



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Programa Oficial de Doctorado en Investigación Agraria y Forestal

Tesis Doctoral

**SUELOS SUPRESIVOS: CAPACIDAD BIOPESTICIDA CONTRA
Phytophthora palmivora EN Olea europea L.**



**SUELOS SUPRESIVOS: CAPACIDAD BIOPESTICIDA CONTRA
Phytophthora palmivora EN Olea europea L.**

María Sol
ROSSI

2016

María Sol ROSSI

Junio 2016



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Programa Oficial de Doctorado en Investigación Agraria y Forestal

Tesis Doctoral

SUELOS SUPRESIVOS: CAPACIDAD BIOPESTICIDA CONTRA

***Phytophthora palmivora* EN *Olea europea*, L.**

María Sol Rossi

Junio 2016



D. Jorge PAZ FERREIRO, Profesor Contratado en la School of Civil, Environmental and Chemical Engineering del Royal Melbourne Institute of Technology (RMIT) University, Australia

CERTIFICA

Que la presente memoria titulada “**Suelos supresivos: capacidad biopesticida contra *Phytophthora Palmivora* en *Olea Europea, L.*”**, que para optar al grado de Doctor por la Universidade da Coruña presenta **Dña. María Sol ROSSI**, ha sido realizada bajo mi dirección y supervisión dentro del Programa Oficial de Doctorado en Investigación Agraria y Forestal.

Considerando que constituye trabajo de Tesis Doctoral, autorizo su presentación.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en A Coruña, a 2 de junio de 2016.

Fdo.: Jorge Paz Ferreiro

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Ciencias de la Universidad Da Corunha, España. Muy especialmente al Dr. Antonio Paz-González por su amabilidad, apoyo académico y orientación para la realización de esta Tesis Doctoral y al Dr. Jorge Paz-Ferreiro por realizar amablemente la dirección de mi trabajo.

Al Dr. Rodolfo Mon del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria por brindarme su experiencia tecnológica en Edafología, su apoyo y visión de superación y por haberme incluido como investigadora participante en su Proyecto Específico de Investigación intitulado *Descompactación de suelos bajo siembra directa con enmienda profunda de yeso*. A la Dra. Beatriz Pérez por su gentileza y amabilidad al incluirme como investigadora participante en el Proyecto intitulado *Manejo integrado de plagas y enfermedades en frutales*. Ambos proyectos de interés prioritario para el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Agradezco a la Escuela de Posgrado de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por brindarme infraestructura y apoyo académico. Muy especialmente a la Dra. Ana Ahedo directora de la Maestría de la Universidad de Buenos Aires por el apoyo brindado durante la realización de mi tesis para optar al título de Magister Scientiae en Data Mining and Knowledge Discovery.

Agradezco a la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de General San Martín por conformar una currícula específica dentro del área de la Microbiología en Argentina y al Instituto Nacional de Microbiología Carlos G. Malbrán donde opté al título de Magister Scientiae en Microbiología Molecular.

RESUMEN

Esta investigación focalizó su interés sobre el olivo por su trascendente valor productivo y comercial dentro de los cultivos no convencionales en Argentina. En plantaciones de olivos se observó un síndrome de desecación, amarillez, defoliaciones, pérdidas de vigor en raíces, pudrición y muerte denominada seca de olivos. En todos los casos estudiados se halló involucrado al patógeno *P. palmivora*. En Argentina, en las últimas décadas se observó el aumento de la incidencia de esta enfermedad y no existe aún un método de control eficaz. El objetivo fue estudiar los suelos de olivares y caracterizar bacterias cultivables constitutivas de la microbiota del suelo rizosférico de olivo para hallar un método de control biológico eficiente y agrosustentable. Como resultados se obtuvieron 452 bacterias a partir de suelo rizosférico de olivo. Entre éstas se hallaron 63 bacterias termorresistentes de las cuales una de ellas fue caracterizada por su eficiente actividad antifúngica, identificada y depositada en GenBank bajo el número de acceso KJ464036. Esta bacteria perteneciente al género *Bacillus* fue capaz de controlar el desarrollo del patógeno *P. palmivora* en un 87,5 % in vitro y en un 84,8 % in vivo. El mecanismo de supresividad involucrado encontrado hasta el momento fue la producción de la enzima β -1,3-glucanasa bacteriana con actividad micolítica. *P. palmivora* mostró un efecto deletéreo sobre las plantas observado a través de un elevado porcentaje de plantas sintomáticas a los 50 d.p.i, presencia de amarillez y desecación en hojas y raíz. En presencia de *P. palmivora* el bioformulado experimental con 10^9 UFC.gss⁻¹ ejerció control sobre el hongo, reflejado en ausencia de síntomas y en un mejor crecimiento vegetal. La acción benéfica de *Bacillus KJ464036* estuvo influida por el patógeno *P. palmivora*. La interacción microorganismo-planta ofrece una estrategia prometedora y ambientalmente amigable para la agricultura convencional y orgánica en todo el mundo.

Palabras clave: *Phytophthora palmivora*, *Olea europaea* L., *Bacillus KJ464036*, biopesticida

RESUMO

Esta investigación centra o seu interese sobre a oliveira polo seu transcendente valor produtivo e comercial dentro dos cultivos non convencionais en Arxentina. En plantacións de oliveiras observáronse síndromes de desecado, amarelado, perda de follas e de vigor en raíces, podremia e morte que foron denominados seca de oliveiras. En todos os casos estudados achouse involucrado o patóxeno *P. palmivora*. En Arxentina, nas últimas décadas observouse o aumento da incidencia desta enfermidade e non existe aínda un método de control eficaz. O obxectivo foi estudar os chans de oliveirais e caracterizar bacterias cultivables constitutivas da microbiota do solo rizosférico de oliveira para atopar un método de control biolóxico eficiente e agrosustentable. Como resultados obtivéronse 452 bacterias a partir de solo rizosférico de oliveira. Entre estas acháronse 63 bacterias termorresistentes das cales una delas foi caracterizada pola súa eficiente actividade antifúngica, identificada e depositada en GenBank baixo o número de acceso KJ464036. Esta bacteria pertencente ao xénero *Bacillus* foi capaz de controlar o desenvolvemento do patóxeno *P. palmivora* nun 87,5 % in vitro e nun 84,8 % in vivo. O mecanismo de supresividade involucrado atopado até o momento foi a produción da encima β -1,3-glucanasa bacteriana con actividade micolítica. *P. palmivora* mostrou un efecto deletéreo sobre as plantas observado a través dunha elevada porcentaxe de plantas sintomáticas aos 50 d.p.i, presenza de amarelado e desecado en follas e raíz. En presenza de *P. palmivora* o bioformulado experimental con 109 UFC.gss^{-1} exerceu control sobre o fungo, o que tivo reflexo na ausencia de síntomas e nun mellor crecemento vexetal. A acción benéfica de *Bacillus KJ464036* estivo influída polo patóxeno *P. palmivora*. A interacción microorganismo-planta ofrece unha estratexia prometedora e ambientalmente amigable para a agricultura convencional e orgánica en todo o mundo.

Palabras chave: *Phytophthora palmivora*, *Olea europaea* L., *Bacillus KJ464036*, pesticida biolóxico.

ABSTRACT

This research focuses its interest in the olive tree because of its transcendent production and commercial value offered within the unconventional crops in Argentina. In the plantings of olive trees it was observed a drying syndrome, yellowing, defoliation, loss of vigor in roots, rot and death called drying of olive trees. In all the studied cases the pathogen *P. palmivora* was associated. In Argentina, in the last decades the increased incidence of this disease was observed and there is still no effective method of control. The objective was to study olive tree soils and to characterize cultivable bacteria constitutive of the microbiota of olive rhizosphere soil to find a method of efficient and agro-sustainable biological control. As a result, 452 bacteria from olive rhizosphere soil were obtained. Among these, there were 63 thermo-resistant bacteria one of which was characterized by its efficient antifungal activity, identified and deposited in GenBank under the access number KJ464036. This bacterium belonging to the *Bacillus* genus was able to control the development of the pathogen *P. palmivora* in 87.5 % in vitro and 84.8 % in vivo. The involved suppressive mechanism found so far was the production of β -1.3-glucanase bacterial enzyme with mycolic activity. *P. palmivora* showed a deleterious effect on plants observed through a high percentage of symptomatic plants at 50 dpi, the presence of yellowing and drying in leaves and roots. In the presence of *P. palmivora*, the experimental bio-solution with 10^9 UFC.gss⁻¹ exerted control over the fungus reflected in the absence of symptoms and a better plant growth. The beneficial action of *Bacillus KJ464036* was influenced by the pathogen *P. palmivora*. The microorganism-plant interaction offers a promising and environmentally friendly strategy for conventional and organic agriculture worldwide.

Key words: *Phytophthora palmivora*, *Olea europaea* L., *Bacillus KJ464036*, Biological fungicide

ABREVIATURAS

ACP: Análisis de Componentes Principales.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AN: medio de cultivo nutritivo agarizado.

AWCD: media del color desarrollado por densitometría óptica (Average well-color development).

CAS: medio de cultivo azul agarizado (Chrome azurol S).

CLPPs: Perfiles fisiológicos a nivel de comunidad (Community Level Physiological Profiles).

Cmic: Carbono proveniente de biomasa microbiana.

COI: Consejo Oleícola Internacional.

Corg: Carbono proveniente de la materia orgánica del suelo.

C-CO: Carbono total del suelo.

DMRT: test de rango múltiple de Duncan (Duncan's Multiple Range Test).

DO: Densidad óptica.

d.p.i.: Días post-infestación.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EPA: Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

GPS: Sistema de Posicionamiento Global.

INPI: Instituto Nacional de la Propiedad Intelectual.

ITS: región de RNA no funcional situada entre RNA ribosomal estructural (rRNA) sobre un transcrito precursor común (Internal Transcribed Spacer).

MOS: Materia orgánica del suelo.

NOA: Región del Noroeste Argentino.

OEPP: Organización Europea y Mediterránea para la Protección de Plantas.

P: valor de probabilidad de un test estadístico.

PBI: Producto Bruto Interno.

PCR: Reacción en cadena de la enzima DNA polimerasa (Polimerase chain reaction).

PGPB: Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant Growth Promoting Bacteria).

PGPF: Hongos promotores del crecimiento vegetal (Plant Growth-Promoting Fungi).

PGPR: Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant Growth Promoting

Rhizobacteria).

PGPY: Levaduras promotoras del crecimiento vegetal (Plant Growth-Promoting Yeast).

POA: Región de la Pampa Ondulada Argentina.

pNP: para-Nitro-Fenol.

pNPP: para-Nitro-Fenil-Fosfato.

RES: Respiración basal del suelo.

SAGPyA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos.

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.

TBR: Bisección y reconexión del árbol (Tree Bisection and Reconnection).

TAE: Tris ácido acético.

TSA: medio de cultivo agarizado con Tripteína de soya.

THAM: Tris-hidroxi-metil-aminometano.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

V8-PARPNH: medio de cultivo específico para el desarrollo de *Phytophthora sp*

ÍNDICE

CAPÍTULO 1	2
1. Introducción	2
<i>1.1. El cultivo del olivo en Argentina</i>	3
1.1.1 Enfermedades del olivo en Argentina causadas por patógenos fúngicos	6
1.1.2. Patologías del olivo causadas por Phytophthora spp.	7
1.1.3. Patogenia de Phytophthora spp. en olivo.....	7
1.1.4. Phytophthora spp. en el mundo	9
1.1.5. Phytophthora palmivora en Argentina	10
<i>1.2. Fundamentación Teórica</i>	11
1.2.1. Importancia del Problema de Estudio	11
1.2.2. Definición del Problema Científico	11
1.2.2.1. El Patosistema de Estudio.....	11
<i>1.3. Hipótesis y Objetivos</i>	12
1.3.1. Hipótesis Generales	12
1.3.2. Hipótesis Específicas	12
1.3.3. Objetivos Generales.....	12
1.3.4. Objetivos Específicos.....	13
1.3.4.1. Caracterizar el panorama sanitario de los olivares	13
1.3.4.2. Caracterizar el suelo de olivares desde un punto de vista fisicoquímico, biológico y bioquímico	13
1.3.4.3. Obtener bacterias formadoras de esporas capaces de inhibir el desarrollo de P. palmivora	14
1.3.4.4. Estudiar los mecanismos de supervivencia involucrados en la actividad antagonista	14
1.3.4.5. Realizar una formulación preliminar de un biopesticida experimental	15
CAPÍTULO 2	17
2. Suelos de olivares	17
<i>2.1. Suelos estudiados</i>	17
2.1.1. Aimogasta	18
2.1.1.1. Clima.....	18
2.1.1.2. Vegetación.....	20
2.1.2. Castelar	20
2.1.2.1. Clima.....	20
2.1.2.2. Vegetación.....	21
<i>2.2. Materiales y Métodos</i>	21

2.2.1. Diseño experimental	21
2.2.2. Análisis estadísticos	22
2.2.3. Caracterización del monitoreo sanitario de los olivares	23
2.2.4. Caracterización fisicoquímica de los suelos	23
2.2.4.1. Sitio LR	23
2.2.4.2. Sitio BA	23
2.2.5. Caracterización bioquímica y biológica de los suelos de olivares.....	24
2.2.5.1. Evaluación de la actividad biológica global	24
2.2.5.2. Evaluación del carbono proveniente de la biomasa microbiana.....	24
2.2.5.3. Evaluación del contenido de materia orgánica del suelo	26
2.2.5.4. Determinación de la actividad de la enzima catalasa	26
2.2.5.5. Determinación de la actividad de la enzima deshidrogenasa	28
2.2.5.6. Determinación de la actividad de la enzima fosfomonoesterasa	29
2.2.5.7. Determinación de la actividad de la enzima fosfodiesterasa	30
2.2.5.8. Determinación de la actividad de la enzima ureasa.....	31
2.2.5.9. Determinación de la actividad de la enzima β -glucosidasa	32
2.2.5.10. Análisis del perfil funcional del suelo a nivel de comunidades bacterianas	33
2.3. <i>Resultados</i>	33
2.3.1. Descripción de los sitios de muestreo.....	33
2.3.2. Caracterización del monitoreo sanitario de los olivares	34
2.3.3. Manejo de olivares en Aimogasta.....	36
2.3.4. Caracterización fisicoquímica y biológica de suelos de los olivares	49
2.3.5. Caracterización bioquímica de suelos de los olivares	53
2.4. <i>Discusión</i>	58
2.5. <i>Conclusión</i>	68

CAPÍTULO 3	70
3. Aislamientos bacterianos	70
3.1. <i>Biodiversidad en suelos supresivos</i>	70
3.1.1. Suelos supresivos.....	71
3.1.2. Origen de la supresividad	72
3.1.3. Suelos supresivos en el mundo	72
3.1.4. Suelos supresivos en Argentina	73
3.2. <i>Materiales y Métodos</i>	75
3.2.1. Muestreo de suelo rizosférico	75
3.2.2. Análisis estadísticos	75
3.2.3. Aislamientos de cepas bacterianas.....	75
3.2.4. Caracterización macroscópica	76
3.2.5. Caracterización microscópica	76
3.2.6. Actividad antifúngica.....	76
3.2.7. Condiciones de cultivo y conservación de las cepas bacterianas	77
3.2.8. Caracterización bioquímica de las cepas bacterianas	77

3.2.8.1. Reacción de Gram (G).....	78
3.2.8.2. Hidrólisis del almidón (Am).....	78
3.2.8.3. Determinación Voges Proskauer (VP).....	78
3.2.8.4. Contenido de la espora (E).....	79
3.2.8.5. Observación de morfología celular (M).....	79
3.2.8.6. Fermentación de citrato (Ci).....	79
3.2.8.7. Desarrollo en NaCl 6,5 %.....	79
3.2.8.8. Presencia de enzima catalasa.....	80
3.2.8.9. Fermentación de manitol.....	80
3.2.8.10. Producción de antibióticos.....	80
3.2.8.11. Resistencia a antibióticos.....	81
3.2.9. Desarrollo de olivo bajo el efecto de Bacillus B31.....	81
3.2.10. Caracterización molecular de las cepas bacterianas.....	82
3.2.10.1. Identificación molecular bacteriana.....	82
3.2.10.2. Secuenciación del rDNA 16S de B31 como PGPR.....	82
3.2.10.3. Construcción del árbol filogenético.....	83
3.3. <i>Resultados</i>	83
3.3.1. Muestreo de suelos.....	84
3.3.2. Obtención de cepas bacterianas.....	85
3.3.3. Caracterización bioquímica de las cepas bacterianas.....	85
3.3.4. Producción de antibióticos y Resistencia a antibióticos.....	88
3.3.5. Actividad antifúngica.....	88
3.3.5. Selección de cepas positivas para la promoción del crecimiento vegetal por mecanismos indirectos.....	90
3.3.7. Evaluación antagonista frente a fitopatógenos in vitro.....	90
3.3.8. Identificación molecular de la bacteria Bacillus B31.....	94
3.3.9. Análisis filogenético de Bacillus B31.....	95
3.4. <i>Discusión</i>	98
3.5. <i>Conclusión</i>	101

CAPÍTULO 4..... 103

4. Mecanismos de supresividad..... 103

4.1. Las PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) y las PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria)..... 104

4.1.1. Mecanismos de la supresividad natural del suelo..... 105

4.1.1.1. Antibiosis..... 107

4.1.1.2. Producción de enzimas líticas..... 108

4.1.1.3. Producción de sideróforos..... 109

4.1.2. Metodologías de estudio de la supresividad natural del suelo..... 110

4.2. Materiales y Métodos..... 111

4.2.1. Análisis estadísticos..... 111

4.2.2. Crecimiento de los cultivos bacterianos antagonistas y preparación del extracto enzimático..... 111

4.2.2.1. Condiciones y medios de desarrollo	111
4.2.2.2. Evaluación de la producción de β -1,3-glucanasas bacterianas en presencia y en ausencia del patógeno	112
4.2.2.3. Evaluación de la producción de β -1,4-glucanasas bacterianas en presencia y en ausencia del patógeno	112
4.2.2.4. Evaluación de la producción de lipasas bacterianas en presencia y en ausencia del patógeno	112
4.2.3. Evaluación de la producción de sideróforos bacterianos.....	113
4.3. Resultados	113
4.3.1. Crecimiento de los cultivos bacterianos antagonistas y preparación del extracto enzimático.....	114
4.3.2. Evaluación de la producción de β -1,3-glucanasas bacterianas en presencia y en ausencia del patógeno	114
4.3.3. Evaluación de la producción de β -1,4-glucanasas bacterianas en presencia y en ausencia del patógeno	115
4.3.4. Evaluación de la producción de lipasas bacterianas en presencia y en ausencia del patógeno.....	116
4.3.5. Evaluación de la producción de sideróforos bacterianos.....	117
4.4. Discusión	119
4.5. Conclusión	122

CAPÍTULO 5

5. Biopesticidas

5.1. Biopesticidas en la Agricultura Sustentable	124
5.1.1. Regulación del uso de plaguicidas en Europa	128
5.1.2. Regulación del uso de plaguicidas en Argentina	129
5.2. Materiales y Métodos	130
5.2.1. Análisis estadísticos	130
5.2.2. Evaluación preliminar de la eficiencia del bioformulado experimental	131
5.2.2.1. Preparación del inóculo fúngico	131
5.2.2.2. Preparación del soporte.....	131
5.2.2.3. Postulados de Köch.....	132
5.2.2.4. Evaluación de la presencia del patógeno sobre las comunidades bacterianas rizosféricas de olivo en suelo natural.....	132
5.3. Resultados	132
5.3.1. Ensayo de patogenicidad de <i>P. palmivora</i> en olivo.....	133
5.3.1.1. Análisis de la biomasa fresca aérea	137
5.3.1.2. Análisis de la biomasa seca aérea	138
5.3.1.3. Análisis de la biomasa fresca radical	138
5.3.1.4. Análisis de la biomasa seca radical.....	139
5.3.2. Ensayo de biocontrol de <i>P. palmivora</i> con <i>Bacillus</i> KJ464036	139
5.3.2.1. Análisis cualitativo de síntomas a causa de <i>P. palmivora</i>	141
5.3.2.2. Análisis del crecimiento longitudinal aéreo.....	142

5.3.2.3. Análisis del crecimiento longitudinal radical	144
5.3.2.4. Análisis de la biomasa fresca aérea	145
5.3.2.4. Análisis de biomasa seca aérea	146
5.3.2.6. Análisis de la biomasa fresca radical	147
5.3.2.7. Análisis de la biomasa seca radical.....	147
5.3.3. Evaluación de la presencia del patógeno sobre las comunidades bacterianas del suelo natural	148
5.3.3.1. Análisis estadísticos	148
5.4. <i>Discusión</i>	152
5.5. <i>Conclusión</i>	157
CAPÍTULO 6	159
6. Discusión General	159
6.1. <i>Primera Hipótesis General: Relaciones entre la sanidad del olivo y las características del suelo</i>	160
6.2. <i>Segunda Hipótesis General: Relaciones entre la actividad antagonista y la eficiencia de una alternativa de control</i>	161
CHAPTER 7	185
7. Conclusions, Prospects and New Hypotheses	185
7.1. <i>General Conclusion</i>	186
7.2. <i>New Hypotheses</i>	188
BIBLIOGRAFÍA	189
ANEXOS	216

CAPÍTULO 1

**“Porque Después De Todo He Comprendido
Que Lo Que el Árbol Tiene De Florido
Vive De Lo Que Tiene Sepultado”**

Francisco Luis Bernárdez (1900-1978)

CAPÍTULO 1

1. Introducción

El Banco Mundial sobre la base de estadísticas elaboradas por ONU informa el rango por países de superficie cultivada. La Fig. 1.1. muestra los primeros 18 países del rango que tienen suelos cultivados por más de 17 millones de hectáreas cada uno. Esos países totalizan 972.786.000 hectáreas, el 70,4 % del total mundial. Entre los cuales, Argentina representa el 2,2 % del área cultivada mundial y ocupa el décimo lugar en dicho rango.

La cantidad de suelos cultivados en el planeta es de 1.381.000.000 hectáreas (13.800.000 km²). En este sentido el algoritmo utilizado en la visualización de datos de la Fig. 1.1. permite discriminar por color, en un rango de verde claro al oscuro, el orden en el rango de los países con suelos cultivados en más de 17 millones de hectáreas. El color más claro representa los países con mayor cantidad de hectáreas cultivadas.

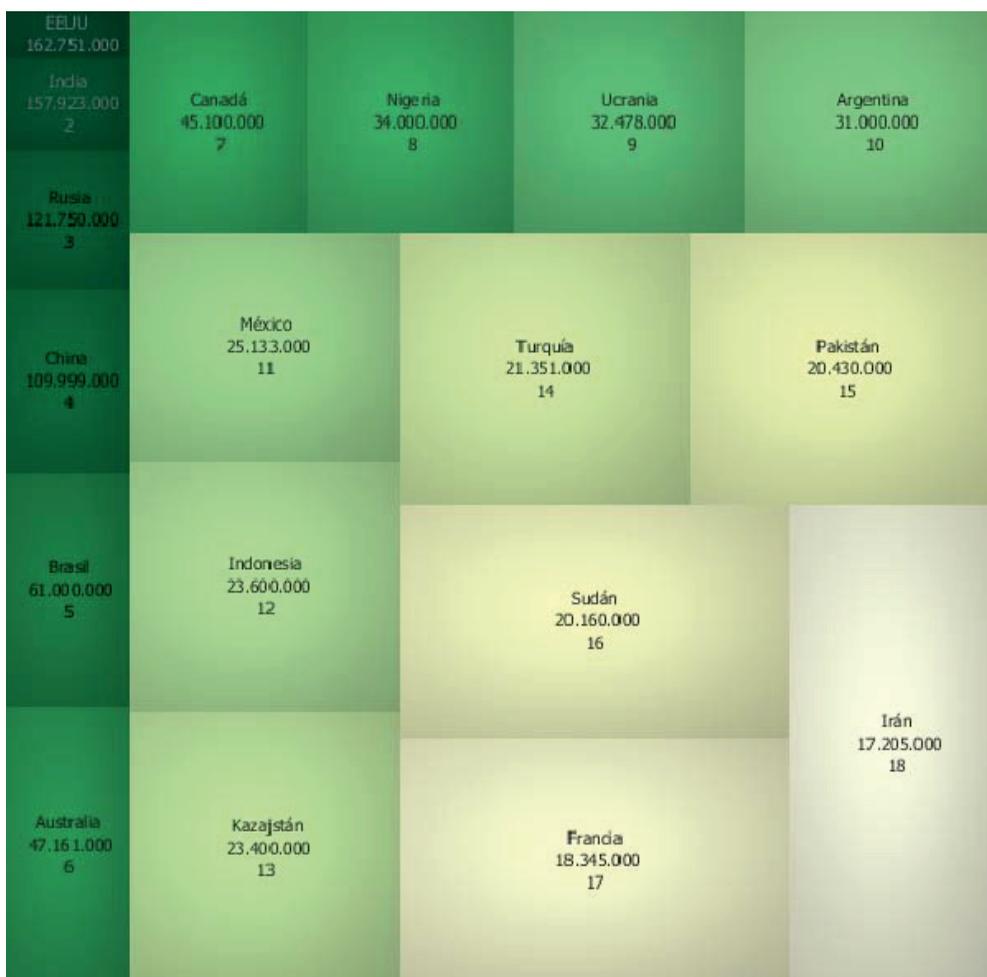


Figura 1.1. Países con suelos cultivados en más de 17 millones de hectáreas cada uno

1.1. El cultivo del olivo en Argentina

La producción del olivo en Argentina comenzó en la década de 1930 debido a que el comercio con España, su principal abastecedor, se vio afectado por la Guerra Civil. Para asegurar el normal abastecimiento el gobierno argentino tomó la iniciativa de promocionar el sector olivícola. En 1965 Argentina contaba con más de 4.600.000 plantas manejadas en forma tradicional y sin tecnologías adecuadas según lo publicado por Cáceres *et al.*, (2009).

En la década de 1970 el aumento del consumo de aceite mezcla de girasol y maíz determinó que el mercado de aceite de oliva perdiera actividad, por lo cual se eliminaron plantaciones en forma masiva. Por otra parte, las progresivas sequías registradas en la Cuenca del Mediterráneo, los cambios en los hábitos de consumo y la promoción de la actividad económica argentina a partir de diferimientos impositivos condujeron a que la producción de

aceite de oliva se encontrara nuevamente en expansión.

Actualmente Argentina es el séptimo productor mundial de aceitunas de mesa y es el décimo productor mundial de aceite de oliva. En 2012 ambos productos generaron exportaciones por más de 30.000.000 de dólares según Ladux *et al.*, (2012). Acorde con lo expresado, el cultivo del olivo ocupa 87.000 mil hectáreas en el país con una producción promedio de 100.000 toneladas de aceitunas y 25.000 toneladas de aceite de oliva. En tanto, sus productos y subproductos constituyen el 1 % de la producción mundial y en total aportan 185.000.000 de dólares por año a la producción nacional. Empero, a pesar de encontrarse en plena expansión de superficie productiva existen pocos estudios específicos sobre la sanidad del olivo en Argentina.

Según el Censo Nacional Agropecuario de 2012 del total de producción las provincias con mayor superficie son Catamarca, La Rioja, Mendoza y San Juan, aunque también existen plantaciones de olivo en Córdoba, Buenos Aires y Salta. El 65 % corresponde a plantaciones con destino aceite y el 33 % a aceituna en conserva. Como resultado de las producciones tradicionales, de los diferimientos impositivos, y de estas inversiones, la superficie en 2012 de las principales provincias productoras fue de 87.650 hectáreas, como se muestra en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1 Superficie cultivada con olivo en las principales provincias productoras en Argentina

Provincias	Superficie (hectáreas)
Catamarca	24500
La Rioja	20500
San Juan	19500
Mendoza	15500
Córdoba	3000
Buenos Aires	3000
Salta	1650
Total	87650

Según datos del Consejo Oleícola Internacional (COI) el consumo promedio nacional fue de 15.000 toneladas anuales y en el caso del aceite de oliva, fue de 5.420 toneladas por año.

En Catamarca la producción olivícola es muy reciente. La edad de las plantaciones promedia los 10 años y es la principal productora de aceite de oliva de Argentina. La producción se localiza en las regiones del Valle Central (Capayán y Valle Viejo), el Bolsón de Pipanaco (Pomán) y las zonas de altura (Tinogasta). Alrededor del 80 % de las variedades cultivadas son aceiteras, entre las que se destacan Arbequina, Frantoio, Barnea y Coratina. El 20 % restante corresponde a las de doble propósito, como Manzanilla y Empeltre.

En tanto en la provincia de La Rioja la olivicultura se desarrolla principalmente en el departamento de Arauco. La principal variedad es Arauco con 70 % de la superficie cultivada, mientras que el 30 % restante comprende variedades aceiteras como Arbequina, Manzanilla, Frantoio, Empeltre, Picual, Barnea y Farga.

Por otra parte, en Mendoza el olivo es uno de los cultivos más destacados. Su importante eslabón industrial elabora conservas y aceites de oliva de reconocida calidad. Las principales zonas de producción se encuentran en los departamentos de Maipú, Rivadavia, Junín, San Rafael, San Martín, Lavalle y Guaymallén. Las zonas de producción se caracterizan por tener un clima semiárido con escasas precipitaciones, debiendo complementar las necesidades hídricas con diversos sistemas de riego artificial como en las demás provincias del oeste argentino. El 59 % de las aceitunas producidas se destinan a conservas, con predominio de las variedades Arauco y Manzanilla. El 41 % restante se destina a la fabricación de aceites de oliva, principalmente Arbequina, Farga, Empeltre y Frantoio.

En San Juan la olivicultura es una actividad económica de destacada importancia y tradición. El 60 % de las plantaciones corresponden a cultivos menores a los 10 años de edad relacionados con los nuevos emprendimientos diferidos, y el resto corresponde a olivares tradicionales de más de 25 años de antigüedad. El 60 % de las variedades son aceiteras tales como Arbequina, Picual, Frantoio y Empeltre, el 22 % de la producción corresponde a aceitunas de mesa de la variedad Changlot Real y el 19 % de variedades de doble propósito como Arauco y Manzanilla.

Por su parte la provincia de Córdoba, cuenta con una superficie cultivada de 3.000 hectáreas. En general, se trata de plantaciones de más de 25 años que mayormente producen conservas en salmuera y aceites de oliva orgánicos, ya que el 60 % de esta cadena de valor en la provincia se encuentra bajo certificación orgánica. Las principales variedades implantadas se reparten entre el 70 % destinado a la producción de aceite de oliva (Arbequina y Frantoio) y el 30 % destinado a la producción de conservas (Manzanilla, Arauco, Nevadillo, Farga, Empeltre y Ascolano).

En Buenos Aires, la olivicultura se desarrolla principalmente en Coronel Dorrego, donde se elabora aceite orgánico certificado para exportar en un 80 %. Por otra parte en la provincia de Salta, la olivicultura se encuentra en plena expansión.

Estados Unidos es el mayor comprador de aceite de oliva virgen, seguido por Brasil. No obstante se observó que las principales pérdidas económicas de olivos en Argentina son causadas por enfermedades.

1.1.1 Enfermedades del olivo en Argentina causadas por patógenos fúngicos

Según Oriolani y Pérez, (2008) las principales enfermedades que causan daños potenciales en el olivo en Argentina son las siguientes:

Rama seca, es una enfermedad asociada a la interacción de factores bióticos y abióticos: hongos pertenecientes a los géneros *Phytophthora*, *Pythium*, *Verticillium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Cylindrocarpon*, *Armillaria* y *Rosellinia*.

Cercosporiosis, causada por el hongo *Cercospora cladosporioides*.

Seca, quema de hoja, el agente etiológico de esta enfermedad es *Phyllosticta panizzei*.

Mancha ocular, el agente etiológico de esta enfermedad es *Spilocaea oleaginea*.

Oidio blanco, el agente etiológico de esta enfermedad es *Leveillula taurina*.

Antracnosis, el agente etiológico de esta enfermedad es *Gloesporium olivarum*.

Fumagina, los agentes etiológicos de esta enfermedad son *Capnodium aleophilum*, *Aureobasidium sp.*, *Coniothecium sp.* entre otros.

Tizón apical, los agentes etiológicos de esta enfermedad son hongos pertenecientes al género *Phomopsis*.

Escudete, el agente etiológico de esta enfermedad es *Macrophomina dalmatica*.

Verticilosis, el agente etiológico de esta enfermedad es *Verticillium dahliae*.

Pudrición basal, el agente etiológico de esta enfermedad es *Sclerotium rolfsii*.

Pudrición del cuello y de las raíces, el agente etiológico de esta enfermedad es *Phytophthora spp.*

Marchitez, los agentes etiológicos de esta enfermedad son especies del género *Fusarium spp.*

1.1.2. Patologías del olivo causadas por *Phytophthora spp.*

En España apareció un síndrome de desecación y muerte de plantones de olivo denominado seca de olivos jóvenes. Además, los casos en los que la muerte de plantones está asociada con podredumbres radicales son muy numerosos. Su principal agente causal es *Phytophthora megasperma* también afecta a las raíces de los olivos adultos, produce amarillez, defoliaciones y pérdida de vigor según lo publicado por Sánchez-Hernández *et al.*, (1998) y Guerrero-Barquero, N. (2003).

De manera semejante, en Aimogasta, La Rioja, Argentina, la incidencia de *Phytophthora spp.* apareció recientemente dando lugar a un nuevo problema fitopatológico en el olivo para el que no existe aún un método de control eficaz según lo publicó Matías, A.C. (2012).

Las especies de *Phytophthora* son principalmente patógenas de dicotiledóneas y son relativamente específicas de las plantas que parasitan. Varias especies son patógenas de plantas de considerable importancia económica. Las enfermedades en las plantas originadas por este género son difíciles de controlar químicamente, por eso como estrategia contra ellas se utiliza en algunos casos la implantación de variedades resistentes según publicaciones de Lucas, J.A. (1991) y Erwin y Ribeiro, (1996).

1.1.3. Patogenia de *Phytophthora spp.* en olivo

Phytophthora spp. requiere determinadas condiciones en el suelo para poder atacar y dañar al olivo. Principalmente los ataques se producen en suelos que mantienen cierto encharcamiento o un alto contenido de humedad durante la época de calor (temperaturas del suelo entre 15 y 25 °C). La mayoría de los daños se producen en primavera y verano después de lluvias y en suelos con drenaje lento.

Este patógeno se encuentra en el suelo en forma de estructuras de supervivencia que son las oosporas. Cuando el suelo está saturado de agua y la temperatura está entre 10 a 35 °C, las oosporas germinan produciendo esporangios que emiten zoosporas móviles. Estas últimas son capaces de nadar en el agua del suelo y son atraídas químicamente por los exudados de las raíces del olivo en las que establecen la infección.

Tras la infección se desarrolla la necrosis cortical de las raíces y ésto da lugar a un

aumento de la población del patógeno. El patógeno se desarrolla rápidamente en sucesivos ciclos de infección, produciendo nuevos esporangios y multitud de zooporas infectivas en condiciones de saturación hídrica del suelo. En condiciones controladas el factor más influyente sobre la severidad de las infecciones es la duración del período de encharcamiento del suelo.

Otros factores como temperatura, tipo de suelo, densidad del inóculo del patógeno, son poco significativas sobre la severidad de la infección. En cambio el encharcamiento del suelo estéril produce necrosis en las raíces debido a las condiciones de anoxia que originan la asfixia radical. Entonces se trata de un policiclo biológico que se origina en varias etapas tal como se muestra en la Fig. 1.2.

Las zoosporas ingresan a la planta sana susceptible por raíz y desarrollan a estado micelial. En esta etapa aparecen los síntomas sobre el cultivo. Luego el ciclo continúa en el suelo donde se liberan las oosporas. Las oosporas desarrollan a micelio y éste de nuevo produce oosporas. El micelio produce esporangios que producen zoosporas, éstas en el suelo producen el quiste que nuevamente produce oosporas según lo publicado por Sánchez *et al.*, (1998).

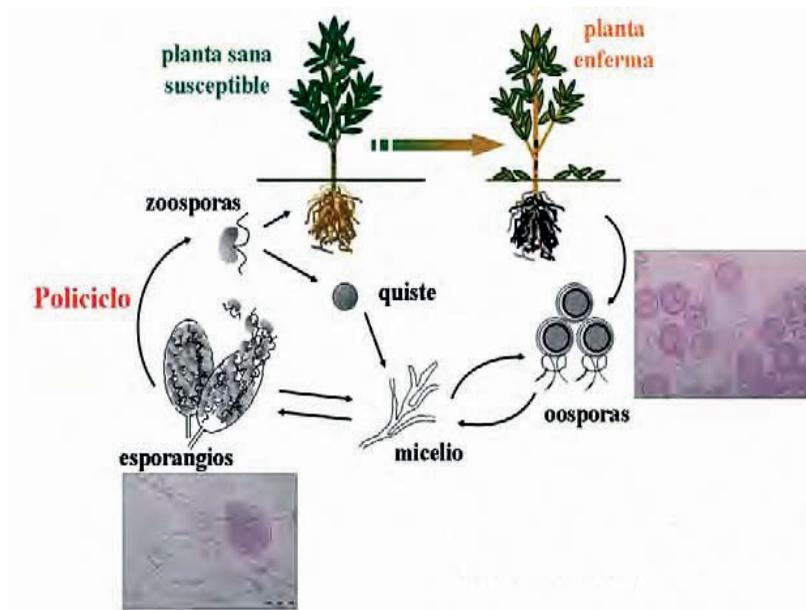


Figura 1.2.
Policiclo de
Phytophthora

spp. en olivo (Sánchez-Hernández *et al.*, 1998)

1.1.4. *Phytophthora* spp. en el mundo

En Europa se obtuvo una selección de 23 nuevos taxa a partir de bosques y ecosistemas semi-naturales de los cuales 13 fueron descritos oficialmente. Las principales razones para este descubrimiento fue una inspección a gran escala para especies provenientes del suelo en más de un millar de bosques estimulados por devastaciones de árboles, según los trabajos publicados por Jung *et al.*, (2000), Vettrano *et al.*, (2002), Jung y Blaschke (2004) y Jung y Burgess (2009).

El desarrollo de las nuevas tecnologías incrementó la disponibilidad de herramientas moleculares. Esto ayudó a descubrir nuevas especies de *Phytophthora* erróneamente identificadas como especies conocidas debido a su indistinguible morfología y fisiología tal como se observó en los trabajos de Brasier *et al.*, (2003) y Jung *et al.*, (2003).

Algunas importantes enfermedades producidas por *Phytophthora* son:

Phytophthora infestans en Estados Unidos e Irlanda *Phytophthora infestans*, causante del tizón tardío de la patata que provocó la gran hambruna de Irlanda entre 1845 y 1849 y que originó la extraordinaria emigración de irlandeses a Estados Unidos.

Phytophthora ramorum causante de la muerte súbita del roble, es un exótico patógeno vegetal que causó extensiva mortalidad en bosques costeros en California desde mediados de los 1990s, ocasionando una enfermedad de chancro fatal en robles susceptibles (*Quercus* spp.) y litocarpos (*Lithocarpus densiflorus*). El patógeno invadió adicionalmente un área pequeña al sudoeste de Oregon, y causó mortandad de litocarpos *Lithocarpus densiflorus* e infecciones sobre *Rhododendron* spp., *P. ramorum* tiene un extenso y expansible rango de hospederos de alrededor de 40 géneros de plantas, cercanos a las especies de árboles dominantes en California, perennes y bosques de secoya son potenciales hospedadores. El patógeno también causa infecciones no letales en numerosos árboles de madera dura o bosques de coníferas, sotobosques arbustivos, y plantas herbáceas según lo publicado por Fichtner *et al.*, (2009).

Phytophthora palmivora fue descrita como el agente causal de podredumbre radical de olivos en Italia donde fue aislada de árboles de olivo colapsados en la publicación de Cacciola *et al.*, (2000). En España fue confirmada como un patógeno de olivo aunque *P. megasperma* es más frecuentemente asociado con síntomas de campo según lo publicó Hernández *et al.*, (1998).

Phytophthora alni: Pudrición de las raíces en el aliso, publicado por Brasier *et al.*, (2004).

Phytophthora cactorum: Pudrición de las raíces en rododendros y azaleas, publicado por Utkhede *et al.*, (2002).

Phytophthora cinnamomi: Pudrición de las raíces en diversas especies ornamentales leñosas tal como, *Chamaecyparis* y *Forsythia*, entre otros, publicado por Jang, J C (1990).

Phytophthora fragariae: Pudrición roja en las raíces de la fresa, publicado por Valois *et al.*, (1996).

Phytophthora palmivora: Pudrición del fruto en cocotero y palma de betel, publicado por Idosu y Zentmyer (1978).

Phytophthora ramorum: Infecta a más de 60 géneros de plantas. Causa la muerte súbita del roble, publicado por Garbelotto, M. (2003).

Phytophthora quercina: Muerte en robles, publicado por Blacy y Halmschlager (2002).

Phytophthora sojae: Pudrición de las raíces en la soja, publicado por Abney *et al.*, (1994).

1.1.5. *Phytophthora palmivora* en Argentina

Según algunas publicaciones de Lucero *et al.*, (2007), Gally *et al.*, (2007), Greslebin y Hansen (2010) y Palmucci *et al.*, (2011) se describieron síntomas de nuevas enfermedades a causa del género *Phytophthora spp.* Durante la primavera del 2005 en 30 plantaciones de olivo en un rango desde 300 a 400 hectáreas. La corona de la muerte progresiva y síntomas de podredumbre radicular se registraron con una incidencia media de 3 en plantaciones de Catamarca, 50 en plantaciones de La Rioja y 10 en plantaciones de San Juan.

Una especie del género *Phytophthora spp.* se aisló a partir de raicillas podridas en medio selectivo V8-PARPNH descrito por Jung *et al.*, (1996). Éste aislamiento produjo papilas, esporangios caducos de forma variable, mayormente elípticos a ovoides, y clamidosporas, todas características típicas de *P. palmivora*. A fin de confirmar el diagnóstico morfológico se analizaron los amplicones generados por PCR mediante la utilización de primers ITS 6 e ITS 4 según lo publicó Cooke *et al.*, (2000). En este sentido, estos amplicones fueron secuenciados y se encontraron idénticos a aquellos de *P. palmivora* provenientes de la base de datos del NCBI GenBank NCBI. La patología del aislamiento de *P. palmivora* fue evaluada mediante la infestación del suelo en cámara de crecimiento a 25 °C, 15 olivos de un año de edad.

En Argentina, el patógeno *P. palmivora* fue registrado por primera vez en 1937

asociado a *Citrus spp.* No obstante, el primer aislamiento de *P. palmivora* en olivo se obtuvo en el año 2007 según lo publicado por Lucero *et al.*, (2007). Esta es la primera publicación de podredumbre radicular causada por *P. palmivora* sobre olivares registrada en este país.

1.2. Fundamentación Teórica

1.2.1. Importancia del Problema de Estudio

Esta tesis aborda una problemática sanitaria perteneciente a una microeconomía regional competente en Argentina. Definitivamente, se trata de una pequeña proporción de la superficie cultivada del país (87.650/31.000.000), 0,3 % del total de hectáreas cultivadas, que aporta 185.000.000 dólares por año al producto bruto interno (PBI) y el 1 % del total de la producción mundial. A pesar de encontrarse la olivicultura en plena expansión productiva existen pocos estudios específicos sobre la sanidad del olivo en Argentina.

Este trabajo propone contribuir a la generación de conocimiento en materia de alternativas de control de plagas dentro de un manejo agrosustentable y desde un enfoque de investigación holístico. La importancia de este trabajo reside en la búsqueda de contribuir al desarrollo de un modelo de control de *P. palmivora* en olivo, explorando la posibilidad de obtener un producto comercial de impacto agronómico, económico, político y ambiental. Para lograrlo se enfatiza en la implementación de herramientas de microbiología clásica y molecular como así también informáticas de última generación.

La técnica de aplicación del producto biológico para el control de la plaga vegetal se fundamenta en la investigación seguida de transferencia científica y tecnológica. Asimismo el presente trabajo contribuye a la generación de conocimiento en la ecología de la interacción microorganismo-planta.

1.2.2. Definición del Problema Científico

1.2.2.1. El Patosistema de Estudio

En cuanto al patosistema de estudio en esta tesis se menciona el cultivo de olivo (*Olea europaea L.*), el fitopatógeno (*Phytophthora palmivora*) y las bacterias que se obtienen como

potenciales agentes de biocontrol. Por todo lo expuesto se plantean las siguientes hipótesis con los objetivos específicos para corroborarlas en las correspondientes etapas de la tesis.

1.3. Hipótesis y Objetivos

Este trabajo parte de las siguientes hipótesis de estudio:

1.3.1. Hipótesis Generales

Una primera hipótesis establece que: *El estado de salud del olivo podría estar relacionado con las características fisicoquímicas, biológicas y bioquímicas del suelo rizosférico del olivo.*

Una segunda hipótesis establece que: *El nivel de actividad antagonista de algunas bacterias frente a patógenos vegetales puede utilizarse como alternativa de control de enfermedad con cierto grado de eficiencia.*

1.3.2. Hipótesis Específicas

En consonancia con las hipótesis generales expresadas se plantean las siguientes hipótesis específicas de estudio:

- H1: Existen bacterias formadoras de esporas que inhiben el desarrollo de *P. palmivora*.
- H2: El nivel de actividad antagonista se relaciona con la producción enzimática bacteriana.
- H3: El nivel de actividad antagonista se relaciona con la producción de sideróforos bacterianos.
- H4: Es posible elaborar un bioformulado con capacidad pesticida con cierto grado de eficiencia.
- H5: La presencia del patógeno afecta las comunidades bacterianas de la rizósfera de olivo.

1.3.3. Objetivos Generales

Con el propósito de corroborar las hipótesis expresadas anteriormente se plantean los

siguientes objetivos de trabajo:

- Estudiar los suelos de olivares y caracterizar bacterias cultivables constitutivas obtenidas del suelo rizosférico de olivo.
- Evaluar el rol de dichas bacterias como agentes benéficos en el estudio del patosistema *Olea europaea L.*, *Phytophthora palmivora*, bacterias.
- Caracterizar los mecanismos celulares intervinientes en la interacción de biocontrol.

1.3.4. Objetivos Específicos

1.3.4.1. Caracterizar el panorama sanitario de los olivares

De acuerdo con los antecedentes fitopatológicos de *Phytophthora sp.* expresados en la Introducción se plantean las siguientes evaluaciones para cumplir con el objetivo específico:

- Evaluación del panorama sanitario por *Phytophthora sp.* en Junio 2006 en dos sitios contrastantes.
- Evaluación del panorama sanitario por *Phytophthora sp.* en Junio 2010 en dos sitios contrastantes.
- Evaluación del panorama sanitario por *Phytophthora sp.* en Junio 2015 en dos sitios contrastantes.

1.3.4.2. Caracterizar el suelo de olivares desde un punto de vista fisicoquímico, biológico y bioquímico

En consonancia con lo estudiado por Bardgett y Ward (2010) acerca de las relaciones existentes 'sobre y bajo la superficie del suelo' y desde un enfoque de investigación holístico se plantean las siguientes evaluaciones para cumplir con el objetivo específico:

- Evaluación fisicoquímica del suelo.
- Evaluación de la actividad biológica global del suelo.
- Evaluación del carbono proveniente de la biomasa microbiana.
- Evaluación del contenido de materia orgánica del suelo.

- Determinación de la actividad de la enzima deshidrogenasa.
- Determinación de la actividad de la enzima catalasa.
- Determinación de la actividad de la enzima fosfomonoesterasa.
- Determinación de la actividad de la enzima fosfodiesterasa.
- Determinación de la actividad de la enzima ureasa.
- Determinación de la actividad de la enzima β -glucosidasa.
- Determinación del perfil funcional del suelo a nivel de comunidades bacterianas.

1.3.4.3. Obtener bacterias formadoras de esporas capaces de inhibir el desarrollo de *P. palmivora*

Acorde con los trabajos publicados por Emmert y Handelsman (1999), Quan *et al.*, (2006), Ros-Araluce *et al.*, (2008), Basurto-Cadena *et al.*, (2010) y Feng-Xia *et al.*, (2012) que demostraron no sólo la elevada frecuencia en el suelo de bacterias pertenecientes al género *Bacillus spp.* sino también, la capacidad de esporulación confiriéndole resistencia natural a condiciones adversas, la facilidad de cultivo y conservación in vitro y la capacidad de promoción de crecimiento vegetal en algunas cepas, surgen las siguientes determinaciones a realizar a fin de cumplir con este objetivo específico.

- Aislamiento de bacterias formadoras de esporas rizosféricas de olivos.
- Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de los aislamientos.
- Selección de cepas positivas para la promoción del crecimiento vegetal por mecanismos indirectos.

1.3.4.4. Estudiar los mecanismos de supresividad involucrados en la actividad antagonista

Este objetivo específico se expresa en consonancia con los resultados hallados por Shobha y Kumudini (2012), Feng-Lia *et al.*, (2012) y Basurto-Cadena *et al.*, (2010) en cuanto a los posibles mecanismos de supresividad hallados en bacterias pertenecientes al género *Bacillus*.

Las evaluaciones propuestas para cumplir con este objetivo son:

- Evaluación de la producción de β -1,3 glucanasas bacterianas en presencia y en ausencia del patógeno.
- Evaluación de la producción de β -1,4 glucanasas bacterianas en presencia y en ausencia del patógeno.

- Evaluación de la producción de lipasas bacterianas en presencia y en ausencia del patógeno.
- Evaluación de la producción de sideróforos bacterianos en presencia y en ausencia del patógeno.

1.3.4.5. Realizar una formulación preliminar de un biopesticida experimental

En referencia al desarrollo de una agricultura sustentable que incluya prácticas de manejo tendientes a reducir el impacto negativo sobre el medioambiente, es que se plantea el estudio preliminar de un biopesticida experimental.

Las siguientes evaluaciones se proponen para cumplir con este objetivo específico.

- Patogenicidad de *Phytophthora palmivora* en olivo.
- Ensayo preliminar de control biológico de *Bacillus* sobre *Phytophthora* en olivo.
- Evaluación de la presencia del patógeno sobre las comunidades bacterianas rizosféricas de olivo.

CAPÍTULO 2

**“¡Olivares Coloridos
De Una Tarde Anaranjada;
Olivares Rebruñidos
Bajo La Luna Argentada!”**

**Los Olivos.
Antonio Machado (1875-1939)**

CAPÍTULO 2

2. Suelos de olivares

Numerosos patógenos atacan al olivo en Argentina y otros países y causan importantes pérdidas de producción según los trabajos publicados por Lucero *et al.*, (2007), Docampo *et al.*, (2006), Pérez *et al.*, (2004) y Pérez *et al.*, (2001). Es sabido que las propiedades biológicas del suelo pueden utilizarse como indicadores siendo sensibles a cambios en el manejo según Paz-Ferreiro y Fu, (in press) y al uso del suelo, Paz-Ferreiro *et al.*, (2007). Por otra parte en los últimos años se avanzó en el estudio sobre cómo los microorganismos interactúan entre sí y con otros organismos gobernando la funcionalidad del ambiente suelo, investigación publicada por Bardgett y Wardle (2003).

Estos investigadores trabajan sobre la definición del suelo como un ecosistema terrestre constituido por componentes que interactúan tanto desde arriba como desde abajo de la superficie del suelo para influir sobre las propiedades y los procesos a nivel de comunidades y del ecosistema. Estos componentes están estrechamente relacionados a nivel de comunidad, y reciben la influencia con un grado de mayor especificidad entre plantas y organismos del suelo. Así resulta que las comunidades de arriba y abajo de la superficie suelo pueden ser poderosas conductoras mutualistas con retroalimentación tanto positiva como negativa.

La comprensión sobre cómo funcionan los ecosistemas terrestres requiere de estrategias de estudio combinadas focalizando en las relaciones de los procesos que ocurren sobre y bajo el suelo.

Dada la importancia en la retroalimentación que ocurre entre los subsistemas de

herbívoros, productores, y descomponedores, Bardgett y Wardle (2003) identificaron mecanismos por los cuales los herbívoros afectan indirectamente a los microorganismos descomponedores y a los procesos del suelo mediante la alteración de la calidad y cantidad de los recursos de entrada al suelo. Por otra parte mostraron que esos mecanismos son similares independientemente de si operan en corto tiempo como resultado de respuestas fisiológicas de las plantas individuales al ataque de herbívoros, o alteraciones a largo plazo de la estructura de la comunidad de las plantas por herbívoros y cambios consecuentes con la calidad de los desechos de entrada al suelo. Una variedad de mecanismos responsables para la naturaleza de efectos sobre la microbiota y el ecosistema del suelo, efectos de herbívoros positivos, negativos o neutros son posibles dependiendo del balance de esos mecanismos.

Estudios combinados de arriba y abajo a nivel de comunidad y ecología ecosistémica están aportando conocimiento acerca de la significancia de la biodiversidad funcional y de regulación y de los impactos ambientales producidos por el fenómeno de cambio global inducido por el hombre Wardle *et al.*, (2005). En particular la relación entre las interacciones en la interfaz 'arriba y abajo del suelo' es un campo de investigación que avanza rápidamente según Bardgett y Wardle (2010). En este Capítulo, y en este sentido de estudiar interrelaciones, se trabaja sobre la hipótesis que establece la condición de salud del olivo podría estar relacionada con las características fisicoquímicas, biológicas y bioquímicas del suelo rizosférico.

2.1. Suelos estudiados

A continuación se presentan entonces, los suelos de estudio contrastantes en cuanto a región climática, hidrografía y vegetación de característica de cada área de influencia.

2.1.1. Aimogasta

2.1.1.1. Clima

El clima regional donde se encuentra la ciudad de Aimogasta corresponde a BSh según la clasificación de Köppen y Geiger. Se describe como un clima árido cálido-templado, con lluvias estivales, grandes amplitudes térmicas diarias y estacionales, veranos muy

prolongados e inviernos moderados con heladas y déficit hídrico durante todo el año. A su vez, por las particularidades del área le corresponde el clima local del valles y bolsones, en el que las temperaturas son influenciadas por la disposición de los cordones montañosos que tienen incidencia en las horas de insolación, en la dirección de los vientos y en el factor climático altitud, ya que es un área que está por encima de los 800 m.s.n.m.

Aimogasta está ubicada en el área geomorfológica denominada valles del Velasco específicamente en la sub-unidad geomorfológica de la planicie de decantación, razón por la cual las precipitaciones son menores. Las temperaturas son templadas con promedios anuales, en un período de 20 años, entre 15 °C y 25 °C. Las temperaturas mensuales demuestran promedios muy variables, entre sus máximas y mínimas, tanto estacionales como diarias, con temperaturas máximas estivales promedios de 39 °C y mínimas invernales promedio de 0 °C.

Las amplitudes térmicas diarias son mayores que las amplitudes térmicas estacionales. Característica acentuada en los climas áridos. Existen veranos prolongados e inviernos cortos. La distribución anual de las precipitaciones permitió la determinación del año hidrológico correspondiente a los meses de septiembre a marzo y a su vez con mayor monto pluviométrico en los meses de diciembre, enero y febrero.

Los montos pluviométricos, al igual que las temperaturas, son muy variables, con registros anuales de 5 a 10 mm hasta 100 mm, como así también de extendidos períodos sin lluvia. Las elevadas temperaturas estivales y las escasas precipitaciones, de tipo torrencial estival, definen el gran déficit hídrico de la zona.

En cuanto a la descripción hidrográfica para el departamento Arauco corresponde al área sector de Arauco de la cuenca Salar de Pipanaco o cuenco del Río Salado: este sector comprende la cuenca hidrográfica inferior del río salado y numerosos cursos afluentes que drenan la amplia depresión intermonta delimitada por la sierra del Velasco al oeste y las sierras de Mazán al este.

El Río Salado o Colorado nace en territorio catamarqueño y se incorpora a La Rioja en el Departamento San Blas de los Sauces, atraviesa el sector norte del Departamento Arauco y se pierde en los desagües situados al nordeste de la ciudad capital de La Rioja. Otro recurso hídrico superficial importante es el Río Aimogasta o Uspalta con un caudal de $0,287 \text{ m}^3 \cdot \text{seg}^{-1}$. El máximo de toda el área, utilizado principalmente para riego.

En lo relativo a los recursos hídricos subterráneos, existen varias áreas con importantes reservorios que son explotados principalmente para el riego de parcelas. Entre estas zonas se destacan: Bañado de los Pantanos, los Bordos de Talacán y los Bordos de Arauco.

Los recursos hídricos de Aimogasta son:

Ríos superficiales: Río Aimogasta, nace por vertientes situadas en los Bordos de Talacán, y atraviesa la ciudad en su sector central, y se dirige hacia el noroeste hasta el distrito de Machingasta.

Otros ríos importantes localmente son el Río Otasio u Otaso y el Río Ashá, que nacen de la confluencia de numerosos e irregulares cursos en el área de coalescencia pedemontana, si bien al atravesar la planicie de decantación pierden fuerza hídrica, éstos poseen antecedentes de importantes crecidas y colmatación.

De sedimentos en grandes proporciones, por lo que se construyeron defensas para evitar inundaciones en el área urbana. Aimogasta se ubica en el centro-este del Departamento Arauco a 130 km de la capital de La Rioja y tiene una extensión de 9,57 Km² y según el censo del año 2010 una población de 15.000 habitantes es decir poco más del 70 % del total departamental según INDEC, (2010).

2.1.1.2. Vegetación

La jarilla y la pichana son los arbustos característicos, pero también se suman el algarrobo (*Prosopis sp.*), el chañar (*Geoffroea sp.*) y el retamo (*Bulnesia retama*).

2.1.2. Castelar

Para llevar a cabo este estudio se seleccionó un olivar ubicado en Castelar a fin de evaluar un sistema de producción de olivos contrastante en cuanto a clima, altitud y tipo de suelo.

2.1.2.1. Clima

Castelar, en la región Pampa Ondulada, el clima corresponde a Cfa según la clasificación de Köppen y Geiger. Se describe como un clima subtropical húmedo. La altitud regional está en un rango de 0 a 120 m.s.n.m. Los suelos son en su mayoría profundos y bien drenados, con una textura franco-limosa. En las cañadas que recortan algunas lomadas y en algunas cubetas aparecen suelos lavados, hidromórficos y sódicos en los horizontes superficiales según lo publicado por Mon, R. (2007).

2.1.2.2. Vegetación

La estructura de la vegetación de los pastizales corresponde a una pradera en los años húmedos y a una pseudo-estepa en los períodos secos. En zonas donde los suelos son muy fértiles se desarrolla el llamado flechillar, caracterizado por gramíneas del género *Stipa*. En sectores donde los suelos son ligeramente alcalinos, también en los bordes de cursos de agua se encuentran comunidades halófilas de los géneros *Salicornia* y *Distichlis*. Debido a las restricciones que presentan estas áreas, su utilización como tierra de cultivo es muy limitada, según Mon, R. (2007).

2.2. *Materiales y Métodos*

2.2.1. Diseño experimental

Para el diseño experimental se seleccionaron dos sitios de estudio contrastantes entre sí por el tipo de suelo y región climática. El ensayo se estableció en dos áreas adyacentes tanto en LR como en BA. La primer área no presentó olivos sintomáticos a causa de *P. palmivora* (LRh y BAh).

La segunda área de estudio presentó olivos sintomáticos causa de rama seca, de los cuales se aisló el patógeno *P. palmivora* (LRs) y olivos con sintomatología en (BAs). En ambos sitios de estudio, suelo lindero sin cultivar se utilizó como control de ensayo (LRc y BAc). En cada unidad experimental se tomaron cinco muestras de suelo compuestas por 20 submuestras por profundidad alrededor de cada árbol de olivo tal como se muestra en la Fig. 2.1.

Para análisis fisicoquímicos y biológicos las profundidades de muestreo fueron: 0 a 5 cm (n=5), 5 a 20 cm (n=5) y 20 a 40 cm (n=5), en tanto, para análisis bioquímicos las profundidades fueron: 0 a 5 cm y 5 a 20 cm. Por otra parte y a fin de realizar el muestreo específico para análisis biológicos y bioquímicos las muestras fueron colectadas e inmediatamente refrigeradas a 4 °C hasta su procesamiento.



Figura 2.1. Ejemplo de composición de una muestra LR (superior) y BA (inferior).

Los tratamientos definidos en este trabajo fueron:

LRs: suelo de olivar sintomático de *P. palmivora* situado en La Rioja (n=5).

LRh: suelo de olivar asintomático situado en La Rioja (n=5).

LRc: suelo sin cultivar lindero al olivar situado en La Rioja (n=5).

BAs: suelo de olivar con síntomas de ataques fúngicos situado en Buenos Aires (n=5).

BAh: suelo de olivar asintomático situado en Buenos Aires (n=5).

BAc: suelo sin cultivar lindero al olivar situado en Buenos Aires (n=5).

2.2.2. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa R usando ANOVA y métodos de comparación múltiple de Tukey y de Duncan. Los datos de frecuencia se sometieron a

análisis de Chi-cuadrado sobre la base de tablas de contingencia. Los datos se analizaron en el nivel de probabilidad de 0,05. Se aplicó además análisis de componentes principales (ACP).

2.2.3. Caracterización del monitoreo sanitario de los olivares

El monitoreo sanitario en ambos sitios de muestreo LR y BA, se realizó durante los años 2006, 2010 y 2015. Para ello se estableció una escala de afectación de las plantas sintomáticas por rama seca medida en grado en un rango de 1 a 4. El grado 1 representa el árbol con afectación por rama seca en menos de un 25 % de sus partes. El grado 2 representa el árbol con afectación por rama seca entre un 25 % y un 50 % de sus partes. En tanto el grado 3 representa la afectación de las partes del árbol entre el 50 % y el 75 % y el grado 4 en más del 75 %.

2.2.4. Caracterización fisicoquímica de los suelos

2.2.4.1. Sitio LR

El suelo de esta región es clasificado como Torripsamente típico, suelo poco desarrollado y predominantemente arenoso, según USDA (2006), pertenece al orden Entisol. Este orden de suelos clasifica suelos jóvenes de escaso desarrollo, con pocos horizontes o capas no evolucionadas, con escaso contenido de materia orgánica, desarrollados en diversos ambientes, climas, vegetación y materiales originales con presencia de amplios sectores del NOA. La superficie ocupada por entisoles en Argentina es de 70.000.000 de hectáreas (25 %).

2.2.4.2. Sitio BA

El suelo de esta región es clasificado como Natracualf típico según USDA (2006) y pertenece al orden Molisol. Este orden de suelos agrupa suelos oscuros, poco evolucionados, con buen contenido de materia orgánica, buena fertilidad natural, de fácil penetración por las raíces y reciclado de materiales por mesofauna, con períodos de falta de agua para cultivos.

Este suelo ocupa 84.200.000 de hectáreas (29,9 %) en Argentina.

Los análisis fisicoquímicos se realizaron según Alef y Nannipieri (1995). En tanto la materia orgánica se realizó siguiendo el método de Walkley-Black y se expresó como g.kg^{-1} . La humedad se determinó gravimétricamente. Además, en muestras tamizadas ($< 2 \text{ mm}$) se determinó: pH (1:2,5 suelo:agua), carbono orgánico lábil (MOS), nitrógeno total se midió por Kjeldahl y se expresó en g.kg^{-1} , conductividad eléctrica (C.E.) mediante conductímetro en relación suelo:agua 1:2,5 y se expresó en dS.m^{-1} , cationes intercambiables y la capacidad de intercambio catiónico (CIC).

La determinación de N-NO_3 se realizó utilizando ácido Fenoldisulfónico y se expresó en mg.kg^{-1} , la Capacidad de Intercambio Catiónico se determinó por titulometría utilizando Acetato de amonio 1 N pH 7 y se expresó en cmol.kg^{-1} , el fósforo extraíble (P) se cuantificó según el método de Bray I y se expresó en mg.kg^{-1} , los cationes: calcio y magnesio presentes en el suelo se determinaron utilizando Acetato de amonio 1 N A.A. pH 7 y se expresaron en cmol.kg^{-1} , en tanto magnesio y sodio presentes en el suelo se determinaron con Acetato de amonio 1 N, F.LL. pH 7, según Klute, A. (1986). Se analizó también la contribución porcentual de cada catión en saturación. Los iones Cinc, Manganeso, Cobre y Hierro se determinaron por Ext. c/DPTA-Espectrometría A.A. y fueron expresados en mg.kg^{-1} . En tanto, la determinación de Boro se realizó siguiendo el método del Acetato de Amonio con Azometina y se expresó en mg.kg^{-1} .

2.2.5. Caracterización bioquímica y biológica de los suelos de olivares.

2.2.5.1. Evaluación de la actividad biológica global

La actividad biológica global se determinó mediante la respiración del suelo (RES) empleando la técnica de valoración del NaOH según Alef y Nannipieri (1995). La misma evaluación se realizó con el objeto de estimar la actividad biológica a diferentes profundidades del suelo influidas por las raíces del cultivo.

2.2.5.2. Evaluación del carbono proveniente de la biomasa microbiana

La determinación del carbono proveniente de la biomasa microbiana (C_{mic}) brinda información directa sobre la cantidad de microorganismos viables que se encuentran presentes en la muestra de suelo. La importancia de esta determinación radica en el hecho de que permite conocer el pool de carbono proveniente de dichos microorganismos y relacionarlo con el carbono evaluado en la determinación de materia orgánica. Se utilizó la técnica de fumigación con Cloroformo de Jenkinson y Polwson (1976).

Para la determinación de C_{mic} , se colocaron 250 g de suelo en un vaso de precipitados de vidrio, el cual se ubicó dentro de un desecador de 30,5 cm de diámetro conteniendo papel húmedo. Dentro del desecador se encontraba un vaso de precipitados de vidrio con $CHCl_3$ libre de alcohol. El aire contenido en el interior del desecador se evacuó completamente. La tapa se cerró y el desecador se dejó en oscuridad a 25 ° C durante 24 h.

Posteriormente se quitaron del desecador, el vaso de precipitados conteniendo cloroformo y el papel húmedo. El vapor de cloroformo fue eliminado del suelo por evacuaciones repetidas. Estas evacuaciones fueron de 3 min cada una y se realizaron utilizando una bomba de vacío.

Finalmente, el carbono proveniente de la biomasa microbiana se obtuvo por diferencia en el análisis volumétrico de la cuantificación del CO_2 liberado por el suelo no fumigado.

Cálculo del CO_2

$$CO_2 - C (\mu g.gss^{-1}) = (B - S) \cdot M \cdot E \cdot A \cdot DW^{-1}$$

donde:

B, es la cantidad de ácido necesaria para titular NaOH en los blancos (sin suelo) hasta el punto final (pH 8,3) en microlitros,

S, es la cantidad de ácido necesaria para titular NaOH en las muestras de suelo hasta el punto final (pH 8,3) en microlitros,

M, es la molaridad del HCl,

E = 6 (peso equivalente para expresar los datos como carbono),

A, es la proporción de volumen total del NaOH y el volumen de alicuota de NaOH y

DW, es el peso seco del suelo, en gramos.

Para el cálculo de C_{mic} se aplicó la siguiente fórmula:

$$C_{mic} = E_c / kEC.$$

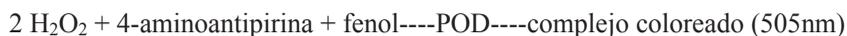
E_c = carbono orgánico total de las muestras fumigadas - carbono orgánico total en las muestras control. $kEC = 0,45$ según Martens, R. (1995)

2.2.5.3. Evaluación del contenido de materia orgánica del suelo

La evaluación del contenido de materia orgánica (MOS) y carbono orgánico total (COT) se realizó según el método de Walkley-Black, (1972). Se basa en la oxidación de la materia orgánica del suelo por vía húmeda, con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en medio ácido, usando ácido sulfúrico (H_2SO_4). La valoración del agente oxidante consumido ($K_2Cr_2O_7$) se realizó con sulfato ferroso amónico 6-hidrato (sal de Mohr). Se trata de una valoración por retroceso, ya que se valora con sal de Mohr el exceso de $K_2Cr_2O_7$ que no fue necesaria para oxidar la materia orgánica del suelo.

2.2.5.4. Determinación de la actividad de la enzima catalasa

El principio del método para que tenga lugar la reacción de la catalasa fue descrito por Johnson y Temple (1964) y la medición del H_2O_2 residual mediante un método colorimétrico con peroxidasa, según Trasar-Cepeda *et al.*, (1999) luego de producida la reacción enzimática de la enzima peroxidasa (POD) y que descompone el peróxido de hidrógeno residual. El oxígeno liberado oxida a la 4-aminoantipirina que reacciona con fenol para generar un complejo de color rosa, cuya intensidad se mide a 505 nm:



Se pesó 0,5 g de suelo húmedo (<2mm) en un Erlenmeyer, se añadieron 40 ml de agua destilada y se tapó. Posteriormente se agitó durante 30 minutos en agitador rotatorio (30 vueltas por minuto.) Luego se añadieron 5 ml de H_2O_2 1:100, se tapó y se agitó nuevamente durante 10 minutos. Para que se produzca la reacción enzimática y se establezca el peróxido de hidrógeno remanente se adicionaron de 5 ml de H_2SO_4 1,5 M y posteriormente se filtró.

Blanco de Reactivo: Los controles de reactivo se realizaron sustituyendo 5 ml de agua destilada en lugar de los 5 ml de H_2O_2

Blanco de Muestra: Los controles de suelo se realizaron sustituyendo 0,5 g de suelo húmedo por 0,5 ml de agua destilada. éstos indicaron la cantidad máxima de H_2O_2 que puede estar presente en las muestras de suelo.

Una vez obtenido el extracto del suelo, tanto de las muestras como de sus controles, se

procedió a realizar la determinación del H₂O₂ remanente en el mismo. Se tomó una alícuota de 100 µl del extracto filtrado en un tubo de vidrio, se le añadió 900 µl de tampón fosfato 110 mM pH 7,4 para neutralizar el pH. Se agregaron 9 ml del reactivo de desarrollo de color, se agitó, se esperó unos minutos a que se desarrolle el color y se midió en espectrofotómetro a 505 nm frente a un blanco preparado de la misma forma, pero en el que los 100 µl fueron de agua destilada.

La concentración de H₂O₂ de las muestras se calculó, después de sustraer el valor de absorción de los blancos correspondientes, por referencia a una curva de calibración preparada de la siguiente manera:

A partir del blanco sin suelo y con H₂O₂, la disolución de H₂O₂ 8,8 mM preparada como las muestras pero sin suelo, se preparó una dilución con agua destilada, una serie de patrones de concentración 0 (P0): 0,55, 1,1, 2,2, 4,4 y 8,8 mM. Se tomó una alícuota de 100 µl de cada una de estas disoluciones patrón, se la colocó en un tubo de vidrio y se desarrolló el color de la misma manera que para las muestras. De este modo se obtuvo una recta de calibrado contenido, en el volumen de 100 µl, 0: 0,055x10⁻³; 0,11x10⁻³; 0,22x10⁻³; 0,44x10⁻³ y 0,88x10⁻³ mmoles de H₂O₂. Posteriormente se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 505 nm.

Por referencia a esta recta de calibración se calcularon los mmoles de H₂O₂ residual contenidos en 0,1 ml que se sometieron a la reacción colorimétrica (C). La cantidad así obtenida se restó a la cantidad H₂O₂ presente en los 0,1 ml del blanco sin suelo y con H₂O₂ (0,88x10⁻³) y de esta manera fue posible conocer la cantidad de H₂O₂ total consumida por cada muestra y por tanto, la del O₂ desprendido en la reacción enzimática, que sería igual a la mitad del peróxido consumido:

$$AE = ((0,88 \times 10^{-3} - C) \times V \times T) / G$$

donde:

AE: actividad catalasa (mmoles H₂O₂ consumido g⁻¹.h⁻¹),

C: mmoles de H₂O₂ remanente en la muestra, obtenidos por referencia a la recta de calibrado.,

V: factor de dilución, en este caso sería 50 ml/0,1ml,

G: factor relativo a la cantidad de suelo seco utilizado (en este caso sería peso de suelo seco que hay en 0,5 g de suelo húmedo),

T: factor relativo al tiempo que en este caso es 6.

2.2.5.5. Determinación de la actividad de la enzima deshidrogenasa

Esta determinación se realizó por el método de von Mersi y Schinner modificado por Camiña *et al.*, (1998). Se basa en la medida espectrofotométrica del iodonitrotetrazolio formazán (INTF) producido por la reducción del 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolio (INT) incubando el suelo con INT en medio tamponado y en oscuridad durante 1 h a 40 ° C.



Muestra: Se pesó 1 g de suelo húmedo (<2 mm) y se colocó en tubos de vidrio con tapón de rosca. Posteriormente se añadió 1,5 ml de tampón Tris-HCl 1 M pH 7,5. Se agregaron 2 ml de INT 0,5 %, se cerraron los tubos, se mezcló y se incubó a 40 ° C durante 1 h en oscuridad, en agitación (120 rpm). Luego se añadieron 10 ml de etanol:DMF 1:1 y se agitó bien. Se dejó reposar 10 min en oscuridad a RT y se filtró.

Blanco de Reactivo: Los controles se prepararon igual que las muestras pero añadiendo 2 ml de agua destilada en lugar de 2 ml de INT 0,5 %. Se midió la absorbancia a 490 nm frente a un blanco de calibrado: 2 ml agua destilada, 1,5 ml tampón Tris-HCl, y 10 ml etanol:DMF.

La cantidad de INTF formado para cada una de las muestras se calculó después de sustraer la absorbancia de los controles, por referencia a una curva de calibrado de INTF que se preparó, en presencia de suelo y para cada muestra, de la siguiente manera:

Blanco de Muestra: Se preparó un blanco sin suelo y se incubó en las mismas condiciones.

Para preparar la recta de calibración se pesó 1 g de suelo en tubos de vidrio. Se añadió 1,5 ml de tampón Tris-HCl 1 M pH 7,4. Se añadió alícuotas de p (Po): 0,2, 0,5, 1,0, 1,5 y 2 ml de INTF 200 μg^{-1} y se completó hasta 2 ml con la mezcla etanol:DMF. Posteriormente se incubaron en las mismas condiciones que las muestras. De este modo se obtuvo una recta de calibrado a la que se añadieron entre 0 y 400 μg de INTF.

Después de la incubación se añadió a cada patrón 2 ml de agua destilada y 8 ml de etanol:DMF. Se midió en espectrofotómetro a 490 nm frente al Po.

Cálculos:

$$\text{AE} = C / (\text{Pm} \times \text{G} \times \text{T})$$

donde:

AE: actividad deshidrogenasa ($\mu\text{mol INTF formado g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$),

C: cantidad de INTF de la muestra en $\mu\text{g.ml}^{-1}$,

Pm: peso molecular del INTF (471,3),

G: factor relativo al peso de suelo seco utilizado (1/ peso de suelo seco en 1 g de suelo húmedo),

T: factor relativo al tiempo de incubación (1 hora).

La actividad deshidrogenasa se calculó por comparación con valores de absorbancia de las muestras con estándares dentro del rango 0 a 400 $\mu\text{g INTF}$ y se expresó en [$\mu\text{mol INTF gss}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$].

2.2.5.6. Determinación de la actividad de la enzima fosfomonoesterasa

La determinación se realizó por espectrofotometría del p-nitrofenol liberado cuando el suelo fue incubado a 37 °C durante 1 h con una disolución tamponada de p-Nitrofenil fosfato (pNPP) como un sustrato análogo del ortofosfato monoéster, según Tabatabai y Bremer (1969).

Muestra: Se colocó 1 g de muestra de suelo en un Erlenmeyer de 50 ml y se adicionó 4 ml de solución amortiguadora MUB (pH 6,5), 1 ml de solución de pNPP preparada con el mismo buffer, se agitó por algunos segundos para mezclar los contenidos. Posteriormente se detuvo la agitación y se incubó 1 h a 37 °C. Se adicionó 1 ml de CaCl_2 0,5 M y 4 ml de NaOH 0,5 M, se agitó por unos segundos, y se filtró (0,45 mm HA nitrocellulose, Millipore) la suspensión de suelo para prevenir la presencia de posibles precipitados como interferentes.

Blanco de Reactivo: El blanco se preparó sustituyendo la solución de pNPP por 1 ml de agua destilada y se incubó junto con las muestras.

Blanco de Muestra: Se preparó un blanco sin suelo y se incubó en las mismas condiciones.

Para preparar la recta de calibración se tomó 1 ml de varias soluciones de pNP entre 0 y 250 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, se añadió 4 ml de agua destilada y se procedió luego igual que con las muestras, es decir, se añadió 1 ml de CaCl_2 0,5 M y 4 ml de NaOH 0,5 M, se filtró y midió la absorbancia a 400 nm.

Posteriormente se interpoló el valor medido en la curva de calibración. Las muestras y los controles se midieron con espectrofotómetro a 400 nm contra blanco. Se calculó el

contenido de p-Nitrofenol (pNP) a partir de una curva de calibración obtenida con standards de concentración conocida.

Cálculos:

$$AE = (C \times V) / (Pm \times G \times T)$$

donde:

AE: actividad fosfomonoesterasa ($\mu\text{mol p-nitrofenol liberado por g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$),

C: cantidad de p-nitrofenol de la muestra en μg ,

Pm: peso molecular del p-nitrofenol (139),

G: factor relativo al peso de suelo seco utilizado (1/ peso de suelo seco en 1 g de suelo húmedo),

V: factor de dilución, en caso de que sea necesario diluir las muestras,

T: factor relativo al tiempo de incubación (1 hora).

La actividad fosfomonoesterasa se expresó como micromol de pNP liberado por gramo de suelo seco y tiempo de incubación ($\mu\text{mol de pNP.gss}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

2.2.5.7. Determinación de la actividad de la enzima fosfodiesterasa

La determinación se realizó utilizando bis-p-nitrofenilfosfato como un sustrato análogo del ortofosfato monoester, según Tabatabai, M.A. (1982). Se siguió el método de Bowman y Tabatabai (1978).

Muestra: Se colocó 1 g de muestra de suelo en un Erlenmeyer de 50 ml y se adicionó 4 ml de solución amortiguadora THAM, pH 8, 1 ml de solución de pNPP preparada con el mismo buffer y se agitó por algunos segundos para mezclar los contenidos.

Posteriormente se detuvo la agitación y se incubó 1 h a 37 ° C. Se adicionó 1 ml de CaCl_2 0,5 M y 4 ml de disolución extractante THAM-NaOH pH 12, se agitó por unos segundos, y se filtró (0,45 mm HA nitrocellulose, Millipore) la suspensión de suelo para prevenir la presencia de posibles precipitados como interferentes.

Blanco de Reactivo: El blanco se preparó sustituyendo la solución de pNPP por 1 ml de agua destilada y se incubó junto con las muestras.

Blanco de Muestra: Se preparó un blanco sin suelo y se incubó en las mismas condiciones.

Se midió la absorbancia y se interpoló en una curva de calibración.

Las muestras y los controles se midieron con espectrofotómetro a 400 nm contra blanco.

Se calculó el contenido de pNP a partir de una curva de calibración obtenida con standards de concentración conocida de pNP.

Cálculos:

$$AE = (C \times V) / (Pm \times G \times T)$$

donde:

AE: actividad fosfodiesterasa ($\mu\text{mol p-nitrofenol liberado por g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$),

C: cantidad de p-nitrofenol de la muestra,

Pm: peso molecular del p-nitrofenol (139),

G: factor relativo al peso de suelo seco utilizado (1/ peso de suelo seco en 1 g de suelo húmedo),

V: factor de dilución, en caso de que sea necesario diluir las muestras,

T: factor relativo al tiempo de incubación (1 hora).

La actividad fosfodiesterasa se expresó como micromol de pNP liberado por gramo de suelo seco y tiempo de incubación ($\mu\text{mol de pNP.gss}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

2.2.5.8. Determinación de la actividad de la enzima ureasa

La determinación se realizó midiendo el amonio liberado después de la incubación del suelo con una disolución de urea a 37 ° C durante 90 minutos según Nannipieri *et al.*, (1978).

Muestra: Se colocaron 2 g de muestra de suelo fresco previamente pasado por un tamiz de 2 mm de diámetro de malla en un Erlenmeyer de 50 ml. Se adicionaron 2 ml de solución de Urea al 6,4 % y se incubó durante 90 min a 37 ° C.

Blanco de Reactivo: El blanco se preparó sustituyendo la solución de Urea por 2 ml de agua destilada y se incubó junto con las muestras.

Blanco de Muestra: Se preparó un blanco sin suelo, únicamente contenía 2 ml de solución de Urea y se incubó en las mismas condiciones.

El amonio liberado en la incubación fue extraído añadiendo 10 ml de solución de KCl 2 M y agitando durante 30 min. Luego se filtró la suspensión de suelo y en ese filtrado se determinó el amonio por electrodo selectivo.

Cálculos: La Actividad Ureasa (AE) se calculó utilizando la expresión: $AE = [(S-B) \cdot V \cdot V' / G \cdot T]$

donde:

S: cantidad de $N-NH_4^+$ en las muestras (μmol de $N-N_4^+$) obtenida de la curva de patrón utilizando las cantidades totales de N en cada una de las soluciones patrón,

B: cantidad $N-N_4$ (μmol de $N-N_4^+$) para los blancos,

V: Volumen total del extracto de incubación,

G: Factor relativo a la cantidad de suelo seco utilizada en el ensayo,

T: Factor relativo al tiempo de incubación en horas,

Pm: peso atómico del nitrógeno.

La actividad ureasa se expresó como amonio por gramo de suelo seco y tiempo de incubación (μmol de NH_4^+ . $gss^{-1} \cdot h^{-1}$).

2.2.5.9. Determinación de la actividad de la enzima β -glucosidasa

La determinación se realizó siguiendo el método de Eivazi y Tabatabai (1988) .

Muestra: Se colocó 1 g de muestra de suelo en un Erlenmeyer de 50ml y se adicionó 4 ml solución amortiguadora (MUB-HCl, pH 6). Se añadieron 1 ml de p-nitrofenil β -D-glucopiranosido 25 mM en las muestras. Se incubó durante 1 h a 37 °C. Se añadió 1 ml de $CaCl_2$ 0,5M y 4 ml de disolución extractante (THAM NaOH pH12). Se midió la absorbancia de los filtrados a 400 nm.

Blanco de Reactivo: El blanco se preparó sustituyendo la solución de salicina por agua destilada y se incubó junto con las muestras.

Blanco de Muestra: Se preparó un blanco sin suelo, únicamente contenía solución de p-nitrofenil β -D-glucopiranosido 25 mM y se incubó en las mismas condiciones.

Cálculos:

$$AE = (C \times V) / (Pm \times G \times T)$$

donde:

AE: actividad β -glucosidasa (μmol p-nitrofenol liberado por $g^{-1} \cdot h^{-1}$),

C: cantidad de p-nitrofenol de la muestra en μg ,

Pm: peso molecular del p-nitrofenol (139),

G: factor relativo al peso de suelo seco utilizado (1/ peso de suelo seco en 1 g de suelo húmedo),

V: factor de dilución, en caso de que sea necesario diluir las muestras,

T: factor relativo al tiempo de incubación (1 hora).

La actividad de β -glucosidasa se expresó como micromol de pNP liberado por gramo de suelo seco y tiempo de incubación ($\mu\text{mol p-NP g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

2.2.5.10. Análisis del perfil funcional del suelo a nivel de comunidades bacterianas

Se utilizó el método de EcoPlates TM según Garland, J.L. (1997). Esta evaluación fue realizada a partir de diluciones seriadas de suelo fresco para las profundidades de 0-5 y 5 a 20 cm de acuerdo con Gómez *et al.*, (2006). La lectura de las placas se realizó a intervalos de 12 h hasta las 72 h de incubación para calcular AWCD, R y H. La actividad microbiana en cada microplaca se expresó como la media de color desarrollado (AWCD) y se determinó como se describe a continuación, $\text{AWCD} = \sum \text{OD}_i \cdot (\text{número de fuentes carbonadas})^{-1}$, donde OD es el valor de densidad óptica de cada well. La Riqueza (R) fue definida como el número de sustratos de C oxidados, y el Índice de Shannon-Weaver (H) se calculó utilizando un umbral de OD de 0.25 para las respuestas positivas. El Índice de Shannon-Weaver se calculó de la siguiente manera: $H = - \sum p_i \cdot (\ln p_i)$, donde p_i es la proporción de la actividad de cada DO (DO_i) a la suma de actividades sobre todos los sustratos ($\sum \text{OD}_i$). Los resultados de la determinación de los perfiles fisiológicos a nivel de comunidades bacterianas se estudiaron por análisis multivariado de componentes principales (ACP).

2.3. Resultados

2.3.1. Descripción de los sitios de muestreo

El predio de estudio LR está ubicado en la localidad de Aimogasta, en la provincia de La Rioja, Argentina (28° 53'S, 66° 48'O) y el predio de estudio BA está ubicado en la localidad de Castelar, en la provincia de Buenos Aires (34° 36'S, 58° 40'O).

2.3.2. Caracterización del monitoreo sanitario de los olivares

En el sitio BA los síntomas se manifestaron sólo en hojas. Se observaron lesiones en lámina de la hoja de color rojizo, luego el tejido se necrosa y pasa a un color castaño claro y sobre la superficie aparecen puntuaciones de color negro que corresponden a la presencia de picnidios, cuerpos de fructificación asexual del hongo *Phyllosticta panizzei*.

La Fig. 2.2. muestra una lesión foliar. Se trata de una enfermedad altamente relacionada con factores abióticos como excesiva humedad relativa y precipitaciones.

Esta enfermedad fue registrada en el monitoreo de los olivares de Castelar en el año 2006, y no se observó durante el monitoreo de los años 2010 y 2015.



Figura 2.2. Lesión necrótica en el ápice de la lámina de la hoja.

En tanto los síntomas de las patologías observadas en LR en el año 2006 se manifestaron en la parte aérea, corona, base de tronco y en las raíces. En la parte aérea se observó clorosis, abarquillado y muerte de hojas. Además se observó marchitamiento, necrosis y muerte apical de los brotes jóvenes. Los síntomas al principio de la infección se presentaron en un sólo sector de la planta, posteriormente se generalizaron al resto de la planta y provocaron la muerte.

Al nivel de la línea del suelo se observó sobre el tallo, una lesión pardo rojiza oscura, con disgregación del tejido, afectando a la corteza y parte del xilema de la corona. Las

condiciones de humedad excesiva favorecieron que el área afectada se cubriera con un micelio tenue blanquecino, donde se pueden observar gotas pequeñas refringentes que corresponden a la formación de zoosporangios. Las raíces finas presentaban podredumbre, necrosis y destrucción total. La Fig. 2.3. muestra pudrición de la corona por *Phytophthora sp.*



Figura 2.3. Lesión a nivel del tronco, pudrición de la corona por *Phytophthora sp.*

A continuación se presentan los resultados del relevamiento en la Tabla 2.1. realizado en el monitoreo durante los años 2006, 2010 y 2015.

Tabla 2.1. Características del monitoreo sanitario de los olivares

Incidencia	Por ejemplar (Grado) / Por olivar		
	2006	2010	2015
Sitio / Año			
LR s	1/ 10%	2 y 3 / 30 %	3 y 4 / 50%
BA s	1/ 1 %	1 / 1 %	0 / 0 %

Referencias: Datos del relevamiento sanitario durante los años 2006, 2010 y 2015. Grado 1: menos del 25 % de afectación de la planta, Grado 2: entre el 25 y el 50 %, Grado 3: entre el 50 % y el 75 % y Grado 4: más del 75 % de afectación de la planta. La incidencia por olivar se expresó en porcentaje de plantas afectadas.

2.3.3. Manejo de olivares en Aimogasta

Este árbol se cultiva en Argentina entre los 25 ° y 40 ° latitud sur. Se considera un cultivo poco exigente en suelos para su desarrollo y se desarrolla bien tanto en suelos calcáreos como en silíceos, pero requiere suelos profundos y bien drenados. El cultivo se desarrolla en clima templado cálido, con inviernos cercanos a cero grado.

Los climas secos favorecen la adaptación del cultivo por la menor incidencia de enfermedades criptogámicas. La época de la cosecha se inicia hacia fines del mes de Enero en la provincia de Córdoba y se prolonga hasta mediados del mes de Mayo, comenzando con las variedades de conserva y siguiendo por las aceiteras. En el sur de la provincia de Buenos Aires, la cosecha se extiende hasta fines de Junio.

La Municipalidad de Aimogasta ofrece un programa de riego por canales para distribución del agua en cantidad de tiempo de una hora diaria, equitativa por finca sin costo para el productor. Ésto requiere la construcción de canales a favor de la pendiente del suelo, del mismo suelo o tradicionales (Fig 2.4.) y de cemento (Fig. 2.5.) y la disposición de tazas que consisten en surcos alrededor de cada árbol de olivo por inundación (Fig. 2.6.).



Figura 2.4. Canales construidos en el suelo para riego.

La edad de los olivos en promedio es de 10 a 30 años. En Aimogasta, la cosecha y la poda se realizan en Junio y la floración se produce en Agosto. En general, el tamaño de las fincas en promedio es de media hectárea con una plantación de 200 plantas de olivos en promedio. Este sistema de manejo corresponde a la forma tradicional.

Por otra parte, las fincas con implementación tecnológica presentan un sistema de riego presurizado y una densidad de cultivo superior a 300 plantas por hectárea.



Figura 2.5. Canales de cemento contruidos para riego.

La comercialización de los productos obtenidos por los pequeños productores se realiza en entrega directa en las industrias agroaceituneras locales o bien algunos productores elaboran productos artesanales regionales agregándole valor al producto. En cuanto a los costos de producción, actualmente, el 30 % corresponde a la cosecha manual, el 20 % es

mantenimiento del riego, la limpieza y poda en Junio, el 20 % corresponde a impuestos de comercialización, flete corto e impuesto inmobiliario rural.



Figura 2.6. Taza de contención para riego alrededor de cada olivo

El desvío del curso del agua hacia cada planta depende del manejo manual realizado por el productor. Si bien la literatura sugiere el riego matutino para evitar el desarrollo de patógenos y el quemado de las hojas por la incidencia solar directa. El riego se realiza en el horario convenido con la Municipalidad para cada finca.

Las fincas de mayor tamaño cuentan con perforaciones propias para extracción de agua. La Fig. 2.7 muestra la cadena de valor de la olivicultura actual.

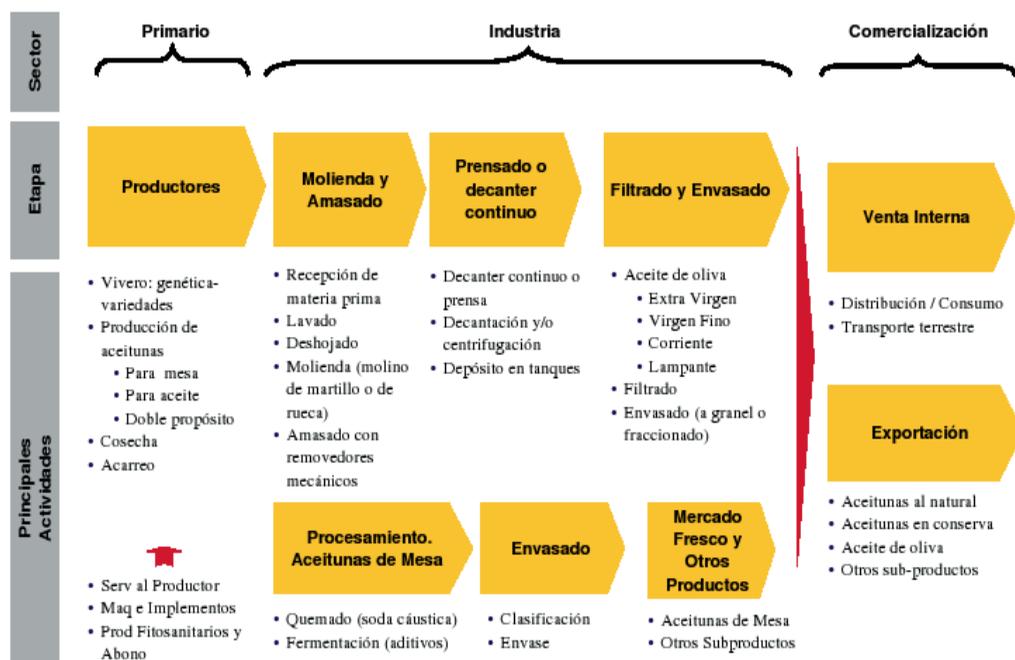


Figura 2.7. Actividades principales por etapa y sector de la cadena de valor (Unión Industrial Argentina)

Gran parte de los productores del sector, fundamentalmente los productores tradicionales, tienen un bajo desarrollo de la infraestructura de riego. El sistema utilizado en algunas regiones cultivadas es ineficiente, siendo el riego por inundación la metodología aplicada en la mayoría de los campos productores tradicionales. A su vez, en muchos casos los canales revestidos primarios se encuentran en mal estado, así como también el agua existente es de mala calidad, teniendo un alto contenido de salinidad.

El sistema de riego por inundación es el más tradicional y fue el usual hasta finales del Siglo XX, cuando se inventó el riego localizado. Actualmente, la tendencia es sustituirlo por otras técnicas que realicen un mejor aprovechamiento del recurso hídrico. Se estima que las pérdidas de agua originadas sólo por evaporación, en largos recorridos y a cielo abierto, son de aproximadamente un 25 % (sin contar las filtraciones no controladas, roturas de conductos, los cuales en algunos casos, las pérdidas alcanzarían los dos tercios del agua utilizada).

Sumado a ésto, la eficiencia del riego es baja a causa de turnos de riego demasiados largos en suelos arenosos y falta de información precisa sobre el uso de agua por cultivo. El tratamiento actual para la rama seca es la poda gruesa (Fig. 2.8.) y posteriormente la quema de la planta afectada (Fig. 2.9.).



Figura 2.8. Rama seca del olivo observada en 2015

En este ejemplar de olivo de la Fig. 2.8. puede observarse desecación y momificación de las inflorescencias, como así también, el acartuchamiento de las hojas y el decaimiento general de la planta.



Figura 2.9. Tratamiento actual de la rama seca en olivo

La Fig. 2.9. muestra el tratamiento actual de rama seca, el cual incluye la secuencia de limpieza, poda, quema y por otro lado, se realizaron trabajos de solarización en algunos casos. Dicha solarización tiene por objeto conservar la temperatura elevada del suelo captada durante el día a fin de evitar el desarrollo de patógenos con la humedad relativa del suelo.

Es sabido que elevadas temperaturas producidas por la aplicación de plásticos al suelo alrededor del tronco del olivo, 37 a 50 ° C obtenidas en los primeros 20 cm de suelo durante dos a cinco semanas tal como lo describieron Katan *et al.*, (1983), Pullman y De Vay (1984) y Elena y Tjamos, (1992) disminuye la densidad de las estructuras de resistencia de los patógenos en el suelo, en olivares de España y Grecia según Blanco-López y Jiménez-Díaz, (1995) la solarización incrementa el fenómeno de recuperación natural de los árboles.

Un árbol de olivo sintomático por por rama seca a partir del cual se aisló el patógeno *P. palmivora* en raíz, se muestra en la Fig. 2.10. en Junio 2006. Se describe un incipiente grado de afectación por rama seca en grado 1 y al fondo de la imagen se observa la sierra del Velasco. Una vista panorámica del sitio LR donde se observa el cordón montañoso de la precordillera riojana, una cortina corta-viento conformada por pinos y el olivar de estudio.



Figura 2.10. Panorámica del sitio LR

Árboles de olivo sintomáticos por rama seca y a partir de los cuales se aisló el patógeno *Phytophthora palmivora* se muestran en la Fig. 2.11. en la evaluación realizada en Junio 2015. Se describe una afectación por rama seca de grados 3 y 4.



Figura 2.11. Olivo atacado por rama seca en el sitio LR

Este muestreo de suelo y de raíces se realizó tomando una submuestra de suelo por planta a 60 cm desde la base del tronco y de 0 a 20 cm de profundidad. Para completar la toma de muestras se realizó este mismo muestreo en el 10 % de las plantas por hilera al azar sobre el 40 % de las hileras recorriendo el lote. Con las submuestras se obtuvo una muestra compuesta pesando entre 2 a 4 kg de suelo por hectárea. Además se colectaron muestras de raíces.



Figura 2.12. Muestreo de suelo del olivar en Aimogasta, LR, Junio 2015

La Fig 2.13 muestra un ejemplar de olivo con grado 1 de afectación.



Figura 2.13. Ejemplar de olivo con grado 1 de afectación por rama seca

Este ejemplar presenta un grado incipiente de afectación, con síntomas observables de decaimiento y amarillez foliar.

La Fig. 2.14. muestra un olivo con grado 3 de afectación.



Figura 2.14. Olivo con grado 3 de afectación por rama seca

Este ejemplar presenta el máximo grado de afectación, con síntomas observables de desecación, amarillez, acartuchamiento y muerte.

La Fig. 2.15. muestra un olivo con grado 4 de afectación.



Figura 2.15. Olivo con grado 4 de afectación por rama seca

El olivar en estado de recuperación se muestra en la Fig. 2.16.



Figura 2.16. Olivar en estado de recuperación en el sitio BA (Junio 2006)

Durante el otoño del 2006 se registraron en 15 plantaciones de olivo en un rango de 300 a 400 hectáreas, la corona de la muerte regresiva y los síntomas de podredumbre radicular con una incidencia media de 2 en plantaciones de LR y 1 en la plantación de BA. En general, en LR se observó muerte de plantas y ramas secas (muerte parcial de ramas, brindillas y hojas). Se observó incidencia de patología causada por *Phytophthora palmivora*. Con referencia a la rama seca se estimó baja incidencia y gravedad en los árboles que recibieron limpieza y poda previamente, durante el año 2006.

Las elevadas temperaturas, restricciones sobre el riego por goteo y otras condiciones ambientales hacen pensar que esta patología podría estar asociada con una combinación de estrés de la planta añadido a la acción de diversos patógenos. Por otro lado se observó presencia de daño a causa de *Verticillium spp.* y *Fusarium spp.* en algunos árboles.

En BA la superficie del suelo presentaba cobertura vegetal y un tratamiento previo de una enmienda orgánica como abono. En este sitio se observó en todos los años de monitoreo, menor incidencia de enfermedad que en LR y en general las plantas se encontraban en estado de recuperación.

En tanto, durante el otoño del 2010 en 15 plantaciones de olivo en un rango de 300 a 400 hectáreas, la corona de la muerte regresiva y síntomas de podredumbre radicular se registraron con una incidencia media de 3 en plantaciones de LR y 1 en la plantación de BA.

Por otra parte, de la observación realizada cinco años después, durante el otoño del 2015, en 15 plantaciones de olivo en un rango de 300 a 400 hectáreas, se registró un aumento en la incidencia de la enfermedad. La corona de la muerte regresiva y síntomas de podredumbre radicular se registraron con una incidencia media de 4 en plantaciones de LR y 0 en la plantación de BA.

2.3.4. Caracterización fisicoquímica y biológica de suelos de los olivares

Las muestras de ambos suelos fueron procesadas en el laboratorio, homogeneizadas y tamizadas. Para estudios microbiológicos se realizaron diluciones decimales de las mismas tal como se muestra en la Fig. 2.17.



Figura 2.17. Procesamiento de las muestras

En cada unidad experimental, cinco muestras compuestas por 20 submuestras a tres profundidades (0 a 5 cm, 5 a 20 cm y 20 a 40 cm) fueron uniformemente distribuidas en un área de aproximadamente 1 hectárea.

Aproximadamente 4 Kg de suelo fue colectado y transportado al laboratorio. El suelo intacto se enfrió con hielo seco en el campo inmediatamente después de la colección y las muestras de la misma profundidad y sitio se mezclaron antes de ser tamizadas.

La Tabla 2.2. muestra las características fisicoquímicas de los suelos cultivados con olivares de La Rioja y de Buenos Aires.

Tabla 2.2. Características fisicoquímicas del suelo de olivares.

Caract\Trat	LRc	LRs	LRh	BAc	BAc	BAh
H	20,8±0,2a	20,20±0,2a	22,30±0,2a	24,3±0,3a	24,9±0,2a	25,1±0,2a
pH	9,00±0,8a	8,70±0,4a	9,00±0,4a	7,10±0,2b	7,10±0,3b	7,20±0,3b
MOS	13,4±0,3b	13,5±0,3b	13,2±0,3b	104,1±0,2a	82,8±0,3a	92,2±0,9a
N-Total	0,90±0,5b	1,00±0,5b	1,00±0,5b	5,30±0,5a	4,50±0,5a	3,90±0,5a
C/N	8,60±0,5a	7,70±0,5a	7,8±0,5a	11,4±0,5b	10,7±0,5b	13,8±0,5b
CE	0,78±0,7a	0,72±0,8a	0,81±0,7a	1,12±0,7b	1,15±0,9b	1,00±0,9b
N-NO3	37,1±0,2b	40,7±0,2b	39,8±0,2b	76,5±0,2a	73,3±0,2a	81,5±0,2a
Pi	6,00±0,5b	7,80±0,5b	6,50±0,5b	97,9±0,5a	96,6±0,5a	95,4±0,5a
CIC	6,00±0,5b	6,00±0,2b	5,80±0,2b	19,4±1,2a	22,8±1,2a	26,8±1,2a
K	1,88±0,2b	1,4±0,2b	1,48±0,2b	3,36±0,2a	3,3±0,2a	3,98±0,6a
Ca	34,45±0,2a	35,58±0,8a	36,31±0,2a	33,58±0,2a	29,91±0,2a	33,42±0,2a
Mg	0,97±0,2b	1,05±0,2b	0,99±0,2b	4,40±0,2a	5,06±0,2a	5,96±0,2a
Na	1,70±0,2b	1,72±0,2b	1,78±0,2b	2,90±0,2a	3,00±0,2a	3,50±0,2a
Zn	0,76±0,02b	0,77±0,02b	0,69±0,02b	12,80±0,02a	11,30±0,02a	11,10±0,02a
Mn	4,40±0,02b	4,40±0,02b	4,40±0,02b	18,30±0,02a	17,60±0,02a	15,70±0,02a
Cu	0,20±0,02b	0,19±0,02b	0,17±0,02b	1,23±0,02a	1,13±0,02a	1,04±0,02a
Fe	2,00±0,02b	2,00±0,02b	2,00±0,02b	36,6±0,02a	30,5±0,02a	29,1±0,02a
B	7,75±0,02a	7,87±0,02a	7,81±0,02a	8,88±0,02a	7,97±0,02a	8,67± 0,02a

Referencias: Datos de las variables fisicoquímicas del suelo, LR: suelo de olivar situado en La Rioja, BA: suelo de olivar situado en Buenos Aires, **s** sintomático por ataque fúngico, **h** olivar asintomático, **c** suelo sin cultivar lindero al olivar. Los datos mostrados representan la media de tres repeticiones (n=3) seguida de su desvío estándar para cada suelo. Valores medios con letras iguales por fila no son estadísticamente diferentes según el test de diferencia de medias (p=0,05).

A partir de los resultados de la Tabla 2.2 surge que los datos de pH resultaron significativamente superiores (p<0,05) en LR con respecto a BA. En tanto los datos de Calcio y Boro no presentaron diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) entre ambos sitios. En cambio los datos observados en las variables MOS, CIC, Nitrógeno total, Nitrógeno provenientes de nitratos, relación C/N, Fósforo, Potasio, Magnesio, Sodio, Cinc, Manganeso, Cobre y Hierro presentaron diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) siendo superiores en BA con respecto a LR.

Por otra parte, la Tabla 2.3. muestra los resultados de las variables biológicas globales medidas en los suelos correspondientes a los olivares de los sitios de La Rioja y de Buenos Aires. El coeficiente biológico del suelo fue significativamente superior ($p < 0,05$) en LR con respecto a BA en los primeros 5 cm. En tanto el coeficiente metabólico no presentó variación entre ambos sitios.

Tabla 2.3. Características biológicas globales del suelo de olivares

Tratamientos	Características			
	RES (1)	Cmic (1)	C-CO2/C-MOS	Cmic/C-MOS
BAs				
0 a 5 cm	371± 0,2b	209± 0,2b	1,77b	1,15b
5 a 20 cm	307± 0,2b	186± 0,2b	1,38b	1,02c
20 a 40 cm	201± 0,2c	171± 0,2c	1,17c	0,93c
BAh				
0 a 5 cm	267± 0,3b	210± 0,5b	1,78b	1,18b
5 a 20 cm	351± 0,3b	202± 0,3b	1,73b	1,14b
20 a 40 cm	233± 0,3c	196± 0,5b	1,18c	1,66a
BAc				
0 a 5 cm	398± 0,2a	239± 0,2a	1,66b	1,26a
5 a 20 cm	313± 0,2c	211± 0,2b	1,55c	1,11b
20 a 40 cm	241± 0,2c	196± 0,2b	1,22c	1,03c
LRs				
0 a 5 cm	421± 0,2a	213± 0,2b	2,14a	1,18b
5 a 20 cm	307± 0,2b	206± 0,2b	1,89a	1,14b
20 a 40 cm	258± 0,2c	181± 0,2b	1,42b	1,00c
LRh				
0 a 5 cm	225± 0,2c	209± 0,2b	2,04a	1,21b
5 a 20 cm	218± 0,2c	180± 0,2b	1,43c	1,05c
20 a 40 cm	252± 0,2c	179± 0,2b	1,41c	1,04c
LRc				
0 a 5 cm	265± 0,2c	233± 0,2a	2,05a	1,23b
5 a 20 cm	274± 0,2c	226± 0,2a	1,83a	1,19b
20 a 40 cm	361± 0,2b	197± 0,2b	1,83a	1,03c
p	0,05	0,05	0,05	0,05
(1): $\text{mgCO}_2 \cdot \text{Kgss}^{-1} \cdot 10 \text{ d}^{-1}$				

Referencias: LR: suelo de olivar situado en La Rioja, BA: suelo de olivar situado en Buenos Aires, **s** sintomático por ataque fúngico, **h** olivar asintomático, **c** suelo sin cultivar lindero al olivar. Los datos mostrados representan la media de tres repeticiones (n=3) seguida de su desvío estándar para cada suelo. Valores medios con letras iguales por columna no son estadísticamente diferentes al test de diferencia de medias (p=0,05).

2.3.5. Caracterización bioquímica de suelos de los olivares

Las unidades de expresión de las actividades enzimáticas determinadas son las siguientes para la actividad fosfomonoesterasa (Fm), actividad fosfodiesterasa (Fd), β -glucosidasa (β -Glu) es [$\mu\text{mol pNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$], para ureasa (U) es [$\mu\text{mol N-NH}_4^+\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$], para catalasa (Cat) es [$\text{mmol H}_2\text{O}_2$ consumido por $\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$] y para deshidrogenasa (DH) es [$\mu\text{mol INTF g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$].

Tabla 2.4. Características bioquímicas del suelo de olivares

Suelo	Fm	Fd	U	Cat	β -Glu	DH
LRs 0-5 cm	0,2±0,001a	0,2±0,001a	28,3±0,003a	2,9± 0,002a	2,8±0,002a	3,4±0,004a
LRs 5-20 cm	0,1±0,001a	0,2±0,001a	29,1±0,001a	2,9± 0,002a	1,8±0,003a	3,9±0,001a
LRc 0-5 cm	0,2±0,001a	0,1±0,001a	22,1±0,003a	0,3± 0,002b	0,3±0,002b	0,7±0,004b
LRc 5-20 cm	0,2±0,001a	0,1±0,001a	21,5±0,001a	0,4± 0,002b	0,4±0,003b	0,7±0,002b
LRh 0-5 cm	0,2±0,001a	0,2±0,001a	31,5±0,003a	0,2± 0,002b	0,4±0,002b	0,4±0,004b
LRh 5-20 cm	0,2±0,001a	0,2±0,001a	28,3±0,003a	0,2± 0,002b	0,2±0,002b	0,4±0,004b
BA s 0-5 cm	0,2±0,001a	0,1±0,001a	29,5±0,004a	2,3± 0,002a	3,1±0,002a	3,9±0,004a
BA s 5-20 cm	0,2±0,004a	0,3±0,001a	30,1±0,001a	2,2± 0,002a	3,2±0,003a	3,9±0,001a
BAc 0-5 cm	0,2±0,001a	0,4±0,001a	28,9±0,003a	0,1± 0,002b	0,2±0,002b	3,8±0,004a
BAc 5-20 cm	0,2±0,001a	0,1±0,001a	28,1±0,001a	0,1± 0,002b	0,8±0,003b	3,8±0,001a
BAh 0-5 cm	0,2±0,001a	0,1±0,001a	31,1±0,001a	0,1± 0,002b	2,1±0,003a	4,7±0,001a
BAh 5-20 cm	0,2±0,001a	0,1±0,001a	28,5±0,001a	0,9± 0,002b	2,8±0,003a	4,7±0,001a

Referencias: LR: suelo de olivar situado en La Rioja, BA: suelo de olivar situado en Buenos Aires, **s** sintomático por ataque fúngico, **h** olivar asintomático, **c** suelo sin cultivar lindero al olivar. Los datos mostrados representan el promedio de tres repeticiones (n=3) con su desvío estándar para cada suelo y profundidad. El promedio de los datos con letras iguales por columna no son estadísticamente al test de diferencia de medias (p=0,05).

Los datos observados en la Tabla 2.4. muestran las actividades enzimáticas encontradas en los suelos de olivares en los diferentes sitios. El rango de actividad de la enzima fosfomonoesterasa fue de 0,1 a 0,2 $\mu\text{mol pNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, mientras que para la actividad fosfodiesterasa fue de 0,1 a 0,4 $\mu\text{mol pNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. El rango de actividad catalasa fue de 0,1 a 2,9 $\text{mmol H}_2\text{O}_2$ consumido por $\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Para la actividad ureasa los valores oscilaron entre 21,5 y 31,1 $\mu\text{mol N-NH}_4^+\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Los valores para la actividad de la enzima β -glucosidasa fue de 0,2 a 3,2 $\mu\text{mol pNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. El rango de actividad deshidrogenasa fue de 0,4 a 4,7 $\mu\text{mol INTF g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

Las actividades fosfomono y diesterasas y ureasas no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los sitios BA y LR ($p<0,05$) como así tampoco entre los tratamientos en cada sitio ni entre cada profundidad de suelo estudiada. Por su parte la actividad de la enzima deshidrogenasa fue máxima en suelo BA coincidentemente con la presencia de un mayor aporte de materia orgánica. En tanto en LR, la actividad deshidrogenasa fue significativamente superior ($p<0,05$) en presencia del patógeno en el suelo.

Por su parte la actividad catalasa fue máxima en presencia del patógeno para ambos suelos, fue la única enzima que se asoció con la presencia del patógeno independientemente del clima y tipo de suelo. Mientras que la actividad de la enzima β -glucosidasa mostró diferencias estadísticamente significativas en presencia del patógeno con respecto al suelo control y de olivares asintomáticos en el sitio LR. Por tanto esta enzima se comportó como indicador sensible a la presencia de patógenos en el suelo. Lo mismo fue observado para las enzimas deshidrogenasa y catalasa.

Significativamente la presencia del patógeno en LR se asoció con la mayor actividad de las enzimas DH, Cat y β -Glu para las profundidades 0-5 cm y 5-20 cm. La actividad catalasa fue la enzima que se relacionó con la presencia del patógeno en todas las profundidades independientemente del clima y tipo de suelo. En resumen la presencia del patógeno en el suelo se asoció con la mayor actividad catalasa independientemente del clima y del tipo de suelo. Y en conjunto, las enzimas catalasa, deshidrogenasa y β -Glu se asociaron con la presencia del patógeno en el sitio LR.

La Fig. 2.18. muestra el biplot de las primeras componentes principales realizadas a partir de todo el conjunto de variables estudiadas en este Capítulo. En la misma pueda observarse que en el suelo más arenoso la saturación de calcio y el cociente metabólico se encontraron positivamente relacionados. A su vez estas variables estuvieron relacionadas

negativamente con respecto a la saturación de magnesio, el contenido de potasio, el contenido de nitratos, la materia orgánica, el contenido de sodio, y el contenido de carbono total y nitrógeno total.

Todas estas variables fueron explicadas por la componente principal 1, la cual expresó el 60,4 % de la variabilidad de los suelos estudiados. Por otra parte puede observarse una fuerte asociación entre las variables biológicas y bioquímicas del suelo, RES, DH, β -Glu y Cat.

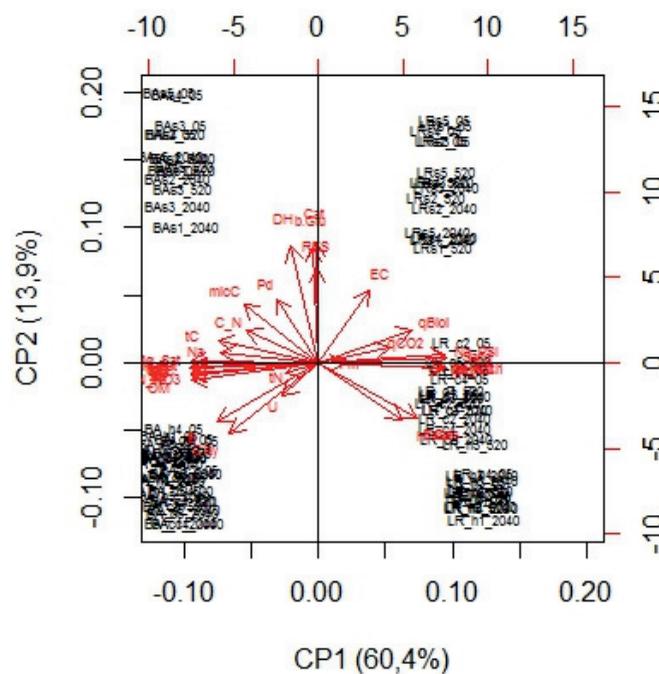


Figura 2.18. Biplot de las variables globales.

En relación con las variables biológicas RES se asoció con la presencia de patógeno independientemente del clima y tipo de suelo. No obstante, RES fue mayor en el suelo sin perturbar y con enmienda orgánica (BAc). Por otra parte, Cmic respondió al igual que RES siendo más elevado en suelo sin cultivar en los primeros 5 cm de profundidad independientemente del clima y tipo de suelo. En LR, el qCO₂ fue menor en el suelo sin cultivar.

Por otra parte, se estudió el comportamiento de las variables biológicas del suelo con respecto a la presencia o ausencia del patógeno (Fig. 2.19). A efectos de evaluar si las mismas estaban relacionadas se realizó un análisis multivariado de componentes principales. El mismo logró explicar el 70 % de la varianza del sistema.

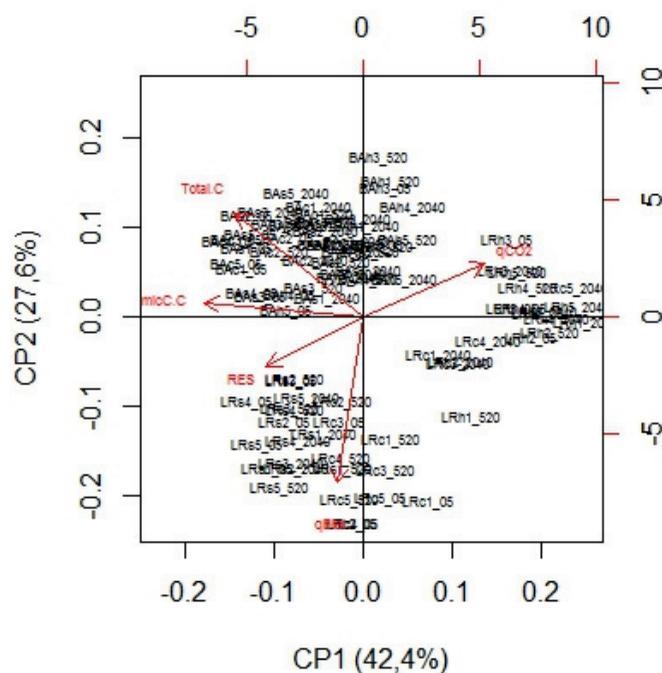


Figura 2.19. Biplot de las variables biológicas.

En tanto, se estudió el comportamiento de las variables bioquímicas del suelo con respecto a la presencia o ausencia del patógeno (Fig. 2.20). A efectos de evaluar si estaban relacionadas se realizó un análisis multivariado de componentes principales. El mismo logró explicar el 84 % de la varianza del sistema.

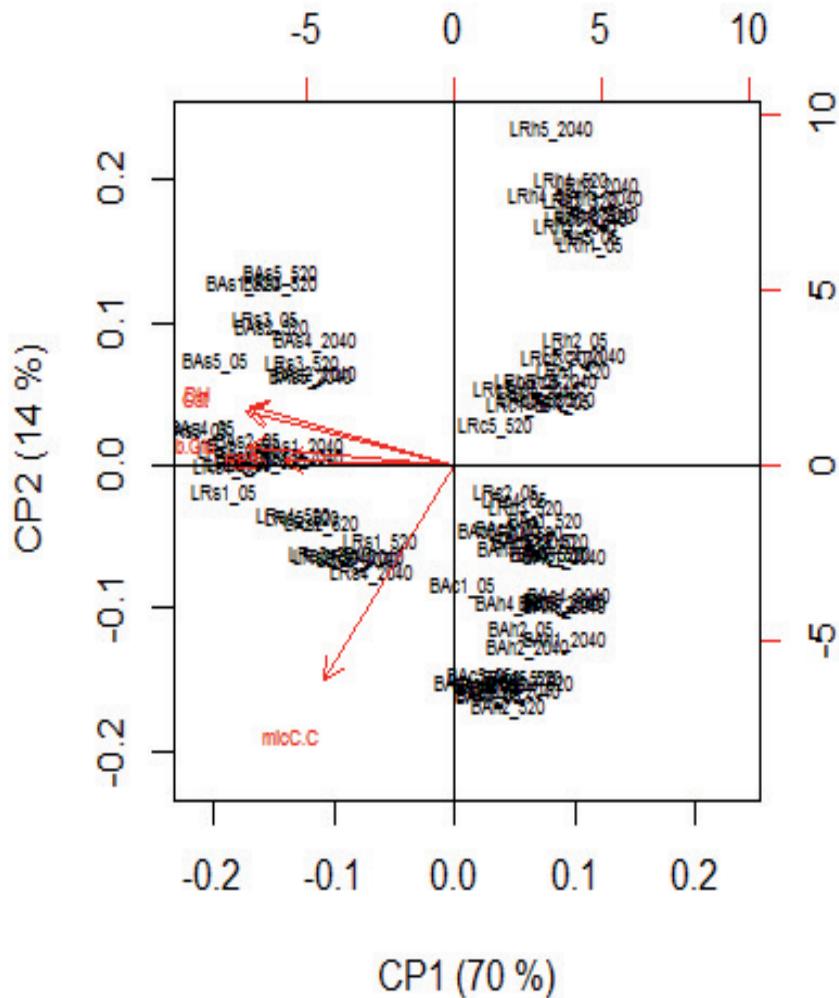


Figura 2.20. Biplot de las variables bioquímicas.

Con respecto al análisis funcional de las comunidades bacterianas de cada suelo medido por utilización de fuentes únicas de carbono, se registraron diferencias estadísticamente significativas con mayor variabilidad en los perfiles del suelo LR y frente al BA. La Tabla 2.5 muestra los resultados de los índices microbiológicos de los suelos obtenidos a partir del análisis de perfiles funcionales a nivel de comunidades bacterianas.

Tabla 2.5. Índices microbiológicos de suelos de olivares

	AWCD	R	H
LRs			
0-5 cm	0,703a	19a	3,26a
5-20 cm	0,878a	20a	3,11a
LRh			
0-5 cm	0,526b	17b	1,89b
5-20 cm	0,484b	17b	1,78b
LRc			
0-5 cm	0,512b	17b	1,15b
5-20 cm	0,439b	16b	1,01b
BA s			
0-5 cm	0,895a	20a	3,91a
5-20 cm	0,849a	19a	3,89a
BAh			
0-5 cm	0,517b	15b	1,18b
5-20 cm	0,573b	15b	1,11b
BAc			
0-5 cm	0,483b	15b	1,92b
5-20 cm	0,441b	15b	1,79b

Referencias: **LRs:** suelo de olivar sintomático de *P. palmivora* situado en La Rioja; **LRh:** suelo de olivar asintomático situado en La Rioja; **LRc:** suelo sin cultivar lindero al olivar situado en La Rioja; **BA s:** suelo de olivar sintomático por ataque fúngico situado en Buenos Aires; **BAh:** suelo de olivar asintomático situado en Buenos Aires; **BAc:** suelo sin cultivar lindero al olivar situado en Buenos Aires.

2.4. Discusión

En el marco del paradigma de investigación positivista y desde un enfoque holístico, se realizó el presente estudio sobre dos suelos de olivares en Argentina. Para ello se tuvieron en cuenta las bases de esta posición metodológica y epistemológica en referencia a cómo los sistemas y sus propiedades, deben ser analizados en su conjunto y no sólo a través de las

partes que lo componen tal como publicó Jaulin, A. (1999). En este caso de estudio, aún analizadas las partes separadamente, se estudió el sistema como un todo integrado y global determinando la contribución individual de las partes a los procesos biológicos del ecosistema suelo.

Las partes estudiadas fueron el monitoreo sanitario de los olivos, los aspectos bioquímicos y microbiológicos del suelo rizosférico de los olivos y los aspectos fisicoquímicos de dichos suelos. Acorde con ésto resultaría muy importante predecir con suficiente anticipación el posible desarrollo de una enfermedad del olivo sobre la base del análisis multivariado utilizando indicadores ambientales que incluyeran diferentes áreas de investigación frente al mismo objeto de estudio acorde con Freitez *et al.*, (2009) y Bombelli, E.C. (2011).

Así como publicaron Bardgett y Wardle (2010) los resultados de la interacción entre los procesos que vinculan la superficie y la profundidad del suelo determinan la gobernabilidad de los procesos microbiológicos del ecosistema. En este sentido y considerando la superficie del suelo como una de las partes de estudio, se llevó a cabo *el monitoreo sanitario de los olivares* durante los años 2006, 2010 y 2015 según Pérez *et al.*, (2004). Considerando otra de las partes de estudio, la evaluación de *los aspectos bioquímicos y microbiológicos* en la profundidad del suelo se analizaron según Paz-Ferreiro *et al.*, 2007, Rossi, M.S. (2008) y Paz-Ferreiro y Fu (2014).

Otra de las partes de estudio fueron *los aspectos fisicoquímicos de los suelos* los cuales se analizaron desde tres pools o compartimentos de los principales nutrientes del suelo. En lo referente al carbono, se evaluó el carbono total, el carbono proveniente de biomasa microbiana, el carbono orgánico, el cociente metabólico, el cociente biológico y la actividad de la enzima β -glucosidasa vinculada con el ciclo del carbono. En cuanto al ciclo biogeoquímico del nitrógeno, se evaluó el nitrógeno total, el nitrógeno proveniente de nitratos y la actividad ureasa.

En cuanto al ciclo del fósforo se evaluó el contenido de fósforo y las actividades enzimáticas fosfomonoesterasas y fosfodiesterasas. Y por otra parte, se evaluó la actividad microbiana que interacciona con estos pools de nutrientes mediante la determinación de las actividades enzimáticas catalasas y deshidrogenasas. En este sentido, el monitoreo del panorama sanitario de los olivares y la caracterización fisicoquímica, biológica y bioquímica de los suelos de olivares se presentaron en este Capítulo.

Como resultados del monitoreo del panorama sanitario de los olivares en LR se observó muerte de plantas y ramas secas, principalmente, la muerte parcial de ramas, brindillas y

hojas. En general se encontró elevada incidencia de patología causada por *P. palmivora* durante el año 2006, con escasa afectación a nivel de la planta, es decir, grados de afectación entre 1 y 2, representando menos del 25 % de partes afectadas en cada ejemplar de olivo y un 10 % del olivar. En tanto, en el año 2010, la incidencia de la enfermedad fue mayor en LR, reportándose afectación de grado 2 y 3 y un 30 % del olivar. En la última observación realizada en Junio 2015, el grado de afectación fue superior a 4, ésto refería a más de un 75 % de afectación de la planta y a un 50 % del olivar.

En referencia al monitoreo de rama seca se estimó baja incidencia y gravedad en los árboles que recibieron limpieza y poda previamente. Las elevadas temperaturas, restricciones sobre el riego por goteo y otras condiciones ambientales condujeron a pensar que esta patología podría estar asociada con una combinación de estrés de la planta añadido a la acción de diversos patógenos. Por otro lado se observó presencia de daño a causa de *Verticillium spp.* y *Fusarium spp.* en algunos árboles.

En tanto, en BA la superficie del suelo presentaba cobertura de residuos vegetales secos y el suelo había recibido un tratamiento con enmienda orgánica. Sólo en el año 2006 se observó la presencia del patógeno *Phyllosticta panizzei* ocasionando lesiones necróticas en el ápice de la lámina foliar. Asimismo en el sitio BA, se observó menor incidencia de enfermedad que en LR y en general las plantas se encontraban en estado de recuperación durante el año 2006. En los años siguientes la incidencia de patógenos tendió a desaparecer.

Como resultado de la caracterización fisicoquímica realizada en los suelos a profundidades de 0 a 5 cm, de 5 a 20 cm y de 20 a 40 cm, fue posible decir que los datos de pH resultaron significativamente superiores ($p < 0,05$) en LR con respecto a BA. En tanto los datos de las variables Calcio y Boro no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ambos sitios. En cambio los datos observados en las variables humedad, materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, Nitrógeno total, Nitrógeno proveniente de Nitratos, relación Carbono y Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Magnesio, Sodio, Cinc, Manganeso, Cobre y Hierro presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) siendo superiores en BA con respecto a LR, tal como se muestra en la Tabla 2.2.

Doran y Parkin (1994) incluyeron a la materia orgánica como el componente más importante a seleccionar entre un grupo de datos mínimos y necesarios para definir la calidad del suelo. En particular, la materia orgánica del suelo se considera un indicador químico significativo de calidad, según Larson y Pierce (1991), razón por la cual dicha variable fue evaluada.

Desde otro punto de vista, las características bioquímicas y biológicas del suelo fueron

utilizadas como indicadores de calidad del suelo siendo sensibles a cambios tanto de condiciones de manejo del suelo, según Paz-Ferreiro y Fu, (in press) como al uso del suelo, según Paz-Ferreiro *et al.*, (2007). Es sabido que en los últimos años se realizaron numerosos trabajos para entender cómo los microorganismos interactúan entre sí y cómo gobiernan la funcionalidad del ecosistema suelo. En particular, el estudio de las relaciones sobre y bajo la superficie del suelo estudiadas por Bardgett y Wardle (2010) es un campo de investigación que avanza rápidamente.

Sin embargo, para nuestro conocimiento existen pocos trabajos que relacionen la calidad del suelo y la supresión de enfermedades, según Janvier *et al.*, (2007), y muy pocos estudios se focalizan en el uso de las características biológicas del suelo en particular de las enzimas en relación con la supresividad natural edáfica. Avanzando en el estudio, la caracterización biológica de los suelos se realizó según Alef y Nannipieri (1995), Abril *et al.*, (2005), Piquín *et al.*, (2006) y Rossi *et al.*, (2008). Entre las variables biológicas globales estudiadas se encuentra la respiración basal del suelo en los diferentes suelos en LR y como en BA y en diferentes estados de sanidad del olivo es decir en presencia y en ausencia síntomas del patógeno en raíz, tal como se muestra en la Tabla 2.3.

La actividad respiratoria fue medida por la producción de CO₂ teniendo en cuenta que es un indicador global de la actividad de los organismos aerobios del suelo debido a que la degradación de la materia orgánica es una propiedad de los microorganismos heterótrofos, según Anderson y Domsch (1990). Esta determinación fue realizada para estimar la actividad biológica global de los suelos a diferentes profundidades influidas por las raíces de olivos, es decir, de 0 a 5, 5 a 20 y 20 a 40 cm. Como resultado fue posible observar que en BA, en presencia de olivares sintomáticos, el rango de RES fue de 201 a 371 mgCO₂.kgss⁻¹, el rango de RES en el suelo de olivos asintomáticos fue de 233 a 351 mg CO₂.kgss⁻¹ y de 213 a 398 mg CO₂.kgss⁻¹ para el suelo control sin cultivar. Mientras tanto en LR el rango de RES fue de 258 a 421 mg CO₂.kgss⁻¹ para el suelo con olivares sintomáticos, un rango de 218 a 252 mgCO₂.kgss⁻¹ en suelos con olivares asintomáticos y de 265 a 361 mg CO₂ mg CO₂.kgss⁻¹ para el suelo control.

A partir de la comparación de todos los tratamientos fue posible concluir que la mayor actividad respiratoria se verificó en el tratamiento control o suelo sin cultivar, tanto en LR en BA, lo cual resulta coincidente con lo observado por Piquín *et al.*, (2006). En concordancia con la respuesta biológica de los suelos sin cultivar hallada en los trabajos de Abril *et al.*, (2005) y Rossi, M.S. (2008). Además fue posible hallar una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la respiración del suelo a favor de BA y los controles de suelo sin

cultivar, con respecto al suelo de olivares LR, lo cual globalmente, podría estar indicando mayor actividad biológica en el sitio con mayor aporte de residuos orgánicos como cobertura.

Esta información se relaciona directamente con lo encontrado por Abril *et al.*, (2005) pues publicaron que la tasa de perturbación del suelo y la cobertura superficial produce cambios sustanciales en los procesos de descomposición de los residuos vegetales, principalmente aquellos relacionados con la acumulación de carbono orgánico y la disponibilidad de nutrientes.

Otro de los índices utilizados para estudios biológicos del suelo, ampliamente aceptado es el cociente metabólico (qCO_2), el cual representa la respiración del suelo por unidad de biomasa calculada según la fórmula de Anderson y Domsch (1993). De acuerdo con Scheu y Parkinson (1995) en este trabajo se observó una disminución del qCO_2 conforme aumentó la profundidad del suelo. Estas diferencias podrían ser atribuidas a una proporción más significativa de organismos fisiológicamente activos en relación con residuos de las plantas.

En concordancia con este resultado se observó que la actividad deshidrogenasa disminuyó conforme aumentó la profundidad del suelo. Los datos superiores de qCO_2 indican que los microorganismos son menos eficientes en el uso de fuentes energéticas o bien que ellos son más eficientes como descomponedores de los residuos orgánicos. El criterio qCO_2 se sugiere como indicador adecuado en el estudio de cambios bioenergéticos en ecosistemas en desarrollo según Odum, E. (1969) y para la maduración progresiva del sistema del suelo, según Anderson y Domsch (1990). El uso del criterio qCO_2 como indicador específico de cambio de suelos puede ser recomendado cuando se observan similares valores de pH, según Anderson y Domsch (1993). De acuerdo con estos autores, qCO_2 valores más altos en ecosistemas jóvenes y más bajos en ecosistemas maduros.

Así como se demostró en este trabajo, los valores más bajos de qCO_2 se observaron siempre en el suelo BA. En el mismo sentido, se observó una correlación positiva ($p < 0,05$) entre las actividades biológicas globales y las características químicas del suelo. Cmic fue significativamente más alto en suelo control en ambos sitios, independientemente del clima, tipo de suelo y profundidad.

Debido a que la biomasa microbiana del suelo tanto como la fracción activa de la materia orgánica responde más rápidamente que la MOS a todos los cambios en el manejo, en el clima, entre otros factores, la biomasa microbiana y la relación entre la biomasa microbiana y la MOS, fueron propuestos como indicadores del estado y de los cambios de la MOS total del suelo, según los autores Dick, R.P. (1992), Powlson, D.D. (1994) y Pankhurst y Lynch (1995). Dada la importancia de dicha variable es que fue analizada en el presente

trabajo donde se halló que en BA en presencia de sintomatología a causa del patógeno en BA el rango de Cmic encontrado fue de 171 a 209 mg CO₂.Kgss⁻¹, en ausencia de sintomatología el rango fue 196 a 210 mg CO₂.Kgss⁻¹ y un rango de 196 a 239 mg CO₂.Kgss⁻¹ en el suelo control sin cultivar. Por otra parte en ausencia de sintomatología a causa del patógeno en suelo en LR el rango de Cmic observado fue de 179 a 209 mg CO₂.Kgss⁻¹. En el suelo LR control sin cultivar el rango de Cmic observado fue de 197 a 233 mg CO₂.Kgss⁻¹. Los datos presentaron homogeneidad tanto en los tratamientos en LR y así como en BA.

Por lo expuesto en lo vinculado con las variables biológicas globales podría decirse que se hallaron evidencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para decir que resultan sensibles al manejo del suelo, presentando valores más elevados en suelos sin cultivar, pero no fueron sensibles a la presencia del patógeno en los suelos estudiados y para todas las profundidades. Todos los estudios realizados dentro de la evaluación de las variables biológicas globales en los objetivos específicos propuestos en el presente trabajo pudieron cumplirse en su totalidad. Sin embargo es sabido que la alteración de las condiciones del suelo por las prácticas de manejo puede afectar la producción de los cultivos a través de su influencia en la distribución de la materia orgánica, actividad microbiana y dinámica de nutrientes, según Salinas-García *et al.*, (1997). Por todo lo expuesto se procedió a buscar variables bioquímicas capaces de reflejar el estado actual del suelo.

Nannipieri *et al.*, (1990) indicaron que las actividades enzimáticas son específicas de un sustrato y están relacionadas con reacciones específicas. Por ello, resulta dificultoso conseguir mediante un solo valor de actividad enzimática, el conocimiento del estado general de nutrientes de un suelo o determinar el índice de actividad microbiológica del mismo. Sin embargo medidas simultáneas de varias enzimas pueden resultar útiles como marcadores de bioactividad y pueden ser utilizadas como índices de fertilidad bioquímica del suelo, tal como indicaron Gil-Sortres *et al.*, (1992).

Con respecto a la caracterización bioquímica de los suelos se midió la actividad microbiana mediante metodología enzimática considerando un perfil compuesto por seis enzimas presentes en el suelo tal como publicaron García y Hernández., (2005), Paz-Ferreiro *et al.*, (2007) y Rossi *et al.*, (2008). Las enzimas del suelo son importantes como catalizadores de numerosas reacciones necesarios para el proceso de vida de los microorganismos en el suelo, la descomposición de los residuos orgánicos, el ciclado de nutrientes, y la formación de la materia orgánica y la estructura del suelo, según Monkiedje *et al.*, (2006). La actividad enzimática del suelo es la responsable de la formación de moléculas orgánicas estables que contribuyen a la estabilidad del ecosistema suelo e intervienen en los

ciclos de los nutrientes tales como el nitrógeno, donde intervienen por ejemplo, ureasas y proteasas, en el ciclo del fósforo donde intervienen fosfomono y diesterasas y en el ciclo del carbono donde intervienen β -glucosidasas.

Por la relevancia expuesta vinculada a las actividades enzimáticas es que se propuso como objetivo específico evaluar variables bioquímicas. A su vez dentro de este objetivo específico se propuso determinar la actividad de las enzimas deshidrogenasas vinculadas estrechamente a la actividad metabólica de la microbiota edáfica presente en los suelos de olivares.

La actividad deshidrogenasa es un indicador del sistema redox microbiano debido a que es el principal indicador de la actividad oxidativa del suelo y un indicador general del carbono orgánico presente en el suelo debido a que esta enzima está involucrada en la etapa final de la degradación de descomponedores derivados de celulosa de bajo peso molecular acumulado en el suelo hasta la liberación de glucosa. García y Hernández, (2005) encontraron valores medios de actividad deshidrogenasa de alrededor de $9 \mu\text{mol INTF.gss}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en suelos naturales. En cuanto al objetivo específico de estudiar el perfil bioquímico del suelo se encontraron los siguientes resultados.

La actividad deshidrogenasa del suelo BA fue de $3,9 \mu\text{mol INTF.gss}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en el suelo de olivares sintomáticos, de $4,7$ en el suelo de olivares asintomáticos y de $3,8$ en el suelo control sin cultivar. En tanto en el sitio LR la actividad deshidrogenasa fue de $3,1$ a $3,9 \mu\text{mol INTF.gss}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en el suelo de olivares sintomáticos, de $0,4 \mu\text{mol INTF.gss}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en el suelo de olivares asintomáticos y de $0,7 \mu\text{mol INTF.gss}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en el control de olivo sin cultivar. Por lo expuesto se observó mayor actividad deshidrogenasa ($p < 0,05$) en el suelo BA que además incluía mayor contenido de materia orgánica comparado con el suelo LR.

Debido a que dichas enzimas no son activas independientemente de la célula microbiana como es el caso de las enzimas extracelulares del suelo la determinación de la actividad deshidrogenasa puede considerarse como una variable indicadora de la actividad microbiológica del suelo tal como lo evaluaron García *et al.*, (1994), Beyer *et al.*, (1982), Quilchano y Maraño, (1993) y Bergstrom *et al.*, (1998). En este sentido podría decirse se observó mayor actividad microbiológica en el suelo del olivar del sitio BA. La actividad microbiana basada en DH mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) más altas en BA con respecto a LR. En este estudio DH fue significativamente más alta en presencia de patógenos radiculares del olivo en el sitio LR.

Por otra parte, otra de las variables de naturaleza bioquímica propuesta como objetivo específico dentro del perfil enzimático a estudiar, se encontró la determinación de la actividad de la enzima catalasa, altamente vinculada con la actividad microbiana del suelo. En este estudio se encontró que tanto en LR como en BA, también fue la actividad enzimática que junto con otras permitió caracterizar los suelos en presencia del patógeno.

Otra de las variables de naturaleza bioquímica propuesta como objetivo específico dentro del perfil enzimático a estudiar, se encontró la determinación de la actividad β -glucosidasa, altamente vinculada con el ciclo biogeoquímico del carbono. En el presente trabajo el rango de actividad β -glucosidasa observado en LR fue de 1,8 a 2,8 $\mu\text{mol pNP.gss}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en suelos con olivares sintomáticos, de 0,2 a 0,4 en suelos con olivares asintomáticos y de 0,2 a 0,8 $\mu\text{mol pNP.gss}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en el control de suelo sin cultivar. En tanto en BA fue de 3,1 a 3,2 $\mu\text{mol pNP.gss}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en suelos con olivares sintomáticos, de 2,1 a 2,8 en suelos de olivares asintomáticos y de 0,2 a 0,8 $\mu\text{mol pNP.gss}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en el control de suelo sin cultivar. La actividad β -glucosidasa presentó diferencias significativas entre ambos sitios de estudio.

Por lo expuesto podría decirse que la actividad β -glucosidasa presentó variación entre los diferentes estados de sanidad de los olivos del mismo sitio geográfico observándose mayor actividad en la condición de olivos sintomáticos por *P. palmivora*.

Otra de las variables bioquímicas medidas fue la actividad ureasas del suelo. Bajo la designación de ureasa se aglutinan todas las hidrolasas capaces de actuar sobre enlaces C-N no peptídicos de amidas lineales. Son enzimas exocelulares de origen fundamentalmente microbiano, como así lo demostraron Ceccanti y García (1994). El rango de actividad ureasa en BA fue de 29,5 a 30,1 $\mu\text{mol NH}_4\text{-N.gss}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en presencia del patógeno, de 28,5 a 31,1 $\mu\text{mol NH}_4\text{-N.gss}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en suelo de olivares no sintomáticos y de 28,1 a 28,9 $\mu\text{mol NH}_4\text{-N.gss}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en el control.

En tanto en LR la actividad ureasa en suelo fue de 28,3 a 29,1 $\mu\text{mol NH}_4\text{-N.gss}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en presencia del patógeno, de 28,3 a 31,5 $\mu\text{mol NH}_4\text{-N.gss}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en olivares no sintomáticos por *P. palmivora* y de 21,5 a 22,1 $\mu\text{mol NH}_4\text{-N.gss}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para el suelo control. La actividad ureasa se determinó en LR, en presencia y en ausencia del patógeno y los resultados obtenidos no permitieron realizar ninguna discriminación entre tratamientos ya que presentaron valores muy similares.

En la determinación de ureasas del suelo en BA la actividad ureasa encontrada en suelos en presencia y en ausencia del patógeno tampoco mostró una diferenciación clara para los tratamientos que permitan evaluar el efecto de la incidencia del patógeno sobre el perfil metabólico del suelo evaluado. La enzima ureasa en olivares LR a profundidad de 5 a 10 cm

fue significativamente inferior ($p < 0,05$) no obstante no tuvo significado de impacto vinculado con la presencia del patógeno.

Por lo expuesto en el presente trabajo pudo observarse que la actividad ureasa no presentó diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los sitios estudiados, por lo que no se comportó como variable estadísticamente indicadora de cambio ante la perturbación y/o ante la incidencia del patógeno en el suelo. En tanto el objetivo de evaluar la actividad ureasa pudo cumplirse totalmente.

Contrariamente a lo observado en la determinación de la actividad deshidrogenasa, catalasa y β -glucosidasa, las actividades ureasa y fosfatasas mostraron similitudes en los resultados correspondientes a ambos sitios de muestreo y en las diferentes estados de sanidad por lo que no mostraron diferencias estadísticamente significativas ante la presencia del patógeno o ante la perturbación del suelo. No obstante y con respecto al objetivo específico planteado referido a la evaluación de variables bioquímicas para describir el suelo, el cual incluía las determinaciones de actividades fosfomonoesterasas y fosfodiesterasas, deshidrogenasas, ureasas, β -glucosidasas, y catalasas podría decirse que el mismo fue cumplido en su totalidad. Entonces a partir de dicho análisis podría decirse que las variables bioquímicas estudiadas permitieron observar variaciones más discriminantes en el estado del suelo a diferencia de las variables biológicas por lo que podrían postularse dentro de un perfil de otras variables como indicadores de cambio en el estado del suelo frente a un patógeno.

Como conclusión de este análisis el suelo LR en presencia del patógeno mostró mayor respuesta de actividad enzimática comparado con el suelo BA en presencia del patógeno. En ambos sitios de estudio el suelo control sin cultivar mostró mayor actividad enzimática en general, por lo que podría decirse que se observa mayor actividad biológica en los suelos menos perturbados independientemente del tipo de suelo.

Las actividades enzimáticas β -glucosidasa, deshidrogenasas y catalasa fueron más altas en presencia de hongos de raíz, independientemente del tipo de suelo y clima, para los primeros 5 cm de profundidad. La actividad microbiana basada en DH fue superior en BA que en LR ($p < 0,05$) y DH fue más alta en suelo rizosférico con olivos con raíces sintomáticas por ataque fúngico. La actividad basada en actividad catalasa fue más alta en LR que en BA ($p < 0,05$) en suelo rizosférico de olivo enfermo independientemente de tipo de suelo y clima.

La actividad microbiana basada en β -glucosidasa fue superior en BA con respecto a LR ($p < 0,05$) en suelo rizosférico de olivo con raíces enfermas por ataque fúngico. En tanto las actividades ureasas y fosfoesterasas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. En este trabajo el suelo LR en presencia de patógenos en raíz presentó

mayor bioactividad que en ausencia del patógeno dado por el perfil conjunto de catalasa, deshidrogenasa y β -glucosidasa.

A partir del análisis de componentes principales basado en las variables biológicas y bioquímicas estudiadas en los suelos LR y BA, se desprende que las variables bioquímicas mostraron en un 84 % mejor diferenciación que las variables biológicas que explicaron tan sólo el 69 % de la variabilidad del sistema. En este trabajo las enzimas β -glucosidasa, deshidrogenasa, catalasa fueron las variables que difirieron en los suelos estudiados segregando en dos grupos. Se observó una fuerte asociación en LRs entre las actividades deshidrogenasas, catalasas y β -glucosidasas.

El gráfico de rangos indicó que los suelos fueron definidos en dos grupos LRC, LRh, BAc y BAh por un lado y LRs y BAs por otro, lo que sugirió la presencia del patógeno podría tener un efecto en las características estudiadas del suelo. Las variables estudiadas en ambos suelos mostraron la misma variabilidad en cada suelo. A partir del análisis estadístico del perfil enzimático el cual mostró resultados de la actividad deshidrogenasa en LR y en BA, fue posible observar claramente que la actividad deshidrogenasa en suelo BA es máxima con respecto a LR, en tanto no fue una variable capaz de discriminar presencia y ausencia del patógeno. Por lo expuesto podría sugerirse que un mayor aporte orgánico mejora notablemente la actividad metabólica de la microbiota edáfica que alcanza valores cercanos a los presentados por el suelo sin perturbar.

Con respecto al estudio a nivel de comunidades bacterianas del suelo en presencia y en ausencia del patógeno se encontró una elevada correlación en los primeros 5 cm del suelo sintomático en presencia del patógeno radicular entre las comunidades bacterianas y el metabolismo de glucosa, rafinosa, ácido cítrico y sacarosa. En tanto en suelos sintomáticos de 5 a 20 cm de profundidad las comunidades bacterianas se asociaron con la utilización de arabinosa. En relación con este análisis Wardle *et al.*, (2004) demostraron que estudios profundos combinados de la interfaz sobre y debajo del suelo a nivel de comunidades y ecología ecosistémica son necesarios para conocer la significancia de la biodiversidad funcional y de regulación y de los impactos ambientales producidos por el fenómeno de cambio global inducido por el hombre .

Estos investigadores propusieron que es necesario un flujo de trabajo temporal para entender el significado natural y ecológico de las relaciones entre las comunidades habitantes sobre y bajo el suelo ya que las comunidades operan sobre una jerarquía de escalas temporales, con rangos desde días hasta estaciones, a milenios, con diferentes consecuencias para la estructura y función del ecosistema.

Puesto que en este trabajo se observó un comportamiento metabólico diferencial entre los suelos en presencia y en ausencia del patógeno surge al respecto una nueva hipótesis de investigación para continuar evaluando el metabolismo diferencial de las bacterias en este suelo en presencia de patógenos del olivo, con metodología molecular específica.

2.5. Conclusión

En este Capítulo se enfatizó sobre la importancia de evaluar indicadores de calidad del suelo en presencia de patógenos de raíz del olivo. La actividad microbiana observada se evidenció por las características bioquímicas del suelo en los sitios con olivares con síntomas observables de ataque fúngico y se relacionó con la respuesta biológica global del suelo en cuanto a respiración y carbono proveniente de biomasa microbiana. Por otro lado, se observó que la actividad microbiana no reflejó cambios relacionados con factores abióticos como la altitud y el clima.

Como conclusión la interacción entre las actividades catalasa, deshidrogenasa y β -glucosidasa, la respiración global del suelo en los primeros 5 cm de profundidad, el carbono proveniente de la biomasa microbiana del suelo y el metabolismo diferencial de fuentes carbonadas fue posible caracterizar el sistema en presencia del patógeno en los primeros 5 cm del suelo. Estos resultados podrán ser utilizados en la construcción de un modelo predictivo para el desarrollo de enfermedad en olivos. Surge al respecto una nueva hipótesis de trabajo para continuar evaluando con mayor profundidad el metabolismo diferencial de las bacterias en este suelo. Como conclusión general se encontró que los cambios en el estado de salud de los olivos podrían estar relacionados con cambios en los indicadores de calidad del suelo.

En el Capítulo 2 las características fisicoquímicas, bioquímicas y biológicas globales de los suelos cultivados con olivares de LR y BA mostraron diferencias funcionales. En el Capítulo 3 se describen los aislamientos bacterianos de relevancia bioquímica e industrial para una agricultura sustentable obtenidos a partir de los suelos estudiados en el Capítulo 2.

CAPÍTULO 3

**“La Llave No Encajaba en La Cerradura.
No Buscó Otra Llave.
Buscó Otra Puerta.”**

Jorge Luis Borges

CAPÍTULO 3

3. Aislamientos bacterianos

3.1. Biodiversidad en suelos supresivos

Es sabido que los suelos poseen una inmensa diversidad microbiana, poco explorada debido principalmente al carácter no cultivable de una gran cantidad de microorganismos (90 - 99 %) tal como publicaron Rondon *et al.*, (1999), Torsvik y Ovreas (2002) y Torsvik *et al.*, (2002). Los estudios de biodiversidad actuales pretenden caracterizar tanto a microorganismos cultivables, como no cultivables mediante el empleo de técnicas de microbiología molecular y comparaciones filogenéticas. Esto se complementa en algunos casos con el análisis de las propiedades metabólicas o mediante la determinación de actividades enzimáticas específicas tal como indicaron Rondon *et al.*, (1999), Osborn *et al.*, (2000), Ranjard *et al.*, (2000), Theron y Cloete (2000) y McCaig *et al.*, (2001).

Para abordar un estudio de microbiología aplicado al control de una enfermedad en olivo se utilizaron metodologías dependientes e independientes de cultivo. Entre las técnicas tradicionales se emplearon medios generales y selectivos para aislamientos tal como publicaron Alef y Nannipieri (1995) y ensayos funcionales *in vitro* tal como indicó Garland, J.L. (1997) e *in vivo* según Landa *et al.*, (2004). Por otro lado se utilizaron técnicas moleculares de PCR y secuenciación. Para el análisis de los datos se utilizaron programas estadísticos como R, (2015) y bioinformáticos vinculados con data mining, según Swofford, D.L. (1999).

La rizósfera definida como el volumen de suelo adyacente a la raíz y su área de influencia definida por Sorensen, J. (1997) es de gran importancia para la salud de la planta y fertilidad del suelo según Smalla *et al.*, (2001). Este espacio es limitado y se extiende hasta unos pocos milímetros de la superficie radicular tal como indicaron Bringham *et al.*, (2001).

Los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (PGPR) pueden clasificarse como directos o indirectos según Glick, B.R. (1995). La promoción directa ocurre cuando compuestos sintetizados por bacterias como nitrógeno fijado, fosfato solubilizado, fitohormonas, hierro, entre otras promueven el crecimiento vegetal. En tanto la promoción indirecta ocurre mediante la promoción de crecimiento por ejemplo por inhibición del desarrollo de patógenos por competencia por nutrientes o por producción de enzimas micolíticas, entre otros.

Además la utilización de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal es útil en el desarrollo de estrategias para facilitar el crecimiento de cultivos en suelos con estrés abiótico tal como publicaron Mayak *et al.*, (2004).

3.1.1. Suelos supresivos

Durante la década de 1960 el análisis de propiedades de suelos que suprimían enfermedades en plantas comenzó a tener relevancia. En estos suelos se observaba una reducción de los síntomas de enfermedades debido a la presencia de microorganismos con características particulares, no patógenos, y capaces de interferir en la biología de microorganismos patógenos de plantas, según publicaron Hoitink *et al.*, (1997). Estas características hizo a los microorganismos susceptibles de ser usados como elementos biológicos de control de enfermedades y entonces se los denominó agentes de biocontrol según Hornby, D. (1983).

Un suelo supresivo de enfermedad es un ecosistema excepcional en el cual los cultivos experimentan menos el ataque de patógenos provenientes del suelo que suprimen las actividades de otros microorganismos del suelo tal como publicaron Mendes *et al.*, (2011).

Un suelo supresivo de enfermedades es aquel capaz de proveer un ambiente en el cual el patógeno no se establece o persiste, o bien se establece, pero no causa daño o causa muy poco, aún cuando el patógeno y el hospedero susceptible están presentes.

El control biológico de los patógenos es generalmente muy específico y usa organismos que atacan o interfieren con patógenos específicos. En algunos casos es posible encontrar una única cepa microbiana que sea eficaz en muchos ambientes, pero en la mayoría de los casos, se requieren cepas de localidades diferentes. En general, la aplicación de tales inoculantes persigue la necesidad de reducir el uso de fertilizantes químicos y productos fitosanitarios sintéticos.

3.1.2. Origen de la supresividad

La supresividad natural de los suelos es un fenómeno explicado por diferentes teorías. Una teoría atribuye la supresividad natural del suelo principalmente a una microbiota antagonista que habita al suelo naturalmente. En la década de 1990, Ryder y Cook publicaron que la identificación de suelos naturalmente supresivos a la pudrición radical es considerada de gran relevancia en la búsqueda de organismos con potencial biocontrolador del agente causal. Estos suelos eran capaces de transferir factores bióticos inhibitorios de la enfermedad tal como publicaron Ryder *et al.*, (1990) y Cook R.S., (1990). La supresión de enfermedades es causada por agentes biológicos ya que al esterilizar un suelo supresivo, éste pasa a ser conductivo al reintroducir el patógeno, es decir se desarrolla la enfermedad según Hornby D., (1983).

3.1.3. Suelos supresivos en el mundo

En el mundo se encontraron numerosos ejemplos en los cuales los suelos se vuelven supresivos. Uno de los ejemplos más estudiados es la pérdida de cultivos de trigo o cebada. Los niveles de la enfermedad se incrementan inicialmente y declina la producción en 3 a 4 años, pero después de esto el nivel de la enfermedad cae y se genera un aumento de producción. Este fenómeno particular se observa en áreas lluviosas especialmente de Europa

y Norte América.

Shobha y Kumudini (2012) encontraron cepas de *Bacillus* antagonistas de *Fusarium oxysporum* en India. En tanto en Cuba Ros-Araluce *et al.*, (2008) hallaron cepas de *Bacillus* antagonistas de *Phytophthora nicotianae* en tabaco. En Brasil Machado *et al.*, (2010) demostraron la antibiosis y la secreción de pigmentos de *Bacillus spp.* contra *Colletotrichum spp.*, *Alternaria alternata* y *Fusarium spp.*

En tanto en China Feng-Xia *et al.*, (2012) hallaron efectos antagonistas de *Bacillus spp.* contra *Botrytis cinerea*. En México Basurto-Cadena *et al.*, (2010) encontraron cambios en la estructura celular durante la actividad antagónica de *Bacillus subtilis* contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium verticillioides* en el cultivo de fresón *Fragaria virginiana*.

3.1.4. Suelos supresivos en Argentina

En Argentina existen algunos proyectos de investigación focalizados en el estudio de los suelos supresivos en diferentes Universidades Nacionales. Se mencionan cuatro proyectos con resultados de relevancia aplicada, tres de ellos pertenecen a la Universidad Nacional de Río Cuarto y uno de ellos a la Universidad Nacional de Mar del Plata. En el trabajo de Tesis realizado por Rossi, M.S. (2003) se evaluó la capacidad biopesticida de *Pseudomonas aurantiaca*, bacteria aislada de la rizósfera de soja (*Glycine max L.*) en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto y presente en la formulación de un bioinoculante industrial. Esta cepa bacteriana mostró un potencial uso como agente biocontrolador mostrando efecto favorable tanto sobre el sistema aéreo como en el sistema radical de plántulas de soja (*Glycine max L.*).

En ensayos de biocontrol realizados *in vitro* *P. aurantiaca* fue capaz de inhibir el crecimiento miceliar de *Sclerotinia minor* demostrando que el crecimiento fúngico se redujo en un 56,25 %. En tanto sobre *Macrophomina phaseolina* la reducción del crecimiento hallada fue de un 100 %, mientras sobre *Rhizoctonia spp.* se observó una reducción del crecimiento de un 63,63 % y se encontró una reducción del crecimiento de un 20,3 % sobre *Fusarium spp.*

En ensayos de fitopatogenicidad y de biocontrol realizados *in vivo* se observó que el 41,67 % de las plántulas experimentaron damping off luego de la expansión de sus

cotiledones, entre el quinto y el octavo día post-siembra, en presencia de *S. minor* tanto en presencia como en ausencia de *P. aurantiaca*. Se hizo evidente el efecto protector que *P. aurantiaca* ejerció sobre *S. minor* en post-emergencia, cuando en presencia de la bacteria se redujo a 0 % el mencionado porcentaje de damping off en las condiciones ensayadas.

Por otra parte *P. aurantiaca* mostró capacidad para controlar a la cepa fitopatógena *M. phaseolina*, reduciendo la mortandad de las semillas en la etapa de germinación con concentraciones de *P. aurantiaca* de 1.10^7 UFC.gss⁻¹ (100 %), con 1.10^8 UFC.gss⁻¹ (95 %) y con 1.10^9 UFC.gss⁻¹ (75 %), mostrando de este modo, evidencias del efecto protector que *P. aurantiaca* ejerce sobre semillas y plántulas. Además se observó que la concentración 1.10^7 UFC.gss⁻¹ del inoculante ejerció mayor control del hongo reflejado en el análisis de germinación y que 1.10^9 UFC.gss⁻¹ ofreció mejor crecimiento vegetal. La evaluación de la posible promoción del crecimiento vegetal demostró que *P. aurantiaca* presentó una acción inocua sobre el vegetal.

Otros investigadores como Príncipe *et al.*, (2007) hallaron resultados similares al medir antagonismo contra *Sclerotinia spp.* y *Fusarium spp.* por el género *Bacillus sp.* obtenido de suelos salinos rizosféricos de maíz (*Zea mays L.*) y agropiro (*Agropyrum elongatum*) en Argentina. Por su parte Cavaglieri *et al.*, (2004) y Cavaglieri *et al.*, (2005) evaluaron el nivel de antagonismo de *Bacillus subtilis* contra *Fusarium verticillioides* en maíz (*Zea mays L.*). En tanto Berón y Salerno (2006) del Centro de Investigaciones Biológicas Aplicadas de la Universidad Nacional de Mar del Plata caracterizaron cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control biológico de insectos plagas cultivos.

La respuesta inmediata a la inoculación con PGPR varía considerablemente dependiendo de la bacteria, de la especie de cultivo, del tipo de suelo, densidad de inóculo y de las condiciones ambientales. Las bacterias inoculadas a veces no sobreviven en el suelo cuando compiten con la microbiota nativa mejor adaptada tal como publicaron Bashan *et al.*, (2004), Rosas *et al.*, (2001), Rosas *et al.*, (2011), Carlier *et al.*, (2008) y Rossi *et al.*, (2003).

Una cepa aislada efectiva como agente de control biológico proveniente de una región puede no comportarse de la misma manera en otras condiciones de clima y suelo. Por esta razón un factor importante a considerar cuando se buscan nuevos aislamientos es su actividad en el rango de ambientes en los cuales podrían acostumbrarse en particular diferentes tipos de suelos. En este sentido nuestro laboratorio se focalizó en aislar cepas nativas con capacidad PGPR. Recientemente, se obtuvo y se caracterizó cepas de *Bacillus* capaces de promover el crecimiento de olivo bajo condiciones de invernáculo.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Muestreo de suelo rizosférico

Se tomaron muestras de suelo rizosférico de olivo (*Olea europaea L*) para el aislamiento de las bacterias en áreas donde se desarrollaban las poblaciones seleccionadas. En cada uno de los sitios de muestreo se determinó la posición geográfica por medio de un sistema de posicionamiento global (GPS) de la marca Garmin modelo Nuvi 710. Las muestras de suelo se tomaron a partir de una capa que no excedía los 20 cm de profundidad en el perfil del suelo.

Las muestras para análisis microbiológicos contenían aproximadamente 50 g de suelo se colocaron en bolsa de plástico con cierre hermético y se mantuvieron a -20 °C durante todo el transporte hasta ser procesadas inmediatamente en el laboratorio.

3.2.2. Análisis estadísticos

Para los análisis biométricos se realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza a todas las variables de los experimentos y después del ANOVA se aplicaron métodos de comparación múltiple de Tukey. Se utilizó el programa R para el sistema GNU/Debian. Los datos de frecuencia se sometieron a análisis de Chi-cuadrado sobre la base de tablas de contingencia. Todos los datos se analizaron en el nivel de probabilidad de 0,05.

3.2.3. Aislamientos de cepas bacterianas

Los bacilos termorresistentes se obtuvieron a partir de suelo rizosférico de una plantación de olivos saludables y linderos a olivos sintomáticos a causa de *Phytophthora palmivora*. Se tomó 1 g de suelo y se realizaron diluciones decimales seriadas hasta 10^{-6} , se procedió a calentar las diluciones a 80 °C durante 30 min y se sembraron 0,1 ml por diseminación en medio Agar Triptona Soya (TSA) según el método del shock térmico

estadísticamente estandarizado por Lindquist S., (1986). De las placas de TSA con desarrollo se tomaron muestras de las colonias con características diferentes y se pasaron a placas por agotamiento para su purificación. Se le realizó una observación microscópica con tinción de Gram para comprobar la pureza y determinar las características micromorfológicas y tintoriales de los mismos, así como la presencia de esporas. Los aislamientos puros se conservaron en tubos de agar nutritivo y glicerol al 12 %.

Los aislamientos bacterianos fueron cultivados en placas de TSA al 30 % e incubados durante 48 h a 28 °C. Durante toda la experiencia se trabajó a 28 °C debido a que es la temperatura óptima de desarrollo de los hongos provenientes del suelo. Después de 7 días de desarrollo miceliar fúngico los hongos fueron conservados a 4 °C durante 72 h.

3.2.4. Caracterización macroscópica

Se observaron las características de desarrollo a nivel macroscópico de cada una de las cepas desarrolladas en agar nutritivo durante 24 h. Para ello se consideró la textura de la colonia, color del anverso y producción de pigmentos difusibles al medio según Bergey *et al.*, (2001).

3.2.5. Caracterización microscópica

Las diferentes cepas de bacilos aisladas se sembraron en agar nutritivo. Luego se realizó la observación microscópica. Para ello el frotis fijado con calor se tiñó 1 min con colorante Cristal Violeta. Posteriormente se lavó con agua, se cubrió con solución Yodada durante 1 min y se lavó nuevamente con agua. Luego se realizó la decoloración con mezcla alcohol etílico/acetona, se escurrió y cubrió con Safranina (coloración de contraste) durante 20 seg. Luego se lavó y se secó según lo indicado por Madigan *et al.*, (2004).

3.2.6. Actividad antifúngica

El ensayo de actividad antifúngica se llevó a cabo en medio TSA al 30 %. Para ello un disco de micelio fúngico (9 mm diámetro) del desarrollo fúngico blanco se colocó en el centro de la placa de Petri y se comparó con el desarrollo fúngico colocado en la misma placa que el aislamiento bacteriano. Las placas se incubaron durante 7 días a 28 °C. Las zonas de

inhibición se midieron y compararon con el desarrollo fúngico control. Una cepa de referencia de *Bacillus subtilis* se utilizó como control positivo. Los hongos fitopatógenos se inocularon en plantas y se identificaron en el Laboratorio de Patología Vegetal, Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola.

El experimento de actividad antifúngica se realizó con 3 replicados por cada par bacteria-hongo evaluado y el porcentaje de inhibición se calculó utilizando la reducción del desarrollo micelial comparado con las placas de control fúngico sin inóculo bacteriano. Con las mediciones obtenidas se procedió al cálculo del porcentaje de inhibición, el cual se determinó por la siguiente ecuación:

Porcentaje de inhibición = $((D.C.C - D.C.P)/D.C.C) * 100$ donde:

D.C.C: diámetro de la colonia control.

D.C.P: diámetro de la colonia problema.

3.2.7. Condiciones de cultivo y conservación de las cepas bacterianas

Las cepas bacterianas se cultivaron en medio agar nutritivo (AN) a 30 °C durante 24 a 48 h. Las mismas se conservaron en glicerol al 12 % a -20 °C. La composición química del medio AN es (g.L⁻¹): extracto de carne, 1; extracto de levadura, 2; peptona, 5; cloruro de sodio, 5; agar agar, 15. También se cultivaron en medio tripteína de soja agarizado cuya composición es (g.L⁻¹): K₂HPO₄, 2,5; glucosa, 2,5; NaCl, 5; tripteína, 17; peptona de soja, 3; agar agar, 15; agua destilada, 1.

Para la conservación de los bacilos se utilizó 1 ml de glicerol estéril a una concentración de 12 % que se adicionó a tubos Eppendorf de 1,5 ml secos y estériles según Bayona, M. (2003). De cada una de las cepas de *Bacillus* se colocó 150 µl de cultivo bacteriano axénico y se completó con glicerol para su posterior almacenamiento a -20 °C. Para la conservación a corto plazo se mantuvieron las cepas a temperatura de 4 °C y se realizaron subcultivos cada 30 días según Monroy, A. (2006).

3.2.8. Caracterización bioquímica de las cepas bacterianas

Sobre la base de los resultados de la caracterización preliminar luego de la prueba de resistencia térmica, 63 aislamientos se identificaron a nivel de género *Bacillus* según Bergey D.H., (2001). Cada aislamiento fue sometido a tinción de Gram y el test complementario KOH 3 % según Suslow *et al.*, (1982). Los aislamientos se caracterizaron mediante producción de enzima catalasa, hidrólisis del almidón tal como indicaron Del Gallo *et al.*, (1989), Voges Proskauer (VP), contenido de esporas (E), producción de citrato (Ci), desarrollo en medio NaCl 6,5 %.

Para caracterizar los aislamientos obtenidos se realizaron pruebas primarias, secundarias y terciarias descritas en el manual de Bergey, D.H. (2001).

3.2.8.1. Reacción de Gram (G)

La caracterización de los aislamientos sobre la base de presencia de caracteres morfológicos observados se realizó a simple vista y mediante microscopía óptica (X 100) previa coloración de Gram.

3.2.8.2. Hidrólisis del almidón (Am)

Esta prueba se basa en la reacción del almidón y el yodo yoduro que genera una coloración azul. Se procedió a cultivar cada bacteria en medio de cultivo que contenía almidón. Luego se inundó la placa con Iodo y se buscó zonas claras alrededor de las colonias. Los miembros del género *Bacillus* son hidrolizadores de almidón característicos según Del Gallo *et al.*, (1989).

3.2.8.3. Determinación Voges Proskauer (VP)

Esta prueba se basa en el principio de fermentación del azúcar generando acetona. Se utiliza α -Naftol y permite la caracterización de *Bacillus* a nivel de género. Se determinó en aquellas cepas que dieron positiva a la hidrólisis del Almidón.

3.2.8.4. Contenido de la spora (E)

Esta determinación se realizó sobre las cepas bacterianas que no hidrolizaron el almidón y que producen catalasa.

3.2.8.5. Observación de morfología celular (M)

Se evaluó el diámetro celular con un valor de corte 1 μm . Se determinó en aquellas cepas que dieron positiva a la hidrólisis del almidón.

3.2.8.6. Fermentación de citrato (Ci)

Se evaluó la utilización de citrato como única fuente de carbono lo que origina la alcalinización del medio. El medio utilizado contenía azul de bromotimol como indicador de pH y viró a azul intenso cuando con pH alcalino. Se determinó en aquellas cepas que reaccionaron positivamente a la hidrólisis del almidón, reaccionaron positivamente a la reacción de Voges-Proskauer, y el tamaño del cuerpo fue superior a 1 μm . También se realizó esta determinación sobre las bacterias que no hidrolizaron el almidón y que no produjeron actividad de la enzima catalasa.

3.2.8.7. Desarrollo en NaCl 6,5 %

Se evaluó la capacidad de la cepa bacteriana de desarrollar en medio conteniendo NaCl 6,5 %. Se determinó en aquellas cepas que reaccionaron positivamente a la hidrólisis del almidón, reaccionaron positivamente a la reacción de Voges-Proskauer, el tamaño del cuerpo es superior a 1 μm y fermentaron citrato. También se realizó sobre aquellas cepas bacterianas que reaccionaron positivamente a la prueba de contenido celular y luego a estas mismas cepas se le determinó al ácido producido a partir de arabinosa.

3.2.8.8. Presencia de enzima catalasa

La determinación de la presencia de la enzima catalasa se realizó según el método del portaobjetos. Con el ansa de siembra se recogió el centro de una colonia pura de 18 - 24 h y se colocó sobre un portaobjetos limpio de vidrio. Posteriormente se agregó con pipeta Pasteur una gota de H₂O₂ al 30 % sobre el microorganismo sin mezclarlo con el cultivo. Se observó el resultado, considerando positivo la formación inmediata de burbujas. Esta determinación se realizó sobre las bacterias que no hidrolizaron el almidón.

3.2.8.9. Fermentación de manitol

Se evaluó la utilización de manitol como única fuente de carbono. Se determinó en aquellas cepas que reaccionaron positivamente a la hidrólisis del almidón, reaccionaron positivamente a la reacción de Voges-Proskauer, el tamaño del cuerpo fue inferior a 1 µm y no fermentaron citrato.

3.2.8.10. Producción de antibióticos

Cada bacteria se evaluó contra todas las bacterias restantes, a los efectos de medir inhibición del desarrollo entre los aislamientos. Las bacterias a analizar se estriaron sobre un tercio de la placa de agar nutritivo y el resto de las bacterias se estriaron de a una en sentido perpendicular a la primera. Este ensayo se realizó con variación temporal de 0 y 24 h de inoculada la cepa problema, confiriendo ventaja a la producción y difusión de una posible molécula con comportamiento antibiótico. El segundo método que se empleó para determinar la producción de antibiótico fue en medio líquido cuya formulación selectiva es la siguiente g.L⁻¹: glucosa, 5; NH₄Cl, 1; extracto de carne, 0,8; MgCl₂, 4; pH 6,0 a 33 °C durante 40 h.

3.2.8.11. Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos de los aislamientos se evaluó en primera medida como prueba de diferenciación fenotípica y en segunda instancia, como una inferencia de la posible existencia de plásmidos. Generalmente genes que codifican para resistencia a antibiótico actúan como marcadores de importancia biotecnológica. Por ejemplo el gen que confiere resistencia a eritromicina se observó en un megaplásmido de *B. thuringiensis subsp. israelensis* según Gammon *et al.*, (2006).

El patrón de resistencia a antibióticos de cada uno de los cultivos se determinó a partir del estriado de las células bacterianas en los medios con antibiótico y su posterior incubación a 28 °C durante 72 h. Para cada bacteria se evaluaron los siguientes antibióticos con las concentraciones ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) que se detallan: eritromicina, 50; estreptomycin, 400; neomicina, 100; kanamicina, 50; tetraciclina, 50.

3.2.9. Desarrollo de olivo bajo el efecto de *Bacillus B31*

Ensayos preliminares se llevaron a cabo para evaluar la respuesta de plantas de olivo a B31. Las plantas de olivo cv. *Manzanilla fina* (Aimogasta, La Rioja, Argentina) se colocaron en macetas plásticas (15 cm de diámetro; 25 cm de altura) se completaron con una mezcla de arena:suelo (a 3:1 p/p), previamente esterilizado por calor a 180 °C durante de 2 h durante cuatro días consecutivos. Las macetas que contenían plantas sin inóculo bacteriano se incubaron como control. Las macetas se incubaron en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas: 16 h luz a 28 °C, 8 h de oscuridad a 16 °C (intensidad de luz de 220 $\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), y regados una vez al día con agua destilada (20 - 100 ml por maceta).

El peso seco de tallos y raíces (72 h a 70 °C) se determinó 50 días después de la inoculación. La bacteria B31 se desarrolló bajo agitación (80 rpm) en medio LB durante 48 h a 28 °C. Las macetas se arreglaron de acuerdo con un diseño completamente aleatorizado con seis replicados por tratamiento y el experimento se repitió dos veces. Sumado a esto la sobrevivencia de *Bacillus B31* en la rizósfera de plantas de olivo se determinó de acuerdo al procedimiento modificado descrito por Landa *et al.*, (2004) a 1 h, y 10, 25 y 50 días después

de la siembra.

Las plantas de cada tratamiento fueron cuidadosamente removidas y las raíces se agitaron suavemente para remover toda la mezcla adherida; 1 g de la mezcla adherida a la rizósfera se colocó en 9 ml de solución estéril de NaCl 0,9 %. Las diluciones seriadas de la suspensión se agitaron suavemente en vórtex y se plaquearon en medio LB; las placas se incubaron durante 48 h a 28 °C. El desarrollo de las colonias en los tratamientos se contó y se expresó el número de UFC.g⁻¹ de mezcla.

3.2.10. Caracterización molecular de las cepas bacterianas

3.2.10.1. Identificación molecular bacteriana

A partir de sedimentos bacterianos de cada cultivo axénico se extrajo ADN utilizando el equipo comercial de QIAGEN R DNAeasy™ Tissue Kit (Valencia, CA). La verificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % en solución amortiguadora tris ácido acético EDTA (TAE) con 1 ml de colorante (loading dye) 6x (Promega R, G 1881), en una cámara de electroforesis Sub-Cell modelo 192 (Bio-Rad Laboratories Inc, CA) a una intensidad de corriente de 75 voltios durante 2 a 3 h.

Como marcador molecular se utilizó el fago Lambda cortado con la enzima Hind III. La comprobación de las bandas de ADN se realizó visualmente por tinción del gel con bromuro de etidio (0,5 mg.ml⁻¹ durante 30 min) y observación en transiluminador de radiación UV modelo M20 equipado con un monitor SONY R blanco y negro modelo SSM-930.

3.2.10.2. Secuenciación del rDNA 16S de B31 como PGPR

Los productos de PCR del rDNA 16 S purificados con el kit de limpieza para productos de PCR Wizard (Promega) de B31 se enviaron a secuenciar a Macrogen. Las secuencias se modificaron manualmente sobre la base de la calidad del cromatograma utilizando el programa de acceso libre ChromasPro version 1.41. El resultado de la secuenciación se analizó usando los servicios de la red informática BLAST en NCBI descrito por Altschul *et al.*, (1997) y se alinearon con otras secuencias publicadas en bancos de genes de NCBI

mediante el uso del programa PAUP.

3.2.10.3. Construcción del árbol filogenético

Para un análisis filogenético se comparan las regiones altamente conservadas entre la secuencia del gen 16 S rRNA. Por tanto para obtener los datos 16S rRNA/16S rDNA fue necesario obtener DNA.

El árbol filogenético de *Bacillus B31* y especies relacionadas de *Bacillus* basado en las secuencias de 16S rRNA se construyó sobre la base de la diferencia porcentual en la relaciones genéticas entre las cepas relacionadas contenidas en GenBank. El programa PAUP* V 4.08b se utilizó para realizar el análisis de parsimonia sin ponderaciones asumiendo que las sustituciones de nucleótidos ocurren en todas las direcciones con la misma probabilidad. Dicho análisis se realizó sobre las secuencias de 16S rRNA como datasets combinados por la matriz taxonómica completa.

Para buscar la estructura óptima del árbol filogenético se utilizó el algoritmo TBR. Este algoritmo desconecta un subárbol a partir del árbol principal desde un nodo interno y luego intenta todas las conexiones posibles entre las ramas de los dos árboles creados de este modo. La opción de búsqueda heurística se realizó con adición de 100 secuencias aleatorias replicadas. Filogenéticamente las inserciones y deleciones se codificaron como un estado de quinto carácter. La estabilidad de los clados se aseguró mediante replicados de bootstrap de 100 repeticiones.

3.3. Resultados

En este Capítulo se describen los experimentos diseñados para el aislamiento, la caracterización y la identificación de los microorganismos utilizados en este trabajo de investigación. Los resultados se agrupan según la siguiente jerarquización de escritura.

-Muestreo de suelos.

-Aislamiento, caracterización e identificación de los *Bacillus sp.*

-Efecto de *Bacillus B31* sobre el desarrollo de olivo.

3.3.1. Muestreo de suelos

El muestreo de suelos se realizó siguiendo estricto control térmico para mantener la viabilidad de las bacterias del suelo. En la Fig. 3.1 se observa una muestra compuesta por 20 submuestras para cada suelo. En tanto la Fig. 3.2 muestra el primer procedimiento de las muestras una vez ingresadas al laboratorio.



Figura 3.1. Muestra compuesta por 20 submuestras tomadas con barreno.



Figura 3.2. Diluciones decimales seriadas del suelo para obtención de bacterias.

3.3.2. Obtención de cepas bacterianas

Un total de 452 aislamientos bacterianas se obtuvieron de suelo rizosférico de olivo. A partir de estos aislamientos bacterianos se seleccionaron 63 de ellos por ser formadores de endosporas. Los mismos se conservaron en glicerol al 12 % a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. La Fig. 3.3. muestra la visualización macroscópica del desarrollo de *Bacillus sp.* y la visualización microscópica de la misma bacteria sometida a tinción de Gram.

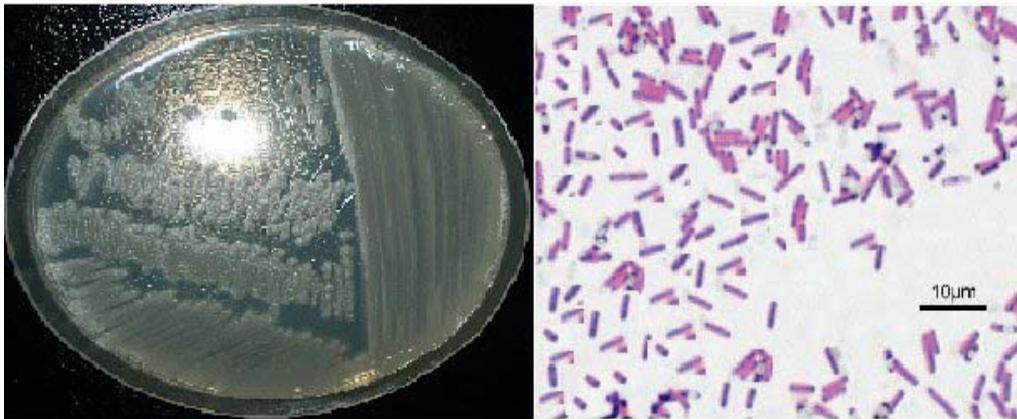


Figura 3.3. Izquierda. La placa conteniendo colonias de *Bacillus B31* desarrolladas en medio AN e incubadas 48 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Derecha. Visualización microscópica de la tinción de Gram de B31.

3.3.3. Caracterización bioquímica de las cepas bacterianas

Los aislamientos de bacterias que mostraron resistencia térmica fueron sometidos a las pruebas descritas en el manual de Bergey, D.H. (2001) para caracterizar a los miembros de

Bacillus spp. Los resultados se muestran en la Tabla 3.1:

Tabla 3.1. Características bioquímicas bacterianas

Aislamiento	G	Am	VP	Tamaño (1µm)	Ci	NaCl 6,5	55 °C	Catalasa	Manitol
1	+	+	+	<	-	NT	NT	NT	+
2	+	+	+	<	-	NT	NT	NT	+
3	+	+	+	<	-	NT	NT	NT	+
4	+	+	+	<	+	+	-	NT	NT
5	+	+	+	<	+	+	-	NT	NT
6	+	+	+	<	+	+	-	NT	NT
7	+	+	+	<	+	+	+	NT	NT
8	+	+	+	<	+	+	+	NT	NT
9	+	+	+	<	+	+	NT	NT	NT
10	+	+	+	<	+	+	NT	NT	NT
11	+	-	NT	NT	+	NT	NT	-	NT
12	+	-	NT	NT	+	NT	NT	-	NT
13	+	-	NT	NT	+	NT	NT	-	NT
14	+	-	NT	NT	+	NT	NT	-	NT
15	+	-	NT	NT	+	NT	NT	-	NT
16	+	-	NT	NT	+	NT	NT	-	NT
17	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
18	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
19	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
20	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
21	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
22	+	+	+	<	+	+	-	NT	NT
23	+	+	-	NT	+	+	NT	-	NT
24	+	+	-	NT	+	+	NT	-	NT
25	+	+	-	NT	+	+	NT	-	NT
26	+	+	-	NT	+	+	NT	-	NT
27	+	+	-	NT	+	+	NT	-	NT
28	+	+	-	NT	+	+	NT	-	NT
29	+	+	-	NT	+	+	NT	-	NT
30	+	+	-	NT	+	+	NT	-	NT
31	+	+	+	<	+	+	-	NT	NT
32	+	+	+	<	+	+	-	NT	NT

33	+	+	+	<	-	NT	NT	NT	+
34	+	+	+	<	-	NT	NT	NT	+
35	+	+	+	<	-	NT	NT	NT	+
36	+	-	NT	NT	+	NT	NT	-	NT
37	+	-	NT	NT	+	NT	NT	-	NT
38	+	-	NT	NT	+	NT	NT	-	NT
39	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
40	+	+	+	<	+	+	+	NT	NT
41	+	+	+	<	+	+	+	NT	NT
42	+	+	+	<	+	+	+	NT	NT
43	+	+	+	<	+	NT	NT	NT	NT
44	+	+	+	<	+	NT	NT	NT	NT
45	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
46	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
47	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
48	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
49	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
50	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
51	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
52	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
53	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
54	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
55	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
56	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
57	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
58	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
59	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
60	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
61	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
62	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT
63	+	+	+	<	NT	NT	NT	NT	NT

Referencias: G, reacción de Gram; Am, hidrólisis de almidón; VP, Voges-Proskauer; 1 μ m, tamaño del cuerpo celular; Ci; utilización de Citrato; NaCl, desarrollo de NaCl en 6,5 %; desarrollo a 55 °C, Catalasa, reacción positiva; NT, no testado.

3.3.4. Producción de antibióticos y Resistencia a antibióticos

Los aislamientos obtenidos no produjeron antibióticos y no mostraron resistencia a antibióticos estadísticamente significativa en las condiciones ensayadas.

3.3.5. Actividad antifúngica

Las bacterias aisladas se sometieron al test de antagonismo mediante el método dual estadísticamente estandarizado. Los hongos fitopatógenos de olivo *Phytophthora palmivora*, *Fusarium solani* y *Verticillium dahliae* fueron cultivados individualmente en placas con medio TSA 30 % durante 7 días a 28 °C. A continuación se muestran las imágenes de los patógenos fúngicos *P. palmivora* (Fig. 3.4.), *V. dahliae* (Fig. 3.5.) y *F. solani* (Fig. 3.6.).

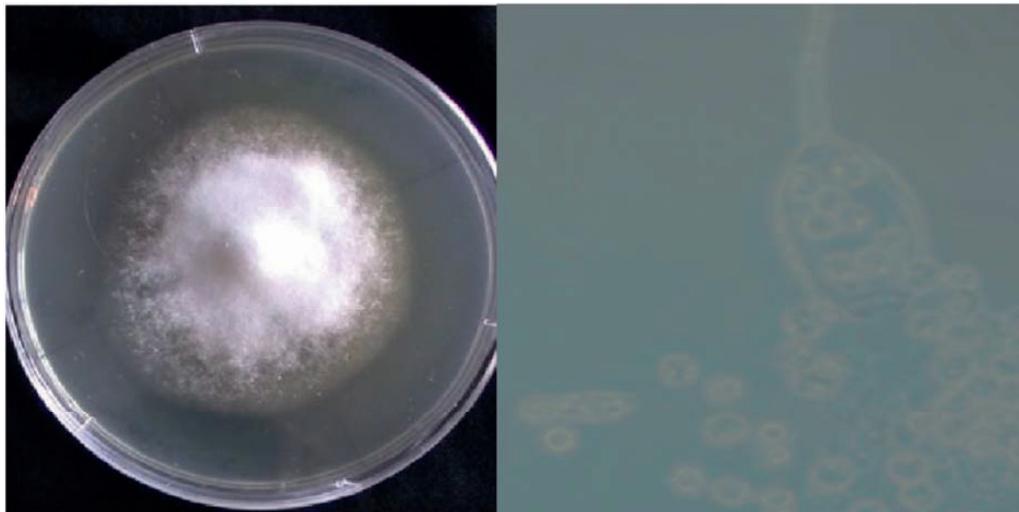


Figura 3.4. Izquierda. Colonia de *Phytophthora palmivora* que contenían medio PDA y luego de 7 días de incubación a 25 °C. Derecha. Microesclerocios de *Phytophthora palmivora*.

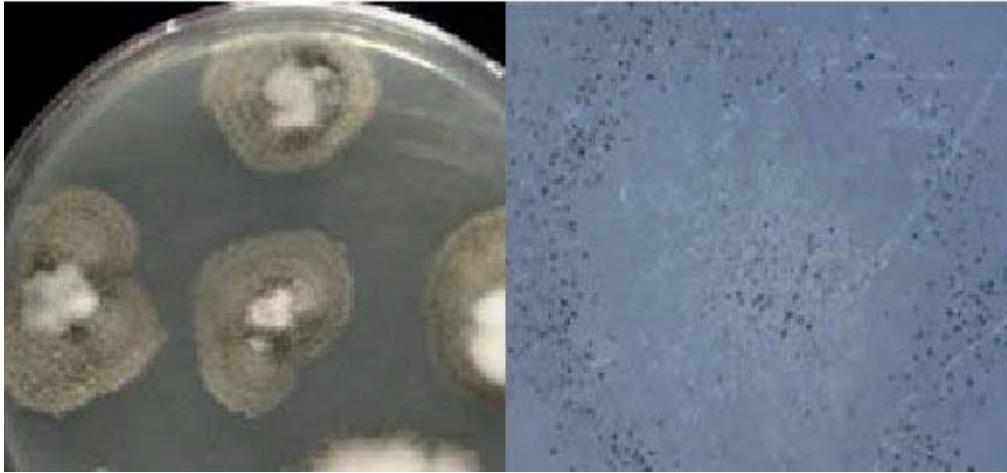


Figura 3.5. Izquierda. Colonias de *Verticillium dahliae* que contenían medio PDA y luego de 7 días de incubación a 25 °C. Derecha. Microesclerocios de *V. dahliae*.

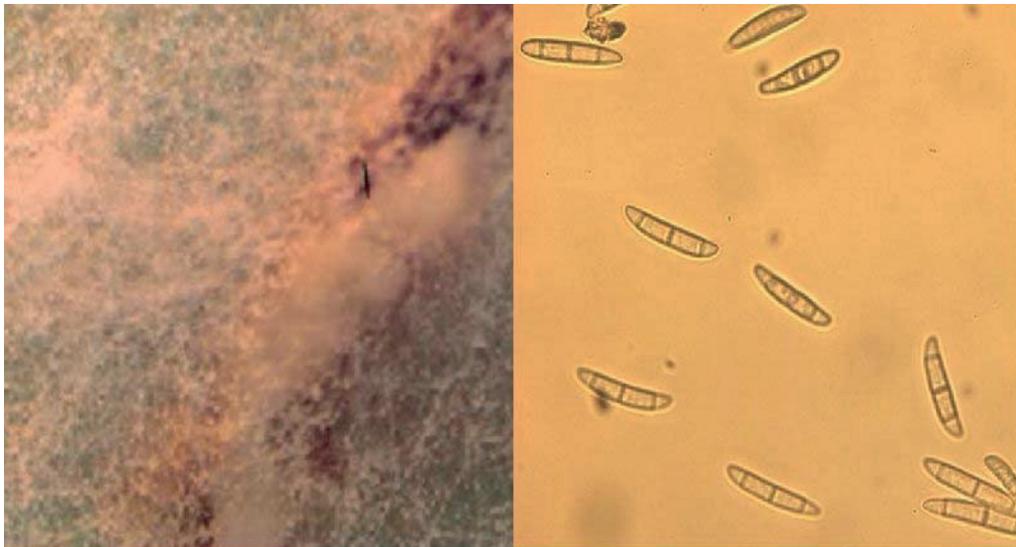


Figura 3.6. Izquierda: Visualización de campo por microscopía óptica (X 100). Material fresco obtenido de placas con *Fusarium solani* que contenían medio PDA y luego de 7 días de incubación 25 °C. Derecha: Macroconidios característicos de *F. solani*.

3.3.6. Selección de cepas positivas para la promoción del crecimiento vegetal por mecanismos indirectos

Las bacterias obtenidas del suelo de La Rioja y de Castelar se evaluaron frente a los principales hongos patógenos de olivo más frecuentes en Argentina. Todos los aislamientos bacterianos se evaluaron por su capacidad biocontroladora in vitro contra los tres patógenos de olivo mencionados.

3.3.7. Evaluación antagonista frente a fitopatógenos in vitro.

La cepa de *Bacillus B31* desarrollada sobre un tercio de la placa de TSA al 30 % durante 48 h a 37 °C, se enfrentó con un disco de micelio de *Phytophthora palmivora* durante 72 h a 28 °C. Luego de este período de incubación, se determinó que el porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico fue del 87,5 % con respecto al crecimiento del hongo en ausencia de *Bacillus B31*. Los resultados pueden observarse en la Figura 3.7.

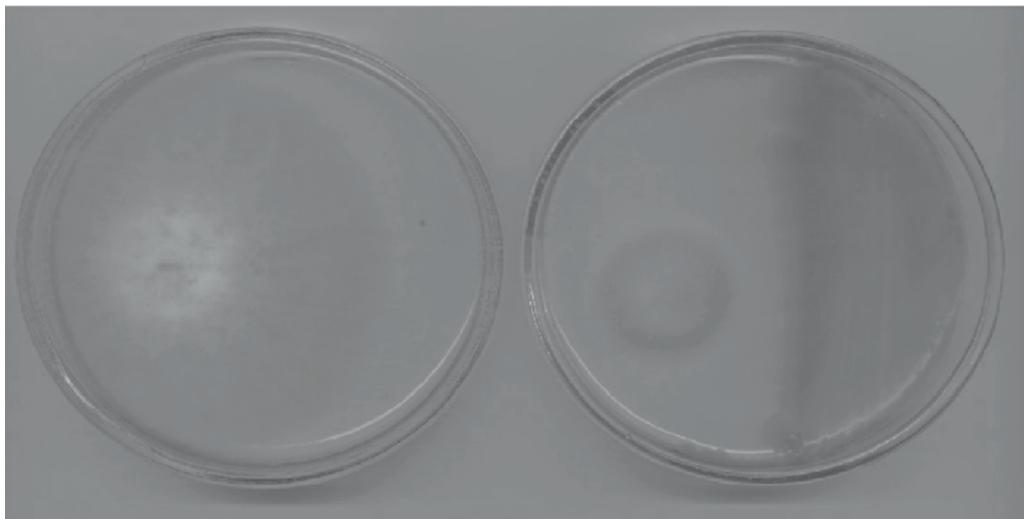


Figura 3.7. Izquierda: control del desarrollo de *P. palmivora*. Derecha: placa conteniendo *P. palmivora* y a la bacteria B31. Se realizaron tres repeticiones (n=3) para cada ensayo de biocontrol in vitro.

La cepa de *Bacillus B4* desarrollada sobre un tercio de la placa de TSA al 30 % durante 48 h a 37 °C, se enfrentó con un disco de micelio de *Verticillium dahliae* durante 72 h a 28 °C. Luego de este período de incubación, se determinó que el porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico fue del 65,02 % con respecto al crecimiento del hongo en ausencia de *Bacillus B4*. Los resultados pueden observarse en la Figura 3.8.



Figura 3.8. Izquierda: control del desarrollo de *Verticillium dahliae*. Derecha: placa conteniendo *V. dahliae* y a la bacteria B4. Se realizaron tres repeticiones (n=3) para cada ensayo de biocontrol in vitro

La cepa de *Bacillus B5* desarrollada sobre un tercio de la placa de TSA al 30 % durante 48 h a 37 ° C, se enfrentó con un disco de micelio de *Fusarium solani* durante 72 h a 28 ° C. Luego de este período de incubación, se determinó que el porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico fue del 56,25 % con respecto al crecimiento del hongo en ausencia de *Bacillus B5*. Los resultados pueden observarse en la Figura 3.9.

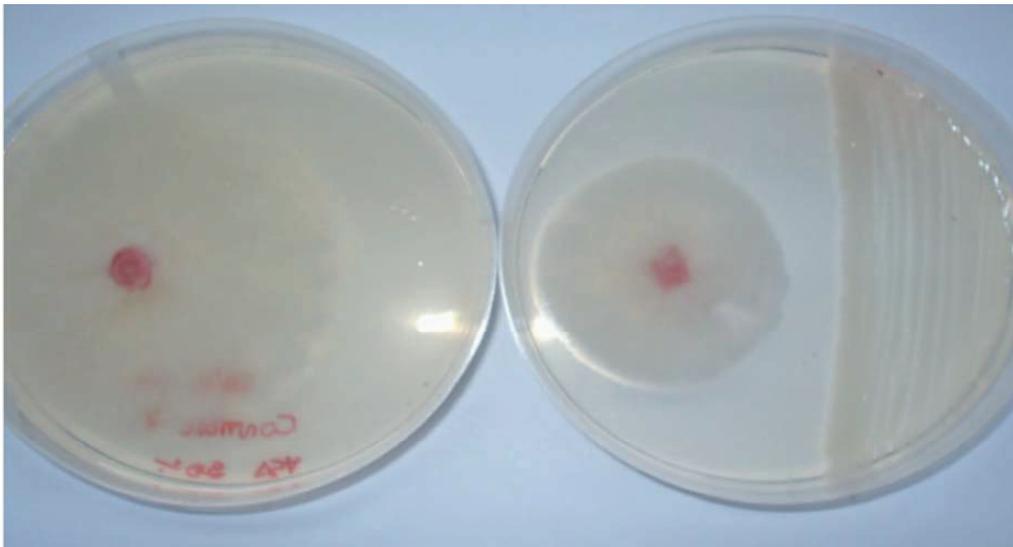


Figura 3.9. Izquierda: control del desarrollo de *Fusarium solani*. Derecha: placa conteniendo a *Fusarium solani* y a la bacteria B5. Se realizaron tres repeticiones (n=3) para cada ensayo de biocontrol in vitro.

La población de bacterias cultivables heterótrofas aerobias fue $1,5 \cdot 10^8$ y $1,3 \cdot 10^7$ UFC.gss⁻¹ en el suelo rizosférico y no rizosférico para el sitio LR respectivamente. El recuento promedio fue $1,8 \cdot 10^8$ y $1,5 \cdot 10^7$ UFC.gss⁻¹ para el suelo rizosférico y no rizosférico para el sitio BA respectivamente. Un total de 452 aislamientos bacterianos se obtuvieron de suelo rizosférico de olivos en LR y BA. A partir de los cuales un total de 104 aislamientos se obtuvieron de suelo LR sintomático de olivo por *P. palmivora* y 112 aislamientos se obtuvieron de suelo LR con olivos asintomáticos. A partir de suelo BA sintomático de olivo se obtuvieron 115 aislamientos y 121 aislamientos a partir de suelo asintomático de olivos.

Dicho recuento fue realizado utilizando metodología dependiente de cultivo con medio enriquecido para bacterias ambientales incubadas a 28 ° C durante 48 h. Se observó que en todas las muestras el número de bacterias Gram-positivas fue más alto que el número de Gram-negativas, aproximadamente el 80 % de los aislamientos fueron Gram-positivos. También se detectaron actinomicetes en la mayoría de las muestras.

La selección térmica permitió obtener 63 bacterias formadoras de endosporas todas ellas provenientes del suelo LR con olivares no sintomáticos (LRh) linderos a olivos sintomáticos por *P. palmivora* (LRs). Las bacterias obtenidas de los otros sitios LRs, BAs y BAh se caracterizaron para incluirlas en el cepario. Los 63 aislamientos se seleccionaron fenotípicamente caracterizados mediante pruebas en relación a nivel de género *Bacillus* y la presencia de propiedades promotoras de crecimiento vegetal: hidrólisis de almidón, Voges-Proskauer, tamaño del cuerpo celular, utilización de citrato, desarrollo en NaCl 6,5 %, desarrollo a 55 ° C, producción de enzima catalasa y control biológico in vitro contra los principales patógenos observados, *Phytophthora palmivora*, *Fusarium solani* y *Verticillium dahliae*.

El control sobre el desarrollo fúngico por parte de las bacterias cuyo potencial biocontrolador fue estadísticamente superior ($p < 0,05$) evaluado in vitro, se muestra en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Bacterias seleccionadas por su actividad antifúngica in vitro

Aislamiento	<i>P. palmivora</i>	<i>F. solani</i>	<i>V. dahliae</i>
B1	31,20 ± 0,2b	9,10 ± 0,2d	15,40 ± 0,2d
B4	24,60 ± 0,2c	11,60 ± 0,2c	65,20 ± 0,2a
B5	29,30 ± 0,2b	58,00 ± 0,2a	38,20 ± 0,2b
B6	18,50 ± 0,2d	39,20 ± 0,2b	27,10 ± 0,2c
B22	15,20 ± 0,2d	33,10 ± 0,2b	22,15 ± 0,2c
B30	22,20 ± 0,2c	35,20 ± 0,2b	19,10 ± 0,2c
B31	87,50 ± 0,2a	39,10 ± 0,2b	37,40 ± 0,2b
B37	21,70 ± 0,2c	19,40 ± 0,2c	25,80 ± 0,2a
B41	19,10 ± 0,2c	18,70 ± 0,2c	21,30 ± 0,2a
B52	20,50 ± 0,2c	31,70 ± 0,2b	18,40 ± 0,2c

Referencias: Los datos representan la media de tres replicados (n=3) seguido de su desvío estándar para cada par bacteria hongo evaluado. Los valores medios con la misma letra por columna no son estadísticamente diferentes según el test de diferencia de medias de Duncan (p<0,05).

Del total de las bacterias obtenidas del suelo LR, B31 fue la bacteria significativamente (p<0,05) más eficiente in vitro contra el desarrollo de *Phytophthora palmivora* (87,5 %). En tanto la bacteria B5 mostró significativamente (p<0,05) mejor capacidad controladora del desarrollo de *Fusarium solani* (58,0 %). En cambio la bacteria B4 mostró efecto controlador estadísticamente superior (p<0,05) contra *Verticillium dahliae* (65,2 %). Las bacterias restantes no mostraron capacidad biocontroladora estadísticamente significativa (p<0,05) in vitro.

A continuación se evaluó la patogenicidad de *P. palmivora* sobre olivo, el potencial biocontrolador de la cepa B31 in vivo en forma cualitativa y la inocuidad por parte de B31. La evaluación cuantitativa se muestra en el Capítulo 5. La actividad antifúngica de B31 en condiciones controladas se muestra en la Fig. 3.10. donde se muestra la aparición de síntomas causados por *P. palmivora* en raíz de olivo, expresado en porcentaje.

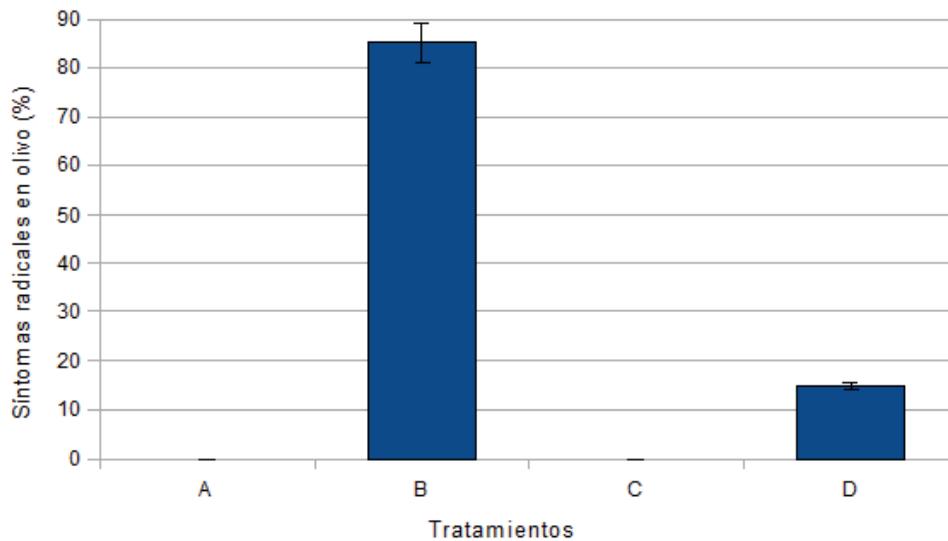


Figura 3.10.: Referencias: **A:** Olivos no-infestados, **B:** Olivos infestados con *P. palmivora*, **C:** Olivos inoculados con B31, **D:** Olivos infestados con *P. palmivora* e inoculados con B31. Los datos se tomaron a los 50 d.p.i. Diferencias fueron estadísticamente significativas con el test de Student's ($p < 0,05$).

Se realizó la evaluación con la bacteria B31 in vivo sobre olivo. Se halló que *P. palmivora* afectó la raíz de olivo en un 75 % evaluado en 10 plantas a los 50 d.p.i. Estas plantas presentaron raíces con podredumbre severa (A). Se evaluaron olivos sanos como control, los cuales no presentaron sintomatología al cabo de 50 d.p.i. (B)

El potencial biocontrolador de B31 con la dosis evaluada logró reducir en un 70 % los síntomas observados en raíz (C). Esta dosis se ajusta en el Capítulo 5. La inocuidad de la bacteria se confirmó sobre olivos a los 50 d.p.i. (D).

Se halló que B31 fue capaz de reducir los síntomas radicales causados por *P. palmivora* en un 87,5 % in vitro. La Fig. 3.10. muestra el porcentaje de reducción de síntomas en presencia de B31. B31 fue capaz de reducir los síntomas causados por *P. palmivora* en olivos (70 % de control sobre el desarrollo fúngico in vivo). Como resultado de su elevada eficiencia esta bacteria fue evaluada mediante metodología molecular para su identificación.

3.3.8. Identificación molecular de la bacteria *Bacillus B31*

Se realizaron las pruebas de identificación recomendadas en el Manual de Bergey para la Familia *Bacillaceae* publicado por Claus *et al.*, (1986). Posteriormente se seleccionaron

aislamientos para la secuenciación parcial de gen que codifica para el ARN ribosómico 16S para lo que se tomaron colonias de 18 h de crecimiento en medio LB. La amplificación se llevó a cabo utilizando los cebadores universales Univ1: 5'ACTCCTACGGGAAGGCAG y Bact4: 5'GGCGTGTGTACAAGGCCCGG y en un volumen final de 50 μ l compuesto por una mezcla de reacción con concentraciones de 200 μ M de dNTP, 1 μ M de cada cebador, 1,5 mM de MgCl₂ y 0,02 unidades μ l⁻¹ de enzima GoTaq polimerasa.

El programa de PCR se inició con un ciclo de 5' a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 30" a 94 °C, 30 " a 55 °C y 1' a 72 °C y un ciclo de elongación final de 7' a 72 °C. Los productos de PCR obtenidos se secuenciaron en el Servicio de MACROGEN (Korea). Entonces, luego de confirmar el potencial biocontrolador de la bacteria B31 in vitro e in vivo se realizó su identificación molecular y un análisis filogenético para conocer las especies relacionadas con la cepa biocontroladora. Para ello se seleccionaron colonias del aislamiento B31, para la extracción, visualización, amplificación y secuenciación del gen 16S.

El ADN extraído se fraccionó en un gel de agarosa al 1 % y se observó la presencia de bandas intensas no degradadas, por lo cual, se procedió a una amplificación del segmento buscado por medio de PCR. Las muestras seleccionadas se fraccionaron y visualizaron por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 2 % por 45 min a 85 volts y se utilizó un marcador molecular 100 bp DNA Ladder como referencia para el tamaño de los fragmentos amplificados. En la amplificación se observó la presencia de una sola banda correspondiente al aislamiento. Dicha banda correspondió a un tamaño aproximado de 300 pb. ésta se cortó y se purificó para su secuenciación.

La secuencia obtenida se comparó con las secuencias existentes en los bancos de genes para corroborar la identidad de la especie. De esta manera el aislamiento B31 fue identificado por metodología molecular y depositado en GenBank bajo el número de acceso *Bacillus KJ464036*.

3.3.9. Análisis filogenético de *Bacillus B31*

La bacteria *Bacillus B31* seleccionada por su significativo potencial biocontrolador sobre el desarrollo de *Phytophthora palmivora* se estudió filogenéticamente. El árbol filogenético muestra las especies estrechamente vinculadas sobre la base de las secuencias

del gen 16S rRNA disponibles en GenBank (Figura 3.11.). La amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA fue realizada mediante MACROGEN (Korea). El resultado de la secuencia de 780 pb se analizó utilizando el algoritmo de BLASTN descrito por Altschul *et al.*, (1997) disponible en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para realizar el estudio de homología.

Además la secuencia del aislamiento B31 utilizando el programa BioEdit V 7.0.9.0 se comparó con las secuencias disponibles en la base de datos de GenBank. Los números de acceso de GenBank utilizados para la comparación filogenética fueron: DQ474759.1 (*Bacillus subtilis* cepa E9 16S ribosomal RNA gene), AY947531.1 (*Bacillus licheniformis* cepa BOH108 16S ribosomal RNA gene), AB021198.1 (*Bacillus vallismortis* gene for 16S ribosomal RNA), AY149473.2 (*Bacillus polyfermenticus* 16S ribosomal RNA gene), AY055221.1 (*Bacillus amyloliquefaciens* cepa FZB42 16S ribosomal RNA gene), DQ343616.1 (*Bacillus* sp. A6 (2006) 16S ribosomal RNA gene), DQ520955.1 (*Bacillus subtilis* cepa B-FS01 16S ribosomal RNA gene), AB053351.1 (*Bacillus* sp. BBK-1 gene for 16S rRNA), DQ207730.2 (*Bacillus subtilis* cepa CCM 1999 16S ribosomal RNA gene), DQ523501.1 (*Bacillus licheniformis* cepa B425 16S ribosomal RNA gene), DQ374636.1 (*Bacillus* sp. CBD 118 16S ribosomal RNA gene), AF411118.1 (*Bacillus* sp. Bch1 16S ribosomal RNA gene), DQ343614.1 (*Bacillus* sp. A7 (2006) 16S ribosomal RNA gene), DQ207730.2 (*Bacillus subtilis* cepa CCM 1999 16S ribosomal RNA gene).

La secuencia obtenida en este estudio fue depositada en GenBank bajo el número de acceso *KJ464036*. El programa PAUP* V 4.08b según Swofford, D.L. (1999) se utilizó para realizar el análisis de parsimonia no ponderado sobre las secuencias del gen 16S rRNA combinado con la base de datos de la matrix taxonómica total. Para el análisis se realizó una búsqueda heurística con la adición de 100 replicados aleatorios, con MULPARS y el algoritmo de intercambio de ramas para construcción del árbol de bisección-reconexión (TBR).

Filogenéticamente las indels informativas se codificaron como estado de quinto carácter. La estabilidad de clados se aseguró mediante bootstrap con 100 replicados. El árbol filogenético fue redibujado con el programa PAUP y los archivos fueron leídos con el programa TREVIEW. El árbol filogenético obtenido se muestra en la Fig. 3.11.

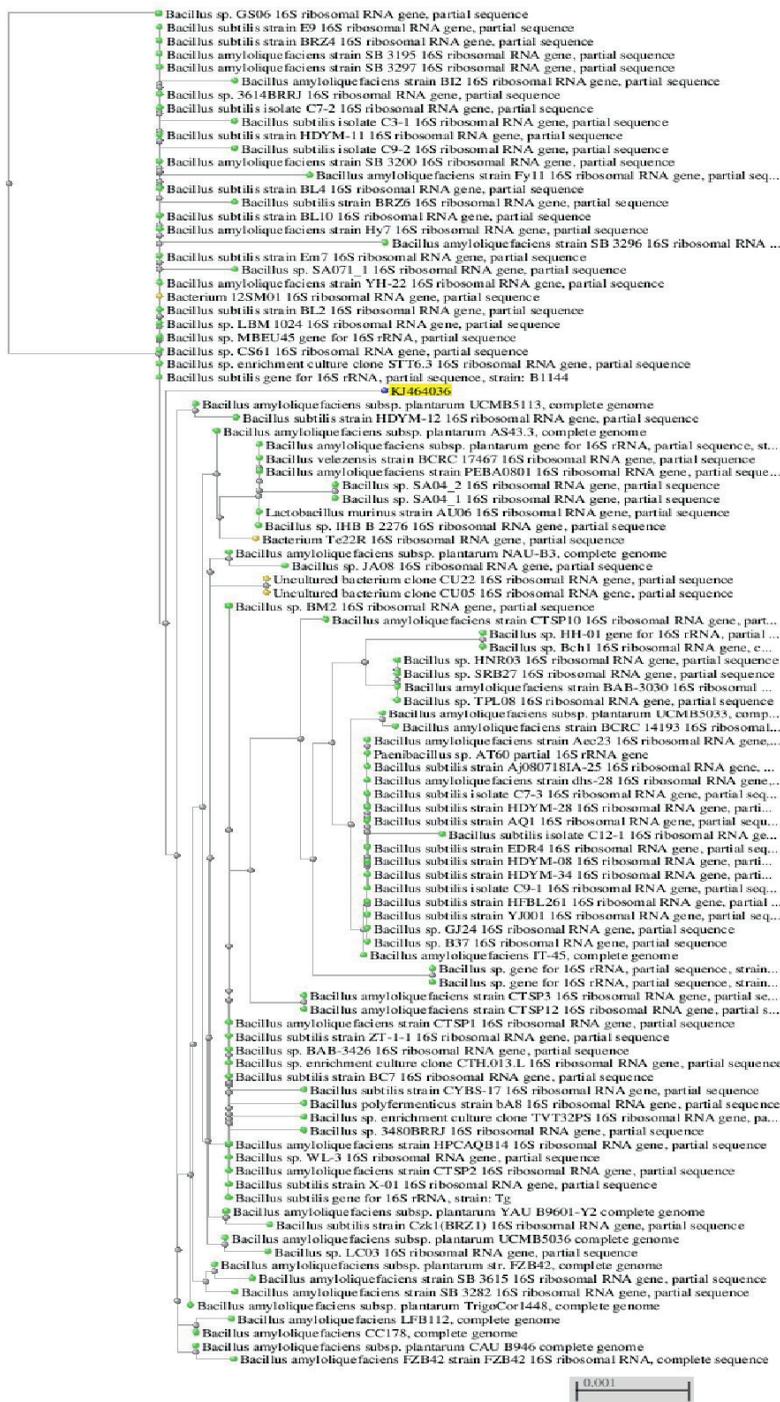


Figura 3.11.: Árbol filogenético

3.4. *Discusión*

Es sabido que un suelo se considera supresivo cuando existiendo condiciones favorables para que puedan ocurrir enfermedades por un patógeno, el patógeno no puede establecerse, o puede establecerse pero no producir enfermedad, o establecerse y producir enfermedad durante un corto tiempo y luego declinar según publicaron Hornby, D. (1983) y Mendes *et al.*, (2011). La supresividad está relacionada al tipo y número de organismos del suelo, nivel de fertilidad y naturaleza del mismo suelo. Adicionalmente la respuesta de crecimiento de las plantas en el suelo contribuye a la supresividad según Alexander *et al.*, (1991), Sorensen J., (1997) y Rossi, M.S. (2011).

En este estudio se observó que el suelo de olivares frente a elevadas temperaturas presentaba restricciones de riego por goteo entre otras condiciones ambientales adversas. Esto conduciría a pensar que según el relevamiento presentado en el Capítulo 2, las patologías encontradas en la plantación del sitio LR causadas por los géneros *Phytophthora*, *Fusarium*, *Verticillium* podrían estar asociadas con una combinación de estrés de la planta.

A partir de suelo rizosférico de olivos se obtuvieron 63 bacterias formadoras de esporas. Aquellas bacterias seleccionadas por su potencial antifúngico *in vitro* se identificaron a nivel de género por metodología bioquímica según Bergey, D.H. (2001).

De acuerdo con las pruebas bioquímicas realizadas los aislamientos B4, B5, B6, B22, B30 y B31 presentaron tinción de Gram positiva, endospora en posición central, diámetro celular inferior a 1 μm , desarrollo aerobio, utilización de citrato, hidrólisis del almidón, fueron positivos a la prueba de Voges-Proskauer, desarrollo en NaCl al 6,5 % y no desarrollaron a 55 °C. Por lo expuesto dichas bacterias fueron compatibles en un 99 % de similitud con *Bacillus subtilis* sobre la base de caracteres morfológicos y bioquímicos.

En tanto el aislamiento B1 presentó tinción de Gram positiva, endospora en posición central, diámetro celular inferior a 1 μm , desarrollo aerobio, no mostró utilización de citrato, hidrolizó el almidón, dio positivo a la reacción de Voges-Proskauer y utilizó Manitol. Por tanto considerando estos caracteres bioquímicos se trató de una bacteria compatible con *B. polymyxa* según Bergey, D.H. (2001). Por otro lado B37 presentó tinción de Gram positiva, endospora en posición central, desarrollo aerobio, utilización de citrato, no hidrolizó almidón y no produjo catalasa se identificó como compatible con *B. azotoformans*. En tanto, B41

presentó tinción de Gram positiva, endospora en posición central, diámetro celular inferior a 1 µm, desarrollo aerobio, utilización de citrato, hidrólisis del almidón, fue positivo en la prueba de Voges-Proskauer, desarrolló en NaCl al 6,5 % y desarrolló a 55 °C se identificó como compatible con *B. licheniformis* sobre la base de caracteres morfológicos y bioquímicos según Bergey, D.H. (2001). No obstante los aislamientos B1, B37 y B41 presentaron actividad antifúngica variable in vitro.

Por otro lado el aislamiento B52 fue clasificado a nivel de género dentro de *Bacillus* pero sin embargo no pudo identificarse a nivel de especie sobre la base de caracteres bioquímicos y morfológicos. Dado que mostró bajo potencial biocontrolador in vitro no se procedió a realizar su identificación molecular.

La actividad biocontroladora in vitro medida en porcentaje de inhibición del desarrollo fúngico por las mejores cepas bacterianas seleccionadas se mostró en la Tabla 3.4. El aislamiento B31 fue significativamente ($p < 0,05$) más efectivo para controlar el desarrollo de *Phytophthora palmivora* (87,5 %) in vitro. En tanto B5 identificado como *B. subtilis* fue el aislamiento más efectivo para controlar a *Fusarium solani* (58 %) in vitro y B4 identificado como *B. subtilis* fue el aislamiento más efectivo para controlar el desarrollo de *Verticillium dahliae* (65 %) in vitro.

No obstante se seleccionó a B31 como biocontrolador por presentar significativamente efecto superior. El potencial biocontrolador de la bacteria B31 contra *P. palmivora* se evaluó in vitro e in vivo. B31 fue capaz de reducir el desarrollo de *P. palmivora* in vitro (87,5 % del desarrollo fúngico).

In vivo B31 fue capaz de reducir los síntomas radicales causados por *P. palmivora* in vivo, es decir en olivo logró una reducción del desarrollo fúngico en un 84,8 % (dato mostrado en el Capítulo 5). Cualitativamente se evaluó la aparición de síntomas radicales en olivos sanos en presencia y en ausencia de B31. Se halló que *P. palmivora* afectó la raíz de olivo en un 85 % evaluado en 20 plantas a los 50 d.p.i. Estas plantas presentaron raíces con podredumbre severa a lo que se denominó estado sintomático del 30 %.

Por otro lado se evaluaron olivos sanos como control, los cuales no presentaron sintomatología al cabo de 50 d.p.i. El potencial biocontrolador de B31 con la dosis evaluada logró reducir en un 30 % los síntomas observados. En el Capítulo 5 se ajusta la dosis de mayor eficiencia lograda. La inocuidad de la bacteria se confirmó sobre olivos a los 50 d.p.i. al no presentar sintomatología ni reducción del crecimiento.

Luego de confirmar el potencial biocontrolador de la bacteria B31 in vitro e in vivo se realizó su identificación molecular y un análisis filogenético para conocer las especies

relacionadas con la cepa biocontroladora. Para ello se seleccionaron colonias del aislamiento B31, para la extracción, visualización, amplificación y secuenciación del gen 16S. De esta manera el aislamiento B31 fue identificado por metodología molecular y depositado en GenBank bajo el número de acceso *Bacillus KJ464036*.

Los miembros de este género tienen un gran potencial para su uso en la agricultura. Muchas cepas tienen la capacidad de producir metabolitos antimicrobianos para el control de patógenos, fijan dinitrógeno, presentan una alta velocidad de crecimiento, forman endosporas resistentes a la desecación, el calor y las radiaciones ultravioletas y sobreviven en diversas condiciones según lo publicado por Liu, X. (2006), lo que ofrece perspectivas en la obtención de biopreparados eficientes.

La construcción del cepario permite obtener cepas que tengan la capacidad de ejercer efecto antagónico contra un amplio grupo de hongos fitopatógenos y de promover el crecimiento de la planta a través de diferentes mecanismos, se podría obtener un bioproducto a partir de estas bacterias que sustituya fertilizantes químicos y fungicidas, lo que contribuiría a la obtención de alimentos y la preservación del medio ambiente.

En el presente Capítulo 3 se mostró que se cumple la hipótesis general al demostrarse que el nivel de actividad antagonista de algunas bacterias frente a patógenos vegetales puede utilizarse como alternativa de control de enfermedad con cierto grado de eficiencia. Además se corroboró la hipótesis específica que establece la existencia de bacterias formadoras de esporas inhibitoras del desarrollo de *Phytophthora palmivora* en la rizósfera del olivo. Autores como Reyes-Ramírez *et al.*, (2011), Quan *et al.*, (2006), Emmert y Handelsman 1999, Asaka y Shoda (1996) y Stirling, G.R. (1984) hallaron resultados similares.

Globalmente se observó que el número de bacterias en la rizósfera fue en todos los casos sustancialmente superior frente al suelo no rizosférico tal como lo observado por Sorensen, J. (1997) y que ésto podría deberse a la influencia de la planta. Se estudiaron las capacidades biocontroladoras del total de las bacterias aisladas de todos los sitios de muestreo. A partir de estos resultados se concluye que la bacteria nativa con actividad PGPR GenBank *Bacillus KJ464036*, aislada del suelo de la provincia de La Rioja, podría jugar un rol esencial en colaborar con las plantas para establecerse y crecer en condiciones de estrés.

Además esta bacteria nativa descrita en este Capítulo podría emplearse para minimizar la utilización de fungicidas sintéticos contribuyendo a la preservación del ambiente. En el Capítulo 4 se presentan los estudios realizados para determinar los posibles mecanismos de supresividad observada en plantas inoculadas bajo condiciones controladas así como para identificar las moléculas involucradas con actividad antifúngica producidas por

Bacillus KJ464036. En el Capítulo 5 se muestran los resultados de los ensayos de patogenicidad y biocontrol in vivo y de la formulación preliminar de un biopesticida experimental sobre la base de *Bacillus KJ464036*.

3.5. Conclusión

Los experimentos presentados en este Capítulo 3 muestran que la utilización de determinados aislamientos de *Bacillus sp.* obtenidos de suelos rizosféricos de plantas de olivo variedad Manzanilla fina demuestran el potencial que tienen dichas bacterias para su posible uso en programas de control biológico. Los aislamientos bacterianos estudiados mostraron capacidad antagonista frente a *P. palmivora* in vitro e in vivo. Asimismo se constató la capacidad de *Bacillus KJ464036* de colonizar y persistir en tejidos radicales de olivo. El establecimiento y mantenimiento de poblaciones de las bacterias en las raíces de olivo también fueron logrados.

CAPÍTULO 4

**“Investigar Las Causas De Un Fenómeno
Es Proceder En Infinito”**

Jorge Luis Borges (1899-1986)

CAPÍTULO 4

4. Mecanismos de supresividad

En las últimas décadas se describieron numerosos microorganismos del suelo con un rol ecológico de fundamental importancia para los cultivos. Estos microorganismos utilizan mecanismos de antagonicidad natural implicados en la protección y en la estimulación del crecimiento de las plantas.

Por ejemplo, algunos hongos pueden estimular las defensas de las plantas o presentar una actividad antagonista contra diferentes fitopatógenos, estimulando el crecimiento directo de la planta según lo publicado por Whipps, J.M. (2001). Estos hongos benéficos fueron denominados recientemente PGPF por Plant Growth-Promoting Fungi según Bent, E. (2006). Ellos pueden ser hongos filamentosos según Harman *et al.*, (2004) o levaduras, denominadas igualmente PGPY por Plant Growth-Promoting Yeasts según El-Tarabily y Sivasithamparam

(2006).

Diversos mecanismos están implicados en la protección y en la estimulación del crecimiento de las plantas entre los cuales se encuentra la asociación benéfica entre una planta y un PGPF. Estos microorganismos pueden actuar por una interacción directa con el agente patógeno, aquellos que protegen las plantas indirectamente. Esto puede realizarse por vía de un micoparasitismo y de una secreción de inhibidores aleloquímicos o bien, por un fenómeno de competencia para el espacio y los nutrientes según Whipps, J. M. (2001), Mauchline *et al.*, (2002) y Howell, C.R. (2003), todos estos compuestos proveen beneficios para el desarrollo de las plantas según Harman *et al.*, (2004) y El-Tarabily y Sivasithamparam (2006).

Estos microorganismos pueden estimular igualmente las defensas de las plantas en las que van a desencadenar una resistencia de la planta huésped contra los agentes patógenos según Bent, E. (2006). Por ejemplo, pueden colocarse barreras físicas estructurales como aposiciones parietales y también pueden no secretarse moléculas como fitoalexinas y proteínas PR bajo la inoculación de la planta con un PGPF.

Numerosas investigaciones avanzaron sobre la interacción planta-PGPF mencionando un fenómeno de potenciación de las defensas. Por citar un ejemplo, el caso de la interacción entre el tomate y el hongo micorrítico, *Glomus mosseae*, el cual permite una protección de la planta contra *Phytophthora parasitica* tal como publicaron Cordier *et al.*, (1995) y Pozo *et al.*, (1999), Pozo *et al.*, (2002). Otro ejemplo concierne a las plantas de pepinos, preinoculadas con *Trichoderma asperellum cepa T203*, después confrontada al agente patógeno *Pseudomonas syringae pv. Lachrymans*. Los resultados mostraron que las defensas son potenciadas bajo la infección por la bacteria patógena, esto es lo que permite una protección de la planta contra el agente agresor según publicaron Shores *et al.*, (2005) .

4.1. Las PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) y las PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria)

Paralelamente a las PGPF existen bacterias benéficas utilizadas igualmente para proteger la planta contra las infecciones por los agentes patógenos según publicaron Schroth y Hancock (1981) y van Loon y Bakker (2004), van Loon y Bakker (2005). Ciertas de estas bacterias pueden estimular directamente el crecimiento de su huésped vegetal y son también de gran interés para la agricultura según publicaron Glick, B.R. (1995) y Welbaum *et al.*,

(2004).

Estos microorganismos benéficos o PGPB (por Plant Growth-Promoting Bacteria según Bashan y Holguin (1998) pueden provenir de diferentes nichos ecológicos tales como la rizósfera, la espermósfera, la filósfera, la antósfera o de la carpósfera.

Sin embargo la mayoría de ellas son originarias de la rizósfera tal como describen Lorenz Hitlner en 1904 según Hartmann *et al.*, (2005). Ellas son en realidad las rizobacterias y también son denominadas PGPR por Plant Growth-Promoting Rhizobacteria según Kloepper y Schroth (1978). Sin embargo, existen otras denominaciones tales como EPR Emergence-Promoting Rhizobacteria y Kloepper *et al.*, (1986), PGPB según Bashan y Holguin (1998), biocontrol-PGPB según Bashan y Holguin (1998) y también YIB Yield-Increased Bacteria y Chen *et al.*, (1996) que pueden encontrarse en la literatura, coincidiendo con sus diferentes acciones sobre las plantas.

Las PGPR pueden también presentar actividades antagonistas, inducir una resistencia sistémica en la planta, producir compuestos estimulantes del crecimiento de las plantas, acelerar la emergencia, inducir un proceso de floración precoz, aumentar la cosecha de su huésped vegetal, conferir al suelo propiedades benéficas sin causar un deterioro en las plantas según lo publicado por Vessey, J.K. (2003) y Welbaum *et al.*, (2004).

Actualmente, es frecuente admitir que estas PGPR colonizan las superficies radiculares y son también epífitas. Sin embargo, la mayoría de ellas pueden igualmente ingresar al interior de las raíces y pueden volverse endofíticas del huésped vegetal según Gray y Smith (2005). Ciertas PGPR endofíticas pueden formar simbiosis remarcables con las plantas como es el caso con los géneros *Rhizobium* según Sessitsch *et al.*, (2002) y *Burkholderia* en los nódulos de *Fabaceas* según Moulin *et al.*, (2001), Chen *et al.*, (2003), Chen *et al.*, (2005) y Chen *et al.*, (2006) y en las plantas actinorríticas con *Frankia sp.* según Schwencke y Caru (2006).

4.1.1. Mecanismos de la supresividad natural del suelo

Tal como se expresó estos microorganismos ejercen efectos benéficos promoviendo el crecimiento de las plantas y dicha promoción del crecimiento involucra mecanismos de acción directa y/o indirecta tal como lo publicaron Kloepper y Schroth (1978).

Los mecanismos de acción directa incluyen a la solubilización de P, solubilidad del

Fe⁺³ mediante la producción de sideróforos poniendo este ion a disposición de la planta, producción de fitohormonas como auxinas, citocininas y giberelinas, muy importantes desde el punto de vista PGPR ya que favorecen el desarrollo radicular aumentando así la toma de agua y nutrientes por el vegetal, producción de etileno, producción de cianidas, fijación del N₂ atmosférico, entre otros.

Los mecanismos de acción indirecta hacen referencia esencialmente la privación de Fe a los patógenos, producción de bacteriocinas o antibióticos e inducción de defensa en las plantas (ISR). El mecanismo de acción indirecto es el punto de interés que poseen las PGPR cuando nos referimos al biocontrol. Estas rizobacterias ejercen control biológico a través de varios mecanismos.

En general la protección bacteriana contra los microorganismos fitopatógenos del suelo depende de dos hechos: la capacidad de colonización del agente de biocontrol y la producción de sideróforos o antibióticos que supriman el crecimiento de estos patógenos, según Kloepper *et al.*, (1988).

Los microorganismos antagonistas comprenden cualquier organismo que interfiere en la supervivencia o desarrollo de los patógenos.

Para lograr el control biológico se pueden seguir tres vías: exploración en el propio medio de los agentes de biocontrol, introducción o liberación masiva de agentes de biocontrol y manipulación del ambiente para favorecer el desarrollo de antagonistas naturales presentes en el mismo. Hace décadas quedó establecido que las interacciones microbio-microbio, son clave en el desarrollo y función de la rizósfera y que las poblaciones de microorganismos pueden interaccionar de manera sinérgica, neutral o bien antagónica.

Indirectamente aquellos organismos que ejercen algún tipo de antagonismo sobre otros microorganismos patógenos de plantas, benefician indirectamente el desarrollo de ésta en términos de la protección de su estado sanitario.

Tal actividad microbiana que funciona por mecanismos de competencia por nutrientes o sitios de colonización, producción de sustancias antimicrobianas, o enzimas extracelulares, opera de forma natural desde que existen las plantas. Sin embargo, puesto que esta actividad natural no está controlada específicamente, sus resultados son impredecibles.

En cuanto al mecanismo principal de la interacción en el suelo entre la bacteria y la raíz puede decirse que la colonización de las raíces por los agentes biocontroladores consta de dos etapas. En la primera de ellas cuando estos microorganismos son agregados por inoculación en la superficie de las semillas se ponen en contacto con la radícula cuando esta emerge y acompañan a las raíces en su crecimiento. En la etapa siguiente los agentes biocontroladores

ponen en funcionamiento los mecanismos necesarios para sobrevivir en el ecosistema en el cual ingresaron dependiendo de la habilidad que estos poseen para competir con la flora natural, según lo publicaron Holbrook *et al.*, (1998).

Diversos mecanismos estarían involucrados en la interacción bacteria-hongo como producción de antibióticos, producción de sideróforos, competencia por sitios, entre otros.

El interés en el uso de microorganismos para el control biológico de enfermedades de cultivos es inherente al crecimiento concerniente a salud y ambiente creado por el uso de pesticidas. La importancia de métodos de protección de cultivos amigable con el ambiente es enormemente enfatizado en la agricultura sustentable. Los incrementos recientes en publicaciones sobre bacterias benéficas refleja un interés en su potencial beneficio en la agricultura tal como explicaron Kobayashi y Palumbo (2000). Algunos de los mecanismos conocidos que pueden ocurrir en la interacción bacteria-patógeno durante el control biológico son los siguientes.

4.1.1.1. Antibiosis

La base de la antibiosis como mecanismo de biocontrol de PGPR se convirtió en foco de investigación en las pasadas dos décadas según Whipps, J. (2001). Una variedad de antibióticos identificados incluyen compuestos como Amfisina, 2,4- Diacetilfloroglucinol (DAPG), Cianida de hidrógeno, Oomicina A, Fenazina, Pyoluteorina, Pyrrolnitrina, Tensina, Tropolono, y lipopéptidos cíclicos son producidos por *Pseudomonas spp.* tal como publicaron los autores Défago, G. (1993), de Souza *et al.*, (2003) y Raaijmakers *et al.*, (2002). Otros antibióticos identificados incluyen Oligomycina A, Kanosamine, Zwittermicina A y Xantobacina y son producidos por *Bacillus*, *Streptomyces* y *Stenotrophomonas spp.* tal como publicaron Hashidoko *et al.*, (1999), Milner *et al.*, (1995), Milner *et al.*, (1996) y Nakayama *et al.*, (1999).

Es importante mencionar que algunos antibióticos producidos por PGPR se encuentran siendo evaluados para nuevos usos como fármacos experimentales según Hashidoko *et al.*, (1999) y Yamaki *et al.*, (1994). Este grupo de bacterias podría ofrecer una inagotable fuente de recursos para compuestos para detener el alarmante ascenso de multirresistencia a drogas en bacterias patógenas de humanos.

4.1.1.2. Producción de enzimas líticas

Una variedad de microorganismos también exhiben actividad hiperparásita. Actúan atacando patógenos por excreción de hidrolasas de la pared celular. La enzima β -1,3-glucanasa sintetizada por la cepa 300 de *Paenibacillus sp.* y la cepa 385 de *Streptomyces sp.* lisan las paredes celulares fúngicas de *F. oxysporum f. sp. cucumerinum* según Singh *et al.*, (1999).

Basurto-Cadena *et al.*, (2010) demostraron que hay liberación de sustancias inhibitorias por parte de *Bacillus subtilis* y que éstas producen modificaciones morfológicas sucesivas en las hifas de los hongos patógenos hasta el colapso total de su estructura celular.

En tanto Feng-Lia *et al.*, (2012) demostraron que *Bacillus cereus* ocasiona daños a nivel de ultraestructura en las hifas de *Botrytis cinerea*. Shobha y Kumudini (2012) comprobaron efectos antagonistas de *Bacillus sp.* contra *Fusarium oxysporum*. La distribución de las enzimas quitinasas en *Bacillus* fue descrita por Cody, R.M. (1989).

La enzima quitinasa producida por *S. plymuthica C48* inhibió la germinación de la espora y la elongación de tubo germinativo en *Botrytis cinerea* según Frankowski *et al.*, (2001). La capacidad para producir quitinasas extracelulares es crucial en la bacteria *Serratia marcescens* para actuar como antagonista del hongo *Sclerotium rolfii* tal como publicaron Ordentlich *et al.*, (1988), y también es crucial en la cepa 300 de *Paenibacillus sp.* y en la cepa 385 de *Streptomyces sp.* para suprimir a *Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum*.

Se demostró que las quitinasas y laminarinasas extracelulares sintetizadas por *Pseudomonas stutzeri* lisan y digieren el micelio de *F. solani* según Lim *et al.*, (1991). A pesar de que la actividad quitinolítica es menos esencial para *S. plymuthica IC14* cuando se suprime a *S. sclerotiorum* y *B. cinerea*, está involucrada la síntesis de proteasas como otro proceso de biocontrol tal como publicaron Kamensky *et al.*, (2003).

Al igual que los sideróforos y los antibióticos, la regulación de la producción de enzimas líticas (proteasas y quitinasas en particular) involucra los sistemas de regulación GacA/GacS según publicaron Corbell y Loper (1995), Gaffney *et al.*, (1994), Natsch *et al.*, (1994) y Sacherer *et al.*, (1994) o GrrA/GrrS según Ovadis *et al.*, (2004) y la variación de la fase de colonia según Lugtenberg *et al.*, (2001).

Las enzimas capaces de hidrolizar β -1,3-glucanos son sintetizadas por bacterias y

hongos.

Dentro del género *Bacillus* las β -glucanasas fueron descritas en *B. circulans* WL12, *B. polymixa*, algunas cepas de *B. subtilis* según Markkanen y Bailey (1974) y aislamientos alcalófilos publicados por Horikoshi y Atsukawa (1973). Estas enzimas tienen un rol ecológico muy importante.

Otras de las funciones brindadas por los agentes bacterianos de control fitopatógeno, pueden ser la solubilidad de fósforo, la producción de sideróforos y de antibióticos en el suelo.

Los mecanismos expresados por microorganismos que pueden controlar el desarrollo de fitopatógenos y dependen de la naturaleza del microorganismo. Los antagonistas bacterianos utilizan principalmente la secreción de moléculas pequeñas (antibióticos) que interfieren con la formación de la pared celular de otros microorganismos según lo publicado por Tripathi y Gottlieb (1969), la secreción de sideróforos según Neilands, J.B. (1981) y la expresión de un número importante de receptores de sideróforos publicada por Poole y McKay (2003).

4.1.1.3. Producción de sideróforos

Para las bacterias aerobias la adquisición de hierro un micronutriente esencial posee una importancia particular debido a que la concentración de Fe^{+3} es poco disponible debido a su insolubilidad como óxidos hidroxylados. En vivo los pools de hierro son rigurosamente regulados y su Fe^{+3} está unido a proteínas de transporte y almacenaje entre células y compartimentos extracelulares, según Andrews *et al.*, (2003).

Los microorganismos particularmente patógenos de humanos tienen múltiples sistemas para competir por la obtención de hierro. Estos sistemas son esenciales para la supervivencia bacteriana y la patogenicidad, tal como publicaron Miethke y Marahiel (2007). Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular, quelantes de hierro con alta afinidad secretados en respuesta a limitaciones de hierro para buscar hierro, y sus sistemas de adquisición son los más diversos y ampliamente distribuidos mecanismos de captura de hierro de microorganismos. Se sabe mucho más sobre estos sistemas en bacterias Gram negativas que en Gram positivas. En las bacterias Gram positivas incluyendo especies de *Bacillus*, los sideróforos férricos son primero unidos por proteínas específicas unidas a sustrato ancladas a membrana (SBPs), las cuales se relacionan con las proteínas de unión periplásmica (PBPs) de las bacterianas Gram negativas. Los sideróforos férricos son luego

transportados a través de la membrana citoplásmica mediante el componente permeasa de tipo transportadores ABC en un proceso energizado por hidrólisis de ATP en el dominio transportador ATPasa, según Heinrichs *et al.*, (2004).

Para lograr la adaptación a las condiciones ambientales variables los microorganismos generalmente producen más que un sideróforo y comúnmente genes que codifican para transportadores para algunos xenosideróforos además de aquellos producidos endógenamente, tal como indicaron Miethke y Marahiel (2007).

Es sabido que tres cepas de *Bacillus anthracis* (USAMRIID, 7702, y 34F2) y *Bacillus cereus* ATCC 14579 excretan dos sideróforos catecolados, petrobactina (que contiene 3,4-dihydroxybenzoyl) y bacillibactina (que contiene 2,3-dihydroxybenzoyl). Sin embargo el organismo insecticida *Bacillus thuringiensis* ATCC 33679 hace solo bacillibactina.

La producción de sideróforos es un mecanismo de control biológico indirecto ya que como publicaron Shobha y Kumudini (2012), Canavarró-Benite y de Paula-Machado (2002) y Hotta *et al.*, (2010), la molécula sideróforo quela el hierro reducido presente en el suelo y privando al patógeno que ataca al cultivo de este ion esencial para su desarrollo.

4.1.2. Metodologías de estudio de la supresividad natural del suelo

A fin de identificar microorganismos involucrados en procesos específicos in situ se desarrollaron investigaciones con diversos niveles de resolución. Éstas incluían isótopos según Boschker *et al.*, (1998) y Radajewski *et al.*, (2000) y bromodesoxiuridina para identificar microorganismos que utilizan sustratos específicos, métodos basados en rRNAs para identificar organismos metabólicamente activos según Giovannoni *et al.*, (1998) y DeLong *et al.*, (1989).

Sobre la base del mecanismo de antibiosis puede citarse la metodología de estudio del proyecto denominado metacontrol según lo publicado por van Elsas *et al.*, (2008) incluye el estudio parcial a nivel genómico de la maquinaria biosintética para la producción de antibióticos poliquétidos particulares como el antibiótico leinamycina así como otros nuevos poliquétidos según van Elsas *et al.*, (2011), Ginolhac *et al.*, (2004), Bertrand *et al.*, (2005), Nalin *et al.*, (2004) y Courtois *et al.*, (2003).

4.2. Materiales y Métodos

Se evaluaron posibles mecanismos involucrados con la supresividad del patógeno en aquellos aislamientos que demostraron actividad antifúngica in vitro en el Capítulo 3. Estos aislamientos se mencionan a continuación y entre paréntesis la especie posible según la similitud basada en caracteres morfológicos: B1 (*B. polymyxa*), B4 (*B. subtilis*), B5 (*B. subtilis*), B6 (*B. subtilis*), 22 (*B. subtilis*), B30 (*B. subtilis*), B31 (*B. subtilis KJ464036*), B37 (*B. azotoformans*), B41 *B. licheniformis* y B52 (*Bacillus sp.*).

En este Capítulo se presentan los resultados del estudio de los siguientes mecanismos de supresividad: producción de β -1,3-glucanasas, producción de β -1,4-glucanasas, producción de lipasas y producción de sideróforos.

4.2.1. Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa R utilizando ANOVA y métodos de comparación múltiple de Tukey. Los datos de frecuencia se sometieron a análisis de Chi-cuadrado sobre la base de tablas de contingencia. Los datos se analizaron en el nivel de probabilidad de 0,05. El agrupamiento de las cepas se realizó mediante un análisis de conglomerado aplicando la distancia Euclidiana y mediante el algoritmo treemap y de cluster jerárquico.

4.2.2. Crecimiento de los cultivos bacterianos antagonistas y preparación del extracto enzimático

4.2.2.1. Condiciones y medios de desarrollo

Se utilizó agar zanahoria (200 g zanahoria, agar 2 %, 1000 ml agua destilada) como medio de cultivo para *P. palmivora*. Los aislamientos B1, B4, B5, B6, B22, B30, KJ464036, B37, B41 y B52 se cultivaron en medio mínimo (MM) según Elad *et al.*, (1982) con el agregado de hifas de *P. palmivora* como sustrato para estudiar la inducción de la enzima degradadora de la pared de *Phytophthora* que contiene celulosa como polímero estructural.

La preparación de los componentes de la pared de la hifa se realizó moliendo el micelio

en nitrógeno líquido y homogeneizándolo en buffer acetato 50 mM (pH 4,5) y conservado durante 3 a 5 h para la extracción. Se filtró luego con papel de filtro Whatman No. 1. Los componentes de la pared hifal retenidos sobre el papel de filtro se rasparon y se incorporaron al medio mínimo y luego se autoclavó.

Cada cultivo bacteriano fue llevado a fase Log y 1 ml de suspensión de esporas de *Phytophthora palmivora* (10^5 esporas.ml⁻¹) en medio mínimo (Phy+MM) y con el agregado de glucosa (Phy+MM+Glu) y fue incubado a 150 rpm a 25 °C durante 72 h. El filtrado del cultivo libre de células se concentró en un frasco de 10 ml y se evaporó a 25 °C. La proteína total en la muestras de enzimas cruda se estimó siguiendo el método de Lowry *et al.*, (1951).

4.2.2.2. Evaluación de la producción de β-1,3-glucanasas bacterianas en presencia y en ausencia del patógeno

Las enzimas β-1,3-glucanasas se estimaron siguiendo el protocolo de Pan *et al.*, (1991). El control positivo de producción se realizó utilizando una cepa de *Bacillus subtilis* productora de β-1,3-glucanasas. La actividad de la enzimas β-1,3-glucanasas se expresó como microequivalentes de glucosa liberada por mililitro de filtrado de cultivo por minuto por miligramo de proteína ($\mu\text{M glucosa.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$).

4.2.2.3. Evaluación de la producción de β-1,4-glucanasas bacterianas en presencia y en ausencia del patógeno

Se tomaron 50 μl de la enzima cruda y se mezclaron con 450 μl de Carboximetil celulosa (CMC) al 1 % y se incubaron a 55 °C durante 30 min. La reducción del azúcar se evaluó siguiendo el protocolo de Miller, G. (1959). La actividad de la enzima β-1,4-glucanasa se expresó como microequivalentes de glucosa liberada por mililitro de filtrado de cultivo por minuto por miligramo de proteína ($\mu\text{M glucosa.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$).

4.2.2.4. Evaluación de la producción de lipasas bacterianas en presencia y en ausencia del patógeno

Para la evaluación de la actividad de enzimas lipasas secretadas por los cultivos

antagonistas se siguió el protocolo modificado por Elad *et al.*, (1985). Se tomaron 2 ml de enzima cruda y se diluyeron con 8 ml de agua destilada y se mezclaron bien con 500 μ l de aceite vegetal. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 2 h en un agitador rotatorio a 200 r.p.m. Para obtener una concentración final de 30 % se agregó etanol.

Los ácidos grasos libres se extrajeron con 25 ml de petróleo puro y el extractante se evaporó en un evaporador rotatorio. Los ácidos grasos libres se disolvieron en 15 ml de etanol neutralizado conteniendo fenoltaleína a 60 ° C. Cada muestra fue titulada con alcohol etílico 0,5 N. Los ácidos grasos libres se neutralizaron y se definió la unidad lipolítica (UL) como micromoles de NaOH por miligramo de proteína por hora (μ M NaOH. mg^{-1} .h⁻¹).

4.2.3. Evaluación de la producción de sideróforos bacterianos

Se estudió la capacidad de control biológico ejercida por cepas de *Bacillus sp.* sobre *Phytophthora palmivora* en cultivo in vitro y la intervención de sideróforos bacterianos en este control. Para ello se sembraron las placas de Petri con las rizobacterias y junto a ellas se colocaron inóculos de *P. palmivora*.

Se evaluó la reducción del desarrollo del hongo en presencia y en ausencia de hierro en el medio de cultivo. Luego se evaluó la producción de sideróforos mediante el medio de cultivo CAS (Chrome Azurol S) agar azulado.

4.3. Resultados

En este Capítulo se describen los experimentos diseñados para evaluar los posibles mecanismos involucrados en la supresividad de las bacterias obtenidas en este trabajo de investigación. Los resultados se agrupan según la siguiente jerarquización de escritura.

- Crecimiento de los cultivos bacterianos y preparación del extracto enzimático.

- Evaluación de la producción de β -1,3-glucanasas bacterianas en presencia y en ausencia del patógeno.

- Evaluación de la producción de β -1,4-glucanasas bacterianas en presencia y en ausencia del patógeno.
- Evaluación de la producción de lipasas bacterianas en presencia y en ausencia del patógeno.
- Evaluación de la producción de sideróforos bacterianos.
- Visualización de los resultados mediante el algoritmo treemap mostrando la caracterización de los aislamientos termorresistentes sobre la base de análisis bioquímicos y morfológicos y la caracterización del total de los aislamientos obtenidos.

4.3.1. Crecimiento de los cultivos bacterianos antagonistas y preparación del extracto enzimático

Cada cultivo bacteriano fue llevado a fase Log y 1 ml de suspensión de esporas de *P. palmivora* (10^5 esporas.ml⁻¹) en medio mínimo (Phy+MM) y con el agregado de glucosa (Phy+MM+Glu) y fue incubado a 150 rpm a 28 °C durante 72 h. El filtrado del cultivo libre de células se concentró en un frasco de 10 ml y se evaporó a 25 °C. La proteína total en las muestras de enzimas cruda se estimó siguiendo el método de Lowry *et al.*, (1951).

4.3.2. Evaluación de la producción de β -1,3-glucanasas bacterianas en presencia y en ausencia del patógeno

Los aislamientos bacterianos B1, B4, B5, B6, B22, B30, B37, B41 y B52 no produjeron cantidades significativas de β -1,3-glucanasas. En tanto *Bacillus KJ464036* produjo la máxima cantidad de la enzima en medio mínimo con el agregado de micelio de *Phytophthora palmivora*. La producción de la enzima en medio con glucosa no fue significativa.

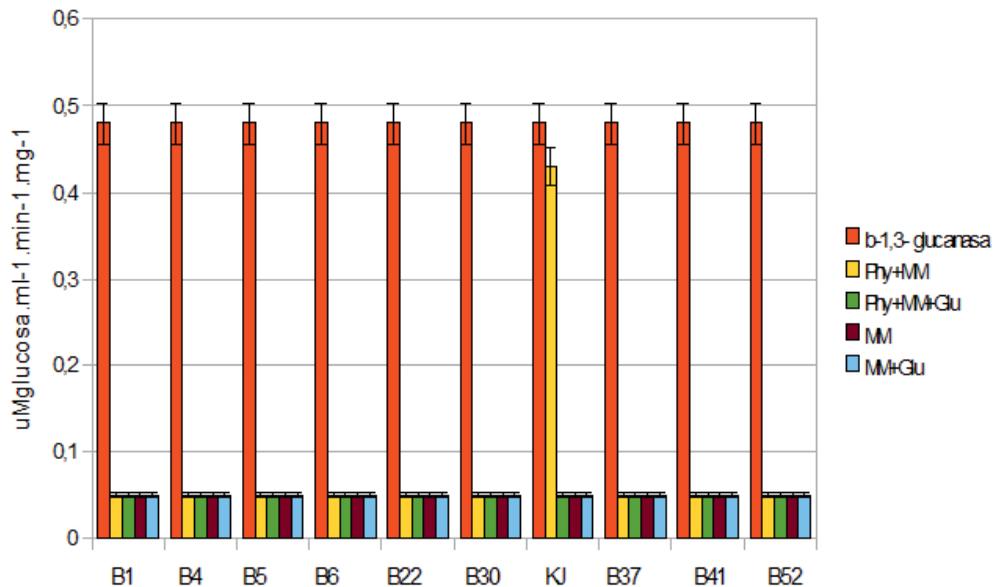


Figura 4.1. Actividad β -1,3-glucanasas producidas por las cepas antagonistas en presencia de *P. palmivora*. Las barras representan un error porcentual igual a 0,05.%

La actividad β -1,3-glucanasas de *Bacillus KJ464036* se observa en medio mínimo y es inducida por la presencia del patógeno (Phy+MM). En tanto no se observa actividad β -1,3-glucanasas en presencia de glucosa por lo que no es inducida por dicho sustrato. El control de esta enzima es la actividad β -1,3-glucanasa producida por *B. subtilis* de referencia.

4.3.3. Evaluación de la producción de β -1,4-glucanasas bacterianas en presencia y en ausencia del patógeno

Se tomaron 50 μ l de la enzima cruda y se mezclaron con 450 μ l de carboximetil celulosa (CMC) al 1 % y se incubaron a 55 $^{\circ}$ C durante 30 min. La reducción del azúcar se evaluó siguiendo el protocolo de Miller, G. (1959). La actividad de la enzima β -1,4-glucanasa (EC.3.2.1.4) se expresó como microequivalentes de glucosa liberada por mililitro de filtrado de cultivo por minuto por miligramo de proteína (μ M glucosa. $\text{ml}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$).

La Figura 4.2 muestra la actividad β -1,4-glucanasas de la bacteria de la bacteria en presencia y en ausencia del patógeno.

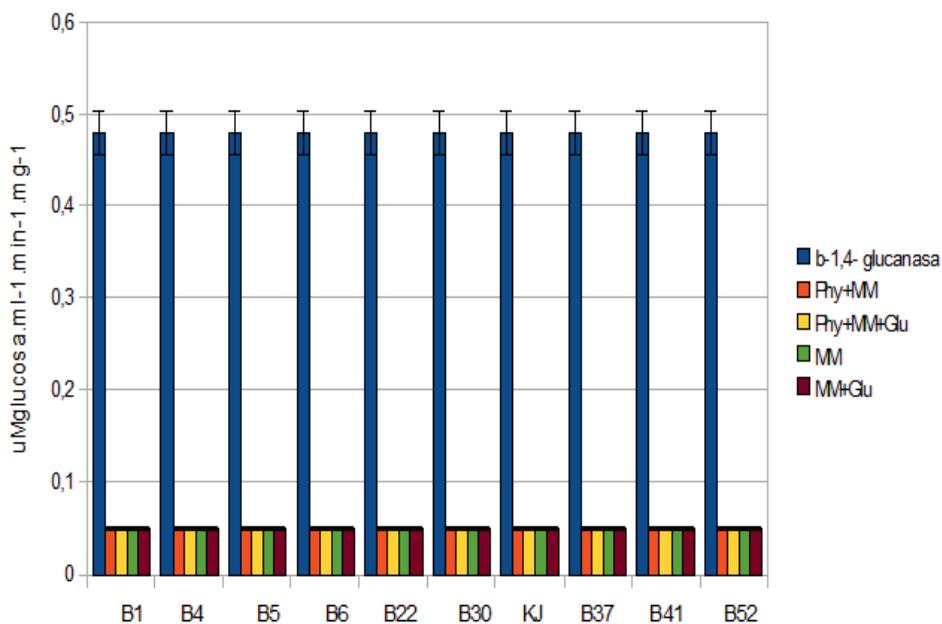


Figura 4.2. Actividad β -1,4-glucanasas producidas por las cepas antagonistas y *P. palmivora* en diferentes sustratos. Las barras representan un error porcentual igual a 0,05.%

El control de la actividad β -1,4-glucanasas es una medida de la actividad de esta enzima producida por *Bacillus subtilis* de referencia.

4.3.4. Evaluación de la producción de lipasas bacterianas en presencia y en ausencia del patógeno

Para la evaluación de la actividad de enzimas lipasas (EC.3.1.1.3) secretadas por los cultivos se definió la unidad lipolítica (UL) como micromoles de NaOH por miligramo de proteína por hora ($\mu\text{M NaOH} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). La Figura 4.3 muestra la actividad de enzimas lipasas de la bacteria en presencia y en ausencia del patógeno.

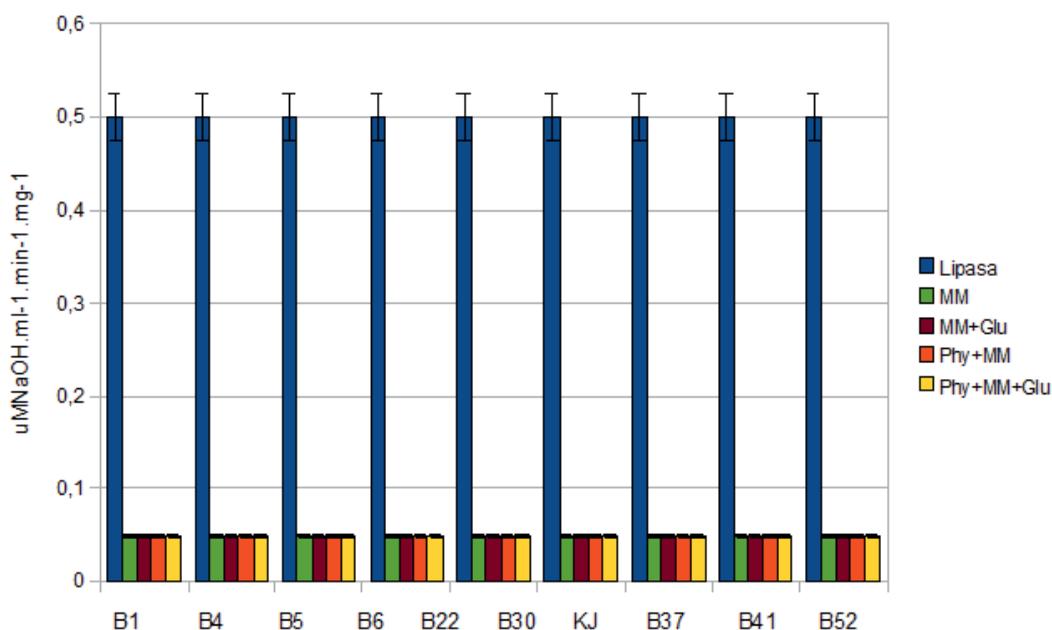


Figura 4.3. Actividad lipasa producida por las cepas antagonistas y *P. palmivora* en diferentes sustratos. Las barras representan un error porcentual igual a 0,05.

El control de la actividad lipasa es una medida de la actividad de esta enzima por parte de *Bacillus subtilis* de referencia. Tanto en medio mínimo como en medio mínimo con con el agregado de glucosa los aislamientos evaluados no produjeron cantidades significativas de actividad lipasa expresada en $\mu\text{g.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

4.3.5. Evaluación de la producción de sideróforos bacterianos

En la evaluación de la capacidad de producción de sideróforos por parte de los aislamientos de *Bacillus* se sembraron las placas Petri con cada una de las rizobacterias aisladas y junto a ellas se colocaron inóculos de *P. palmivora*. Las cepas evaluadas no redujeron significativamente el desarrollo del micelio del patógeno tanto en presencia como en ausencia de hierro en el medio de cultivo. Por lo tanto no se observó participación de sideróforos bacterianos en el control biológico contra *P. palmivora*.

A continuación se muestra un gráfico de la información obtenida de los aislamientos. La visualización de los datos está basada en los caracteres bioquímicos de los aislamientos,

mecanismos de supresividad tales como actividad enzimática, producción de antibióticos, producción de sideróforos y actividad biocontrol in vitro. En función de las categorías descritas se muestra la estructura jerárquica de los datos mediante la utilización del algoritmo treemap (Figura 4.4.) proveniente del sitio LR.

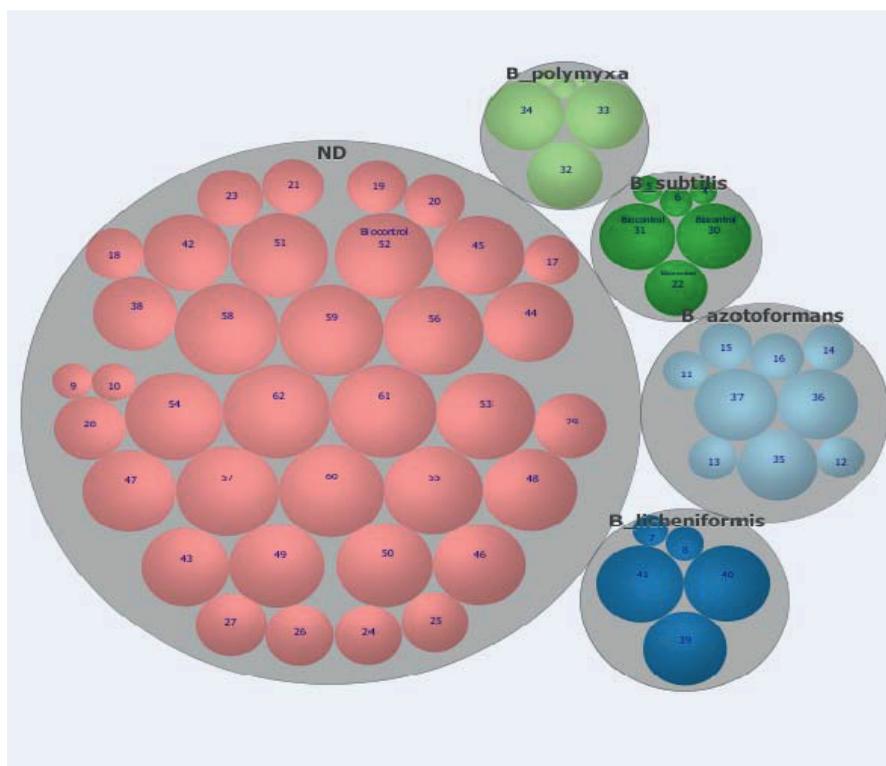


Figura 4.4. Visualización de los aislamientos termorresistentes basada en caracteres bioquímicos y mecanismos de supresividad. El cluster y el color representan la especie, la etiqueta biocontrol representa la capacidad biocontroladora in vitro, el tamaño representa el orden temporal de aislamiento

Se utilizó una capa de trabajo circular, se agrupó según origen con cuatro categorías posibles: LRs, LRh, BAs, BAh y según especie con cinco categorías compatibles posibles: *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. licheniformis*, *B. azotoformans*, *ND*: no disponible sobre la base de caracteres morfológicos y bioquímicos.

El cluster representa el origen del suelo, el color se seleccionó para identificar los diferentes estados posibles de especie. La etiqueta se programó para indicar el número de aislamiento según el orden temporal de obtención del suelo y la capacidad biocontroladora demostrada in vitro.

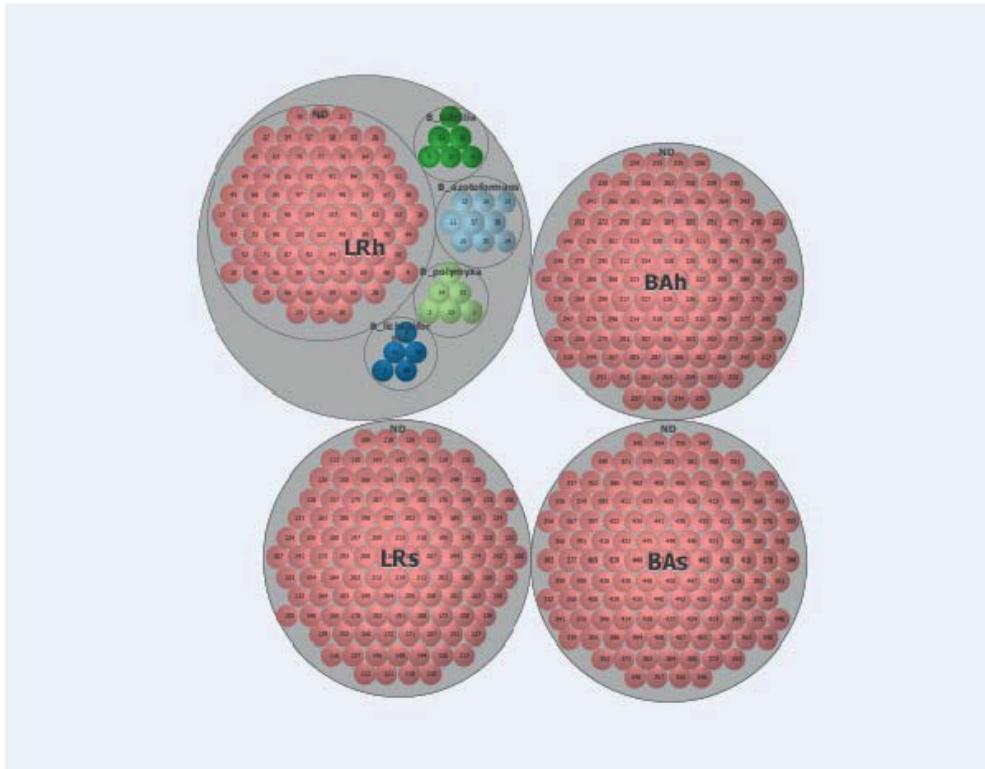


Figura 4.5. Visualización de los 452 aislamientos con el algoritmo treemap

4.4. *Discusión*

Las investigaciones sobre mecanismos promotores del crecimiento vegetal desencadenados por la acción de rizobacterias proporcionan una mayor comprensión acerca de las múltiples facetas que comprende el proceso de supresividad. En particular cobra relevancia el estudio de aquellos parámetros que estimulan la producción y la actividad de las moléculas intervinientes en el proceso de supresividad, tales como antibióticos, enzimas líticas y sideróforos, entre otros, o iones como el Cinc presente en el suelo, altamente relacionados con la supresión natural. Sin embargo, se conocen pocos estudios específicos que relacionen la calidad edáfica con la capacidad supresiva del suelo tal como publicaron Janvier *et al.*, (2007). Más aún, se publicaron muy pocos estudios que puntualmente utilicen

la información que brindan las propiedades biológicas y en particular las propiedades bioquímicas del suelo en relación a su capacidad supresiva tal como indicaron Rossi *et al.*, (2015).

En tanto, la determinación de la función de aquellos parámetros edáficos asociados con la supresión de la enfermedad, pueden ser explorados y explotados para encontrar aquellos suelos que son más propensos a apoyar el biocontrol. Dicha importancia radica tanto para la formulación de inoculantes biológicos mejoradores y agrosustentables como para la formulación de un modelo predictivo del posible desarrollo de una enfermedad. Estos modelos pueden crearse sobre la base de análisis multivariado utilizando indicadores ambientales y algoritmos clasificadores de minería de datos en fuentes de gran dimensionalidad tal como sugieren Freitez *et al.*, (2009) y Bombelli, E.C. (2011).

Las revelaciones sobre los mecanismos de acción por rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal abre nuevas puertas para el diseño de estrategias mejoradoras de su eficiencia como agentes de biocontrol.

La identificación de antimicrobianos originados por agentes supresores tales como β -1,3-glucanasas producidas por la bacteria *KJ464036* puede ser explotado para agilizar el descubrimiento mediante la selección de nuevas cepas que llevan genes sintéticos relevantes. Asimismo el presente trabajo contribuye a la generación de conocimiento en la ecología de la interacción entre microorganismo-planta y es base para la continuación de la investigación a nivel de interacción molecular.

En este sentido se aceptó la hipótesis planteada al establecer que el nivel de actividad antagonista se relaciona con la producción enzimática de la bacteria en forma inducida. Ésto se demostró al hallar un nivel más elevado de actividad de las enzimas β -1,3-glucanasas en la bacteria en presencia del patógeno ($p < 0,05$). *Bacillus KJ464036* mostró una actividad de β -1,3-glucanasa estadísticamente superior ($p < 0,05$) en presencia de *P. palmivora*.

La actividad β -1,4-glucanasas de *Bacillus KJ464036* no fue significativa con respecto al control positivo. El control de esta enzima fue la actividad β -1,3-glucanasa producida por *B. subtilis* de referencia. En tanto, para la evaluación de la actividad de enzimas lipasas secretadas por los cultivos bacterianos se definió la unidad lipolítica (UL) como micromoles de NaOH por miligramo de proteína por hora ($\mu\text{M NaOH} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). La Figura 4.13 muestra la actividad de enzimas lipasas de la bacteria en presencia y en ausencia del patógeno.

Parte de la contribución al conocimiento actual acerca de la eficiencia de la actividad de la enzima lipasa proveniente de *Bacillus subtilis*, caracterizada como mecanismo de supresividad, fue publicada por los autores Sabat *et al.*, (2012), Selva-Mohan *et al.*, (2008),

Bora y Bora (2012) y Mohammad-Sadeghi *et al.*, (2010). Sin embargo en este trabajo no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la actividad de la enzima lipasa en presencia y en ausencia del patógeno ($p < 0,05$).

Como es sabido las enzimas micolíticas producidas por las bacterias antagonistas son muy importantes en tecnología aplicada al control biológico. Numerosos autores tales como Baharum *et al.*, (2003), Huang y Chen (2004) y Gohel *et al.*, (2004) detectaron glucanasas y quitinasas en suelos inoculados con agentes de control biológico y en síntesis este trabajo reveló la producción de la enzima micolítica β -1,3-glucanasa proveniente de *Bacillus subtilis* como mecanismo de supresividad.

Otro de los mecanismos de supresividad estudiados en este Capítulo fue la producción de sideróforos. En la evaluación de la capacidad de producción de sideróforos por cepas de *Bacillus sp.* se sembraron las placas Petri con cada una de las cepas de rizobacterias y junto a ellas se colocaron inóculos de *Phytophthora palmivora*. No obstante en este trabajo no se halló producción de sideróforos por parte de las bacterias propuestas como posibles agentes de control biológico. En cambio en los trabajos publicados por Zawadzka *et al.*, (2009), Hotta *et al.*, (2010) y Shobha y Kumudhini (2012) encontraron producción de sideróforos efectiva por parte de cepas de *Bacillus*.

Merced a la utilización del algoritmo treemap desarrollado para visualización inteligente de datos fue posible mostrar claramente el comportamiento de los datos obtenidos hasta el momento entre el Capítulo 3 y el Capítulo 4 de esta tesis. Se muestra entonces el comportamiento de las variables: cantidad de aislamientos formadores de endosporas, reacción a la tinción de Gram, hidrólisis de almidón, Voges-Proskauer, tamaño del cuerpo celular, utilización de citrato, desarrollo en NaCl 6,5 %, desarrollo a 55 °C, producción de enzima catalasa y control biológico in vitro clasificación a nivel de especie sobre la base de caracteres morfológicos y bioquímicos, actividad biocontrol in vitro, producción de antibióticos, producción de sideróforos, producción de β -1,3-glucanasa, producción de β -1,4-glucanasa, producción de lipasas y origen geográfico de procedencia de los suelos.

4.5. Conclusión

En el Capítulo 4 se estudiaron los posibles mecanismos de supresividad de la bacteria *Bacillus KJ464036*. La actividad β -1,3-glucanasa producida por la bacteria *Bacillus KJ464036* se observó en medio mínimo y fue inducida por la presencia del patógeno. No se observó actividad β -1,3-glucanasa en presencia de glucosa por lo que no fue inducida por dicho sustrato. El control de actividad de dicha enzima fue la actividad β -1,3-glucanasa producida por una cepa *Bacillus subtilis* de referencia. En tanto no se halló actividad de las enzimas β -1,4-glucanasa y lipasa por parte de los aislamientos estudiados.

Se concluye en este ensayo que la molécula identificada con la acción antifúngica contra *Phytophthora* estaría relacionada con la actividad micolítica de la enzima β -1,3-glucanasa producida por *Bacillus KJ464036* en presencia del patógeno.

En el Capítulo 5 se muestran los resultados de los ensayos de patogenicidad y biocontrol in vivo y de la formulación de un biopesticida experimental formulado con *Bacillus KJ464036*.

CAPÍTULO 5

**“Un Poco De Ciencia Aleja de Dios,
Pero Mucha Ciencia Devuelve A ÉL.”
Louis Pasteur (1822-1895)**

CAPÍTULO 5

5. Biopesticidas

5.1. Biopesticidas en la Agricultura Sustentable

Así como fue presentado por Eurostat (2015), está ampliamente aceptado que la agricultura intensiva como sistema de manejo se caracteriza por un gran uso de capital e ingresos para invertir en la adquisición y aplicación de fertilizantes y pesticidas necesarios para el crecimiento de los cultivos. En este sentido se planteó que el excesivo uso de fertilizantes y pesticidas incrementa el riesgo de que los nutrientes y pesticidas permanezcan en la superficie del suelo y contaminen lixiviándose por medio del agua del suelo.

En este trabajo se utilizan como sinónimos los términos biopesticidas y bioplaguicidas. Dentro de esta categoría de productos se incluyen los biofungicidas o fungicidas biológicos. En los últimos 15 años, la literatura científica menciona que la agricultura intensiva incrementó considerablemente como objeto de estudio. Este dato estaría indicando que los investigadores muestran un fuerte interés sobre este tópico de trabajo desde diferentes puntos de estudio, tal como puede observarse en la Fig. 5.1.

Por otra parte desprende a partir del gráfico de nube que la palabra suelo tuvo la mayor frecuencia entre todas las publicaciones, sugiriendo la idea que el rol clave del suelo en este objetivo y el stress que el suelo es el sitio donde causa más efectos negativos que en otras.

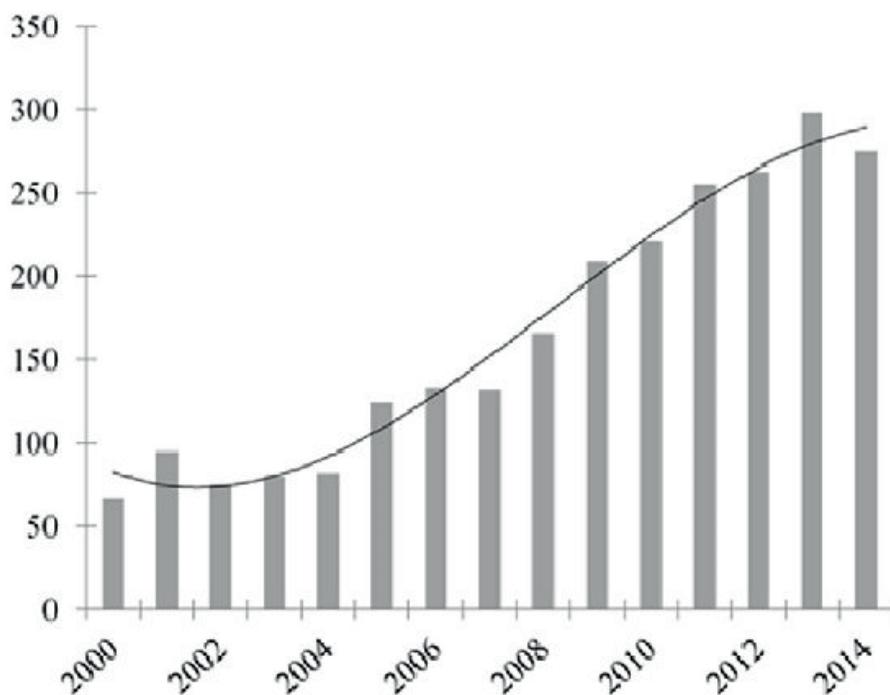


Figura 5.1. Número de publicaciones científicas sobre agricultura sustentable entre 2000 y 2014

Se trabajó sobre una base de datos que incluían títulos de artículos, resúmenes y palabras clave, dentro de las categorías ciencias de la vida y ciencias ambientales. Las sentencias de búsqueda utilizadas para el análisis de text mining fueron agricultura intensiva. El tamaño de cada palabra es proporcional a la representación de este término en el texto.

bioecología e interrelaciones (así como las interacciones existentes entre los productos sanitarios y el ambiente) permite tener una visión general de la situación imperante. De este modo podrían generarse paquetes tecnológicos racionales de manejo fitosanitario para mejorar la competitividad y el posicionamiento de la producción olivícola nacional.

El uso de fitofármacos en un cultivo se hace necesario en muchas ocasiones debido a la presencia de plagas y enfermedades que causan pérdidas considerables en los cultivos. Sin embargo, aplicaciones en forma indiscriminada provocan importantes desequilibrios en el agroecosistema por aparición de poblaciones resistentes de insectos y ácaros, disminución de antagonistas naturales, aparición de plagas y patógenos secundarios, contaminación del ambiente, como así también en los productos derivados de la producción primaria como la presencia de residuos.

En términos generales si se desea utilizar un microorganismo como BCA éste debe poseer los siguientes atributos:

- Alta eficiencia en el establecimiento en el suelo: debe tener la habilidad para establecerse en el ambiente donde debe actuar y aumentar su biomasa.
- Alta competencia: debe ser capaz de competir con la microbiota residente en la rizósfera.
- Elevada capacidad de persistencia en el ambiente: debe poseer formas resistentes, tales como las esporas de bacterias, hongos y protozoarios y los cuerpos poliédricos de virus. Estas formas confieren larga vida en el suelo y almacenaje del formulado biológico.
- Facilidad de reproducir y almacenar: debe tener escasas exigencias nutricionales para facilitar los costos de producción de biomasa.

Por todo lo expuesto se realizó la búsqueda de bacterias con actividad biocontroladora en la rizósfera de olivo.

Como ventajas de los biopesticidas pueden citarse:

- no producen residuos peligrosos
 - reducen significativamente el impacto sobre las especies que no son objeto de los tratamientos
- cuando son producidos localmente pueden ser más económicos que los insecticidas químicos a largo plazo también pueden ser más efectivos que los pesticidas sintéticos.

Como desventajas pueden citarse:

- Alta especificidad, que hace necesaria una identificación exacta de la plaga y su patógeno y puede hacer necesario utilizar muchos biopesticidas. Esto solo se da en casos de parasitismo, por ejemplo hongos que ataquen insectos, en los que hay de por medio procesos de co-evolución. Pero en relaciones con alta cercanía taxonómica, por ejemplo hongos contra hongos, existen procesos de competencia, los que son de baja especificidad.
- A menudo, su velocidad de actuación es lenta por lo que en casos de plagas cuyos daños pueden ser elevados en muy poco tiempo, pueden no ser interesantes de usar.
- A menudo su efectividad es variable debido a la influencia de diversos aspectos bióticos y abióticos debido a que el principio activo del biopesticidas son organismos vivos. Esto es debido principalmente al bajo conocimiento de las condiciones ecológicas del control.

5.1.1. Regulación del uso de plaguicidas en Europa

La lucha química se reveló como un método cotidiano eficaz e indispensable para combatir los agentes patógenos tal como indicaron Leroux, P. (2003) y Pezet *et al.*, (2004). Desde los años '60, este método implicó sobretudo a los fungicidas. Estos productos son utilizados actualmente en diversos cultivos plantados en agricultura periurbana. Alrededor de 78300 toneladas de productos fitosanitarios se utilizan en Francia según datos de la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de Plantas (OEPP) del año 2005. Por citar un ejemplo, esta cantidad corresponde alrededor del 50 % de los productos utilizados en Francia para agricultura.

A partir de su excesivo uso surgieron casos de toxicidad aguda y también crónica para el hombre y los organismos sensibles según publicó Leroux, P. (2004). Por otro lado, se observó que los agentes patógenos pueden devenir resistentes a estos productos químicos según publicaron Panon *et al.*, (2006). Desde el año 2002, existen más de 160 materiales activos de los cuales una veintena de fungicidas fueron clasificados como demasiado tóxicos y en consecuencia están en curso de ser retirados por la normativa vigente.

En el caso de Europa la OEPP pregona por una buena práctica fitosanitaria, de limitar el número de aplicaciones de cada clase química y de utilizar fungicidas de acuerdo con los diferentes modos de acción bioquímica según lo publicado en el Boletín OEPP, (2002). Cabe mencionarse la existencia de un acuerdo con la directiva europea 91/414/CEE concerniente a la puesta en marcha del desarrollo de nuevos productos fitosanitarios.

5.1.2. Regulación del uso de plaguicidas en Argentina

El uso de los plaguicidas se encuentra regulado por diferentes organismos gubernamentales dependiendo del uso para el cual son registrados. Estos organismos son los principales responsables de la normativa que restringe o prohíbe el uso de plaguicidas.

El Registro de Plaguicidas de uso Fitosanitario se encuentra bajo dependencia de la Dirección de Agroquímicos, Productos Farmacológicos y Veterinarios del Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SE.NA.S.A.) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. En este ámbito existen los siguientes Registros:

- Registro Nacional de Terapéutica Vegetal donde se inscriben: Sustancias activas grado técnico, Productos Formulados en lo referido a insecticidas, herbicidas, acaricidas, fungicidas y feromonas, Ampliación de uso de Sustancias Activas y de Productos Formulados, Origen adicional referido a Sustancias Activas y de Productos Formulados, Productos Línea Jardín referido a uso perihogareño.
- Registro de Profesionales independientes especializados en Toxicología y Ecotoxicología, en apoyo al sistema de evaluación de sustancias creado en 1996.
- Registro Nacional de Laboratorios de análisis físicos, químicos, biológicos, insumos agrícolas, suelos, productos y subproductos agrícolas y alimentos, sujetos a régimen de habilitación.
- Registro Nacional de Establecimientos Productores y/o Formuladores de Productos Fitosanitario.
- Registro Nacional de Empresas de Fumigación.

Para garantizar la calidad e inocuidad de los productos fitosanitarios, la autorización de los mismos se desarrolla en el marco de un proceso de aprobación pautado y exhaustivo que determina que el producto es lo que dice ser, es eficaz para el fin que se destina y no implica riesgos indebidos a la salud y/o al ambiente, considerando aspectos de salud humana, de sanidad animal y vegetal en la seguridad alimentaria y de preservación del ambiente.

Se destaca la Resolución SAGPyA 350/99 dado que es el Manual de Procedimientos, Criterios y alcances para el Registro de Productos Fitosanitarios. Las legislaciones de los

estados provinciales adhieren a la normativa nacional en la materia. Algunas provincias y municipios llevan registros independientes de los registros nacionales, en general cuando existe una ley provincial de plaguicidas.

Desde 1969 existe reglamentación nacional que fija límites máximos de residuos de plaguicidas para productos y subproductos agropecuarios, establece regímenes de tolerancias e indica períodos de carencia, contemplado en las leyes 18073, 18796 y 20418. La Resolución 20/95 internaliza los límites máximos de residuos establecidos por las Resoluciones MERCOSUR Nro. 23 y 74 del 1994 para los cultivos de cebolla, arroz, manzana, pera, papa, ajo, frutilla y tomate.

Un ejemplo de fiscalización y control es la actividad realizada por la Corporación del Mercado Central de Buenos Aires, ente gubernamental tripartito que constituye el más importante organismo concentrador de alimentos frescos destinados al consumo de la Ciudad de Buenos Aires y conurbano.

A través del Laboratorio Bromatológico efectúa la detección y cuantificación de Residuos de Plaguicidas en Frutas y Hortalizas y ejerce el poder de policía sanitario y bromatológico así como el decomiso, la alerta a productores, entre otras acciones, según García *et al.*, (2003).

En este Capítulo se muestra la evaluación preliminar de la elaboración de un biopesticida experimental formulado a base de turba estéril inoculada con la bacteria obtenida en el Capítulo 2 *Bacillus KJ464036* en dos concentraciones de formulación: 10^8 UFC.gss⁻¹ y 10^9 UFC.gss⁻¹.

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1 Análisis estadísticos

Se utilizó un diseño factorial de 2x3 en bloques completamente aleatorizados con tres unidades experimentales y seis tratamientos. Los tratamientos fueron:

A: Control olivo (n=20);

B: Control *Phytophthora*, olivo con el agregado de *Phytophthora palmivora* (n=20);

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa R usando ANOVA y

métodos de comparación múltiple de Tukey.

Los datos de frecuencia se sometieron a análisis de Chi-cuadrado sobre la base de tablas de contingencia. Todos los datos se analizaron en el nivel de probabilidad de 0,05.

5.2.2. Evaluación preliminar de la eficiencia del bioformulado experimental

5.2.2.1. Preparación del inóculo fúngico

200 g de semillas de trigo se hidrataron con agua destilada durante 12 h, se escurrieron y secaron entre papel de filtro. Se colocaron en frasco de vidrio y se esterilizaron en autoclave (1 atm, 20 min). Posteriormente se sembraron sobre el trigo ocho discos de micelio de *P. palmivora* desarrollado en medio de cultivo V8-PARPNH. La incubación se realizó en estufa a 25 °C, durante 4 semanas, hasta lograr el crecimiento completo del hongo sobre y dentro de las semillas.

Transcurrido este tiempo se mantuvo en estufa a 30 °C durante una semana para permitir el secado. Luego se realizó la molienda y se conservó en recipiente estéril, cerrado, en oscuridad, a temperatura ambiente.

5.2.2.2. Preparación del soporte

El cultivo utilizado para evaluar in situ la eficiencia del formulado biológico con *Bacillus subtilis* fue *Olea europaea L. variedad manzanilla fina*. Se empleó una mezcla de arena:suelo (3:1), se esterilizó en estufa a 180 °C durante 5 h. Se utilizaron bolsas de poliestireno, cada bolsa fue completada con un volumen de soporte de 800 g y llevada al 60 % de capacidad de campo cuidadosamente por goteo con pipeta de 10 ml.

Se mezcló el inóculo fúngico molido con arena:suelo (3:1 p/p) hasta 3 % P/P (sustrato fúngico 3 % P/P). Se colocaron las 90 macetas en la cámara de cultivo bajo las siguientes condiciones ambientales: 16 h luz a 25 °C, 8 h oscuridad a 16 °C, Intensidad lumínica 220 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$, durante 50 días. El procedimiento anteriormente descrito fue realizado de igual manera para cada uno de los ensayos de patogenicidad y de biocontrol. Nuevamente se evaluó el cumplimiento de los postulados de Köch.

5.2.2.3. Postulados de Köch

Para que una enfermedad sea considerada transmisible debe cumplir requisitos. Estos requisitos fueron enunciados por Robert Köch basados en sus experimentos con *Bacillus anthracis*. Los postulados fueron los siguientes:

El microorganismo debe estar presente en todos los individuos con la misma enfermedad.

El microorganismo debe ser recuperado del individuo enfermo y poder ser aislado en medio de cultivo.

El microorganismo proveniente de ese cultivo debe causar la misma enfermedad cuando se lo inocula a otro huésped.

El individuo experimentalmente infectado debe contener al microorganismo.

Luego se realizó la evaluación de la presencia del patógeno sobre las comunidades bacterianas rizosféricas de olivo en suelo natural.

5.2.2.4. Evaluación de la presencia del patógeno sobre las comunidades bacterianas rizosféricas de olivo en suelo natural

Se utilizó la metodología CLPPs con diluciones seriadas de suelo. Se sembró en la policubeta una dilución de cuatro veces (10^{-4}) la concentración de suelo rizosférico del olivo. Los resultados se analizaron por análisis multivariado de componentes principales según Gómez *et al.*, (2006).

5.3. Resultados

En este Capítulo se describen los experimentos diseñados para el aislamiento, la caracterización y la identificación de los microorganismos utilizados en este trabajo de

investigación. Los resultados se agrupan según la siguiente jerarquización de escritura.

- Patogenicidad de *P. palmivora* en olivo.
- Biocontrol con *Bacillus KJ464036*.
- Evaluación de la presencia *P. palmivora* sobre las comunidades bacterianas del suelo.

5.3.1. Ensayo de patogenicidad de *P. palmivora* en olivo

Tal como se describió en el Capítulo Materiales y Métodos se reprodujeron los postulados de Köch en el ensayo de patogenicidad y biocontrol sobre el cultivo de olivo. La Fig. 5.3. muestra el aislamiento del patógeno en medio selectivo obtenido de una porción de raicilla de olivo.

Observación macroscópica *P. palmivora*



Figura 5.3. *Phytophthora palmivora* desarrollada en medio V8-PARPNH luego de 7 días de incubación a 25 °C

La Fig. 5.4 muestra la raicilla de olivo infestada por *Phytophthora palmivora*

Observación de raicilla de olivo sintomático de *P. palmivora*



Figura 5.4. Raicilla de olivo sintomático de *P. palmivora* obtenida en el ensayo de patogenicidad a los 50 d.p.i.

De este modo se obtuvo nuevamente el mismo patógeno a partir de olivo sintomático en el ensayo de patogenicidad bajo condiciones controladas de ambiente. Dicho patógeno se obtuvo de un ejemplar de olivo con una afectación radical de un 85 %. Se analizó la actividad patógena de *P. palmivora* sobre el cultivo de olivo.

Se reprodujeron los postulados de Köch, aislando el patógeno de raicillas de olivo al manifestarse los síntomas a los 50 d.p.i. *P. palmivora* afectó el crecimiento normal de olivo en las etapas iniciales de crecimiento. En el control del hongo se observó un porcentaje de síntomas radicales del 85 %.

La Figura 5.5. muestra el porcentaje de plantas sintomáticas del control fúngico.

Patogenicidad de *P. palmivora* en olivo expresada en porcentaje de plantas sintomáticas

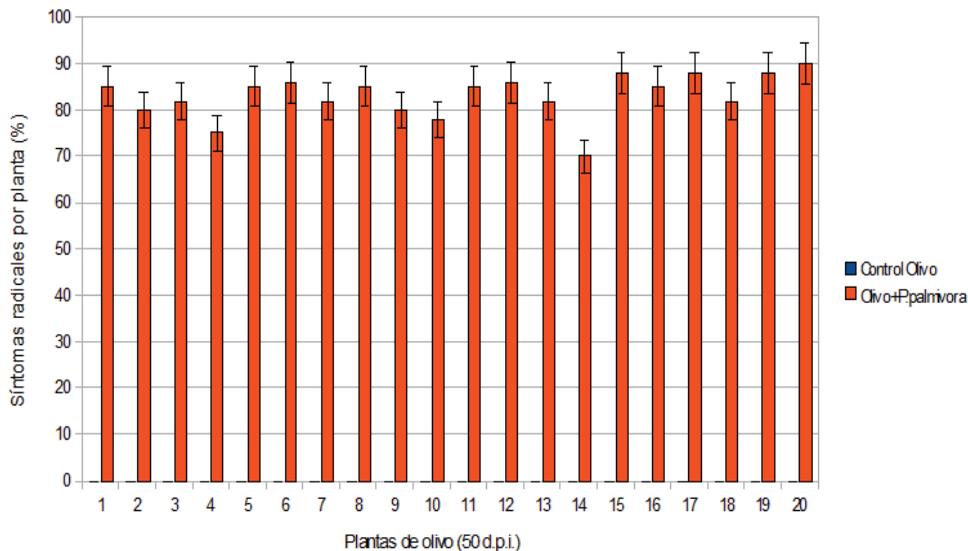


Figura 5.5. Plantas sintomáticas por *P. palmivora* (%). Referencias: **A:** control olivo (n=20); **B:** control olivo en suelo infestado con *P. palmivora* (n=20) al 3 % P/P, 50 d.p.i.

Con respecto a las variables analizadas (largo aéreo, largo radical, peso fresco y peso seco) se observó un marcado efecto deletéreo sobre el cultivo, detectándose diferencias entre los valores hallados de longitud aérea y radical y los controles respectivos sin el hongo medidos a los 50 d.p.i. (Tablas 5.1. y 5.2.).

Tabla 5.1. Patogenicidad. Longitud aérea de olivo

Tratamientos	Crecimiento aéreo (cm)	Crecimiento aéreo (%)
Olivo	47,9 ± 0,2	100
	48,8 ± 0,3	100
Olivo + <i>P. palmivora</i>	26,8 ± 0,3	56,0
	25,4 ± 0,4	52,1

Referencias: **Olivo:** suelo rizosférico de olivo (n=20); **Olivo + *P. palmivora*:** suelo rizosférico de olivo sintomático por *P. palmivora* (n=20). Los datos representan la media de tres repeticiones para cada tratamiento a los 50 d.p.i.

Se observó una diferencia entre la longitud aérea del olivo con respecto al crecimiento aéreo de la planta desarrollada en suelo infestado con *P. palmivora*. El hongo afectó en un 76,6 % el desarrollo aéreo de la planta. El efecto patogénico también se manifestó en la longitud de la raíz principal del cultivo, observándose una disminución del 67 %; en este caso las diferencias también fueron importantes.

Tabla 5.2. Patogenicidad. Longitud radical de olivo

Tratamientos	Crecimiento radical (cm)	Crecimiento radical (%)
Olivo	35,3 ± 0,3	100
	31,6 ± 0,3	100
Olivo + <i>P. palmivora</i>	18,9 ± 0,1	53,5
	21,1 ± 0,2	67,0

Referencias: **Olivo:** suelo rizosférico de olivo (n=20); **Olivo + *P. palmivora*:** suelo rizosférico de olivo sintomático por *P. palmivora* (n=20). Los datos representan la media de tres repeticiones para cada tratamiento a los 50 d.p.i.

Los resultados de la biomasa fresca aérea de olivo se muestran en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Patogenicidad. Biomasa fresca aérea de olivo

Tratamientos	Peso fresco aéreo (g)	Peso fresco aéreo (%)
Olivo	11,192± 0,267	100
	10,516 ± 0,109	100
Olivo + <i>P. palmivora</i>	3,914 ± 0,213	35
	3,574 ± 0,288	33,9

Referencias: **Olivo:** suelo rizosférico de olivo (n=20); **Olivo + *P. palmivora*:** suelo rizosférico de olivo sintomático por *P. palmivora* (n=20). Los datos representan la media de tres repeticiones para cada tratamiento a los 50 d.p.i.

5.3.1.1. Análisis de la biomasa fresca aérea

Cuando se analizó el olivo en suelo infestado con *P. palmivora*, hubo una reducción en la biomasa fresca aérea medida en gramos, de un 49,2 % comparado con el control olivo en el cual desarrolló la planta en suelo sin infestar. La reducción del 72,5 % del crecimiento longitudinal aéreo del olivo en presencia del hongo se observó también en la biomasa de dicha fracción (aérea) que se redujo en 49,2 %; es decir, ambos parámetros revelaron un efecto deletéreo de *P. palmivora* sobre la fracción aérea del olivo. Los resultados de la biomasa seca aérea de olivo se muestran en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Patogenicidad. Biomasa seca aérea de olivo

Tratamientos	Peso seco aéreo (g)	Peso seco aéreo (%)
Olivo	3,524 ± 0,201	100
	3,471 ± 0,363	100
Olivo + <i>P. palmivora</i>	1,893 ± 0,233	51,0
	1,799 ± 0,201	51,8

Referencias: **Olivo:** suelo rizosférico de olivo (n=20); **Olivo + *P. palmivora*:** suelo rizosférico de olivo sintomático por *P. palmivora* (n=20). Los datos representan la media de tres repeticiones para cada tratamiento a los 50 d.p.i.

5.3.1.2. Análisis de la biomasa seca aérea

Cuando se evaluó la biomasa seca aérea del olivo en presencia del hongo se observó una disminución de un 51,8 % en el crecimiento de la planta comparado con el control de olivo desarrollado en suelo sin infestar. Al comparar el valor del efecto deletéreo del patógeno sobre la biomasa seca aérea (disminución del 51,5 %) con el obtenido en el análisis de biomasa fresca de olivo desarrollado en suelo infestado con *P. palmivora* (reducción del 49,2 %) se observó una importante aproximación entre ambos parámetros lo que estaría indicando un efecto deletéreo de *P. palmivora* sobre la fracción aérea de la planta.

A continuación se muestran los resultados observados en la fracción radical del olivo. Los resultados de la biomasa fresca radical de olivo se muestran en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5. Patogenicidad. Biomasa fresca radical de olivo

Tratamientos	Peso fresco radical (g)	Peso fresco radical (%)
Olivo	9,545 ± 0,251	100
	8,939 ± 0,459	100
Olivo + <i>P. palmivora</i>	3,218 ± 0,275	33,7
	2,951 ± 0,836	30,9

Referencias: Olivo: suelo rizosférico de olivo (n=20); Olivo + *P. palmivora*: suelo rizosférico de olivo sintomático por *P. palmivora* (n=20). Los datos representan la media de tres repeticiones para cada tratamiento a los 50 d.p.i.

5.3.1.3. Análisis de la biomasa fresca radical

Cuando se evaluó la biomasa fresca radical medida en gramos en el tratamiento de olivo desarrollado en suelo infestado con *P. palmivora* se encontró una reducción del 48,6 % en biomasa en comparación con el control olivo. Si se compara el efecto deletéreo de la actividad fúngica sobre la biomasa fresca radical (reducción del 48,6 %), con el mismo efecto observado en el crecimiento longitudinal de la raíz principal (reducción del 53,49 %), puede

decirse que ambos parámetros revelan un efecto deletéreo importante de *P. palmivora* sobre el sistema radical del olivo.

Los datos de biomasa seca radical se muestran en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6. Patogenicidad. Biomasa seca radical de olivo

Tratamientos	Peso seca radical (g)	Peso seca radical (%)
Olivo	2,865 ± 0,254	100
	2,307 ± 0,372	100
Olivo + <i>P. palmivora</i>	0,965 ± 0,237	33,7
	0,836 ± 0,332	36,2

Referencias: Biomasa seca radical de olivo en presencia y ausencia de *P. palmivora*, **Olivo:** suelo rizosférico de olivo (n=20); **Olivo + *P. palmivora*:** suelo rizosférico de olivo sintomático de *P. palmivora* (n=20). Los datos representan la media de tres repeticiones para cada tratamiento a los 50 d.p.i.

5.3.1.4. Análisis de la biomasa seca radical

Al analizar la biomasa seca radical del olivo desarrollado en suelo infestado con *P. palmivora* se observó una disminución del 47,5 % comparado con el control olivo. Los resultados se muestran en la Tabla 5.6. *P. palmivora* presente en el suelo afectó el desarrollo del olivo. La biomasa fresca aérea y radical disminuyeron en un 49,2 % y 48,6 %, respectivamente, mientras que la reducción en biomasa seca fue de 51,8 % en la fracción aérea y 47,5 % en la fracción radical.

En el presente estudio se demostró la acción patógena de *P. palmivora* en el cultivo de olivo en condiciones controladas de crecimiento.

5.3.2. Ensayo de biocontrol de *P. palmivora* con *Bacillus KJ464036*

Dado que los resultados del ensayo anterior mostraron la elevada actividad fitopatógena de *P. palmivora* sobre el olivo, se llevó a cabo el ensayo de Biocontrol para evaluar la capacidad biocontroladora real, de la cepa bacteriana en estudio. Para ello se realizaron los siguientes tratamientos:

Control olivo: olivo desarrollado en suelo sin infestar, (n=20), **(A)**

Control hongo: olivo desarrollado en suelo infestado con *P. palmivora* al 3 % P/P (de sustrato fúngico), (n=20), **(B)**

Control bacteriano con *Bacillus KJ464036* 10^8 UFC.g⁻¹: olivo regado con el inoculante en su formulación original (10^8 UFC.g⁻¹), desarrollado en suelo sin infestar, (n=20), **(C)**

Control bacteriano con *Bacillus KJ464036* 10^9 UFC.g⁻¹: olivo regado con el inoculante en su formulación original (10^8 UFC.g⁻¹), desarrollado en suelo sin infestar, (n=20), **(D)**

Tratamiento de biocontrol con *Bacillus KJ464036* 10^8 UFC.g⁻¹: olivo regado con el inoculante en su formulación original (10^8 UFC.g⁻¹), desarrollado en suelo infestado con *P. palmivora* al 3 % P/P (de sustrato fúngico), (n=20), **(E)**

Tratamiento de biocontrol con *Bacillus KJ464036* 10^9 UFC.g⁻¹: olivo regado con el inoculante en su formulación original (10^9 UFC.g⁻¹), desarrollado en suelo infestado con *P. palmivora* al 3 % P/P (de sustrato fúngico), (n=20), **(F)**

Nuevamente en el ensayo de Biocontrol al igual que en el ensayo de Patogenicidad se reprodujeron los postulados de Köch aislando *P. palmivora* en medio V8-PARPNH a partir de raicillas de olivo.

Las variables analizadas fueron:

Plantas sintomáticas, expresado en porcentaje;

Longitud Parte Aérea, expresada en centímetros;

Longitud Raíz Principal, expresado en centímetros;

Peso Fresco Aéreo, expresado en gramos;

Peso Fresco Radical, expresado en gramos;

Peso Seco Aéreo, expresado en gramos;

Peso Seco Radical, expresado en gramos.

Los siguientes resultados obtenidos en el ensayo de biocontrol en olivo, permitieron conocer la acción biocontroladora de *Bacillus KJ464036* sobre este patógeno, evaluar la capacidad de la cepa bacteriana de controlar o suprimir la enfermedad fúngica.

El ensayo de control biológico de *Bacillus KJ464036* sobre *Phytophthora* en olivo se muestra en la Figura 5.7.

Control biológico de *Bacillus KJ464036* sobre *P. palmivora* en olivo



Figura 5.7. Referencias: **A:** control olivo (n=20); **B:** control olivo en suelo infestado con *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20); **C:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10^8 UFC.gss⁻¹ (n=20); **D:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10^9 UFC.gss⁻¹ (n=20); **E:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10^8 UFC.gss⁻¹ + *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20); **F:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10^9 UFC.gss⁻¹ + *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20), a los 50 d.p.i.

5.3.2.1. Análisis cualitativo de síntomas a causa de *P. palmivora*

Las plantas del control olivo (tratamiento A) no presentaron síntomas de infestación por *P. palmivora* por lo que el porcentaje de incidencia de enfermedad fue nulo (0 %). En el control hongo (tratamiento B) se observó el efecto deletéreo de *P. palmivora* a los 50 d.p.i sobre el suelo rizosférico de olivo. Se observaron síntomas de grado 1 (25 % de la planta afectada a nivel radical).

En el control bacteriano (tratamiento C y D) el 100 % de las plantas de olivo presentó buen estado de sanidad. En el tratamiento (D) se observaron síntomas severos de grado 1 en el 33,3 % de las plantas evaluadas (5 de las 15 analizadas) y las plantas restantes (67,6 %) no mostraron signos de enfermedad posteriormente. Por lo expuesto podría evidenciarse que si bien hubo un efecto inocuo de la bacteria sobre el cultivo, no se puso en evidencia un efecto protector por parte de la misma, en los primeros 50 días del ataque fúngico. Si se compara el porcentaje de daño sintomático (46,6 %) observado en el tratamiento B, con el porcentaje de daño (0 %) en tratamiento de biocontrol (D), es posible observar que una vez que las plantas desarrollaron (7 de las 15 analizadas) lograron escapar a los daños provocados por el patógeno en presencia de *Bacillus KJ464036*. Por lo antedicho podría proponerse el efecto protector de la bacteria luego de 50 días post-infestación.

En el tratamiento F no se observaron síntomas y efectos deletéreos a causa de *P.*

palmivora. Aquí se puso de manifiesto el efecto protector de *Bacillus KJ464036* con la concentración óptima efectiva de 10^9 UFC.gss⁻¹ para controlar al patógeno in vivo. Los resultados del análisis de sintomatología, se muestran en la Fig. 4.22.

La Tabla 5.7 muestra el crecimiento longitudinal aéreo.

Tabla 5.7. Biocontrol. Longitud aérea del olivo

Tratamientos	Crecimiento aéreo (cm)	Crecimiento aéreo (%)
A	50,5 ± 0,3	100
	45,8 ± 0,3	100
B	28,1 ± 0,1	55,6
	25,7 ± 0,2	33,2
C	44,4 ± 0,1	87,9
	43,8 ± 0,2	95,6
D	47,4 ± 0,1	93,9
	46,5 ± 0,2	98,8
E	30,3 ± 0,1	66,1
	30,8 ± 0,2	89,1
F	38,8 ± 0,1	76,1
	36,1 ± 0,2	78,8

Referencias: **A:** control olivo (n=20); **B:** control olivo en suelo infestado con *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20); **C:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10^8 UFC.gss⁻¹ (n=20); **D:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10^9 UFC.gss⁻¹ (n=20); **E:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10^8 UFC.gss⁻¹ + *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20); **F:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10^9 UFC.gss⁻¹ + *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20), a los 50 d.p.i.

5.3.2.2. Análisis del crecimiento longitudinal aéreo

Al analizar en los tratamientos A, B, C, D, E y F, la variable longitud aérea medida en centímetros, se encontró que el control hongo presenta diferencia con los tratamientos A, C, D, E y F es decir se observó, un elevado efecto deletéreo, (aproximadamente una reducción del 67 %), con respecto al control olivo. Se observó además que todos los tratamientos presentaron diferencias con respecto al control olivo. B mostró una reducción del 67 %, C y

D controles bacterianos presentaron un valor similar (100 %) al control olivo en el crecimiento longitudinal aéreo, E una disminución del 10 % y F un valor similar (100 %) al control olivo analizando la misma variable.

Con los datos mencionados sobre el tratamiento C, podría demostrarse una vez más la inocuidad de *Bacillus KJ464036* sobre el cultivo, ya que presentó crecimiento superior al alcanzado en ausencia de la bacteria y pudiendo inferirse una posible actividad PGPR sobre la planta. En cuanto al tratamiento con el hongo (B), se observó su alto grado de patogenicidad, con respecto al tratamiento de biocontrol (D), si bien, en presencia de *Bacillus KJ464036* la disminución del crecimiento fue menor, que en ausencia de la misma, no fue suficiente para lograr el control de la plaga. Dicho de otra forma la actividad biocontroladora de la bacteria sobre el hongo puede observarse sólo en un 30 % de la fracción aérea.

La Tabla 5.8 muestra el crecimiento longitudinal radical.

Tabla 5.8. Biocontrol. Longitud radical del olivo

Tratamientos	Crecimiento radical (cm)	Crecimiento radical (%)
A	31,2 ± 0,3	100
	30,7 ± 0,3	100
B	13,2 ± 0,1	42,3
	11,7 ± 0,2	38,0
C	27,1 ± 0,1	86,8
	23,1 ± 0,2	75,2
D	28,9 ± 0,1	92,6
	27,7 ± 0,2	90,0
E	22,3 ± 0,1	71,5
	21,8 ± 0,2	70,9
F	32,8 ± 0,1	105,1
	30,8 ± 0,2	100,3

Referencias: **A:** control olivo (n=20); **B:** control olivo en suelo infestado con *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20); **C:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10⁸ UFC.gss⁻¹ (n=20); **D:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10⁹ UFC.gss⁻¹ (n=20); **E:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10⁸ UFC.gss⁻¹ + *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20); **F:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10⁹ UFC.gss⁻¹ + *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20), a los 50 d.p.i.

5.3.2.3. Análisis del crecimiento longitudinal radical

Cuando se evaluó el crecimiento longitudinal del olivo en presencia de *P. palmivora* se observó una reducción del 57,6 % de la raíz principal con respecto al control olivo. Los controles bacterianos nuevamente mostraron similitud con respecto al control olivo (88 %) lo que estaría indicando nuevamente la posible actividad PGPR de la cepa bacteriana. En tanto que el tratamiento de biocontrol E mostró una reducción del 30 % en el crecimiento longitudinal de la raíz principal comparado con el control olivo, en tanto F mostró un efecto controlador con una similitud del 100 % con el control olivo en presencia del hongo y de *Bacillus KJ464036* 10^9 UFC.gss⁻¹. La Tabla 5.9. muestra los resultados de la biomasa fresca aérea.

Tabla 5.9. Biocontrol. Biomasa fresca aérea del olivo

Tratamientos	Peso fresco aéreo (g)	Peso fresco aéreo (%)
A	11,502 ± 0,281	100
	9,187 ± 0,205	100
B	4,689 ± 0,327	40,8
	3,163 ± 0,201	34,4
C	9,912 ± 0,298	86,2
	8,527 ± 0,255	92,8
D	10,592 ± 0,245	92,1
	8,315 ± 0,297	90,5
E	6,881 ± 0,239	59,8
	5,625 ± 0,266	61,2
F	8,449 ± 0,393	73,5
	7,195 ± 0,284	78,3

Referencias: **A:** control olivo (n=20); **B:** control olivo en suelo infestado con *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20); **C:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10^8 UFC.gss⁻¹ (n=20); **D:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10^9 UFC.gss⁻¹ (n=20); **E:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10^8 UFC.gss⁻¹ + *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20); **F:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10^9 UFC.gss⁻¹ + *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20), a los 50 d.p.i.

5.3.2.4. Análisis de la biomasa fresca aérea

Al analizar el crecimiento de la parte aérea del olivo medida en biomasa fresca se encontró que el control hongo presentó una notoria diferencia del 50 % con respecto a los demás tratamientos. En tanto que los controles bacterianos mostraron valores similares al observado en el control olivo. En cuanto al tratamiento de biocontrol E se observó una disminución del 30 % de biomasa fresca aérea y el tratamiento de biocontrol F mostró un valor similar al control olivo. Los resultados pueden verse en la Tabla 5.9.

La Tabla 5.10. muestra los resultados de la biomasa seca aérea.

Tabla 5.10. Biocontrol. Biomasa seca aérea del olivo

Tratamientos	Peso seco aéreo (g)	Peso seco aéreo (%)
A	3,504 ± 0,231	100
	3,251 ± 0,388	100
B	1,355 ± 0,439	38,7
	1,189 ± 0,207	36,3
C	2,941 ± 0,274	84,0
	2,265 ± 0,433	69,5
D	3,169 ± 0,285	90,4
	3,025 ± 0,673	92,9
E	2,324 ± 0,267	66,3
	2,191 ± 0,849	67,3
F	2,518 ± 0,421	71,9
	2,231 ± 0,512	68,6

Referencias: A: control olivo (n=20); B: control olivo en suelo infestado con *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20); C: olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10⁸ UFC.gss⁻¹ (n=20); D: olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10⁹ UFC.gss⁻¹ (n=20); E: olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10⁸ UFC.gss⁻¹ + *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20); F: olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10⁹ UFC.gss⁻¹ + *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20), a los 50 d.p.i.

5.3.2.5. Análisis de biomasa seca aérea

Se observó que la biomasa seca aérea guarda correlación con los datos obtenidos en la biomasa fresca mostrando una pérdida de agua de alrededor del 85 %. Lo que puede explicarse si se considera que se trata de plantas jóvenes las cuales presentan un alto contenido acuoso

La Tabla 5.11. muestra los resultados de la biomasa fresca radical.

Tabla 5.11. Biocontrol. Biomasa fresca radical del olivo

Tratamientos	Peso fresco radical (g)	Peso fresco radical (%)
A	9,315 ± 0,207	100
	9,309 ± 0,632	100
B	3,176 ± 0,244	39,1
	3,124 ± 0,525	33,5
C	9,491 ± 0,288	101,9
	8,589 ± 0,327	92,3
D	10,350 ± 0,309	101,1
	9,187 ± 0,451	98,6
E	4,784 ± 0,342	48,6
	3,522 ± 0,527	37,8
F	8,943 ± 0,296	99,0
	7,905 ± 0,771	84,9

Referencias: **A:** control olivo (n=20); **B:** control olivo en suelo infestado con *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20); **C:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10⁸ UFC.gss⁻¹ (n=20); **D:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10⁹ UFC.gss⁻¹ (n=20); **E:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10⁸ UFC.gss⁻¹ + *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20); **F:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10⁹ UFC.gss⁻¹ + *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20), a los 50 d.p.i.

5.3.2.6. Análisis de la biomasa fresca radical

Fue posible cuantificar la actividad altamente deletérea de *P. palmivora* sobre todo el sistema radical. Nuevamente se muestra un crecimiento superior al control olivo en el sistema radical crecido en presencia de *Bacillus KJ464036*. Los resultados se muestran en la Tabla 5.11.

La Tabla 5.12 muestra la biomasa seca radical del olivo.

Tabla 5.12. Biocontrol. Biomasa seca radical del olivo

Tratamientos	Peso seco radical (g)	Peso seco radical (%)
A	2,318 ± 0,239	100
	2,292 ± 0,552	100
B	0,974 ± 0,267	42,0
	0,909 ± 0,744	39,6
C	2,985 ± 0,416	128,8
	2,858 ± 0,389	124,5
D	2,303 ± 0,752	99,3
	2,311 ± 0,871	99,6
E	1,277 ± 0,832	55,1
	1,095 ± 0,195	47,7
F	2,382 ± 0,341	102,8
	2,230 ± 0,679	97,2

Referencias: **A:** control olivo (n=20); **B:** control olivo en suelo infestado con *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20); **C:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10^8 UFC.gss⁻¹ (n=20); **D:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10^9 UFC.gss⁻¹ (n=20); **E:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10^8 UFC.gss⁻¹ + *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20); **F:** olivo con el agregado de bioformulado *Bacillus KJ464036* 10^9 UFC.gss⁻¹ + *P. palmivora* al 3 % P/P (n=20), a los 50 d.p.i.

5.3.2.7. Análisis de la biomasa seca radical

Al analizar el crecimiento de la parte radical del olivo medida en biomasa seca, se encontró que el control hongo presentó una notoria diferencia con respecto a los demás

tratamientos. En tanto que, el control bacteriano mostró un crecimiento superior que el observado en el control olivo. En cuanto al tratamiento de biocontrol, se observó una disminución del 80 % de biomasa fresca aérea. Los resultados pueden verse en la Tabla 5.12.

5.3.3. Evaluación de la presencia del patógeno sobre las comunidades bacterianas del suelo natural

5.3.3.1. Análisis estadísticos

Sobre suelo natural proveniente del sitio LR y en condiciones semicontroladas en invernáculo con un diseño factorial de 6x3 en bloques completamente aleatorizados con tres unidades experimentales y seis tratamientos. Los tratamientos fueron:

Control olivo: olivo desarrollado en suelo sin infestar, (n=15), **(A)**

Control hongo: olivo desarrollado en suelo infestado con *P. palmivora* al 3 % P/P (de sustrato fúngico), (n=15), **(B)**

Control bacteriano con *Bacillus KJ464036* 10^8 UFC.gss⁻¹: olivo con el agregado de bioformulado en su formulación original (10^8 UFC.gss⁻¹), desarrollado en suelo sin infestar, (n=15), **(C)**

Control bacteriano con *Bacillus KJ464036* 10^9 UFC.gss⁻¹: olivo con el agregado de bioformulado en su formulación original (10^9 UFC.gss⁻¹), desarrollado en suelo sin infestar, (n=15), **(D)**

Tratamiento de biocontrol con *Bacillus KJ464036* 10^8 UFC.gss⁻¹: olivo con el agregado de bioformulado en su formulación original (10^8 UFC.gss⁻¹), desarrollado en suelo infestado con *P. palmivora* al 3 % P/P (de sustrato fúngico), (n=15), **(E)**

Tratamiento de biocontrol con *Bacillus KJ464036* 10^9 UFC.gss⁻¹: olivo con el agregado de bioformulado en su formulación original (10^9 UFC.gss⁻¹), desarrollado en suelo infestado con *P. palmivora* al 3 % P/P (de sustrato fúngico), (n=15), **(F)**

Para el análisis estadístico se utilizó componentes principales y el algoritmo de cluster exclusivo k-means con clusters de tamaños 2, 4 y 6. Luego de aplicar el algoritmo contenido en la función CLARA del programa R se realizó la validación del mismo utilizando la técnica de validación interna Silhouette según Agrawal *et al.*, (1998). A los 50 d.p.i se realizó un análisis de perfiles de comunidades bacterianas del suelo utilizando la dilución de suelo de 10^{-4} . Los resultados se analizaron por componentes principales.

Microplacas conteniendo diluciones de suelo

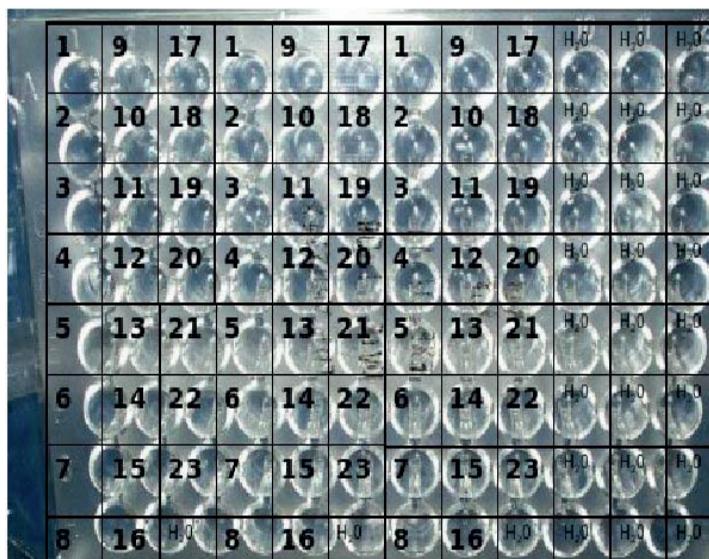


Figura 5.8. Esquema de siembra de las diluciones seriadas de suelo en las microplacas

En la Fig. 5.8 se muestran las microplacas conteniendo suelo proveniente del ensayo de biocontrol. Se utiliza la técnica del análisis del perfil funcional de las comunidades bacterianas del suelo medidas a 24 h de incubación a 28 °C.

Microplacas conteniendo suelo del ensayo de biocontrol

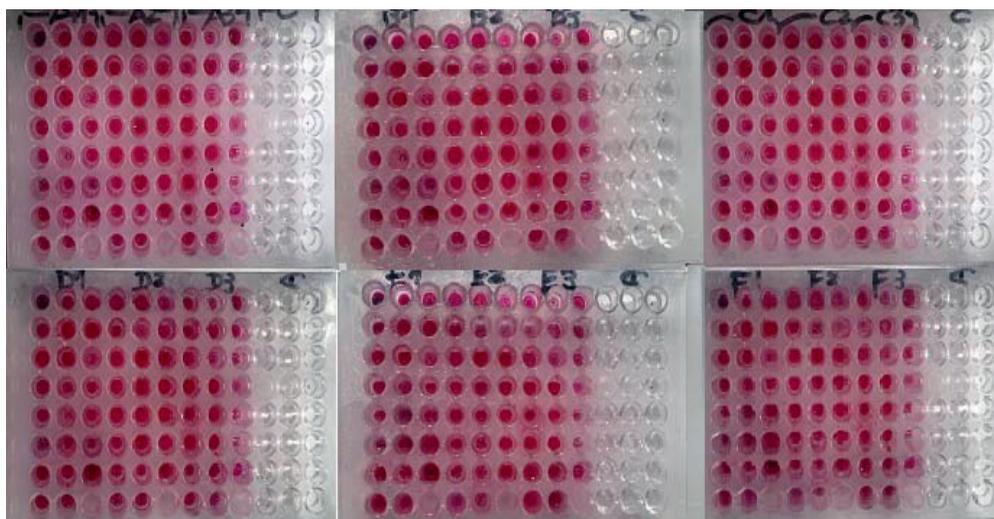


Figura 5.8. Microplacas conteniendo suelo incubado durante 24 h a 28 °C

Los resultados observados en el estudio de perfiles de utilización de diferentes fuentes carbonadas para los tratamientos sobre el suelo natural en presencia y en ausencia de *P. palmivora* se muestran en la Figura 5.9. En orden de determinar la diferenciación del promedio de absorbancia del color desarrollado (AWCD) entre los distintos tratamientos en el suelo con respecto al metabolismo de las fuentes carbonadas cada uno de los tratamientos fue sometido al análisis de la componente principal.

ACP de AWCD en presencia y en ausencia de *P. palmivora*

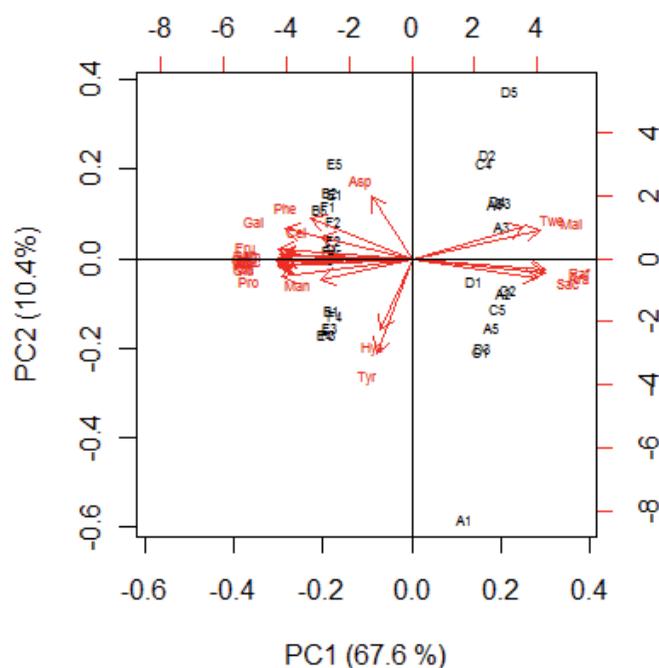


Figura 5.9. Referencias: **A:** control olivo (n=15); **B:** control olivo en suelo infestado con *P. palmivora* al 3 % P/P (n=15); **C:** olivo en suelo con *Bacillus KJ464036* 10^8 UFC.g⁻¹ (n=15); **D:** olivo en suelo con *Bacillus KJ464036* 10^9 UFC.g⁻¹ (n=15); **E:** olivo en suelo con *Bacillus KJ464036* 10^8 UFC.g⁻¹ + *P. palmivora* al 3 % P/P (n=15); **F:** olivo en suelo con *Bacillus KJ464036* 10^9 UFC.g⁻¹ + *P. palmivora* al 3 % P/P (n=15), a los 50 d.p.i.

El ensayo de CLPPs se realizó por triplicado. Los tratamientos B, E y F incluían al patógeno. En la Fig. 5.10. puede observarse un comportamiento diferencial en dos clusters de agrupamientos que explicaron la máxima variabilidad del sistema en un 79,5 %.

Los tratamientos A, C y D mostraron un perfil de fuentes carbonadas únicas como Tween (Twe), Maltosa (Mal), Rafinosa (Raf), Sacarosa (Sac) y Arabinosa (Ara). La

utilización de dichas fuentes carbonadas mostró correlación positiva con la ausencia del patógeno en el suelo natural. Los tratamientos B, E y F mostraron un comportamiento metabólico de las comunidades bacterianas del suelo en presencia del patógeno ya que los tratamientos B, E y F se agruparon en un cluster diferencial utilizando las fuentes carbonadas únicas Manosa (Man), Fructosa (Fru), Ramnosa (Ram), Lactosa (Lac), Celulosa (Cel), Glucosa (Glu), Acético (Ace), Xilosa (Xil), Láctico (Lct), Citrato (Cit), Succínico (Suc), Aspartato (Asp), Histidina (Hys), Prolina (Pro), Fenol (Fen), Galactosa (Gal), Glicerol (Gli) y Tirosina (Tir). Estas fuentes mostraron correlación con los tratamientos que incluían al patógeno.

Este ensayo podría explicar el comportamiento metabólico diferencial de las comunidades bacterianas del suelo en presencia del patógeno. Por lo que utilizando una metodología dependiente de cultivo analizando el perfil de la utilización de fuentes carbonadas únicas a nivel de comunidades bacterianas del suelo fue posible cumplir con el objetivo de comprobar un cambio en las comunidades ante la presencia del patógeno.

Por tanto se registraron cambios en la diversidad metabólica de las comunidades bacterianas del suelo en presencia del patógeno. Esto estaría indicando que la presencia del patógeno altera al patosistema a nivel metabólico. Se corrobora entonces la hipótesis que establece la presencia del patógeno modifica las comunidades bacterianas del suelo

Cluster de AWCD en presencia y en ausencia de *P. palmivora*

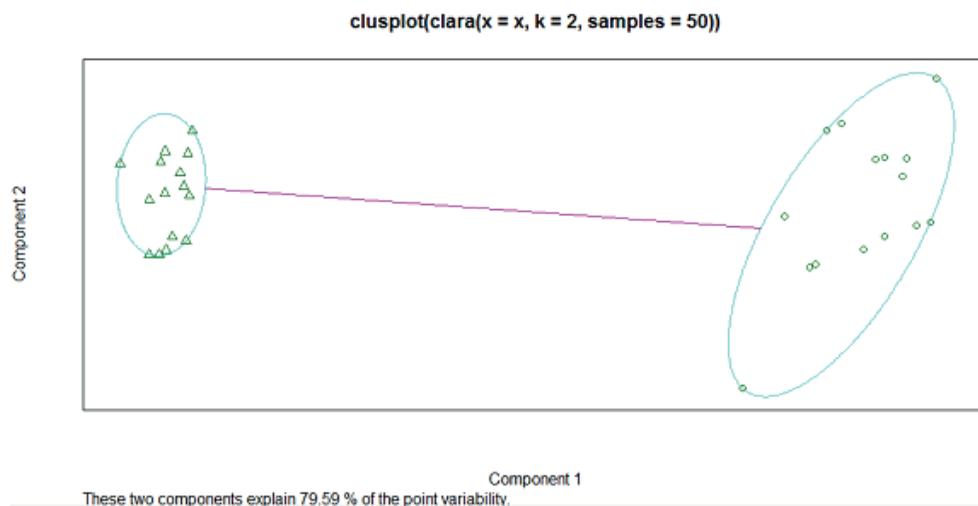


Figura 5.10. Referencias: **A:** control olivo (n=15); **B:** control olivo en suelo infestado con *P. palmivora* al 3 % P/P (n=15); **C:** olivo en suelo con *Bacillus KJ464036* 10^8 UFC.g⁻¹ (n=15); **D:** olivo en suelo con *Bacillus KJ464036* 10^9 UFC.g⁻¹ (n=15); **E:** olivo en suelo con *Bacillus KJ464036* 10^8 UFC.g⁻¹ + *P. palmivora* al 3 % P/P (n=15); **F:** olivo en suelo con *Bacillus KJ464036* 10^9 UFC.g⁻¹ + *P. palmivora* al 3 % P/P (n=15), a los 50 d.p.i.

En este análisis de agrupamiento en función de la presencia y ausencia de *P. palmivora* se utilizó la función CLARA de R con K=2 y muestras 50. Las primeras dos componentes lograron diferenciar el suelo en ausencia y en presencia del patógeno en un 79,59%. El análisis de clusters fue validado mediante Silhouette (Fig. 5.11.).

Validación del análisis de cluster con Silhouette

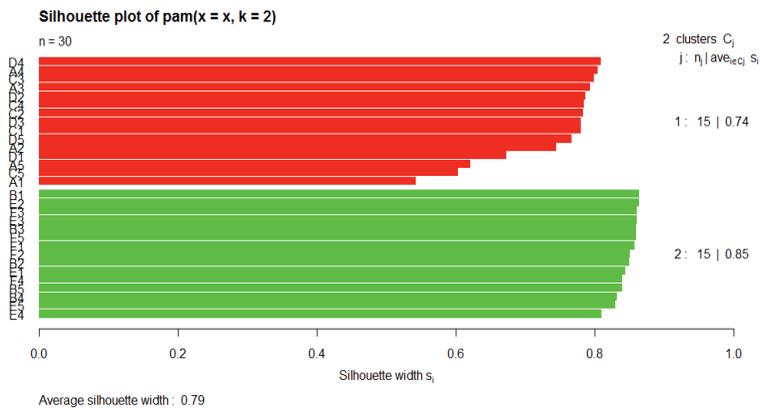


Figura 5.11. Referencias: **A:** control olivo (n=15); **B:** control olivo en suelo infestado con *P. palmivora* al 3 % P/P (n=15); **C:** olivo en suelo con *Bacillus KJ464036* 10^8 UFC.g⁻¹ (n=15); **D:** olivo en suelo con *Bacillus KJ464036* 10^9 UFC.g⁻¹ (n=15); **E:** olivo en suelo con *Bacillus KJ464036* 10^8 UFC.g⁻¹ + *P. palmivora* al 3 % P/P (n=15); **F:** olivo en suelo con *Bacillus KJ464036* 10^9 UFC.g⁻¹ + *P. palmivora* al 3 % P/P (n=15), a los 50 d.p.i.

5.4. Discusión

En primer lugar, cabe mencionarse la estrecha vinculación entre la agricultura sustentable y el uso de biopesticidas. La agricultura sustentable incluye sistemas agrícolas integrados y orgánicos que buscan reducir el uso de fertilizantes químicos, pesticidas sintéticos, aditivos y reguladores del crecimiento para mejorar la salud y calidad del suelo. En este sentido y con el fin de lograr la eficiencia de los sistemas productivos, resulta necesario utilizar técnicas que permitan proveer niveles adecuados de nutrientes para suplir los requerimientos de los cultivos, y controlar o suprimir, efectivamente, plagas y malezas con métodos no contaminantes.

Por otra parte, es sabido que los abonos orgánicos aportan nutrientes para el

crecimiento de las plantas, estimulan la actividad biológica en el suelo, suprimen enfermedades, estimulan los ciclos de los nutrientes, mejoran las condiciones físicas del suelo y permiten reciclar residuos de cosecha y estiércol. Sin embargo, la supresividad en una enmienda orgánica o en un compost es materia de discusión. Algunos estudios realizados por Tilston *et al.*, (2002) y Scheuerell *et al.*, (2005) comunicaron un incremento en la incidencia y severidad después de producida la enmienda orgánica. En cambio, Termorshuizen *et al.*, (2007) observaron la supresión de enfermedad en un 54 % de los casos de estudio, supresividad no significativa en un 42,7 % y aumento de enfermedad en tan sólo un 3,3 %.

Otros autores como Szczech y Smolinska (2001) y Borrero *et al.*, (2004) observaron las bondades del compost como importante característica para influir sobre la microbiota del suelo por la supresión de numerosos fitopatógenos, en particular, especies pertenecientes a los géneros *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium spp.*

En una amplia investigación sobre 1964 estudios experimentales, Bonanomi *et al.*, (2010) hallaron que las enmiendas orgánicas fueron supresivas de enfermedades en un 45 % de los casos, no significativas en un 35 %, pero conducivas en un 20 %, es decir observaron un aumento de la incidencia de la enfermedad. Por lo expuesto sobre la naturaleza de la aplicación práctica del compost para la supresividad de enfermedades en sistemas agrícolas reales se ocultan resultados inconsistentes. El punto crítico reside en que el compost puede ser producido a partir de una amplia variedad de residuos de plantas y animales y ésto conduce a la variación en las propiedades químicas y microbiológicas en el producto final y luego en su capacidad supresiva de enfermedades. Por tanto las complejas relaciones entre los factores dificulta la predicción de eficacia en la supresividad del compost.

Sin embargo, se realizaron esfuerzos sustanciales durante las últimas décadas en búsqueda de mecanismos supresivos para lograr la supresión de enfermedades según Janvier *et al.*, (2007), y la identificación de indicadores de supresividad en enmiendas orgánicas tal como observaron Bonanomi *et al.*, (2010) y en suelos agrícolas según Rossi *et al.*, (2015).

En un sentido más específico y en condiciones más controladas se plantea el desarrollo y el uso de un biopesticida. Un biopesticida se define como un agente de control biológico aplicado de manera inundativa para controlar una plaga determinada de acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA). Dicha Agencia indica que el ingrediente activo de un biopesticida puede ser una sustancia natural de origen animal, vegetal, un organismo vivo, un virus o algún mineral.

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)

consideró la importancia del empleo de agentes de biocontrol a través de un documento emitido en 2007 en el que expresa: la agricultura dependerá mucho del control biológico como componente mayor del manejo integrado de plagas. Los avances en técnicas moleculares y en el conocimiento científico en general serán la base del desarrollo de esta tecnología alternativa. Las presentaciones realizadas muestran que en América Latina diferentes patógenos sirvieron como modelo para la aplicación de técnicas de biocontrol.

Por otro lado, la gama de cultivos a proteger es muy amplia: cultivos extensivos tales como leguminosas forrajeras de clima templado y gramíneas como trigo y cebada, cultivos hortícolas, frutales y forestales. En este sentido se propuso una gran diversidad de agentes de biocontrol los cuales constituyen un recurso genético invaluable: bacterias rizosféricas, hongos entomopatógenos y levaduras, aislados de nuestros ecosistemas, que estarían asegurando un control efectivo y no agresivo para el ambiente. Para su aplicación comercial se requiere desarrollar estrategias de producción masiva de los microorganismos, normas de calidad para los bioplaguicidas, y marcos legales para registrar y regular el uso de organismos nativos según publicó FAO, (2007).

En efecto la demanda impuesta por la sustentabilidad está conduciendo al uso de estrategias que mantengan una protección del medioambiente. En este contexto el uso de inóculos microbianos cobra interés en todo el mundo. Los microorganismos más usados son *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces*. El control biológico se transforma entonces en el mejor método para optimizar las actividades de las especies beneficiosas y conseguir la reducción de las actividades dañinas de ciertas plagas y enfermedades.

En el presente Capítulo se comprobó la hipótesis que establece es posible elaborar un formulado con capacidad biopesticida con cierto grado de eficiencia. Se comprobó que la dosis máxima del bioformulado experimental elaborado con la concentración 1.10^9 UFC.gss⁻¹ de *Bacillus KJ464036* fue eficiente contra *P. palmivora*. Dado que el término eficiente se refiere a controlar la capacidad del patógeno con la menor cantidad posible de bacterias utilizando el menor recurso posible se midió la eficiencia en dos niveles de dosis de producto. La eficiencia óptima del bioformulado se encontró que se logra con la concentración de 10^9 UFC.gss⁻¹ de *Bacillus KJ464036* en estudios preliminares.

La contribución al desarrollo de un modelo de control de *P. palmivora* en olivo en Argentina así como la obtención de un producto comercial de impacto agronómico, económico, político y ambiental son objetivos claramente enmarcados en el desarrollo tecnológico y en la innovación. Focalizando en estos objetivos se enfatizó en la

implementación de herramientas de microbiología clásica y molecular como así también informáticas de última generación como la minería de datos. La técnica de aplicación del producto biológico para el control de la plaga vegetal está fundamentada en la investigación seguida de transferencia científica y tecnológica.

La mayoría de los casos que intentaron dar respuesta en los sistemas de producción a nivel comercial fallaron en lograr la transferencia tecnológica de nuevas fuentes de control de enfermedad. Así como en la baja supervivencia y actividad de algunos microorganismos en un sistema biológico extraño y en la competencia con el gran número de microorganismos adaptados al mismo suelo. La supresividad de enfermedad en un suelo determinado requiere la interacción entre múltiples factores bióticos y abióticos y la función de un agente específico en sitios externos al sistema específico, podría ser disminuida en su efecto.

La supresividad del suelo a fitopatógenos es un concepto holístico y se basa en la teoría general de sistemas y de la complejidad. La complejidad es precursora de la estabilidad y en ecología del suelo, la propiedad de organización de los sistemas complejos podría relacionarse con la supresividad propia de ese suelo. Con el enfoque holístico existen mayores posibilidades de manejar la supresividad mediante cambios profundos en la estructura del sistema y así mejorar el control biológico.

Bajo la perspectiva de sistemas cuando se pretenden inducir cambios profundos en el comportamiento de un sistema se deben realizar cambios profundos en su estructura. Dada la naturaleza compleja de las interacciones microbianas que tienen lugar en el suelo y que impiden que los patógenos de raíz sean exitosos en los suelos supresivos, bajo el enfoque holístico la investigación y el manejo de sistemas agrícolas debe reconocer que si existe un suelo supresor a ciertos fitopatógenos, hay que conservar su estructura y que si se desea inducir supresividad a un suelo donde las enfermedades causan devastación, debe hacer cambios profundos en su estructura.

Recientemente se evaluaron más aproximaciones para conseguir el manejo de la enfermedad biológicamente mediada proveniente del suelo. Más allá de inoculantes de suelos o materiales propagantes de cultivos con formulaciones producidas en masa de agentes biológicos no nativos, una estrategia emergente emplea prácticas para manejar la biología del suelo residente del sistema con el objetivo de inducir la supresividad.

Tal como se mencionó en este trabajo el conocimiento acerca de la estructura y función de la composición bacteriana que rodea a la raíz de olivo es relevante por la competencia por los nutrientes, la colonización de una bacteria exógena entre las comunidades autóctonas de la rizósfera de olivo, la capacidad para lograr establecerse y duplicar su población en poco

tiempo. En el presente trabajo al probar la hipótesis que establece la presencia del patógeno afecta la composición bacteriana de la rizósfera se encontró que existen evidencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para decir que la presencia del patógeno afecta la composición bacteriana del suelo con las técnicas funcionales utilizadas dependientes de cultivo. Mayores esfuerzos de profundización del estudio deberán realizarse continuando con la investigación.

En el ensayo de patogenicidad se observó que *Phytophthora palmivora* afectó el crecimiento del olivo en un 85 %. Se encontró un efecto deletéreo sobre las plantas observado a través de un elevado porcentaje de plantas sintomáticas a los 50 d.p.i, presencia de amarillez y desecación en hojas y raíz. En presencia de *Phytophthora palmivora*, el biopesticida experimental conteniendo 10^9 UFC.gss⁻¹ ejerció control sobre el hongo reflejado en ausencia de síntomas y en un mejor crecimiento vegetal.

La acción benéfica de *Bacillus KJ464036* estaría influida por el patógeno *Phytophthora palmivora*. Continuando con la evaluación de variables microbiológicas se llevó a cabo el análisis de los diferentes perfiles fisiológicos de la comunidad microbiana del suelo (CLPPs). Este análisis está basado en la capacidad de los microorganismos para oxidar diferentes sustratos carbonados puesto que este método es muy utilizado para diferenciar las comunidades microbianas presentes en diferentes habitats según Garland, J. L. (1997).

Dentro del análisis multivariado aplicado a CLPPs el análisis de la componente principal explicó claramente una diferenciación en dos clusters diferentes para el suelo con presencia del patógeno y ausencia del patógeno. Por tanto el presente trabajo concuerda con lo observado por Garland, J. L. (1997), Stenberg, B. (1999) y García *et al.*, (2012) quienes observaron que CLPPs es una herramienta sensible para detectar cambios en la perturbación del suelo. Este constituye un aporte particularmente interesante de este trabajo ya que CLPPs demostró ser indicador de cambio vinculado con la presencia del patógeno.

Por lo expuesto podría decirse que el ítem de evaluar los perfiles funcionales al nivel de comunidades microbianas enmarcado en el objetivo de evaluar las variables microbiológicas como indicadores de cambio ante la presencia del patógeno en el suelo fue completado en su totalidad y además mostró ser una variable que podría comportarse como indicadora de cambio por la presencia del patógeno entre todas las variables analizadas.

Como proceso de manejo podría esperarse algún conocimiento de las poblaciones bacterianas funcionales que son contribuyentes a la supresividad observada. Por lo que utilizando una metodología dependiente de cultivo en el análisis del perfil de la utilización de

fuentes carbonadas únicas a nivel de comunidades bacterianas del suelo fue posible cumplir con el objetivo de comprobar un cambio en las comunidades ante la presencia del patógeno.

Por tanto se registraron modificaciones en la diversidad metabólica de las comunidades bacterianas del suelo en presencia del patógeno. Esto estaría indicando que la presencia del patógeno altera al patosistema a nivel metabólico. Se corrobora entonces la hipótesis que establece la presencia del patógeno modifica las comunidades bacterianas del suelo.

5.5. Conclusión

Se obtuvieron un total de 452 cepas bacterianas de las cuales se seleccionaron aquellas formadoras de endosporas. Posteriormente se evaluó un total de 63 aislamientos bacterianos procedentes del suelo rizosférico de olivo. Se evaluó la capacidad biopesticida in vitro de las bacterias frente a los principales patógenos radiculares del olivo en la región como son *Verticillium dahliae*, *Fusarium solani* y *Phytophthora palmivora*. Una vez comprobado el efecto antagonista se realizó la caracterización molecular de la bacteria para su identificación según Rossi *et al.*, (2006b) y Rossi, M.S. (2011).

Posteriormente se realizó el aislamiento de *P. palmivora* de la raíz de olivo. Luego se continuó con la evaluación de antagonicidad in vivo, en el patosistema olivo-*Bacillus subtilis* KJ464036 -*Phytophthora palmivora*. Se observó que el biocontrol logró reducir la intensidad o las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, mediante la manipulación del ambiente, del hospedero o de los antagonistas del patógeno o plaga que se quiso controlar, por ésto es posible decir que el presente trabajo propondría una alternativa de biocontrol para olivo.

En este último caso el biocontrol consiste en la utilización de un microorganismo natural, es decir no modificado genéticamente, para reducir los efectos de organismos indeseables, favoreciendo al mismo tiempo el desarrollo de los microorganismos beneficiosos para las plantas.

CAPÍTULO 6

**“Olivo y aceituno, todo es uno”
Proverbio popular andaluz**

CAPÍTULO 6

6. Discusión General

Tal como se mencionó en la importancia del problema de estudio, esta tesis aborda una problemática sanitaria vegetal perteneciente a una microeconomía regional competente en Argentina. A pesar de encontrarse la olivicultura en plena expansión productiva existen pocos estudios específicos sobre la sanidad del olivo en Argentina. Por otra parte y en relación con el planteo del problema, los resultados hallados permiten contribuir a la generación de conocimiento en materia de alternativas de control de plagas dentro de un manejo agrosustentable y desde un enfoque de investigación holístico.

La importancia de este trabajo reside entonces en contribuir al desarrollo de un modelo

de control de *Phytophthora palmivora* en olivo, explorando la posibilidad de obtener un producto comercial de impacto agronómico, económico, político y ambiental. Para lograrlo se enfatizó en la implementación de herramientas de microbiología clásica y molecular como así también informáticas de última generación. Por otra parte, la optimización de la dosis de aplicación del producto biológico para el control de la plaga vegetal se fundamenta en la investigación seguida de transferencia científica y tecnológica. Asimismo esta tesis contribuye a la generación de conocimiento en la ecología de la interacción microorganismo-planta.

En este Capítulo que presenta la Discusión General de esta Tesis, se analizan y se discuten los resultados obtenidos en cada Capítulo con el objeto de contrastar las hipótesis de estudio y de evaluar el cumplimiento de los objetivos planteados.

6.1. Primera Hipótesis General: Relaciones entre la sanidad del olivo y las características del suelo

Previamente se había expuesto que las relaciones existentes 'sobre y bajo la superficie del suelo' podían estudiarse desde un enfoque de investigación holístico. Y así, la primera hipótesis de trabajo relacionaba la sanidad del olivo con las características físicoquímicas, biológicas y bioquímicas del suelo. Entonces como resultado de la literatura tratada se propuso la siguiente hipótesis:

H1: El estado de salud del olivo podría estar relacionado con las características físicoquímicas, biológicas y bioquímicas del suelo rizosférico del olivo.

Al corroborar esta hipótesis se hallaron resultados relevantes tales como, que las características bioquímicas del suelo rizosférico del olivo, en particular la actividades de las enzimas deshidrogenasas y catalasas mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en presencia del patógeno independientemente del tipo de suelo. Por su parte, las características físicoquímicas y biológicas del suelo no mostraron sensibilidad ante el estado de salud del olivo para todas las profundidades estudiadas. Las características biológicas mostraron sensibilidad frente al manejo presentando diferencias significativas en suelos sin cultivar.

6.2. Segunda Hipótesis General: Relaciones entre la actividad antagonista y la eficiencia de una alternativa de control

El planteo de esta hipótesis surgió acorde con los trabajos publicados por Emmert y Handelsman (1999), Quan *et al.*, (2006), Ros-Araluce *et al.*, (2008), Basurto-Cadena *et al.*, (2010) y Feng-Xia *et al.*, (2012) que demostraron no sólo la elevada frecuencia en el suelo de bacterias pertenecientes al género *Bacillus spp.* sino también, la capacidad de esporulación confiriéndole resistencia natural a condiciones adversas, la facilidad de cultivo y conservación in vitro y la capacidad de promoción de crecimiento vegetal en algunas cepas. Entonces se planteó la Segunda Hipótesis General:

H2: El nivel de actividad antagonista de algunas bacterias frente a patógenos vegetales puede utilizarse como alternativa de control de enfermedad con cierto grado de eficiencia.

Esta hipótesis de trabajo había generado las siguientes hipótesis específicas:

La primera hipótesis específicas de trabajo proponía que existen bacterias formadoras de esporas que inhiben el desarrollo de *P. palmivora*.

La segunda hipótesis específica de trabajo proponía que el nivel de actividad antagonista se relaciona con la producción enzimática bacteriana

La tercera hipótesis específica de trabajo proponía que el nivel de actividad antagonista se relaciona con la producción de sideróforos bacterianos.

La cuarta hipótesis específica de trabajo proponía que es posible elaborar un bioformulado con capacidad pesticida con cierto grado de eficiencia.

La quinta hipótesis específica de trabajo proponía que la presencia del patógeno afecta las comunidades bacterianas de la rizósfera de olivo.

Una de las características sociales de las últimas décadas del siglo XX a esta parte ha sido la toma de conciencia del agotamiento de los recursos naturales debido a su explotación desmesurada. En el ámbito de la producción agrícola y frutihortícola las demandas cada vez más exigentes del mercado mundial llevaron a un uso exhaustivo del suelo y a la utilización de productos químicos de rápida acción altamente contaminantes del ambiente. En tanto las regiones frutihortícolas del NOA y Cuyo en Argentina no escapan a dicha problemática.

Por otra parte, el ataque de fitopatógenos sobre diferentes cultivares de olivo de alto consumo interno y externo se observó en aumento en las últimas décadas. Este cultivo se ve afectado principalmente en estas regiones por especies fúngicas como *Phytophthora spp.*, *Verticillium spp.*, *Pythium spp.*, *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Sclerotium spp.*, *Sclerotinia spp.* y *Rizoctonia spp.* según Lucero *et al.*, (2007) y Oriolani y Pérez, (2008). Así, importantes pérdidas económicas se registraron sobre productos de exportación derivados del olivo por lo que urge encontrar soluciones sanitarias agrosustentables.

En este sentido y , en el marco del paradigma de investigación positivista y desde un enfoque holístico, se realizó el estudio sobre dos suelos de olivares en Argentina (LR y BA). Para ello se tuvieron en cuenta las bases de esta posición metodológica y epistemológica en referencia a cómo los sistemas y sus propiedades, deben ser analizados en su conjunto y no sólo a través de las partes que lo componen tal como publicó Jaulin, A. (1999). En este caso de estudio, aún analizadas las partes separadamente, se estudió el sistema como un todo integrado y global determinando la contribución individual de las partes a los procesos biológicos del ecosistema suelo.

Como consecuencia de dicho enfoque, las partes estudiadas fueron *el monitoreo sanitario de los olivos, los aspectos bioquímicos y microbiológicos del suelo rizosférico de los olivos y los aspectos fisicoquímicos de dichos suelos*. Acorde con ésto resultaría muy importante predecir con anticipación suficiente el posible desarrollo de una enfermedad del olivo sobre la base del análisis multivariado utilizando indicadores ambientales que incluyeran diferentes áreas de investigación frente al mismo objeto de estudio tal como observaron Freitez *et al.*, (2009) y Bombelli, E.C. (2011).

Así como publicaron Bardgett y Wardle (2010) los resultados de la interacción entre los procesos que vinculan la superficie y la profundidad del suelo determinan la gobernabilidad de los procesos microbiológicos del ecosistema. En este sentido y considerando la superficie del suelo como una de las partes de estudio, se llevó a cabo *el monitoreo sanitario de los olivares* durante los años 2006, 2010 y 2015 según Pérez *et al.*, (2004).

En el Capítulo 2 de esta Tesis se presentaron los resultados del monitoreo del panorama sanitario de los olivares respondiendo a otra de las partes del sistema de estudio. En LR se observó muerte de plantas y ramas secas, principalmente, la muerte parcial de ramas, brindillas y hojas. En general se encontró elevada incidencia de patología causada por *P. palmivora* durante el año 2006, con escasa afectación a nivel de la planta, es decir, grados de afectación entre 1 y 2, representando menos del 25 % de partes afectadas en cada ejemplar de olivo y un 10 % del olivar. En tanto, en el año 2010, la incidencia de la enfermedad fue mayor en LR, reportándose afectación de grado 2 y 3 y un 30 % del olivar. En la última observación realizada en Junio 2015, el grado de afectación fue superior a 4, ésto refería a más de un 75 % de afectación de la planta y a un 50 % del olivar.

En referencia al monitoreo de rama seca se estimó baja incidencia y gravedad en los árboles que recibieron limpieza y poda previamente. Las elevadas temperaturas, restricciones sobre el riego por goteo y otras condiciones ambientales condujeron a pensar que esta patología podría estar asociada con una combinación de estrés de la planta añadido a la acción de diversos patógenos. Por otro lado se observó presencia de daño a causa de *Verticillium spp.* y *Fusarium spp.* en algunos árboles.

En tanto, en BA la superficie del suelo presentaba cobertura de residuos vegetales secos y el suelo había recibido un tratamiento con enmienda orgánica. Sólo en el año 2006 se observó la presencia del patógeno *Phyllosticta panizzei* ocasionando lesiones necróticas en el ápice de la lámina foliar. Asimismo en el sitio BA, se observó menor incidencia de enfermedad que en LR y en general las plantas se encontraban en estado de recuperación durante el año 2006. En los años siguientes la incidencia de patógenos tendió a desaparecer.

Otra de las partes de estudio fueron los *aspectos fisicoquímicos de los suelos* los cuales se analizaron desde tres pools o compartimentos de los principales nutrientes del suelo. En lo referente al carbono, se evaluó el carbono total, el carbono proveniente de biomasa microbiana, el carbono orgánico, el cociente metabólico, el cociente biológico y la actividad de la enzima β -glucosidasa vinculada con el ciclo del carbono. En cuanto al ciclo biogeoquímico del nitrógeno, se evaluó el nitrógeno total, el nitrógeno proveniente de nitratos y la actividad ureasa.

En cuanto al ciclo del fósforo se evaluó el contenido de fósforo y las actividades enzimáticas fosfomonoesterasas y fosfodiesterasas. Y por otra parte, se evaluó la actividad microbiana que interacciona con estos pools de nutrientes mediante la determinación de las actividades enzimáticas catalasas y deshidrogenasas. En este sentido, el monitoreo del

panorama sanitario de los olivares y la caracterización fisicoquímica, biológica y bioquímica de los suelos de olivares se presentaron en el Capítulo 2.

Como resultado se observó que el sitio LR presentaba características de un suelo alcalino con un pH de 9, salino conteniendo $0,8 \text{ dS.m}^{-1}$, calcáreo aportando el calcio un 89 % de proporción a las bases en saturación. Su textura arenosa propia de un suelo poco desarrollado permite fácilmente la exploración de las raíces. En tanto el sitio BA, presentaba características de un suelo ácido con un pH de 5, con baja salinidad y alto contenido de materia orgánica.

Además se observó que los datos de pH resultaron significativamente superiores ($p < 0,05$) en LR con respecto a BA. En tanto los datos de Calcio y Boro no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ambos sitios. En cambio los datos observados en las variables humedad, materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, Nitrógeno total, Nitrógeno proveniente de Nitratos, relación Carbono y Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Magnesio, Sodio, Cinc, Manganeso, Cobre y Hierro presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) siendo superiores en BA con respecto a LR.

Doran y Parkin (1994) incluyeron a la materia orgánica como el componente más importante a seleccionar entre un grupo de datos mínimos y necesarios para definir la calidad del suelo. En particular, la materia orgánica del suelo se considera un indicador químico significativo de calidad, según Larson y Pierce (1991), razón por la cual dicha variable fue evaluada.

Considerando *los aspectos bioquímicos y microbiológicos* como otra de las partes de estudio se llevaron a cabo las evaluaciones pertinentes a diferentes profundidades del suelo según Paz-Ferreiro *et al.*, 2007, Rossi, M.S. (2008) y Paz-Ferreiro y Fu (2014). Desde otro punto de estudio, las características bioquímicas y biológicas del suelo fueron utilizadas como indicadores de calidad del suelo siendo sensibles a cambios tanto de condiciones de manejo del suelo, según Paz-Ferreiro y Fu, (in press) como al uso del suelo, según Paz-Ferreiro *et al.*, (2007). Es sabido que en los últimos años se realizaron numerosos trabajos para entender cómo los microorganismos interactúan entre sí y cómo gobiernan la funcionalidad del ecosistema suelo. En particular, el estudio de las relaciones 'sobre y bajo la superficie del suelo' estudiadas por Bardgett y Wardle (2010) es un campo de investigación que avanza rápidamente.

Sin embargo, para nuestro conocimiento tal como menciona Janvier *et al.*, (2007) existen pocos trabajos que relacionen la calidad del suelo y la supresión de enfermedades y muy pocos estudios se focalizan en el uso de las características biológicas del suelo en

particular de las enzimas en relación con la supresividad natural edáfica. Avanzando en el estudio, la caracterización biológica de los suelos se realizó según Alef y Nannipieri (1995), Abril *et al.*, (2005), Piquín *et al.*, (2006) y Rossi *et al.*, (2008). Entre las variables biológicas globales estudiadas se encuentra la respiración basal del suelo en los diferentes suelos en LR y como en BA y en diferentes estados de sanidad del olivo es decir en presencia y en ausencia síntomas del patógeno en raíz.

La actividad respiratoria fue medida por la producción de CO₂ teniendo en cuenta que es un indicador global de la actividad de los organismos aerobios del suelo debido a que la degradación de la materia orgánica es una propiedad de los microorganismos heterótrofos, según Anderson y Domsch (1990). Esta determinación fue realizada para estimar la actividad biológica global de los suelos a diferentes profundidades influidas por las raíces de olivos. Tales profundidades de interés fueron: 0 a 5, 5 a 20 y 20 a 40 cm.

A partir de la comparación de todos los tratamientos fue posible concluir que la mayor actividad respiratoria se verificó en el tratamiento control o suelo sin cultivar, tanto en LR en BA. Este resultado resulta coincidente con lo observado por Piquín *et al.*, (2006) y en concordancia también con la respuesta biológica de los suelos sin cultivar hallada en los trabajos de Abril *et al.*, (2005) y Rossi, M.S. (2008). Además comparando el mismo sitio, se observó una mayor actividad respiratoria en los primeros 5 cm de profundidad del sitio LR en presencia de olivares sintomáticos, y comparando la actividad respiratoria en ambos sitios fue posible hallar una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la respiración del suelo a favor de BA y los controles de suelo sin cultivar, con respecto al suelo de olivares LR, lo cual globalmente, podría estar indicando mayor actividad biológica en el sitio con mayor aporte de residuos orgánicos como cobertura.

Esta información se relaciona con lo hallado por Abril *et al.*, (2005) pues publicaron que la tasa de perturbación del suelo y la cobertura superficial produce cambios sustanciales en los procesos de descomposición de los residuos vegetales, principalmente aquellos relacionados con la acumulación de carbono orgánico y la disponibilidad de nutrientes.

Otro de los índices utilizados para estudios biológicos del suelo y ampliamente aceptado, es el cociente metabólico (qCO₂), el cual representa la respiración del suelo por unidad de biomasa calculada según la fórmula de Anderson y Domsch (1993). De acuerdo con lo publicado por Scheu y Parkinson (1995) en este trabajo se observó una disminución del qCO₂ conforme aumentó la profundidad del suelo. Estas diferencias podrían ser atribuidas a una proporción más significativa de organismos fisiológicamente activos en

relación con residuos de las plantas.

En concordancia con este resultado se observó que la actividad deshidrogenasa disminuyó conforme aumentó la profundidad del suelo. Los datos superiores de qCO_2 indican que los microorganismos son menos eficientes en el uso de fuentes energéticas o bien que ellos son más eficientes como descomponedores de los residuos orgánicos. El criterio qCO_2 se sugiere como indicador adecuado en el estudio de cambios bioenergéticos en ecosistemas en desarrollo según Odum, E. (1969) y para la maduración progresiva del sistema del suelo, según Anderson y Domsch (1990).

El uso del criterio qCO_2 como indicador específico de cambio de suelos puede ser recomendado cuando se observan similares valores de pH, según Anderson y Domsch (1993). De acuerdo con estos autores, qCO_2 valores más altos en ecosistemas jóvenes y más bajos en ecosistemas maduros. Así como se demostró en este trabajo, los valores más bajos de qCO_2 se observaron siempre en el suelo BA.

En el mismo sentido, se observó una correlación positiva ($p < 0,05$) entre las actividades biológicas globales y las características químicas del suelo. Cmic fue significativamente más alto en suelo control en ambos sitios, independientemente del clima, tipo de suelo y profundidad. Por lo expuesto en lo vinculado con las variables biológicas globales podría decirse que no se hallaron evidencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para decir que resultan sensibles a la presencia del patógeno en los suelos estudiados. en todas las profundidades. Todos los estudios realizados dentro de la evaluación de las variables biológicas globales en los objetivos específicos propuestos en el presente trabajo pudieron cumplirse en su totalidad.

Sin embargo es sabido que la alteración de las condiciones del suelo por las prácticas de manejo puede afectar la producción de los cultivos a través de su influencia en la distribución de la materia orgánica, actividad microbiana y dinámica de nutrientes, según Salinas-García *et al.*, (1997). Por todo lo expuesto se procedió a buscar variables bioquímicas capaces de reflejar el estado actual del suelo.

En este sentido, Nannipieri *et al.*, (1990) indicaron que las actividades enzimáticas son específicas de un sustrato y están relacionadas con reacciones específicas. Por ello, resulta dificultoso conseguir mediante un solo valor de actividad enzimática, el conocimiento del estado general de nutrientes de un suelo o determinar el índice de actividad microbiológica del mismo. Sin embargo medidas simultáneas de varias enzimas pueden resultar útiles como marcadores de bioactividad y pueden ser utilizadas como índices de fertilidad bioquímica del suelo, tal como indicaron Gil-Sortres *et al.*, (1992) .

Con respecto a la caracterización bioquímica de los suelos se midió la actividad microbiana mediante metodología enzimática considerando un perfil compuesto por seis enzimas presentes en el suelo tal como publicaron García-Hernández *et al.*, (2005), Paz-Ferreiro *et al.*, (2007) y Rossi *et al.*, (2008).

Como es sabido, las enzimas del suelo son importantes como catalizadores de numerosas reacciones necesarios para el proceso de vida de los microorganismos en el suelo, la descomposición de los residuos orgánicos, el ciclado de nutrientes, y la formación de la materia orgánica y la estructura del suelo, según Monkiedje *et al.*, (2006). La actividad enzimática del suelo es la responsable de la formación de moléculas orgánicas estables que contribuyen a la estabilidad del ecosistema suelo e intervienen en los ciclos de los nutrientes tales como el nitrógeno, donde intervienen por ejemplo, ureasas y proteasas, en el ciclo del fósforo donde intervienen fosfomono y diesterasas y en el ciclo del carbono donde intervienen β -glucosidasas.

Por la relevancia expuesta vinculada a las actividades enzimáticas es que se propuso como objetivo específico evaluar dichas variables bioquímicas. A su vez dentro de este objetivo específico se propuso determinar la actividad de las enzimas deshidrogenasas vinculadas estrechamente a la actividad metabólica de la microbiota edáfica presente en los suelos de olivares.

La actividad deshidrogenasa es un indicador del sistema redox microbiano debido a que es el principal indicador de la actividad oxidativa del suelo y un indicador general del carbono orgánico presente en el suelo debido a que esta enzima está involucrada en la etapa final de la degradación de descomponedores derivados de celulosa de bajo peso molecular acumulado en el suelo hasta la liberación de glucosa. García *et al.*, (2005) encontraron valores medios de actividad deshidrogenasa de alrededor de $9 \mu\text{mol INTF.gss}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en suelos naturales. Por lo expuesto en el Capítulo 2 se observó mayor actividad deshidrogenasa ($p < 0,05$) en el suelo BA que incluía mayor contenido de materia orgánica comparado con el suelo LR.

Debido a que las enzimas deshidrogenasas no son activas independientemente de la célula microbiana como es el caso de las enzimas extracelulares del suelo la determinación de la actividad deshidrogenasa puede considerarse como una variable indicadora de la actividad microbiológica del suelo tal como lo evaluaron García *et al.*, (1994), Beyer *et al.*, (1982), Quilchano *et al.*, (1993) y Bergstrom *et al.*, (1998). En este sentido podría decirse se observó mayor actividad microbiológica en el suelo del olivar del sitio BA. La actividad microbiana basada en DH mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) más altas en BA con respecto a LR.

En este estudio DH fue significativamente más alta en presencia de patógenos radiculares del olivo en el sitio LR.

Por otra parte, otra de las variables de naturaleza bioquímica propuesta como objetivo específico dentro del perfil enzimático a estudiar, se encontró la determinación de la actividad de la enzima catalasa, altamente vinculada con la actividad microbiana del suelo. En este estudio se encontró que tanto en LR como en BA, fue la actividad enzimática que permitió caracterizar los suelos en presencia del patógeno.

Otra de las variables de naturaleza bioquímica propuesta como objetivo específico dentro del perfil enzimático a estudiar, se encontró la determinación de la actividad β -glucosidasa, altamente vinculada con el ciclo biogeoquímico del carbono. La actividad β -glucosidasa presentó diferencias significativas entre ambos sitios de estudio. Por lo expuesto en el Capítulo 2 podría decirse que la actividad β -glucosidasa presentó variación entre los diferentes estados de sanidad de los olivos del mismo sitio geográfico observándose mayor actividad en la condición de olivos sintomáticos por *P. palmivora*.

Otra de las variables bioquímicas medidas fue la actividad ureasa del suelo. Bajo la designación de ureasa se aglutinan todas las hidrolasas capaces de actuar sobre enlaces C-N no peptídicos de amidas lineales. Son enzimas exocelulares de origen fundamentalmente microbiano, como así lo demostraron Ceccanti y García (1994).

Por lo expuesto en el presente trabajo pudo observarse que la actividad ureasa no presentó diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los sitios estudiados, por lo que no se comportó como variable estadísticamente indicadora de cambio ante la perturbación y/o ante la incidencia del patógeno en el suelo. En tanto el objetivo de evaluar la actividad ureasa pudo cumplirse totalmente.

Contrariamente a lo observado en la determinación de la actividades deshidrogenasas, catalasas y β -glucosidasas, la actividades ureasa y fosfatasas mostraron similitudes en los resultados correspondientes a ambos sitios de muestreo y en las diferentes estados de sanidad por lo que no mostraron diferencias estadísticamente significativas. En tanto y con respecto al objetivo específico planteado referido a la evaluación de variables bioquímicas para describir el suelo, el cual incluía las determinaciones de actividades fosfomonoesterasas y fosfodiesterasas, deshidrogenasas, ureasas, β -glucosidasas, y catalasas podría decirse que el mismo fue cumplido en su totalidad. Entonces a partir de dicho análisis podría decirse que las variables bioquímicas estudiadas permitieron observar variaciones más discriminantes en el

estado del suelo a diferencia de las variables biológicas por lo que podrían postularse dentro de un perfil de otras variables como indicadores de cambio en el estado del suelo frente a un patógeno.

Como conclusión de este análisis el suelo LR en presencia del patógeno mostró mayor respuesta de actividad enzimática comparado con el suelo BA en presencia del patógeno. En ambos sitios de estudio el suelo control sin cultivar mostró mayor actividad enzimática en general, por lo que podría decirse que se observa mayor actividad biológica en los suelos menos perturbados independientemente del tipo de suelo.

Las actividades enzimáticas β -glucosidasa, deshidrogenasas y catalasa fueron más altas en presencia de hongos de raíz, independientemente del tipo de suelo y clima, para los primeros 5 cm de profundidad. La actividad microbiana basada en DH fue superior en BA que en LR ($p < 0,05$) y DH fue más alta en suelo rizosférico con olivos con raíces sintomáticas por ataque fúngico. La actividad basada en actividad catalasa fue más alta en LR que en BA ($p < 0,05$) en suelo rizosférico de olivo enfermo independientemente de tipo de suelo y clima.

La actividad microbiana basada en β -glucosidasa fue superior en BA con respecto a LR ($p < 0,05$) en suelo rizosférico de olivo con raíces enfermas por ataque fúngico. En tanto las actividades ureasas y fosfoesterasas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. En este trabajo el suelo LR en presencia de patógenos en raíz presentó mayor bioactividad que en ausencia del patógeno dado por el perfil conjunto de catalasa, deshidrogenasa y β -glucosidasa.

A partir del análisis de componentes principales basado en las variables biológicas y bioquímicas estudiadas en los suelo LR y BA, se desprende que las variables bioquímicas mostraron en un 84 % mejor diferenciación que las variables biológicas que explicaron tan sólo el 69 % de la variabilidad del sistema. En este trabajo las enzimas β -glucosidasa, deshidrogenasa, catalasa fueron las variables que difirieron en los suelos estudiados segregando en dos grupos. Se observó una fuerte asociación en LRs entre las actividades deshidrogenasas, catalasas y β -glucosidasas.

El gráfico de rangos indicó que los suelos fueron definidos en dos grupos LRc, LRh, BAc y BAh por un lado y LRs y BAs por otro, lo que sugiere que la presencia del patógeno podría tener un efecto en las características estudiadas del suelo. Las variables estudiadas en ambos suelos mostraron la misma variabilidad en cada suelo. A partir del análisis estadístico del perfil enzimático el cual mostró resultados de la actividad deshidrogenasa en LR y en BA, fue posible observar claramente que la actividad deshidrogenasa en suelo BA es máxima con respecto a LR, en tanto no fue una variable capaz de discriminar presencia y ausencia del

patógeno. Por lo expuesto podría sugerirse que un mayor aporte orgánico mejora notablemente la actividad metabólica de la microbiota edáfica que alcanza valores cercanos a los presentados por el suelo sin perturbar.

Con respecto al estudio a nivel de comunidades bacterianas del suelo en presencia y en ausencia del patógeno se encontró una elevada correlación en los primeros 5 cm del suelo sintomático en presencia del patógeno radicular entre las comunidades bacterianas y el metabolismo de Glucosa, Rafinosa, ácido Cítrico y Sacarosa. En tanto en suelos sintomáticos de 5 a 20 cm de profundidad las comunidades bacterianas se asociaron con la utilización de Arabinosa. En relación con este análisis Wardle *et al.*, (2004) demostraron que estudios profundos combinados de la interfaz sobre y debajo del suelo a nivel de comunidades y ecología ecosistémica son necesarios para conocer la importancia de la biodiversidad funcional y de regulación y de los impactos ambientales producidos por el fenómeno de cambio global inducido por el hombre .

Estos investigadores propusieron que es necesario un flujo de trabajo temporal para entender el significado natural y ecológico de las relaciones entre las comunidades habitantes sobre y bajo el suelo ya que las comunidades operan sobre una jerarquía de escalas temporales, con rangos desde días hasta estaciones, a milenios, con diferentes consecuencias para la estructura y función del ecosistema.

Puesto que en este trabajo se observó un comportamiento metabólico diferencial entre los suelos en presencia y en ausencia del patógeno surge al respecto una nueva hipótesis de investigación para continuar evaluando el metabolismo diferencial de las bacterias en este suelo en presencia de patógenos del olivo, con metodología molecular específica.

Como conclusiones generales del Capítulo 2 se enfatizó sobre la importancia de evaluar indicadores de calidad del suelo en presencia de patógenos de raíz del olivo. La actividad microbiana observada se evidenció por las características bioquímicas del suelo en los sitios con olivares con síntomas observables de ataque fúngico y se relacionó con la respuesta biológica global del suelo en cuanto a respiración y carbono proveniente de biomasa microbiana. Por otro lado, se observó que la actividad microbiana no reflejó cambios relacionados con factores abióticos como la altitud y el clima.

Como conclusión la interacción entre las actividades catalasa, deshidrogenasa y β -glucosidasa, la respiración global del suelo en los primeros 5 cm de profundidad, el carbono proveniente de la biomasa microbiana del suelo y el metabolismo diferencial de fuentes carbonadas fue posible caracterizar el sistema en presencia del patógeno en los primeros 5 cm de profundidad. Estos resultados podrán ser utilizados en la construcción de un modelo

predictivo para el desarrollo de enfermedad en olivos. Surge al respecto una nueva hipótesis de trabajo para continuar evaluando con mayor profundidad el metabolismo diferencial de las bacterias en este suelo.

Como conclusión general del Capítulo 2 se encontró que los cambios en el estado de salud de los olivos podrían estar relacionados con cambios en los indicadores de calidad del suelo. Las características fisicoquímicas, bioquímicas y biológicas globales de los suelos cultivados con olivares de LR y BA mostraron diferencias funcionales. Los principales aportes académicos de este Capítulo fueron publicados en Rossi, M.S.; Mon-Martin, R.; Paz-Ferreiro, J. 2015. Soil biochemical and physicochemical properties in relation to fungal root disease in olive trees. *Ecological Indicators* (Elsevier Ed) ISSN:1470-160X. Factor Impacto: 3.444. (Submitted) y en EcoSummit 2016 Le Corum, Montpellier, France y en Rossi, M.S.; Mon-Martin, R.; Paz-Ferreiro, J. 2016. Update of the health status of olive groves in Aimogasta. *Plant Health Progress* (Elsevier Ed) ISSN:1535-1025. (Submitted) y en EcoSummit 2016 Le Corum, Montpellier, France.

Finalizando las consideraciones sobre el Capítulo de Suelos de olivares se presentaron los resultados de los estudios de bacterias rizosféricas de olivos en el Capítulo de Aislamientos bacterianos a partir de los suelos estudiados.

Es sabido que un suelo se considera supresivo cuando existiendo condiciones favorables para que puedan ocurrir enfermedades por un patógeno, el patógeno no puede establecerse, o puede establecerse pero no producir enfermedad, o establecerse y producir enfermedad durante un corto tiempo y luego declinar según publicaron Hornby, D. (1983) y Mendes *et al.*, (2011). La supresividad está relacionada al tipo y número de organismos del suelo, nivel de fertilidad y naturaleza del mismo suelo. Adicionalmente la respuesta de crecimiento de las plantas en el suelo contribuye a la supresividad según Alexander *et al.*, (1991), Sorensen J., (1997) y Rossi, M.S. (2011).

En este estudio se observó que el suelo de olivares frente a elevadas temperaturas presentaba restricciones de riego por goteo entre otras condiciones ambientales adversas. Ésto conduciría a pensar que según el relevamiento presentado en el Capítulo 2, las patologías encontradas en la plantación del sitio LR causadas por los géneros *Phytophthora*, *Fusarium*, *Verticillium* podrían estar asociadas con una combinación de estrés de la planta.

Se planteó entonces la Primera Hipótesis Específica que surge a partir de la Segunda Hipótesis General.

H1: *Existen bacterias formadoras de endosporas que inhiben el desarrollo de P. palmivora.*

A partir de suelo rizosférico de olivos se obtuvieron 63 bacterias formadoras de esporas. Aquellas bacterias seleccionadas por su potencial antifúngico in vitro se identificaron a nivel de género por metodología bioquímica según Bergey, D.H. (2001).

De acuerdo con las pruebas bioquímicas realizadas los aislamientos B4, B5, B6, B22, B30 y B31 presentaron tinción de Gram positiva, endospora en posición central, diámetro celular inferior a 1 µm, desarrollo aerobio, utilización de citrato, hidrólisis del almidón, fueron positivos a la prueba de Voges-Proskauer, desarrollo en NaCl al 6,5 % y no desarrollaron a 55 °C. Por lo expuesto dichas bacterias fueron compatibles en un 99 % de similitud con *Bacillus subtilis* sobre la base de caracteres morfológicos y bioquímicos.

En tanto el aislamiento B1 presentó tinción de Gram positiva, endospora en posición central, diámetro celular inferior a 1 µm, desarrollo aerobio, no mostró utilización de citrato, hidrolizó el almidón, dio positivo a la reacción de Voges-Proskauer y utilizó Manitol. Por tanto considerando estos caracteres bioquímicos se trató de una bacteria compatible con *B. polymyxa* según Bergey, D.H. (2001). Por otro lado B37 presentó tinción de Gram positiva, endospora en posición central, desarrollo aerobio, utilización de citrato, no hidrolizó almidón y no produjo catalasa se identificó como compatible con *B. azotoformans*.

En tanto, B41 presentó tinción de Gram positiva, endospora en posición central, diámetro celular inferior a 1 µm, desarrollo aerobio, utilización de citrato, hidrólisis del almidón, fue positivo en la prueba de Voges-Proskauer, desarrolló en NaCl al 6,5 % y desarrolló a 55 °C se identificó como compatible con *B. licheniformis* sobre la base de caracteres morfológicos y bioquímicos según Bergey, D.H. (2001). No obstante los aislamientos B1, B37 y B41 presentaron actividad antifúngica variable in vitro.

Por otro lado el aislamiento B52 fue clasificado a nivel de género dentro de *Bacillus* pero sin embargo no pudo identificarse a nivel de especie sobre la base de caracteres bioquímicos y morfológicos. Dado que mostró bajo potencial biocontrolador in vitro no se procedió a realizar su identificación molecular.

La actividad biocontroladora in vitro medida en porcentaje de inhibición del desarrollo fúngico por las mejores cepas bacterianas seleccionadas se mostró en la Tabla 3.4.

El aislamiento B31 fue significativamente ($p < 0,05$) más efectivo para controlar el desarrollo de *P. palmivora* (87,5 %) in vitro. En tanto B5 identificado como *B. subtilis* fue el aislamiento más efectivo para controlar a *Fusarium solani* (58 %) in vitro y B4 identificado como *B. subtilis* fue el aislamiento más efectivo para controlar el desarrollo de *Verticillium*

dahliae (65 %) in vitro.

No obstante se seleccionó a B31 como biocontrolador por presentar significativamente efecto superior. El potencial biocontrolador de la bacteria B31 contra *P. palmivora* se evaluó in vitro e in vivo. B31 fue capaz de reducir el desarrollo de *P. palmivora* in vitro (87,5 % del desarrollo fúngico).

In vivo B31 fue capaz de reducir los síntomas radicales causados por *P. palmivora* in vivo, es decir en olivo logró una reducción del desarrollo fúngico en un 84,8 %. Cualitativamente se evaluó la aparición de síntomas radicales en olivos sanos en presencia y en ausencia de B31. Se halló que *P. palmivora* afectó la raíz de olivo en un 85 % evaluado en 20 plantas a los 50 d.p.i. Estas plantas presentaron raíces con podredumbre severa a lo que se denominó estado sintomático del 30 %.

Por otro lado se evaluaron olivos sanos como control, los cuales no presentaron sintomatología al cabo de 50 d.p.i. El potencial biocontrolador de B31 con la dosis evaluada logró reducir en un 30 % los síntomas observados. En el Capítulo 5 se ajusta la dosis de mayor eficiencia lograda. La inocuidad de la bacteria se confirmó sobre olivos a los 50 d.p.i. al no presentar sintomatología ni reducción del crecimiento.

Luego de confirmar el potencial biocontrolador de la bacteria B31 in vitro e in vivo se realizó su identificación molecular y un análisis filogenético para conocer las especies relacionadas con la cepa biocontroladora. Para ello se seleccionaron colonias del aislamiento B31, para la extracción, visualización, amplificación y secuenciación del gen 16S.

De esta manera el aislamiento B31 fue identificado por metodología molecular y depositado en GenBank bajo el número de acceso *Bacillus KJ464036*.

Los miembros de este género tienen un gran potencial para su uso en la agricultura. Muchas cepas tienen la capacidad de producir metabolitos antimicrobianos para el control de patógenos, fijan dinitrógeno, presentan una alta velocidad de crecimiento, forman endosporas resistentes a la desecación, el calor y las radiaciones ultravioletas y sobreviven en diversas condiciones según lo publicado por Liu, X. (2006), lo que ofrece perspectivas en la obtención de biopreparados eficientes.

La construcción del cepario permite obtener cepas que tengan la capacidad de ejercer efecto antagónico contra un amplio grupo de hongos fitopatógenos y de promover el crecimiento de la planta a través de diferentes mecanismos, se podría obtener un producto biológico a partir de estas bacterias que sustituya fertilizantes químicos y fungicidas, lo que contribuiría a la obtención de alimentos y la preservación del medio ambiente.

En el Capítulo 3 se mostró que se cumple la hipótesis general al demostrarse que el

nivel de actividad antagonista de algunas bacterias frente a patógenos vegetales puede utilizarse como alternativa de control de enfermedad con cierto grado de eficiencia. Además se corroboró la hipótesis específica que establece la existencia de bacterias formadoras de esporas inhibitoras del desarrollo de *Phytophthora palmivora* en la rizósfera del olivo. Autores como Reyes-Ramírez *et al.*, (2011), Quan *et al.*, (2006), Emmert y Handelsman 1999, Asaka y Shoda (1996) y Stirling, G.R. (1984) hallaron resultados similares.

Globalmente se observó que el número de bacterias en la rizósfera fue en todos los casos sustancialmente superior frente al suelo no rizosférico tal como lo observado por Sorensen, J. (1997) y que ésto podría deberse a la influencia de la planta. Se estudiaron las capacidades biocontroladoras del total de las bacterias aisladas de todos los sitios de muestreo. A partir de estos resultados se concluye que la bacteria nativa con actividad PGPR GenBank *Bacillus KJ464036*, aislada del suelo de la provincia de La Rioja, podría jugar un rol esencial en colaborar con las plantas para establecerse y crecer en condiciones de estrés.

Además esta bacteria nativa descrita en el Capítulo 3 podría emplearse para minimizar la utilización de fungicidas sintéticos contribuyendo a la preservación del ambiente. En el Capítulo 4 se presentan los estudios realizados para determinar los posibles mecanismos de supresividad observada en plantas inoculadas bajo condiciones controladas así como para identificar las moléculas involucradas con actividad antifúngica producidas por *Bacillus KJ464036*. En el Capítulo 5 se muestran los resultados de los ensayos de patogenicidad y biocontrol in vivo y de la formulación preliminar de un biopesticida experimental sobre la base de *Bacillus KJ464036*.

Los experimentos presentados en el Capítulo 3 muestran que la utilización de determinados aislamientos de *Bacillus sp.* obtenidos de suelos rizosféricos de plantas de olivo variedad Manzanilla fina demuestran el potencial que tienen dichas bacterias para su posible uso en programas de control biológico. Los aislamientos bacterianos estudiados mostraron capacidad antagonista frente a *P. palmivora* in vitro e in vivo. Asimismo se constató la capacidad de *Bacillus KJ464036* de colonizar y persistir en tejidos radicales de olivo. El establecimiento y mantenimiento de poblaciones de las bacterias en las raíces de olivo también fueron logrados. Los resultados fueron publicados en Rossi, M.S.; Mon-Martin, R.; Paz-Ferreiro, J. 2016. Antifungal activity of bacteria against soil-borne fungi from *Olea europaea L.* (Submitted)

A continuación se presenta la contrastación de la Segunda Hipótesis Específica que surge de la Segunda Hipótesis General.

H2: *El nivel de actividad antagonista se relaciona con la producción enzimática bacteriana*

Ahora bien, las investigaciones sobre mecanismos promotores del crecimiento vegetal desencadenados por la acción de rizobacterias proporcionan una mayor comprensión acerca de las múltiples facetas que comprende el proceso de supresividad. En particular cobra relevancia el estudio de aquellos parámetros que estimulan la producción y la actividad de las moléculas intervinientes en el proceso de supresividad, tales como antibióticos, enzimas líticas y sideróforos, entre otros, o iones como el Cinc presente en el suelo, altamente relacionados con la supresión natural. Sin embargo, se conocen pocos estudios específicos que relacionen la calidad edáfica con la capacidad supresiva del suelo tal como publicaron Janvier *et al.*, (2007). Más aún, se publicaron muy pocos estudios que puntualmente utilicen la información que brindan las propiedades biológicas y en particular las propiedades bioquímicas del suelo en relación a su capacidad supresiva tal como indicaron Rossi *et al.*, (2015).

En tanto, la determinación de la función de aquellos parámetros edáficos asociados con la supresión de la enfermedad, pueden ser explorados y explotados para encontrar aquellos suelos que son más propensos a apoyar el biocontrol. Dicha importancia radica tanto para la formulación de inoculantes biológicos mejoradores y agrosustentables como para la formulación de un modelo predictivo del posible desarrollo de una enfermedad. Estos modelos pueden crearse sobre la base de análisis multivariado utilizando indicadores ambientales y algoritmos clasificadores de minería de datos en fuentes de gran dimensionalidad tal como sugieren Freitez *et al.*, (2009) y Bombelli, E.C. (2011).

Las revelaciones sobre los mecanismos de acción por rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal abre nuevas puertas para el diseño de estrategias mejoradoras de su eficiencia como agentes de biocontrol.

La identificación de antimicrobianos originados por agentes supresores tales como β -1,3-glucanasas producidas por la bacteria *KJ464036* puede ser explotado para agilizar el descubrimiento mediante la selección de nuevas cepas que llevan genes sintéticos relevantes. Asimismo el presente trabajo contribuye a la generación de conocimiento en la ecología de la interacción entre microorganismo-planta y es base para la continuación de la investigación a nivel de interacción molecular.

En este sentido se aceptó la hipótesis planteada al establecer que el nivel de actividad antagonista se relaciona con la producción enzimática de la bacteria en forma inducida. ésto

se demostró al hallar un nivel más elevado de actividad de las enzimas β -1,3-glucanasas en la bacteria en presencia del patógeno ($p < 0,05$). *Bacillus KJ464036* mostró una actividad de β -1,3-glucanasa estadísticamente superior ($p < 0,05$) en presencia de *P. palmivora*.

La actividad β -1,4-glucanasas de *Bacillus KJ464036* no fue significativa con respecto al control positivo. El control de esta enzima fue la actividad β -1,3-glucanasa producida por *B. subtilis* de referencia. En tanto, para la evaluación de la actividad de enzimas lipasas secretadas por los cultivos bacterianos se definió la unidad lipolítica (UL) como micromoles de NaOH por miligramo de proteína por hora ($\mu\text{M NaOH} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Parte de la contribución al conocimiento actual acerca de la eficiencia de la actividad de la enzima lipasa proveniente de *Bacillus subtilis*, caracterizada como mecanismo de supresividad, fue publicada por los autores Sabat *et al.*, (2012), Selva-Mohan *et al.*, (2008), Bora y Bora (2012) y Mohammad-Sadeghi *et al.*, (2010). Sin embargo en este trabajo no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la actividad de la enzima lipasa en presencia y en ausencia del patógeno ($p < 0,05$).

Como es sabido las enzimas micolíticas producidas por las bacterias antagonistas son muy importantes en tecnología aplicada al control biológico. Numerosos autores tales como Baharum *et al.*, (2003), Huang y Chen (2004) y Gohel *et al.*, (2004) detectaron glucanasas y quitinasas en suelos inoculados con agentes de control biológico y en síntesis este trabajo reveló la producción de la enzima micolítica β -1,3-glucanasa proveniente de *Bacillus subtilis* como mecanismo de supresividad.

A continuación se discute la Tercera Hipótesis Específica surgida de la Segunda Hipótesis General.

H3: *El nivel de actividad antagonista se relaciona con la producción de sideróforos bacterianos.*

Por otra parte, otro de los mecanismos de supresividad estudiados en este Capítulo fue la producción de sideróforos. En la evaluación de la capacidad de producción de sideróforos por cepas de *Bacillus sp.* se sembraron las placas Petri con cada una de las cepas de rizobacterias y junto a ellas se colocaron inóculos de *P. palmivora*. No obstante en este trabajo no se halló producción de sideróforos por parte de las bacterias propuestas como posibles agentes de control biológico.

En cambio en los trabajos publicados por Zawadzka *et al.*, (2009), Hotta *et al.*, (2010) y Shobha y Kumudhini (2012) encontraron producción de sideróforos efectiva por parte de cepas de *Bacillus*.

Merced a la utilización del algoritmo treemap desarrollado para visualización inteligente de datos fue posible mostrar claramente el comportamiento de los datos obtenidos hasta el momento entre el Capítulo 3 y el Capítulo 4 de esta tesis. Se muestra entonces el comportamiento de las variables: cantidad de aislamientos formadores de endosporas, reacción a la tinción de Gram, hidrólisis de almidón, Voges-Proskauer, tamaño del cuerpo celular, utilización de citrato, desarrollo en NaCl 6,5 %, desarrollo a 55 °C, producción de enzima catalasa y control biológico in vitro clasificación a nivel de especie sobre la base de caracteres morfológicos y bioquímicos, actividad biocontrol in vitro, producción de antibióticos, producción de sideróforos, producción de β -1,3-glucanasa, producción de β -1,4-glucanasa, producción de lipasas y origen geográfico de procedencia de los suelos.

Finalizando las consideraciones sobre los aportes realizados en el Capítulo 4 donde se estudiaron los posibles mecanismos de supresividad de la bacteria *Bacillus KJ464036*. La actividad β -1,3-glucanasa producida por la bacteria *Bacillus KJ464036* se observó en medio mínimo y fue inducida por la presencia del patógeno. No se observó actividad β -1,3-glucanasa en presencia de glucosa por lo que no fue inducida por dicho sustrato.

El control de actividad de dicha enzima fue la actividad β -1,3-glucanasa producida por una cepa *Bacillus subtilis* de referencia. En tanto no se halló actividad de las enzimas β -1,4-glucanasa y lipasa por parte de los aislamientos estudiados. Se concluye en esta etapa que la molécula identificada con la acción antifúngica contra *Phytophthora* estaría relacionada con la actividad micolítica de la enzima β -1,3-glucanasa producida por *Bacillus KJ464036* en presencia del patógeno.

Avanzando en la Discusión General acerca de los aportes realizados en el Capítulo 5 se muestran los resultados de los ensayos de patogenicidad y biocontrol in vivo y de la formulación de un biopesticida experimental formulado con *Bacillus KJ464036*. En este capítulo se menciona la estrecha vinculación entre la agricultura sustentable y el uso de biopesticidas. La agricultura sustentable incluye sistemas agrícolas integrados y orgánicos que buscan reducir el uso de fertilizantes químicos, pesticidas sintéticos, aditivos y reguladores del crecimiento para mejorar la salud y calidad del suelo. En este sentido y con el fin de lograr la eficiencia de los sistemas productivos, resulta necesario utilizar técnicas que permitan proveer niveles adecuados de nutrientes para suplir los requerimientos de los cultivos, y controlar o suprimir, efectivamente, plagas y malezas con métodos no contaminantes.

Por otra parte, es sabido que los abonos orgánicos aportan nutrientes para el crecimiento de las plantas, estimulan la actividad biológica en el suelo, suprimen

enfermedades, estimulan los ciclos de los nutrientes, mejoran las condiciones físicas del suelo y permiten reciclar residuos de cosecha y estiércol. Sin embargo, la supresividad en una enmienda orgánica o en un compost es materia de discusión. Algunos estudios realizados por Tilston *et al.*, (2002) y Scheuerell *et al.*, (2005) comunicaron un incremento en la incidencia y severidad después de producida la enmienda orgánica. En cambio, Termorshuizen *et al.*, (2007) observaron la supresión de enfermedad en un 54 % de los casos de estudio, supresividad no significativa en un 42,7 % y aumento de enfermedad en tan sólo un 3,3 %.

Otros autores como Szczech y Smolinska (2001) y Borrero *et al.*, (2004) observaron las bondades del compost como importante característica para influir sobre la microbiota del suelo por la supresión de numerosos fitopatógenos, en particular, especies pertenecientes a los géneros *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium spp.*

En una amplia investigación sobre 1964 estudios experimentales, Bonanomi *et al.*, (2010) hallaron que las enmiendas orgánicas fueron supresivas de enfermedades en un 45 % de los casos, no significativas en un 35 %, pero conducivas en un 20 %, es decir observaron un aumento de la incidencia de la enfermedad. Por lo expuesto sobre la naturaleza de la aplicación práctica del compost para la supresividad de enfermedades en sistemas agrícolas reales se ocultan resultados inconsistentes. El punto crítico reside en que el compost puede ser producido a partir de una amplia variedad de residuos de plantas y animales y éste conduce a la variación en las propiedades químicas y microbiológicas en el producto final y luego en su capacidad supresiva de enfermedades. Por tanto las complejas relaciones entre los factores dificulta la predicción de eficacia en la supresividad del compost.

Sin embargo, se realizaron esfuerzos sustanciales durante las últimas décadas en búsqueda de mecanismos supresivos para lograr la supresión de enfermedades según Janvier *et al.*, (2007), y la identificación de indicadores de supresividad en enmiendas orgánicas tal como observaron Bonanomi *et al.*, (2010) y en suelos agrícolas según Rossi *et al.*, (2015).

En un sentido más específico y en condiciones más controladas se plantea el desarrollo y el uso de un biopesticida. Un biopesticida se define como un agente de control biológico aplicado de manera inundativa para controlar una plaga determinada de acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA). Dicha Agencia indica que el ingrediente activo de un biopesticida puede ser una sustancia natural de origen animal, vegetal, un organismo vivo, un virus o algún mineral.

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) consideró la importancia del empleo de agentes de biocontrol a través de un documento emitido en 2007 en el que expresa: la agricultura dependerá mucho del control biológico

como componente mayor del manejo integrado de plagas. Los avances en técnicas moleculares y en el conocimiento científico en general serán la base del desarrollo de esta tecnología alternativa. Las presentaciones realizadas muestran que en América Latina diferentes patógenos sirvieron como modelo para la aplicación de técnicas de biocontrol.

Por otro lado, la gama de cultivos a proteger es muy amplia: cultivos extensivos tales como leguminosas forrajeras de clima templado y gramíneas como trigo y cebada, cultivos hortícolas, frutales y forestales. En este sentido se propuso una gran diversidad de agentes de biocontrol los cuales constituyen un recurso genético invaluable: bacterias rizosféricas, hongos entomopatógenos y levaduras, aislados de nuestros ecosistemas, que estarían asegurando un control efectivo y no agresivo para el ambiente. Para su aplicación comercial se requiere desarrollar estrategias de producción masiva de los microorganismos, normas de calidad para los bioplaguicidas, y marcos legales para registrar y regular el uso de organismos nativos según publicó FAO, (2007).

En efecto la demanda impuesta por la sustentabilidad está conduciendo al uso de estrategias que mantengan una protección del medioambiente. En este contexto el uso de inóculos microbianos cobra interés en todo el mundo. Los microorganismos más usados son *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces*. El control biológico se transforma entonces en el mejor método para optimizar las actividades de las especies beneficiosas y conseguir la reducción de las actividades dañinas de ciertas plagas y enfermedades.

A continuación se discute la contrastación de la Cuarta Hipótesis Específica surgida a partir de la Segunda Hipótesis General.

H4: *Es posible elaborar un bioformulado con capacidad bactericida con cierto grado de eficiencia.*

En el Capítulo 5 se comprobó la hipótesis que establece es posible elaborar un formulado con capacidad biopesticida con cierto grado de eficiencia. Se comprobó que la dosis máxima del bioformulado experimental elaborado con la concentración 1.10^9 UFC.gss⁻¹ de *Bacillus KJ464036* fue eficiente contra *Phytophthora palmivora*. Dado que el término eficiente se refiere a controlar la capacidad del patógeno con la menor cantidad posible de bacterias utilizando el menor recurso posible se midió la eficiencia en dos niveles de dosis de producto. La eficiencia óptima del bioformulado se encontró que se logra con la

concentración de 10^9 UFC.gss⁻¹ de *Bacillus KJ464036* en estudios preliminares.

La contribución al desarrollo de un modelo de control de *Phytophthora palmivora* en olivo en Argentina así como la obtención de un producto comercial de impacto agronómico, económico, político y ambiental son objetivos claramente enmarcados en el desarrollo tecnológico y en la innovación. Focalizando en estos objetivos se enfatizó en la implementación de herramientas de microbiología clásica y molecular como así también informáticas de última generación como la minería de datos. La técnica de aplicación del producto biológico para el control de la plaga vegetal está fundamentada en la investigación seguida de transferencia científica y tecnológica.

La mayoría de los casos que intentaron dar respuesta en los sistemas de producción a nivel comercial fallaron en lograr la transferencia tecnológica de nuevas fuentes de control de enfermedad. Así como en la baja supervivencia y actividad de algunos microorganismos en un sistema biológico extraño y en la competencia con el gran número de microorganismos adaptados al mismo suelo.

La supresividad de enfermedad en un suelo determinado requiere la interacción entre múltiples factores bióticos y abióticos y la función de un agente específico en sitios externos al sistema específico, podría ser disminuida en su efecto. La supresividad del suelo a fitopatógenos es un concepto holístico y se basa en la teoría general de sistemas y de la complejidad. La complejidad es precursora de la estabilidad y en ecología del suelo, la propiedad de organización de los sistemas complejos podría relacionarse con la supresividad propia de ese suelo. Con el enfoque holístico existen mayores posibilidades de manejar la supresividad mediante cambios profundos en la estructura del sistema y así mejorar el control biológico.

Bajo la perspectiva de sistemas cuando se pretenden inducir cambios profundos en el comportamiento de un sistema se deben realizar cambios profundos en su estructura. Dada la naturaleza compleja de las interacciones microbianas que tienen lugar en el suelo y que impiden que los patógenos de raíz sean exitosos en los suelos supresivos, bajo el enfoque holístico la investigación y el manejo de sistemas agrícolas debe reconocer que si existe un suelo supresor a ciertos fitopatógenos, hay que conservar su estructura y que si se desea inducir supresividad a un suelo donde las enfermedades causan devastación, debe hacer cambios profundos en su estructura.

Recientemente se evaluaron más aproximaciones para conseguir el manejo de la enfermedad biológicamente mediada proveniente del suelo. Más allá de inoculantes de suelos o materiales propagantes de cultivos con formulaciones producidas en masa de agentes

biológicos no nativos, una estrategia emergente emplea prácticas para manejar la biología del suelo residente del sistema con el objetivo de inducir la supresividad.

Tal como se mencionó en este trabajo el conocimiento acerca de la estructura y función de la composición bacteriana que rodea a la raíz de olivo es relevante por la competencia por los nutrientes, la colonización de una bacteria exógena entre las comunidades autóctonas de la rizósfera de olivo, la capacidad para lograr establecerse y duplicar su población en poco tiempo. En el presente trabajo al probar la hipótesis que establece la presencia del patógeno afecta la composición bacteriana de la rizósfera se encontró que existen evidencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para decir que la presencia del patógeno afecta la composición bacteriana del suelo con las técnicas funcionales utilizadas dependientes de cultivo. Mayores esfuerzos de profundización del estudio deberán realizarse continuando con la investigación.

En el ensayo de patogenicidad se observó que *Phytophthora palmivora* afectó el crecimiento del olivo en un 85 %. Se encontró un efecto deletéreo sobre las plantas observado a través de un elevado porcentaje de plantas sintomáticas a los 50 d.p.i, presencia de amarillez y desecación en hojas y raíz. En presencia de *Phytophthora palmivora*, el biopesticida experimental conteniendo 10^9 UFC.gss⁻¹ ejerció control sobre el hongo reflejado en ausencia de síntomas y en un mejor crecimiento vegetal. La acción benéfica de *Bacillus KJ464036* estaría influida por el patógeno *Phytophthora palmivora*.

A continuación se discute la contrastación de la Quinta Hipótesis Específica surgida a partir de la Segunda Hipótesis General.

H5: *La presencia del patógeno afecta las comunidades bacterianas de la rizósfera del olivo.*

Continuando con la evaluación de variables microbiológicas se llevó a cabo el análisis de los diferentes perfiles fisiológicos de la comunidad microbiana del suelo (CLPPs). Este análisis está basado en la capacidad de los microorganismos para oxidar diferentes sustratos carbonados puesto que este método es muy utilizado para diferenciar las comunidades microbianas presentes en diferentes hábitats según Garland, J. L. (1997).

Dentro del análisis multivariado aplicado a CLPPs el análisis de la componente principal explicó claramente una diferenciación en dos clusters diferentes para el suelo con presencia del patógeno y ausencia del patógeno. Por tanto el presente trabajo concuerda con lo observado por Garland, J. L. (1997), Stenberg, B. (1999) y García *et al.*, (2012) quienes

observaron que CLLPs es una herramienta sensible para detectar cambios en la perturbación del suelo. Este constituye un aporte particularmente interesante de este trabajo ya que CLPPs demostró ser indicador de cambio vinculado con la presencia del patógeno.

Por lo expuesto podría decirse que el ítem de evaluar los perfiles funcionales al nivel de comunidades microbianas enmarcado en el objetivo de evaluar las variables microbiológicas como indicadoras de cambio ante la presencia del patógeno en el suelo fue completado en su totalidad y además mostró ser una variable que podría comportarse como indicadora de cambio por la presencia del patógeno entre todas las variables analizadas.

Como proceso de manejo podría esperarse algún conocimiento de las poblaciones bacterianas funcionales que son contribuyentes a la supresividad observada. Por lo que utilizando una metodología dependiente de cultivo en el análisis del perfil de la utilización de fuentes carbonadas únicas a nivel de comunidades bacterianas del suelo fue posible cumplir con el objetivo de comprobar un cambio en las comunidades ante la presencia del patógeno.

Por tanto se registraron modificaciones en la diversidad metabólica de las comunidades bacterianas del suelo en presencia del patógeno. Esto estaría indicando que la presencia del patógeno altera al patosistema a nivel metabólico. Se corrobora entonces la hipótesis que establece la presencia del patógeno modifica las comunidades bacterianas del suelo.

Finalizando la Discusión General de esta tesis donde se obtuvieron un total de 452 cepas bacterianas de las cuales se seleccionaron aquellas formadoras de endosporas. Posteriormente se evaluó un total de 63 aislamientos bacterianos procedentes del suelo rizosférico de olivo. Se evaluó la capacidad biopesticida in vitro de las bacterias frente a los principales patógenos radiculares del olivo en la región como son *Verticillium dahliae*, *Fusarium solani* y *Phytophthora palmivora*. Una vez comprobado el efecto antagonista se realizó la caracterización molecular de la bacteria para su identificación según Rossi *et al.*, (2006b) y Rossi, M.S. (2011).

Posteriormente se realizó el aislamiento de *Phytophthora palmivora* de la raíz de olivo. Luego se continuó con la evaluación de antagonicidad in vivo, en el patosistema olivo-*Bacillus subtilis* KJ464036 -*Phytophthora palmivora*. Se observó que el biocontrol logró reducir la intensidad o las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, mediante la manipulación del ambiente, del hospedero o de los antagonistas del patógeno o plaga que se quiso controlar, por ésto es posible decir que el presente trabajo pondría una alternativa de biocontrol para olivo.

En este último caso el biocontrol consiste en la utilización de un microorganismo natural, es decir no modificado genéticamente, para reducir los efectos de organismos

indeseables, favoreciendo al mismo tiempo el desarrollo de los microorganismos beneficiosos para las plantas.

Finalizando la Discusión General se menciona que los objetivos planteados se cumplieron en su totalidad y que las hipótesis de estudio fueron corroboradas. Se presentan a continuación las Conclusiones Generales y las nuevas Hipótesis de trabajo surgidas a partir de esta investigación.

CAPÍTULO 7

**“La Tarea Que Emprendo Es Ilimitada
Y Ha De Acompañarme Hasta El Fin,
No Menos Misteriosa
Que El Universo Y Yo, El Aprendiz”**

Jorge Luis Borges (1899-1986)

CHAPTER 7

7. Conclusions, Prospects and New Hypotheses

The study of interactions between PGPR bacteria and their host plants is at the moment a high-impact point of research. In this work one of these interactions was studied using the model *Olea europaea L* - *Bacillus KJ464036* via glucanase. Part of this interaction was characterized by the colonization of the plant by the bacterium and bacterial glucanases production, which lead to provide the plant of certain level of defense against *P. palmivora*.

As future prospects, new research hypotheses focused on suppressive soils by proteomics and data mining are proposed. It will try to find patterns of response of bacterial consortia with bio-pesticide capacity against the presence of *P. palmivora* in the olive rhizosphere. With the understanding that a better knowledge of the suppressive ability of a soil, being natural or acquired, could improve the health of crops and its use could improve the condition of crops causing minimal impact on the environment.

The project under which this work was performed sought to improve health and promote plant growth by using beneficial microorganisms, organic amendments and plant extracts, reducing the use of chemical pesticides to achieve sustainable and integrated management of the agricultural production systems. In view of the above, it is also proposed to continue the study of bacterial beneficial properties as bio-control agents, with the already standardized techniques and expanding the spectrum of phytopathogenic fungi that attack the olive tree. Then we arrived at the following new research objectives:

- Improving the effectiveness of combined applications of biological control agents.

- Developing study models able to integrate all the available information to achieve a holistic approach to the problem.

- Quick answer to necessary questions to predict how and when the suppression in the soil occurs and to avoid the effects of possible detriments.

- Identifying consistent and robust parameters to predict the suppressive ability of different organisms.

7.1. General Conclusion

- ✓ The physicochemical, global biological and biochemical evaluation of the soils together with the evaluation of the health picture of olive groves monitored during the years 2006, 2010 and 2015 were made.

- ✓ The isolation of bacterial strains with potential bio-pesticide capacity was obtained.

- ✓ The molecular taxonomic identification of selected bacterial isolation for its high efficiency against the pathogen was performed.

- ✓ The construction of a bacterial strain collection with agricultural applications in the formulations of inoculants and with biotechnological characteristics for horizontal transference of genes was performed.
- ✓ The generation of knowledge regarding the suppression in the interaction *P. palmivora*-*B. subtilis* KJ464036 was produced.
- ✓ Preliminary formulation of an experimental bio-pesticide to control *P. palmivora* was begun.
- ✓ The beneficial action of *B. subtilis* KJ464036 would be influenced by the pathogen *P. palmivora*; before it, the formulation containing 10^9 CFU g^{-1} exerted control over the fungus, reflected in an improving in the plant growth.
- ✓ The bio-controlling action of *B. subtilis* KJ464036 was reflected in a protective effect caused by *P. palmivora* 50 days post-infestation.
- ✓ Before *Phytophthora palmivora*, it was observed heterogeneity in the population of plants studied in the control of fungus. That behavior was not observed in the growth of other pathogens analyzed when used the same number of samples, therefore, should be considered in the construction of future experimental designs in which the same pathogen be studied.
- ✓ *P. palmivora* affected the olive plant, exerting a deleterious effect on that crop, observed through a high percentage of symptomatic plants at 50 dpi, a significant decrease in the length of the aerial and radical parts of the plant, as well as a decrease in the aerial and radical mass regarding the control.
- ✓ The *B. subtilis* KJ464036 contained in the bio-formulated, again, did not exert any deleterious effect on olive tree.
- ✓ The *B. subtilis* KJ464036 was able to promote the growth of the olive plant controlling the pathogenic action of *P. palmivora*.

7.2. New Hypotheses:

The creation of new research hypotheses from this thesis was performed. Namely:

As in Chapter 2 a differential metabolic profile was observed in the presence of the pathogen at the level of bacterial communities of the soil, then it emerges the hypothesis which states: *the high concentration of the pathogen in the soil could be related to the differential use of some carbonated sources specific by heterotrophic bacteria.*

While in Chapter 3 was observed that *B. subtilis KJ464036* could play a key role in working with plants to establish and grow in conditions of plant stress, then it emerges as a new hypothesis: *the level of activity of a non-cultivable bacterial consortium of olive rhizosphere soil would be related to the response to the presence of P. palmivora in the rhizosphere.* To corroborate this hypothesis, proteomic and data mining techniques would be proposed.

From the results found in Chapter 4, where the studied suppressive mechanisms were presented, it emerges as new hypothesis: *a further deepening of the induced molecular mechanism of the enzyme β -1-3 glucanase in the presence of the pathogen would allow knowing if a biochemical two components system is involved.*

Moreover, from the results found in Chapter 5, where it was evaluated preliminarily the efficiency of a bio-pesticide, the following new hypothesis emerges: *the efficiency of the experimental bio-pesticide could act against the development of other radical pathogens of the olive plant with a high level of efficiency.*

BIBLIOGRAFÍA

Abney T.S., Melgar J.C., Richard T.L., Scott D.H., Grosgan J.Y., Young J. 1994. New races of *Phytophthora sojae* with RPS-1d virulence. *Plant Disease*, 81:653-655.

Abril A., Salas P., Lovera E., Kopp S., Casado-Murillo N. 2005. Efecto acumulativo de la siembra directa sobre algunas características del suelo en la región semiárida central de la Argentina. *Ciencia del Suelo*, 23:179-188.

Agrawal R., Gehrke J., Gunopulos D., Raghavan P. 1998. Automatic subspace clustering of high dimensional data for data mining applications. *ACM SIGMOD Int'l Conf. on Management of Data*, Seattle, Washington, 44:474-478.

Alef K., Nannipieri P. 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press Harcourt Brace and Company Publishers Great Britain.

Alexander D., Zuberer D. 1991. Siderophore producing bacteria of iron efficient and inefficient grass. D.L. Keister and P.B. Criang (Eds.), *The Rhizosphere and Plant Growth*, Kluwer Academic Publisher, The Netherlands.

Altschul S., Madden T., Schaffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25:3389-3402.

Anderson T.H., Domsch K.H. 1990. Application of eco-physiological quotiens (qCO_2 and qD) on microbial biomass from soil of different cropping histories. *Soil Biol Biochem*, 22:251-255.

Anderson T.H., Domsch K.H. 1993. The metabolic quotient for CO_2 (qCO_2) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the

microbial biomass of forest soils. *Soil Biol Biochem*, 25:393-395.

Andrews S.C., Robinson A.K., Rodriguez-Quinones F. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev*, 27:215-237.

Asaka O., Shoda M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:4081-4085.

Baharum S.N., Salleh A.B., Razak C.N.A., Basri M., Rahman R.N.Z.R, Rahman M.B.A. 2003. Organic solvent tolerant lipase by *Pseudomonas sp. strain s5*: stability of enzyme in organic solvent and physical factors affecting its production. *Ann Microbiol.*, 53:75-83.

Bardgett R.D., Bowman W.D., Kaufmann R., Schmidt S.T. 2005. A temporal approach to linking aboveground and belowground ecology. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 20:634-641.

Bardgett R.D., Wardle D.A. 2003. Herbivore-mediated linkages between aboveground and belowground communities. *Ecology*, 84:2258-2268.

Bardgett R.D., Wardle D.A. 2010. Aboveground-belowground linkages: Biotic interactions, ecosystem process and global change. New York. Oxford University Press, 1:1-200.

Bashan Y., Holguin G. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, 30:1225-1228.

Bashan Y., Holguin G., de Bashan L.E. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol*, 50:521-577.

Basurto-Cadena M.G., Font SanAmbrosio M.I., García-Jiménez J., Vázquez-Arista, A. 2010. Cambios en la estructura celular durante la actividad antagónica de *Bacillus subtilis* contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium verticillioides*. *Acta microscópica*, 19:138-144.

Bayona M. 2003. Conservación y mantenimiento de cepas microbianas con fines docentes e investigativos. *Laboratorio Actual*, 20:20-22.

Bent E. 2006. Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). In: *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants* (Tuzun S. and Bent E., eds), Springer Science+Business Media, New York, United States of America.

Bergey D.H. 2001. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Department of Biology, Indiana University, Bloomington, Indiana.

Bergstrom D.W., Monreal C.M., King D.J. 1998. Sensitivity of soil enzyme activity to conservation practices. *Soil Science Society America Journal*, 62:1286-1295.

Berón C.M., Salerno G.L. 2006. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina that are potentially useful in insect pest control. *BioControl*, 51:779-794.

Bertrand H. 2005. High molecular weight DNA recovery from soils prerequisite for biotechnological metagenomic library construction. *J. Microbiol. Methods*, 62:1-11.

Beyer L., Wachendorf C., Balzer F.M., Balzer-Graf U.R. 1982. The effects of soil texture and soil management on microbial biomass and soil enzymes activities in arable soils of northwest of Germany. *Agrobiological Research*, 45:276-283.

Blacy Y., Halmschlager, H. 2002. First confirmation of *Phytophthora quercina* on oaks in Asia. *Plant Disease*, 86:442-443.

Blanco-López M.A., Jiménez-Díaz R.M. 1995. Una propuesta de lucha integrada contra la verticilosis del olivo. *Fruticultura Profesional. Especial Producción Integrada*, 70:52-78, 1995.

Bombelli E.C. Modelado para la predicción de enfermedades en cultivos de alto valor comercial. PhD thesis, Escuela de Posgrado. Universidad Tecnológica Nacional, 2011.

- Bonanomi G., Antignani V., Capodilupo M., Scala F.** 2010. Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soilborne plant diseases. *Soil Biol Biochem*, 42:136-144.
- Bora L., Bora M.** 2012. Optimization of extracellular thermophilic highly alkaline lipase from thermophilic *Bacillus sp.* isolated from hot spring of Arunachal Pradesh, India. *Brazilian Journal of Microbiology*, 61:30-42.
- Borrero C., Trillas M.I., Odovas J., Tello J.C., Maviles M.** 2004. Predictive factor for the suppression of *Fusarium wilt* of tomato in plant growth media. *Phytopathology*, 94:1094-1101.
- Boschker H.T.S., Nold S.C., Wellsbury P., Bos D., De Graaf W.** 1998. Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ¹³C-labeling of biomarkers. *Nature*, 392:801-805.
- Bowman M.G., Tabatabai M.A.** 1978. Phosphodiesterase activity in soils. *Soil Science Society of America Journal*, 42.
- Brasier C.J.M., Kirk S.A., Delcan J, Cooke E.L., Jung T., Man IntVeld W.A.** 2004. *Phytophthora alni sp. nov.* and its variants: designation of emerging heteroploid pathogens spreading on alnus trees. *Mycological Research*, 108:1172-1184.
- Brasier C.M., Cooke D.E.L., Duncan J.M., Hansen E.M.** 2003. Multiple new phenotypic taxa from trees and riparian ecosystems in *Phytophthora gonapodyides*-*P. megasperma* ITS clade 6, which tend to be high-temperature tolerant and either inbreeding or sterile. *Mycological Research*, 107:277-290.
- Bringhurst R.M., Cardon Z.G., Gage D. J.** 2001. Galactosidases in the rhizosphere: utilization by *Sinorhizobium meliloti* and development of a biosensor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:4540-4545, 2001.
- Cacciola S.O., Agosteo G.E., Pane A.** 2000. First report of *Phytophthora palmivora* as a pathogen of olive in Italy. *Plant Disease*, 84:1153-1154.

Cáceres R., Novello R., Robert M. 2009. Análisis de la cadena del olivo en Argentina. Ediciones INTA, 1:1-102.

Camiña F., Trasar-Cepeda C., Gil-Sortres F., Leirós M.C. 1998. Measurement of dehydrogenase activity in acid soil rich in organic matter. *Soil Biol. Biochem.*, 30:1005-1011.

Canavarro Benite A.M., de Paula Machado S. 2002. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. *Quim Nova*, 25:1155-1164.

Carlier E., Rovera M., Rossi Jaume A., Rosas S. 2008. Improvement of growth, under field conditions, of wheat inoculated with *Pseudomonas chlororaphis subsp aurantiaca SRI*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24:2653-2658.

Cavaglieri L., Orlando J., Rodríguez M.I., Chulze S., Etcheverry M. 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology*, 156:748-754.

Cavaglieri L., Passone A., Etcheverry M. 2004. Screening procedures to select rhizobacteria with biocontrol activity upon *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. *Res. Microbiol.*, 155:747-754.

Ceccanti B., García C. 1994. Coupled chemical and biochemical methodologies to characterize a composting process and the humic substances., Capítulo Humic Substances In *The Global Environment And Implications On Human Health*. Elsevier, Amsterdam., pp 1279-1284. Senesi, N. and Miano, T.M. (Eds).

Claus D., Berkeley R.C.W., Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 2:1105-1139, Capítulo Genus *Bacillus* Cohn 1872. Doran, J W and Jons, A J (eds) ASA, Madison.

Chen Y.P., Mei R., Lu S. 1996. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: *Management of Soil-Born Diseases* (Gupta V.K. and Utkhede R., eds). M/S Narosa, Kalayani Publisher, New Delhi, India.

Chen W.M., Moulin L.J., Bontemps C., Vandamme P., Béna G., Boivin-Masson C. 2003. Legume symbiotic nitrogen fixation by β -proteobacteria is widespread in nature. *Journal of Bacteriology*, 185:7266-7272.

Chen W.M., James E.K., Chou J.H., Sheu S.Y., Yang S.Z., Sprent J.I. 2005. Beta rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan. *New Phytologist*, 168:661-675.

Chen W.M., James E.K., Coenye T., Chou J.H., Barrios E., de Faria S.M., Elliott G. N., Sheu S.Y., Sprent J.I., Vandamme P. 2006. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56:1847-1851.

Cody R.M. 1989. Distribution of chitinase and chitobiase in *Bacillus*. *Curr. Microbiol.*, 19:201-205.

Cook R.S. 1990. Biological control of soil-borne plant pathogens, Capítulo Twenty five years of progress towards biological control, pp 131-142. CAB International Wallingford, England.

Cooke D.E.L, Drenth A., Duncan J.M., Wagles G., Braiser C.M. 2000. Molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 30:17-32.

Corbell N., Loper J.E. 1995. A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* pf-5. *J. Bacteriol.*, 177:6230-6236.

Cordier C., Pozo M.J., Barea J.M., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. 1995. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 11:1017-1028.

Courtois S. 2003. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:49-55.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Recursos genéticos microbianos en el Simposio de recursos genéticos para América Latina y el Caribe. Undécima reunión ordinaria. Roma, 11-15 de junio de 2007, 11:1-2, 2007.

De Souza J.T., Weller D.M., Raaijmakers J.M. 2003. Frequency, diversity and activity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas spp.* in dutch take-all decline soils. *Phytopathology*, 93:54-63.

Défago G. 1993. 2,4-diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. *Plant Pathol.*, 42:311-312.

Del Gallo M., Negi N., Neyra C. 1989. Calcofluor and lectin-binding exocellular polysaccharides of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.*, 171:3504-3510.

DeLong E.F., Wickham G.S., Pace N.R. 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, 243:1360-1363.

Di Salvo L.P., García I.E. 2013. Laboratory standardization of an economical and reliable technique to evaluate physiological profiles of soil-microbial communities (CLPP). *Ecología Austral*, 22:129--136.

Dick R.P. 1992. A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. *Agricultural Ecosystem Environmental*, 40:25-36.

Docampo D.M., Oriolani E., Otero L., Pérez B.A. 2006. Atlas e índice de las enfermedades de las plantas cultivadas y nativas explotadas de Argentina. En: Atlas de las enfermedades de olivo *Olea europaea* en Argentina, 1:1-218.

Doran J.W., Parkin T.B. 1994. Defining and assessing soil quality. Soil Science Society of America. Special Publication N 35, Madison, Wisconsin, EE.U.

Erwin D.C., Ribeiro O.K. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. American

Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota.

Eivazi F., Tabatabai M.A. 1988. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 20:601-606.

El-Tarabily K.A., Sivasithamparam K. 2006. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience*, 47:25-35.

Elad Y., Baker R. 1985. Influence of trace amounts of cations and siderophore-producing pseudomonads on chlamyospore germination of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 75:1053-1059.

Elad Y., Chet I., Henis Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.*, 28:719-725.

Elena K., Tjamos, E.C. 1992. Control of *Fusarium* wilt of carnation by soil solarization singly or in combination with fungal or bacterial biocontrol agents. In E C Tjamos and G C Papavizas.

Emmert E.A.B., Handelsman J. 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 171:1-9.

Eurostat. Statistics Explained. www.ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained, 2015.

Feng-Lia L., Hui-Quan M., Jing L., Chao Z. 2012. Antagonistic effects of *Bacillus cereus* strain b-02 on morphology, ultrastructure and cytophysiology of *Botrytis cinerea*. *Polish Journal of Microbiology*, 61:119-128.

Fichtner E.J., Lynch S.C., Rizzo D.M. 2009. Survival, dispersal, and potential soil-mediated suppression of *Phytophthora ramorum* in a California redwood-tanoak forest. *Ecology and Epidemiology*, 99:608-619.

Frankowski J., Lorito M., Scala F., Schmidt R. 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* hro-c48. *Arch. Microbiol.*, 176:421-426.

Freitez J.A., Ablan M., Gómez C. 2009. Proposal of predictive models of black sigatoka for planta in plantation at South of Maracaibo Lake, Venezuela. *Revista UDO Agrícola*, 9:191-198.

Gaffney T.D., Lam S.T., Ligon J., Gates K., Frazelle A., Di Maio J., Hill S., Goodwin S., Torkewitz N., Allshouse A.M. 1994. Global regulation of expression of antifungal factors by a *Pseudomonas fluorescens* biological control strain. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 7:455-463.

Gally M., Ramos A.M., Dokmetzian D., López S.E. 2007. Genetic variability of *Phytophthora sojae* isolates from Argentina. *Mycologia*, 99:877-883.

Gammon J., Jones K.W., Hope S.J., De Oliveira C.M., Regis L., Silva Filha M.H., Dancer B. 2006. Berry conjugal transfer of a toxin-coding megaplasmid from *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* to mosquitocidal strains of *Bacillus sphaericus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:1766-1770.

Garbelotto, M. 2003. Molecular diagnostics of *Phytophthora ramorum*, causal agent of sudden oak death. *Journal of American Phytopathological Society*, 26:1185-1192.

García C., Hernández, M.T. 2005. Investigación y perspectivas de la Enzimología de suelos en España. CSIC-CEyBAS, Murcia, España.

García C., Hernández M.T., Costa F. 1994. Biochemical characterization of biological activity in very young mine soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 26:1185-1191.

García S.I., Bovi Mitre G., Moreno I., Eiman Grossi M., Digón A., de Titto E. 2003. Taller regional sobre intoxicaciones por plaguicidas y armonización en la recolección de la información. Ministerio de Salud. Secretaría de Programas Sanitarios. Subsecretaría de Programas de Prevención y Promoción, 23:1-26.

Garland, J.L. 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbial Ecology*, 24:289-300.

Garland J.L., Mills, A.L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole-carbon- source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 57:2351-2359.

Gil-Sotres F., Trasar-Cepeda M.C., Ciardi C., Ceccanti B. 1992. Biochemical characterization of biological activity in very young mine soils. *Biology and Fertility of Soils*, 13:25-30.

Ginolhac A. 2004. Phylogenetic analysis of polyketide synthase i domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:5522-5527.

Giovannoni S.J., DeLong E.F., Olsen G.J., Pace N.R. 1998. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.*, 170:720-726.

Glick B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 41:109-117.

Godagnone R.E., De la Fuente J.C. 2012. Regionalización ecológica del NOA. Ed. Instituto de Suelos INTA Argentina, 1:1-22.

Gohel V., Chaudhary T., Vyas P., Chatpar H.S. 2004. Isolation and identification of chitinolytic bacteria and their potential in antifungal biocontrol. *Ind. J. Exp. Biol.*, 42:715-720.

Gomez E., Ferreras L., Toresani S. 2006. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. *Bioresource Technology*, 97:1484-1489.

Gray E.J., Smith D.L. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37:395-412.

Greslebin A., Hansen E.M. 2010. Pathogenicity of *Phytophthora austrocedrae* on *Austrocedrus chilensis* and its relation with mal del ciprés in Patagonia. Plant Pathology, 59:604-612.

Guerrero Barquero N. 2003. Recolección de aceitunas en plantaciones superintensivas. Agricultura Revista Agropecuaria, 857:846-847.

Harman G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp.* Phytopathology, 96:190-194.

Harman G.E., Howell C.R., Vitarbo A., Chet I., Lorito M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Review Microbiology, 2:43-56.

Hartmann M., Frey B., Kolliker R., Widmer F. 2005. Prof. Dr. Lorenz Hiltner, a pioneer in soil bacteriology and rhizosphere research. In: Rhizosphere 2004: Perspectives and Challenges A Tribute to Lorenz Hiltner (Hartmann A., Schmid M., Wenzel W. and Hinsinger P., eds), GSF-Forschungszentrum, Neuherberg, Germany.

Hashidoko Y., Nakayama T., Homma Y., Tahara S. 1999. Structure elucidation of Xanthobaccin A, a new antibiotic produced from *Streptophomonas sp. strain SB-k88*. Tetrahedron Letter, 40:2957-2960.

Heinrichs D.E., Rahn A., Dale S.E, Sebulsky M.T. 2004. Iron transport in Bacteria, Capítulo Iron transport systems in pathogenic bacteria *Staphylococcus*, *Streptococcus*, and *Bacillus*., pp 387-401. Crosa, J H, Mey, A R, Payne, S M, eds (ASM Press, Washignton, DC).

Hoitink H.A., Stone A.G., Han D.Y. 1997. Suppression of plant diseases by composts. HortSci, 32:184-187.

Holbrook C.C., Noe J.P., Gorbet D.W., Stephenson M.G. 1998. Evaluation of peanut breeding lines with resistance to the peanut root - knot nematode. Crop Science, 38:260-262.

Horikoshi K., Atsukawa Y. 1973. Xylanase produced by alkalophilic *Bacillus no. c-59-2*.

Agric. Biol. Chem., 37:2097-2103.

Hornby D. 1983. Suppressive soils. Annual Review of Phytopathology, 21:65-85.

Hotta K., Chu-Young K., Fox D.T., Koppisch A.T. 2010. Siderophore-mediated iron acquisition in *Bacillus anthracis* and related strains. Microbiology, 156:1918-1925.

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

Huang C.J., Chen C.Y. 2004. Gene cloning and biochemical characterization of chitinase CH from *Bacillus cereus* 28-9. Ann Microbiol, 54:289-297.

Idosu G.A., Zentmyer G.O. 1978. *Phytophthora palmivora*: a comparative study of typical and atypical isolates from cacao (*Theobroma cacao*). Mycologia, 70:1101-1112.

INDEC. 2010. Índice Nacional de censos y estadísticas. Boletín INDEC, 70:1-111.

Jang J.C. 1990. Hyphal growth of *Phytophthora cinnamomi* on pine callus tissue. Plant Cell Resports, 8:741-744.

Janvier C., Villeneuve F., Alabouvette C., del Hermann V.E., Mateille T., Steiberg C. 2007. Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? Soil Biology and Biochemistry, 39:1-23.

Jaulin A. 1999. Aristóteles. La Metaphysique. PUF Ed.

Jenkinson D.S., Harkness D.D., Vance E.D., Adams D.E., Harrison A.F. 1992. Calculating net primary production and annual input of organic matter to soil from the amount and radio carbon content of soil organic matter. Soil Biology and Biochemistry, 24:295-308.

Johnson J.L., Temple, K.L. 1964. Some variables affecting the measurement of catalase

activity in soil. Soil Science Society of America Proceedings, 28:207-209.

Jung T., Blaschke H., Neumann P. 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. Eur. J. For. Path., 26:253-272.

Jung T., Blaschke H., Oswald W. 2000. Involvement of *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. Plant Pathol., 49:706-718.

Jung T. Blaschke M. 2004. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. Plant Pathology, 53:197-208.

Jung T., Burgess, T.I. 2009. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. nov. *Persoonia*, 22:95-110.

Jung T., Nechwatal J., Cooke D.E.L., Hartmann G., Blaschke M., Oswald W.F., Duncan J.M., Delatour C. 2000. *Phytophthora pseudosyringae* sp. nov., a new species of *Phytophthora* from European oak forests. Mycol. Res., 106:397-411.

Kamensky M., Ovadis M., Chet I., Chernin L. 2003. Soilborne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. Soil Biology and Biochemistry, 35:323-331.

Katan J., Fishler G., Grinstein A. 1983. Short and long term effects of soil solarization and crop sequence on *Fusarium wilt* and cotton yield in Israel. Phytopathology, 73:1215-1219.

Kloepper J.W., Ryu C.M., Zhang S. 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. Plant Science., 6:60-64.

Kloepper J.W., Scher F., Laliberte M., Tipping B. 1986. Emergence-promoting rhizobacteria: description and implications for agriculture. In: Iron, Siderophores and Plant Diseases (Swinburne T.R., ed) Plenum, Publishing Corporation, New York, United States of America.

Kloepper J.W., Schroth, M.N. 1978. Station de pathologie vegetale et ptyobacterologie, INRA, Angers (ed.). Gibert-Clarey, Tours. In Proceeding of the Fourth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria.

Kloepper J.W., Zablotowicz, R.M., Tipping E.M., Lifshitz R. 1991. The Rhizosphere and Plant Growth. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. D. L. Keister and P. B. Cregan (eds.) Kluwer Academic Publ. Dordrecht.

Klute, A. 1986. Methods of Soil Analysis, Part 1. Physical and Minerological Methods. In: Klute, A. (Ed.), Methods of Soil Analysis, Part 1. American Society of Agronomy, Madison.

Kobayashi D.Y., Palumbo J.D. 2000. Microbial Endophytes. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. Bacon CW, White JE(Eds.) Marcel Dekker, New York.

Ladux J., Diez P., Buteler M. 2012. Debilidades y desafios tecnologicos del sector productivo. Ed. Unión Industrial Argentina, 3:1-44.

Landa B.B., Navas-Cortes J.A., Jimenez-Diaz R.M. 2004. Influence temperature on plant-rhizobacteria interactions related to biocontrol potential for suppression of *Fusarium wilt* of chickpea. Plant Pathology 5, 53:341-352.

Larson W.E., Pierce F.J. 1991. Conservation and enhancement of soil quality. International Board for Soil Research and Manegement.

Leroux P. 2003. Modes d' action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. Comptes Rendus de Biologie, 326:9-21.

Leroux P. 2004. Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In: Botrytis: Biology, Pathology and Control (Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N., eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Lim H.S., Kim Y.S., Kim S.D. 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation

and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:510-516.

Lindquist, S. 1986. The heat shock response. *Annual Reviews in Biochemistry*, 55:1151-1191.

Liu, X. 2006. Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. *Current Microbiology*, 52:186-190.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagents. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.

Lucas, J.A. 1991. *Phytophthora* based on a symposium held at Trinity College Dublin, Ireland. British Mycological Society, Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Lucero G., Vettraino A.M., Pizzuolo P., Di Stefano C., Vannini A. 2007. First report of *Phytophthora palmivora* on olive trees in Argentina. *Plant Pathology*, 56:728-729.

Lugtenberg B.J.J., Dekkers L., Bloemberg, G.V. 2001. Molecular determinants of rizhosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 39:461-490.

Machado A.P., Vivi V.K., Tavares J.R., Gueiros Filhos, F.J., Fischman O. 2010. Antibiosis and dark-pigments secretion by the phytopathogenic and environmental fungal species after interaction in vitro with a *Bacillus subtilis* isolate. *Brazilian archives of biology and technology*, 53:997-1004,

Madigan M.T., Martinko J., Parker J. 2004. *Brock Biology of Microorganisms*. Lippincott Williams and Wilkins. (10th ed.).

Markkanen P.H., Bailey, M.J. 1974. Simultaneous production of α -amylase, β -glucanase and proteolytic enzymes by *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 24:93-103.

Martens, R. 1995. Current methods for measuring microbial biomass C in soil: Potentials and limitations. *Biology and Fertility of Soils*, 19:87-99.

Matias A.C. 2012. Informe INTA, 6:2-3.

Mauchline T.H., Kerry B.R., Hirsch P.R. 2002. Quantification in soil and the rhizosphere of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* by competitive PCR and comparison with selective plating. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:1846-1853.

Mayak S., Tirosh T., Glick B.R. 2004. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol. Biochem.*, 42:556-572.

McCaig A.E., Glover L.A., Prosser J.I. 2001. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimes by using 16s ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:4554-4559.

Mendes M., Kruijt M., de Bruijn I., Dekkers E., van der Voort M., Schneider J.H., Piceno Y.M., De Santis T.Z., Andersen G.L., Bakker P.A., Raaijmakers, J.M. 2011. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332:1097-1998.

Miethke M., Marahiel, M.A. 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Mol. Biol. Rev.*, 71:413-451.

Miller G. 1959. Use of dinitrosalicyc acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31:426-428.

Milner J.L., Raffel S.J., Lethbridge B.J., Handelsman J. 1995. Culture conditions that influence accumulation of Zwittermicin a by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43:685-691.

Milner J.L., Silo-Suh L., Lee J.C., He H., Clardy J., Handelsman J. 1996. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:3061-3065.

Mohammad Sadeghi H.M., Mohammad R., Fatemeh M., Sareh H. 2010. Molecular

detection of lipase a gene in putative *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. Iranian Journal of Biotechnology, 8:46-49.

Mon R. Ampliación del perfil de los Suelos erosionados y compactados mediante subsolado con enmienda cálcica profunda. PhD Thesis, Facultad de Ciencias, Área de Edafología y Química Agrícola. Universidade da Corunha, 2007.

Monkiedje A., Spiteller M., Fotio D., Sukul P. 2006. The effect of land use on soil health indicators in peri-urban agriculture in the humid forest zone of southern Cameroon. Journal of Environmental Quality, 35:2402-2409.

Monroy A. 2006. Evaluación de la estabilidad del método de criopreservación en glicerol para el establecimiento de un banco de cepas. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Bogotá, 35:1-240.

Moulin L., Munive A., Dreyfus B., Boivin-Masson C. 2001. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of proteobacteria. Nature, 411:948-950.

Morales, P. 2000. Relieve de Arauco, La Rioja, Argentina. Ed. UNLR, 1:63-71.

Nakayama T., Homma Y., Hashidoko Y., Mizutani J., Tabara S. 1999. Possible role of *Xanthobaccins* produced by *Stenotrophomonas sp. strain SB-K88* in suppression of sugar beet damping-off disease. Appl. Environ. Microbiol., 65:4334-4339.

Nalin, R. 2004. Method for the expression of unknown environmental DNA into adapted host cells. Patent CA2492966. LibraGen.

Nannipieri P., Grego S., Ceccanti B. 1990. Soil Biochemistry, Capítulo Ecological significance of the biological activity in soil, pp 293-355. Bollag, J. M., Stotzky, G. (Eds.).

Nannipieri P., Johnson R.L., Paul E.A. 1978. Criteria for measurement of microbial growth and activity in soil. Soil Biology and Biochemistry, 10:223-229.

Natsch A., Keel C., Pfirter H.A., Hass D., Défago, G. 1994. Contribution of the global

regulador gene GACA to persistence and dissemination of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 introduced into soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:2553-2560.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. www.ncbi.nlm.nih.gov. U.S. National Library of Medicine, 20894, USA, 1:1-1, 2013.

Neilands, J.B. 1981. Microbial iron compounds. *Annual review of Biochemistry*, 50:715-731.

Nelson D.W., Sommers, L.E. 1982. Methods of soil analysis, Capítulo Total carbon, organic carbon and organic matter, pp. 539-577. Page, A L and Miller, R H and Keeney, D R (ed).

Odum, E. 1969. The strategy of ecosystem development. *Science*, 194:262-270.

Ordentlich A., Elad Y., Chet, I. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, 78:84-88.

Oriolani E.J.A., Pérez, B.A. 2008. Manual de reconocimiento de enfermedades y plagas en olivo. Ed. INTA, 6:1-79.

Osborn A.M., Moore E.R.B., Timmis, K.N. 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.*, 2:39-50.

Ovadins M., Liu X., Gavriel S., Ismailov Z., Chet I., Chermin, I. 2004. The global regulator genes from biocontrol strain *Serratia plymuthica* IC1270: cloning, sequencing, and functional studies. *J Bacteriol*, 186:4986-4993.

Palmucci H.E., Grijalba P.E., Wolcan S.M. 2011. Basal rot of *Cchamelaucium uncinatum* caused by *Phytophthora nicotianae* in Argentina. *Australasian Plant Dis. Notes*, 39:15-18.

Pan S.Q., Ye X.S., Kuc J. 1991. Association of β -1,3 glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mold in tobacco induced by stem injection with *Peronospora*

tabacina or leaf inoculation with tobacco mosaic virus. *Physiol. Mol. Pl. Pathol.*, 39:25-39.

Pankhurst C.E., Lynch J.M. 1995. The role of soil microbiology in sustainable intensive agriculture. *Advances in Plant Pathology*, 11:229-247.

Panon M.L., Panigai L., Walker A.S., Leroux P. 2006. Les nouveautés concernant la pourriture grise: en quelques points. *Le Vigneron Champenois*, 127:26-36.

Paz-Ferreiro J.; Fu S. 2014. Biological indices for soil quality evaluations: perspectives and limitations. *Land Degrad. Dev.*, 26:211-217.

Paz-Ferreiro J., Trasar-Cepeda C., Leirós M.C., Seoane S., Gil-Sotres, F. 2007. Biochemical properties of acid soils under native grassland in a temperate humid zone. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 50:537-548.

Pérez B.A., Barreto D., Docampo D., Otero L., Costilla M., Roca M, Babbitt S. 2001. Current status of the drying syndrome (seca) of olive trees in Argentina. *Phytopathol*, 91:71-72.

Pérez B.A., Barreto D., Maramorosch K. 2004. Hop and olive diseases. In: *Diseases and disorders of fruits and vegetables*. Science Publishers, Inc Enfield, USA.

Pérez B.A., Carboni G., Sánchez J.M., Cruzate G.A. 2006. Pathogenic fungi of olive orchards in La Rioja soils, Argentina. 18th World Congress of Soil Science. Philadelphia, Pennsylvania, USA, 8:661-686.

Pezet R., Viret O., Gindro K. 2004. Plant-microbe interaction: the *Botrytis grey* mould of grapes-biology, biochemistry, epidemiology and control management. In: *Advances in plant physiology* (Hemantaranjan A., Ed). Scientific publishers, Jodhpur, India, 7:71-116.

Piquín E.J., Arzeno J.L., Cabrera M.P., Sánchez C. 2006. Evaluación de la calidad del suelo mediante la biomasa y la actividad respiratoria (in vitro). Universidad Nacional de Salta, Argentina, 2006.

Poole K., McKay G.A. 2003. Iron acquisition and its control *Pseudomonas aeruginosa*: many roads. *Frontiers in Bioscience*, 8:661-686.

Powlson D.S. 1994. Long-Terms Experiments in Agricultural and Ecological Sciences. Capítulo Quantification of nutrients cycles using long-term experiments., pp. 97-115. Leigh, R A and Johnston, A E (Eds).

Powlson J.J., Jenkinson, F. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 8:167-188.

Pozo M.J., Azcón-Aguilar C., Dumas-Gaudot E., Barea J.M. 1999. β -1,3-glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. *Plant Science*, 141:149-157.

Pozo M.J., Cordier C., Dumas-Gaudot E., Gianinazzi S., Barea J.M., Azcon-Aguilar, C. 2002. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany*, 53:525-534.

Príncipe A., Álvarez F., Castro M.G., Zachi L., Fischer S.E., Moris G., Jofré E. 2007. Biocontrol and PGPR features in native strains isolated from saline soils of Argentina. *Current Microbiology*, 55:314-322.

Pullman G.S., De Vay, J.E. 1984. Soil solarization. A non chemical method for controlling diseases and pests. Ed. California, USA, Cooperative Extension, University of California, Divison of Agricultural and Natural Resource.

Quan C., Wang J.H., Xu H.T., Fan S.D. 2006. Identification and characterization of a *Bacillus amyloliquefaciens* with high antifungal activity. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 46:7-12.

Quilchano C., Marañón, T. 1993. Dehidrogenase activity in mediterranean forest soils. *Biology and Fertility of Soils*, 32:102-107.

R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2015. ISBN 3-900051-07-0.

Raaijmakers J.M., Vlami M., de Souza, J.T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Leeuwenhoek*, 81:537-547.

Radajewski S., Ineson, P., Parekh N.R., Murrell, J.C. 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 403:646-649.

Ranjard L., Poly F., Combrisson J., Richaume A., Goubiere F., Thioulouse J., Nazaret S. 2000. Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microb. Ecol.*, 39:263-272.

Reyes-Ramírez A., Ruiz-Sánchez E., Yam-Chimal C., Dzul-Chan M. 2011. Selección de *Bacillus spp.* con actividad antagónica in vitro contra *Macrophomina phaseolina (tasii) goid.* en diferentes medios de cultivos. *Fitosanidad*, 15:117-121.

Rondon M.R., Goodman R.M., Handelsman J. 1999. The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *Trend Biotechnol.*, 17:403-409.

Ros-Araluce C., Arévalo-Arévalo R., Rodríguez Y. 2008. Aislamiento y prospección de cepas bacterianas del género *Bacillus* para el control del hongo *Phytophthora nicotianae* en el cultivo de tabaco. *Fitosanidad*, 12:1-3.

Rosas S.B., Pastor N.A., Guiñazú L.B., Andrés J.A., Carlier E., Vogt M.V., Bergesse J., Rovera M. 2011. Efficacy of *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* SR1 for improving productivity of several crops. *Crop Production Technologies*, 1:199-210.

Rosas S.B., Altamirano F., Schroder E., Correa N. 2001. In vitro biocontrol activity of *Pseudomonas aurantiaca*. *Phyton Int. J. Exp. Bot.*, 12:203-209.

Rossi M.S., Andrés J., Rovera M., Correa, N.S. Evaluación biopesticida de un inoculante formulado a base de *Pseudomonas aurantiaca*. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina, 1-101, 2003.

Rossi M.S., Jones L., Wright E., Pérez B.A. Cepas rizosféricas de *Bacillus* aisladas de plantaciones de arándano con potencial para reducir la incidencia y/o severidad de hongos patógenos. Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. SAFV. Chascomús, 26:1117-1120, 2006a.

Rossi M.S., Jones L., Otero L., Rocca M., Matías C., Pérez B.A. 2006. Aislamientos de *Bacillus* de la rizósfera de una plantación tradicional de olivo de Castelar. XXIX Congreso Argentino de Horticultura. ASAGO. San Fernando del Valle de Catamarca, 26:1117-1120, 2006b.

Rossi M.S., Jones L., Otero L., Rocca M., Matías C., Pérez B.A. Selección de especies de *Bacillus* de suelo antagonistas de *Fusarium* en plantaciones de arándano. XXIX Congreso Argentino de Horticultura. ASAGO. San Fernando del Valle de Catamarca, 26:1117--1120, 2006c.

Rossi M.S., Jones L., Wright E., Pérez B. A. Antagonicidad de cepas de *Bacillus* provenientes de la rizósfera de plantaciones de arándano. XXIX Congreso Argentino de Horticultura. ASAGO. San Fernando del Valle de Catamarca, 26:1117-1120, 2006d.

Rossi M.S., Jones L., Wright E., Pérez B.A. Cepas de *Bacillus* antagonistas de hongos de suelo patógenos en arándano y olivo. XX Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. I Reunión de Suelos de la Región Andina Salta-Jujuy. Salta., 26:1117-1120, 2006e.

Rossi M.S., Otero L., Matías C., Rocca M., Pérez B.A. Cepas de *Bacillus sp.* rizosféricas de olivo y su potencialidad antagonista frente a *Fusarium* y *Drechslera*. I Congreso Nacional de Olivicultura. La Rioja., 26:1117-1120, 2006f.

Rossi M.S. Aspectos bioquímicos y microbiológicos del estado de salud del suelo. Tesis Magíster en Microbiología Molecular. Edición UNSAM. p156., 26:1-156. 2008.

Rossi M.S. 2011. Disease-suppressive soils in the rhizosphere of *Olea europaea*. Fundamental for Life: Soil, Crop and Environmental Sciences-ASA-CSSA-SSSA International Annual Meetings Oct 16-19,2011, San Antonio, TX., 26:1117—1120.

Rossi M.S., Mon-Martin R., Paz-Ferreiro, J. 2015. Soil biochemical and physicochemical properties in relation to fungal root disease in olive trees. *Ecological Indicators*, 26:1117-1125.

Ryder M.H., Brisbane P.G., Rovira A.D. 1990. Biological control of soil-borne plant pathogens., Capítulo Mechanisms in the biological control of take-all of wheat rhizosphere bacteria, pp. 123-130. Hornby, D. (ed.) C.A.B. International, Wallingford, England.

Sabat S., Krishna Murthy V., Pavithra M., Mayur P., Chandavar, A. 2012. Production and characterisation of extracellular lipase from *Bacillus stearothermophilus* MTCC 37 under different fermentation condition. *Journal of Engineering Research and Applications*, 2:1755-1781.

Sacherer P., Défago G., Hass D. 1994. Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene GACA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiol. Lett.*, 116:155-160.

Salinas-García J.R., Hons F.M., Matocha J.E. 1997. Long-term effects of tillage and fertilization on soil organic matter dynamic. *Soil Science Society of America Journal*, 61:152-159.

Sánchez-Hernández M.E., Ruiz-Dávila A., Pérez de Algaba A., Trapero-Casas, A. 1998. Occurrence and etiology of death of young olive trees in southern Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 104:347-357.

Scheu N., Parkinson, N. 1995. Successional changes in microbial biomass, respiration and nutrient status during litter decomposition in an aspen and pine forest. *Biol. Fertil. Soil.*, 19:327-332.

Scheuerell S.J., Sullivan D.M., Mahaffee, W.F. 2005. Suppression of seedling damping-off caused by *Pythium ultimum*, *P. irregulare* and *Rhizoctonia solani* in container media amended with a diverse range of pacific northwest compost sources. *Phytopathology*, 95:306-315.

Selva Mohan T., Palavesam A., Immanuel G. 2008. Isolation and characterisation of lipase-producing *Bacillus* strains from oil mill waste. *African Journal of Biotechnology*, 7:2728-2735.

Sessitsch A., Reiter B., Pfeifer U., Wilhelm E. 2002. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and actinomyces-specific PCR of 16s rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*, 39:23-32.

Shobha G., Kumudini B.S. 2012. Antagonistic effect of the newly isolated PGPR *Bacillus spp.* on *Fusarium oxysporum*. *Int. Journal of Applied Sciences and Engineering Research*, 11:463-474.

Shoresh M., Yedidia I., Chet I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum t203*. *Phytopathology*, 95:76-84.

Schroth M.N., Hancock, J.G. 1981. Selected topics in biological control. *Annual Review in Microbiology*, 35:453-476.

Schwencke J., Caru, M. 2006. Advances in actinorhizal symbiosis: host plant-*Frankia* interactions, biology, and applications in arid land reclamation. a review. *Arid Land Research Managment*, 15:285-327.

Singh P.P., Shin Y.C., Park C.S, Chung Y.R. 1999. Biological control of *Fusarium wilt* of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology*, 59:92-99.

Smalla K., Wieland G., Buchner A., Zock A, Parzy J., Kaiser S., Roskot N., Heuer H., Berg G. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studies by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol*, 67:4742-4751.

Sorensen J. 1997. The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms. In: *Modern Soil Microbiology*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. D. Van Elsas, J.T. Trevors, E.M.H. Wellington (Eds).

- Stenberg, B.** 1999. Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicators. *Soil Plant Science*, 49:1-24.
- Stirling G.R.** 1984. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. *Phytopathology*, 74:55-60.
- Swofford D.L.** 1999. PAUP 4.0: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (And Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, MS, USA.
- Szczecz M., Smolinska, U.** 2001. Comparison of suppressiveness of vermicomposts produced from animal manures and sewage sludge against *Phytophthora nicotianae brenda de haan var. nicotianae*. *Journal of Phytopathology*, 149:77-89.
- Tabatabai M.A.** 1982. Soil enzymes, Capítulo Chemical and microbiological properties, pp. 903-947. Mickelson S.H., Bigham, J.M. (Eds.) SSSA Book Series, number 5, Madison, W. I.
- Tabatabai M.E., Bremmer J.M.** 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1:301-307.
- Termorshuizen A.J., Evan Rijn D.J., vander Gaag D.J., Alabouvette C., Chen Y., Lagerlof J., Malandrakis A.A., Paplomatas E.J., Ramert B., Ryckeboer J., Steinberg C., Zmora-Nahum, S.** 2007. Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems: Variability in pathogen response. *Soil Biology and Biochemistry*, 38:2461-2477.
- Theron J., Cloete T.E.** 2000. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. Review. *Crit. Rev. Microbiol*, 26:37-57.
- Tilston E.L., Pitt D., Groenhof, A.C.** 2002. Composted recycled organic matter suppress soil-borne diseases of field crops. *New Phytopathology*, 154:731-740.
- Torsvik V., Ovreas, L.** 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5:240-245.

Traoré S., Thiomiano L., Rasolodimby J., Guinko M.S. 2007. Carbon and nitrogen enhancement in Cambisols and Vertisols by *Acacia spp.* in eastern *Burkina faso*: relation to soil respiration and microbial biomass. *Applied Soil Ecology*, 35:660-669.

Trasar-Cepeda C., Camiña F., Leiró M.C., Gil-Sortres, F. 1999. An improved method to measure catalase activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 31:483-485.

Tripathi R.K., Gottlieb D. 1969. Mechanism of action of the antifungal antibiotic pyrrolnitrin. *Journal of Bacteriology*, 100:310-318.

USDA. 2006. Soil taxonomy. Department of Agriculture, Washington, 1:2-233.

Utkhede, R.S., Quamme H.A., Brownlee R.I. 2002. Incidence of *Phytophthora cactorum* crown and root rot on seven apple rootstocks artificially infected in the orchard. *Biogeochemistry*, 11:213-233.

Valois D., Fayad K., Barasubiye T., Garon M., Dery C., Brzenzinnski R., Beaulieu C. 1996. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae var. rubi*, the causal agent of raspberry root rot. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:1630-1635.

van Elsas J.D. et al. 2008. The metagenomics of disease-suppressive soils- experiences from the metacontrol project. *Cell. Press*, 26:591-601.

van Elsas J.D. et al. 2011. A novel protocol for the metagenomic analysis of suppressive soil. *J. Microbiol. Methods*, 11:213-230.

van Loon L.C., Bakker P A H M. 2004. Signalling in rhizobacteria-plant interactions. Verlag, Berlin, Germany.

van Loon L.C., Bakker P.A.H.M. 2005. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In: *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* (Siddiqui Z.A., ed.), Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Vessey J.K. 2003. Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*,

255:571-586.

Vettrano A.M., Barzanti G.P., Bianco M.C., Ragazzi A., Capretti P., Paoletti N., Luisi E., Anselmi N., Vannini A. 2002. Occurrence of *Phytophthora* species in oak stands in Italy and their association with declining oak trees. *Forest Pathology*, 32:19-28.

Wardle D.A., Bardgett R.D., Klironomos J.N., Setälä H., van der Putten W.H., Wall D.H. 2004. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science*, 304:1629-1633.

Welbaum G., Sturz A.V., Dong Z., Nowak J. 2004. Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Critical Review in Plant Science*, 23:175-193.

Whipps J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52:487-511.

Yamaki M., Miwa M., Ishiguro K., Takaghi S. 1994. Antimicrobial activity of naturally occurring and synthetic phloroglucinols against *Staphylococcus aureus*. *Phytother. Res.*, 8:112-114.

Zawadzka A.M., Kimb Y., Maltseva N., Nichiporuk R., Fan Y., Joachimiak A., Raymonda K.N. 2009. Characterization of a *Bacillus subtilis* transporter for petrobactin, an anthrax stealth siderophore. *PNAS*, 106:21854-21859.

ANEXOS

Publicaciones Científicas

In Journals

- **Rossi, M.S.**; Mon-Martin, R.; Paz-Ferreiro, J. 2016. Current status of olive health in Aimogasta, Argentina. *Plant Health Progress* (Elsevier Ed) ISSN:1535-1025. (Submitted)

- **Rossi, M.S.**; Mon-Martin, R.; Paz-Ferreiro, J. 2015. Soil biochemical and physicochemical properties in relation to fungal root disease in olive trees. *Ecological Indicators* IF 3.444 (Submitted) ECOLIND-S-15-01088.

- **Rossi, M.S.**; Mon-Martin, R.; Paz-Ferreiro, J. 2015. Antifungal activity of bacteria against soil-borne fungi from *Olea europaea L.* (Submitted) IF 3.5.

In Theses

- **Rossi, M.S.** 2016. Mining en bases de gran dimensionalidad para la predicción de enfermedades en suelos de olivares sobre la base de consorcios bacterianos activos en suelos supresivos. Ed. UBA, p162. Thesis of Magister Science in Data Mining and Knowledge Discovery Sciences. Duration: 3 years.

- **Rossi, M.S.** 2008. Aspectos bioquímicos y microbiológicos como indicadores del estado de salud del suelo. Ed. UNSAM, p156. Thesis of Magister Science in Molecular Microbiology Sciences. Duration: 3 years.

- **Rossi, M.S.** 2003. Evaluación de la capacidad biopesticida de un formulado con *Pseudomonas aurantiaca*. Ed. UNRC, p101. Thesis of Bachelor's Degree in Microbiology Sciences. Duration: 5.5 years.

Posters and Scientific Presentations

- **Rossi, M.S.**; Mon-Martin, R.; Paz-Ferreiro, J. 2016. Soil properties in relation to the health status of olive groves. Eco Summit 29 August - 1 September, 2016, Montpellier, France.

- **Rossi, M.S.**; Mon-Martin, R.; Paz-Ferreiro, J. 2016. Antagonistic activity of *Bacillus subtilis* against *Phytophthora palmivora*. Eco Summit 29 August - 1 September, 2016, Montpellier, France.

- **Rossi, M.S.**; Mon-Martin, R.; Paz-Ferreiro, J. 2016. Update of the health status of olive groves in Aimogasta, Argentina. Eco Summit 29 August - 1 September, 2016, Montpellier, France.

- **Rossi, M.S.**; Roero Zaliz, R.; Milej, E.; Mon, R. 2014, Holística de los suelos supresivos basada en data mining. XXIV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, Bahía Blanca, Buenos Aires.

- **Rossi, M.S.** 2011. Disease suppressive soils in the rhizosphere of *Olea europaea* L. Fundamental for Life: Soil, Crop and Environmental Sciences-ASA-CSSA-SSSA International Annual Meetings. Oct16-19, San Antonio, TX, 26: 1117-1120.

- **Rossi, M.S.**; Jones, L.; Otero, L.; Rocca, M.; Matías, C.; Pérez, B. 2006. Aislamientos de *Bacillus* de la rizósfera de una plantación tradicional de olivo de Castelar. XXIX Congreso Argentino de Horticultura. ASAHO. San Fernando del Valle de Catamarca.

- **Rossi, M.S.**; Jones, L.; Otero, L.; Rocca, M.; Matías; C., Pérez, B. 2006. Selección de especies de *Bacillus* de suelo antagonistas de *Fusarium* en plantaciones de arándano. XXIX Congreso Argentino de Horticultura. ASAHO. San Fernando del Valle de Catamarca.

- **Rossi, M.S.**; Jones, L.; Wright, E.; Pérez, B. 2006. Antagonicidad de cepas de *Bacillus* provenientes de la rizósfera de plantaciones de arándano. XXIX Congreso Argentino de Horticultura. ASAHO. San Fernando del Valle de Catamarca.

- **Rossi, M.S.**; Jones, L.; Wright, E.; Pérez, B. 2006. Cepas de *Bacillus* antagonistas de hongos de suelo patógenos de arándano y olivo. XX Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. CACS. Primera Reunión de Suelos de la Región Andina. Salta-Jujuy.

- **Rossi, M.S.**; Jones, L.; Wright, E.; Pérez, B. 2006. Cepas rizosféricas de *Bacillus* aisladas de plantaciones de arándano con potencial para reducir la incidencia y/o severidad de hongos patógenos. Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. SAFV, Chascomús, Buenos Aires.

- **Rossi, M.S.**; Otero, L.; Matías, C.; Roca, M.; Pérez, B. 2006. Cepas de *Bacillus sp.* rizosféricas de olivo y su potencialidad antagonista frente a *Fusarium sp.* y *Dreschlera sp.* de hongos de suelo patógenos de arándano y olivo. I Congreso Nacional de Olivicultura. La Rioja.

Internships before PhD

- 2003 - Área de Fisiología Vegetal, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales - UNRC. Córdoba, Argentina.

- 2004 -2005. Beca de Investigación Iniciación-INTA. Instituto de Suelos. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Castelar, Buenos Aires, Argentina.

- 2005 -2008. Beca de Investigación Perfeccionamiento-INTA. Instituto de Suelos e Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Castelar, Buenos Aires, Argentina.

Research Projects

INTA PE AEAI-271171. Diagnóstico de la compactación del suelo en siembra directa y técnicas para la descompactación y su control. INTA-Instituto de Suelos. Coord. MSc. Carlos Iruetia. 2010-2013.

INTA PE AEAI-21111. Descompactación del suelo bajo siembra directa con enmienda profunda de yeso. INTA-Instituto de Suelos. Coord. Dr. Rodolfo Mon. 2009-2012.

INTA AERN 295582. Comunidades microbianas del suelo: Estructura y funciones en respuesta al manejo. INTA-IFFIVE Coord. Dra. Silvina Vargas Gil. 2010-2013.

BID 1201/OC-AR-PICT 2003 N°14331. Resol. ANPCYT N° 266. Etiología de los problemas fitosanitarios en la producción de frutas finas en distintas zonas de la Argentina. Su relación con el manejo de los cultivos. Investigador responsable: Ing. Agr. E Wright (FAUBA). Grupo Investigadores Responsables: Dra. B.A. Pérez (IMYZA), Ing. Agr. F. Vilella (FAUBA), Dra. G. Mareggiani (FAUBA). 2004-2007.

UBACyT G 108. Etiología de los problemas fitosanitarios en la producción de frutas finas en distintas zonas de la Argentina. Su relación con el manejo de los cultivos. Responsable: Ing. Agr. E Wright (FAUBA-Arándano). 2004-2007.

INTA AERN 5654. Efecto de distintas rotaciones sobre la dinámica de la materia orgánica y del agua pluvial en suelos con intensificación agrícola. Coordinador: MSc. Michelen R. Instituto de Suelos, dependiente del Centro de Investigación de Recursos Naturales de INTA-Castelar (CIRN-INTA Castelar). 2006-2009.

INTA PNFRU 2184. Proyecto Integrado (PI), Módulo Olivo. Desarrollo de tecnologías para aumentar la competitividad y sustentabilidad de la fruticultura argentina. Manejo integrado de plagas y enfermedades en frutales. Coordina C. Matías, EEA-Catamarca. 2006-2009 y 2009-2012.

INTA PE. Identificación, caracterización y sistematización de organismos perjudiciales emergentes con énfasis en OP de importancia cuarentenaria. Coord. Dra. Beatriz Pérez. 2006-2009.

FONTAGRO. Contribución a una producción sostenible de alfalfa mediante el manejo de microorganismos rizosféricos de Argentina, Chile y Uruguay. Subsidiado por Naciones Unidas. Director General: Dr. Roberto Racca, PhD. Unidad Ejecutora Río Cuarto: Investigador Principal MSc. Néstor Correa. Laboratorio de Fisiología Vegetal-FCEFQyN-UNRC. 2001-2003.

Manejo Biotecnológico de la Rizósfera en Cultivos Agronómicamente Importantes. Director:

MSc. Ing. Agr. Néstor S. Correa. Laboratorio de Fisiología Vegetal-FCEFQyN-UNRC.
2001-2003.