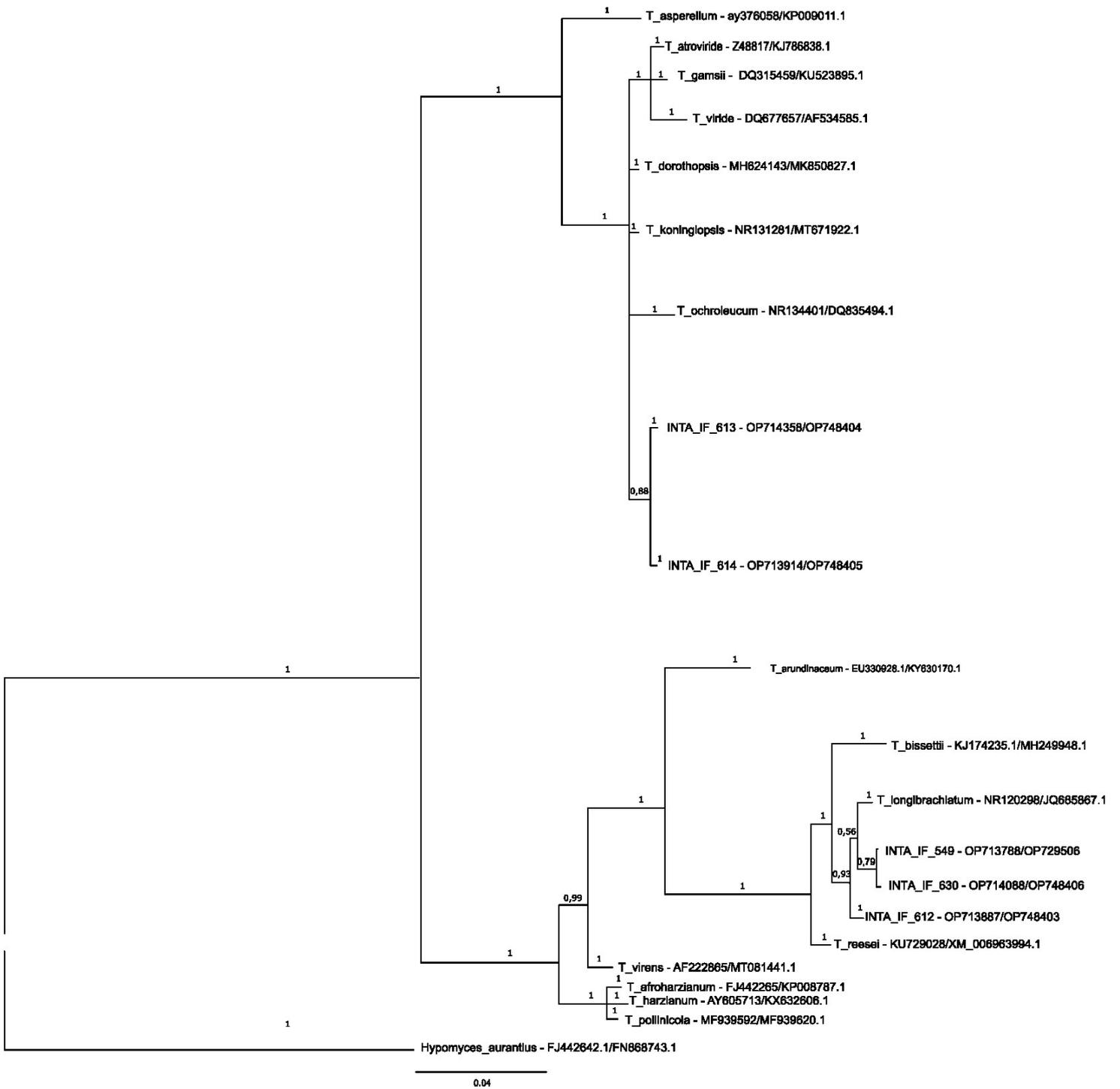


Figura 3.1.3.22. Árbol filogenético consenso de *Trichoderma* generado a partir de la información de los genes ITS y TEF1 α . Los números sobre las ramas indican la robustez del análisis, e implican la probabilidad de que las especies bajo estudio pertenezcan a un clado. Los códigos que acompañan a cada especie indican el número de acceso al NCBI para el gen ITS y TEF1 α respectivamente.

3.2. Conclusiones del capítulo

- A partir de 16 muestras de suelo se pudieron obtener 26 aislados de *Trichoderma* sp. que, sumados a los 12 preexistentes, conformaron una colección de 38 aislados.
- Los aislados INTA IF-549, 612, 613, 614 y 630 se preseleccionaron como controladores *in vitro* de dos aislados de *Fusarium proliferatum* patógenos de calibrachoa.
- Los aislados INTA IF-549, 612 y 630 poseen homología con *T. longibrachiatum* e INTA IF-613 y 614 con *T. koningiopsis*.
- Los aislados INTA IF-549, 612, 613, 614 y 630 mostraron una elevada capacidad de colonización del sustrato Z-Floricultura de Terrafertil®.
- Los aislados INTA IF-613 y 630 presentaron una elevada capacidad de biocontrol *in vivo* de *Fusarium proliferatum* INTA IF-535 y 536, mientras que INTA IF-614 expresó la capacidad de biocontrol más baja.
- El aislado INTA IF-613 fue el de mejor capacidad de promoción de crecimiento de las variedades de calibrachoa evaluadas, seguido por INTA IF-549 y 614 y luego INTA IF-630. El aislado INTA IF-612 disminuyó el crecimiento vegetal.

3.3. Bibliografía

- Alori ET, Glick BR, Babalola OO. 2017. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front. Microbiol.* 8(971): 1-8. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00971.
- Altomare C, Norvell WA, Bjorkman T, Harman G. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(7): 2926-2933. DOI: 10.1128/aem.65.7.2926-2933.1999.
- Atanasova L, Druzhinina IS, Jaklitsch WM. 2013. Two hundred *Trichoderma* species recognized on the basis of molecular phylogeny. En: Mukherjee PK, Horwitz BA, Singh US, Mukherjee M, Schmoll M (Eds.). *Trichoderma: biology and applications*. Oxfordshire, Reino Unido: CAB International.
- Azarmi R, Hajjehgari B, Giglou A. 2011 Effect of *Trichoderma* isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake. *Afr. J. Biotechnol* 10(31): 5850-5855. DOI: 10.5897/AJB10.1600.
- Baker R. 1988. *Trichoderma* spp. as plant-growth stimulants. *Crit. Rev. Microbiol.* 7: 97-106. DOI: 10.3109/07388558809150724.
- Barari H. 2016. Biocontrol of tomato *Fusarium* wilt by *Trichoderma* species under *in vitro* and *in vivo* conditions. *Cercet. Agron. Mold.* 1(165): 91-98. DOI: 10.1515/cerce-2016-0008.
- Bettiol W, Rivera MC, Mondino P, Montealegre JR, Colmenárez YC. 2014. Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Uruguay. 404 pp.
- Bissett J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Longibrachiatum sect. nov. *Can. J. Bot.* 62: 924-931.
- Bissett J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Intrageneric classification. *Can. J. Bot.* 69:2357-2372.
- Bissett J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section Pachybasium. *Can. J. Bot.* 69:2373-2417.
- Bissett J. 1991c. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section Longibrachiatum. *Can. J. Bot.* 69:2418-2420.
- Bissett J. 1992. *Trichoderma atroviride*. *Can. J. Bot.* 70:639-641.
- Bissett J, Gams W, Jaklitsch W, Samuels GJ. 2015. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA FUNGUS* 6(2): 263-295. DOI: 10.5598/imafungus.2015.06.02.02.
- Brewer D, Feicht A, Taylor A, Keeping JW, Taha AA, Thaller V. 1982. Ovine ill-thrift in Nova Scotia. 9. Production of experimental quantities of isocyanide metabolites of *Trichoderma hamatum*. *Can. J. Microbiol.* 28: 1252-1260. DOI: 10.1139/m82-186.

Brotman Y, Briff E, Viterbo A, Chet I. 2008. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol.* 147(2): 779–789. DOI: 10.1104/pp.108.116293.

Cai F y Druzhinina IS. 2021. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. *Fungal Divers.* 107: 1-69. DOI: 10.1007/s13225-020-00464-4.

Carrero-Carrón I, Rubio MB, Niño-Sánchez J, Navas-Cortés JA, Jiménez-Díaz RM, Monte E, Hermosa R. 2018. Interaction between *Trichoderma harzianum* and defoliating *Verticillium dahliae* in resistant and susceptible wild olive clones. *Plant Pathol.* 67: 1758-1767. DOI: 10.1111/ppa.12879.

Castrillo ML, Amerio NS, Bich GA, Villalba LL, Saparrat MCN, Zapata PD. 2019. *Trichoderma koningiopsis* pos7 es portador de genes codificantes de enzimas micolíticas implicadas en biocontrol. ReBIOS. XII Reunión Nacional Científico-Técnica de Biología de Suelos. Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. Argentina.

Chang YC, Chang YC, Baker R, Kleifeld O, Chet I. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis.* 70(2): 145-148. DOI: 10.1094/PD-70-145.

Chaverry P, Branco-Rocha F, Jaklitsch W, Gazis R, Degenkolb T, Samuels GJ. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia* 107(3): 558-590. DOI: 10.3852/14-147.

Chaverry P, Castlebury LA, Overton BE, Samuels GJ. 2003. *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia* 95(6): 1100-1140.

Chaverry P y Samuels GJ. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Stud. Mycol.* 48(48): 1-116.

Chet I. 1987, *Trichoderma*: application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. En: Chet I (Ed.). Innovative approaches to plant disease control. Wiley & Sons, New York. 372 pp.

Cholango Martinez LP. 2009. Selección de cepas de *Trichoderma* sp. *in vitro*, para el control de problemas radiculares en flores de verano. Tesis para optar por el título de Ingeniero Agropecuario. Escuela Politécnica del Ejercito, Checa, Ecuador.

Coats JH, Myer CE, Pyke TR. 1971. Antibiotic dermadin. US Patent 3,627,882 (Chem. Abstr. 1972, 76:84524).

Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez LI, Herrera-Estrella A, López- Bucio J. 2014. The 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* plays a role in plant protection against *Botrytis cinerea* through volatile organic compound emission. *Plant Soil.* 379: 261-274. DOI: 10.1007/s11104-014-2069-x.

Cubillos-Hinojosa J, Valero N, Mejía L. 2009. *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del Maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). *Agronomía Colombiana* 27(1): 81-86.

Cunningham JE, Kuiack C. 1992 Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. Appl. Environ. Microbiol. 58(5): 1451-1458. DOI: 10.1128/aem.58.5.1451-1458.1992.

Deacon JW, Berry A. 1992. Modes of action of mycoparasites in relation to biocontrol of soilborne plant pathogens. En: Tjamos EC, Papavizas GC, Cook RJ (Eds). Biological control of plant diseases. NATO ASI Series, Vol. 230. Springer, Boston, MA. DOI: 10.1007/978-1-4757-9468-7_17.

Degenkolb T, Dieckmann R, Fog Nielsen K, Gräfenhan T, Theis C, Zafari D, Chaverri P, Ismaiel A, Brückner H, Döhren H, Thrane U, Petrini O, Samuels GJ. 2008. The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. Mycol. Prog. 7(3): 177-219. DOI: 10.1007/s11557-008-0563-3.

Di Rienzo JA, Guzmán AW, Casanoves F. 2002. A multiple comparison method based on the distribution of the root node distance of a binary tree obtained by average linkage of the matrix of Euclidean distances between treatment means. JABES 7(2): 1-14. DOI: 10.1198/10857110260141193.

Djonović S, Pozo MJ, Dangott LJ, Howell CR, Kenerley CM. 2006. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. Mol. Plant Microbe Interact. 19(8): 838-853. DOI: 10.1094/MPMI-19-0838.

Dodd SL, Lieckfeldt E, Samuels GJ. 2003. *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. Mycologia 95(1): 27-40. DOI: 10.1080/15572536.2004.11833129.

Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, Mukherjee PK, Zeilinger S, Grigoriev S, Kubicek CP. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. Nat. Rev. Microbiol. 9: 749-759. DOI: 10.1038/nrmicro2637.

Dunham W, Dunham T. 2015. Evolution and future of biocontrol. X Annual Biocontrol Industry Meeting (abim), Basel, Switzerland.

Elad Y, Chet I, Henis Y. 1981. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. Phytoparasitica 9: 59-67.

Frascella A, Sarrocco S, Mello A, Venice F. 2022. Biocontrol of *Phytophthora xcambivora* on *Castanea sativa*: Selection of local *Trichoderma* spp. isolates for the management of ink disease. Forests 13(1065): 1-21. DOI: 10.3390/f13071065.

Fujiwara A, Okuda T, Masuda S, Shiomi Y, Miyamoto C, Sekine Y, Tazoe M, Fujiwara M. 1982. Fermentation, isolation and characterisation of isonitrile antibiotics. Agric. Biol. Chem. 46: 1803-1809.

Gaind S. 2016. Phosphate dissolving fungi: mechanism and application in alleviation of salt stress in wheat. Microbiol. Res. 193: 94-102. DOI: 10.1016/j.micres.2016.09.005.

Gajera H, Domadiya R, Patel S, Kapopara M, Golakiya B. 2013. Molecular mechanism of *Trichoderma* as biocontrol agents against phytopathogen system – A review. Curr. Res. Microbiol. Biotechnol. 1(4): 133-142.

Gams W, Bissett J. 2002. Morphology and identification of *Trichoderma*. En: Kubicek CP, Harman GE (Eds). *Trichoderma & Gliocladium*. Volumen 1. Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor & Francis, London. 293 pp.

Ghanbarzadeh B, Safaie N, Goltapeh EM. 2014. Antagonistic activity and hyphal interactions of *Trichoderma* spp. against *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* *in vitro*. Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz. 47(16): 1979-1987. DOI: 10.1080/03235408.2013.864506.

Ghisalberti EL y Sivasithamparam K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil Biol. Biochem. 23: 1011-1020. DOI: 10.1016/0038-0717(91)90036-J.

Grijalba PE, Devitto GA, Wright ER, López MV, de Defino OSF. 1992. Eficiencia antagónica *in vitro* y en invernáculo de *Trichoderma koningii* sobre *Colletotrichum dematium* var. *truncata*. Revista de la Facultad de Agronomía 13: 157-169.

Harman GE. 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T 22. Plant disease 84(4): 377-393. DOI: 10.1094/PDIS.2000.84.4.377.

Harman GE. 2011. *Trichoderma* - not just for biocontrol anymore. Phytoparasitica 39: 103-108. DOI: 10.1007/s12600-011-0151-y.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol. 2: 43-56. DOI: 10.1038/nrmicro797.

Hatvani L, Homa M, Chenthamara K, Cai F, Kocsubé S, Atanasova L, Mlinaric-Missoni E, Manikandan P, Revathi R, Dóczy L, Bogáts G, Narendran V, Büchner R, Vágvölgyi C, Druzhinina IS, Kredics L. 2019. Agricultural systems as potential sources of emerging human mycoses caused by *Trichoderma*: a successful, common phylotype of *Trichoderma longibrachiatum* in the frontline. FEMS Microbiol. Lett. 366: 1-13. DOI: 10.1093/femsle/fnz246.

Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology 158: 17-25. DOI: 10.1099/mic.0.052274-0.

Hjeljord L, Tronsmo A. 2005. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. En: Harman GE, Kubicek CP (Eds.). *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2: Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor & Francis, London. 365 pp.

Holmes KA, Schroers HJ, Thomas SE, Evans HC, Samuels GJ. 2004. Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America. Mycol. Prog. 3(2): 199-210. DOI: 10.1007/s11557-006-0090-z.

Howell CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: USDA/ARS south. Plains Agric. Res. Cent. 87(1): 1-7. DOI: 10.1094/PDIS.2003.87.1.4.

Hung R, Lee S, Bennett JW. 2013. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effects of *Trichoderma* volatile organic compounds. Fungal Ecol. 6: 19-26. DOI: 10.1016/j.funeco.2012.09.005.

Infante D, Martínez B, González N, Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Prot. Veg.* 24(1): 14-21. Recuperado de <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RPV/article/view/542>.

InfoStat (2007). Grupo de Estadística y Biometría. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba.

Jaklitsch WM. 2009. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Stud. Mycol.* 63: 1-91. DOI: 10.3114/sim.2009.63.01.

Jaklitsch WM, Samuels GJ, Dodd SL, Lu BS, Druzhinina IS. 2006. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Stud. Mycol.* 56: 135-177. DOI: 10.3114/sim.2006.56.04.

Jensen D y Wolffhechel H. 1995. The use of fungi, particularly *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* spp. to control root rot and damping diseases. En: Heikki M, Hokkanen T, James M (Eds.). *Biological control: benefits and risks*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 304 pp.

Jiménez C, Sanabria de Albarracín N, Altuna G, Alcano M. 2011. Efecto de *Trichoderma harzianum* (Rifai) sobre el crecimiento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). *Rev. Fac. Agron. Luz.* 28(1): 1-10. Recuperado de: <https://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/26862>.

Jiménez Díaz RM, Melgarejo P, Bonaterra A, Landa BB, Monte E, Montesinos Seguí E. 2010. Manejo integrado de enfermedades causadas por hongos. En: Jiménez Díaz RM, Montesinos Seguí E (Eds.). *Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. Naturaleza y control integrado*. Phytoma. España. 342 pp.

Joshi BB, Bhatt RP, Bahukhandi D. 2010. Antagonistic and plant growth activity of *Trichoderma* isolates of Western Himalayas. *J. Environ. Biol.* 31: 921-928.

Keswani C, Mishra S, Sarma B, Singh S, Singh H. 2014. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 533-544. DOI: 10.1007/s00253-013-5344-5.

Komon-Zelazowska M, Bissett J, Zafari D, Hatvani L, Manczinger L, Woo S, Lorito M, Kredics L, Kubicek CP, Druzhinina IS. 2007. Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in oyster mushroom farms worldwide. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(22): 7415-7426. DOI: 10.1128/AEM.01059-07.

Kubicek CP, Harman GE. 2002. *Trichoderma & Gliocladium*. Volumen 1. Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor & Francis, London. 293 pp.

Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels GJ, Kovacs W, Meyervii W, Petrini O, Gams W, Berner T, Kunicek CP. 1996. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7755-7760. DOI: 10.1073/pnas.93.15.7755.

Kullnig-Gradinger CM, Szakacs G, Kubicek CP. 2002. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycol. Res.* 106(7): 757-767. DOI: 10.1017/S0953756202006172.

- Lee CH, Chung MC, Lee HJ, Kho YH, Koshino H. 1995. MR-93A, a new oxazole from *Trichoderma harzianum* KCTC 0114BP. J. Nat. Prod. 58: 1605-1607. DOI: 10.1021/np50124a022.
- Lee S, Yap M, Behringer G, Hung R, Bennett JW. 2016. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. Fungal Biol. Biotechnol. 3(7): 1-14. DOI: 10.1186/s40694-016-0025-7.
- Li RX, Cai F, Pang G, Shen QR, Li R, Chen W. 2015. Solubilization of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. PLoS One 10(6): 1-16. DOI: 10.1371/journal.pone.0130081.
- Lieckfeldt E, Kuhls K, Muthumeenakshi S. 2002. Molecular taxonomy of *Trichoderma* and *Gliocladium* and their teleomorphs. En: Kubicek CP, Harman GE (Eds). *Trichoderma & Gliocladium*. Volumen 1. Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor & Francis, London. 293 pp.
- Lockwood JL. 1988. Evolution of concepts associated with soilborne plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 26: 93-121. DOI: 10.1146/annurev.py.26.090188.000521.
- Lorito M, Woo SL. 2015. *Trichoderma*: A multi-purpose tool for integrated pest management. En: Lugtenberg B. (Ed.). Principles of plant-microbe interactions. Springer International Publishing. Berlin, Alemania. 448 pp. DOI: 10.1007/978-3-319-08575-3_36.
- Lorito M, Woo SL, Harman GE, Monte E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. Annu. Rev. Phytopathol. 48: 395-417. DOI: 10.1146/annurev-phyto-073009-114314.
- Lorito M, Woo SL. 2015. *Trichoderma*: A multi-purpose tool for integrated pest management. En: Lugtenberg B. (Ed.). Principles of plant-microbe interactions. Springer International Publishing. Berlin, Alemania. 448 pp. DOI: 10.1007/978-3-319-08575-3_36.
- Marín-Guirao JI, Rodríguez-Romera P, Lupión-Rodríguez B, Camacho-Ferre F, Tello-Marquina JC. 2016. Effect of *Trichoderma* on horticultural seedlings' growth promotion depending on inoculum and substrate type. J. Appl. Microbiol. 121: 1095-1102. DOI: 10.1111/jam.13245.
- Markets and Markets 2022. Global biopesticide market Trends & Forecast (2022-2027). Recuperado de: https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biopesticides-267.html?gclid=CjwKCAjw8JKbBhBYEiwAs3sxN6fqi5uUQ7tizv8m7N9G3q5_nR7FXKpXP7a8joJV3yqDCh1QQq3TyBoCldwQAvD_BwE.
- Martínez B, Infante D, Reyes Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Revista de Protección Vegetal. 28: 1-11.
- Martínez-Álvarez P, Alves-Santos FM, Diez JJ. 2012. *In vitro* and *in vivo* interactions between *Trichoderma viride* and *Fusarium circinatum*. Silva Fenn. 46(3): 303-316. DOI: 10.14214/sf.42.
- Martínez-Medina A, Roldán A, Pascual JA. 2009. Performance of a *Trichoderma harzianum* bentonite-vermiculite formulation against *Fusarium* wilt in seedling nursery melon plants. HortScience 44(7): 2025-2027. DOI: 10.21273/HORTSCI.44.7.2025.
- Michel Aceves AC. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp. Euascomycetes: Hypocreales, su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes):

Hyphales). Tesis para optar por el título de Maestro en Ciencias en Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Colima, México. 176 pp.

Mishra, V.K. 2010. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against *Pythium aphanidermatum*. J. Phytopathol. 2: 28-35. Recuperado de: <https://updatepublishing.com/journal/index.php/jp/article/view/2172>.

Monte E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. Int. J. Microbiol. 4(1): 1-4. DOI: 10.1007/s101230100001.

Moran-Diez E, Hermosa R, Ambrosio P, Cardoza RE, Gutiérrez S, Lorito M, Monte E. 2009. The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*-plant beneficial interaction. Mol. Plant Microbe Interact. 22: 1021-1031. DOI: 10.1094/MPMI-22-8-1021.

Nagy V, Seidl V, Szakacs G, Komon-Zelazowska M, Kubicek CP, Druzhinina IS. 2007. Application of DNA barcodes for screening of industrially important fungi: the haplotype of *Trichoderma harzianum* sensu stricto indicates superior chitinase formation. Appl. Environ. Microbiol. 73(21): 7048-7058. DOI: 10.1128/AEM.00995-07.

Ngo MT, Van Nguyen M, Han JW, Park MS, Kim H, Choi GJ. 2021. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of sorbicillinoids produced by *Trichoderma longibrachiatum*. J. Fungi 7(428): 1-14. DOI: 10.3390/jof7060428.

Nieto-Jacobo MF, Steyaert JM, Salazar-Badillo FB, Nguyen DV, Rostás M, Braithwaite M, De Souza JT, Jimenez-Bremont JF, Ohkura M, Stewart A, Mendoza-Mendoza A. 2017. Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. Front. Plant Sci. 8(102): 1-18. DOI: 10.3389/fpls.2017.00102.

Osorio JA, Martínez EP, Hío JC. 2012. Screening of microbial culture filtrates, plant extracts and fungicides for control of mango anthracnose. Agron. Colomb. 30(2):222-229.

Ousley MA, Lynch JM, Whipps JM. 1994. Potential of *Trichoderma* spp. as consistent plant growth stimulators. Biol. Fertil. Soils 17: 85-90. DOI: 10.1007/BF00337738.

Overton BE, Stewart EL, Geiser DM. 2006. Taxonomy and phylogenetic relationships of nine species of *Hypocrea* with anamorphs assignable to *Trichoderma* section *Hypocreanum*. Stud. Mycol. 56: 39-65. DOI: 10.3114/sim.2006.56.02.

Pakdaman BS, Goltapeh EM, Soltani BB, Talebi AA, Nadepoor M, Kruszewska JS, Piłsyk S, Sarrocco S, Vannacci G. 2013. Toward the quantification of confrontation (dual culture) test: A case study on the biological control of *Pythium aphanidermatum* with *Trichoderma asperelloides*. J. Biofertil. Biopestic. 4: 137-141. DOI: 10.4172/2155-6202.1000137.

Papavizas GC. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology and potential for biological control. Annu. Rev. Phytopathol. 19: 332-349. DOI: 10.1146/annurev.py.23.090185.000323

Pelagio-Flores R, Esparza-reynoso S, Garnica-vergara A, López-Bucio J, Herrera-estrella A. 2017. *Trichoderma*-induced acidification is an early trigger for changes in *Arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulation. Front. Plant Sci. 8(822): 1-13. DOI: 10.3389/fpls.2017.00822.

- Põldmaa K. Tropical species of *Cladobotryum* and *Hypomyces* producing red pigments. 2011. *Stud. Mycol.* 68: 1–34. DOI: 10.3114/sim.2011.68.0.
- Promwee A, Issarakraisila M, Intana W, Chamswarng C, Yenjit P. 2014. Phosphate solubilization and growth promotion of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) by *Trichoderma* strains. *J. Agric. Sci.* 6(9): 8-20. DOI: 10.5539/jas.v6n9p8.
- Re M, Wright ER, Hagiwara JC, Rivera MC. 2017. Evaluación “in vitro” de aislados de *Trichoderma* para el control de *Fusarium oxysporum*, patógeno de *Calibrachoa*. *Actas 4º Congreso Argentino de Fitopatología*. P. 336.
- Rifai M A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* 116: 1-56.
- Rivera-Chávez J, Raja HA, Graf TN, Burdette JE, Pearce CJ, Oberlies SNH. 2017. Biosynthesis of fluorinated peptaibols using a site-directed building block incorporation approach. *J. Nat. Prod.* 80: 1883-1892. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00189.
- Rubio MB, Quijada NM, Pérez E, Domínguez S, Monte E, Hermosa R. 2014. Identifying *Trichoderma parareesei* beneficial qualities for plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(6): 1864-1873. DOI: 10.1128/AEM.03375-13.
- Samuels GJ, Doi Y, Rogerson CT. 1990. *Hypocreales*. *Mem. N. Y. Bot. Gard.* 59: 6-108.
- Samuels GJ. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.* 100: 923-935. DOI: 10.1016/S0953-7562(96)80043-8.
- Samuels GJ, Dodd SL, Lu BS, Petrini O, Schroers HJ, Druzhinina IS. 2006. The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Stud. Mycol.* 56: 67-133. DOI: 10.3114/sim.2006.56.03.
- Samuels GJ, Ismaiel A. 2011. *Hypocrea peltata*: a mycological Dr Jekyll and Mr Hyde?. *Mycologia* 103(3): 616-630. DOI: 10.3852/10-227.
- Samuels GJ, Ismaiel A, Mulaw TB, Szakacs G, Druzhinina IS, Kubicek CP, Jaklitsch WM- 2012. The *Longibrachiatum* Clade of *Trichoderma*: a revision with new species. *Fungal Divers.* 55(1): 77-108. DOI: 10.1007/s1322 5-012-0152-2.
- Sandoval-Denis M, Sutton DA, Cano-Lira JF, Gené J, Fothergill AW, Wiederhold NP, Guarro J. 2014. Phylogeny of the clinically relevant species of the emerging fungus *Trichoderma* and their antifungal susceptibilities. *J. Clin. Microbiol* 52(6): 2112-2125. DOI: 10.1128/JCM.00429-14.
- Scheirer CJ, Ray WS, Hare N. 1976. The analysis of ranked data derived from completely randomized factorial designs. *Biometrics* 32 (2): 429-434. DOI: 10.2307/25295.
- SENASA. 2022. Registro Nacional de Terapéutica Vegetal. Listado de productos fitosanitarios inscriptos. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de la República Argentina. <http://www.senasa.gob.ar>.
- Sharma S, Kour D, Rana KL, Dhiman A, Thakur S, Thakur P, Thakur S, Thakur N, Sudheer S, Yadav N, Rastegari AA, Singh K. 2019. *Trichoderma*: biodiversity, ecological significances, and industrial applications. En: Yadav AN, Mishra S, Singh S, Gupta A (Eds.). *Recent advancement in white biotechnology through fungi, Volume 1: Diversity and enzymes perspectives*. Springer Nature Switzerland. 528 pp.

Shoresh M, Harman GE, Mastouri F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 21-43. DOI: 10.1146/annurev-phyto-073009-114450.

Singh SP, Singh HB, Singh DK, Rakshit A. 2014. *Trichoderma*-mediated enhancement of nutrient uptake and reduction in incidence of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Egypt. Acad. J. Biol. Sci.* 16: 29-38. DOI: 10.4314/ejb.v16i1.4.

Singh BN, Dwivedi P, Sarma BK, Singh GS and Singh HB. 2018. *Trichoderma asperellum* T42 reprograms tobacco for enhanced nitrogen utilization efficiency and plant growth when fed with N nutrients. *Front. Plant Sci.* 9(163): 1-15. DOI: 10.3389/fpls.2018.00163.

Sivasithamparam K, Ghisalberti EL. 2002. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. En: Kubicek CP, Harman GE (Eds). *Trichoderma & Gliocladium*. Volumen 1. Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor & Francis, London. 293 pp.

Skoneczny D, Oskiera M, Szczech M, Bartoszewski G. 2015. Genetic diversity of *Trichoderma atroviride* strains collected in Poland and identification of loci useful in detection of within-species diversity. *Folia Microbiol.* 60: 297-307. DOI 10.1007/s12223-015-0385-z.

Sofo A, Tataranni G, Xiloyannis C, Dichio B, Scopa A. 2012. Direct effects of *Trichoderma harzianum* strain T-22 on micropropagated shoots of GiSeLa6 R (*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*) rootstock. *Environ. Exp. Bot.* 76: 33-38. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2011.10.006.

Starobinsky G, Monzón J, di Marzo Broggi E, Braude H. 2021. Bioinsumos para la agricultura que demandan esfuerzos de investigación y desarrollo. Capacidades existentes y estrategia de política pública para impulsar su desarrollo en Argentina. Consejo para el Cambio Estructural - Ministerio de Desarrollo Productivo de la Nación. Documento de trabajo N° 17. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Stocco M, Monaco C, Cordo C. 2010. A comparison of preservation methods for *Trichoderma harzianum* cultures. *Rev. Iberoam. Micol.* 27 (4): 213-215. DOI: 10.1016/j.riam.2010.06.001.

Sundaramoorthy S y Balabaskar P. 2013. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp. against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *J. Appl. Biol* 1(3): 36-40. DOI: 10.7324/JABB.2013.1306

Sutton J y Peng G. 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology* 83:615-621. DOI: 10.1094/Phyto-83-615.

Tamura A, Kotani H, Naruto S. 1975. Trichoviridin and dermadin from *Trichoderma* sp. TK-1. *J. Antibiot.* 28: 161-162.

Tomah AA, Abd Alamera IS, Lia B, Zhanga JZ. 2020. A new species of *Trichoderma* and gliotoxin role: A new observation in enhancing biocontrol potential of *T. virens* against *Phytophthora capsici* on chili pepper. *Biol. Control* 145: 1-11. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2020.104261.

Trevors JT. 1996. Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *J. Microbiol. Methods* 26: 53-59. DOI: 10.1016/0167-7012(96)00843-3.

- Trivedi S, Srivastava M, Singh A, Kumar V, Pandey S, Shahid M, Srivastava Y. 2015. *Trichoderma koningiopsis* a new and strong antagonist against soil borne pathogens of chickpea. J. Pure Appl. Microbiol. 9(4): 3265-3275.
- Trushina N, Levin M, Mukherjee PK, Horwitz BA. 2013. PacC and pH-dependent transcriptome of the mycotrophic fungus *Trichoderma virens*. BMC Genom. 14: 138. DOI: 10.1186/1471-2164-14-138.
- Tucci M, Ruocco M, De Masi L, De Palma M, Lorito M. 2011. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. Mol. Plant Pathol. 12(4): 341-354. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2010.00674.x.
- Valero N. 2007. Determinación del valor fertilizante de microorganismos solubilizadores de fosfato en cultivos de arroz. En: Sánchez J. (Ed.). Potencial biotecnológico de microorganismos en ecosistemas naturales y agroecosistemas. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 437 pp.
- Vargas WA, Mandawe JC, Kenerley CM. 2009. Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. Plant Physiol. 151: 792-808. DOI: 10.1104/pp.109.141291.
- Vera D, Pérez H, Valencia H. 2002. Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizosfera del arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae). Acta Biológica Colombiana 7(1): 33-40. Recuperado de: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/26037>.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL, Lorito M. 2008. Trichoderma-plant-pathogen interactions. Soil Biol. Biochem. 40: 1-10.
- Viterbo A, Chet I. 2006. TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. Mol. Plant Pathol. 7(4): 249-258. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2006.00335.x.
- Vizcaíno JA, González FJ, Suárez B, Redondo P, Heinrich J, Hermosa R, Gutiérrez S, Monte E, Llobell A, Rey M. 2006. Generation, annotation and analysis of ESTs from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. BMC Genomics 7: 193. DOI: 10.1186/1471-2164-7-193.
- Watanabe N, Yamagishi M, Mizutani T, Kondoh H, Omura H, Hanada K, Kushida K. 1990. CAF-603: a new antifungal carotane sesquiterpene. Isolation and structure elucidation. J. Nat. Prod. 53: 1176-1181. DOI: 10.1021/np50071a006.
- Weindling R, Fawcett HS. 1936. Experiments in the control of Rhizoctonia damping-off of citrus seedlings. J. Agric. Sci. CA Agric. Exp. Stn. 10: 1-16
- Wolf DC, Skipper HD. 1994. Soil sterilization. En: Weaver Chair RW, Scott A, Bottomley PF, Bezdicek D, Smith S, Tabatabai A, Wollum A. (Eds). Methods of soil analysis, Part 2: Microbiological and biochemical properties. SSSA Book Series. Wisconsin, USA.
- Wright ER, Zapata R, de Delfino OSF, López MV, Senlle M. 1988. Eficiencia *in vitro* de antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*. Revista de la Facultad de Agronomía 9: 109-116.

Yedidia I, Benhamou N, Chet I. 1999. Induction of defense response in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Appl. Environ. Microbiol. 65(3): 1061-1070. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.1061-1070.1999>.

Yedidia I, Srivastva AK, Kapulnik Y, Chet I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant Soil 235: 235-242. DOI: 10.1023/A:1011990013955.

Zhang C, Druzhinina I, Kubick CP, Xu T. 2005. *Trichoderma* biodiversity in China: evidence for a north to southern distribution of species in East Asia. FEMS Microbiol. Lett. 251: 251-257. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.08.034.

Zhao YZ, Zhang ZF, Cai L, Peng WJ, Liu F. 2018. Four new filamentous fungal species from newly-collected and hive-stored bee pollen. Mycosphere 9(6): 1089–1116. DOI: 10.5943/mycosphere/9/6/3.

Zhao J, Liu T, Liu W, Zhang D, Dong D, Wu H, Zhang T, Liu D. 2021. Transcriptomic insights into growth promotion effect of *Trichoderma afroharzianum* TM2-4 microbial agent on tomato plants. J. Integr. Agric. 20(5): 1266-1276. DOI: 10.1016/S2095-3119(20)63415-3.

Zhou Y, Wang Y, Yang L, Guo L, He S, Zhou W, Huang J. 2021. Development of species/genus specific primers for identification of three *Trichoderma* species and for detection of *Trichoderma* genus. Res. Sq. Preprint. DOI: 10.21203/rs.3.rs-139038/v1.

4. Resistencia varietal y actividad del quitosano

4.1. Resistencia varietal

4.1.1. Introducción

Para que un programa de manejo de enfermedades cumpla con las exigencias actuales en materia de sustentabilidad, debe integrar principios, estrategias y prácticas que permitan un equilibrado funcionamiento del agrosistema. El detallado conocimiento de la biología de un cultivo y de los patógenos asociados permite establecer los momentos más adecuados para incorporar las medidas de manejo que disminuyan los posibles daños. Dentro de los principios que enumeró Whetzel (1929), que a pesar del tiempo transcurrido siguen vigentes, se encuentra el uso de variedades resistentes que involucra la aplicación de técnicas de mejoramiento genético vegetal para la selección de materiales con buen comportamiento frente a enfermedades. Este principio es considerado ecológico, económico, factible, seguro y de gran efectividad. Además de reducir las pérdidas de rendimiento que ocasionan las enfermedades, disminuye el número de aplicaciones de fungicidas y en consecuencia minimiza la contaminación ambiental (Agrios, 1995; Keller *et al.*, 2000).

En el siglo XX comenzaron los estudios formales sobre herencia de la resistencia a enfermedades. Agrios (1995) mencionó investigaciones de Bifen (1905) sobre la herencia mendeliana de la resistencia del trigo a la roya, de Orton (1909) sobre el marchitamiento de diversos cultivos causado por *Fusarium* sp. y de Barms (1911) sobre la existencia de razas de patógenos específicas de ciertas variedades vegetales. El avance en el conocimiento dio lugar en 1946 a la teoría de Flor de la resistencia gen por gen: para cada gen de resistencia en una planta (R) existe un gen de avirulencia en el patógeno (avr) cuya interacción incompatible impide el progreso de la enfermedad. Existe una coevolución dinámica entre plantas y patógenos (Jones y Dangl, 2006). Van der Plank (1966) propuso los conceptos de resistencia vertical y horizontal a partir del análisis del patosistema *Phytophthora infestans* - *Solanum tuberosum*. Definió a la resistencia vertical como mono u oligogénica, basada en genes principales (R) de interacción directa con razas específicas del patógeno que solo puede ser superada por un cambio genético en este último (resistencia cualitativa). Este tipo de resistencia es capaz de reducir el inóculo inicial de una epidemia y posibilita su retraso en el tiempo. Por otro lado, la resistencia horizontal es poligénica y no posee especificidad, por lo cual está uniformemente distribuida entre las razas del patógeno (resistencia cuantitativa). Los materiales vegetales con esta resistencia tienen la capacidad de disminuir la tasa de infección. Así, la diferencia entre ambas resistencias sería un ataque tardío (vertical) frente a uno lento (horizontal). La existencia de un gen R solo permite la

infección por razas virulentas. La presión de selección causada por la introducción de plantas resistentes es contrarrestada por el potencial de adaptación de la población patógena (gran diversidad genética, alta tasa de multiplicación, posibilidad de reproducción sexual, varias generaciones por temporada de crecimiento y rápida dispersión por aire). Los genes de resistencia cuantitativa reducen la esporulación del patógeno pero no la previenen. En consecuencia, la presión de selección sobre la población patógena es menos extrema y su adaptación es más lenta. Por lo tanto, la resistencia cuantitativa es normalmente mucho más duradera que la cualitativa (Keller *et al.*, 2000). A partir de estas definiciones varios autores (Poland *et al.*, 2009; Kushalappa y Gunnaiah, 2013; Kushalappa *et al.*, 2016; Burbano-Figueroa, 2020) propusieron un continuo desde la resistencia plena a una raza de un patógeno (vertical o cualitativa) hasta la susceptibilidad, que incluye una gama de comportamientos (horizontal o cuantitativa).

Los mecanismos moleculares que activan las respuestas de las plantas difieren entre enfermedades causadas por patógenos biótrofos y necrótrofos (Zhang *et al.*, 2013). Así, según Glasebrook (2005), la defensa contra los primeros se debe en gran parte a la resistencia gen por gen que conduce a una respuesta de hipersensibilidad y activa la señalización dependiente de ácido salicílico. Respecto de los segundos, la señalización es mediada por ácido jasmónico y etileno, las fitoalexinas intervienen en la respuesta y en ciertos casos también la resistencia gen por gen (Zhang *et al.*, 2013). Las células vegetales producen una amplia gama de moléculas durante la reacción de defensa. Entre ellas, las proteínas relacionadas con la patogénesis incluyen proteasas, quitinasas y β -1,3-glucanasas, enzimas que al degradar la pared celular de las hifas de los patógenos fúngicos permiten la liberación de inductores de oligosacáridos que son detectados por las células de la planta (Galeana-Sánchez *et al.*, 2017). En décadas recientes, nuevas tecnologías como metabolómica, proteómica y transcriptómica además de genómica y epigenómica permitieron indagar acerca de los mecanismos de resistencia en las plantas (Kushalappa y Gunnaiah, 2013; Liu *et al.*, 2013).

Las plantas poseen una serie de barreras físicas y químicas preformadas, tales como capas de cera, paredes celulares rígidas, enzimas antimicrobianas o metabolitos secundarios, que evitan la entrada de patógenos y dan lugar a la activación subsiguiente de respuestas de defensa inducibles (García-Pineda y Lozoya-Gloria, 2004; Nürnberger *et al.*, 2004; Galvez *et al.*, 2014). Es probable que dichas barreras constitutivas desempeñen un papel en la resistencia parcial al limitar el crecimiento de un patógeno normalmente virulento confiriendo resistencia de amplio espectro (Vergne *et al.*, 2010). Los compuestos fenólicos pueden ser constitutivos (funcionan como inhibidores y proporcionan una defensa general contra un amplio espectro de patógenos

potenciales) o se pueden sintetizar en respuesta a la entrada de patógenos y su aparición se considera parte de una defensa activa (Kuc, 1992).

En el capítulo 2 de esta tesis, al estudiar la agresividad de los aislados patógenos, se observó una respuesta diferencial de los materiales genéticos de calibrachoa. El objetivo del presente apartado fue evaluar el comportamiento de variedades de calibrachoa frente a los aislados de *Fusarium proliferatum* más agresivos, como un primer paso para estudios futuros de comprensión de los mecanismos involucrados.

4.1.2. Materiales y métodos

Reacción de las variedades de calibrachoa a los aislados más agresivos de Fusarium

Se trabajó con los datos obtenidos en el apartado 2.1.2.e: “Agresividad de los aislados” (Capítulo 2: “Hongos Patógenos”). En dicha sección se orientó el análisis estadístico a caracterizar los aislados según su comportamiento general frente a distintas variedades de calibrachoa. La presente sección, fue enfocada a caracterizar a las mismas según su respuesta a la inoculación. Para esto, se analizó la interacción de los aislados más agresivos de *F. proliferatum* (INTA IF-535 y 536) con las variedades de calibrachoa INTA 06575, Overá Fucsia INTA y Pampa Salmón-INTA. Se estudió el peso seco aéreo y radical y la severidad según las escalas de daño. Los resultados se analizaron según lo indicado en el Capítulo 2: “Hongos patógenos” 2.1.2.g. “Análisis estadísticos”. Los ensayos se repitieron dos veces.

4.1.3. Resultados y discusión

Reacción de las variedades de calibrachoa a los aislados más agresivos de Fusarium

Severidad de daño aéreo (escala de síntomas aéreos)

En las Tablas 4.1.3.1 y 4.1.3.2 se muestra la severidad de enfermedad estimada en los dos ensayos según la escala utilizada, cuyos grados más altos indican capacidad para producir síntomas más severos.

Las variedades de calibrachoa inoculadas con INTA IF-535 y 536 expresaron mayor daño visual que los testigos excepto en el ensayo 2 para la interacción de la variedad Overá Fucsia-INTA con el aislado INTA IF-536. En el ensayo 2, en la interacción con INTA IF-535, las variedades Pampa Salmón e INTA 06575 presentaron menor severidad de daños visuales que Overá Fucsia-INTA y, en la interacción con INTA IF-536, la variedad INTA 06575 fue la menos dañada.

En cuanto a la comparación entre ensayos, los únicos tratamientos con resultados estadísticamente similares fueron la variedad INTA 06575 inoculada con INTA IF-535 y sin inocular para los ensayos con ambas cepas patógenas, lo que demostró la alta variabilidad de las respuestas.

Tabla 4.1.3.1. Daños aéreos según escala en calibrachoas inoculadas con INTA IF-535 (*F. proliferatum*).

Aislado	Variedad	Ensayo 2	Ensayo 3	Valor p**
		Severidad (ranking)* [grado]	Severidad (ranking)* [grado]	
-	INTA 06575	32,2 a [0,7]	31,8 a [0,2]	0,1068
-	Pampa Salmón-INTA	57,6 a [1,5]	27 a [0,0]	0,0001
INTA IF-535	Pampa Salmón-INTA	110,5 b [3,7]	77,4 b [3,0]	0,0001
INTA IF-535	INTA 06575	113,8 bc [3,8]	81,1 b [3,3]	0,5253
-	Overá Fucsia-INTA	141,0 c [4,3]	30,8 a [0,3]	0,0001
INTA IF-535	Overá Fucsia-INTA	173,0 d [5,0]	78,7 b [3,4]	0,0001

Los valores entre corchetes indican el valor medio de grados sobre la escala.

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

**Valor $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre ensayos.

Tabla 4.1.3.2. Daños aéreos según escala en calibrachoas inoculadas con INTA IF-536 (*F. proliferatum*).

Aislado	Variedad	Ensayo 2	Ensayo 3	Valor p**
		Severidad (ranking)* [grado]	Severidad (ranking)* [grado]	
-	INTA 06575	30,8 a [0,7]	34,5 a [0,2]	0,1068
-	Pampa Salmón-INTA	49,2 a [1,5]	28,5 a [0,0]	0,0001
INTA IF-536	INTA 06575	93,3 b [4,2]	76,3 b [2,0]	0,0001
-	Overá Fucsia-INTA	109,7 bc [4,3]	32,5 a [0,3]	0,0001
INTA IF-536	Pampa Salmón-INTA	125,0 c [4,7]	67,8 b [1,6]	0,0001
INTA IF-536	Overá Fucsia-INTA	135 c [5,0]	87,4 b [3,4]	0,0001

Los valores entre corchetes indican el valor medio de grados sobre la escala.

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

**Valor $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre ensayos.

Severidad de daño aéreo (peso seco de la parte aérea)

En las Tablas 4.1.3.3 y 4.1.3.4 se muestran los pesos secos aéreos de las plantas registrados en los dos ensayos.

En la interacción con el aislado INTA IF-535, la única variedad que presentó diferencias significativas fue INTA 06575 que redujo su peso seco aéreo un 25 % (ensayo 2). En cuanto a la comparación de ensayos, los tratamientos que combinaron al patógeno y las variedades Pampa Salmón-INTA e INTA 06575 fueron los únicos estadísticamente similares.

En cuanto a la interacción de las variedades con el aislado INTA IF-536, en el ensayo 2 ninguna variedad difirió estadísticamente de los testigos. A pesar de esto, todas las plantas inoculadas tuvieron una disminución del peso seco aéreo. La variedad Overá Fucsia-INTA fue la de mayores

daños, con pérdidas de peso del 43 %. En cuanto al ensayo 3, Overá Fucsia-INTA e INTA 06575 disminuyeron su peso seco aéreo 21 y 14 % respectivamente. Pampa Salmón-INTA a pesar de que redujo su peso un 10 % frente al testigo, no difirió estadísticamente. Respecto de la comparación de ensayos, el único tratamiento comparable fue el que combinó al patógeno y a la variedad Pampa Salmón-INTA.

Tabla 4.1.3.3. Peso seco de parte aérea en calibrachos inoculados con INTA IF-535 (*F. proliferatum*).

Aislado	Variedad	Ensayo 2 Peso seco aéreo (mg)*	Ensayo 3 Peso seco aéreo (mg)*	Valor p**
INTA IF-535	Overá Fucsia-INTA	45,3 a	57,3 a	0,0427
-	Overá Fucsia-INTA	46,7 a	63,6 a	0,0140
INTA IF-535	Pampa Salmón-INTA	79,4 b	67,0 a	0,1284
-	Pampa Salmón-INTA	88,9 bc	75,2 a	0,0490
INTA IF-535	INTA 06575	101,1 c	84,7 b	0,0641
-	INTA 06575	135,4 d	93,3 b	0,0032

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

**Valor $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre ensayos.

Tabla 4.1.3.4. Peso seco de parte aérea en calibrachos inoculados con INTA IF-536 (*F. proliferatum*).

Aislado	Variedad	Ensayo 2 Peso seco aéreo (mg)*	Ensayo 3 Peso seco aéreo (mg)*	Valor p**
INTA IF-536	Overá Fucsia-INTA	26,6 a	50,1 a	0,0001
-	Overá Fucsia-INTA	46,7 a	63,6 b	0,014
INTA IF-536	Pampa Salmón-INTA	78,4 b	68,2 b	0,1909
-	Pampa Salmón-INTA	88,9 b	75,2 b	0,049
INTA IF-536	INTA 06575	128,4 c	80,1 b	0,0001
-	INTA 06575	135,4 c	93,3 c	0,0032

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

**Valor $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre ensayos.

Severidad daño radical (escala de síntomas en raíz)

En las Tablas 4.1.3.5 y 4.1.3.6 se muestra la severidad de enfermedad estimada en los dos ensayos, de acuerdo con la escala utilizada, según la cual los grados más altos indican capacidad para producir síntomas más severos.

Las raíces de todas las variedades inoculadas con ambos patógenos tuvieron mayores daños que las no inoculadas. En el ensayo 2, las plantas testigo de Overá Fucsia-INTA mostraron un sistema radical con mayores daños visuales que el resto de las variedades.

Al comparar los ensayos, en la interacción de variedades con *F. proliferatum* INTA IF-535, los resultados de INTA 06575 sin inocular y Pampa Salmón-INTA inoculada fueron estadísticamente

idénticos. En la interacción con INTA IF-536, sólo la variedad INTA 06575 sin inocular mostró similitud estadística entre ensayos.

Tabla 4.1.3.5. Daños radicales según escala en calibrachoas inoculadas con INTA IF-535 (*F. proliferatum*).

Aislado	Variedad	Ensayo 2	Ensayo 3	Valor p**
		Severidad (ranking)* [grado]	Severidad (ranking)* [grado]	
-	INTA 06575	48,8 a [2,1]	36,7 a [1,8]	0,2319
-	Pampa Salmón-INTA	62,9 a [2,2]	25,3 a [1,1]	0,0051
INTA IF-535	Pampa Salmón-INTA	101,35 b [2,8]	70,1 b [3,9]	0,0985
INTA IF-535	INTA 06575	117,0 b [2,9]	75,5 b [4,2]	0,0001
-	Overá Fucsia-INTA	126,9 b [3,1]	32,9 a [1,6]	0,0001
INTA IF-535	Overá Fucsia-INTA	164,6 c [3,6]	86,4 b [4,8]	0,0001

Los valores entre corchetes indican el valor medio de grados sobre la escala.

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

**Valor $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre ensayos.

Tabla 4.1.3.6. Daños radicales según escala en calibrachoas inoculadas con INTA IF-536 (*F. proliferatum*).

Aislado	Variedad	Ensayo 2	Ensayo 3	Valor p**
		Severidad (ranking)* [grado]	Severidad (ranking)* [grado]	
-	INTA 06575	39,9 a [2,1]	38,1 a [1,8]	0,2319
-	Pampa Salmón-INTA	50,7 a [2,2]	25,4 a [1,1]	0,0051
INTA IF-536	INTA 06575	94,5 b [3,0]	75,6 b [3,5]	0,0203
INTA IF-536	Pampa Salmón-INTA	94,7 b [3,0]	67,6 b [2,9]	0,0001
-	Overá Fucsia-INTA	102,7 b [3,1]	33,9 a [1,6]	0,0001
INTA IF-536	Overá Fucsia-INTA	169,5 c [4,0]	86,3 b [4,2]	0,0001

Los valores entre corchetes indican el valor medio de grados sobre la escala.

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

**Valor $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre ensayos.

Severidad de daño radical (peso seco de raíz)

En las Tablas 4.1.3.7 y 4.1.3.8 se muestran los pesos secos de la parte radical de las plantas registrados en los dos ensayos. En todos los casos las plantas que no fueron inoculadas presentaron mayor peso seco radical que las inoculadas.

En el ensayo 2 de la inoculación con INTA IF-535, solo la variedad INTA 06575 mostró diferencias estadísticas entre tratamientos, con mermas de peso del 35 %. En el caso de Overá Fucsia-INTA, si bien las diferencias numéricas fueron superiores, no se registraron estadísticamente. En el ensayo 3 no se observaron diferencias entre tratamientos pero Overá Fucsia-INTA fue la variedad que tuvo mayor pérdida de peso. Los resultados de los ensayos fueron comparables estadísticamente sólo para los tratamientos con la variedad Pampa Salmón-INTA.

En cuanto al ensayo 2 de interacción de las variedades con INTA IF-536 las plantas de Pampa Salmón-INTA no difirieron del testigo a pesar de que hubo mermas en el peso del 53 %. La

variedad Overá Fucsia-INTA presentó la mayor pérdida de peso seco radical seguida por INTA 06575 con mermas de peso del 61 %. En el tercer ensayo no se registraron diferencias estadísticas entre tratamientos. Los ensayos fueron similares estadísticamente para los tratamientos de la variedad INTA 06575 inoculada y la Pampa Salmón-INTA sin inocular.

Tabla 4.1.3.7. Peso seco de parte radical en calibrachos inoculados con INTA IF-535 (*F. proliferatum*).

Aislado	Variedad	Ensayo 2 Peso seco raíz (mg)*	Ensayo 3 Peso seco raíz (mg)*	Valor p**
INTA IF-535	Overá Fucsia-INTA	1,6 a	8,6 a	0,0002
-	Overá Fucsia-INTA	5,7 ab	13,5 a	0,0002
INTA IF-535	Pampa Salmón-INTA	9,9 bc	12,1 a	0,3032
-	Pampa Salmón-INTA	14,7 cd	15,7 a	0,6060
INTA IF-535	INTA 06575	16,1 d	11,0 a	0,0235
-	INTA 06575	25,1 e	12,5 a	0,0001

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

**Valor $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre ensayos.

Tabla 4.1.3.8. Peso seco de parte radical en calibrachos inoculados con INTA IF-536 (*F. proliferatum*).

Aislado	Variedad	Ensayo 2 Peso seco raíz (mg)*	Ensayo 3 Peso seco raíz (mg)*	Valor p**
INTA IF-536	Overá Fucsia-INTA	0,4 a	10,1 a	0,0001
-	Overá Fucsia-INTA	5,7 b	13,5 a	0,0002
INTA IF-536	Pampa Salmón-INTA	6,9 b	14,5 a	0,0001
INTA IF-536	INTA 06575	9,7 b	10,9 a	0,5511
-	Pampa Salmón-INTA	14,7 c	15,7 a	0,606
-	INTA 06575	25,1 d	12,5 a	0,0001

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

**Valor $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre ensayos.

Los resultados expuestos permiten afirmar que las variedades de calibrachos poseen una respuesta diferencial frente a la inoculación con dos aislados de *Fusarium proliferatum*. En líneas generales, la más afectada a nivel de las raíces por ambos patógenos fue Overá Fucsia-INTA, seguida por INTA 06575. Pampa Salmón-INTA fue la que presentó menores pérdidas de peso seco radical. En cuanto a la severidad de daño aéreo, Pampa Salmón-INTA fue la menos dañada. Las variedades INTA 06575 y Overá Fucsia-INTA registraron los mayores daños en su interacción con alguno de los dos patógenos. Al margen de esto, existió una elevada variabilidad de resultados dentro y entre ensayos que, en algunos casos, no permitió detectar diferencias estadísticas pese a que las medias fueran distintas. Esta situación fue discutida previamente en el análisis de la agresividad de los aislados de *Fusarium* en el Capítulo 2, apartado 2.1.3.e. En todos los casos, las escalas de daño reflejaron la tendencia observada en los valores de peso

seco, por lo cual pueden ser consideradas una herramienta práctica, sencilla y rápida para caracterizar la respuesta de calibrachoa.

Se estima que el 75 % de los cultivos agrícolas importantes tiene resistencia efectiva contra al menos un patógeno y que el 98 % de los de grano y forraje la posee contra una o más enfermedades (Schumann, 1991). En muchos casos, la resistencia en variedades comerciales proviene de genotipos silvestres (Keller *et al.*, 2000). Por esa vía, además de otros rasgos deseables, se ha incorporado resistencia a las enfermedades en muchos cultivos. Croser *et al.* (2003) reportaron que las especies silvestres de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) tienen un mayor nivel de resistencia que las cultivadas frente al marchitamiento ocasionado por *Fusarium*, entre otras enfermedades. Especies silvestres de garbanzo (*Cicer bijugum* L. y *C. pinnatifidum* L.), lenteja (*Lens ervoides* M., *L. nigricans* M., *L. odemensis* M.) y poroto (*Phaseolus coccineus* L.) poseen resistencia a adversidades bióticas entre las que se encuentra incluida la marchitez causada por *Fusarium* (Kumar *et al.*, 2011). Anjani *et al.* (2018) pudieron incorporar genes de resistencia a *Fusarium* a partir de variedades silvestres de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) mediante hibridación interespecífica confirmada con marcadores moleculares y evaluación fenotípica por inoculación. Es importante mencionar que con dichos marcadores, se pueden seleccionar con precisión en el laboratorio los híbridos resistentes a la marchitez, lo cual evita la inoculación y complicaciones asociadas (necesidad de un determinado estado fenológico del cultivo, temperatura, humedad, niveles de inóculo, etc.). La base genética de las variedades de calibrachoa con las que se trabajó está integrada por genotipos nativos y comerciales. Por ejemplo, calibrachoa Overá Fucsia-INTA se obtuvo a partir del cruzamiento de *Calibrachoa caesia* x "Callie Sunrise". Por su parte, calibrachoa Pampa Salmón-INTA se obtuvo del cruzamiento de *C. thymifolia* x "Callie Scarlet Red". Por último, calibrachoa INTA 06575 se obtuvo a partir del cruzamiento de *C. caesia* x "Callie Dark Blue" (J.C. Hagiwara, com. pers.). *C. caesia* crece en el sur de Brasil y en el sudeste de Misiones. *C. thymifolia* es relativamente abundante en el oeste de Uruguay y noreste de Argentina. En Entre Ríos y Corrientes habita principalmente sobre las costas de los ríos Uruguay y sus afluentes, las costas del río Paraná y los esteros del Iberá (Greppi *et al.*, 2013). Las diferencias de respuesta a la inoculación con los aislados de *Fusarium* podría estar condicionada fuertemente por las características de los padres y madres de los híbridos. Por ejemplo, *C. thymifolia* puede haber aportado a la variedad Pampa Salmón-INTA un buen comportamiento a podredumbres de raíz, por su adaptación al crecimiento en áreas de alta humedad edáfica. Sería interesante estudiar en profundidad la interacción del germoplasma nativo de calibrachoa frente a los patógenos que limitan el cultivo de los genotipos comerciales. De este modo, se podría detectar la existencia de fuentes de resistencia genética. Tombion (2022) logró unos avances interesantes al respecto.

Modafar *et al.* (2000) estudiaron la acumulación de distintos compuestos fenólicos y lignina en raíces de palmera datilera (*Phoenix dactylifera* L.) de cultivares resistentes y susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. La necrosis de la raíz en los cultivares resistentes apareció muy temprano y permaneció limitada, mientras que en los susceptibles fue más tardía y se extendió por toda la superficie radical, acompañada de marchitez. Ambos cultivares presentaron el mismo perfil de compuestos fenólicos. Antes de la infección, el contenido de distintos fenoles en las raíces del cultivar resistente superó ampliamente al del susceptible. Luego de la infección, fue aún mayor para los mismos fenoles y un nuevo compuesto. Además aumentó el contenido de lignina. Mandal *et al.* (2009) obtuvieron resultados similares en raíces de tomate, donde detectaron una menor concentración de compuestos fenólicos en el período de prefloración, de mayor susceptibilidad a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. El ácido ferúlico, compuesto mayormente detectado, presentó mayor la capacidad inhibitoria del patógeno *in vitro*.

Esta información es relevante para orientar futuros estudios que permitan detectar diferencias en la estructura y composición química de las raíces de las distintas variedades de calibrachoa bajo estudio y explicar las variaciones en su comportamiento frente a los patógenos.

Galván *et al.* (2008) estudiaron la resistencia de especies del género *Allium* a la pudrición basal ocasionada por *Fusarium oxysporum* y *F. proliferatum*. La cebolla de verdeo (*A. fistulosum* L.) presentó una incidencia mucho menor que la cebolla (*A. cepa* L.), debido a un sistema radical más importante y a una capacidad de regeneración de raíces que le permitieron superar las infecciones. Por el contrario, la planta de cebolla dejó de crecer después de la formación del bulbo, y los tejidos de la raíz y la placa basal se volvieron senescentes. El comportamiento de las plantas de cebolla de verdeo puede relacionarse con la respuesta de la calibrachoa variedad Pampa Salmón-INTA. Si bien presentó mermas en el peso seco radical, esta variedad de calibrachoa continuó creciendo en su parte aérea y tuvo un mejor comportamiento frente a los aislados de *Fusarium* que el resto de las variedades evaluadas.

Por último, existe una asociación entre la activación de enzimas hidrolíticas durante la etapa temprana de la patogénesis y la respuesta de defensa por parte de diversas plantas. Gupta *et al.* (2013) observaron en cultivares de rúcula (*Eruca sativa* M.) resistentes a *Alternaria brassicicola* una elevada producción de β -1,3-glucanasas y quitinasas durante las 72 h posteriores a la inoculación. La actividad de estas dos enzimas daría lugar a la liberación de oligosacáridos por ruptura de las paredes celulares del hongo y las consiguientes reacciones de defensa en las plantas. En cultivares de ajo (*A. sativum* L.) inoculados con *Fusarium proliferatum* (Filyushin *et al.*, 2021) cuantificaron quitinasas. Su importante aumento en raíces y tallos del cultivar resistente 24 y 96 h de la inoculación podría explicar su comportamiento frente a la enfermedad. Sería interesante avanzar en estudios que permitan conocer la expresión, tanto de quitinasas

como de β -1,3-glucanasas, en las distintas variedades de calabrochoa inoculadas con *Fusarium proliferatum*.

La diversidad genética que poseen las especies cultivadas permite responder al ataque de un patógeno de múltiples formas y con diferentes grados de especificidad y eficacia. Los múltiples genes que confieren resistencia horizontal controlan los procesos fisiológicos de la planta que generan las sustancias y estructuras de defensa frente a todas las razas de un patógeno. Este tipo de resistencia es dependiente tanto de las condiciones ambientales como del estado de desarrollo del cultivo (Agrios, 1995). Por otro lado, tal como se mencionó en el capítulo 2, se conocen razas de las *formae specialis* de *Fusarium oxysporum* que poseen capacidad para infectar distintos cultivares. Genes específicos en ciertas variedades de tomate les confieren resistencia vertical (monogénica) al ataque de tres razas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* o susceptibilidad a alguna de ellas (Scott *et al.*, 2004; van der Does *et al.*, 2019). Michielse y Rep (2009) enumeraron cultivos que poseen resistencia monogénica a diferentes razas de *F. oxysporum*. Una explicación a la aparición de razas que quiebran la resistencia vertical, es la coevolución de las poblaciones del patógeno con el monocultivo de cultivares resistentes que, frente a la presión de selección, generan mutaciones (Keller *et al.*, 2000; Moerschbacher y Mendgen, 2000; Poland *et al.*, 2009). En las variedades de calabrochoa evaluadas se observó diferente susceptibilidad a la enfermedad causada por distintos aislados de *Fusarium*, lo cual permite pensar que no se expresaron genes específicos de resistencia sino que se activaron respuestas con base genética cuantitativa. Sería interesante realizar estudios que permitan confirmar tal hipótesis.

4.1.4. Conclusiones

- Las variedades de calabrochoa presentaron una respuesta diferencial a la marchitez causada por los aislados de *Fusarium proliferatum* más agresivos (INTA IF-535 y 536).
- La variedad Pampa Salmón-INTA expresó la mayor resistencia a la marchitez, seguida por calabrochoa INTA 06575. La variedad Overá Fucsia-INTA mostró la mayor susceptibilidad.
- Es necesario realizar estudios morfológicos y fitoquímicos para conocer los mecanismos de resistencia de las variedades de calabrochoa bajo estudio.

4.2. Quitosano

4.2.1 Introducción

La quitina, homopolímero de β -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-B-D-glucopiranososa, es el segundo recurso orgánico más abundante en la tierra después de la celulosa y está presente en invertebrados marinos, insectos y hongos con funciones estructurales (Hudson y Smith, 1998; Tolaimate *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2017; Varun *et al.*, 2017). A nivel industrial, los caparazones de ciertos crustáceos (camarones, langostas y cangrejos) obtenidos como subproducto de la industria pesquera proveen la materia prima que posibilita la obtención de quitina (Bakshia *et al.*, 2019; Espinosa-Cavazos *et al.*, 2020). Según Hudson y Smith (1988), Braconnot (1811) estudió la composición de tejidos fúngicos mediante digestión química y encontró materiales similares a la celulosa que denominó "fungine" y Odier (1821) observó que el exoesqueleto de insectos poseía una composición similar y lo llamó quitina. Este nuevo compuesto generó confusión por su similitud funcional con la celulosa como componente estructural de las paredes celulares en plantas, hasta que los avances tecnológicos permitieron diferenciarlos químicamente. El quitosano es un biopolímero catiónico lineal derivado de la desacetilación de la quitina en un medio alcalino a temperaturas mayores a los 60 °C, en la que ocurre el reemplazo del grupo acetyl de la amida por un grupo amino. Se compone de los azúcares glucosamina y N-acetilglucosamina en proporciones que dependen del tratamiento al que se sometió (Bakshia *et al.*, 2019). Las condiciones fisicoquímicas del proceso generan biopolímeros de quitosano con propiedades estructurales, físicas, químicas y funcionales, con características muy distintas a las de la quitina (Majeti y Kumar, 2000; Espinosa-Cavazos *et al.*, 2020). Además, la pureza, el rendimiento, el peso molecular y el grado de desacetilación son específicos del material original (Hudson y Smith, 1998). En la Figura 4.2.1.1 puede observarse su estructura química.

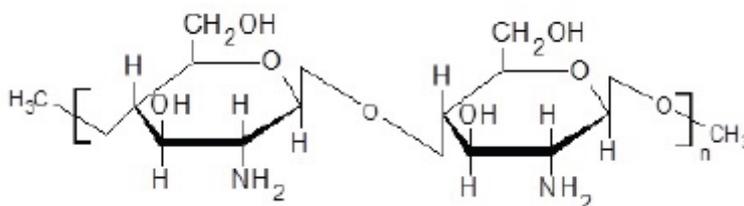


Figura 4.2.1.1. Estructura química del quitosano (Fuente: Espinosa-Cavazos *et al.*, 2020).

La biodegradación de la quitina es un proceso muy lento que genera grandes cantidades de descartes y se ha convertido en una preocupación importante en la industria de procesamiento de productos del mar (Shahidi y Synowiecki, 1991). Por lo tanto, la obtención de compuestos con valor agregado como la quitina, el quitosano y sus derivados y su aplicación en diferentes campos es de gran interés (Shahidi *et al.*, 1999). Varun *et al.* (2017) extrajeron quitina y quitosano de caparzones de camarón con rendimientos del 14 y del 12 % en peso seco respectivamente. El quitosano, debido a su capacidad para actuar como polielectrolito catiónico, su bioactividad y su biocompatibilidad tiene una amplia variedad de aplicaciones en industrias como la alimenticia, textil, agrícola, médica, cosmética y farmacéutica y para la remediación (Espinosa-Cavazos *et al.*, 2020). Es utilizado como agente espesante en el agua, puede generar quelación selectiva de metales pesados y actuar en el tratamiento de aguas residuales, se convierte fácilmente en fibras, películas, recubrimientos y perlas, así como en polvos y soluciones (Hudson y Smith, 1998). Dentro del mundo agrícola es utilizado como controlador de plagas, regulador del crecimiento de plantas, mejorador de la disponibilidad y propiedades de ciertos nutrientes y del almacenamiento y conservación de semillas mediante su recubrimiento (Ramírez *et al.*, 2010; Mármol *et al.*, 2011). También, por sus propiedades antimicrobianas, es usado como bioprotector en el empaquetado de alimentos (Valenzuela y Arias, 2012).

Existen escasos antecedentes en el país sobre su evaluación como bioprotector. Se lo ha utilizado para el control de podredumbres poscosecha de zapallo (Cifone *et al.*, 1999, 2001), la disminución de poblaciones bacterianas en lechuga (Goñi *et al.*, 2010), la infección por *Alternaria alternata* en tomate (Yommi *et al.*, 2005) y la preservación poscosecha de peras (Rodríguez *et al.*, 1999).

El objetivo de este apartado fue evaluar las capacidades de biocontrol *in vitro* de dos formulaciones de quitosano frente a *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* (patógenos de suelo) y su compatibilidad con cepas de *Trichoderma* preseleccionadas.

4.2.2 Materiales y métodos

Las evaluaciones preliminares desarrolladas en los apartados a y b se realizaron con un producto no inscripto formulado en base a quitosano, en colaboración con la Técnica en Producción Vegetal Orgánica Noelia M. Grisancich. Por otro lado, las evaluaciones correspondientes al apartado c se realizaron con Raisan® de Nutriterra, con registro en SENASA N° 17882.

a. Efecto del pH sobre la actividad del quitosano

Se utilizó la técnica del medio de cultivo envenenado (Balouiri *et al.*, 2016). Se colocaron 0,05 g de quitosano (dosis 5.000 ppm) en la base de placas de Petri de 10 cm de diámetro. Se preparó APG a pH 4 y 6 mediante la adición de ácido láctico, se vertieron 10 mL del medio fundido atemperado en cada placa y se realizó un movimiento circular suave de las placas sobre la mesada para distribuir homogéneamente el quitosano en el medio. Se cultivó el aislado INTA IF-527 de *S. rolfsii* por 7 días y se cortaron discos de 0,9 cm de diámetro de las colonias. Se colocó un disco en el centro de cada placa. Los testigos se prepararon de igual manera, pero sin quitosano. Las placas fueron distribuidas al azar en estufa de cultivo a 22 ± 2 °C en oscuridad y se realizaron 6 repeticiones por tratamiento. Se efectuaron observaciones diarias durante tres días del diámetro de crecimiento fúngico en cada placa y se analizaron los resultados según lo indicado en el Capítulo 2: “Hongos patógenos” 2.1.2.g. “Análisis estadísticos”.

b. Crecimiento de hongos patógenos de suelo en medio de cultivo con quitosano.

Se repitió la metodología descrita en 4.2.2.a, a pH 6, con los aislados INTA IF-523 (*Rhizoctonia solani*), 527 (*S. rolfsii*), 528 (*Sclerotinia sclerotiorum*) y 534 (*Fusarium proliferatum*). Los ensayos se llevaron a cabo con 6 repeticiones por tratamiento y los testigos no tuvieron el agregado de quitosano. Las placas se incubaron a 22 ± 2 °C y se registró a diario el radio de crecimiento fúngico. Los resultados se analizaron estadísticamente según lo indicado en el Capítulo 2: “Hongos patógenos” 2.1.2.g. “Análisis estadísticos”.

c. Compatibilidad in vitro de quitosano con aislados de Trichoderma y efecto fungicida frente a Fusarium proliferatum.

Se evaluó la compatibilidad *in vitro* con cuatro aislados de *Trichoderma* (INTA IF-549, 613, 614 y 630) y el efecto fungicida frente a tres aislados *F. proliferatum* (INTA IF-534, 535 y 536) de un formulado en base a quitosano. Para esto, se repitió la metodología desarrollada en el apartado 4.2.2.a. Para cultivos florícolas, la recomendación del fabricante de quitosano es de 5 a 7 litros de producto formulado por hectárea. La dosis más alta (7 l/ha) se extrapola al área de una placa de Petri y de este modo, a las placas con el APG fundido se les agregó 1 mL de quitosano. Como testigos se sembraron discos de cada hongo en medios de cultivo con el agregado de 1 mL de agua destilada estéril. Se realizaron 8 repeticiones por cada tratamiento y las placas se incubaron a 24 ± 2 °C hasta que los testigos las cubrieron totalmente en el caso de *Trichoderma* y por siete días en el caso de *Fusarium*. Se registró a diario el radio de crecimiento fúngico. Los datos se

analizaron estadísticamente según lo indicado en el Capítulo 2: “Hongos patógenos” 2.1.2.g. “Análisis estadísticos”.

4.2.3 Resultados y discusión

a. Efecto del pH sobre la actividad del quitosano

En la Figura 4.2.3.1 pueden observarse los resultados del ensayo sobre el efecto del pH y el quitosano en el crecimiento *in vitro* del aislado de *S. rolfsii* INTA IF-527. La modificación del valor pH por sí sola no afectó el crecimiento del patógeno, pero se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con quitosano a distintos pH, siendo el quitosano a pH 4 el que inhibió el crecimiento en su totalidad. Cuando el pH utilizado fue 6 y se combinó con quitosano, el patógeno tuvo un leve crecimiento, con diferencias estadísticas frente al resto de los tratamientos. Así, teniendo en cuenta que un pH cercano a 6 es frecuente en los sustratos comerciales, se eligió ese valor para avanzar en el ensayo siguiente.

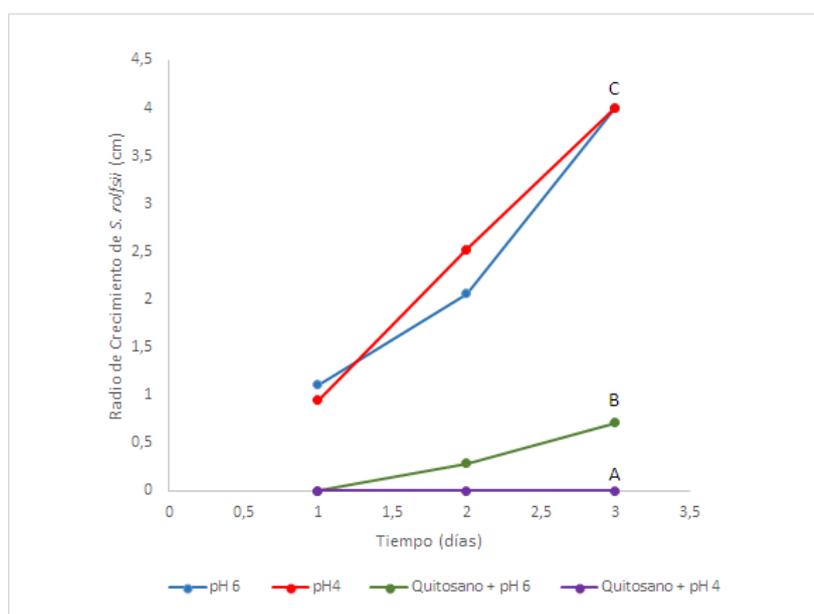


Figura 4.2.3.1. Efecto del pH y del quitosano en el crecimiento del aislado INTA IF-527 de *Sclerotium rolfsii*. Letras distintas sobre cada línea indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

b. Crecimiento de hongos patógenos de suelo en medio de cultivo con quitosano.

En la Tabla 4.2.3.1 se observa que el quitosano redujo el crecimiento de todos los aislados de manera significativa. Los de menor crecimiento fueron INTA IF-528 (*S. sclerotiorum*), 527 (*S. rolfsii*) y 534 (*F. proliferatum*). Para *R. solani* (INTA IF-523), si bien el quitosano tuvo un efecto

significativo, fue menos efectivo que para el resto de los patógenos. En general, la dosis utilizada fue efectiva para reducir el crecimiento de los aislados.

Tabla 4.2.3.1. Efecto del quitosano sobre el crecimiento *in vitro* de aislados fúngicos.

Aislado	Quitosano	Radio de crecimiento (cm)*
<i>S. sclerotiorum</i> INTA IF-528	Sí	0,0 a
<i>S. rolfsii</i> INTA IF-527	Sí	0,2 a
<i>F. proliferatum</i> INTA IF-534	Sí	0,5 a
<i>F. proliferatum</i> INTA IF-534	No	1,1 b
<i>S. sclerotiorum</i> INTA IF-528	No	1,8 c
<i>R. solani</i> INTA IF-523	Sí	2,5 d
<i>S. rolfsii</i> INTA IF-527	No	3,9 e
<i>R. solani</i> INTA IF-523	No	4,0 e

*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

c. Compatibilidad in vitro de quitosano con aislados de Trichoderma y efecto fungicida frente a Fusarium.

En la Tabla 4.2.3.2 se observan los resultados de compatibilidad de quitosano con los aislados de *Trichoderma* sp. INTA IF-549, 613, 614 y 630 a las 72 horas del inicio. Tanto en el ensayo 1 como en el 2, la aplicación de quitosano no inhibió el crecimiento de los aislados INTA IF-549 y 613. En cuanto a INTA-IF 614 y 630 el crecimiento fue inhibido entre un 42 y un 22 % respectivamente en el ensayo 1. En el ensayo 2, sólo INTA IF-614 fue inhibido por la aplicación de quitosano, en un 1,5 %. Es importante mencionar que INTA IF-630 pudo completar su crecimiento al cuarto día de iniciado el ensayo al igual que INTA IF-614 (ensayo 2). En cuanto al ensayo 1, INTA IF-614 no logró completar las placas de Petri y alcanzó un promedio de 35,5 mm al día 12 con lo cual, fue el aislado más afectado por quitosano.

Tabla 4.2.3.2. Efecto del quitosano en el crecimiento *in vitro* de *Trichoderma* sp. al tercer día de ensayo.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	Dosis de quitosano	Ensayo 1 Radio de crecimiento (mm)*	Ensayo 2 Radio de crecimiento (mm)*	Valor p**
INTA IF-614	7 l/ha	23,2 a	39,4 a	< 0,001
INTA IF-630	7 l/ha	31,3 b	40,0 b	< 0,001
INTA IF-614	0 l/ha	40,0 c	40,0 b	> 0,99
INTA IF-630	0 l/ha	40,0 c	40,0 b	> 0,99
INTA IF-549	0 l/ha	40,0 c	40,0 b	> 0,99
INTA IF-549	7 l/ha	40,0 c	40,0 b	> 0,99
INTA IF-613	0 l/ha	40,0 c	40,0 b	> 0,99
INTA IF-613	7 l/ha	40,0 c	40,0 b	> 0,99

*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

** Valor $p < 0,05$ indica diferencias significativas entre ensayos.

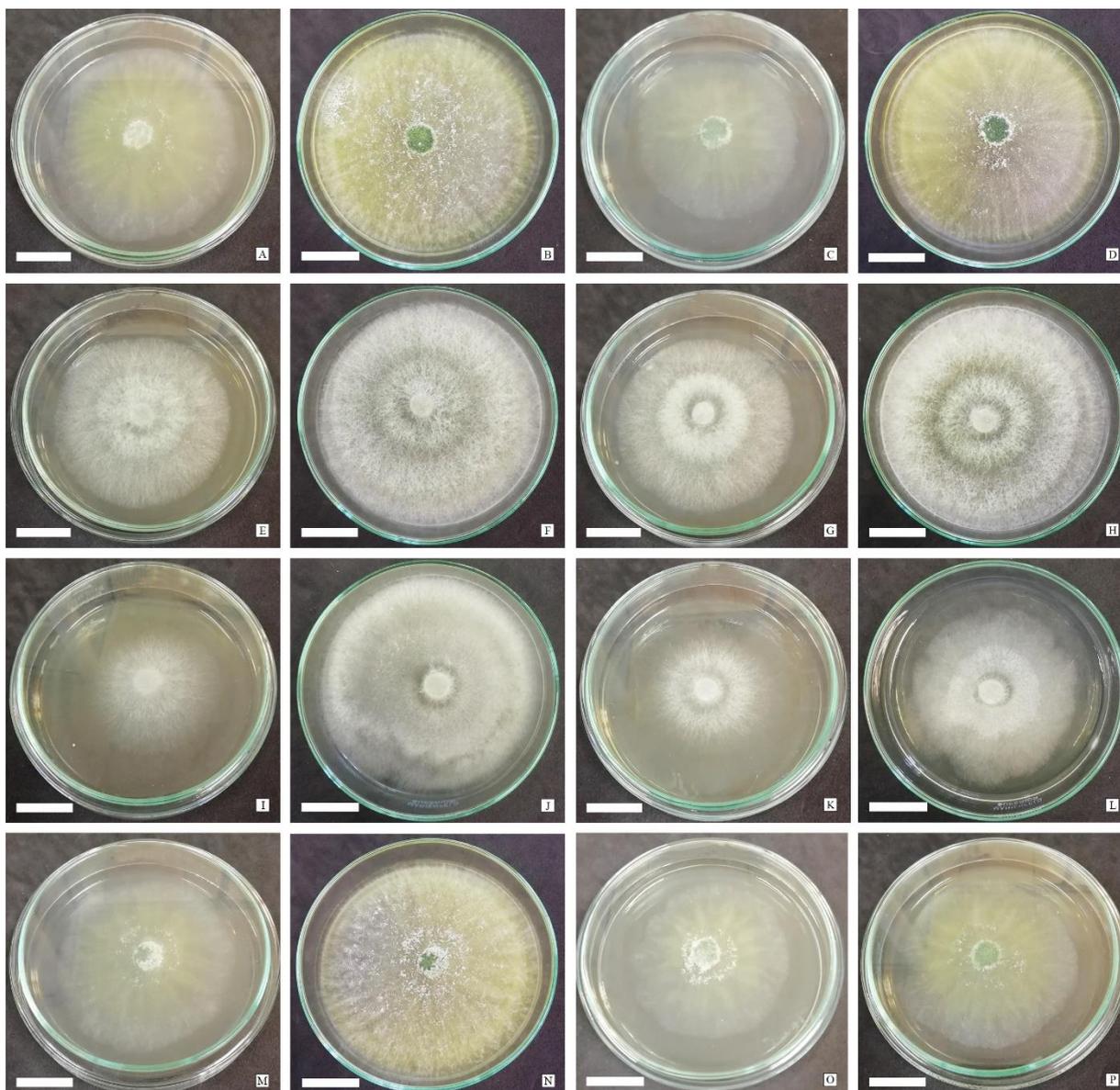


Figura 4.2.3.3. Cultivos de *Trichoderma* en medios de cultivo con y sin agregado de quitosano. A) INTA IF-549 sin quitosano a las 48 h; B) INTA IF-549 sin quitosano a las 72 h; C) INTA IF-549 con quitosano a las 48 h; D) INTA IF-549 con quitosano a las 72 h; E) INTA IF-613 sin quitosano a las 48 h; F) INTA IF-613 sin quitosano a las 72 h; G) INTA IF-613 con quitosano a las 48 h; H) INTA IF-613 con quitosano a las 72 h; I) INTA IF-614 sin quitosano a las 48 h; J) INTA IF-614 sin quitosano a las 72 h; K) INTA IF-614 con quitosano a las 48 h; L) INTA IF-614 con quitosano a las 72 h; M) INTA IF-630 sin quitosano a las 48 h; N) INTA IF-630 sin quitosano a las 72 h; O) INTA IF-630 con quitosano a las 48 h; P) INTA IF-630 con quitosano a las 72 h (Barra= 2 cm).

En cuanto al efecto del quitosano sobre *F. proliferatum*, los resultados pueden observarse en la Tabla 4.2.3.3. En ambos ensayos no existió inhibición de ningún aislado.

Tabla 4.2.3.3. Efecto del quitosano en el crecimiento *in vitro* de *F. proliferatum*.

Aislado de <i>Fusarium</i>	Dosis de quitosano	Ensayo 1 Radio de crecimiento (mm)*	Ensayo 2 Radio de crecimiento (mm)*	Valor p**
INTA IF-536	7 l/ha	21,6 a	21,9 a	0,63
INTA IF-536	0 l/ha	22,7 a	22,9 a	0,85
INTA IF-535	7 l/ha	25,1 b	25,2 b	0,9
INTA IF-534	0 l/ha	25,1 b	26 b	0,44
INTA IF-534	7 l/ha	26,4 b	26 b	0,59
INTA IF-535	0 l/ha	27,2 b	26,4 b	0,07

*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (p< 0,05).

** Valor p< 0,05 indica diferencias significativas entre ensayos.

En este trabajo el valor de pH influyó en la actividad del quitosano evidenciada por la modificación en el crecimiento de cuatro especies patógenas de suelo. A pH 4 fue inhibido el crecimiento de *S. rolfsii*; a pH 6, el de *S. sclerotiorum* y se controló el de *S. rolfsii*, *F. oxysporum* y *R. solani*. Tales resultados son compatibles con los de Papineau *et al.* (1991), Helander *et al.* (2001) y Devlieghere *et al.* (2004) que indicaron que el pH afecta la actividad del quitosano y es más efectivo a valores ácidos (pH= 4). Sin embargo, en estos niveles de acidez de sustrato es muy complejo desarrollar actividades agrícolas, por lo que fue elegido el valor de pH= 6 para avanzar en las pruebas. Según Valenzuela y Arias (2012) el mayor efecto antimicrobiano del quitosano a valores bajos de pH se explicaría por el carácter catiónico de este biopolímero. Así, a medida que disminuye el pH de la solución, los grupos amino de los monómeros de glucosamina se protonan fuertemente, se vuelven reactivos y desestabilizan a los lipopolisacáridos y las proteínas de la membrana celular. En estudios *in vitro* realizados por Stössel y Leuba (1984), el pH de los medios de cultivo modificó en gran medida la capacidad antifúngica del quitosano. A pH 4, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani* no crecieron en las placas sin quitosano, pero sí con quitosano. Dicho polímero presentó actividad diferencial en distintos medios de cultivo y pH. Así, se redujo el crecimiento de *C. lindemuthianum*, *F. oxysporum* y *Pythium paroecandrum* a pH 6 en APG, medio de Vogel y agar V-8, pero se incrementó el de *F. oxysporum* y *P. paroecandrum* a pH 8. *Phytophthora megasperma* fue fuertemente inhibida por quitosano en medio de Vogel (pH 6 u 8) y agar V-8 (pH 6).

La efectividad del quitosano evaluado en el apartado c para controlar el crecimiento *in vitro* de *F. proliferatum* fue nula. Estos resultados fueron opuestos a los observados en el ensayo b con otro producto. Es importante considerar que tanto la dosis, como las condiciones de extracción del quitosano, su granulometría, grado de acetilación y origen pueden determinar una diferente actividad biológica. El-Mohamedy *et al.* (2014) observaron que a mayor dosis de quitosano *in*

vitro hubo un mayor efecto inhibitor de cinco aislados de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Por otro lado, Stössel y Leuba (1984) hallaron que dosis de 10 mg/ml de quitosano con un diámetro de partícula menor a 50 µm redujeron notablemente el crecimiento radial de p.ej. *F. oxysporum* y *R. solani* y que la actividad antifúngica disminuyó con el aumento del diámetro de partícula hasta 600 µm. En ese mismo trabajo, se estudió el efecto de la quitina y dos formulaciones de quitosano (66 y 91 % de desacetilación). La quitina no tuvo efecto fungicida y aumentó el crecimiento de los aislados de *Fusarium* y *Pythium*, mientras que el control de los patógenos con dosis de 5 mg/ml de quitosano aumentó con el grado de acetilación. Estudios realizados por Chittenden y Singh (2009) permitieron detectar un mayor efecto del quitosano para inhibir el crecimiento fúngico cuando las pruebas se realizaron con esporas en comparación con el micelio. Con estos antecedentes bibliográficos y sobre la base de los resultados del presente trabajo, será necesario evaluar diferentes productos a distintas dosis, valores de pH, aislados fúngicos y medios de cultivo para poder ampliar el conocimiento en la temática. Posteriormente, se deberá continuar con estudios *in vivo* para extrapolar los resultados a condiciones de cultivo.

En cuanto a la compatibilidad del producto evaluado en el apartado c con los aislados de *Trichoderma*, en líneas generales no se produjo inhibición del crecimiento o si existió, fue transitoria. En estudios realizados por Chittenden y Singh (2009) del efecto *in vitro* de un formulado de quitosano para controlar un patógeno de la madera de manera complementaria con *T. harzianum*, a igual dosis un efecto fungistático afectó al patógeno, pero no al biocontrolador. En tales estudios los aislados de *Trichoderma* presentaron mayor tolerancia al quitosano que el patógeno. Torr *et al.* (2005) evaluaron el efecto del acetato y de mezclas de oligómeros de quitosano sobre patógenos de madera y *T. harzianum* y detectaron que, mientras las dosis utilizadas inhibían a los hongos patógenos, sólo afectaban la tasa de crecimiento de *Trichoderma* con fungistasis inicial. En el mismo sentido, diversos estudios documentaron la sensibilidad de aislados de *Trichoderma* a fungicidas sintéticos (Ferreira da Silva *et al.*, 1999; Harman *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 2002; Chaparro *et al.*, 2011; Ortellado y Fuente, 2013; Valdetaro, 2018; Crimer, 2021). Lanzuise *et al.* (2002) demostraron la capacidad del género para producir transportadores en procesos de detoxificación, que podrían ser indispensables para la supervivencia en ambientes alterados por la actividad humana y a efectos de antibióticos o enzimas generadas por otros hongos del suelo. Esto podría explicar la capacidad de *Trichoderma* para sobrevivir en ambientes con diversas concentraciones y formulaciones de quitosano.

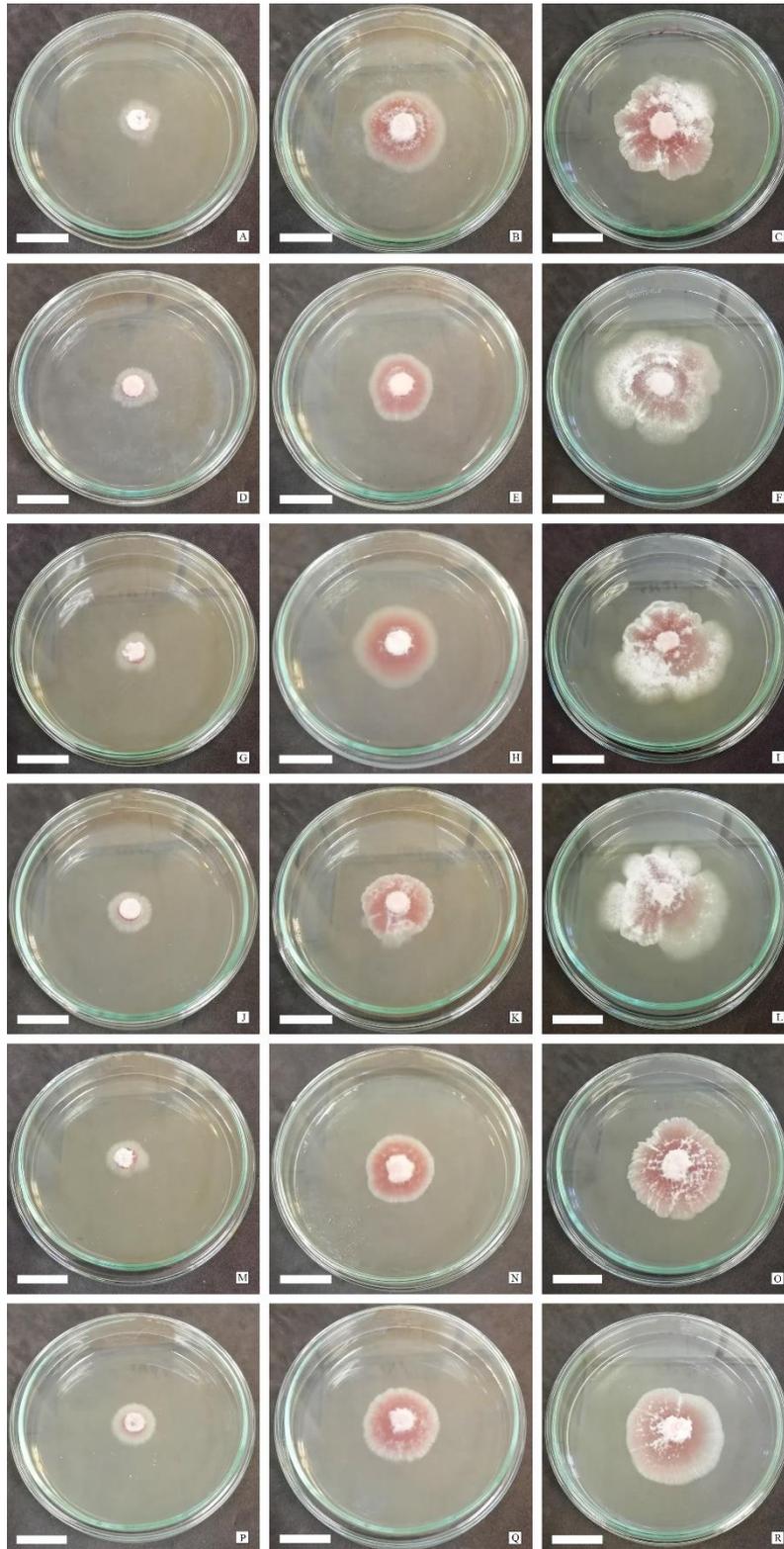


Figura 4.2.3.3. Cultivos de *F. proliferatum* en medios de cultivo con y sin agregado de quitosano. A) INTA IF-534 sin quitosano a las 48 h; B) INTA IF-534 sin quitosano a las 96 h; C) INTA IF-534 sin quitosano a las 168 h; D) INTA IF-534 con quitosano a las 48 h; E) INTA IF-534 con quitosano a las 96 h; F) INTA IF-534 con quitosano a las 168 h; G) INTA IF-535 sin quitosano a las 48 h; H) INTA IF-535 sin quitosano a las 96 h; I) INTA IF-535 sin quitosano a las 168 h; J) INTA IF-535 con quitosano a las 48 h; K) INTA IF-535 con quitosano a las 96 h; L) INTA IF-535 con quitosano a las 168 h; M) INTA IF-536 sin quitosano a las 48 h; N) INTA IF-536 sin quitosano a las 96 h; O) INTA IF-536 sin quitosano a las 168 h; P) INTA IF-536 con quitosano a las 48 h; Q) INTA IF-536 con quitosano a las 96 h; R) INTA IF-536 con quitosano a las 168 h (Barra= 2 cm).

4.2.4 Conclusiones

- La actividad de un producto formulado en base a quitosano impidió el crecimiento *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* a pH 4 y lo limitó a pH 6.
- La actividad de otro producto formulado en base a quitosano disminuyó el crecimiento *in vitro* de *S. rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium proliferatum* y *Rhizoctonia solani* a pH 6.
- El quitosano permitió el crecimiento de aislados de *Trichoderma* sp. biocontroladores de *F. oxysporum* y promotores del crecimiento de calibrachoa.

4.3. Conclusiones del capítulo

- Las variedades de calibrachoa difirieron en su resistencia a la inoculación con *Fusarium proliferatum*.
- La capacidad del quitosano para inhibir el crecimiento de patógenos fúngicos de suelo dependió del producto evaluado y del pH del medio de cultivo.
- *Trichoderma* creció en presencia de quitosano en el medio de cultivo.

4.4. Bibliografía

- Agrios GN. 1995. Fitopatología. Ciudad de México, México: Ed. Limusa. 838 pp.
- Anjani K, Ponukumatla B, Mishra D, Ravulapalli DP. 2018. Identification of simple-sequence-repeat markers linked to *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *carthami*) resistance and marker-assisted selection for wilt resistance in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) interspecific offsprings. *Plant Breed.* 137(6): 1-8. DOI: 10.1111/pbr.12636.
- Bakshia P, Selvakumar D, Kadirvelu K, Kumar N. 2019. Chitosan as an environment friendly biomaterial- a review on recent modifications and applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 150(1): 1072-1083. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113.
- Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* 6(2): 71-79. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- Burbano-Figueroa O. 2020. Resistencia de plantas a patógenos: una revisión sobre los conceptos de resistencia vertical y horizontal. *Rev. Argent. Microbiol.* 52(3): 245-255. DOI: 10.1016/j.ram.2020.04.006.
- Chaparro AP, Hoyos Caravajal L, Orduz S. 2011. Fungicide tolerance of *Trichoderma asperelloides* and *T.harzianum* strains. *Agric. Sci.* 2(3): 301-307. DOI: 10.4236/as.2011.23040.
- Chittenden C, Singh T. 2009. *In vitro* evaluation of combination of *Trichoderma harzianum* and chitosan for the control of sapstain fungi. *Biol. Control.* 50: 262-266. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2009.04.015.
- Cifone N, Kiehr M, Delhey R, Agulló E. 1999. El potencial de quitosano y de ácido acético para controlar podredumbres de poscosecha en zapallo anquito. *Resúmenes X Jornadas Fitosanitarias Argentinas.* P. 85.
- Cifone N, Delhey R, Kiehr M, Agulló E, Martínez RS, Chaves H. 2001. Quitosano controla podredumbres de frutos de zapallo anquito (*Cucurbita moschata*). En: *Resúmenes Taller Química de quitina y quitosanos y su aplicación en control ambiental.* Pp. 53-55.
- Crimer DL; Borrelli NP; Tognetti PM; Wright ER. 2021. Avances para el manejo integrado de *Sclerotinia sclerotiorum*: Compatibilidad de cepas nativas de *Trichoderma* con Fluazinam. 5to Congreso Argentino de Fitopatología. 59th Meeting of the APS Caribbean Division. Recuperado de: <http://aafitopatologos.com.ar/wp/wp-content/uploads/2021/11/Libro-de-Res%C3%BAmenes-5%C2%BACAF-Final.pdf>.
- Croser JS, Ahmad F, Clarke HJ, Siddique KHM. 2003. Utilization of wild cicer in chickpea improvement– progress, constraints and prospects. *Aust. J. Agric. Res.* 54(5): 429-444. DOI: 10.1071/AR02157.
- Devlieghere F, Vermeulen A, Debevere J. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interacciones with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiol.* 21:703-714. DOI: 10.1016/j.fm.2004.02.008.

El-Mohamedy SRS Abdel-Kareem F, Jabnoun-Khiareddine H, Daami-Remadi M. 2014. Chitosan and *Trichoderma harzianum* as fungicide alternatives for controlling *Fusarium* crown and root rot of tomato. Tunis. J. Plant Prot. 9(1): 31-43.

Espinosa-Cavazos KG, Sáenz-Galindo A y Castañeda-Facio AO. 2020. Películas de quitosano propiedades y aplicaciones. Afinidad 77(591): 203-208. Recuperado de: <https://www.raco.cat/index.php/afinidad/article/download/377418/470720/>.

Ferreira da Silva A, Echeveste da Rosa CR, Soares de Melo I. 1999. Sensibilidade de isolados de *Trichoderma* spp. a Benomil e Iprodione. Cienc. Rural 29(3): 395-399. DOI: 10.1590/S0103-84781999000300003.

Filyushin MA, Anisimova OK, Kochieva EZ, Shchennikova AV. 2021. Genome-wide identification and expression of chitinase class I genes in garlic (*Allium sativum* L.) cultivars resistant and susceptible to *Fusarium proliferatum*. Plants 10(4): 1-21. DOI: 10.3390/plants10040720.

Galeana-Sánchez E, Sánchez-Rangel D, de la Torre-Hernández ME, Nájera-Martínez M, Ramos-Villegas P, Plasencia J. 2017. Fumonisin B1 produced in planta by *Fusarium verticillioides* is associated with inhibition of maize β -1,3-glucanase activity and increased aggressiveness. Physiol. Mol. Plant Pathol. 100: 75-83. DOI: 10.1016/j.pmpp.2017.07.003.

Galván GA, Koning-Boucoiran CFS, Koopman WJM, Burger-Meijer K, González PH, Waalwijk C, Kik C, Scholten OE. 2008. Genetic variation among *Fusarium* isolates from onion, and resistance to *Fusarium* basal rot in related *Allium* species. Eur. J. Plant Pathol. 121(4): 499-512. DOI: 10.1007/s10658-008-9270-9.

Galvez LC, Banerjee J, Pinar H, Mitra A. 2014. Engineered plant virus resistance. Plant Sci. 228: 11-25. DOI: 10.1016/j.plantsci.2014.07.006.

García-Pineda E y Lozoya-Gloria E. 2004. Genes de resistencia a enfermedades en plantas. Rev. Mex. Fitopatol. 22(3): 414-422. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222315>.

Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 43: 205-227. DOI: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923.

Goñi MG, Moreira MR, Viacava GE, Roura SI. 2010. Aplicación de quitosano a semillas de lechuga manteca: efecto sobre la carga microbiana y la germinación. Resúmenes XXXIII Congreso Argentino de Horticultura. P. 407.

Greppi JA, Hagiwara JC, Stehmann JR. 2013. Novedades de Calibrachoa (Solanaceae) y notas taxonómicas sobre el género en la Argentina. Darwiniana nueva serie 1: 173-186.

Gupta P, Ravi I, Sharma V. 2013. Induction of β -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. J. Plant Interact. 8(2): 155-161. DOI: 10.1080/17429145.2012.679705.

Harman GE, Latorre B, Agosin E, San Martin R, Riegel DG, Nielsen PA, Tronsmo A, Pearson RC. 1996. Biological and integrated control of *Botrytis* bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. Biol. Control 7: 259-266. DOI: 10.1006/bcon.1996.0092.

Helander IM, Nurmiäho-Lassila EL, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. 2001. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 71(2-3): 235-244. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00609-2.

Hudson SM, Smith C. 1998. Polysaccharides: chitin and chitosan: chemistry and technology of their use as structural materials. En: Kaplan DL (Ed.). *Biopolymers from renewable resources. Macromolecular systems - Materials approach.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 420 pp. DOI: 10.1007/978-3-662-03680-8_4

Jones JD, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329. DOI: 10.1038/nature05286.

Keller B, Feuilleti C, Messmer M. 2000. Genetics of disease resistance. Basic concepts and application in resistance breeding. En: Slusarenko AJ, Fraser RSS, van Loon LC (Eds.). *Mechanisms of resistance to plant diseases.* Springer-science business media, Dordrecht, The Netherlands. DOI 10.1007/978-94-011-3937-3.

Kuc J. 1992. Antifungal compounds from plants. En: Nigg HN, Seigler D. (Eds.). *Phytochemical resources for medicine and agriculture.* Springer. New York. 445 pp. DOI: 10.1007/978-1-4899-2584-8_7.

Kumar S, Imtiaz M, Gupta S, Pratap A. 2011. Distant hybridization and alien gene introgression. En: Pratap A y Kumar J (Eds.). *Biology and breeding of food legumes.* CAB International, Wallingford, United Kingdom. 418 pp. DOI: 10.1079/9781845937669.0000

Kushalappa AC, Gunnaiah R. 2013. Metabolo-proteomics to discover plant biotic stress resistance genes. *Trends Plant Sci.* 18(9): 522-531. DOI: 10.1016/j.tplants.2013.05.002.

Kushalappa AC, Yogendra KN, Karre S. 2016. Plant innate immune response: qualitative and quantitative resistance. *Plant Sci.* 35(1): 38-55. DOI: 10.1080/07352689.2016.1148980.

Lanzuise S, Ruocco M, Scala V, Woo SL, Scala F, Vinale F, Del Sorbo G, Lorito M. 2002. Cloning of ABC transporter-encoding genes in *Trichoderma* spp. to determine their involvement in biocontrol. *J. Plant Pathol.* 84(3):184.

Liu W, Liu J, Ning Y, Ding B, Wang X, Wang Z, Wang GL. 2013. Recent progress in understanding PAMP-and effector-triggered immunity against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant.* 6(3): 605-620. DOI: 10.1093/mp/sst015.

Majeti N y Kumar R. 2000. A review: chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* 46(1): 1-27. DOI: 10.1016/S1381-5148(00)00038-9

Mandal S, Mitra A, Mallick N. 2009. Time course study on accumulation of cell wall-bound phenolics and activities of defense enzymes in tomato roots in relation to *Fusarium* wilt. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 795-802. DOI: 10.1007/s11274-008-9951-8.

Mármol Z, Páez G, Rincón M, Araujo K, Aiello C, Chandler C, Gutiérrez E. 2011. Quitina y quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU* 1: 53-58.1.

Michielse CB y Rep M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* 10(3): 311-324. DOI: 10.1111/J.1364-3703.2009.00538.X.

- Modafar CE, Tantaoui A, Boustani E. 2000. Changes in cell wall-bound phenolic compounds and lignin in roots of date palm cultivars differing in susceptibility to *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. J. Phytopathology 148: 405-411. DOI: 10.1046/j.1439-0434.2000.00512.x.
- Moerschbacher B y Mendgen K. 2000. Structural aspects of defense. En: Slusarenko AJ, Fraser RSS, van Loon LC. Mechanisms of resistance to plant diseases. Springer Dordrecht. The Nederland. 628 pp. DOI: 10.1007/978-94-011-3937-3.
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. Immunol. Rev. 198(1): 249-266. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.0119.x.
- Ortellado BMF y Fuente ALO. 2013. Compatibilidad *in vitro* de aislados nativos de *Trichoderma* spp. con fungicidas para el tratamiento de semillas. Investigación Agraria 15(1): 15-22. Recuperado de: <https://www.agr.una.py/revista/index.php/ria/article/view/2>.
- Papineau A, Hoover D, Knorr D, Farkas D. 1991. Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. Food Biotechnol. 5: 45-57. DOI: 10.1080/08905439109549790.
- Poland JA, Balint-Kurti PJ, Wisser RJ, Pratt RC, Nelson RJ. 2009. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. Trends Plant Sci. 14(1): 21-29. DOI: 10.1016/j.tplants.
- Ramírez M, Rodríguez A, Alfonso L, Peniche C. 2010. Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. Biotechnol. Apl. 27(4): 270-276. Recuperado de: <http://scielo.sld.cu/pdf/bta/v27n4/bta02410.pdf>.
- Ren L, Yan X, Zhou J, Tong J, Su X. 2017. Influence of chitosan concentration on mechanical and barrier properties of corn starch/Chitosan films. Int. J. Biol. Macromol. 105 (3): 1636-1643. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.008.
- Rodríguez MS, Ramos V, Pistonesi M, Delhey R, Agulló E. 1999. Preservación de peras con filmes de quitosano. Parte I. Resúmenes VIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Schumann GL. 1991. Plant Diseases: Their biology and social impact. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 397 pp.
- Scott JW, Agrama HA, Jones JP. 2004. RFLP-based analysis of recombination among resistance genes to *Fusarium* wilt races 1, 2, and 3 in tomato. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 129(3): 394-400.
- Shahidi F y Synowiecki J. 1991. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. J. Agric. Food Chem. 39: 1527-1532. DOI: 10.1021/jf00008a032.
- Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon YJ. 1999. Food applications of chitin and chitosans. Trends Food Sci. Technol. 10: 37-57. DOI: 10.1016/S0924-2244(99)00017-5.
- Singh T, Wakeling R, Kreber B, Jaspers MV, Stewart A. 2002. Advances in understanding the mode of action of MBT fungicide used in wood protection. N. Z. Plant Prot. 55:63-67. DOI: 10.30843/nzpp.2002.55.3920.

Stössel P, Leuba JL. 1984. Effect of chitosan, chitin and some aminosugars on growth of various soilborne phytopathogenic fungi. J. Phytopathol. 111(1): 82-90. DOI: 10.1111/j.1439-0434.1984.tb04244.x.

Tolaimate A, Desbrières J, Rhazi M, Alagui A, Vincendon M, Vottero, P. 2000. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. Polymer 41(7): 2463-2469. DOI: 10.1016/S0032-3861(99)00400-0.

Tombion L. 2022. Estudio de *Potyvirus* y *Nigrospora oryzae* como agentes patógenos del género *Calibrachoa*. Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 137 pp.

Torr KM, Chittenden C, Franich RA, Kreber B. 2005. Advances in understanding bioactivity of chitosan and chitosan oligomers against selected wood-inhabiting fungi. Holzforschung 59: 559-567. DOI: 10.1515/HF.2005.092.

Valdettaro RA, Borrelli NP, Wigdorovitz PI. 2018. Evaluación de la compatibilidad *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con un fungicida comercial. VIII Jornadas de Jóvenes Investigadores. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. Recuperado de: <http://www.fvet.uba.ar/archivos/investigacion/Libro-de-resumenes.pdf>.

Valenzuela V y Arias JI. 2012. Potenciales aplicaciones de películas de quitosano en alimentos de origen animal: una revisión. Av. Cienc. Vet. 27(1): 33-46. DOI: 10.5354/acv.v27i1.21997.

van der Does HC, Constantin ME, Houterman PM, Takken FLW, Cornelissen BJC, Haring MA, van den Burg HA, Rep M. 2019. *Fusarium oxysporum* colonizes the stem of resistant tomato plants, the extent varying with the R-gene present. Eur. J. Plant Pathol. 154: 55-65. DOI: 10.1007/s10658-018-1596-3.

van der Plank JE. 1966. Horizontal (polygenic) and vertical (oligogenic) resistance against blight. Am. Potato J. 43: 43-52. DOI: 10.1007/BF02871406.

Varun TK, Senani S, Jayapal N, Chikkerur J, Roy S, Tekulapally VB, Gautam M, Kumar N. 2017. Extraction of chitosan and its oligomers from shrimp shell waste, their characterization and antimicrobial effect. Vet. World 10(2): 170-175. Recuperado de: www.veterinaryworld.org/Vol.10/February-2017/6.pdf.

Vergne E, Grand X, Ballini E, Chalvon V, Saindrenan P, Tharreau D, Notténgem JL, Morel JB. 2010. Preformed expression of defense is a hallmark of partial resistance to rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. BMC Plant Biol. 10(206): 1-17. DOI: 10.1186/1471-2229-10-206.

Whetzel HH. 1929. The terminology of plant pathology. Proc. Int. Cong. Plant Science, Ithaca, Nueva York.

Yommi A, Escande A, López Camelo A, Cendoya G, Sozzi G. 2005. Efecto del quitosano aplicado en pre-cosecha sobre la pudrición del tomate causada por *Alternaria alternata*. Resúmenes XVIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. P. 337.

Zhang Y, Lubberstedt T, Xu M. 2013. The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. J. Genet. Genomics 40: 23-35. DOI: 10.1016/j.jgg.2012.11.003.

5. Conclusiones generales

- Se cumplieron todos los objetivos planteados y se validaron las hipótesis.
- *Fusarium* fue el género prevalente entre los patógenos de calibrachoa, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. fujikuroi* causaron marchitez debida a la podredumbre basal. *Fusarium proliferatum* INTA IF-535, 536 y 569 fueron los aislados más agresivos. Además de calibrachoa, tres aislados de *F. proliferatum* y uno de *F. oxysporum* marchitaron petunia y dos aislados de *F. oxysporum* marchitaron nierembergia.
- El uso de escalas en las pruebas de agresividad y de respuesta varietal resultó apropiado.
- *Sclerotinia sclerotiorum* y *Ceratobasidium* sp. AG-A formaron parte del complejo de hongos de suelo patógeno de calibrachoa y causaron marchitez. *S. sclerotiorum* también ocasionó tizón en calibrachoa y marchitó nierembergia y petunia.
- *Nigrospora oryzae* se identificó como agente causal de manchas foliares en calibrachoa.
- Todos los patógenos detectados fueron citados por primera vez en calibrachoa a nivel mundial.
- De los aislados de *Trichoderma* sp. de la rizosfera de calibrachoa, *T. longibrachiatum* INTA IF-549, 612 y 630 y *T. koningiopsis* INTA IF-613 y 614 presentaron una alta eficiencia biocontroladora de *F. proliferatum* INTA IF-535 y 536 *in vitro* y una elevada capacidad de colonización del sustrato Z-Floricultura de Terrafertil®. INTA IF-613 y 630 mantuvieron la capacidad de biocontrol en los ensayos *in vivo*. La producción de inóculo de *Trichoderma* en arroz y la dosis del 1% v/v en el sustrato resultaron exitosas. *T. koningiopsis* INTA IF-613 sobresalió por su capacidad de promoción de crecimiento de las variedades de calibrachoa.
- En inoculaciones con *F. proliferatum* INTA IF-535 y 536, la variedad Pampa Salmón-INTA fue la más resistente a la marchitez.
- La colección de patógenos y biocontroladores se conservó con éxito en agua destilada, vaselina y en papel.
- La actividad del quitosano en biocontrol dependió del producto estudiado y del pH del medio de cultivo. El polímero no influyó en el crecimiento *in vitro* de *Trichoderma*.
- Esta tesis constituyó un estudio integral de las patologías asociadas a la calibrachoa y de su manejo biológico. La integración de una estrategia genética (variedad resistente) con una biológica (aislado de *Trichoderma*) y una química (quitosano) permiten manejar la marchitez por *Fusarium* y aumentar el crecimiento vegetal.
- La aplicación de los conocimientos generados permitirá mejorar la calidad de la producción florícola mediante el manejo de la sanidad con prácticas eco compatibles.

6. Anexo

6.1. Dimensiones de micro y macroconidios de *Fusarium* spp.

Aislado	Microconidios		Macroconidios		Aislado	Microconidios		Macroconidios	
	Largo (µm)	Ancho (µm)	Largo (µm)	Ancho (µm)		Largo (µm)	Ancho (µm)	Largo (µm)	Ancho (µm)
INTA IF-534	11,95	2,92	50,6	3,2	INTA IF-535	11,95	3,22	37	3,9
INTA IF-534	7,53	2,92	46,5	3	INTA IF-535	9,66	2,33	30,4	3
INTA IF-534	9,55	1,64	33,2	2,7	INTA IF-535	9,36	2,92	47,8	4,3
INTA IF-534	6,8	2,28	60,7	3,4	INTA IF-535	6,77	1,64	30,4	3,9
INTA IF-534	9,05	1,96	59,5	3,7	INTA IF-535	8,22	2,76	30,4	3
INTA IF-534	8,86	2,33	44,1	2,6	INTA IF-535	5,57	2,46	35,2	3,7
INTA IF-534	8,24	1,96	39,7	3,3	INTA IF-535	6,46	2,33	47,8	4,3
INTA IF-534	8,96	1,61	49,4	3,5	INTA IF-535	8,27	2,33	30,4	3,1
INTA IF-534	5,34	1,29	74,5	2,9	INTA IF-535	6,77	2,6	31,4	3,9
INTA IF-534	5,81	1,93	54	2,3	INTA IF-535	7,93	2,33	30,9	3,5
INTA IF-534	7,61	2,16	51,2	3	INTA IF-535	7,55	2,35		
INTA IF-534	7,93	1,74	74,5	3,7	INTA IF-535	9,18	3,18		
INTA IF-534	8,71	2,28	33,2	2,3	INTA IF-535	11,1	3,43		
INTA IF-534	8,51	2,74			INTA IF-535	6,98	2,6		
INTA IF-534	5,49	1,74			INTA IF-535	6,52	2,35		
INTA IF-534	6,98	1,82			INTA IF-535	8,96	2,52		
INTA IF-534	11,41	2,07			INTA IF-535	8,68	2,16		
INTA IF-534	8,39	2,16			INTA IF-535	12,27	3,87		
INTA IF-534	4,65	1,37			INTA IF-535	9,09	2,88		
INTA IF-534	7,81	1,82			INTA IF-535	8,29	3,18		
INTA IF-534	6,98	1,37			INTA IF-535	6,89	2,35		
INTA IF-534	5,57	2,28			INTA IF-535	11,54	3,37		
INTA IF-534	5,48	1,44			INTA IF-535	10	4,19		
INTA IF-534	6,46	1,61			INTA IF-535	7,21	3,76		
INTA IF-534	6,35	1,88			INTA IF-535	8,96	2,28		
INTA IF-536	7,85	3,04	23,9	4,3	INTA IF-538	8,29	2,6	21,74	2,17
INTA IF-536	9,89	2,16	26,1	2,4	INTA IF-538	5,74	2,46	28,26	3,91
INTA IF-536	7,1	2,46	30,4	3	INTA IF-538	9,35	1,29	23,91	2,61
INTA IF-536	7,91	2,35	23,9	2,2	INTA IF-538	7,69	1,61	30,43	4,35
INTA IF-536	12,29	2,97	21,7	1,9	INTA IF-538	7,81	2,07	28,26	2,39
INTA IF-536	8,32	3,43	37	4,8	INTA IF-538	5,89	2,52	26,09	4,35
INTA IF-536	7,21	2,77	28,4	4,5	INTA IF-538	8,27	1,88	26,45	3,3
INTA IF-536	6,16	1,88	26,5	3,7	INTA IF-538	7,07	1,61	30,43	4,35
INTA IF-536	6,9	2,74	25,8	2,5	INTA IF-538	5,92	2,07	21,74	2,17
INTA IF-536	5,34	2,6	28,1	2,1	INTA IF-538	9,75	2,35	26,2	3,2
INTA IF-536	9,59	2,76			INTA IF-538	6,65	2,52		
INTA IF-536	10,5	2,97			INTA IF-538	7,69	1,29		
INTA IF-536	7,8	3,61			INTA IF-538	9,13	2,52		
INTA IF-536	7,98	3,49			INTA IF-538	6,4	2,33		
INTA IF-536	9,23	2,97			INTA IF-538	4,79	1,88		
INTA IF-536	9,83	3,04			INTA IF-538	4,65	1,61		
INTA IF-536	5,81	3,18			INTA IF-538	8,97	1,61		
INTA IF-536	6,12	2,6			INTA IF-538	9,62	2,88		
INTA IF-536	7,08	2,6			INTA IF-538	7,1	2,46		
INTA IF-536	11,4	2,97			INTA IF-538	7,87	2,35		
INTA IF-536	6,84	2,52			INTA IF-538	6,98	2,07		
INTA IF-536	5,71	2,52			INTA IF-538	5,92	2,52		
INTA IF-536	5,81	2,97			INTA IF-538	5,41	2,04		
INTA IF-536	6,2	2,9			INTA IF-538	6,89	2,97		
INTA IF-536	6,84	2,8			INTA IF-538	7,28	2,28		
INTA IF-559	6,4	2,88			INTA IF-566	8,61	3,61		
INTA IF-559	5,89	2,28			INTA IF-566	8,41	4,65		
INTA IF-559	5,49	3,56			INTA IF-566	11,22	4,65		
INTA IF-559	8,68	2,76			INTA IF-566	6,71	4,1		
INTA IF-559	4,93	1,64			INTA IF-566	9,57	4,91		
INTA IF-559	4,91	1,93			INTA IF-566	7,75	2,92		
INTA IF-559	6,14	1,61			INTA IF-566	4,65	2,76		
INTA IF-559	6,58	1,88			INTA IF-566	7,25	3,94		
INTA IF-559	6,36	2,33			INTA IF-566	6,45	3,55		
INTA IF-559	9	2,16			INTA IF-566	6,84	3,88		
INTA IF-559	4,49	2,6			INTA IF-566	4,93	3,37		
INTA IF-559	4,79	2,88			INTA IF-566	6,4	3,43		
INTA IF-559	4,62	2,66			INTA IF-566	10,45	3,56		
INTA IF-559	6,2	2,76			INTA IF-566	5,21	3,32		
INTA IF-559	5,63	2,28			INTA IF-566	7,31	3,19		
INTA IF-559	5,16	1,64			INTA IF-566	10,29	3,9		
INTA IF-559	5,2	2,28			INTA IF-566	10,84	3,18		
INTA IF-559	6,4	1,61			INTA IF-566	10,97	4,04		
INTA IF-559	5,49	1,61			INTA IF-566	9,08	3,56		
INTA IF-559	4,53	2,77			INTA IF-566	10,73	3,76		
INTA IF-559	5,37	2,07			INTA IF-566	8,12	3,37		
INTA IF-559	8,06	2,66			INTA IF-566	8,06	2,6		
INTA IF-559	5,8	2,26			INTA IF-566	6,23	4,04		
INTA IF-559	5,1	1,74			INTA IF-566	8,51	3,19		
INTA IF-559	5,2	2,92			INTA IF-566	8,51	2,97		
INTA IF-567	9,03	3,37			INTA IF-569	13,54	2,9		
INTA IF-567	7,35	2,74			INTA IF-569	7,85	2,6		
INTA IF-567	6,4	2,33			INTA IF-569	9,75	2,97		
INTA IF-567	6,89	3,24			INTA IF-569	9,04	2,76		
INTA IF-567	7,98	2,97			INTA IF-569	10,1	3,29		
INTA IF-567	5,84	2,97			INTA IF-569	10,12	3,06		
INTA IF-567	6,14	2,6			INTA IF-569	6,8	3,32		
INTA IF-567	6,39	2,77			INTA IF-569	9,1	2,97		
INTA IF-567	5,95	2,28			INTA IF-569	6,2	3,19		
INTA IF-567	8,41	2,52			INTA IF-569	15	3,18		
INTA IF-567	6,71	2,07			INTA IF-569	7,67	3,32		
INTA IF-567	6,35	2,46			INTA IF-569	8,77	3,68		
INTA IF-567	7,37	2,6			INTA IF-569	7,53	2,97		

INTA IF-567	7,07	2,33	INTA IF-569	8,06	2,97
INTA IF-567	5,77	3,04	INTA IF-569	8,86	2,97
INTA IF-567	11,69	2,92	INTA IF-569	8,06	3,19
INTA IF-567	5,29	2,52	INTA IF-569	7,42	2,6
INTA IF-567	7,45	2,76	INTA IF-569	8,67	3,04
INTA IF-567	7,31	2,52	INTA IF-569	7,31	2,52
INTA IF-567	8,68	3,04	INTA IF-569	7,12	2,92
INTA IF-567	9,31	2,6	INTA IF-569	8,06	2,66
INTA IF-567	8,07	1,93	INTA IF-569	11,69	3,29
INTA IF-567	6,26	2,33	INTA IF-569	8,08	3,32
INTA IF-567	5,49	2,28	INTA IF-569	8,12	2,58
INTA IF-567	5,89	2,66	INTA IF-569	8,39	3,32
INTA IF-577	10,81	4,49			
INTA IF-577	8,59	3,76			
INTA IF-577	8,09	2,92			
INTA IF-577	8,61	3,92			
INTA IF-577	10,45	4,56			
INTA IF-577	7,31	4,1			
INTA IF-577	8,22	3,68			
INTA IF-577	7,21	3,94			
INTA IF-577	12,09	3,92			
INTA IF-577	10,34	4,2			
INTA IF-577	12,27	3,88			
INTA IF-577	13,61	4,79			
INTA IF-577	9,37	4,34			
INTA IF-577	9,75	4,34			
INTA IF-577	7,75	3,19			
INTA IF-577	12,34	3,29			
INTA IF-577	8,86	2,6			
INTA IF-577	7,85	2,28			
INTA IF-577	11,63	3,92			
INTA IF-577	7,75	3,87			
INTA IF-577	7,16	4,79			
INTA IF-577	9,09	4,19			
INTA IF-577	9,37	2,92			
INTA IF-577	7,36	3,49			
INTA IF-577	11,08	3,92			

6.2. Agresividad de aislados de *Fusarium* en variedades de calibrachoa. Ensayos 1, 2 y 3.

Aislado	Variedad	Repetición	Peso seco raíz (mg)	Peso seco tallo (mg)	Escala aérea (grados)	Escala raíz (grados)
Testigo	INTA06575	1	61	412	0	1
Testigo	INTA06575	2	75	848	0	5
Testigo	INTA06575	3	172	548	0	3
Testigo	OVERA	1	318	1220	0	1
Testigo	OVERA	2	308	598	0	1
Testigo	OVERA	3	195	995	0	3
Testigo	PAMPA	1	216	674	0	3
Testigo	PAMPA	2	254	600	0	3
Testigo	PAMPA	3	215	790	0	3
INTA IF-534	INTA06575	1	179	885	2	4
INTA IF-534	INTA06575	2	302	1074	2	3
INTA IF-534	INTA06575	3	150	821	2	4
INTA IF-534	OVERA	1	435	847	3	3
INTA IF-534	OVERA	2	213	940	2	3
INTA IF-534	OVERA	3	172	910	1	3
INTA IF-534	PAMPA	1	153	1060	0	2
INTA IF-534	PAMPA	2	330	1013	2	2
INTA IF-534	PAMPA	3	415	799	0	2
INTA IF-535	INTA06575	1	245	950	0	2
INTA IF-535	INTA06575	2	408	136	1	2
INTA IF-535	INTA06575	3	329	1051	1	1
INTA IF-535	OVERA	1	149	818	2	4
INTA IF-535	OVERA	2	251	1011	1	2
INTA IF-535	OVERA	3	243	899	2	3
INTA IF-535	PAMPA	1	325	683	0	3
INTA IF-535	PAMPA	2	333	858	0	2
INTA IF-535	PAMPA	3	378	742	0	2
INTA IF-536	INTA06575	1	226	1042	2	2
INTA IF-536	INTA06575	2	218	1047	2	3
INTA IF-536	INTA06575	3	252	1109	0	1
INTA IF-536	OVERA	1	311	943	1	1
INTA IF-536	OVERA	2	352	1386	1	1
INTA IF-536	OVERA	3	162	923	4	4
INTA IF-536	PAMPA	1	303	633	0	1
INTA IF-536	PAMPA	2	538	968	0	1
INTA IF-536	PAMPA	3	438	770	0	2
INTA IF-538	INTA06575	1	58	940	1	5
INTA IF-538	INTA06575	2	170	910	1	3
INTA IF-538	INTA06575	3	192	954	2	2
INTA IF-538	OVERA	1	271	1095	4	3
INTA IF-538	OVERA	2	203	960	4	4
INTA IF-538	OVERA	3	322	966	2	2
INTA IF-538	PAMPA	1	370	789	0	1
INTA IF-538	PAMPA	2	494	1124	0	1
INTA IF-538	PAMPA	3	281	593	0	1
INTA IF-559	INTA06575	1	347	1315	0	2
INTA IF-559	INTA06575	2	177	1083	0	3
INTA IF-559	INTA06575	3	33	207	1	3
INTA IF-559	OVERA	1	245	1162	2	3
INTA IF-559	OVERA	2	220	943	2	3
INTA IF-559	OVERA	3	235	1041	3	2

INTA IF-559	PAMPA	1	302	829	2	1
INTA IF-559	PAMPA	2	313	821	0	2
INTA IF-559	PAMPA	3	291	862	1	1
INTA IF-566	INTA06575	1	313	1094	2	1
INTA IF-566	INTA06575	2	3	488	5	5
INTA IF-566	INTA06575	3	297	955	1	2
INTA IF-566	OVERA	1	230	1003	1	1
INTA IF-566	OVERA	2	400	1110	2	2
INTA IF-566	OVERA	3	363	1109	0	1
INTA IF-566	PAMPA	1	281	857	0	2
INTA IF-566	PAMPA	2	386	661	0	2
INTA IF-566	PAMPA	3	328	818	1	2
INTA IF-567	INTA06575	1	98	945	5	4
INTA IF-567	INTA06575	2	205	906	2	3
INTA IF-567	INTA06575	3	88	1064	0	4
INTA IF-567	OVERA	1	375	1183	3	1
INTA IF-567	OVERA	2	220	978	3	3
INTA IF-567	OVERA	3	220	1220	3	4
INTA IF-567	PAMPA	1	400	1069	2	2
INTA IF-567	PAMPA	2	304	915	0	3
INTA IF-567	PAMPA	3	312	1045	0	2
INTA IF-569	INTA06575	1	152	955	5	4
INTA IF-569	INTA06575	2	32	243	5	3
INTA IF-569	INTA06575	3	19	286	5	4
INTA IF-569	OVERA	1	275	1074	2	3
INTA IF-569	OVERA	2	229	980	2	3
INTA IF-569	OVERA	3	188	1139	4	2
INTA IF-569	PAMPA	1	250	620	0	1
INTA IF-569	PAMPA	2	303	870	0	2
INTA IF-569	PAMPA	3	281	920	0	2
INTA IF-577	INTA06575	1	28	476	4	4
INTA IF-577	INTA06575	2	60	322	5	3
INTA IF-577	INTA06575	3	64	285	5	4
INTA IF-577	OVERA	1	236	1065	3	1
INTA IF-577	OVERA	2	316	1223	0	1
INTA IF-577	OVERA	3	233	1229	2	1
INTA IF-577	PAMPA	1	159	620	0	4
INTA IF-577	PAMPA	2	387	933	4	2
INTA IF-577	PAMPA	3	310	843	0	1

Aislado	Variiedad	Repetición	Peso seco raíz (mg)	Peso seco tallo (mg)	Escala aérea (grados)	Escala raíz (grados)
Testigo	INTA06575	1	10	59	5	3
Testigo	INTA06575	2	22	106	2	2
Testigo	INTA06575	3	18	134	1	2
Testigo	INTA06575	4	19	68	1	2
Testigo	INTA06575	5	35	134	1	1
Testigo	INTA06575	6	20	94	1	2
Testigo	INTA06575	7	2	40	1	2
Testigo	INTA06575	8	39	149	1	2
Testigo	INTA06575	9	25	108	1	2
Testigo	INTA06575	10	23	125	1	2
Testigo	INTA06575	11	32	124	0	2
Testigo	INTA06575	12	20	84	0	2
Testigo	INTA06575	13	35	188	1	2
Testigo	INTA06575	14	29	178	0	2
Testigo	INTA06575	15	37	134	0	2
Testigo	INTA06575	16	36	249	0	2
Testigo	INTA06575	17	42	224	2	3
Testigo	INTA06575	18	2	39	0	2
Testigo	INTA06575	19	37	222	1	3
Testigo	INTA06575	20	15	94	0	2
Testigo	INTA06575	21	31	147	0	3
Testigo	INTA06575	22	30	169	0	3
Testigo	INTA06575	23	10	97	0	2
Testigo	INTA06575	24	22	139	0	2
Testigo	INTA06575	25	24	169	0	2
Testigo	INTA06575	26	24	137	0	2
Testigo	INTA06575	27	20	119	0	2
Testigo	INTA06575	28	38	184	0	2
Testigo	INTA06575	29	32	191	1	2
Testigo	INTA06575	30	23	156	0	2
Testigo	OVERA	1	21	54	2	2
Testigo	OVERA	2	0	22	5	3
Testigo	OVERA	3	4	25	5	3
Testigo	OVERA	4	0	29	5	3
Testigo	OVERA	5	8	54	5	3
Testigo	OVERA	6	0	15	4	3
Testigo	OVERA	7	0	25	5	4
Testigo	OVERA	8	5	43	5	3
Testigo	OVERA	9	7	39	5	3
Testigo	OVERA	10	8	78	2	3
Testigo	OVERA	11	12	79	3	3
Testigo	OVERA	12	4	39	4	2
Testigo	OVERA	13	5	24	4	4
Testigo	OVERA	14	3	47	5	4
Testigo	OVERA	15	3	38	5	3
Testigo	OVERA	16	0	64	5	3
Testigo	OVERA	17	0	41	5	3
Testigo	OVERA	18	0	42	4	4
Testigo	OVERA	19	17	52	5	4
Testigo	OVERA	20	12	54	5	4
Testigo	OVERA	21	9	74	2	3
Testigo	OVERA	22	9	45	3	3

Testigo	OVERA	23	10	37	2	2
Testigo	OVERA	24	20	74	4	2
Testigo	OVERA	25	0	62	5	3
Testigo	OVERA	26	5	46	5	2
Testigo	OVERA	27	0	74	5	4
Testigo	OVERA	28	6	39	5	3
Testigo	OVERA	29	3	42	5	4
Testigo	OVERA	30	0	45	5	3
Testigo	PAMPA	1	6	71	5	2
Testigo	PAMPA	2	3	48	2	3
Testigo	PAMPA	3	20	79	0	2
Testigo	PAMPA	4	24	117	0	1
Testigo	PAMPA	5	29	107	1	1
Testigo	PAMPA	6	25	90	0	2
Testigo	PAMPA	7	20	79	0	2
Testigo	PAMPA	8	27	117	0	2
Testigo	PAMPA	9	14	107	0	2
Testigo	PAMPA	10	8	53	5	3
Testigo	PAMPA	11	16	60	0	2
Testigo	PAMPA	12	15	56	0	2
Testigo	PAMPA	13	12	70	1	2
Testigo	PAMPA	14	17	89	0	1
Testigo	PAMPA	15	2	29	5	3
Testigo	PAMPA	16	7	74	5	3
Testigo	PAMPA	17	18	90	2	2
Testigo	PAMPA	18	8	53	0	2
Testigo	PAMPA	19	11	65	5	3
Testigo	PAMPA	20	9	68	1	3
Testigo	PAMPA	21	22	72	5	2
Testigo	PAMPA	22	7	63	0	3
Testigo	PAMPA	23	10	45	3	2
Testigo	PAMPA	24	16	61	0	2
Testigo	PAMPA	25	18	83	0	2
Testigo	PAMPA	26	7	74	0	3
Testigo	PAMPA	27	9	99	2	3
Testigo	PAMPA	28	16	99	1	3
Testigo	PAMPA	29	17	105	2	3
Testigo	PAMPA	30	27	130	0	1
534	INTA06575	1	15	113	3	3
534	INTA06575	2	11	90	3	3
534	INTA06575	3	29	199	3	2
534	INTA06575	4	27	134	3	3
534	INTA06575	5	20	132	3	2
534	INTA06575	6	10	104	4	3
534	INTA06575	7	19	150	3	2
534	INTA06575	8	12	150	3	3
534	INTA06575	9	47	205	3	2
534	INTA06575	10	60	150	3	1
534	INTA06575	11	8	97	4	3
534	INTA06575	12	22	111	4	3
534	INTA06575	13	16	119	3	3
534	INTA06575	14	26	119	3	3
534	INTA06575	15	28	129	2	3
534	INTA06575	16	31	182	3	2
534	INTA06575	17	34	125	2	2
534	INTA06575	18	36	98	2	2
534	INTA06575	19	49	174	2	1
534	INTA06575	20	26	127	2	3
534	INTA06575	21	21	148	3	2
534	INTA06575	22	27	124	3	2
534	INTA06575	23	14	95	3	3
534	INTA06575	24	29	150	2	3
534	INTA06575	25	24	131	2	3
534	INTA06575	26	19	168	3	3
534	INTA06575	27	32	135	3	3
534	INTA06575	28	22	130	2	3
534	INTA06575	29	28	171	3	2
534	INTA06575	30	32	139	2	2
534	OVERA	1	4	22	5	3
534	OVERA	2	5	21	5	3
534	OVERA	3	0	24	5	4
534	OVERA	4	6	46	5	3
534	OVERA	5	3	44	5	3
534	OVERA	6	2	22	5	4
534	OVERA	7	13	39	5	3
534	OVERA	8	0	13	5	4
534	OVERA	9	7	48	5	2
534	OVERA	10	0	17	5	4
534	OVERA	11	3	24	5	3
534	OVERA	12	5	72	5	3
534	OVERA	13	0	12	5	4
534	OVERA	14	0	7	5	4
534	OVERA	15	0	17	5	4
534	OVERA	16	0	18	5	4
534	OVERA	17	2	21	5	4
534	OVERA	18	0	16	5	4
534	OVERA	19	0	42	5	4
534	OVERA	20	0	50	5	4
534	OVERA	21	12	26	5	3
534	OVERA	22	4	37	5	3
534	OVERA	23	2	44	5	3
534	OVERA	24	4	46	5	4
534	OVERA	25	0	18	5	4
534	OVERA	26	7	32	5	4
534	OVERA	27	0	49	5	4

534	OVERA	28	0	45	5	4
534	OVERA	29	0	39	5	4
534	OVERA	30	0	0	5	3
534	PAMPA	1	9	39	5	3
534	PAMPA	2	9	63	5	3
534	PAMPA	3	8	101	4	3
534	PAMPA	4	14	131	4	2
534	PAMPA	5	9	104	3	3
534	PAMPA	6	24	78	5	1
534	PAMPA	7	14	106	3	3
534	PAMPA	8	28	119	2	1
534	PAMPA	9	18	86	3	2
534	PAMPA	10	11	71	5	3
534	PAMPA	11	9	70	4	3
534	PAMPA	12	14	73	4	2
534	PAMPA	13	13	103	3	2
534	PAMPA	14	22	88	2	2
534	PAMPA	15	15	79	2	3
534	PAMPA	16	9	69	5	3
534	PAMPA	17	23	90	2	2
534	PAMPA	18	31	81	2	2
534	PAMPA	19	10	80	4	3
534	PAMPA	20	11	94	5	3
534	PAMPA	21	15	106	3	3
534	PAMPA	22	10	99	5	3
534	PAMPA	23	21	142	2	3
534	PAMPA	24	19	100	2	3
534	PAMPA	25	16	131	2	3
534	PAMPA	26	7	141	5	3
534	PAMPA	27	25	108	2	2
534	PAMPA	28	14	132	4	3
534	PAMPA	29	13	135	5	3
534	PAMPA	30	10	139	5	3
535	INTA06575	1	9	128	4	3
535	INTA06575	2	4	103	4	4
535	INTA06575	3	20	81	4	3
535	INTA06575	4	9	117	3	2
535	INTA06575	5	22	99	3	3
535	INTA06575	6	15	115	4	3
535	INTA06575	7	17	84	4	3
535	INTA06575	8	13	90	3	3
535	INTA06575	9	9	95	4	3
535	INTA06575	10	21	128	3	3
535	INTA06575	11	12	44	4	3
535	INTA06575	12	18	150	4	2
535	INTA06575	13	34	143	4	2
535	INTA06575	14	12	107	3	3
535	INTA06575	15	22	94	4	3
535	INTA06575	16	17	97	3	3
535	INTA06575	17	29	86	4	3
535	INTA06575	18	12	64	4	3
535	INTA06575	19	16	81	3	3
535	INTA06575	20	12	85	3	3
535	INTA06575	21	19	142	3	3
535	INTA06575	22	18	117	3	3
535	INTA06575	23	9	65	4	3
535	INTA06575	24	15	99	4	3
535	INTA06575	25	15	113	3	3
535	INTA06575	26	17	125	3	3
535	INTA06575	27	14	108	3	3
535	INTA06575	28	24	82	3	3
535	INTA06575	29	14	82	3	3
535	INTA06575	30	14	108	3	3
535	OVERA	1	0	40	5	4
535	OVERA	2	4	54	5	4
535	OVERA	3	0	41	5	4
535	OVERA	4	10	50	5	2
535	OVERA	5	0	54	5	3
535	OVERA	6	4	59	5	3
535	OVERA	7	3	54	5	4
535	OVERA	8	0	52	5	4
535	OVERA	9	17	51	5	2
535	OVERA	10	3	55	5	3
535	OVERA	11	0	55	5	3
535	OVERA	12	0	67	5	4
535	OVERA	13	0	41	5	4
535	OVERA	14	0	22	5	4
535	OVERA	15	0	38	5	4
535	OVERA	16	0	50	5	3
535	OVERA	17	0	65	5	4
535	OVERA	18	0	17	5	4
535	OVERA	19	0	58	5	4
535	OVERA	20	5	62	5	4
535	OVERA	21	0	29	5	4
535	OVERA	22	1	48	5	3
535	OVERA	23	0	32	5	4
535	OVERA	24	0	54	5	4
535	OVERA	25	0	54	5	4
535	OVERA	26	0	54	5	4
535	OVERA	27	0	50	5	3
535	OVERA	28	2	53	5	4
535	OVERA	29	0	0	5	4
535	OVERA	30	0	0	5	3
535	PAMPA	1	0	64	5	4
535	PAMPA	2	5	92	5	3

535	PAMPA	3	15	56	3	3
535	PAMPA	4	5	69	4	3
535	PAMPA	5	2	65	4	3
535	PAMPA	6	15	83	4	2
535	PAMPA	7	4	38	5	3
535	PAMPA	8	18	62	4	2
535	PAMPA	9	6	105	3	3
535	PAMPA	10	7	77	5	3
535	PAMPA	11	3	79	5	3
535	PAMPA	12	18	134	5	3
535	PAMPA	13	14	100	3	3
535	PAMPA	14	18	72	2	3
535	PAMPA	15	5	94	5	3
535	PAMPA	16	7	101	3	2
535	PAMPA	17	19	108	4	3
535	PAMPA	18	16	134	2	3
535	PAMPA	19	12	95	2	2
535	PAMPA	20	3	53	2	3
535	PAMPA	21	24	65	5	3
535	PAMPA	22	9	106	2	2
535	PAMPA	23	11	97	5	3
535	PAMPA	24	15	75	3	3
535	PAMPA	25	0	112	3	2
535	PAMPA	26	17	100	3	2
535	PAMPA	27	10	94	4	2
535	PAMPA	28	2	73	5	3
535	PAMPA	29	13	92	3	3
535	PAMPA	30	4	62	4	3
536	INTA06575	1	9	124	4	3
536	INTA06575	2	5	101	4	3
536	INTA06575	3	3	139	5	3
536	INTA06575	4	4	136	5	3
536	INTA06575	5	9	104	5	3
536	INTA06575	6	15	169	3	2
536	INTA06575	7	7	194	4	3
536	INTA06575	8	8	148	4	3
536	INTA06575	9	4	112	4	3
536	INTA06575	10	15	140	5	3
536	INTA06575	11	7	38	5	3
536	INTA06575	12	7	178	4	3
536	INTA06575	13	10	129	4	3
536	INTA06575	14	9	121	5	4
536	INTA06575	15	11	90	4	3
536	INTA06575	16	5	120	5	3
536	INTA06575	17	0	28	5	4
536	INTA06575	18	10	136	4	3
536	INTA06575	19	10	118	4	3
536	INTA06575	20	5	110	4	3
536	INTA06575	21	3	91	4	3
536	INTA06575	22	7	109	5	3
536	INTA06575	23	13	166	4	3
536	INTA06575	24	15	155	3	3
536	INTA06575	25	5	120	4	3
536	INTA06575	26	9	190	4	3
536	INTA06575	27	8	137	4	3
536	INTA06575	28	22	150	3	3
536	INTA06575	29	33	167	3	2
536	INTA06575	30	24	133	4	2
536	OVERA	1	0	37	5	4
536	OVERA	2	3	50	5	4
536	OVERA	3	0	30	5	4
536	OVERA	4	0	31	5	4
536	OVERA	5	0	60	5	4
536	OVERA	6	0	43	5	4
536	OVERA	7	0	65	5	4
536	OVERA	8	0	29	5	4
536	OVERA	9	0	37	5	4
536	OVERA	10	0	22	5	4
536	OVERA	11	2	22	5	4
536	OVERA	12	0	12	5	4
536	OVERA	13	2	25	5	4
536	OVERA	14	4	28	5	4
536	OVERA	15	0	11	5	4
536	OVERA	16	0	14	5	4
536	OVERA	17	0	16	5	4
536	OVERA	18	0	17	5	4
536	OVERA	19	2	25	5	4
536	OVERA	20	0	26	5	4
536	OVERA	21	0	7	5	4
536	OVERA	22	0	19	5	4
536	OVERA	23	0	7	5	4
536	OVERA	24	0	12	5	4
536	OVERA	25	0	42	5	4
536	OVERA	26	0	34	5	4
536	OVERA	27	0	48	5	4
536	OVERA	28	0	29	5	4
536	OVERA	29	0	0	5	4
536	OVERA	30	0	0	5	4
536	PAMPA	1	9	109	5	3
536	PAMPA	2	7	90	5	3
536	PAMPA	3	6	108	5	3
536	PAMPA	4	3	63	5	3
536	PAMPA	5	5	75	5	3
536	PAMPA	6	7	87	5	3
536	PAMPA	7	3	60	5	3

536	PAMPA	8	5	131	5	3
536	PAMPA	9	7	85	5	3
536	PAMPA	10	5	51	5	3
536	PAMPA	11	5	74	5	3
536	PAMPA	12	5	39	5	3
536	PAMPA	13	3	105	5	3
536	PAMPA	14	5	60	5	3
536	PAMPA	15	9	104	5	3
536	PAMPA	16	7	112	5	3
536	PAMPA	17	9	53	5	3
536	PAMPA	18	5	101	5	3
536	PAMPA	19	11	124	3	3
536	PAMPA	20	9	72	5	3
536	PAMPA	21	14	121	5	2
536	PAMPA	22	8	91	5	3
536	PAMPA	23	5	104	3	3
536	PAMPA	24	3	92	5	3
536	PAMPA	25	4	113	5	3
536	PAMPA	26	5	65	5	3
536	PAMPA	27	6	82	5	3
536	PAMPA	28	5	86	3	3
536	PAMPA	29	6	72	5	3
536	PAMPA	30	25	139	2	3
538	INTA06575	1	27	152	3	2
538	INTA06575	2	31	185	2	2
538	INTA06575	3	22	162	2	2
538	INTA06575	4	21	170	2	2
538	INTA06575	5	19	116	2	2
538	INTA06575	6	28	153	2	2
538	INTA06575	7	33	195	3	2
538	INTA06575	8	12	157	2	3
538	INTA06575	9	10	176	2	3
538	INTA06575	10	22	182	2	3
538	INTA06575	11	34	225	3	2
538	INTA06575	12	20	118	3	2
538	INTA06575	13	17	74	2	2
538	INTA06575	14	9	86	2	2
538	INTA06575	15	31	130	2	3
538	INTA06575	16	26	174	2	2
538	INTA06575	17	21	156	2	2
538	INTA06575	18	22	127	2	2
538	INTA06575	19	25	137	2	2
538	INTA06575	20	17	162	3	2
538	INTA06575	21	31	129	2	1
538	INTA06575	22	32	119	2	2
538	INTA06575	23	26	94	2	2
538	INTA06575	24	27	120	2	2
538	INTA06575	25	37	198	2	2
538	INTA06575	26	25	135	2	2
538	INTA06575	27	52	253	2	1
538	INTA06575	28	40	136	2	2
538	INTA06575	29	15	91	2	2
538	INTA06575	30	26	182	2	2
538	OVERA	1	0	24	5	4
538	OVERA	2	5	43	5	4
538	OVERA	3	5	61	5	3
538	OVERA	4	0	34	5	4
538	OVERA	5	0	41	5	4
538	OVERA	6	0	54	5	4
538	OVERA	7	2	29	0	1
538	OVERA	8	7	60	5	3
538	OVERA	9	3	50	5	3
538	OVERA	10	0	29	5	4
538	OVERA	11	3	52	5	3
538	OVERA	12	0	19	5	4
538	OVERA	13	0	10	5	4
538	OVERA	14	0	12	5	3
538	OVERA	15	4	18	5	4
538	OVERA	16	0	7	5	4
538	OVERA	17	0	17	5	4
538	OVERA	18	0	24	5	4
538	OVERA	19	0	30	5	4
538	OVERA	20	3	33	5	4
538	OVERA	21	29	23	5	1
538	OVERA	22	14	67	5	2
538	OVERA	23	0	19	5	4
538	OVERA	24	0	3	5	4
538	OVERA	25	0	8	5	4
538	OVERA	26	0	29	5	4
538	OVERA	27	0	25	5	3
538	OVERA	28	0	25	5	4
538	OVERA	29	0	21	5	4
538	OVERA	30	0	10	5	4
538	PAMPA	1	5	58	5	3
538	PAMPA	2	8	110	4	3
538	PAMPA	3	7	129	3	3
538	PAMPA	4	7	78	5	3
538	PAMPA	5	2	83	5	3
538	PAMPA	6	9	63	5	3
538	PAMPA	7	7	96	5	3
538	PAMPA	8	7	50	5	3
538	PAMPA	9	7	102	5	3
538	PAMPA	10	7	91	4	3
538	PAMPA	11	7	106	4	3
538	PAMPA	12	7	99	2	2

538	PAMPA	13	9	85	3	3
538	PAMPA	14	6	83	3	3
538	PAMPA	15	7	94	3	3
538	PAMPA	16	7	86	3	3
538	PAMPA	17	5	50	5	3
538	PAMPA	18	24	96	2	2
538	PAMPA	19	5	58	5	3
538	PAMPA	20	7	125	5	3
538	PAMPA	21	4	62	4	3
538	PAMPA	22	22	118	2	2
538	PAMPA	23	25	103	3	2
538	PAMPA	24	20	135	2	2
538	PAMPA	25	17	57	2	2
538	PAMPA	26	24	147	2	2
538	PAMPA	27	20	70	2	2
538	PAMPA	28	3	55	3	3
538	PAMPA	29	90	78	3	3
538	PAMPA	30	11	135	3	3
559	INTA06575	1	29	192	0	2
559	INTA06575	2	30	175	2	2
559	INTA06575	3	20	178	2	2
559	INTA06575	4	5	117	1	3
559	INTA06575	5	27	182	1	2
559	INTA06575	6	23	145	1	2
559	INTA06575	7	11	175	2	3
559	INTA06575	8	17	159	1	2
559	INTA06575	9	39	208	1	1
559	INTA06575	10	13	122	1	2
559	INTA06575	11	13	89	2	3
559	INTA06575	12	17	142	2	3
559	INTA06575	13	19	144	2	2
559	INTA06575	14	17	152	2	2
559	INTA06575	15	28	200	2	2
559	INTA06575	16	13	150	2	3
559	INTA06575	17	13	111	2	3
559	INTA06575	18	17	129	2	2
559	INTA06575	19	25	163	2	2
559	INTA06575	20	18	132	2	2
559	INTA06575	21	42	154	2	1
559	INTA06575	22	31	233	2	2
559	INTA06575	23	33	316	2	1
559	INTA06575	24	19	203	2	3
559	INTA06575	25	14	198	2	3
559	INTA06575	26	4	152	2	3
559	INTA06575	27	18	183	2	2
559	INTA06575	28	9	123	2	3
559	INTA06575	29	21	156	2	3
559	INTA06575	30	22	158	2	3
559	OVERA	1	5	37	2	3
559	OVERA	2	14	44	5	3
559	OVERA	3	8	50	4	3
559	OVERA	4	8	53	5	4
559	OVERA	5	2	45	5	2
559	OVERA	6	9	73	4	2
559	OVERA	7	12	66	4	2
559	OVERA	8	4	38	4	3
559	OVERA	9	5	36	0	4
559	OVERA	10	9	54	5	3
559	OVERA	11	8	32	5	3
559	OVERA	12	0	27	2	4
559	OVERA	13	0	9	5	4
559	OVERA	14	3	49	5	3
559	OVERA	15	0	14	5	4
559	OVERA	16	0	14	5	3
559	OVERA	17	7	37	5	3
559	OVERA	18	4	42	5	3
559	OVERA	19	5	33	5	3
559	OVERA	20	7	32	5	3
559	OVERA	21	6	27	5	3
559	OVERA	22	1	37	5	3
559	OVERA	23	0	46	5	3
559	OVERA	24	5	70	5	4
559	OVERA	25	0	7	5	4
559	OVERA	26	2	35	5	4
559	OVERA	27	0	4	5	4
559	OVERA	28	11	28	5	3
559	OVERA	29	3	29	5	3
559	OVERA	30	0	12	5	3
559	PAMPA	1	7	100	5	3
559	PAMPA	2	22	133	3	2
559	PAMPA	3	11	112	3	3
559	PAMPA	4	7	63	5	3
559	PAMPA	5	5	75	3	3
559	PAMPA	6	7	78	4	3
559	PAMPA	7	23	140	3	2
559	PAMPA	8	4	94	4	3
559	PAMPA	9	19	129	2	2
559	PAMPA	10	3	62	5	3
559	PAMPA	11	7	70	5	3
559	PAMPA	12	5	64	2	3
559	PAMPA	13	24	124	3	2
559	PAMPA	14	10	123	3	3
559	PAMPA	15	14	160	3	3
559	PAMPA	16	18	164	2	3
559	PAMPA	17	17	93	2	3

559	PAMPA	18	12	83	2	3
559	PAMPA	19	18	155	3	3
559	PAMPA	20	12	46	5	3
559	PAMPA	21	6	34	5	3
559	PAMPA	22	16	148	2	3
559	PAMPA	23	6	154	5	3
559	PAMPA	24	17	144	3	3
559	PAMPA	25	17	136	3	3
559	PAMPA	26	14	136	3	3
559	PAMPA	27	8	57	5	3
559	PAMPA	28	4	50	3	3
559	PAMPA	29	1	29	5	4
559	PAMPA	30	15	119	2	3
566	INTA06575	1	36	106	2	3
566	INTA06575	2	27	61	2	3
566	INTA06575	3	30	76	3	3
566	INTA06575	4	34	109	3	3
566	INTA06575	5	22	125	2	3
566	INTA06575	6	27	131	2	3
566	INTA06575	7	15	76	3	4
566	INTA06575	8	21	84	3	3
566	INTA06575	9	19	105	2	4
566	INTA06575	10	32	175	2	4
566	INTA06575	11	27	144	3	3
566	INTA06575	12	26	166	2	3
566	INTA06575	13	30	213	3	3
566	INTA06575	14	18	134	2	3
566	INTA06575	15	29	197	3	3
566	INTA06575	16	29	139	2	4
566	INTA06575	17	11	90	3	4
566	INTA06575	18	21	95	2	4
566	INTA06575	19	20	134	2	3
566	INTA06575	20	34	177	3	2
566	INTA06575	21	40	168	2	2
566	INTA06575	22	33	197	2	3
566	INTA06575	23	30	173	2	3
566	INTA06575	24	25	137	2	3
566	INTA06575	25	22	190	2	3
566	INTA06575	26	25	146	3	3
566	INTA06575	27	29	172	3	3
566	INTA06575	28	23	114	2	4
566	INTA06575	29	14	92	3	3
566	INTA06575	30	29	182	3	4
566	OVERA	1	4	34	5	4
566	OVERA	2	0	25	5	4
566	OVERA	3	0	3	5	4
566	OVERA	4	0	19	5	4
566	OVERA	5	0	20	5	4
566	OVERA	6	5	29	5	4
566	OVERA	7	3	22	5	4
566	OVERA	8	0	6	5	4
566	OVERA	9	11	43	5	3
566	OVERA	10	10	32	5	3
566	OVERA	11	0	21	5	4
566	OVERA	12	0	5	5	4
566	OVERA	13	0	33	5	4
566	OVERA	14	0	35	5	4
566	OVERA	15	0	22	5	4
566	OVERA	16	0	8	5	4
566	OVERA	17	0	26	5	4
566	OVERA	18	8	7	5	4
566	OVERA	19	10	16	5	3
566	OVERA	20	12	36	5	4
566	OVERA	21	3	11	5	4
566	OVERA	22	0	23	5	4
566	OVERA	23	11	32	5	4
566	OVERA	24	10	40	5	4
566	OVERA	25	10	5	5	4
566	OVERA	26	0	42	5	4
566	OVERA	27	14	15	4	4
566	OVERA	28	5	34	5	4
566	OVERA	29	0	0	5	4
566	OVERA	30	0	45	5	4
566	PAMPA	1	57	5	4	4
566	PAMPA	2	99	21	3	3
566	PAMPA	3	85	6	3	3
566	PAMPA	4	78	20	2	2
566	PAMPA	5	88	15	2	3
566	PAMPA	6	2	20	2	3
566	PAMPA	7	98	5	2	3
566	PAMPA	8	93	14	5	3
566	PAMPA	9	75	4	5	3
566	PAMPA	10	74	8	5	3
566	PAMPA	11	91	19	3	3
566	PAMPA	12	101	18	3	3
566	PAMPA	13	98	18	2	3
566	PAMPA	14	109	7	2	3
566	PAMPA	15	98	9	2	3
566	PAMPA	16	95	20	3	4
566	PAMPA	17	61	10	5	4
566	PAMPA	18	55	4	1	3
566	PAMPA	19	114	16	3	4
566	PAMPA	20	74	11	2	4
566	PAMPA	21	89	19	3	4
566	PAMPA	22	69	14	3	4

566	PAMPA	23	65	14	2	4
566	PAMPA	24	71	13	2	3
566	PAMPA	25	69	12	2	3
566	PAMPA	26	53	1	2	3
566	PAMPA	27	93	9	2	4
566	PAMPA	28	68	7	3	4
566	PAMPA	29	95	18	1	4
566	PAMPA	30	54	10	2	4
567	INTA06575	1	3	157	4	4
567	INTA06575	2	8	129	4	4
567	INTA06575	3	10	123	4	4
567	INTA06575	4	8	162	4	4
567	INTA06575	5	19	171	3	4
567	INTA06575	6	14	129	3	4
567	INTA06575	7	14	154	3	3
567	INTA06575	8	13	174	3	3
567	INTA06575	9	17	106	3	3
567	INTA06575	10	18	110	3	3
567	INTA06575	11	4	103	3	4
567	INTA06575	12	10	174	3	4
567	INTA06575	13	17	144	3	3
567	INTA06575	14	18	130	3	3
567	INTA06575	15	15	107	3	3
567	INTA06575	16	19	117	3	3
567	INTA06575	17	14	170	1	4
567	INTA06575	18	21	200	2	4
567	INTA06575	19	19	138	1	4
567	INTA06575	20	19	170	2	3
567	INTA06575	21	32	141	2	3
567	INTA06575	22	44	197	1	2
567	INTA06575	23	27	174	1	3
567	INTA06575	24	29	145	2	3
567	INTA06575	25	38	175	1	4
567	INTA06575	26	13	80	1	4
567	INTA06575	27	33	163	2	2
567	INTA06575	28	22	144	1	3
567	INTA06575	29	27	127	1	3
567	INTA06575	30	19	122	2	3
567	OVERA	1	3	36	0	4
567	OVERA	2	3	36	0	4
567	OVERA	3	3	36	0	4
567	OVERA	4	14	72	3	3
567	OVERA	5	0	4	5	4
567	OVERA	6	3	36	0	4
567	OVERA	7	3	36	0	4
567	OVERA	8	0	31	5	4
567	OVERA	9	0	56	5	4
567	OVERA	10	9	89	0	3
567	OVERA	11	0	17	5	4
567	OVERA	12	1	25	5	4
567	OVERA	13	2	37	5	4
567	OVERA	14	0	25	5	4
567	OVERA	15	0	6	0	4
567	OVERA	16	1	24	5	4
567	OVERA	17	0	34	5	4
567	OVERA	18	0	31	5	4
567	OVERA	19	10	31	5	4
567	OVERA	20	0	34	4	4
567	OVERA	21	4	21	5	4
567	OVERA	22	0	89	5	4
567	OVERA	23	1	42	5	4
567	OVERA	24	7	34	5	4
567	OVERA	25	0	53	5	4
567	OVERA	26	0	16	5	4
567	OVERA	27	17	49	5	3
567	OVERA	28	1	17	5	4
567	OVERA	29	4	35	5	4
567	OVERA	30	16	38	4	4
567	PAMPA	1	9	65	5	4
567	PAMPA	2	6	117	4	4
567	PAMPA	3	10	106	5	4
567	PAMPA	4	9	73	5	4
567	PAMPA	5	10	112	5	4
567	PAMPA	6	8	122	5	4
567	PAMPA	7	12	96	3	4
567	PAMPA	8	6	97	4	4
567	PAMPA	9	6	84	4	4
567	PAMPA	10	8	56	4	4
567	PAMPA	11	6	69	5	4
567	PAMPA	12	15	98	3	3
567	PAMPA	13	10	80	5	4
567	PAMPA	14	5	69	5	4
567	PAMPA	15	11	82	3	3
567	PAMPA	16	8	117	3	4
567	PAMPA	17	9	48	1	3
567	PAMPA	18	22	88	3	4
567	PAMPA	19	9	62	3	4
567	PAMPA	20	4	48	4	4
567	PAMPA	21	5	66	5	4
567	PAMPA	22	8	62	5	4
567	PAMPA	23	17	70	3	3
567	PAMPA	24	17	101	3	3
567	PAMPA	25	7	64	5	4
567	PAMPA	26	9	66	5	4
567	PAMPA	27	2	10	2	4

567	PAMPA	28	0	7	5	4
567	PAMPA	29	4	66	5	4
567	PAMPA	30	17	69	3	3
569	INTA06575	1	17	85	1	2
569	INTA06575	2	26	163	1	3
569	INTA06575	3	20	143	2	3
569	INTA06575	4	21	113	2	2
569	INTA06575	5	14	70	2	3
569	INTA06575	6	18	121	2	2
569	INTA06575	7	22	128	2	2
569	INTA06575	8	23	129	1	2
569	INTA06575	9	36	129	1	3
569	INTA06575	10	12	72	2	1
569	INTA06575	11	10	75	3	3
569	INTA06575	12	11	98	3	3
569	INTA06575	13	12	90	3	3
569	INTA06575	14	11	79	3	3
569	INTA06575	15	12	122	3	3
569	INTA06575	16	22	133	3	2
569	INTA06575	17	7	102	2	3
569	INTA06575	18	17	61	2	2
569	INTA06575	19	20	138	2	2
569	INTA06575	20	11	138	2	3
569	INTA06575	21	8	73	3	3
569	INTA06575	22	13	79	3	3
569	INTA06575	23	0	39	3	4
569	INTA06575	24	7	89	2	3
569	INTA06575	25	6	85	3	3
569	INTA06575	26	9	77	2	3
569	INTA06575	27	12	83	2	3
569	INTA06575	28	26	120	2	2
569	INTA06575	29	19	116	2	2
569	INTA06575	30	16	121	3	3
569	OVERA	1	0	20	5	4
569	OVERA	2	0	11	5	3
569	OVERA	3	3	27	5	3
569	OVERA	4	0	32	5	4
569	OVERA	5	5	30	5	3
569	OVERA	6	0	26	5	4
569	OVERA	7	2	9	0	4
569	OVERA	8	0	14	5	4
569	OVERA	9	4	21	5	4
569	OVERA	10	0	23	5	3
569	OVERA	11	3	45	5	3
569	OVERA	12	3	31	5	4
569	OVERA	13	0	11	5	4
569	OVERA	14	0	28	5	4
569	OVERA	15	0	20	5	4
569	OVERA	16	0	10	5	4
569	OVERA	17	0	16	5	4
569	OVERA	18	3	34	5	3
569	OVERA	19	5	58	5	3
569	OVERA	20	0	29	5	4
569	OVERA	21	0	24	5	4
569	OVERA	22	0	10	5	4
569	OVERA	23	0	12	5	3
569	OVERA	24	0	22	5	4
569	OVERA	25	3	49	5	3
569	OVERA	26	3	34	5	3
569	OVERA	27	7	29	5	3
569	OVERA	28	2	33	5	3
569	OVERA	29	4	44	5	3
569	OVERA	30	9	48	5	3
569	PAMPA	1	7	79	5	3
569	PAMPA	2	16	60	1	2
569	PAMPA	3	14	90	2	2
569	PAMPA	4	11	110	5	3
569	PAMPA	5	8	133	3	2
569	PAMPA	6	14	121	5	2
569	PAMPA	7	15	158	2	2
569	PAMPA	8	17	170	2	2
569	PAMPA	9	4	92	5	3
569	PAMPA	10	9	93	3	3
569	PAMPA	11	9	108	5	3
569	PAMPA	12	7	149	4	3
569	PAMPA	13	11	106	3	2
569	PAMPA	14	24	101	4	2
569	PAMPA	15	10	123	5	2
569	PAMPA	16	11	92	4	3
569	PAMPA	17	10	110	5	2
569	PAMPA	18	17	145	2	3
569	PAMPA	19	1	76	3	2
569	PAMPA	20	3	65	5	3
569	PAMPA	21	9	170	3	3
569	PAMPA	22	18	135	3	3
569	PAMPA	23	7	83	3	2
569	PAMPA	24	8	59	2	3
569	PAMPA	25	14	68	4	3
569	PAMPA	26	20	80	2	2
569	PAMPA	27	10	84	3	3
569	PAMPA	28	8	94	4	3
569	PAMPA	29	17	110	5	3
569	PAMPA	30	10	92	4	3
577	INTA06575	1	9	100	4	4
577	INTA06575	2	11	74	3	3

577	INTA06575	3	4	68	4	4
577	INTA06575	4	12	99	3	3
577	INTA06575	5	11	90	3	3
577	INTA06575	6	14	79	4	3
577	INTA06575	7	4	60	4	4
577	INTA06575	8	15	134	3	3
577	INTA06575	9	1	90	5	4
577	INTA06575	10	7	80	5	4
577	INTA06575	11	20	162	2	2
577	INTA06575	12	19	147	2	2
577	INTA06575	13	19	139	2	2
577	INTA06575	14	42	182	2	1
577	INTA06575	15	23	132	2	2
577	INTA06575	16	22	179	2	2
577	INTA06575	17	10	114	2	3
577	INTA06575	18	13	91	2	2
577	INTA06575	19	31	157	2	2
577	INTA06575	20	31	119	2	2
577	INTA06575	21	29	177	2	2
577	INTA06575	22	22	129	2	2
577	INTA06575	23	17	126	3	4
577	INTA06575	24	32	171	2	1
577	INTA06575	25	29	214	2	1
577	INTA06575	26	27	168	2	1
577	INTA06575	27	27	160	2	1
577	INTA06575	28	36	234	3	3
577	INTA06575	29	19	159	3	2
577	INTA06575	30	35	157	3	2
577	OVERA	1	9	16	5	4
577	OVERA	2	6	20	5	4
577	OVERA	3	0	2	5	4
577	OVERA	4	3	30	5	4
577	OVERA	5	0	14	5	4
577	OVERA	6	0	1	5	4
577	OVERA	7	0	3	5	4
577	OVERA	8	3	32	5	4
577	OVERA	9	0	20	5	4
577	OVERA	10	5	36	5	4
577	OVERA	11	14	45	5	4
577	OVERA	12	0	10	5	3
577	OVERA	13	0	17	5	4
577	OVERA	14	7	9	5	4
577	OVERA	15	0	5	5	4
577	OVERA	16	4	65	5	3
577	OVERA	17	0	2	5	4
577	OVERA	18	3	38	5	4
577	OVERA	19	0	2	5	4
577	OVERA	20	6	32	5	4
577	OVERA	21	0	29	5	4
577	OVERA	22	0	60	5	3
577	OVERA	23	3	25	5	3
577	OVERA	24	0	28	5	4
577	OVERA	25	0	32	5	3
577	OVERA	26	7	24	5	4
577	OVERA	27	10	29	5	4
577	OVERA	28	0	0	5	4
577	OVERA	29	1	30	5	4
577	OVERA	30	0	29	5	4
577	PAMPA	1	2	62	5	4
577	PAMPA	2	9	107	5	3
577	PAMPA	3	7	107	5	4
577	PAMPA	4	8	103	5	4
577	PAMPA	5	7	134	5	4
577	PAMPA	6	10	90	4	4
577	PAMPA	7	21	125	4	3
577	PAMPA	8	6	66	4	4
577	PAMPA	9	8	97	4	4
577	PAMPA	10	5	87	5	4
577	PAMPA	11	15	110	4	3
577	PAMPA	12	21	127	2	2
577	PAMPA	13	16	123	3	3
577	PAMPA	14	8	84	3	4
577	PAMPA	15	22	150	2	2
577	PAMPA	16	18	161	2	3
577	PAMPA	17	8	46	5	3
577	PAMPA	18	7	84	5	4
577	PAMPA	19	22	150	2	3
577	PAMPA	20	4	78	5	4
577	PAMPA	21	22	139	3	2
577	PAMPA	22	10	90	3	4
577	PAMPA	23	18	89	2	3
577	PAMPA	24	14	94	2	3
577	PAMPA	25	16	100	2	3
577	PAMPA	26	16	125	5	4
577	PAMPA	27	16	137	3	2
577	PAMPA	28	27	153	4	4
577	PAMPA	29	14	111	3	3
577	PAMPA	30	14	112	3	4

Aislado	Variedad	Repetición	Peso seco tallo (mg)	Peso seco raíz (mg)	Escala aérea (grados)	Escala raíz (grados)
Testigo	INTA06575	1	111	22	0	1
Testigo	INTA06575	2	109	4	0	5
Testigo	INTA06575	3	60	9	2	1
Testigo	INTA06575	4	47	12	0	1
Testigo	INTA06575	5	77	12	0	1
Testigo	INTA06575	6	104	17	2	1
Testigo	INTA06575	7	120	9	0	2
Testigo	INTA06575	8	66	2	0	5
Testigo	INTA06575	9	69	11	0	1
Testigo	INTA06575	10	72	12	0	1
Testigo	INTA06575	11	79	12	0	1
Testigo	INTA06575	12	131	23	0	1
Testigo	INTA06575	13	74	9	0	2
Testigo	INTA06575	14	157	24	0	1
Testigo	INTA06575	15	95	1	0	1
Testigo	INTA06575	16	65	12	0	1
Testigo	INTA06575	17	122	24	0	1
Testigo	INTA06575	18	121	10	0	5
Testigo	OVERA	1	91	18	0	1
Testigo	OVERA	2	50	15	0	1
Testigo	OVERA	3	49	11	0	1
Testigo	OVERA	4	63	8	0	2
Testigo	OVERA	5	40	10	0	5
Testigo	OVERA	6	60	3	0	2
Testigo	OVERA	7	39	7	5	5
Testigo	OVERA	8	65	13	0	1
Testigo	OVERA	9	66	17	0	1
Testigo	OVERA	10	0	0	0	1
Testigo	OVERA	11	52	18	0	1
Testigo	OVERA	12	66	14	0	1
Testigo	OVERA	13	112	25	0	1
Testigo	OVERA	14	52	13	0	1
Testigo	OVERA	15	52	9	0	1
Testigo	OVERA	16	92	21	0	1
Testigo	OVERA	17	71	12	0	1
Testigo	OVERA	18	124	29	0	1
Testigo	PAMPA	1	75	10	0	1
Testigo	PAMPA	2	77	5	0	2
Testigo	PAMPA	3	98	11	0	1
Testigo	PAMPA	4	48	11	0	1
Testigo	PAMPA	5	78	14	0	1
Testigo	PAMPA	6	104	12	0	1
Testigo	PAMPA	7	103	22	0	1
Testigo	PAMPA	8	72	19	0	1
Testigo	PAMPA	9	74	25	0	1
Testigo	PAMPA	10	79	22	0	1
Testigo	PAMPA	11	61	11	0	1
Testigo	PAMPA	12	74	19	0	1
Testigo	PAMPA	13	57	16	0	2
Testigo	PAMPA	14	104	21	0	1
Testigo	PAMPA	15	53	12	0	1
Testigo	PAMPA	16	48	11	0	1
Testigo	PAMPA	17	80	21	0	1
Testigo	PAMPA	18	69	21	0	1
534	INTA06575	1	132	15	1	4
534	INTA06575	2	97	15	0	4
534	INTA06575	3	145	18	1	5
534	INTA06575	4	89	10	0	4
534	INTA06575	5	98	0	0	5
534	INTA06575	6	107	22	0	4
534	INTA06575	7	142	24	1	1
534	INTA06575	8	99	6	0	5
534	INTA06575	9	75	20	0	2
534	INTA06575	10	49	10	5	3
534	INTA06575	11	59	13	1	5
534	INTA06575	12	102	10	0	4
534	INTA06575	13	68	8	0	4
534	INTA06575	14	36	8	0	3
534	INTA06575	15	106	12	0	3
534	INTA06575	16	75	15	0	2
534	INTA06575	17	119	16	0	3
534	INTA06575	18	57	9	0	3
534	OVERA	1	62	15	0	4
534	OVERA	2	67	14	0	4
534	OVERA	3	6	0	0	2
534	OVERA	4	108	22	0	3
534	OVERA	5	65	19	0	3
534	OVERA	6	57	17	0	4
534	OVERA	7	53	12	0	4
534	OVERA	8	42	10	5	5
534	OVERA	9	37	10	1	4
534	OVERA	10	39	6	5	4
534	OVERA	11	54	11	2	4
534	OVERA	12	17	0	1	5
534	OVERA	13	92	9	0	5
534	OVERA	14	66	1	5	5
534	OVERA	15	73	21	1	3
534	OVERA	16	20	0	1	5
534	OVERA	17	0	0	5	5
534	OVERA	18	27	7	0	5
534	PAMPA	1	91	20	0	2
534	PAMPA	2	79	19	0	2
534	PAMPA	3	81	7	0	5
534	PAMPA	4	66	23	1	2

534	PAMPA	5	81	20	0	2
534	PAMPA	6	104	16	0	3
534	PAMPA	7	90	18	0	3
534	PAMPA	8	88	15	1	3
534	PAMPA	9	86	27	0	1
534	PAMPA	10	82	16	0	3
534	PAMPA	11	74	17	0	3
534	PAMPA	12	117	15	0	3
534	PAMPA	13	83	13	0	4
534	PAMPA	14	69	27	0	2
534	PAMPA	15	91	13	0	4
534	PAMPA	16	67	22	0	3
534	PAMPA	17	81	17	0	3
534	PAMPA	18	67	12	0	5
535	INTA06575	1	90	0	5	5
535	INTA06575	2	55	13	2	3
535	INTA06575	3	51	9	5	4
535	INTA06575	4	50	10	2	3
535	INTA06575	5	169	21	2	5
535	INTA06575	6	125	34	5	3
535	INTA06575	7	89	9	3	4
535	INTA06575	8	103	16	5	5
535	INTA06575	9	83	0	2	3
535	INTA06575	10	78	13	5	5
535	INTA06575	11	55	0	3	5
535	INTA06575	12	132	19	5	5
535	INTA06575	13	72	13	1	2
535	INTA06575	14	38	0	3	4
535	INTA06575	15	105	15	2	5
535	INTA06575	16	113	5	2	5
535	INTA06575	17	79	14	2	4
535	INTA06575	18	37	7	5	5
535	OVERA	1	19	0	5	5
535	OVERA	2	47	2	5	5
535	OVERA	3	68	6	5	5
535	OVERA	4	8	3	5	5
535	OVERA	5	73	5	5	5
535	OVERA	6	38	19	1	5
535	OVERA	7	76	25	2	4
535	OVERA	8	49	15	1	3
535	OVERA	9	62	11	5	4
535	OVERA	10	66	6	0	5
535	OVERA	11	63	18	2	5
535	OVERA	12	75	15	5	5
535	OVERA	13	69	16	0	5
535	OVERA	14	107	13	2	5
535	OVERA	15	59	0	5	5
535	OVERA	16	38	0	5	5
535	OVERA	17	66	0	3	5
535	OVERA	18	48	0	5	5
535	PAMPA	1	82	17	1	1
535	PAMPA	2	63	16	1	3
535	PAMPA	3	50	4	5	5
535	PAMPA	4	60	11	1	3
535	PAMPA	5	74	14	1	3
535	PAMPA	6	47	25	5	4
535	PAMPA	7	17	9	5	5
535	PAMPA	8	25	8	5	5
535	PAMPA	9	45	2	5	5
535	PAMPA	10	112	28	5	3
535	PAMPA	11	106	21	2	4
535	PAMPA	12	93	10	1	4
535	PAMPA	13	79	8	5	5
535	PAMPA	14	70	16	2	4
535	PAMPA	15	85	11	1	4
535	PAMPA	16	89	7	1	4
535	PAMPA	17	49	10	3	4
535	PAMPA	18	60	0	5	5
536	INTA06575	1	56	14	2	2
536	INTA06575	2	107	18	2	3
536	INTA06575	3	126	9	2	2
536	INTA06575	4	72	15	2	3
536	INTA06575	5	90	7	2	3
536	INTA06575	6	60	9	2	4
536	INTA06575	7	85	12	2	4
536	INTA06575	8	75	13	0	2
536	INTA06575	9	75	9	2	2
536	INTA06575	10	2	0	5	5
536	INTA06575	11	77	18	1	3
536	INTA06575	12	94	9	1	4
536	INTA06575	13	117	19	1	4
536	INTA06575	14	76	9	1	4
536	INTA06575	15	61	7	4	5
536	INTA06575	16	60	5	5	5
536	INTA06575	17	110	3	1	5
536	INTA06575	18	99	20	1	3
536	OVERA	1	54	4	5	5
536	OVERA	2	43	3	5	5
536	OVERA	3	105	12	5	4
536	OVERA	4	57	17	1	3
536	OVERA	5	34	10	3	4
536	OVERA	6	44	13	5	4
536	OVERA	7	72	2	5	5
536	OVERA	8	53	5	5	5
536	OVERA	9	52	0	2	5

536	OVERA	10	38	4	5	5
536	OVERA	11	51	31	1	2
536	OVERA	12	38	14	0	4
536	OVERA	13	38	20	2	3
536	OVERA	14	40	0	5	5
536	OVERA	15	40	2	5	5
536	OVERA	16	67	27	2	2
536	OVERA	17	50	17	1	5
536	OVERA	18	26	0	5	5
536	PAMPA	1	60	16	1	4
536	PAMPA	2	46	15	1	3
536	PAMPA	3	82	17	1	2
536	PAMPA	4	119	26	2	2
536	PAMPA	5	72	21	2	2
536	PAMPA	6	67	7	1	5
536	PAMPA	7	76	9	2	3
536	PAMPA	8	102	18	5	2
536	PAMPA	9	52	12	2	2
536	PAMPA	10	29	15	0	3
536	PAMPA	11	45	14	0	3
536	PAMPA	12	57	12	0	3
536	PAMPA	13	33	15	1	3
536	PAMPA	14	121	20	1	2
536	PAMPA	15	98	12	1	2
536	PAMPA	16	69	17	2	3
536	PAMPA	17	26	0	5	5
536	PAMPA	18	74	15	1	4
538	INTA06575	1	79	5	5	5
538	INTA06575	2	63	19	2	2
538	INTA06575	3	78	0	5	5
538	INTA06575	4	49	0	5	5
538	INTA06575	5	52	21	2	2
538	INTA06575	6	67	16	2	3
538	INTA06575	7	85	0	4	5
538	INTA06575	8	84	14	1	3
538	INTA06575	9	52	0	5	5
538	INTA06575	10	59	17	1	3
538	INTA06575	11	72	7	5	4
538	INTA06575	12	80	5	5	5
538	INTA06575	13	85	5	5	5
538	INTA06575	14	72	9	2	5
538	INTA06575	15	84	19	2	3
538	INTA06575	16	80	5	3	5
538	INTA06575	17	69	0	5	5
538	INTA06575	18	89	0	1	4
538	OVERA	1	59	13	5	3
538	OVERA	2	32	0	2	5
538	OVERA	3	26	0	5	5
538	OVERA	4	28	0	5	5
538	OVERA	5	50	5	3	5
538	OVERA	6	65	12	1	4
538	OVERA	7	38	0	5	5
538	OVERA	8	83	11	1	4
538	OVERA	9	37	4	5	4
538	OVERA	10	38	5	5	5
538	OVERA	11	38	6	5	4
538	OVERA	12	83	15	1	3
538	OVERA	13	59	15	4	3
538	OVERA	14	60	17	0	3
538	OVERA	15	54	7	1	4
538	OVERA	16	50	0	5	5
538	OVERA	17	71	15	1	4
538	OVERA	18	78	11	5	4
538	PAMPA	1	83	20	2	2
538	PAMPA	2	119	17	2	2
538	PAMPA	3	67	9	2	2
538	PAMPA	4	94	17	2	2
538	PAMPA	5	66	9	2	2
538	PAMPA	6	150	20	1	1
538	PAMPA	7	37	8	2	3
538	PAMPA	8	52	17	1	2
538	PAMPA	9	37	11	0	3
538	PAMPA	10	29	0	4	5
538	PAMPA	11	50	10	1	3
538	PAMPA	12	41	21	1	2
538	PAMPA	13	104	20	2	2
538	PAMPA	14	71	12	2	2
538	PAMPA	15	46	11	2	3
538	PAMPA	16	79	13	2	3
538	PAMPA	17	48	7	4	4
538	PAMPA	18	55	15	1	3
559	INTA06575	1	71	19	1	2
559	INTA06575	2	82	11	5	5
559	INTA06575	3	74	12	5	5
559	INTA06575	4	61	0	2	2
559	INTA06575	5	78	3	5	5
559	INTA06575	6	70	0	1	3
559	INTA06575	7	47	0	5	5
559	INTA06575	8	66	0	5	5
559	INTA06575	9	59	0	5	5
559	INTA06575	10	72	0	5	5
559	INTA06575	11	82	0	5	5
559	INTA06575	12	70	17	1	3
559	INTA06575	13	59	7	1	4
559	INTA06575	14	62	8	2	4

559	INTA06575	15	83	6	3	4
559	INTA06575	16	56	11	5	5
559	INTA06575	17	110	11	5	3
559	INTA06575	18	69	8	2	4
559	OVERA	1	73	20	5	2
559	OVERA	2	69	10	1	3
559	OVERA	3	34	0	0	5
559	OVERA	4	65	20	0	2
559	OVERA	5	76	20	0	3
559	OVERA	6	89	28	1	4
559	OVERA	7	85	21	1	2
559	OVERA	8	57	0	5	5
559	OVERA	9	77	20	0	2
559	OVERA	10	54	5	1	4
559	OVERA	11	76	9	1	2
559	OVERA	12	63	21	0	2
559	OVERA	13	115	12	0	1
559	OVERA	14	97	9	2	3
559	OVERA	15	62	7	5	5
559	OVERA	16	78	12	0	4
559	OVERA	17	36	10	1	4
559	OVERA	18	29	7	5	5
559	PAMPA	1	51	11	0	2
559	PAMPA	2	72	7	5	4
559	PAMPA	3	84	0	5	5
559	PAMPA	4	93	13	4	2
559	PAMPA	5	73	5	5	4
559	PAMPA	6	98	14	1	1
559	PAMPA	7	106	11	0	1
559	PAMPA	8	65	19	2	2
559	PAMPA	9	69	6	5	4
559	PAMPA	10	80	14	2	3
559	PAMPA	11	106	10	1	3
559	PAMPA	12	76	20	3	3
559	PAMPA	13	70	10	1	2
559	PAMPA	14	81	7	0	3
559	PAMPA	15	84	6	1	4
559	PAMPA	16	83	11	0	3
559	PAMPA	17	55	12	0	2
559	PAMPA	18	50	6	0	5
<hr/>						
566	INTA06575	1	100	8	3	4
566	INTA06575	2	73	8	5	2
566	INTA06575	3	69	5	3	4
566	INTA06575	4	50	0	5	5
566	INTA06575	5	81	9	5	5
566	INTA06575	6	124	3	4	5
566	INTA06575	7	56	5	5	5
566	INTA06575	8	143	0	5	5
566	INTA06575	9	63	0	5	5
566	INTA06575	10	72	0	5	5
566	INTA06575	11	54	6	2	5
566	INTA06575	12	78	9	2	5
566	INTA06575	13	54	0	4	5
566	INTA06575	14	70	9	3	5
566	INTA06575	15	52	7	4	5
566	INTA06575	16	59	3	5	5
566	INTA06575	17	84	5	5	5
566	INTA06575	18	80	10	1	5
566	OVERA	1	57	0	5	5
566	OVERA	2	66	10	5	4
566	OVERA	3	78	8	5	4
566	OVERA	4	60	0	5	5
566	OVERA	5	59	0	5	4
566	OVERA	6	76	13	5	5
566	OVERA	7	74	0	5	5
566	OVERA	8	24	12	5	4
566	OVERA	9	76	0	5	5
566	OVERA	10	38	2	5	5
566	OVERA	11	85	2	5	5
566	OVERA	12	75	17	2	2
566	OVERA	13	39	0	5	5
566	OVERA	14	55	0	5	5
566	OVERA	15	57	0	5	5
566	OVERA	16	47	3	5	5
566	OVERA	17	34	10	5	2
566	OVERA	18	47	7	1	5
566	PAMPA	1	70	8	5	4
566	PAMPA	2	32	5	5	5
566	PAMPA	3	46	8	2	3
566	PAMPA	4	121	8	3	3
566	PAMPA	5	71	5	5	5
566	PAMPA	6	74	17	1	2
566	PAMPA	7	70	3	4	5
566	PAMPA	8	53	0	5	5
566	PAMPA	9	67	9	5	4
566	PAMPA	10	64	0	4	3
566	PAMPA	11	80	7	4	3
566	PAMPA	12	60	12	2	3
566	PAMPA	13	53	11	4	5
566	PAMPA	14	75	10	4	5
566	PAMPA	15	27	0	5	5
566	PAMPA	16	57	0	5	5
566	PAMPA	17	84	11	2	2
566	PAMPA	18	54	10	1	2
<hr/>						
567	INTA06575	1	117	6	0	5

567	INTA06575	2	65	7	1	3
567	INTA06575	3	77	5	5	5
567	INTA06575	4	99	13	3	4
567	INTA06575	5	67	0	5	5
567	INTA06575	6	121	19	2	3
567	INTA06575	7	73	10	1	4
567	INTA06575	8	99	0	2	5
567	INTA06575	9	77	7	5	5
567	INTA06575	10	97	0	5	2
567	INTA06575	11	100	7	5	5
567	INTA06575	12	90	9	2	5
567	INTA06575	13	109	10	1	5
567	INTA06575	14	89	16	2	5
567	INTA06575	15	87	12	2	3
567	INTA06575	16	88	20	1	2
567	INTA06575	17	123	13	0	1
567	INTA06575	18	92	16	0	1
567	OVERA	1	79	13	3	4
567	OVERA	2	45	9	2	5
567	OVERA	3	90	20	1	2
567	OVERA	4	87	22	0	5
567	OVERA	5	93	20	0	4
567	OVERA	6	98	26	0	3
567	OVERA	7	137	9	0	1
567	OVERA	8	62	9	0	5
567	OVERA	9	63	13	0	5
567	OVERA	10	55	0	5	2
567	OVERA	11	63	12	1	5
567	OVERA	12	65	7	1	5
567	OVERA	13	133	11	2	5
567	OVERA	14	110	8	4	4
567	OVERA	15	59	7	5	5
567	OVERA	16	31	0	5	5
567	OVERA	17	104	22	1	4
567	OVERA	18	67	0	5	5
567	PAMPA	1	48	8	0	5
567	PAMPA	2	52	14	1	2
567	PAMPA	3	64	11	1	2
567	PAMPA	4	84	11	3	3
567	PAMPA	5	93	8	2	5
567	PAMPA	6	66	10	0	2
567	PAMPA	7	88	4	4	5
567	PAMPA	8	76	4	4	5
567	PAMPA	9	39	12	1	2
567	PAMPA	10	88	8	1	5
567	PAMPA	11	91	19	1	2
567	PAMPA	12	79	12	1	2
567	PAMPA	13	93	15	1	1
567	PAMPA	14	63	10	0	5
567	PAMPA	15	62	15	0	1
567	PAMPA	16	76	10	1	5
567	PAMPA	17	121	7	1	5
567	PAMPA	18	62	0	5	5
569	INTA06575	1	105	0	4	5
569	INTA06575	2	101	12	1	4
569	INTA06575	3	72	4	5	5
569	INTA06575	4	105	0	5	5
569	INTA06575	5	63	4	5	5
569	INTA06575	6	56	2	5	5
569	INTA06575	7	48	0	5	5
569	INTA06575	8	88	0	5	5
569	INTA06575	9	69	2	5	5
569	INTA06575	10	104	11	1	5
569	INTA06575	11	69	2	5	5
569	INTA06575	12	78	3	2	5
569	INTA06575	13	102	13	1	4
569	INTA06575	14	78	12	0	4
569	INTA06575	15	92	8	0	4
569	INTA06575	16	85	13	0	4
569	INTA06575	17	69	7	0	5
569	INTA06575	18	87	10	0	5
569	OVERA	1	50	6	0	5
569	OVERA	2	55	21	1	2
569	OVERA	3	27	7	5	5
569	OVERA	4	64	25	1	3
569	OVERA	5	7	0	5	5
569	OVERA	6	81	0	5	5
569	OVERA	7	43	6	0	5
569	OVERA	8	54	7	1	4
569	OVERA	9	46	15	5	3
569	OVERA	10	59	14	1	4
569	OVERA	11	60	3	5	4
569	OVERA	12	82	11	5	4
569	OVERA	13	44	6	0	5
569	OVERA	14	92	28	1	4
569	OVERA	15	63	16	0	5
569	OVERA	16	67	48	1	4
569	OVERA	17	57	16	0	5
569	OVERA	18	66	13	5	5
569	PAMPA	1	56	10	0	2
569	PAMPA	2	70	13	1	3
569	PAMPA	3	67	10	1	3
569	PAMPA	4	39	8	1	4
569	PAMPA	5	67	5	5	4
569	PAMPA	6	69	10	1	4

569	PAMPA	7	87	6	4	5
569	PAMPA	8	34	0	5	5
569	PAMPA	9	65	6	3	4
569	PAMPA	10	105	9	1	4
569	PAMPA	11	40	0	5	5
569	PAMPA	12	86	5	5	5
569	PAMPA	13	106	15	0	3
569	PAMPA	14	79	16	1	2
569	PAMPA	15	37	8	5	3
569	PAMPA	16	49	0	5	5
569	PAMPA	17	54	0	5	5
569	PAMPA	18	85	13	1	4
577	INTA06575	1	106	17	1	3
577	INTA06575	2	77	12	4	5
577	INTA06575	3	113	3	1	3
577	INTA06575	4	108	6	1	1
577	INTA06575	5	112	10	2	4
577	INTA06575	6	119	5	0	1
577	INTA06575	7	44	4	1	3
577	INTA06575	8	97	2	1	1
577	INTA06575	9	110	10	0	1
577	INTA06575	10	93	21	0	1
577	INTA06575	11	65	12	0	1
577	INTA06575	12	71	11	0	1
577	INTA06575	13	98	13	0	1
577	INTA06575	14	80	30	1	1
577	INTA06575	15	120	24	0	1
577	INTA06575	16	103	20	0	1
577	INTA06575	17	87	27	0	1
577	INTA06575	18	78	18	0	1
577	OVERA	1	67	19	0	1
577	OVERA	2	34	4	1	3
577	OVERA	3	80	13	0	3
577	OVERA	4	65	17	0	1
577	OVERA	5	76	16	0	1
577	OVERA	6	87	0	0	1
577	OVERA	7	38	0	0	5
577	OVERA	8	72	15	1	1
577	OVERA	9	70	10	3	3
577	OVERA	10	40	14	1	1
577	OVERA	11	121	37	0	1
577	OVERA	12	93	26	0	1
577	OVERA	13	81	32	0	1
577	OVERA	14	50	29	0	1
577	OVERA	15	45	13	1	1
577	OVERA	16	57	20	1	1
577	OVERA	17	67	8	0	1
577	OVERA	18	71	17	0	1
577	PAMPA	1	56	12	0	1
577	PAMPA	2	93	22	1	1
577	PAMPA	3	86	12	1	1
577	PAMPA	4	83	14	1	1
577	PAMPA	5	113	22	1	1
577	PAMPA	6	64	17	1	1
577	PAMPA	7	50	16	1	1
577	PAMPA	8	34	15	0	1
577	PAMPA	9	106	19	1	1
577	PAMPA	10	74	17	0	1
577	PAMPA	11	64	24	0	1
577	PAMPA	12	67	28	0	1
577	PAMPA	13	90	20	0	1
577	PAMPA	14	104	23	1	1
577	PAMPA	15	80	23	1	1
577	PAMPA	16	85	25	0	1
577	PAMPA	17	91	19	0	1
577	PAMPA	18	59	8	1	1

6.3. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp.

Trichoderma vs Fusarium	Repetición	Ensayo 1		Ensayo 2	
		Día 5 - <i>Fusarium</i>	% Inhibición	Día 5 - <i>Fusarium</i>	% Inhibición
503-535	1	19	32,1	21	-23,5
503-535	2	15	44,4	15	16,7
503-535	3	19	42,4	20	9,1
503-535	4	20	35,5	20	0,0
503-535	5	18	28,0	18	14,3
503-535	6	19	36,7	18	18,2
505-535	1	13	53,6	13	23,5
505-535	2	12	55,6	15	16,7
505-535	3	14	57,6	12	45,5
505-535	4	12	61,3	10	50,0
505-535	5	12	52,0	12	42,9
505-535	6	11	63,3	12	45,5
506-535	1	13	53,6	15	32,2
506-535	2	11	59,3	13	27,8
506-535	3	13	60,6	13	40,9
506-535	4	15	51,6	14	30,0
506-535	5	14	44,0	15	28,6
506-535	6	14	53,3	14	36,4
508-535	1	13	53,6	12	29,4
508-535	2	14	48,2	13	27,8
508-535	3	14	57,6	12	45,5

508-535	4	16	48,4	14	30,0
508-535	5	14	44,0	13	38,1
508-535	6	15	50,0	14	36,4
510-535	1	13	53,6	11	35,3
510-535	2	12	55,6	11	38,9
510-535	3	12	63,6	11	50,0
510-535	4	12	61,3	12	40,0
510-535	5	12	52,0	11	47,6
510-535	6	11	63,3	13	40,9
511-535	1	13	53,6	13	23,5
511-535	2	11	59,3	12	33,3
511-535	3	13	60,6	11	50,0
511-535	4	12	61,3	11	45,0
511-535	5	14	44,0	12	42,9
511-535	6	11	63,3	13	40,9
512-535	1	18	35,7	13	23,5
512-535	2	13	51,9	14	22,2
512-535	3	15	54,6	13	40,9
512-535	4	12	61,3	13	35,0
512-535	5	16	36,0	14	33,3
512-535	6	12	60,0	12	45,5
513-535	1	15	46,4	12	29,4
513-535	2	15	44,4	14	22,2
513-535	3	16	51,5	13	40,9
513-535	4	13	58,1	13	35,0
513-535	5	13	48,0	14	33,3
513-535	6	14	53,3	16	27,3
514-535	1	18	35,7	15	11,8
514-535	2	21	22,2	14	22,2
514-535	3	16	51,5	16	27,3
514-535	4	15	51,6	16	20,0
514-535	5	13	48,0	17	19,1
514-535	6	18	40,0	13	40,9
549-535	1	8	71,4	10	41,2
549-535	2	10	63,0	10	44,4
549-535	3	10	69,7	10	54,6
549-535	4	9	71,0	11	45,0
549-535	5	9	64,0	10	52,4
549-535	6	10	66,7	9	59,1
550-535	1	15	46,4	13	23,5
550-535	2	15	44,4	13	27,8
550-535	3	14	57,6	12	45,5
550-535	4	13	58,1	14	30,0
550-535	5	14	44,0	12	42,9
550-535	6	15	50,0	17	22,7
551-535	1	13	53,6	15	11,8
551-535	2	12	55,6	12	33,3
551-535	3	13	60,6	13	40,9
551-535	4	13	58,1	16	20,0
551-535	5	12	52,0	14	33,3
551-535	6	12	60,0	14	36,4
552-535	1	14	50,0	18	20,0
552-535	2	12	55,6	15	16,7
552-535	3	13	60,6	15	31,8
552-535	4	13	58,1	20	0,0
552-535	5	12	52,0	14	33,3
552-535	6	15	50,0	18	18,2
553-535	1	9	67,9	12	29,4
553-535	2	10	63,0	11	38,9
553-535	3	11	66,7	13	40,9
553-535	4	11	64,5	10	50,0
553-535	5	10	60,0	13	38,1
553-535	6	12	60,0	14	36,4
572-535	1	18	35,7	17	26,1
572-535	2	15	44,4	18	26,1
572-535	3	15	54,6	16	27,3
572-535	4	19	38,7	15	25,0
572-535	5	15	40,0	12	42,9
572-535	6	21	30,0	20	9,1
573-535	1	11	60,7	9	47,1
573-535	2	10	63,0	12	33,3
573-535	3	15	54,6	13	40,9
573-535	4	11	64,5	14	30,0
573-535	5	9	64,0	14	33,3
573-535	6	12	60,0	10	54,6
580-535	1	12	57,1	11	35,3
580-535	2	13	51,9	14	22,2
580-535	3	13	60,6	14	36,4
580-535	4	12	61,3	13	35,0
580-535	5	11	56,0	14	33,3
580-535	6	14	53,3	15	31,8
612-535	1	13	53,6	12	29,4
612-535	2	11	59,3	12	33,3
612-535	3	10	69,7	11	50,0
612-535	4	10	67,7	10	50,0
612-535	5	7	72,0	12	42,9
612-535	6	10	66,7	15	31,8
613-535	1	11	60,7	10	41,2
613-535	2	14	48,2	9	50,0
613-535	3	13	60,6	8	63,6
613-535	4	12	61,3	9	55,0
613-535	5	14	44,0	11	47,6
613-535	6	12	60,0	10	54,6
614-535	1	10	64,3	12	29,4
614-535	2	10	63,0	11	38,9

614-535	3	11	66,7	10	54,6
614-535	4	14	54,8	11	45,0
614-535	5	13	48,0	11	47,6
614-535	6	13	56,7	11	50,0
615-535	1	11	60,7	11	35,3
615-535	2	12	55,6	13	27,8
615-535	3	15	54,6	13	40,9
615-535	4	11	64,5	15	25,0
615-535	5	14	44,0	15	28,6
615-535	6	16	46,7	18	18,2
622-535	1	14	50,0	13	23,5
622-535	2	14	48,2	14	22,2
622-535	3	12	63,6	15	31,8
622-535	4	15	51,6	9	55,0
622-535	5	15	40,0	19	35,6
622-535	6	20	33,3	12	45,5
623-535	1	14	50,0	13	23,5
623-535	2	13	51,9	14	22,2
623-535	3	13	60,6	14	36,4
623-535	4	17	45,2	10	50,0
623-535	5	13	48,0	12	42,9
623-535	6	14	53,3	13	40,9
624-535	1	15	46,4	15	11,8
624-535	2	11	59,3	13	27,8
624-535	3	13	60,6	14	36,4
624-535	4	10	67,7	14	30,0
624-535	5	17	32,0	12	42,9
624-535	6	13	56,7	13	40,9
625-535	1	14	50,0	17	30,0
625-535	2	14	48,2	18	30,0
625-535	3	16	51,5	14	36,4
625-535	4	16	48,4	18	10,0
625-535	5	15	40,0	16	23,8
625-535	6	16	46,7	11	50,0
626-535	1	15	46,4	12	29,4
626-535	2	18	33,3	13	27,8
626-535	3	11	66,7	14	36,4
626-535	4	16	48,4	12	40,0
626-535	5	11	56,0	13	38,1
626-535	6	14	53,3	12	45,5
627-535	1	15	46,4	17	14,2
627-535	2	13	51,9	17	5,6
627-535	3	16	51,5	16	27,3
627-535	4	15	51,6	17	15,0
627-535	5	15	40,0	19	9,5
627-535	6	16	46,7	19	13,6
629-535	1	12	57,1	15	11,8
629-535	2	12	55,6	11	38,9
629-535	3	16	51,5	17	22,7
629-535	4	12	61,3	12	40,0
629-535	5	11	56,0	14	33,3
629-535	6	11	63,3	11	50,0
630-535	1	9	67,9	10	41,2
630-535	2	7	74,1	10	44,4
630-535	3	8	75,8	11	50,0
630-535	4	10	67,7	9	55,0
630-535	5	9	64,0	10	52,4
630-535	6	9	70,0	12	45,5
631-535	1	13	53,6	15	11,8
631-535	2	14	48,2	14	22,2
631-535	3	11	66,7	12	45,5
631-535	4	12	61,3	12	40,0
631-535	5	16	36,0	14	33,3
631-535	6	12	60,0	18	18,2
632-535	1	15	46,4	21	22,0
632-535	2	13	51,9	16	11,1
632-535	3	12	63,6	18	18,2
632-535	4	14	54,8	15	25,0
632-535	5	14	44,0	15	28,6
632-535	6	14	53,3	16	27,3
535	1	28	-	17	-
535	2	27	-	18	-
535	3	33	-	22	-
535	4	31	-	20	-
535	5	25	-	21	-
535	6	30	-	22	-

Trichoderma vs Fusarium	Repetición	Ensayo 1		Ensayo 2	
		Día 5 - Fusarium	% Inhibición	Día 5 - Fusarium	% Inhibición
503-536	1	14,0	26,3	16,0	26,3
503-536	2	16,0	0,0	12,5	0,0
503-536	3	16,0	30,4	15,5	30,4
503-536	4	15,0	40,0	15,0	40,0
505-536	1	6,5	65,8	7,5	65,8
505-536	2	8,0	50,0	9,0	50,0
505-536	3	7,0	69,6	8,0	69,6
505-536	4	6,0	76,0	6,0	76,0
506-536	1	8,0	57,9	9,5	57,9
506-536	2	8,0	50,0	10,0	50,0
506-536	3	10,0	56,5	10,0	56,5
506-536	4	7,5	70,0	8,5	70,0
508-536	1	10,0	47,4	11,0	47,4
508-536	2	10,0	37,5	10,0	37,5

508-536	3	9,5	58,7	11,0	58,7
508-536	4	10,0	60,0	10,0	60,0
510-536	1	6,0	68,4	7,0	68,4
510-536	2	7,5	53,1	9,0	53,1
510-536	3	8,0	65,2	7,0	65,2
510-536	4	7,0	72,0	7,0	72,0
511-536	1	7,0	63,2	7,5	63,2
511-536	2	6,0	62,5	7,0	62,5
511-536	3	8,5	63,0	8,0	63,0
511-536	4	8,5	66,0	9,0	66,0
512-536	1	13,0	31,6	6,5	31,6
512-536	2	9,0	43,8	10,5	43,8
512-536	3	9,0	60,9	10,0	60,9
512-536	4	11,0	56,0	8,0	56,0
513-536	1	9,0	52,6	6,0	52,6
513-536	2	12,0	25,0	9,5	25,0
513-536	3	10,0	56,5	7,0	56,5
513-536	4	9,0	64,0	11,0	64,0
514-536	1	15,0	21,1	14,5	21,1
514-536	2	13,5	15,6	15,0	15,6
514-536	3	14,0	39,1	14,0	39,1
514-536	4	16,0	36,0	17,0	36,0
549-536	1	8,0	57,9	8,0	57,9
549-536	2	7,0	56,3	10,0	56,3
549-536	3	4,0	82,6	5,0	82,6
549-536	4	6,0	76,0	6,0	76,0
550-536	1	8,5	55,3	7,0	55,3
550-536	2	8,0	50,0	13,0	50,0
550-536	3	12,0	47,8	8,5	47,8
550-536	4	15,0	40,0	8,0	40,0
551-536	1	6,0	68,4	9,0	68,4
551-536	2	10,0	37,5	6,0	37,5
551-536	3	10,0	56,5	6,5	56,5
551-536	4	8,5	66,0	10,0	66,0
552-536	1	7,5	60,5	11,0	60,5
552-536	2	8,0	50,0	9,0	50,0
552-536	3	7,0	69,6	9,0	69,6
552-536	4	8,5	66,0	9,5	66,0
553-536	1	7,0	63,2	7,5	63,2
553-536	2	8,5	46,9	9,0	46,9
553-536	3	7,5	67,4	6,5	67,4
553-536	4	8,0	68,0	7,5	68,0
572-536	1	8,0	57,9	10,0	57,9
572-536	2	9,0	43,8	9,5	43,8
572-536	3	8,5	63,0	9,0	63,0
572-536	4	8,0	68,0	8,5	68,0
573-536	1	6,5	65,8	8,5	65,8
573-536	2	8,0	50,0	7,5	50,0
573-536	3	6,0	73,9	8,0	73,9
573-536	4	6,5	74,0	10,5	74,0
580-536	1	9,0	52,6	8,5	52,6
580-536	2	11,0	31,3	11,0	31,3
580-536	3	8,5	63,0	8,0	63,0
580-536	4	9,0	64,0	9,0	64,0
612-536	1	5,0	73,7	7,0	73,7
612-536	2	6,5	59,4	7,0	59,4
612-536	3	6,5	71,7	8,0	71,7
612-536	4	7,5	70,0	9,0	70,0
613-536	1	6,0	68,4	7,0	68,4
613-536	2	7,0	56,3	6,0	56,3
613-536	3	6,0	73,9	7,0	73,9
613-536	4	5,0	80,0	9,0	80,0
614-536	1	7,0	63,2	6,0	63,2
614-536	2	4,0	75,0	9,0	75,0
614-536	3	5,0	78,3	7,0	78,3
614-536	4	4,0	84,0	6,0	84,0
615-536	1	8,0	57,9	9,5	57,9
615-536	2	10,0	37,5	5,0	37,5
615-536	3	11,0	52,2	8,0	52,2
615-536	4	8,5	66,0	8,0	66,0
622-536	1	9,0	52,6	11,0	52,6
622-536	2	9,0	43,8	9,0	43,8
622-536	3	8,5	63,0	11,0	63,0
622-536	4	9,0	64,0	12,5	64,0
623-536	1	12,5	34,2	8,0	34,2
623-536	2	10,0	37,5	11,0	37,5
623-536	3	11,0	52,2	10,0	52,2
623-536	4	12,0	52,0	10,0	52,0
624-536	1	9,5	50,0	9,0	50,0
624-536	2	10,0	37,5	10,0	37,5
624-536	3	9,0	60,9	9,0	60,9
624-536	4	9,0	64,0	9,5	64,0
625-536	1	10,0	47,4	13,5	47,4
625-536	2	10,0	37,5	10,0	37,5
625-536	3	9,0	60,9	11,0	60,9
625-536	4	14,0	44,0	10,0	44,0
626-536	1	15,0	21,1	10,5	21,1
626-536	2	9,5	40,6	10,0	40,6
626-536	3	9,8	57,4	10,0	57,4
626-536	4	8,0	68,0	8,5	68,0
627-536	1	12,0	36,8	12,0	36,8
627-536	2	12,0	25,0	12,0	25,0
627-536	3	14,0	39,1	12,0	39,1
627-536	4	12,0	52,0	10,0	52,0
629-536	1	8,0	57,9	7,0	57,9

629-536	2	7,0	56,3	8,0	56,3
629-536	3	7,0	69,6	8,0	69,6
629-536	4	6,5	74,0	5,0	74,0
630-536	1	7,0	63,2	6,5	63,2
630-536	2	7,5	53,1	7,5	53,1
630-536	3	8,0	65,2	5,0	65,2
630-536	4	5,0	80,0	5,0	80,0
631-536	1	8,0	57,9	7,0	57,9
631-536	2	9,0	43,8	9,5	43,8
631-536	3	8,0	65,2	10,0	65,2
631-536	4	8,0	68,0	10,0	68,0
632-536	1	14,5	23,7	13,0	23,7
632-536	2	12,5	21,9	14,0	21,9
632-536	3	15,0	34,8	17,5	34,8
632-536	4	15,5	38,0	15,0	38,0
536	1	19,0	-	21,5	-
536	2	16,0	-	19,0	-
536	3	23,0	-	21,0	-
536	4	25,0	-	20,0	-

6.4. Colonización de sustratos por *Trichoderma* sp.

Tratamiento	Repetición	UFC/mL	Tratamiento	Repetición	UFC/mL	Tratamiento	Repetición	UFC/mL
Testigo 1%	1	55000	614 5%	1	47000000	614 E 10%	1	27000000
Testigo 1%	2	52000	614 5%	2	46000000	614 E 10%	2	27000000
Testigo 1%	3	47000	614 5%	3	49000000	614 E 10%	3	29000000
Testigo 1%	4	51000	614 5%	4	47000000	614 E 10%	4	28000000
Testigo 5%	1	58000	614 10%	1	73000000	630 E 1%	1	19000000
Testigo 5%	2	67000	614 10%	2	79000000	630 E 1%	2	20000000
Testigo 5%	3	54000	614 10%	3	75000000	630 E 1%	3	21000000
Testigo 5%	4	54000	614 10%	4	76000000	630 E 1%	4	19000000
Testigo 10%	1	64000	630 1%	1	11000000	630 E 5%	1	44000000
Testigo 10%	2	59000	630 1%	2	12000000	630 E 5%	2	46000000
Testigo 10%	3	55000	630 1%	3	10000000	630 E 5%	3	39000000
Testigo 10%	4	66000	630 1%	4	11000000	630 E 5%	4	42000000
Testigo estéril 1%	1	20000	630 5%	1	50000000	630 E 10%	1	176000000
Testigo estéril 1%	2	18000	630 5%	2	44000000	630 E 10%	2	180000000
Testigo estéril 1%	3	18000	630 5%	3	46000000	630 E 10%	3	177000000
Testigo estéril 1%	4	20000	630 5%	4	47000000	630 E 10%	4	165000000
Testigo estéril 5%	1	16000	630 10%	1	62000000			
Testigo estéril 5%	2	14000	630 10%	2	61000000			
Testigo estéril 5%	3	17000	630 10%	3	59000000			
Testigo estéril 5%	4	13000	630 10%	4	60000000			
Testigo estéril 10%	1	21000	549 E 1%	1	35000000			
Testigo estéril 10%	2	17000	549 E 1%	2	35000000			
Testigo estéril 10%	3	15000	549 E 1%	3	36000000			
Testigo estéril 10%	4	18000	549 E 1%	4	33000000			
549 1%	1	68000000	549 E 5%	1	62000000			
549 1%	2	67000000	549 E 5%	2	63000000			
549 1%	3	70000000	549 E 5%	3	62000000			
549 1%	4	68000000	549 E 5%	4	63000000			
549 5%	1	42000000	549 E 10%	1	79000000			
549 5%	2	44000000	549 E 10%	2	70000000			
549 5%	3	41000000	549 E 10%	3	68000000			
549 5%	4	43000000	549 E 10%	4	75000000			
549 10%	1	89000000	612 E 1%	1	66000000			
549 10%	2	84000000	612 E 1%	2	64000000			
549 10%	3	87000000	612 E 1%	3	66000000			
549 10%	4	85000000	612 E 1%	4	66000000			
612 1%	1	38000000	612 E 5%	1	42000000			
612 1%	2	36000000	612 E 5%	2	41000000			
612 1%	3	35000000	612 E 5%	3	43000000			
612 1%	4	37000000	612 E 5%	4	44000000			
612 5%	1	66000000	612 E 10%	1	65000000			
612 5%	2	67000000	612 E 10%	2	63000000			
612 5%	3	60000000	612 E 10%	3	66000000			
612 5%	4	65000000	612 E 10%	4	63000000			
612 10%	1	112000000	613 E 1%	1	45000000			
612 10%	2	110000000	613 E 1%	2	50000000			
612 10%	3	115000000	613 E 1%	3	42000000			
612 10%	4	112000000	613 E 1%	4	46000000			
613 1%	1	19000000	613 E 5%	1	93000000			
613 1%	2	22000000	613 E 5%	2	88000000			
613 1%	3	20000000	613 E 5%	3	90000000			
613 1%	4	21000000	613 E 5%	4	91000000			
613 5%	1	176000000	613 E 10%	1	128000000			
613 5%	2	190000000	613 E 10%	2	138000000			
613 5%	3	197000000	613 E 10%	3	132000000			
613 5%	4	191000000	613 E 10%	4	135000000			
613 10%	1	396000000	614 E 1%	1	12000000			
613 10%	2	388000000	614 E 1%	2	9000000			
613 10%	3	382000000	614 E 1%	3	10000000			
613 10%	4	404000000	614 E 1%	4	11000000			
614 1%	1	11000000	614 E 5%	1	20000000			
614 1%	2	13000000	614 E 5%	2	17000000			
614 1%	3	15000000	614 E 5%	3	18000000			
614 1%	4	13000000	614 E 5%	4	19000000			

6.5. Biocontrol *in vivo* por *Trichoderma* sp.

Aislado de <i>Fusarium</i>	Aislado de <i>Trichoderma</i>	Repetición	Ensayo 1						Ensayo 2					
			PFA	PFR	PSA	PSR	Escala Raíz	Escala Aérea	PFA	PFR	PSA	PSR	Escala Raíz	Escala Aérea
-	-	1	324,0	232,0	76,8	20,2	1	0	324,0	232,0	76,8	20,2	1	0
-	-	2	588,0	212,0	82,7	14,7	1	0	588,0	212,0	82,7	14,7	1	0
-	-	3	564,0	287,0	76,6	24,1	1	0	564,0	287,0	76,6	24,1	1	0
-	-	4	680,0	260,0	107,0	22,6	1	0	680,0	260,0	107,0	22,6	1	0
-	-	5	528,0	176,0	60,8	14,5	1	0	528,0	176,0	60,8	14,5	1	0
-	-	6	509,0	235,0	75,3	20,3	1	0	509,0	235,0	75,3	20,3	1	0
INTA IF-535	-	1	59,0	83,0	44,6	8,7	4	5	109,0	49,0	56,3	6,5	3	5
INTA IF-535	-	2	348,0	132,0	52,4	12,2	2	1	282,0	265,0	54,2	22,8	2	1
INTA IF-535	-	3	297,0	109,0	41,4	15,0	2	4	224,0	101,0	90,6	15,3	2	5
INTA IF-535	-	4	275,0	135,0	50,8	10,0	2	4	61,0	33,0	43,2	5,6	2	5
INTA IF-535	-	5	194,0	195,0	34,9	10,8	3	5	154,0	139,0	53,6	17,6	2	5
INTA IF-535	-	6	105,0	142,0	64,0	13,6	2	5	137,0	171,0	73,6	17,0	2	5
INTA IF-535	INTA IF-549	1	523,0	221,0	83,1	18,1	1	0	477,0	209,0	77,2	18,2	1	1
INTA IF-535	INTA IF-549	2	428,0	202,0	60,8	15,0	1	0	511,0	197,0	72,4	14,5	1	0
INTA IF-535	INTA IF-549	3	455,0	157,0	61,7	14,6	1	0	823,0	351,0	109,3	32,4	1	0
INTA IF-535	INTA IF-549	4	502,0	254,0	80,7	23,3	1	0	525,0	233,0	68,3	17,2	1	0
INTA IF-535	INTA IF-549	5	446,0	155,0	58,5	12,2	1	0	428,0	184,0	58,8	13,4	1	0
INTA IF-535	INTA IF-549	6	409,0	222,0	61,7	15,3	1	0	524,0	195,0	71,4	17,4	1	0
INTA IF-535	INTA IF-612	1	375,0	136,0	48,0	14,7	1	0	560,0	233,0	78,3	17,8	1	0
INTA IF-535	INTA IF-612	2	814,0	296,0	107,5	25,1	1	0	514,0	209,0	70,5	15,8	1	0
INTA IF-535	INTA IF-612	3	707,0	308,0	103,5	29,2	1	0	572,0	144,0	80,6	13,9	1	0
INTA IF-535	INTA IF-612	4	670,0	206,0	93,3	16,7	1	0	954,0	428,0	149,3	31,1	1	0
INTA IF-535	INTA IF-612	5	615,0	258,0	84,0	22,3	1	0	380,0	187,0	48,8	14,6	1	0
INTA IF-535	INTA IF-612	6	340,0	142,0	43,9	13,1	1	0	505,0	182,0	76,3	17,0	1	0
INTA IF-535	INTA IF-613	1	350,0	132,0	51,6	9,9	1	0	652,0	293,0	88,4	26,6	1	0
INTA IF-535	INTA IF-613	2	394,0	152,0	59,9	12,6	1	0	551,0	263,0	66,5	18,9	1	0
INTA IF-535	INTA IF-613	3	811,0	255,0	100,3	20,1	1	0	967,0	461,0	121,0	32,8	1	0
INTA IF-535	INTA IF-613	4	758,0	290,0	98,0	22,5	1	0	669,0	317,0	82,6	24,9	2	0
INTA IF-535	INTA IF-613	5	498,0	279,0	61,8	20,9	1	0	613,0	221,0	76,3	18,7	2	0
INTA IF-535	INTA IF-613	6	505,0	162,0	82,5	16,3	2	0	813,0	349,0	103,5	26,8	1	0
INTA IF-535	INTA IF-614	1	730,0	199,0	98,3	14,4	1	0	635,0	188,0	96,7	20,3	2	1
INTA IF-535	INTA IF-614	2	200,0	70,0	52,9	9,1	1	0	79,0	130,0	69,6	6,2	2	1
INTA IF-535	INTA IF-614	3	817,0	285,0	98,3	22,8	1	0	64,0	48,0	48,7	6,9	2	2
INTA IF-535	INTA IF-614	4	693,0	261,0	78,5	21,9	1	0	336,0	171,0	40,8	15,5	2	1
INTA IF-535	INTA IF-614	5	520,0	166,0	79,3	15,6	2	0	347,0	144,0	72,2	13,2	2	2
INTA IF-535	INTA IF-614	6	362,0	135,0	49,5	11,9	1	0	464,0	145,0	54,7	14,3	2	1
INTA IF-535	INTA IF-630	1	556,0	176,0	62,3	12,3	1	0	962,0	345,0	106,7	26,3	1	0
INTA IF-535	INTA IF-630	2	580,0	221,0	66,0	16,3	1	0	810,0	324,0	101,3	25,1	1	0
INTA IF-535	INTA IF-630	3	781,0	301,0	91,2	20,7	1	0	569,0	193,0	65,8	14,9	1	0
INTA IF-535	INTA IF-630	4	892,0	276,0	109,6	19,8	1	0	662,0	220,0	82,2	19,5	1	0
INTA IF-535	INTA IF-630	5	630,0	231,0	76,9	17,5	1	0	509,0	173,0	64,6	13,6	1	0
INTA IF-535	INTA IF-630	6	857,0	281,0	103,6	22,6	1	0	800,0	251,0	110,1	21,4	1	0
-	-	1	324,0	232,0	76,8	20,2	1	0	823,0	551,0	127,3	41,9	1	0
-	-	2	588,0	212,0	82,7	14,7	1	0	651,0	381,0	88,6	39,6	1	0

-	-	3	564,0	287,0	76,6	24,1	1	0	720,0	462,0	95,3	41,2	1	0
-	-	4	680,0	260,0	107,0	22,6	1	0	768,0	472,0	102,5	49,9	1	0
-	-	5	528,0	176,0	60,8	14,5	1	0	847,0	524,0	135,7	50,2	1	0
-	-	6	509,0	235,0	75,3	20,3	1	0	659,0	351,0	72,4	38,6	1	0
INTA IF-536	-	1	109,0	49,0	56,3	6,5	3	5	240,0	102,0	72,8	12,7	3	5
INTA IF-536	-	2	282,0	265,0	54,2	22,8	2	1	312,0	113,0	85,2	17,4	2	3
INTA IF-536	-	3	224,0	101,0	90,6	15,3	2	5	191,0	89,0	66,1	7,2	2	4
INTA IF-536	-	4	61,0	33,0	43,2	5,6	2	5	239,0	161,0	77,4	18,1	2	5
INTA IF-536	-	5	154,0	139,0	53,6	17,6	2	5	226,0	114,0	70,6	7,6	2	4
INTA IF-536	-	6	137,0	171,0	73,6	17,0	2	5	287,0	178,0	82,7	21,9	2	5
INTA IF-536	INTA IF-549	1	477,0	209,0	77,2	18,2	1	1	809,0	401,0	127,1	33,4	1	1
INTA IF-536	INTA IF-549	2	511,0	197,0	72,4	14,5	1	0	684,0	335,0	84,2	30,2	1	0
INTA IF-536	INTA IF-549	3	823,0	351,0	109,3	32,4	1	0	754,0	395,0	104,6	36,7	1	0
INTA IF-536	INTA IF-549	4	525,0	233,0	68,3	17,2	1	0	772,0	421,0	117,3	40,3	1	0
INTA IF-536	INTA IF-549	5	428,0	184,0	58,8	13,4	1	0	712,0	465,0	105,7	37,6	1	1
INTA IF-536	INTA IF-549	6	524,0	195,0	71,4	17,4	1	0	780,0	428,0	125,8	37,8	1	0
INTA IF-536	INTA IF-612	1	560,0	233,0	78,3	17,8	1	0	902,0	531,0	165,6	51,2	1	0
INTA IF-536	INTA IF-612	2	514,0	209,0	70,5	15,8	1	0	813,0	459,0	123,4	37,3	1	0
INTA IF-536	INTA IF-612	3	572,0	144,0	80,6	13,9	1	0	856,0	419,0	139,7	36,1	1	0
INTA IF-536	INTA IF-612	4	954,0	428,0	149,3	31,1	1	0	791,0	487,0	99,2	42,7	1	0
INTA IF-536	INTA IF-612	5	380,0	187,0	48,8	14,6	1	0	833,0	433,0	132,4	41,8	1	0
INTA IF-536	INTA IF-612	6	505,0	182,0	76,3	17,0	1	0	829,0	501,0	117,9	45,9	1	0
INTA IF-536	INTA IF-613	1	652,0	293,0	88,4	26,6	1	0	1008,0	680,0	188,7	61,6	2	0
INTA IF-536	INTA IF-613	2	551,0	263,0	66,5	18,9	1	0	926,0	543,0	132,4	50,7	1	0
INTA IF-536	INTA IF-613	3	967,0	461,0	121,0	32,8	1	0	870,0	498,0	116,5	42,5	1	0
INTA IF-536	INTA IF-613	4	669,0	317,0	82,6	24,9	2	0	963,0	539,0	123,1	55,9	1	1
INTA IF-536	INTA IF-613	5	613,0	221,0	76,3	18,7	2	0	852,0	451,0	107,6	37,4	2	0
INTA IF-536	INTA IF-613	6	813,0	349,0	103,5	26,8	1	0	955,0	556,0	144,8	51,2	1	0
INTA IF-536	INTA IF-614	1	635,0	188,0	96,7	20,3	2	1	423,0	274,0	66,2	17,6	1	0
INTA IF-536	INTA IF-614	2	79,0	130,0	69,6	6,2	2	1	460,0	233,0	78,1	19,4	2	0
INTA IF-536	INTA IF-614	3	64,0	48,0	48,7	6,9	2	2	475,0	207,0	82,4	15,3	2	0
INTA IF-536	INTA IF-614	4	336,0	171,0	40,8	15,5	2	1	501,0	294,0	87,1	25,6	2	1
INTA IF-536	INTA IF-614	5	347,0	144,0	72,2	13,2	2	2	409,0	224,0	96,4	21,7	1	1
INTA IF-536	INTA IF-614	6	464,0	145,0	54,7	14,3	2	1	424,0	237,0	81,5	22,4	2	0
INTA IF-536	INTA IF-630	1	962,0	345,0	106,7	26,3	1	0	938,0	405,0	117,2	36,5	1	0
INTA IF-536	INTA IF-630	2	810,0	324,0	101,3	25,1	1	0	985,0	452,0	129,7	41,4	1	0
INTA IF-536	INTA IF-630	3	569,0	193,0	65,8	14,9	1	0	1021,0	611,0	156,3	55,2	1	0
INTA IF-536	INTA IF-630	4	662,0	220,0	82,2	19,5	1	0	967,0	423,0	110,4	40,7	1	0
INTA IF-536	INTA IF-630	5	509,0	173,0	64,6	13,6	1	0	982,0	520,0	121,8	46,3	1	0
INTA IF-536	INTA IF-630	6	800,0	251,0	110,1	21,4	1	0	944,0	446,0	100,7	42,2	1	0

*PFA= Peso fresco aéreo; PFR= Peso fresco radical; PSA= Peso seco aéreo; PSR= Peso seco radical

6.6. Promoción de crecimiento de calibrachoa por *Trichoderma* sp.

Aislado	Variación	Repetición	PFA	PFR	PSA	PSR	Nº Flores	Aislado	Variación	Repetición	PFA	PFR	PSA	PSR	Nº Flores
Testigo	Pampa Salmón INTA	1	2870	1915	488,8	128	3	INTA IF-612	Blanca	1	924	881	155,3	52,4	4
Testigo	Pampa Salmón INTA	2	2547	1316	417,5	94,9	3	INTA IF-612	Blanca	2	1733	1423	207,4	57,1	4
Testigo	Pampa Salmón INTA	3	2628	1621	439	125,5	3	INTA IF-612	Blanca	3	963	575	124,8	36,6	1
Testigo	Pampa Salmón INTA	4	2370	2202	377,3	144,2	2	INTA IF-612	Blanca	4	1442	899	200,6	61,4	3
Testigo	Pampa Salmón INTA	5	1738	918	295,5	69,2	1	INTA IF-612	Blanca	5	857	596	136,8	39,7	4
Testigo	Pampa Salmón INTA	6	2512	2364	401,9	159,6	4	INTA IF-612	Blanca	6	1863	1560	218,5	56,9	3
Testigo	Overá Fucsia-INTA	1	3658	1685	768,6	86,5	0	INTA IF-612	Amarilla	1	1913	1173	294	84,7	3
Testigo	Overá Fucsia-INTA	2	2848	1628	362,6	84,2	5	INTA IF-612	Amarilla	2	2093	1538	318,3	101,2	5
Testigo	Overá Fucsia-INTA	3	2551	962	33,6	53,2	2	INTA IF-612	Amarilla	3	3656	2868	382,8	121,4	3
Testigo	Overá Fucsia-INTA	4	2778	1879	287,7	95,4	0	INTA IF-612	Amarilla	4	2587	2076	294,7	129,6	4
Testigo	Overá Fucsia-INTA	5	3019	1308	363,7	79,5	5	INTA IF-612	Amarilla	5	2054	1585	305,1	114,1	4
Testigo	Overá Fucsia-INTA	6	1989	1134	249,7	70,3	5	INTA IF-612	Amarilla	6	4294	2287	341,2	135,4	3
Testigo	INTA 06575	1	3940	2080	570	158	3	INTA IF-612	Violeta	1	1337	751	199,9	60	4
Testigo	INTA 06575	2	2829	1865	340,5	98,3	1	INTA IF-612	Violeta	2	1916	1001	258,4	53,8	3
Testigo	INTA 06575	3	5176	4085	629,4	237,6	3	INTA IF-612	Violeta	3	1455	643	219,1	49,6	3
Testigo	INTA 06575	4	1968	625	241,3	153,2	2	INTA IF-612	Violeta	4	1482	606	220,8	45,9	2
Testigo	INTA 06575	5	2859	2080	374,9	151,1	4	INTA IF-612	Violeta	5	1971	771	297,9	68,5	2
Testigo	INTA 06575	6	2292	2007	331,4	92,8	3	INTA IF-612	Violeta	6	1780	857	215,2	39,5	3
Testigo	Blanca	1	1842	897	244	71,4	5	INTA IF-613	Pampa Salmón INTA	1	3182	1972	738,4	217,4	4
Testigo	Blanca	2	1554	741	159,5	41,7	3	INTA IF-613	Pampa Salmón INTA	2	3851	1860	591,5	145,7	2
Testigo	Blanca	3	1918	985	248,1	76,1	3	INTA IF-613	Pampa Salmón INTA	3	5043	2669	865,4	172,7	5
Testigo	Blanca	4	2705	1360	307,2	81	5	INTA IF-613	Pampa Salmón INTA	4	4695	1749	743,8	146,2	6
Testigo	Blanca	5	1631	835	231,8	71,7	4	INTA IF-613	Pampa Salmón INTA	5	4227	1569	776,8	155,2	6
Testigo	Blanca	6	1053	1045	156,5	58,4	4	INTA IF-613	Pampa Salmón INTA	6	4926	2445	881,2	207,5	5
Testigo	Amarilla	1	2256	1797	361,7	122,9	3	INTA IF-613	Overá Fucsia-INTA	1	2211	626	281,2	42,4	0
Testigo	Amarilla	2	2477	2201	365,3	125,2	5	INTA IF-613	Overá Fucsia-INTA	2	2603	1100	348,9	89,3	0
Testigo	Amarilla	3	1403	800	190,9	44,3	1	INTA IF-613	Overá Fucsia-INTA	3	4132	906	520,9	73	8
Testigo	Amarilla	4	2397	1284	352,2	84	4	INTA IF-613	Overá Fucsia-INTA	4	1215	473	187,2	29,6	0
Testigo	Amarilla	5	3339	2550	454,9	145,6	5	INTA IF-613	Overá Fucsia-INTA	5	1260	445	200,7	41,1	1
Testigo	Amarilla	6	4433	2324	474,9	161,8	5	INTA IF-613	Overá Fucsia-INTA	6	3071	1266	427,2	80,7	0
Testigo	Violeta	1	1138	431	194,4	35,9	4	INTA IF-613	INTA 06575	1	1418	318	213,2	34,1	0
Testigo	Violeta	2	1896	845	302,5	65,7	5	INTA IF-613	INTA 06575	2	1335	404	171,8	30,8	0
Testigo	Violeta	3	1924	1039	213,2	31,9	2	INTA IF-613	INTA 06575	3	5260	1221	636,5	89,9	0
Testigo	Violeta	4	1502	489	207,8	31,6	6	INTA IF-613	INTA 06575	4	3610	1155	493	86,8	0
Testigo	Violeta	5	869	338	125,9	23,5	3	INTA IF-613	INTA 06575	5	4419	1835	603,4	107,2	1
Testigo	Violeta	6	1522	834	232,7	66,9	4	INTA IF-613	INTA 06575	6	5806	3610	421,8	44,8	2
INTA IF-549	Pampa Salmón INTA	1	4221	1517	618	104	2	INTA IF-613	Blanca	1	4022	2178	563,5	139,3	5
INTA IF-549	Pampa Salmón INTA	2	5135	1985	813	145,8	5	INTA IF-613	Blanca	2	5069	1882	663,8	132,8	10
INTA IF-549	Pampa Salmón INTA	3	6554	2715	1042,7	199,6	4	INTA IF-613	Blanca	3	2583	1197	362,4	77,6	3
INTA IF-549	Pampa Salmón INTA	4	5741	2776	867,7	193,7	5	INTA IF-613	Blanca	4	6635	2140	304	44,7	5
INTA IF-549	Pampa Salmón INTA	5	4326	1634	565,5	102,5	4	INTA IF-613	Blanca	5	2873	1387	370,5	90,7	4
INTA IF-549	Pampa Salmón INTA	6	5286	1729	815,8	134,9	6	INTA IF-613	Blanca	6	1634	866	258,8	61,5	5
INTA IF-549	Overá Fucsia-INTA	1	1349	1148	190,6	76,3	1	INTA IF-613	Amarilla	1	4715	1696	739,7	151,9	5
INTA IF-549	Overá Fucsia-INTA	2	2457	607	316,3	38	0	INTA IF-613	Amarilla	2	5765	2435	934,5	194,7	8
INTA IF-549	Overá Fucsia-INTA	3	3433	1307	429,9	97,6	0	INTA IF-613	Amarilla	3	4070	1902	596,1	135,2	5
INTA IF-549	Overá Fucsia-INTA	4	5000	1009	541,1	77,3	5	INTA IF-613	Amarilla	4	6117	2067	852	175,8	7
INTA IF-549	Overá Fucsia-INTA	5	2302	915	341,6	49,7	2	INTA IF-613	Amarilla	5	4436	1263	580,9	96	3
INTA IF-549	Overá Fucsia-INTA	6	2891	538	291,7	35,4	4	INTA IF-613	Amarilla	6	5151	2794	645,9	204,6	6
INTA IF-549	INTA 06575	1	3680	769	541,4	49,8	1	INTA IF-613	Violeta	1	4222	916	608,8	70,4	5
INTA IF-549	INTA 06575	2	6090	1284	759,3	97,8	1	INTA IF-613	Violeta	2	3247	664	521,4	38,9	4
INTA IF-549	INTA 06575	3	3930	1589	579,6	116,3	2	INTA IF-613	Violeta	3	2319	533	366,2	39,3	4
INTA IF-549	INTA 06575	4	4593	985	685,8	83,8	3	INTA IF-613	Violeta	4	4322	1128	697,9	85,9	15
INTA IF-549	INTA 06575	5	5243	1084	633,6	85,2	1	INTA IF-613	Violeta	5	2376	664	376,6	52,7	5
INTA IF-549	INTA 06575	6	3156	699	480,6	48,2	0	INTA IF-613	Violeta	6	3411	881	487	86,2	5
INTA IF-549	Blanca	1	2992	957	317,8	62,1	5	INTA IF-614	Pampa Salmón INTA	1	4639	2105	646,4	141,5	2
INTA IF-549	Blanca	2	2605	1423	384,8	102,9	8	INTA IF-614	Pampa Salmón INTA	2	5732	2488	829,7	171	4
INTA IF-549	Blanca	3	2625	1007	340	73,3	7	INTA IF-614	Pampa Salmón INTA	3	5688	2180	804,2	162,1	4
INTA IF-549	Blanca	4	2395	1335	349,8	83,8	4	INTA IF-614	Pampa Salmón INTA	4	4051	1672	579,4	108,2	4
INTA IF-549	Blanca	5	2946	1210	413	95,5	6	INTA IF-614	Pampa Salmón INTA	5	3359	1157	407,6	94,5	2
INTA IF-549	Blanca	6	4078	1416	481,4	95,6	7	INTA IF-614	Pampa Salmón INTA	6	3671	1322	509	91,1	3
INTA IF-549	Amarilla	1	5950	2935	880,8	232,8	6	INTA IF-614	Overá Fucsia-INTA	1	5980	1977	618,3	116,6	0
INTA IF-549	Amarilla	2	4517	1794	582,6	131,7	3	INTA IF-614	Overá Fucsia-INTA	2	5144	2370	664,5	155,6	9
INTA IF-549	Amarilla	3	4422	1607	614,6	126,4	4	INTA IF-614	Overá Fucsia-INTA	3	4563	1439	600,1	106	6
INTA IF-549	Amarilla	4	6475	3454	872,4	197,9	6	INTA IF-614	Overá Fucsia-INTA	4	4669	1313	672,8	88,2	8
INTA IF-549	Amarilla	5	5830	2197	826,4	182,4	7	INTA IF-614	Overá Fucsia-INTA	5	4821	1523	574	89,8	7
INTA IF-549	Amarilla	6	3320	827	492,5	67,2	3	INTA IF-614	Overá Fucsia-INTA	6	3712	965	549,2	68,7	7
INTA IF-549	Violeta	1	1970	348	329	38,9	2	INTA IF-614	INTA 06575	1	4248	809	612,1	65,4	2
INTA IF-549	Violeta	2	4137	975	572,9	59,7	7	INTA IF-614	INTA 06575	2	2643	553	377,3	41	0
INTA IF-549	Violeta	3	4179	670	622,8	78,2	9	INTA IF-614	INTA 06575	3	6558	133	897,3	107,9	3
INTA IF-549	Violeta	4	3640	738	591,7	79	4	INTA IF-614	INTA 06575	4	3481	1040	526,6	75,8	2
INTA IF-549	Violeta	5	2600	703	431,4	60,7	4	INTA IF-614	INTA 06575	5	4072	1186	533,5	88,4	2
INTA IF-549	Violeta	6	2310	667	389,2	65,6	5	INTA IF-614	INTA 06575	6	3475	1011	447,5	67,7	3
INTA IF-612	Pampa Salmón INTA	1	1794	2208	318,1	166,8	3	INTA IF-614	Blanca	1	3020	1108	432,1	80,2	5
INTA IF-612	Pampa Salmón INTA	2	1813	2210	305,8	134,8	3	INTA IF-614	Blanca	2	4275	1778	523,7	114,9	5
INTA IF-612	Pampa Salmón INTA	3	1592	1370	278,2	102,8	1	INTA IF-614	Blanca	3	3290	1459	406,9	104,1	5
INTA IF-612	Pampa Salmón INTA	4	1621	1884	299,7	130,1	1	INTA IF-614	Blanca	4	3923	1298	550,5	100,2	5
INTA IF-612	Pampa Salmón INTA	5	1644	1482	264,8	96,3	2	INTA IF-614	Blanca	5	3172	1133	493,5	80,9	7
INTA IF-612	Pampa Salmón INTA	6	1811	2309	319,9	132,4	2	INTA IF-614	Blanca	6	2266	1022	312,4	69,9	5
INTA IF-612	Overá Fucsia-INTA	1	1757	1155	238,7	75,8	3	INTA IF-614	Amarilla	1	4550	1769	531,2	124,1	2
INTA IF-612	Overá Fucsia-INTA	2	1529	2204	176,2	75	4	INTA IF-614	Amarilla	2	5758	2027	729,6	145,9	4
INTA IF-612	Overá Fucsia-INTA	3	1460	887	210,2	55,9	3	INTA IF-614	Amarilla	3	2812	1080	424,3	93,9	4
INTA IF-612	Overá Fucsia-INTA	4	1282	807	194,5	52,8	0	INTA IF-614	Amarilla	4	4204	1962	617,1	140,3	5
INTA IF-612	Overá Fucsia-INTA	5	2905	3792	365,5	121,2	7	INTA IF-614	Amarilla	5	3853	1628	488,5	108,6	2
INTA IF-612	Overá Fucsia-INTA	6	2036	1386	291,1	84,1	4	INTA IF-614	Amarilla	6	4646	1481	632,4	100,9	2
INTA IF-612	INTA 06575	1	2604	2106	347	117,1	4	INTA IF-6							

INTA IF-630	Pampa Salmón INTA	2	4286	2416	685,7	160,6	6
INTA IF-630	Pampa Salmón INTA	3	4223	2756	614,8	184,8	2
INTA IF-630	Pampa Salmón INTA	4	3398	900	633,6	88	4
INTA IF-630	Pampa Salmón INTA	5	3943	2383	656,7	182,6	5
INTA IF-630	Pampa Salmón INTA	6	3768	1117	649,5	98	6
INTA IF-630	Overá Fucsia-INTA	1	1050	358	127	20,6	0
INTA IF-630	Overá Fucsia-INTA	2	3420	1287	465,8	75,4	7
INTA IF-630	Overá Fucsia-INTA	3	1913	642	223,4	41,3	1
INTA IF-630	Overá Fucsia-INTA	4	3690	1695	443,2	117,7	4
INTA IF-630	Overá Fucsia-INTA	5	3773	1325	509,6	97,5	0
INTA IF-630	Overá Fucsia-INTA	6	4078	2568	579,7	184	6
INTA IF-630	INTA 06575	1	3729	1827	514,3	131,2	5
INTA IF-630	INTA 06575	2	3543	1290	498	86	2
INTA IF-630	INTA 06575	3	5135	1943	608,2	147,3	3
INTA IF-630	INTA 06575	4	3990	2384	558,9	149,2	4
INTA IF-630	INTA 06575	5	3434	1373	486,9	108,8	1
INTA IF-630	INTA 06575	6	3964	2460	639,4	184,6	8
INTA IF-630	Blanca	1	2654	1299	357,3	77,3	4
INTA IF-630	Blanca	2	2623	1166	395,7	89,4	4
INTA IF-630	Blanca	3	3621	1297	367,9	84	6
INTA IF-630	Blanca	4	3748	1724	432,3	82,8	6
INTA IF-630	Blanca	5	1779	697	468,3	113	2
INTA IF-630	Blanca	6	2598	1033	280,1	52,1	4
INTA IF-630	Amarilla	1	3836	2740	545,6	190,4	4
INTA IF-630	Amarilla	2	5099	2676	654,2	180,5	4
INTA IF-630	Amarilla	3	3705	2150	468,7	143,3	4
INTA IF-630	Amarilla	4	3116	1060	366,8	78,3	4
INTA IF-630	Amarilla	5	3290	2912	930	157,1	4
INTA IF-630	Amarilla	6	4329	2735	580,2	168,6	5
INTA IF-630	Violeta	1	2303	686	312,3	47,1	3
INTA IF-630	Violeta	2	2738	1000	391,2	82,8	2
INTA IF-630	Violeta	3	1923	464	288	37,7	3
INTA IF-630	Violeta	4	2408	665	329,9	49	2
INTA IF-630	Violeta	5	2910	842	362,5	56,7	4
INTA IF-630	Violeta	6	3745	1135	542,4	91,3	4

*PFA= Peso fresco aéreo; PFR= Peso fresco radical; PSA= Peso seco aéreo; PSR= Peso seco radical

Aislado	Variedad	Repetición	pH	CE (dS/m)	NO3-	P	Ca	Mg	K	Fe
Testigo	Pampa Salmón INTA	1	5,8	0,60	25,50	46,93	7,26	5,18	182,07	3,49
Testigo	Pampa Salmón INTA	2	5,8	0,70	66,23	57,71	7,86	6,20	211,41	3,82
Testigo	Overá Fucsia-INTA	1	5,7	0,76	109,78	58,59	7,95	6,35	242,95	19,65
Testigo	Overá Fucsia-INTA	2	6,0	0,61	31,39	47,98	4,36	3,95	198,09	25,99
Testigo	INTA 06575	1	6,2	0,54	73,34	46,77	4,52	3,78	153,99	24,69
Testigo	INTA 06575	2	6,1	0,46	46,91	43,03	4,08	3,62	134,92	25,31
Testigo	Blanca	1	6,2	0,39	20,87	41,95	7,45	4,37	126,73	4,60
Testigo	Blanca	2	5,8	0,70	291,50	56,09	6,77	5,41	211,46	17,62
Testigo	Amarilla	1	5,8	0,56	155,12	42,81	5,62	4,40	174,17	14,19
Testigo	Amarilla	2	5,8	0,64	164,09	55,84	4,43	4,05	211,86	26,97
Testigo	Violeta	1	5,7	0,60	194,38	50,29	4,13	3,54	196,79	23,67
Testigo	Violeta	2	5,8	0,47	115,61	38,29	5,44	4,06	156,25	17,90
INTA IF-549	Pampa Salmón INTA	1	4,7	0,39	183,38	46,18	2,35	2,73	151,09	24,10
INTA IF-549	Pampa Salmón INTA	2	4,7	0,44	224,53	53,68	3,22	3,16	156,34	15,04
INTA IF-549	Overá Fucsia-INTA	1	4,5	0,62	496,67	56,66	8,06	6,08	196,94	13,94
INTA IF-549	Overá Fucsia-INTA	2	4,5	0,54	393,92	48,42	5,68	4,61	171,05	12,66
INTA IF-549	INTA 06575	1	4,4	0,62	449,58	62,51	8,30	6,61	193,82	4,86
INTA IF-549	INTA 06575	2	4,6	0,61	353,22	63,69	8,19	6,35	195,11	9,02
INTA IF-549	Blanca	1	4,5	0,61	500,68	52,65	2,54	5,13	206,07	13,91
INTA IF-549	Blanca	2	4,6	0,564	378,41	54,28	3,45	4,05	198,01	20,46
INTA IF-549	Amarilla	1	4,6	0,50	338,96	47,49	8,34	3,94	162,39	6,69
INTA IF-549	Amarilla	2	4,7	0,44	216,23	46,69	6,14	2,88	143,20	19,00
INTA IF-549	Violeta	1	4,4	0,64	492,74	50,40	7,91	5,56	212,21	15,66
INTA IF-549	Violeta	2	4,4	0,68	498,99	55,21	8,17	7,68	216,60	11,49
INTA IF-612	Pampa Salmón INTA	1	5,9	0,413	87,11	43,89	6,55	2,31	134,48	9,54
INTA IF-612	Pampa Salmón INTA	2	5,6	0,467	85,80	69,39	4,75	2,20	183,24	30,45
INTA IF-612	Overá Fucsia-INTA	1	5,6	0,511	97,20	62,45	4,79	2,54	198,75	40,36
INTA IF-612	Overá Fucsia-INTA	2	5,6	0,466	163,49	53,02	3,52	2,52	198,78	58,92
INTA IF-612	INTA 06575	1	5,8	0,450	139,19	41,67	7,48	2,65	155,51	39,71
INTA IF-612	INTA 06575	2	5,9	0,428	152,84	37,82	10,57	1,99	148,81	44,51
INTA IF-612	Blanca	1	5,6	0,446	125,51	46,25	2,69	2,15	161,24	31,39
INTA IF-612	Blanca	2	5,4	0,453	199,71	48,39	2,53	2,33	170,49	23,07
INTA IF-612	Amarilla	1	5,4	0,527	304,46	49,86	2,63	2,63	207,31	48,45
INTA IF-612	Amarilla	2	5,8	0,47	183,07	47,23	2,40	2,56	159,28	35,62
INTA IF-612	Violeta	1	5,6	0,387	111,03	39,23	3,05	2,20	156,71	40,90
INTA IF-612	Violeta	2	5,6	0,437	199,86	48,23	1,78	2,24	156,24	20,37
INTA IF-613	Pampa Salmón INTA	1	5,1	0,446	158,60	53,63	2,08	2,69	163,63	39,48
INTA IF-613	Pampa Salmón INTA	2	5	0,488	130,71	55,57	2,71	3,06	166,61	24,44
INTA IF-613	Overá Fucsia-INTA	1	4,6	0,618	464,71	58,94	2,96	6,52	203,85	7,81
INTA IF-613	Overá Fucsia-INTA	2	4,7	0,634	481,96	58,77	2,92	6,02	122,93	10,85
INTA IF-613	INTA 06575	1	5	0,47	219,38	49,60	2,09	2,99	88,17	25,06
INTA IF-613	INTA 06575	2	5,3	0,52	338,88	48,87	2,68	2,46	98,86	29,48
INTA IF-613	Blanca	1	4,7	0,55	357,49	65,96	2,64	5,61	185,29	3,08
INTA IF-613	Blanca	2	4,8	0,58	323,03	66,01	3,28	5,59	182,20	3,09
INTA IF-613	Amarilla	1	5	0,427	152,20	47,95	8,63	2,76	142,23	15,05
INTA IF-613	Amarilla	2	5	0,45	197,33	49,55	8,40	3,10	151,87	12,73
INTA IF-613	Violeta	1	4,7	0,59	394,95	56,68	7,87	5,96	199,85	2,11
INTA IF-613	Violeta	2	4,7	0,58	426,94	52,11	7,51	5,67	197,89	4,36
INTA IF-614	Pampa Salmón INTA	1	4,6	0,62	438,59	56,32	6,69	4,92	209,61	18,36
INTA IF-614	Pampa Salmón INTA	2	4,9	0,5	239,75	52,16	4,22	3,33	164,13	30,26
INTA IF-614	Overá Fucsia-INTA	1	4,8	0,54	282,59	52,50	4,27	3,62	176,27	24,76
INTA IF-614	Overá Fucsia-INTA	2	4,7	0,57	64,07	14,38	9,11	6,55	135,00	12,27
INTA IF-614	INTA 06575	1	4,1	1,03	829,93	83,62	6,00	19,03	300,45	10,98
INTA IF-614	INTA 06575	2	4,8	0,62	460,43	55,99	5,77	4,36	187,64	21,02
INTA IF-614	Blanca	1	4,4	0,781	628,80	66,19	14,28	9,40	235,17	12,40

INTA IF-614	Blanca	2	4,8	0,657	373,04	62,79	16,27	3,57	225,12	33,01
INTA IF-614	Amarilla	1	4,6	0,76	133,96	73,81	9,27	6,63	242,13	19,28
INTA IF-614	Amarilla	2	4,8	0,57	313,84	51,84	5,99	4,41	173,60	12,60
INTA IF-614	Violeta	1	4,6	0,57	119,09	49,55	6,09	4,27	187,45	19,36
INTA IF-614	Violeta	2	4,7	0,93	204,95	74,44	9,80	7,00	281,26	27,92
INTA IF-630	Pampa Salmón INTA	1	5	0,5	251,37	61,42	3,97	3,08	189,08	21,68
INTA IF-630	Pampa Salmón INTA	2	5,2	0,46	100,14	61,45	2,46	2,54	178,15	38,50
INTA IF-630	Overá Fucsia-INTA	1	5	0,45	204,68	54,78	4,33	3,21	166,37	17,02
INTA IF-630	Overá Fucsia-INTA	2	4,9	0,53	294,69	59,07	6,05	4,28	184,17	12,60
INTA IF-630	INTA 06575	1	5	0,48	130,67	67,90	2,27	2,76	204,36	25,89
INTA IF-630	INTA 06575	2	5	0,53	219,79	59,49	4,18	3,34	190,34	26,50
INTA IF-630	Blanca	1	4,5	0,86	441,22	97,29	14,68	11,20	303,42	9,24
INTA IF-630	Blanca	2	4,8	0,733	340,43	79,86	8,26	6,31	245,34	7,73
INTA IF-630	Amarilla	1	4,8	0,57	260,73	74,26	4,61	3,79	216,76	25,71
INTA IF-630	Amarilla	2	4,9	0,63	159,33	71,87	6,11	5,04	227,30	14,66
INTA IF-630	Violeta	1	4,8	0,56	305,92	55,64	6,85	4,99	213,27	4,55
INTA IF-630	Violeta	2	4,8	0,619	325,99	68,34	8,43	5,96	222,68	4,95

6.7. Dimensiones de las estructuras reproductivas de *Trichoderma* spp.

Aislado	Fiálides		Conidios		Hifas (µm)	Aislado	Fiálides		Conidios		Hifas (µm)
	Largo (µm)	Ancho (µm)	Largo (µm)	Ancho (µm)			Largo (µm)	Ancho (µm)	Largo (µm)	Ancho (µm)	
INTA IF-549	5,95	2,66	4,3	3,36	4,8	INTA IF-613	6,34	2,46	3,99	2,88	6,16
INTA IF-549	5,1	2,46	4,27	3	5,32	INTA IF-613	6,35	2,28	3,73	2,55	5,49
INTA IF-549	3,92	2,6	4,11	3,68	4,1	INTA IF-613	5,48	1,93	3,22	2,58	4,92
INTA IF-549	6,2	3,24	4,53	3	6,78	INTA IF-613	6,65	2,07	3,78	1,85	3,87
INTA IF-549	4,79	2,76	3,79	3,13	6,78	INTA IF-613	7,16	3,76	3,78	2,31	6
INTA IF-549	6	2,97	3,24	2,9	4,53	INTA IF-613	9,83	3,43	3,53	2,36	5,52
INTA IF-549	5,48	2,52	3,23	2,93	10,54	INTA IF-613	7,21	3,18	3,34	2,57	5,41
INTA IF-549	7,36	2,52	4	3,42	2,6	INTA IF-613	6,8	2,92	4,24	2,41	4,19
INTA IF-549	6,96	1,96	3,99	3,1	3,49	INTA IF-613	5,25	3,77	3,73	2,54	7,04
INTA IF-549	6,98	2,74	4,19	2,78	3,47	INTA IF-613	7,97	2,77	4,31	2,72	4,56
INTA IF-549	5,71	2,28	3,51	2,79	3,7	INTA IF-613	6,02	2,6	3,45	2,18	5,89
INTA IF-549	7,45	1,88	3,5	2,63	3,56	INTA IF-613	5,81	2,26	4,12	3,39	6,12
INTA IF-549	6,14	2,26	4,05	3	3,8	INTA IF-613	12	1,96	3,95	2,3	7,42
INTA IF-549	5,77	2,04	2,88	2,88	3,56	INTA IF-613	12,14	2,58	3,8	1,89	7,07
INTA IF-549	4,62	2,46	4,06	2,93	2,6	INTA IF-613	13,61	2,04	3,79	2,59	2,74
INTA IF-549	5,25	2,77	3,72	2,74	4,08	INTA IF-613	8,39	2,04	3,51	2,43	5,17
INTA IF-549	4,79	2,88	4,08	3,04	3,88	INTA IF-613	11,03	2,28	4,3	2,42	6,48
INTA IF-549	6,2	2,97	3,62	3,11	4,1	INTA IF-613	5,2	2,26	3,6	2,52	4,34
INTA IF-549	6,96	2,92	4,28	2,49	4,48	INTA IF-613	3,47	2,92	3,99	2,61	7,61
INTA IF-549	3,94	2,33	4,11	2,76	2,76	INTA IF-613	6,84	2,46	4,02	2,49	4,65
INTA IF-549	4,49	2,33	3,71	3,31	2,58	INTA IF-613	8,39	2,66	3,14	2,61	8,54
INTA IF-549	4,62	2,26	4,18	2,49	2,97	INTA IF-613	10,72	1,74	4,28	2,72	6,49
INTA IF-549	4,85	2,35	4,59	2,8	2,46	INTA IF-613	7,45	2,58	4,2	2,85	4,34
INTA IF-549	4,08	2,66	3,18	2,43	2,77	INTA IF-613	4,76	2,52	3,31	2,36	5,21
INTA IF-549	5,74	2,6	4,16	3,03	4,62	INTA IF-613	7,67	3,47	3,9	2,39	7,21
INTA IF-549	5,71	2,26	4,16	3,25	3,56	INTA IF-613	8,09	2,77	3,51	2,5	5,63
INTA IF-549	4,39	2,04	3,82	2,57	4,3	INTA IF-613	5,32	2,88	3,89	1,85	4,7
INTA IF-549	5,48	2,16	4,69	3,47	3,9	INTA IF-613	3,56	2,28	4,12	3,39	5,41
INTA IF-549	6,08	2,46	4,44	3,27	4,56	INTA IF-613	7,52	2,74	4,03	3,24	6,16
INTA IF-549	5,25	2,58	4,19	3,04	3,99	INTA IF-613	8,97	2,07	3,8	3,11	8,06
INTA IF-549	5,04	1,61	3,93	2,99	4,51	INTA IF-613	8,92	2,28	3,25	3,39	7,52
INTA IF-549	3,56	2,04	4,58	2,94	5,64	INTA IF-613	9,04	1,64	3,87	2,78	4,19
INTA IF-549	6,96	2,46	3,23	3,68	4,4	INTA IF-613	9,32	1,96	4,03	2,04	11,83
INTA IF-549	4,62	1,96	4	2,98	3,22	INTA IF-613	7,23	2,19	4,22	2,25	6,12
INTA IF-549	6,35	1,61	3,99	3,12	3,1	INTA IF-613	7,19	3,21	3,7	2,96	5,29
INTA IF-549	4,34	2,07	4,19	2,53	3,2	INTA IF-613	7,25	3,54	3,85	2,12	4,7
INTA IF-549	3,68	2,07	3,51	3	4,3	INTA IF-613	6,84	2,78	3,45	3,41	5,29
INTA IF-549	4,79	2,46	3,5	2,86	3,29	INTA IF-613	6,31	2,03	3,65	3,04	6,89
INTA IF-549	4,39	2,04	4,05	2,93	3,19	INTA IF-613	6,12	2,55	4	1,95	5,95
INTA IF-549	7,5	2,33	2,88	2,71	6,4	INTA IF-613	7,18	3,11	3,91	2,08	3,37
INTA IF-549	3,88	2,07	4,06	3,04	5,32	INTA IF-613	8,85	2,09	3,64	3,31	4,13
INTA IF-549	5,57	2,35	3,72	3,11	3,8	INTA IF-613	6,53	1,95	3,5	2,54	5,1
INTA IF-549	4,19	2,6	4,08	2,49	3,3	INTA IF-613	7,21	2,14	4,12	2,43	7,79
INTA IF-549	5,41	2,97	3,62	2,76	5,2	INTA IF-613	6,91	3,44	4,17	2,88	6,64
INTA IF-549	4,34	2,28	4,28	3,2	2,74	INTA IF-613	8,56	2,03	3,41	3,03	3,68
INTA IF-549	4,56	3,37	4,11	3,45	5,32	INTA IF-613	8,71	2,62	3,92	2,68	4,49
INTA IF-549	5,49	1,82	3,71	2,97	5,3	INTA IF-613	6,11	1,94	4,05	3,21	4,62
INTA IF-549	6,08	2,07	4,18	3,1	6,2	INTA IF-613	6,65	1,88	4,1	2,39	9,87
INTA IF-549	6,2	2,07	4,59	2,87	5,1	INTA IF-613	7,39	2,15	3,94	1,93	3,94
INTA IF-549	5,25	2,77	4,16	3,05	4,8	INTA IF-613	7,44	3,12	4,12	1,87	3,56
INTA IF-612	3,61	1,74	4,07	2,46	5,02	INTA IF-614	5,21	2,04	4,2	2,73	4,56
INTA IF-612	4,39	2,46	3,91	2,66	2,35	INTA IF-614	5,51	3,06	3,56	2,05	6,26
INTA IF-612	6,86	2,07	3,73	2,97	6,34	INTA IF-614	5,25	2,66	3,91	2,41	3,68
INTA IF-612	6,6	1,88	4,5	3,28	5,93	INTA IF-614	5,48	2,26	4,04	2,88	9,08
INTA IF-612	4,79	2,6	4,41	3,32	3,87	INTA IF-614	6,2	1,82	3,88	2,9	4,91
INTA IF-612	3,99	1,96	4,37	3,08	4,12	INTA IF-614	4,93	1,64	4,19	2,33	6,34
INTA IF-612	4,39	1,74	5,56	2,76	3,61	INTA IF-614	7,07	1,82	3,32	2,89	4,48
INTA IF-612	3,47	1,64	3,94	2,89	2,6	INTA IF-614	6,2	2,52	3,68	2,12	4,53
INTA IF-612	6,45	1,61	4,32	2,91	7,07	INTA IF-614	5,93	2,77	3,87	2,64	3,18
INTA IF-612	4,24	1,64	4,27	3,24	3,61	INTA IF-614	6,16	2,76	3,88	2,81	6,08
INTA IF-612	6,53	2,28	4,76	3,06	5,16	INTA IF-614	5,01	2,33	3,77	2,43	6,2
INTA IF-612	6,45	2,52	3,9	2,6	3,87	INTA IF-614	7,97	2,66	3,37	2,56	2,6
INTA IF-612	6,23	1,88	4,17	2,87	4,51	INTA IF-614	4,48	1,61	3,04	2	5,57
INTA IF-612	3,88	1,61	4,88	2,91	4,84	INTA IF-614	5,81	2,33	2,9	2,37	11,9
INTA IF-612	3,32	2,07	4,72	2,46	4,2	INTA IF-614	4,19	1,64	3,88	2,3	5,81
INTA IF-612	5,04	2,33	3,97	2,78	3,87	INTA IF-614	4,62	2,9	3,04	2,49	4,08
INTA IF-612	3,76	1,61	3,66	2,57	4,62	INTA IF-614	3,43	1,82	3,04	2,65	4,48
INTA IF-612	4,91	2,04	4,29	2,58	3,99	INTA IF-614	5,63	2,66	3,24	2,7	3,9
INTA IF-612	4,19	1,93	4,18	2,88	6,08	INTA IF-614	4,62	2,92	3,61	2,84	3,55
INTA IF-612	3,24	2,28	3,68	3,21	4,62	INTA IF-614	8,09	2,33	3,04	2,52	4,08

INTA IF-612	3,43	2,33	3,85	2,52	5,04	INTA IF-614	5,1	2,46	3,61	2,3	4,62
INTA IF-612	4,3	2,58	4,94	3,04	5,71	INTA IF-614	5,1	2,04	3,68	2,08	3,22
INTA IF-612	2,77	2,07	5,41	2,52	2,26	INTA IF-614	10,95	1,64	3,77	2,14	3,61
INTA IF-612	3,18	1,61	4,47	2,74	4,2	INTA IF-614	5,25	2,66	4,2	2,6	5,41
INTA IF-612	3,88	1,61	5,18	3,04	3,19	INTA IF-614	8,39	2,9	3,76	2,09	3,47
INTA IF-612	3,68	2,04	3,69	2,58	3,99	INTA IF-614	8,52	3,47	3,87	2,75	3,32
INTA IF-612	5,16	1,96	4,23	2,64	3,68	INTA IF-614	7,21	3,47	3,88	2,43	3,32
INTA IF-612	3,37	1,64	4,37	2,6	4,39	INTA IF-614	5,05	3,88	3,88	2,5	2,74
INTA IF-612	4,91	1,74	4,49	2,76	5,81	INTA IF-614	6,95	2,33	4,12	2,58	4,19
INTA IF-612	6,02	1,74	3,75	2,41	2,77	INTA IF-614	6,78	3,18	3,56	2,67	4,92
INTA IF-612	7,81	2,16	3,86	2,9	7,25	INTA IF-614	9,23	2,07	3,61	2,04	4,84
INTA IF-612	6,35	2,35	4,21	2,46	4,39	INTA IF-614	6,08	2,76	3,04	2,36	3,94
INTA IF-612	3,9	1,96	4,03	2,46	4,15	INTA IF-614	5,2	2,6	3,37	2,55	2,6
INTA IF-612	4,93	1,61	4,26	2,74	3,88	INTA IF-614	7,81	2,6	2,9	2,79	5,47
INTA IF-612	4,39	2,07	3,99	2,43	3,32	INTA IF-614	7,65	3,04	3,22	2,58	4,08
INTA IF-612	4,53	1,61	4,35	2,77	3,94	INTA IF-614	4,3	2,26	2,94	2,41	4,39
INTA IF-612	4,85	1,61	4,12	2,49	4,56	INTA IF-614	7,77	2,33	3,12	2,54	4,53
INTA IF-612	3,61	2,28	5,34	2,97	6,43	INTA IF-614	6,16	2,16	3,22	2,85	6,53
INTA IF-612	4,79	2,04	3,87	2,9	5,01	INTA IF-614	6,26	2,26	3,56	2,17	3,88
INTA IF-612	4,53	2,28	3,96	3,35	2,58	INTA IF-614	5,55	2,07	4,2	2,1	6,65
INTA IF-612	3,76	2,35	5,64	3,04	3,65	INTA IF-614	5,74	2,07	3,47	2,07	7,31
INTA IF-612	5,04	2,07	3,78	3,17	3,04	INTA IF-614	6,26	1,74	3,47	2,83	2,52
INTA IF-612	3,94	1,61	3,85	2,97	3,9	INTA IF-614	4,39	2,46	4,04	2,5	3,76
INTA IF-612	4,1	1,82	3,9	3,8	4,13	INTA IF-614	6,58	2,28	3,76	2,74	3,92
INTA IF-612	5,49	1,74	4,14	3,36	6,89	INTA IF-614	6,28	2,37	3,22	2,51	5,02
INTA IF-612	4,1	2,07	3,77	3,12	3,77	INTA IF-614	5,89	1,98	3,43	2,27	6,8
INTA IF-612	5,49	2,07	4,45	3,31	6,65	INTA IF-614	6,77	2,41	4,04	2,23	6,06
INTA IF-612	5,04	2,52	5,49	3,25	5,04	INTA IF-614	4,15	2,87	3,32	2,58	6,26
INTA IF-612	5,57	2,35	4,63	2,6	5,42	INTA IF-614	5,91	2,94	3,19	2,75	5,34
INTA IF-612	3,44	1,61	3,88	2,4	7,98	INTA IF-614	6,98	2,04	3,56	2,13	3,47
INTA IF-630	7,67	1,61	5,04	2,68	7,16	INTA IF-630	4,66	2,89	3,43	3,04	2,52
INTA IF-630	7,55	2,04	3,19	2,97	4,56	INTA IF-630	7,12	2,24	4,39	2,92	4,19
INTA IF-630	4,56	2,35	4,55	2,92	2,07	INTA IF-630	6,35	3,12	3,46	2,88	2,46
INTA IF-630	7,36	2,33	3,2	3,4	2,77	INTA IF-630	4,95	2,77	4,13	2,77	6,23
INTA IF-630	7,21	2,08	4,56	2,97	2,35	INTA IF-630	5,1	1,89	3,69	3,39	3,43
INTA IF-630	6,23	2,56	3,65	3,21	4,49	INTA IF-630	5,37	1,76	4,26	3,24	2,6
INTA IF-630	5,2	3,06	4,36	2,92	2,92	INTA IF-630	5,6	3,31	3,93	2,45	2,04
INTA IF-630	11,74	2,04	3,33	2,97	4,04	INTA IF-630	5,89	3,2	3,97	2,88	1,93
INTA IF-630	5,57	1,93	4,21	2,67	2,88	INTA IF-630	7,02	2,54	3,77	2,43	3,04
INTA IF-630	5,21	1,88	3,67	2,97	2,52	INTA IF-630	9,43	2,21	4,2	3,4	2,07
INTA IF-630	6,02	1,88	4,23	2,52	4,92	INTA IF-630	9,1	2,05	3,55	3,04	2,46
INTA IF-630	6,96	1,44	3,76	2,24	7,79	INTA IF-630	4,37	2,36	4,16	2,92	2,33
INTA IF-630	5,2	3,43	5,2	2,88	4,65	INTA IF-630	5,32	2,55	4,24	3,12	2,16
INTA IF-630	4,39	2,46	3,1	2,97	2,46	INTA IF-630	6,43	2,9	5,02	2,28	1,82
INTA IF-630	4,13	2,46	4,87	2,88	1,82	INTA IF-630	4,45	1,94	4,16	2,97	2,74
INTA IF-630	6,26	1,93	3,15	3,06	1,82	INTA IF-630	6,4	3,16	4,95	2,9	3,22
INTA IF-630	2,97	2,77	4,57	3,21	2,28	INTA IF-630	3,95	1,85	3,6	2,52	2,28
INTA IF-630	4,2	3,55	3,93	3,29	4,65	INTA IF-630	5,85	2,19	5,04	2,2	2,6
INTA IF-630	5,16	2,97	5,2	3,06	4,33	INTA IF-630	6,12	1,81	3,82	3,04	4,58
INTA IF-630	5,02	2,16	3,88	3,35	2,28	INTA IF-630	5,43	2,11	4,81	3,1	2,74
INTA IF-630	6,95	2,6	5,02	3,37	2,58	INTA IF-630	6,54	2,06	3,88	3,22	3,22
INTA IF-630	5,04	1,82	3,76	2,88	4,39	INTA IF-630	5,1	1,9	4,71	3,38	6,62
INTA IF-630	5,81	1,88	4,96	2,97	2,6	INTA IF-630	5,06	1,74	3,52	2,88	3,04
INTA IF-630	5,71	2,52	3,44	2,23	2,52	INTA IF-630	5,34	1,6	4,11	2,97	3,43
INTA IF-630	5,8	3,31	5,2	3,22	3,43	INTA IF-630	4,98	1,45	5,18	3,24	2,92

6.8. Compatibilidad *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp. con quitosano. Ensayos 1 y 2.

Aislado	Quitosano	Repetición	Ensayo 1		Ensayo 2	
			Día 7	Día 7	Día 7	Día 7
INTA IF-534	No	1	20	27		
INTA IF-534	No	2	28	25		
INTA IF-534	No	3	27	25		
INTA IF-534	No	4	22	27		
INTA IF-534	No	5	24	26		
INTA IF-534	No	6	28	25		
INTA IF-534	No	7	27	27		
INTA IF-534	No	8	25	26		
INTA IF-535	No	1	30	27		
INTA IF-535	No	2	28	27		
INTA IF-535	No	3	25	26		
INTA IF-535	No	4	27	26		
INTA IF-535	No	5	22	27		
INTA IF-535	No	6	27	25		
INTA IF-535	No	7	25	27		
INTA IF-535	No	8	34	26		
INTA IF-536	No	1	23	23		
INTA IF-536	No	2	21	22		
INTA IF-536	No	3	25	22		
INTA IF-536	No	4	20	23		
INTA IF-536	No	5	20	24		
INTA IF-536	No	6	28	24		
INTA IF-536	No	7	20	23		
INTA IF-536	No	8	25	22		
INTA IF-534	Si	1	25	25		
INTA IF-534	Si	2	25	28		
INTA IF-534	Si	3	27	26		
INTA IF-534	Si	4	27	25		
INTA IF-534	Si	5	26	26		
INTA IF-534	Si	6	29	24		
INTA IF-534	Si	7	26	26		
INTA IF-534	Si	8	26	28		

INTA IF-535	Si	1	30	24
INTA IF-535	Si	2	23	25
INTA IF-535	Si	3	27	25
INTA IF-535	Si	4	27	26
INTA IF-535	Si	5	24	26
INTA IF-535	Si	6	25	27
INTA IF-535	Si	7	23	25
INTA IF-535	Si	8	22	24
INTA IF-536	Si	1	20	22
INTA IF-536	Si	2	18	21
INTA IF-536	Si	3	21	21
INTA IF-536	Si	4	25	23
INTA IF-536	Si	5	20	22
INTA IF-536	Si	6	20	23
INTA IF-536	Si	7	24	22
INTA IF-536	Si	8	25	21

Aislamiento	Quitosano	Repetición	Ensayo 1	Ensayo 2
			Día 3	Día 3
INTA IF-549	No	1	40	40
INTA IF-549	No	2	40	40
INTA IF-549	No	3	40	40
INTA IF-549	No	4	40	40
INTA IF-549	No	5	40	40
INTA IF-549	No	6	40	40
INTA IF-549	No	7	39	40
INTA IF-549	No	8	40	40
INTA IF-613	No	1	40	40
INTA IF-613	No	2	39	40
INTA IF-613	No	3	40	40
INTA IF-613	No	4	40	40
INTA IF-613	No	5	40	40
INTA IF-613	No	6	40	40
INTA IF-613	No	7	40	40
INTA IF-613	No	8	40	40
INTA IF-614	No	1	40	40
INTA IF-614	No	2	40	40
INTA IF-614	No	3	40	40
INTA IF-614	No	4	39	40
INTA IF-614	No	5	40	40
INTA IF-614	No	6	40	40
INTA IF-614	No	7	40	40
INTA IF-614	No	8	40	40
INTA IF-630	No	1	40	40
INTA IF-630	No	2	40	40
INTA IF-630	No	3	39	40
INTA IF-630	No	4	40	40
INTA IF-630	No	5	40	40
INTA IF-630	No	6	40	40
INTA IF-630	No	7	40	40
INTA IF-630	No	8	40	40
INTA IF-549	Si	1	40	40
INTA IF-549	Si	2	40	40
INTA IF-549	Si	3	40	40
INTA IF-549	Si	4	39	40
INTA IF-549	Si	5	40	40
INTA IF-549	Si	6	40	40
INTA IF-549	Si	7	40	40
INTA IF-549	Si	8	40	40
INTA IF-613	Si	1	39	40
INTA IF-613	Si	2	40	40
INTA IF-613	Si	3	40	40
INTA IF-613	Si	4	40	40
INTA IF-613	Si	5	40	40
INTA IF-613	Si	6	40	40
INTA IF-613	Si	7	40	40
INTA IF-613	Si	8	40	40
INTA IF-614	Si	1	23	40
INTA IF-614	Si	2	23	36
INTA IF-614	Si	3	23	40
INTA IF-614	Si	4	24	40
INTA IF-614	Si	5	24	40
INTA IF-614	Si	6	23	40
INTA IF-614	Si	7	24	39
INTA IF-614	Si	8	24	40
INTA IF-630	Si	1	31	40
INTA IF-630	Si	2	31	40
INTA IF-630	Si	3	31	40
INTA IF-630	Si	4	31	40
INTA IF-630	Si	5	31	40
INTA IF-630	Si	6	31	40
INTA IF-630	Si	7	32	40
INTA IF-630	Si	8	31	40