

Control biológico de patógenos vegetales

Una revisión de las investigaciones realizadas en los últimos 30 años en el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola

Amelia Laura Gasoni⁵, Mara Edith Martín², Vanesa Yamila Mema^{1,3}, Eliana Melignani^{2,4}, José Matías Zapiola¹, Rodrigo Alejandro Rojo¹, Viviana Andrea Barrera¹

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA), Nicolás Repetto y de los Reseros s/n (1686) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, CABA, Argentina.

³Facultad de Agronomía, Cátedra de Dasonomía, Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453 (1417), Buenos Aires, Argentina.

⁴Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Dpto. Biodiversidad y Biología Experimental. Universidad de Buenos Aires (UBA/Instituto de Micología y Botánica (INMIBO-CONICET), Buenos Aires, CABA, Argentina.

⁵Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Investigador Asociado. Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA), Nicolás Repetto y de los Reseros s/n (1686) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.

lgasoni@gmail.com

RESUMEN

A principios de la década de 1990, el equipo de fitopatólogos del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA-INTA), que había llevado a cabo numerosas investigaciones sobre fitopatógenos, comenzó a desarrollar un programa que incluía diferentes herramientas para reducir la aplicación de productos químicos, con el fin de lograr una agricultura sustentable. Esta revisión describe los avances obtenidos desde 1990 hasta 2020 inclusive.

El control biológico o la bioprotección de los patógenos de las plantas³¹ ha alcanzado una gran importancia en las últimas décadas. La preocupación social por el deterioro del ambiente debida al uso intensivo de plaguicidas ha llevado a demandar alternativas menos contaminantes como el control biológico.

Al respecto, los fitopatólogos enfatizan la necesidad de profundizar en investigaciones conducentes a reducir las pérdidas causadas por enfermedades fúngicas mediante el uso de microorganismos benéficos.

Los avances en la implementación del control biológico dependen en gran medida de políticas que faciliten su utilización, de infraestructura adecuada y además, de disponibilidad de fondos²⁷.

Las investigaciones sobre los agentes fúngicos benéficos nativos representan un componente crítico del control biológico de fitopatógenos (BCPP) (Biological Control of Plant Pathogens). En este sentido, Argentina tiene un gran potencial para la implementación de un BCPP exitoso, debido a la riqueza de su microflora nativa³². Este hecho ha sido el principal factor que ha permitido la investigación, el desarrollo y la aprobación de algunos inoculantes de control biológico²⁸.

El objetivo de esta revisión fue describir las investigaciones llevadas a cabo durante tres décadas a fin de desarrollar diferentes herramientas que permitieran reducir el uso de pesticidas químicos y la promoción de una agricultura sustentable.

El avance de varios proyectos institucionales nacionales sobre el control de fitopatógenos, que incluyeron relevamientos en varias regiones de la Argentina, proporcionó información relacionada con las interacciones entre fitopatógenos y organismos benéficos. Durante los relevamientos realizados en distintas regiones, sobre diferentes cultivos y en lugares no cultivados de la Argentina se obtuvieron varios aislamientos que fueron identificados como *Rhizoctonia* spp. y otros microorganismos fúngicos septados estériles que compartían el mismo nicho. En estas muestras se observó la competencia y la reducción de la patogenicidad lograda sobre algunos cultivos.

La investigación preliminar tenía como objetivo reducir los daños del *damping-off* en los cultivos causado por organismos fitopatógenos identificados como pertenecientes a *R. solani*.

Los microorganismos fúngicos septados estériles que compartían nicho con especies de *Rhizoctonia* no fueron taxonómicamente identificables en el momento del aislamiento y demostraron ser hipovirulentos sobre un gran número de semillas de diferentes especies vegetales. Se realizaron experimentos *in vitro* e *in vivo* utilizando estos hongos septados no identificados, cultivándolos sobre un medio de APG (Agar papa glucosa) e incubándolos a 28 °C. Luego de ese período, se enfrentaron discos de estos cultivos con semillas desinfectadas de diferentes especies vegetales colocadas en los bordes de las placas de Petri. Las placas se incubaron a 28 °C durante 7-10 días. La virulencia se evaluó en una escala de 0 a 5. La puntuación media se basó en el análisis de 60 semillas de cada hospedante por aislamiento. Los resultados se presentaron en la sesión de posters en las VII Jornadas Fitosanitarias Argentinas (1989), Salta, Argentina (no publicado).

Las investigaciones posteriores sobre los aislamientos hipovirulentos mencionados anteriormente demostraron la necesidad de investigar exhaustivamente la taxonomía de estos microorganismos. Estas actividades estuvieron contempladas en el proyecto de investigación INTA CICA 532: "Agentes biocontroladores de hongos patógenos de suelo". (1992-1994). Posteriormente, se continuaron las investigaciones sobre el rango de patogenicidad de los aislamientos, en el marco del Proyecto INTA CICA 32-0337: "Utilización de bacterias antagonistas para el biocontrol de

enfermedades de plantas causadas por hongos fitopatógenos" (1995-1997). Los resultados obtenidos fueron expuestos en una presentación de posters en el xxv Congreso Brasileiro de Fitopatología (1992), Gramado, Brasil (no publicado).

Es importante resaltar que los aislamientos septados estériles no resultaron patogénicos sobre las semillas de los cultivos ensayados. Se realizaron otros experimentos en los cuales se combinaron patógenos y los septados estériles, incorporados en el suelo de cultivo y se determinó un porcentaje significativo de protección en plántulas de lino (*Linum usitatissimum*). Las investigaciones sobre la supresión del *damping-off* causado por *R. solani* fueron publicados¹⁰. La identificación de estos organismos llevada a cabo en el centro The Fungarium, Royal Gardens of Kew (Inglaterra) determinó que correspondían a *Cladorrhinum foecundissimum*.

Posteriormente, Martínez, en 2009, realizó una identificación precisa de la cepa de *Cladorrhinum*, identificada en Inglaterra, basada en la amplificación y secuenciación de la región del espaciador interno de transcripción (ITS) del ADN ribosómico utilizando los cebadores ITS4 e ITS5. Los resultados demostraron que la especie correspondía a *C. samala*. La comparación de las secuencias de ADN, obtenidas de las cepas tipo de cada especie del género, depositadas en las Colecciones internacionales, mostró la ubicación de la cepa argentina C1 antes identificada como *C. foecundissimum* en un clado junto con *C. samala*. Los datos moleculares se analizaron por homología estática, por máxima parsimonia con el software WinClada-Nona. Los resultados fueron presentados en una sesión de posters en el xx Congreso Latinoamericano de Microbiología y ix Encuentro Nacional de Microbiólogos (2010), Montevideo, Uruguay, (no publicado).

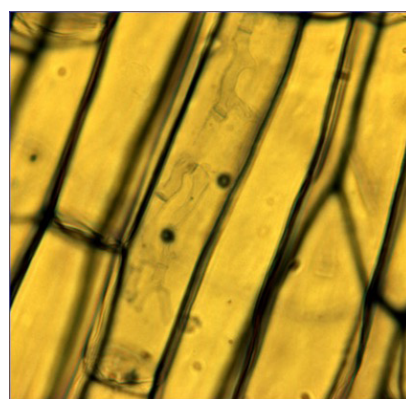
Para evaluar la eficacia de estas cepas en cultivos extensivos afectados por patógenos de suelo, se realizaron ensayos sobre algodón (*Gossypium hirsutum* L.) en invernáculo. Los resultados de la aplicación de las cepas de *C. samala* INTA-AR1 (en ese momento identificadas como *C. foecundissimum*) y *Trichoderma koningii* para el control de *R. solani* en plántulas de algodón fueron expuestos en el 6° Congreso Internacional de Patología Vegetal (1993), Montreal, Canadá (no publicado). La cepa de *T. koningii* pertenecía a la Colección de cepas de la Facultad de Agronomía (UBA).

Los estudios microscópicos en raíces de algodón y en lino indicaron un comportamiento endofítico de este agente (fig.1) y fue posible diferenciar las estructuras del hongo y del hospedante en secciones transversales seriadas, obtenidas por cortes con micrótopo de raíces inoculadas, teñidas con rojo Magdala-verde claro. Los resultados fueron descritos en el trabajo de tesis de la Dra. Amelia Laura Gasoni *El complejo Rhizoctonia en la Argentina: Distribución, Patogenicidad y Biocontrol*¹¹.

Con respecto a los resultados promisorios, obtenidos con la utilización de los hongos benéficos, fue de interés explorar el mecanismo de acción de las cepas de *C. foecundissimum* (*C. samala* INTA-AR1). Los resultados se presentaron en una sesión de poster en el vi Congreso de Micología (1993), Buenos Aires, Argentina, (no publicado).

El objetivo principal de esta presentación fue estudiar la actividad celulolítica de una de las cepas de *Cladorrhinum* y el impacto de ciertas enzimas (complejo de celulasas) en el desempeño como agente de biocontrol contra *R. solani*. Los resultados indicaron que la actividad de exo, endocelulasa y B-glucosidasa se obtuvieron por medio de la sustitución parcial de la fuente de C por CMC (Carboxi-metil-celulosa), avicel y/o pectina/xilano en el medio de cultivo. Las enzimas se determinaron en el sobrenadante del cultivo por colorimetría de los azúcares reductores según los métodos de Somogyi²⁹ y Nelson²⁶.

Figura 1. Colonización endofítica de *Cladorrhinum samala* en raíces de lino.



La conversión de la absorbancia de los azúcares reductores se realizó según una curva de glucosa de 0,05 a 1 µml de glucosa y se expresó en unidades de glucosa. El avicel fue el mejor sustituto para β-glucosidasa de todos los inductores enzimáticos utilizados durante 14d de crecimiento vegetativo.

Los resultados fueron presentados en el IV Siconbiol (4.º Simposio de Control Biológico (1994)), Gramado, Brasil¹².

En otros ensayos, se evaluó la acción de los aislamientos hipovirulentos y de un fungicida selectivo, RIZOLEX® (methyltolclofos) para controlar el desarrollo de *R. solani*. El resultado fue presentado durante el Congreso Latinoamericano de Fitopatología (1994), Santiago de Chile, Chile³⁰.

Entre 1994 y 1995 se intensificaron los estudios sobre el género *Trichoderma*, a partir de la participación en un proyecto internacional con la Universidad de Salamanca, (España), con fondos del Instituto de Cooperación con Iberoamérica. Las actividades involucraron la realización de estudios de control biológico sobre *Pythium aphanidermatum* y *R. solani*, con la utilización de cepas de *T. koningii*, *T. harzianum* y *T. viride*. El proyecto contemplaba, además, una beca de corta duración proporcionada por el Gobierno español en la Universidad de Salamanca que contribuyó a reforzar los conocimientos y a llevar a cabo la caracterización fisiológica de las cepas de *Trichoderma*.

Los ensayos preliminares demostraron el potencial de numerosos aislamientos para controlar el desarrollo de fitopatógenos de suelo *in vitro*.

En simultáneo, con el propósito de ampliar las posibilidades de cooperación internacional, en 1994 se aprobó un acuerdo con la Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA) y se inició el Proyecto bilateral denominado "Root Rot Biological Control", entre JICA y el INTA.

En el marco del proyecto mencionado, se recibió la asistencia de los profesores: Kiroku Kobayashi, Norio Kondo, Mitsuro Hyakumachi y Kazunari Yokoyama de las Universidades de Hokkaido, Gifu y del Centro de Investigaciones de Tsukuba respectivamente. En el contexto de este proyecto, se pusieron a punto metodologías y se publicaron resultados con los expertos mencionados.

Los mayores esfuerzos de estas investigaciones se dirigieron a la

selección de agentes microbianos como bacterias y hongos benéficos con capacidad para controlar fitopatógenos. Los aislamientos de *Trichoderma* con capacidad biocontroladora se caracterizaron mediante el método API® ZYM. Además, se determinó la capacidad antagonista de dos especies de *Bacillus* y una de *Pseudomonas* contra *R. solani*. Complementariamente se llevó a cabo la extracción de antibióticos y la determinación de la producción de sideróforos.

En los comienzos del desarrollo de la formulación de un bioproducto basado en cepas de *Trichoderma* se evaluó el crecimiento de los aislamientos en medio líquido. Se seleccionaron los medios más adecuados para obtener cultivos con alta producción de conidios y la posibilidad de desarrollar formulaciones eficientes para ser aplicadas en suelo o en semillas y se llevaron a escala piloto.

Los primeros resultados de estos estudios fueron presentados en el VII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. XIV Congreso Venezolano de Fitopatología. I Congreso Venezolano de Micología (1995). Facultad de Ciencias Forestales. Univ. de Los Andes, Mérida, Venezuela⁸.

Se continuaron los estudios bioquímicos sobre la actividad antibiótica de las bacterias antagonistas. Las fracciones obtenidas de los extractos se analizaron por bioautografía y en el caso de *Pseudomonas*, se demostró la presencia de pirrolnitrina, un antibiótico efectivo para el control de patógenos.

Con el fin de obtener un bioproducto eficaz para ser incorporado al suelo o sobre semilla, los cultivos de las cepas bacterianas se incluyeron en diferentes soluciones adhesivas. Se aplicaron en semillas de especies hortícolas sobre diferentes tipos de soportes. Se evaluó la supervivencia de los organismos benéficos y la eficacia en el control de los patógenos. La combinación de turba y arcilla con *Pseudomonas* presentó la mejor respuesta. Los resultados preliminares de esta investigación fueron expuestos durante el V Siconbiol (1996). Centro de Pesquisa Agropecuaria de Clima Temperado, Embrapa, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil (no publicado).

Los resultados obtenidos con la cepa de *Cladorrhinum*, en la reducción de la necrosis causada por *R. solani* en plántulas de algodón, y sobre varios suelos

de la región productora (zona norte de la provincia del Chaco) con deficiencias de fósforo (P), permitieron determinar la capacidad del microorganismo de solubilizar el P de esos suelos y facilitar el crecimiento del hospedante. Los resultados referidos fueron publicados en 1997¹³.

En el marco de una estada en la Universidad de Hokkaido, Sapporo (Japón) en 1997, se presentaron en el Centro de Convenciones de la Universidad de Hokkaido los resultados de las investigaciones realizadas a campo, sobre la eficiencia de rizobacterias promotoras de crecimiento en lechuga (*Lactuca sativa*; L.)⁹. Ensayos en campo sobre otras especies hortícolas, complementaron estos resultados en la región de Córdoba. Los datos obtenidos sobre reducción de la patogenicidad por acción de los agentes antagonistas sobre aislamientos de *Rhizoctonia* en lechuga y en papa (*Solanum tuberosum*; L.) fueron publicados en 2001¹⁵.

Otros estudios sobre control biológico realizados con investigadores de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (FAUBA-INTA) en el marco del Proyecto conjunto: "Producción y Manejo de Agentes Biocontroladores de Fitopatógenos del Suelo" (1995 a 2000), contribuyeron al aislamiento de varias cepas de *Trichoderma* spp.

Resultados obtenidos sobre la combinación de antagonistas y enmiendas orgánicas para el control de fitopatógenos de suelo en cultivos hortícolas fueron expuestos durante la XII Conferencia Internacional de Agricultura Orgánica (1998), (IFOAM 98). Mar del Plata, Argentina y luego publicados³⁴.

En octubre de 1998, el equipo de trabajo organizó el Primer Congreso Argentino de Control Biológico de Patógenos Vegetales en Buenos Aires. El evento fue declarado de interés parlamentario por la Cámara de Diputados de la Nación con la Resolución 870. También fue declarado de interés por la legislatura de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Se contó con el apoyo de diferentes instituciones, y los disertantes extranjeros expusieron sus resultados sobre el control biológico de patógenos vegetales. Muchos asistentes del país tuvieron la oportunidad de intercambiar con investigadores internacionales y discutir sus resultados. En el año 1998 se publicaron los resultados de la acción de bacterias

antagonistas y sus metabolitos sobre una cepa patógena de *R. solani*¹⁹. Además, se evaluó tanto la eficiencia de diferentes soportes para la vehiculización de los agentes de biocontrol como la eficiencia bajo diversas condiciones. Adicionalmente, los resultados sobre la producción de enzimas y la movilización de nutrientes a partir de la materia orgánica obtenidos de un aislamiento endofítico de *C. foecundissimum* fueron presentados en las sesiones de posters del XIV Congreso Internacional de Protección Vegetal (IPPC) (1999), Jerusalén, Israel. En el mismo evento se expusieron los resultados sobre la caracterización fisiológica y bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* con el propósito de mejorar el proceso de fermentación¹.

Posteriormente se evaluó la eficiencia de la solarización en combinación con la aplicación de agentes de biocontrol en acelga (*Beta vulgaris* L.) en campos de producción en la provincia de Córdoba, Argentina.

Los resultados sobre el rendimiento de acelga en suelos solarizados fueron significativamente mayores comparados con los otros tratamientos y fueron presentados durante el XXVI Congreso de la Sociedad Mexicana de Fitopatología y en el X Congreso Latinoamericano de Fitopatología (1999), Guadalajara, México (no publicado). Este trabajo fue premiado por el Comité Organizador.

LOGROS

De acuerdo con el primer objetivo del equipo de trabajo de contribuir a una agricultura sustentable, los principales logros a fines de la década fueron 1- la obtención de una importante colección de aislamientos benéficos y 2- resultados preliminares promisorios sobre la eficiencia de los agentes de biocontrol seleccionados.

En la década del 2000, se incorporaron nuevos investigadores al equipo de trabajo, lo que permitió profundizar las investigaciones sobre diferentes aspectos de los organismos benéficos en estudio. El objetivo principal fue llevar adelante la evaluación de diferentes métodos de aplicación de los inóculos, tales como utilizar trozos de madera u otros sustratos para vehicularlos y determinar la respuesta de esos inóculos en condiciones de campo².

Considerando que el equipo de trabajo del IMyZA había organizado el primer Congreso Argentino de Control Biológico, el Dr. Joseph Kloepper, miembro activo del comité organizador de la convención internacional de Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (Plant Growth Promoting Rizobacteria) (PGPR), encomendó al equipo de investigación, la organización del Quinto Taller Internacional de PGPR en 1999, en Argentina. Este importante evento se celebró en Carlos Paz (Córdoba, Argentina) el 29 de octubre de 2000 y contó con la colaboración del equipo de trabajo e investigadores de otras instituciones.

En el año 2000 se firmó un nuevo convenio de investigación entre JICA e IMYZA-INTA, denominado "Control biológico de enfermedades de las plantas". Este proyecto de colaboración bilateral tuvo vigencia hasta el año 2004 y representó un papel sustancial en la integración de las investigaciones sobre control biológico y aquellas en fase de desarrollo, en las EEA del INTA y en las Universidades Nacionales de Córdoba y de Buenos Aires.

En el marco del convenio, se realizaron ensayos y se publicaron resultados sobre las combinaciones de la aplicación de agentes benéficos con solarización del suelo y con otras prácticas agrícolas, en predios de diferentes regiones^{16, 35, 36}. Los resultados del acuerdo bilateral fueron publicados en las Actas del Seminario Internacional de "Control Biológico de Enfermedades de las Plantas", Japón-Argentina (2004). En el marco de las investigaciones, se publicaron además los resultados obtenidos con el desarrollo de un método molecular para detectar especies patógenas de *Streptomyces*, importante fitopatógeno a controlar⁴. Este método permite la detección del patógeno en tubérculos de papa y desde muestras de suelo.

Los estudios sobre formulaciones sólidas fueron un componente crítico de las investigaciones realizadas. Esto se concretó con el desarrollo de bioformulados registrados como TRICOTRAP® y BIOTRAP®, obtenidos en el marco del convenio con NITRAP S.R.L., firmado por el período desde 2004 a 2037.

Otro aspecto estudiado fue el impacto de los agentes de biocontrol sobre la comunidad microbiana original del suelo. La diversidad microbiana implica

no solo complejidad sino también una gran capacidad de recuperación del equilibrio microbiano en diferentes niveles de organización biológica. Por ello se han estudiado los cambios en las preferencias nutricionales de las comunidades del suelo, luego de la incorporación de los agentes benéficos.

La diversidad funcional se evaluó por determinación de las preferencias nutricionales a través de la utilización de diferentes sustratos con el sistema BIOLOG®.

Los resultados del impacto del agente de biocontrol *Trichoderma* sobre la diversidad funcional de la comunidad microbiana del suelo en un sistema de monocultivo de tabaco en Argentina fueron publicados en 2008¹⁷.

En el año 2005 se obtuvo la aprobación del Proyecto de Cooperación bilateral Italia-Argentina, «Antagonistas de organismos fitopatógenos, caracterización, evaluación de la capacidad de instalación en el ecosistema e impacto sobre las comunidades microbianas existentes» (Programa de Cooperación Científico-Tecnológico Argentino-Italiano SECYT-MAE (Ministro degli Affari Esteri), (Cod: IT/PA05-AyEXV/118), (2005-2007).

Las misiones Italia-Argentina fueron financiadas por MAE y por SECYT. El objetivo principal de este proyecto fue estudiar exhaustivamente diferentes aspectos de las cepas de *Trichoderma*.

La investigación se llevó a cabo con aislamientos de *Trichoderma* spp. con capacidad para estimular el crecimiento de las plantas y ejercer antagonismo sobre ciertos hongos fitopatógenos del suelo.

Durante la primera misión de investigadores italianos en Argentina, el propósito fue determinar la producción de enzimas inducibles, específicas del aislamiento seleccionado durante la acción antagonista.

En el caso de la misión llevada a cabo por la contraparte argentina en Italia, la investigación se centró en la transformación de aislamientos de *Trichoderma* spp. por medio de la degradación enzimática de sus paredes celulares. Posteriormente, se realizó un seguimiento para observar la aparición de colonias recombinantes.

En otra etapa, se realizaron estudios proteómicos de los aislamientos de *Trichoderma* spp. en ensayos de interacción entre aislamientos

antagonistas, plantas de tomate y hongos fitopatógenos.

Durante la segunda misión, los estudios de investigación se centraron en la capacidad de los aislamientos de *Trichoderma* para la producción de metabolitos fúngicos y su posterior caracterización. Los resultados fueron expuestos en el XIV Congreso SIPAV (Società Italiana di Patologia Vegetale) (2007), Perugia, Italia³³. Las actividades mencionadas estuvieron contempladas en el Proyecto INTA (AEPV2552): "Desarrollo de insumos biológicos para el manejo de organismos perjudiciales" (2006-2009).

En este mismo período se llevaron adelante exhaustivos estudios sobre el género *Cladorrhinum* como potencial agente de biocontrol y los resultados se publicaron en una revista internacional¹⁸.

Final de la segunda década

Los principales logros fueron, el registro de dos bioproductos, la información sobre mecanismos de acción de agentes benéficos y su eficacia en ensayos sobre hospedantes. Además, se firmaron importantes acuerdos internacionales (JICA-INTA; SECyT-MAE), incluso con una empresa privada (NITRAP SRL).

En marzo de 2010 se aprobó el proyecto de investigación bilateral (código BE/09/04) entre los gobiernos de Bélgica y de Argentina, financiados por MINCYT-FNRS (Ministerio de Ciencia y Técnica-Fondo de la Investigación Científica) respectivamente. Las misiones entre Argentina y Bélgica fueron financiadas por MINCYT y por FNRS durante la ejecución del proyecto. Se realizaron dos misiones de l'Université de Louvain La-Neuve (UCL) al IMyZA, y dos del

IMyZA a la UCL. El objetivo de este proyecto fue conocer las etapas a seguir para el establecimiento de colecciones de microorganismos de reconocimiento internacional, comprendiendo desde la recepción de las muestras, el almacenamiento hasta su gestión, como se lleva a cabo en un centro Internacional de conservación de cepas como es la Colección Belga de Cultivos de Microorganismos (BCCM Belgian Coordinated Collections of Microorganisms).

Este proyecto se vinculó con un Proyecto Específico del INTA AERG-231251: "Conservación y valoración de recursos genéticos microbiológicos" (2006.2009) y con el Proyecto Específico (AEPV214032): "Desarrollo de metodologías y herramientas para el manejo integrado de enfermedades" (2009-2012).

El avance de otro proyecto de control biológico con la empresa RIZOBACTER S.A. firmado en 2007 y vigente en la actualidad, proporcionó la oportunidad de mejorar una formulación líquida con la cepa de *T. afroharzianum* (antes *T. harzianum*) seleccionada así como de evaluar su eficiencia sobre cultivos extensivos (fig. 2).

Para los bioformulados desarrollados a partir de cepas de *Trichoderma* fue de especial interés para el equipo de trabajo investigar la variabilidad biológica de las especies considerando que no había estudios previos en profundidad sobre la taxonomía del género en el país. El abordaje de este tema fue realizado por la Dra. Viviana Barrera, investigadora del equipo, es su tesis titulada *El género Hypocrea en la Argentina. Estudio de la variabilidad molecular de su estado anamórfico Trichoderma*³. Las investigaciones se realizaron sobre relevamientos de

especímenes en estado teleomórfico y anamórfico de *Trichoderma* en diferentes sitios geográficos de la Argentina. Los objetivos principales fueron identificar aquellas especies de *Trichoderma* presentes mediante el estudio de caracteres morfológicos, fisiológicos y moleculares, y conocer los patrones de variabilidad molecular neutral con el fin de generar marcadores moleculares para reconocer cepas de la misma especie, entre las cuales se encontraban las cepas seleccionadas e incorporadas en los convenios.

Posteriormente, se continuaron las investigaciones sobre la utilización de diferentes soportes en la conservación de las formulaciones de *T. harzianum*, en el marco del proyecto con la empresa RIZOBACTER y del Proyecto Específico de INTA: PNPV-1135023 "Estrategias de bajo impacto ambiental para el manejo de enfermedades de las plantas" (2012-2018). Los resultados fueron publicados³⁷.

La formulación líquida con una especie de *Trichoderma* se presentó en el mercado comercial como RIZODERMA®, en 2014.

Esta tecnología contribuye no solo a reducir la contaminación del ambiente por la disminución en el uso de plaguicidas sintéticos, sino también al incremento de los rendimientos asociado a una producción sustentable.

Este manejo del control biológico implica una serie de prácticas agrícolas para restablecer el equilibrio microbiano y lograr una mayor supervivencia de los agentes de biocontrol.

En 2014 se aprobó un nuevo proyecto de cooperación con JICA que comenzó en 2015. En el marco de este proyecto, el objetivo a largo plazo fue la reducción de las enfermedades de las plantas mediante el uso de productos que incluyeran microorganismos benéficos. Con los expertos japoneses Drs. Mitsuro Hyakumachi y Masafumi Shimizu las principales actividades planteadas fueron establecer las condiciones necesarias para lograr la producción masiva de los organismos de biocontrol eficientes contra hongos fitopatógenos y determinar su viabilidad en los formulados en períodos prolongados.

Es importante señalar que todas las actividades desarrolladas en el marco del convenio con JICA estuvieron contempladas en el Proyecto Específico de INTA: PNPV-1135023 "Estrategias de bajo impacto ambiental para el manejo de

Figura 2. Ensayos con *Trichoderma afroharzianum* y *Fusarium graminearum* sobre trigo.



enfermedades de las plantas" (2012-2018).

La contribución de las investigaciones realizadas con los expertos japoneses permitió obtener resultados relativos a la conservación de los propágulos de *Trichoderma* durante varios meses en estantería. Estos se informaron en el seminario final: Research Project about fermentation technology and formulation of biocontrol agents against plant pathogenic fungi. Vol 1 National Program of plant protection-PNPV 1135023. Vol 2 Bilateral Project JICA-INTA.

En lo que concierne a los estudios sobre el género *Cladorrhinum*, se describió y publicó una nueva especie⁷. Los aspectos moleculares y biotecnológicos fueron estudiados con profundidad en el marco del trabajo de tesis de la Dra. Mara Martín, *Caracterización de aislamientos nativos de hongos del género Cladorrhinum y su potencial como agentes antagonistas y promotores del crecimiento vegetal*²². Además, se publicó una revisión sobre la diversidad de especies de *Cladorrhinum* y su aplicación en biotecnología²³.

Se analizaron los perfiles metabólicos de 5 cepas nativas de *C. samala* y *C. bulbiliosum* con cepas de referencia utilizando 95 fuentes de carbono individuales del sistema BIOLOG® FF y los resultados revelaron una variabilidad fisiológica intraespecífica en las especies de *Cladorrhinum* ensayadas⁵.

La evaluación *in vitro* del potencial antagónico de los aislados nativos de *Cladorrhinum* contra fitopatógenos se realizó con aislamientos obtenidos de suelos de diferentes regiones del país y con cepas de referencia.

Los resultados publicados sobre *Cladorrhinum* fueron muy importantes y se requieren más estudios para conocer con profundidad la capacidad antagónica de algunas especies del género contra *F. graminearum* y *B. sorokiniana*.

A partir de las investigaciones realizadas, se seleccionó *C. samala* como la especie con mayor potencial de aplicación. Estos resultados fueron presentados en una sesión de posters en el III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental (CAMAYA) (2015). Facultad de Ciencias Agrarias-UCA-Palermo, Buenos Aires, Argentina²⁰.

Para la selección de los aislamientos de *Cladorrhinum* con actividad enzimática, se cultivaron en un medio específico con carboximetilcelulosa (CMC) como

única fuente de carbono. Se utilizó como método de tinción Rojo Congo, el cual tiñe de rojo a la celulosa en tanto que la zona de degradación de la celulosa se manifiesta con un halo incoloro. Se midieron los radios de las colonias y el radio del halo a fin de calcular el Índice Enzimático (IE) como el cociente entre el radio de la zona de hidrólisis y el radio de la colonia. Estos datos preliminares sugieren que las especies de *Cladorrhinum* pueden tener capacidad de producir enzimas celulolíticas bajo ciertas condiciones. La cepa de *T. harzianum* (T3) utilizada para comparar la actividad enzimática no presentó diferencias entre el radio del halo y el radio de la colonia. Los resultados fueron expuestos en el VIII Congreso Brasileño de Micología (2016) Universidad Federal de Santa Catarina, Trindade, Florianópolis, Brasil²¹.

Más recientemente se determinó la promoción de crecimiento vegetal a partir de la biomasa radicular en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) por la acción de aislamientos seleccionados de *Cladorrhinum* spp.

El trabajo se realizó con aislamientos de la especie *C. samala* obtenidos de suelos de diferentes regiones de Argentina y con cepas de referencia. En los ensayos se evaluaron las respuestas de las plántulas de tomate inoculadas que fueron sometidas a un estrés hídrico. Los datos obtenidos a los 30 días mostraron diferencias significativas con dos de las cepas ensayadas. Estos resultados indicaron que los aislamientos tienen un efecto positivo sobre el desarrollo de las raíces de las plantas de tomate en estas condiciones. Los resultados fueron presentados en el IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental (2018). Mar del Plata, Argentina (no publicados).

Además, se analizó la capacidad de los aislamientos nativos de *C. samala* y *C. bulbiliosum* con cepas de referencia mediante el sistema BIOLOG® FF para caracterizar sus patrones metabólicos y los resultados fueron publicados⁵.

La investigación sobre otros agentes de biocontrol se incrementó con los estudios sobre especies del género *Laetisaria*. Los aislamientos fúngicos fueron obtenidos en el marco del Proyecto Específico de INTA AEBIO-242441 "Calidad de suelos mediante evaluación molecular de comunidades microbianas como indicadores biológicos", durante los años 2009-2011, a partir de muestras

de suelo del cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.), en un sistema de rotación de 15 años en la Estación Experimental Agropecuaria de Hilario Ascasubi. Los resultados preliminares fueron presentados por Andreotti *et al.* (2012) a través de una sesión de posters en las XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas en Potrero de los Funes, San Luis, Argentina. El autor analizó la frecuencia de aparición de hongos antagonistas de *F. oxysporum*, entre ellos *Laetisaria* spp., en distintas rotaciones del cultivo de cebolla. Posteriormente, Marion *et al.* (2015) expusieron los resultados obtenidos de estudios morfológicos de los aislamientos que indicaban que pertenecían a *L. arvalis*. En una sesión de posters en el III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental (CAMAYA), Facultad de Ciencias Agrarias-UCA-Palermo, Buenos Aires, Argentina. El análisis filogenético con ITS confirmó los resultados, que fueron realizados en el marco del Proyecto Específico de INTA PNBIO-1131044 "Genómica aplicada a estudios de ecología molecular y diversidad genética". Es importante destacar que esta es la primera mención de esta especie de *Laetisaria* en Argentina.

Dentro de las actividades del proyecto mencionado anteriormente, se realizó además una prospección de la actividad enzimática con ocho de los aislamientos de *Laetisaria* sp. obtenidos con el objetivo de seleccionar cepas con capacidad para reducir el crecimiento de hongos fitopatógenos de suelo. La selección se llevó a cabo a través de ensayos de antagonismo *in vitro* y por la determinación de la producción de "enzimas degradadoras de paredes celulares" (CWDEs). Estas enzimas están involucradas en la degradación de materiales lignocelulósicos y pueden ser de utilidad para el control de fitopatógenos así como en la producción de etanol de segunda generación. Los ensayos de control se realizaron en cultivos duales contra siete patógenos: *Bipolaris sorokiniana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *Pythium irregulare*, dos cepas de *R. circinata* y de *Sclerotium rolfsii*. Los resultados indicaron que *P. irregulare* fue el patógeno que presentó mayor inhibición de crecimiento (73 %). Esta información así como la obtenida de los enfrentamientos con *Laetisaria* sp. contra los mismos patógenos fueron expuestos por Melignani *et al.* (2018) en el IV Congreso Argentino de

Microbiología Agrícola y Ambiental. Asociación Argentina de Microbiología Buenos Aires, Argentina²⁴.

Se evaluó además la capacidad de los aislamientos de *Laetisaria* de producir enzimas en placa (quitinasas, proteasas, celulasas, ligninasas). Las quitinasas fueron producidas por siete de los ocho aislamientos evaluados y en tres de ellos con índices enzimáticos elevados. Los resultados fueron expuestos Melignani et al. (2018) en el IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina²⁵.

Actualmente, se continúan los estudios de identificación taxonómica y molecular de esta especie y las investigaciones sobre las enzimas proteasas, celulasas y ligninasas en el IMyZA, en colaboración con la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. La información sobre esta especie, hasta el momento, es escasa a nivel mundial, por lo que se considera importante profundizar en estos estudios.

Recientemente se realizó una identificación precisa de las especies de *Trichoderma* incluidas en la formulación de RIZODERMA®⁶ y se llevó a cabo la investigación molecular de las cepas benéficas del género. Estos resultados contribuyeron a una mejor comprensión de los mecanismos de acción de estas especies y a la optimización de la formulación. La información obtenida fue publicada⁶.

En 2019 se comenzó a coordinar el Proyecto disciplinario 2019-PD-E4-I069-001: "Bioprospección y caracterización de microorganismos benéficos para la protección y producción vegetal" de la Cartera 2019 (2019-2022).

Es importante destacar que en el marco de los proyectos anteriores se llevaron a cabo las actividades de selección y caracterización de microorganismos benéficos con capacidad para el biocontrol de patógenos vegetales y para la vinculación con las empresas del sector agroindustrial que contribuyeron al desarrollo de los bioformulados registrados. En esta nueva Cartera se enfatizó la necesidad del monitoreo sistemático de la biodiversidad para aportar información a los programas de conservación.

Considerando la incorporación de Argentina al Protocolo de Nagoya y

dentro de las actividades desarrolladas en este nuevo proyecto, se llevó a cabo un exhaustivo trabajo de difusión, a fin de incorporar los lineamientos del Protocolo para los investigadores participantes. Con este propósito se organizaron talleres de capacitación en vinculación con los sectores de RRGG, como la Redgen Microbianos de INTA, la Gerencia de VT de INTA, el MAYS, departamentos de RRGG provinciales y Parques Nacionales.

Además debe señalarse que desde 1995 hasta 2017 el IMyZA fue sede del curso de Control Biológico de Fitopatógenos organizado en convenio con la Escuela para Graduados (EPG), Fac. de Agronomía (UBA). Se ha realizado cada dos años y fue dirigido por el Dr. Enrique Monte Vázquez de la Universidad de Salamanca (España), y con la codirección del Dr. Eduardo Wright de la Escuela para Graduados (EPG), Fac. de Agronomía y el equipo de trabajo del IMyZA.

Durante gran parte de las tres décadas, el equipo de trabajo del IMyZA tuvo a su cargo la coordinación de proyectos del INTA a nivel nacional e internacional, con objetivos que contemplaron el desarrollo de insumos biológicos para el manejo de patógenos, de metodologías y de herramientas para el manejo integrado de enfermedades así como la conservación de la biodiversidad.

En el marco de estos proyectos, se facilitó la integración del equipo de trabajo del IMyZA con otros profesionales de estaciones experimentales de distintas provincias.

Es muy importante destacar que la estructura de estos proyectos contempló diferentes etapas en el desarrollo de insumos o herramientas conducentes a una agricultura sustentable. Algunos de los equipos de trabajo llevaron a cabo el aislamiento y preservación de organismos benéficos, en tanto que otros, ya más adelantados en sus investigaciones, se encaminaron al desarrollo de formulaciones experimentales de productos biológicos.

Se concluye que hasta el momento los principales logros obtenidos fueron el registro de los bioproductos registrados: TRICOTRAP®, BIOTRAP® y RIZODERMA®, el conocimiento de la taxonomía y características de las cepas incluidas en los formulados y los estudios avanzados sobre la cepa de *Trichoderma* que compone el formulado RIZODERMA® (*T. afroharzianum*

Th2RI99) así como la realización de estudios adicionales sobre otros microorganismos benéficos.

Los resultados aquí presentados muestran que el equipo de trabajo del IMyZA ha estado profundamente implicado a lo largo de tres décadas (desde 1990 hasta 2020 inclusive) en la investigación sobre el control biológico de los patógenos de las plantas. Científicos de varios laboratorios y estaciones experimentales han trabajado en diferentes proyectos a lo largo de este período.

Se ha incrementado el uso de técnicas genéticas y moleculares, especialmente para entender los mecanismos de acción de los agentes benéficos. También se han producido avances significativos en el desarrollo de bioproductos, en la selección y en las evaluaciones posteriores a su aplicación.

Además, la colaboración internacional en el control biológico de fitopatógenos ha contribuido ampliamente en todos los aspectos que abarcan los programas de control biológico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo recibido de las siguientes Instituciones gubernamentales: CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), FAUBA (Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires), FAUNC (Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Córdoba) y colaboradores en diferentes proyectos de IPAVE (Instituto Patología Vegetal Córdoba), Estaciones Experimentales INTA Obispos Colombres (Tucumán), Yuto (Jujuy), Marcos Juárez (Córdoba), Oliveros (Santa Fe), Concepción del Uruguay (Entre Ríos) y Chubut.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] BABBITT, S.; GASONI, L.; COZZI, J. (199). Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma* isolates to improve fermentation process. XIVTH International Plant Protection Congress (IPPC). Jerusalem (Israel). 35 p.
- [2] BABBITT, S.; GASONI, L.; BARRERA, V. (2001). Utilización de aislamientos de *Trichoderma* desarrollados sobre tarugos de madera en el control de *Rhizoctonia solani* en berenjena. Fitopatología Brasileira 2001:(26):461.

- [3] BARRERA, V.A. (2012). El género *Hypocrea* Fr. (Hypocreales, Ascomycota) en la Argentina. Estudio de la variabilidad molecular de su estado anamórfico *Trichoderma*. Tesis doctoral en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA). (Disponible: <http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis5226Barrera.pdf>. 2 verificado: septiembre 2022).
- [4] BARRERA, V.; KAGEYAMA, K.; ROJO, R.; GASONI, L.; KOBAYASHI, K. (2013). A species-specific method for detecting pathogenic *Streptomyces* species from soil and potato tubers in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 45 (4): 277-81
- [5] BARRERA, V.; MARTÍN, M.; AULICINO, M.; MARTÍNEZ, S.; CHIESSA, G.; SAPARRAT, M.; GASONI, L. (2019). Carbon-substrate utilization profiles by *Cladorrhinum* (Ascomycota). *Rev. Argent. Microbiol.* 2019. 51(4):302-306.
- [6] BARRERA, V.; IANNONE, L.; ROMERO, A.; CHAVERRI, P. (2021). Expanding the *Trichoderma harzianum* species complex: Three new species from Argentine natural and cultivated ecosystems. *Mycologia* vol. 113. DOI: 10.1080/00275514.2021.1947641
- [7] CARMARÁN, C.; BERRETTA, M.; MARTÍNEZ, S.; BARRERA, V.; MUNAUT, F.; GASONI, L. (2015). Species diversity of *Cladorrhinum* in Argentina and description of a new species, *Cladorrhinum australe*. *Mycol. Prog.* 14:94. <http://dx.doi.org/10.1007/s11557-015-1106-3>
- [8] COZZI, J.; GASONI, L. (1995). Producción de biomasa de *Trichoderma harzianum* en distintos medios y condiciones de cultivo. VII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. XIV Congreso Venezolano de Fitopatología. I Congreso Venezolano de Micología. Facultad de Ciencias Forestales. Univ. de Los Andes. Mérida. (Venezuela). 27 p.
- [9] COZZI, J.; GASONI, L. (1997). Temporal relationships of inoculum formulation to density, viability and biocontrol effectiveness of *Trichoderma harzianum*. Proceedings of the Fourth International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Sapporo, Japón. 468-471 pp.
- [10] GASONI, L.; STEGMAN DE GURFINKEL, B.; FORTUGNO, C. (1993). Suppression of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* through a nonpathogenic sterile septate fungus. *J. Plant Dis. Prot.* 100 (5):467-473.
- [11] GASONI, L. (1994). El complejo *Rhizoctonia* en la Argentina: Distribución, Patogenicidad y Biocontrol. Tesis doctoral en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA).
- [12] GASONI, L. (1994). Actividad celulolítica de *Cladorrhinum foecundissimum*, agente biocontrolador de *Rhizoctonia solani*. IV Siconbiol (4.º Simposio de Control Biológico), Centro de Pesquisa Agropecuaria de Clima Temperado (CPACT) de Embrapa, Gramado (Brasil). 16 p.
- [13] GASONI, L.; STEGMAN DE GURFINKEL, B. (1997). The endophyte *Cladorrhinum foecundissimum* in cotton roots. Effects on phosphorus uptake and host grow. *Mycol. Res.* 101 (7):867-870.
- [14] GASONI, L.; COZZI, J.; KOBAYASHI, K. (1998). Survival of potential biocontrol bacteria in various formulations and their ability to reduce radish damping-off caused by *Rhizoctonia solani*. *J. Plant Dis. Prot.* 105 (1): 41-48.
- [15] GASONI, L.; COZZI, J.; KOBAYASHI, K.; YOSSEN, V.; ZUMELZÚ, G.; BABBITT, S.; KAHN, N. (2001). Yield response of lettuce and potato to bacterial and fungal inoculants under field conditions in Córdoba (Argentina). *J. Plant Dis. Prot.* 108 (5):530-535.
- [16] GASONI, L.; KAHN, N.; YOSSEN, V.; COZZI, J.; KOBAYASHI, K.; BABBITT, S.; BARRERA, V.; ZUMELZÚ, G. (2008). Effect of Soil Solarization and Biocontrol Agents on Plant Stand and Yield on Table Beet in Córdoba (Argentina). *Crop Prot.* 27: 337-342.
- [17] GASONI, L.; KAHN, N.; YOKOHAMA, K.; CHIESSA, G.; KOBAYASHI, K. (2008). Impact of *Trichoderma* biocontrol agent on functional diversity of soil microbial community in tobacco monoculture system in Argentina. *World Journal of Agricultural Sciences (WJAS)* 4 (5): 527-532.
- [18] GASONI, L.; STEGMAN DE GURFINKEL, B. (2009). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* by the endophytic fungus *Cladorrhinum foecundissimum* in cotton plants. *Australas. Plant Pathol.* 38:389-391.
- [19] KOBAYASHI, K.; GASONI, L.; VICARIO, A.; COZZI, J. 1999. Suppressiveness of antagonistic bacteria and metabolites on a pathogenic *Rhizoctonia solani* strain. Increased production in a specific medium. *Revista de Investigaciones Agropecuarias (RIA)* 29 (2):63-76. INTA. Buenos Aires, Argentina.
- [20] MARTÍN, M.; ROJO, R.; BARRERA, V.; GASONI, L.; SAPARRAT, M. (2015). Evaluación in vitro del potencial antagonístico de aislamientos nativos de *Cladorrhinum* frente a fitopatógenos III Congreso Argentino de Agricultura y Microbiología Ambiental Argentina (CAMAYA). Auditorio de la Facultad de Ciencias Agrícolas-UCA-Palermo, Buenos Aires, Argentina. 25-27 pp.
- [21] MARTÍN, M.; GASONI, L.; SAPARRAT, M.; BARRERA, V. (2016). Actividad celulolítica en aislamientos de *Cladorrhinum* sp. VIII Congreso Brasileño de Micología, Universidad Federal de Santa Catarina, Trindade, Florianópolis, Brasil. 693 p.
- [22] MARTÍN, M. (2019). Caracterización de aislamientos nativos de hongos del género *Cladorrhinum* y su potencial como agentes antagonistas y promotores del crecimiento vegetal. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, (UBA).
- [23] MARTÍN, M.; BARRERA, V.; SAPARRAT, M.; GASONI, L. (2019). Mini-review: *Cladorrhinum* species, their diversity and application in biotechnology. *Nova Hedwigia.* (108) issue 3-4 :489-503.
- [24] MELIGNANI, E.; LEVIN, L.; GUIDOBONO, J. S.; BARRERA, V. (2018a). Evaluación de antagonismo en aislamientos nativos del género *Laetisaria* Burds. (Corticaceae, Basidiomycota). IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Mar del Plata, Argentina.
- [25] MELIGNANI, E.; BARRERA, V.; GUIDOBONO, J. S.; LEVIN, L. (2018b). Evaluación de la acción quitinolítica en aislamientos nativos del género *Laetisaria* Burds. (Corticaceae, Basidiomycota). IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental Mar del Plata, Argentina. (Disponible: https://panel.aam.org.ar/img_up/07112022.2.pdf verificado: septiembre de 2022).
- [26] NELSON, N.A. (1994). Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153(2): 375-380.
- [27] PALMER, W.; HEARD, T.; SHEPPARD, A. 2010. A review of Australian classical biological control of weeds programs and research activities over the past 12 years. *Biol. Control.* 52(3): 271-287.
- [28] SENASA. (2019). Listado de agentes de control biológico exóticos evaluados en el país. (Disponible: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/listado_actualizado_a_junio_de_2019.docx verificado: septiembre de 2022).

- [29] SOMOGYI M. (1945). A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* 1945 160(1): 61-68.
- [30] STEGMAN DE GURFINKEL, B.; GASONI, L. (1994). Efecto de un Endófito y de un fungicida Selectivo en el Control de *Rhizoctonia solani*. Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Santiago de Chile, Chile. 50 p.
- [31] STENBERG, J.; SUNDHBECHER, I.; BJÖRKMAN, C.; DUBEY, M.; EGAN, P.; VIKETOFT, M. (2021). When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *J. Pest Sci.* 94(3): 665-676. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01354-7>
- [32] TAURIAN, T.; ANZUAY, M. S.; ANGELINI, J. G.; TONELLI, M. L.; LUDUEÑA, L.; PENA, D.; FABRA, A. (2010). Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. *Plant and Soil.* 329 (1): 421-431. <https://doi.org/10.1007/s1104-009-0168-s>
- [33] VINALE, F.; CHIESSA, G.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.; MARRA, R.; CONTE, P.; PICCOLO, V.; ALOJ, D.; TURRÀ, D.; LANZUISE, S.; RUOCCO, M.; WOO, S.; LORITO, M. (2007). Antibiotic and plant growth promotion activity of *Trichoderma koniginins*. xiv Congresso SIPAV (Società Italiana di Patologia Vegetale). Perugia, Italia. 100 p.
- [34] WRIGHT, E.; ZAPATA, R.; RIVERA, M.; PALMUCCI, H.; LÓPEZ, M.; FABRIZIO, M.; BABBITT, S.; CHEHEID, A.; PINTO, R.; GASONI, L.; COZZI, J.; ESCANDE, A. (1999). Use of antagonists and organic amendments for the control of soilborne plant pathogens in horticultural crops. *Fitopatología* 34 (2):61-62 pp.
- [35] YOSSEN, V.; ZUMELZU, G.; GASONI, L.; KOBAYASHI, K. (2008). Effect of soil reductive sterilisation on *Fusarium* wilt in greenhouse carnation in Córdoba, Argentina. *Australas. Plant Pathol* 37(5): 520-522 pp.
- [36] YOSSEN, V.; ROJO, R.; BARRERA, V.; CHIESSA, G.; ZUMELZU, G.; COZZI, J.; KOBAYASHI, K.; GASONI, L. (2011). Effect of green manure and biocontrol agents on potato crops in Córdoba, Argentina. *Journal of Plant Pathology* 93 (3): 713-717.
- [37] ZAPIOLA, J.; BARRERA, V.; ROJO, R.; CHIESSA, G.; COZZI, J.; GASONI, L. (2012). Effect of different carriers on the shelf-life of *Trichoderma harzianum* formulations. En: Satinder Kar Brar (ed.). *Biocontrol: Management, Processes and Challenges*. Nova Science Publishers Biocontrol: Management, Processes and Challenges. Canadá. 1-18 pp.