

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOMAS DE ZAMORA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**Estudio preliminar de biocontrol de *Fusarium* Link ex Grey, patógeno del
cultivo de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duchesne)**

Trabajo Final de Grado de la Carrera de Ing. Agronómica

Eliana Antonella Rafart

Tutora: María Sol Gilardino

Co tutora: María Cristina Sandoval

Lomas de Zamora, noviembre de 2020

Resumen:

El cultivo de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duchesne) es afectado por distintas enfermedades que disminuyen el crecimiento de las plantas y comprometen el rendimiento y calidad de la fruta. Entre ellas se pueden mencionar las enfermedades fúngicas que producen marchitamiento y podredumbre de la raíz y cuello de las plantas causadas por el género *Fusarium* Link ex Grey. Las enfermedades de las plantas causadas por este tipo de hongos se hallan entre los factores más importantes que aumentan las pérdidas y afectan los rendimientos de los cultivos. *Trichoderma* spp. Person posee propiedades micoparasitarias y antibióticas, por lo que algunas especies han sido catalogadas como excelentes agentes de control biológico de hongos causantes de enfermedades en diferentes plantas. El siguiente proyecto se propuso utilizar aislamientos de *Trichoderma* como biocontrolador, con los objetivos de: i) Aislar y caracterizar cepas de *Trichoderma* spp. Persoon de filoplano, rizoplano y rizósfera de plantas de frutilla; ii) Evaluar *in vitro* el efecto antagónico de cepas de *Trichoderma* spp sobre el crecimiento y esporulación de *Fusarium* spp. Las pruebas *in vitro* se realizaron por triplicado y se replicaron en tres oportunidades; como testigos se utilizaron cajas sembradas en forma individual con el patógeno y *Trichoderma*. Para las pruebas *in vivo*, se procedió a la inoculación de plantas de frutilla contenidas en macetas. La suspensión obtenida fue utilizada para regar las macetas (15 ml por maceta) según los siguientes tratamientos: i) *Fusarium*; ii) *Trichoderma*; iii) *Fusarium* + *Trichoderma*; y iv) Agua destilada estéril (testigo). Los resultados obtenidos reflejaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el crecimiento de *Fusarium* en cultivo individual y en cultivo dual, resultando el antagonista eficiente en el control del patógeno.

Palabras clave: Control Biológico, *Trichoderma*, *Fusarium*, Frutilla

Abstract

The strawberry crop (*Fragaria x ananassa* Duchesne) is affected by different diseases that slow down its growth and compromise the yield and quality of the fruit. Among them we can mention the fungal diseases that cause wilting and rotting of the root and neck of plants caused by the genus *Fusarium* Link ex Grey. Plant diseases caused by these types of fungi are among the most important factors that increase losses and affect crop yields. *Trichoderma* spp. Person has mycoparasitic and antibiotic properties, which is why some species have been classified as excellent biological control agents for fungi that cause diseases in different plants. The following project proposes to use isolates of *Trichoderma* as a biocontroller, with the objectives of: i) Isolating and characterizing strains of *Trichoderma* spp. Phylloplane, rhizoplane and rhizosphere persoon of strawberry plants; ii) To evaluate *in vitro* the antagonistic effect of *Trichoderma* spp strains on the growth and sporulation of *Fusarium* spp. The *in vitro* tests were performed in triplicate and were replicated three times; As controls, boxes planted individually with the pathogen and

Trichoderma were used. For *in vivo* tests, the strawberry plants contained in pots were inoculated. The suspension obtained was used to water the pots (15 ml per pot) according to the following treatments: i) *Fusarium*; ii) *Trichoderma*; iii) *Fusarium* + *Trichoderma*; and iv) Sterile distilled water (control). The results obtained reflected significant differences ($p < 0.05$) between the growth of *Fusarium* in individual culture and in dual culture, resulting in an efficient antagonist in the control of the pathogen.

Keywords: Biological Control, *Trichoderma*, *Fusarium*, Strawberry.

INDICE

Capítulo I	6
Introducción	
1. El cultivo de frutilla	6
1.1. Patógenos fúngicos que afectan el cultivo de frutilla	9
1.1.1. <i>Fusarium</i> Link	10
1.2. Control biológico	16
1.2.1. <i>Trichoderma</i> Persoon	17
1.2.2. Antecedentes acerca de la utilización de control biológico para el manejo de enfermedades	23
1.2.3. Antecedentes acerca de la utilización de técnicas de control biológico en el cultivo de frutilla	24
1.3. Situación problema	26
1.4. Objetivos	27
1.5. Hipótesis	27
Capítulo II	28
Materiales y Métodos	
Materiales utilizados	28
Pruebas <i>in vitro</i>	30
Pruebas <i>in vivo</i> en invernáculo	31
Capítulo III	33
Resultados y Discusión	
3.2.1. Pruebas <i>in vitro</i>	35
3.2.2. Pruebas <i>in vivo</i>	40
3.2.3. Consideraciones finales	44
Capítulo IV	45
Conclusiones	
V. Bibliografía	47
VI. Anexos	54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Escala de clases de antagonismo.	30
Tabla 2. Valores correspondientes al diámetro de colonias (en mm) de <i>Fusarium</i> cultivadas en forma individual y cultivo dual con <i>Trichoderma</i> a las 24 y 96 h	38
Tabla 3. Valores correspondientes al diámetro de colonias (en mm) de <i>Fusarium</i> cultivadas en forma individual y cultivo dual con <i>Trichoderma</i> a las 96 y 120 h	39

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organografía de la planta de frutilla	7
Figura 2: Macroconidios del género <i>Fusarium</i> .	12
Figura 3: Microconidios del género <i>Fusarium</i> .	13
Figura 4. Clamidoporas y micelio de <i>Fusarium</i>	13
Figura 5. Podredumbre de la corona causada por la infección con <i>Fusarium</i>	15
Figura 6. Muerte de plantas de frutilla causada por la infección con <i>Fusarium</i>	15
Figura 7. Colonia joven de <i>Trichoderma</i> sobre medio agar papa glucosado	19

Figura 8. Colonia madura de <i>Trichoderma</i> desarrollada sobre explantos de hoja de frutilla	20
Figura 9. Conidióforos y conidios de <i>Trichoderma</i>	29
Figura 10. Colonia de <i>Trichoderma</i> en medio de cultivo APG	31
Figura 11. Plantas de frutilla utilizadas en las pruebas <i>in vivo</i>	34
Figura 12. Cepas de <i>Trichoderma</i> spp. aisladas durante las pruebas	34
Figura 13. Estructuras de <i>Trichoderma</i>	36
Figura 14. Cultivos individuales y duales de <i>Fusarium</i> y <i>Trichoderma</i>	37
Figura 15. Estructuras del antagonista y del patógeno, observadas en la zona de contacto de las colonias en cultivo dual	38
Figura 16. Diámetro de colonias de cultivos individuales y duales de <i>Fusarium</i> y <i>Trichoderma</i>	40
Figura 17. Valores promedio del diámetro de colonias	42
Figura 18. Pruebas de antagonismo <i>in vivo</i>	43
Figura 19. Valores promedio del peso de raíces de plantas tratadas con <i>Fusarium</i> en cultivo individual y dual	

CAPÍTULO I

INTRODUCCION

1. El cultivo de frutilla

La frutilla (*Fragaria x ananassa* Duchesne), pertenece a la familia de las Rosáceas y al género *Fragaria*; es producto del cruzamiento entre *Fragaria chiloensis* L. y *F. virginiana* Duchesne; y es considerada una planta perenne, aunque su potencial productivo sólo dura dos años en nuestro país. Es una planta rastrera, su tallo es un pequeño rizoma que crece al ras del suelo y de allí se originan estolones en cuyos extremos se forman plántulas idénticas a la planta madre. Una corona representa al tallo de la planta que se observa superficialmente, ésta lleva a las yemas tanto vegetativas como fructíferas y de ellas nacen las hojas, las inflorescencias y las guías o estolones. Sus hojas dispuestas de forma arrosetada, son trifoliadas, fuertemente aserradas, de pecíolo largo y lámina de color verde intenso en su cara superior y pseudo-pubescentes en su cara inferior, con una gran cantidad de estomas. Las flores son de color blanco, ubicadas en inflorescencias largas pero generalmente más cortas que las hojas, siendo polinizadas por insectos y por el viento. El fruto propiamente dicho es un aquenio (fruto agregado), y corresponde a las pepitas que van insertas sobre un receptáculo carnoso y ensanchado, que constituye la parte comestible (Figura 1) (Caminiti, 2015).

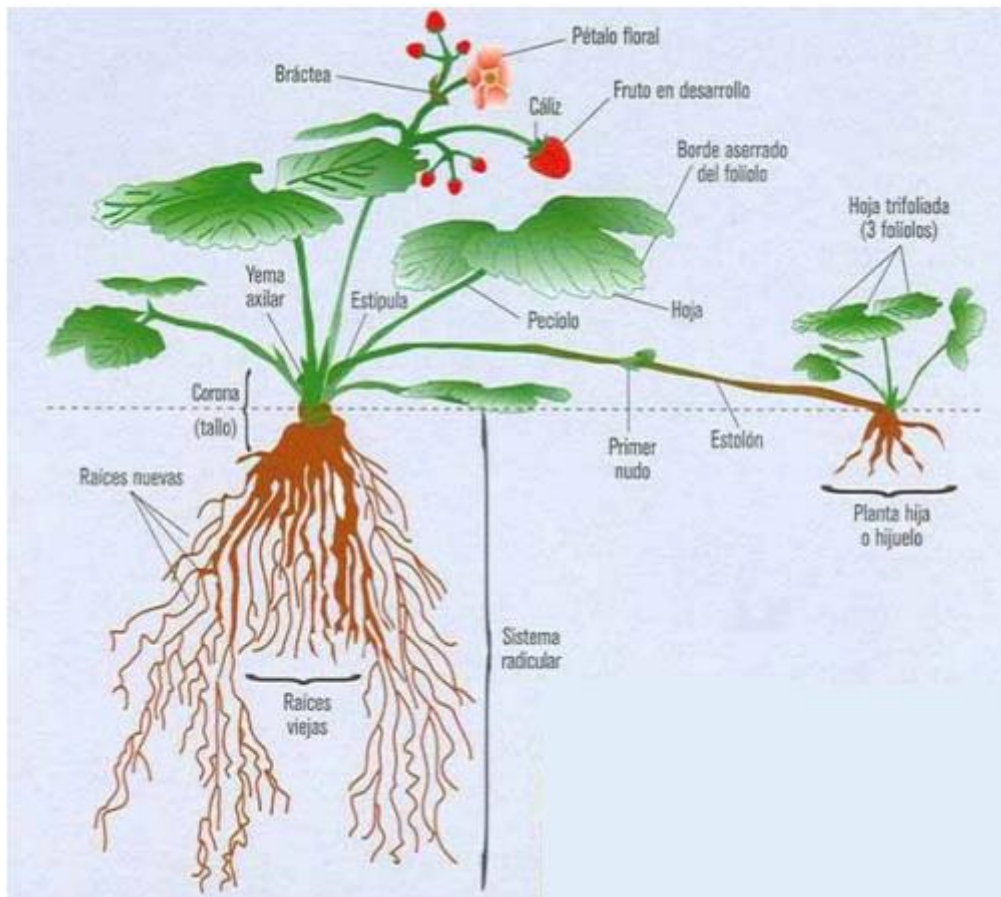


Figura 1: Organografía de la planta de frutilla. Fuente: Strand (1994)

Es un vegetal del tipo vivaz que puede vivir varios años, sin embargo puede durar de uno a dos años en producción en plantaciones de mayor edad donde las plantas se muestran más débiles, con bajo rendimiento y frutas de menor calidad debido a una mayor incidencia de plagas y enfermedades, especialmente virosis (Morales, 2017).

“Se cultivan en diferentes zonas del mundo, tropicales, subtropicales e incluso en áreas templadas. Además de su interés comercial, este cultivo es de gran importancia social debido a la alta demanda de trabajadores requeridos para su producción y procesamiento en campo, en poscosecha y en la industria” (Pedraza *et al.*, 2010). En la actualidad, la frutilla debido a su alto contenido de flavonoides, antocianinas y compuestos fenólicos, además del contenido

nutricional y el aporte de algunas vitaminas como la A y C (Cao *et al.*, 2011), puede ser considerada como un producto nutracéutico, ampliando las posibilidades comerciales que existen para este tipo de productos, que cada día aumentan en los mercados internacionales.

Por otra parte, este cultivo es altamente demandante de productos como insecticidas, fungicidas y plaguicidas para lograr una aceptable producción de fruta. Requiere grandes cantidades de recursos renovables y no renovables tales como: Un mulch que consiste en cubrir los surcos o camas, con algún material plástico que impida que la fruta tenga contacto directo con el suelo, impidiendo así daños y a su vez evitando el crecimiento de malezas. De igual forma, requiere una cantidad considerable de agua para el establecimiento de las plantaciones y depende de aplicaciones frecuentes de fertilizantes de síntesis química, para aumentar su productividad (Pritts, 2002).

“A nivel nacional, la frutilla es la fruta fina más difundida, la de mayor aceptación por parte del consumidor argentino, con una demanda muy elástica ya que su consumo está fuertemente vinculado a la compra compulsiva, denominada fruta “llamadora”, ya que el consumidor la ve y la quiere” (Caminiti, 2015).

En Argentina, se cultivan anualmente entre 1.000 y 1.400 hectáreas que producen entre 14.000 y 17.000 t/año promedio, esta fruta se comercializa fundamentalmente como fruta fresca (60-70%) y fruta para industria (30-40%) en sus diversas formas de congelados y derivados para la industria alimenticia.

La primicia proviene del NOA, principalmente de la producción de Lules, Tucumán, siendo esta localidad el segundo productor nacional de frutillas.

Luego se encuentra la localidad de Tafí del Valle pero con menor concentración de producción que Lules. En septiembre, la producción de frutillas proviene de Santa Fe, incluyendo Coronda, Arijón y Arocena. La localidad de Coronda es la principal productora de frutillas del país. Coronda y Lules conforman las dos localidades más importantes para la producción de frutilla por sus volúmenes producidos y por los momentos que ingresan al mercado y por lo tanto son formadoras del precio de las frutillas en el mercado nacional. Por consiguiente, las provincias del NOA, con Tucumán como la principal, el cinturón verde de la Ciudad de Buenos Aires, Santa Fe, las provincias del NEA, principalmente Corrientes y por último, la región de Cuyo, con el valle de Uco en Mendoza, constituyen las principales zonas productoras del país. (Caminiti, 2015)

Uno de los principales retos en el desarrollo del cultivo comercial de frutilla, e incluso en la poscosecha del fruto, es el manejo de las enfermedades que en su gran mayoría son de carácter fungoso; seguidas por algunos problemas bacterianos, de nematodos y muy pocos ocasionados por virus.

La frutilla es una especie altamente susceptible a patógenos, algunos edáficos como *Phytophthora sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Fusarium sp.* y *Verticillium sp.* (Vestberg *et al.*, 2004).

1.1. Patógenos fúngicos que afectan el cultivo de frutilla

Los hongos son los principales agentes causales de pudriciones de cuello y raíces en las plantas de frutilla. Ellos forman parte de la microflora del suelo, y su permanencia en él dependerá de la capacidad de vivir en ausencia del

hospedero. Todos estos organismos tienen una fase parasitaria que ocurre en las raíces de las plantas de frutilla, y una fase saprofítica que transcurre en la materia orgánica, también tienen la particularidad de presentar estructuras de resistencia como son los esclerocios, clamidosporas u oosporas, entre otras, que les permiten permanecer en el suelo por muchos años. Éstos sirven de inóculo para iniciar la infección, la que ocurre en presencia de diversos compuestos exudados por las raíces de las plantas de frutilla, que estimulan su germinación produciendo hifas y su penetración en la zona radical en forma directa, o a través de heridas causadas por nematodos, insectos, herramientas o por la emisión de raíces secundarias. La diseminación de todos estos microorganismos ocurre por el agua de riego, los movimientos de suelo o por plantas enfermas. La colonización de los tejidos se ve favorecida por la acción de sustancias químicas, producidas por los patógenos. Condiciones de alta humedad en los suelos facilitan la infección y propagación de estos hongos en plantas de frutilla. Ellos invaden los tejidos, causando obstrucción de los vasos conductores provocando marchitez y a veces hasta la muerte. En los órganos afectados, los hongos forman sus estructuras reproductivas que servirán de fuente de inóculo para infectar nuevas plantas (Morales, 2017).

Entre las enfermedades fúngicas que afectan al cultivo de frutilla se destacan las causadas por especies del género *Fusarium*. Las características distintivas de este género se describen en el siguiente ítem:

1.1.1. *Fusarium* Link

El género *Fusarium* fue definido por primera vez en la terminología moderna del sistema científico por Link en 1809. Johann Heinrich Friedrich Link fue un

doctor, botánico, profesor universitario y científico natural alemán (1769 -1852) (Biblioteca Nacional Alemana, s.f.)

“Un monje franciscano en México en el siglo XVI recogió los primeros datos sobre el género *Fusarium*, basándose en las descripciones del pueblo Azteca sobre la podredumbre del maíz causado por el hongo conocido ahora como *Fusarium verticillioides*” (Casado del Castillo, 2017).

Fusarium presenta una clasificación compleja. Su taxonomía ha sufrido cambios a lo largo del último siglo, y actualmente se encuentra incluido dentro del grupo de hongos Ascomicetos, en la división Ascomycota, subdivisión Pezizomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Nectriaceae. Está subdividido en 16 secciones que agrupan aproximadamente a 150 especies filogenéticamente diferentes bien caracterizadas y aceptadas por los taxónomos (Seifert y Levesque, 2004).

Dentro de los hongos fitopatógenos, es uno de los géneros más importantes que comprende un grupo extenso y heterogéneo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en suelos tanto no disturbados como cultivados. Viven de forma saprofítica en el suelo, obteniendo los nutrientes necesarios para su supervivencia a partir de materia orgánica muerta o detritos desechados por otros seres vivos. Muchos de ellos tienen la capacidad de colonizar gran variedad de hospedadores vegetales mediante diferentes estrategias de infección, provocando en ellos la enfermedad conocida como fusariosis, y precisamente por esta capacidad son considerados hongos fitopatógenos (Desjardins, 2003; Di Pietro *et al.*, 2003; Goswami y Kistler, 2004).

Las especies del género forman esporas pluricelulares en forma de macroconidios (Figura 2). Éstos son muy característicos: son fusiformes, hialinos, alargados, curvados y septados, y se forman, en la mayoría de las especies, en una estructura especializada denominada esporodoquio. La forma más o menos curvada, el grosor de la zona central de la espora, y la forma y tamaño de las células apicales y basales de los macroconidios se consideran caracteres distintivos de cada especie. Algunas especies del género tienen la capacidad de producir esporas en forma de microconidios (Figura 3) de un tamaño menor que el que presentan los macroconidios, con una o dos células; y aunque generalmente no son septados, en algunos casos pueden presentar de 1 a 2 septos. La forma de los microconidios es variable (arriñonada, ovalada, ovoidal, etc.), pudiendo encontrarse diferentes formas dentro de un mismo cultivo (Leslie y Summerell, 2006).

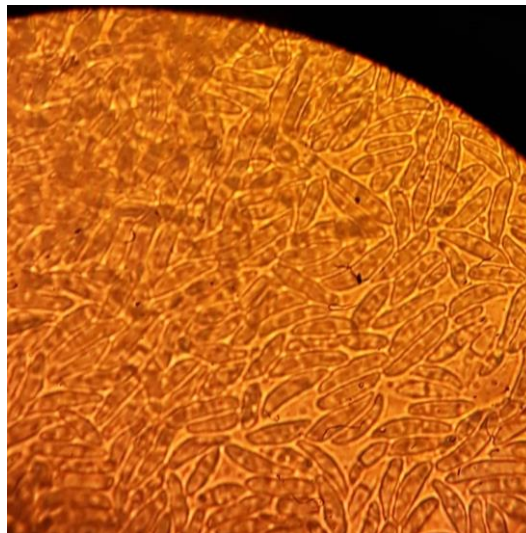


Figura 2: Macroconidios del género *Fusarium*. Fuente: Gilardino (2019)

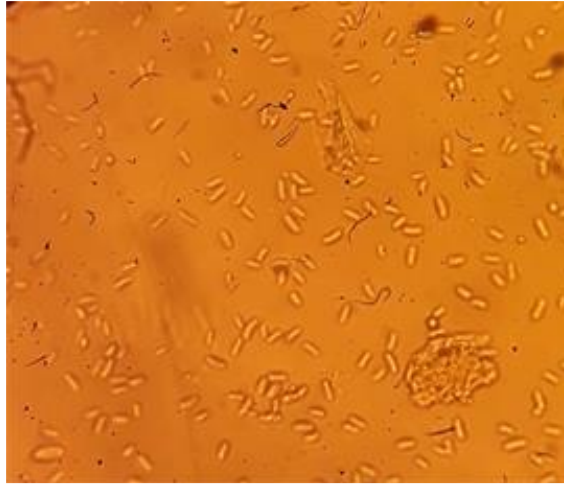


Figura 3: Microconidios del género *Fusarium*. Fuente: Gilardino (2019)

En algunas especies se ha observado también la producción de formas de resistencia denominadas clamidosporas (Figura 4). Presentan una o dos células, tienen forma esférica y su pared está engrosada. Su formación requiere de un tiempo prolongado (más de seis semanas desde el inicio del cultivo) y no suelen producirse en un número elevado (Leslie y Summerell, 2006).



Figura 4. Clamidosporas y micelio de *Fusarium*. Fuente: Koike (2013)

Una característica importante del género *Fusarium* es la variabilidad en cuanto a su capacidad de reproducción sexual, conociéndose especies teleomórficas o de reproducción sexual conocida, y especies anamórficas, agámicas o de reproducción sexual desconocida.

“Como otros fitopatógenos, este hongo emplea diversas estrategias de infección, así también, la especificidad del hospedero depende de cada especie de *Fusarium*. El hongo puede sobrevivir en el suelo como micelio o como esporas en ausencia de sus anfitriones, y si se encuentra cerca una planta hospedera, la infección puede iniciar en las raíces, en partes de la planta por encima del suelo, a través del aire o el agua” (Ma *et al.*, 2013). “Para que la infección se logre con éxito, la interacción entre hongo–planta responde a un proceso donde se deben movilizar diferentes conjuntos de genes para la señalización temprana del hospedero, la adhesión a la superficie de éste, la descomposición enzimática de barreras físicas, la defensa contra los compuestos antifúngicos del anfitrión, y la inactivación y la muerte de las células huésped por las micotoxinas segregadas”. (Agrios, 2005).

Las especies de *Fusarium* causantes de marchitez siguen un patrón similar de infección; penetran por la raíz y colonizan el tallo de las plantas el sistema vascular. Sin embargo, la colonización se restringe en cultivares tanto resistentes como susceptibles, a la región de entrada inicial del patógeno, debido a la oclusión de los vasos por geles, deposiciones de calosa y tilosas. En los cultivares susceptibles la colonización continúa en una distribución secundaria cuando los geles y calosas son degradados por el efecto de enzimas pectolíticas del patógeno y el crecimiento de las tilosas es inhibido (González *et al.*, 2012).

En frutilla la infección debida a *Fusarium* causa podredumbre de corona (Figura 5) y muerte de plantas (Figura 6).



Figura 5. Podredumbre de la corona causada por la infección con *Fusarium*. Foto: Sandoval (2016).



Figura 6. Muerte de plantas de frutilla causada por la infección con *Fusarium*. Fuente: Koike (2013).

La enfermedad causada por *Fusarium* en frutilla incluye los siguientes síntomas: en la parte aérea: marchitez de follaje, disminución del crecimiento y muerte de las hojas viejas. Cuando se parte la corona de la planta infectada los tejidos vasculares y de la corteza presentan una coloración marrón oscuro a marrón anaranjado. La severidad de la enfermedad se incrementa cuando la planta infectada sufre distintos tipos de estrés: hídrico, térmico, suelos pesados o alta producción de frutos. (Koike y Bolda, 2013)

El control de *Fusarium*, al igual que sucede con otros organismos fitopatógenos del suelo es de los más difíciles de lograr. En tal sentido, se han desarrollado distintas estrategias que incluyen prácticas culturales, control biológico y control químico, "siendo este último el más utilizado por ser económico y eficaz, en comparación con otras medidas" (Rubio *et al.*, 2008). Las enfermedades de las plantas causadas por este tipo de hongos se hallan entre los factores más importantes que aumentan las pérdidas y afectan los rendimientos de los cultivos.

1.2. Control biológico

El control biológico fue originalmente definido como "la acción de parásitos, depredadores o patógenos que mantienen poblaciones de otros organismos a un nivel más bajo de lo que pudiera ocurrir en su ausencia" (DeBach, 1977). El control biológico se distingue de otras formas de control de plagas por actuar de una manera denso dependiente, esto es, los enemigos naturales se incrementan y destruyen una gran porción de la población cuando la densidad de esta población se incrementa (DeBach y Rosen, 1991). "Este fenómeno natural de regulación de plagas manejado por el ser humano a través del realce

de la intervención de agentes de control biológico, plantas y herbívoros provisto de bases ecológicas se dio a conocer en la década de los 70, como Manejo Integrado de Plagas (MIP)” (Van des Boshch *et al.*, 1982).

Entre las especies más ampliamente estudiadas y aplicadas como agentes de control biológico, se encuentran las del género *Trichoderma*, debido a su eficaz control, capacidad reproductiva, plasticidad ecológica, efecto estimulante sobre los cultivos y recientemente se detectó su acción como inductor de resistencia sistémica en la planta a diferentes patógenos. (Infante *et al.*, 2009).

1.2.1. *Trichoderma* Persoon

El género *Trichoderma* fue descrito por Persoon en 1794. El género incluye especies de hongos saprofitos del suelo y la madera, de crecimiento muy rápido (Villegas, 2008).

Las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas por todas las latitudes, y se presentan naturalmente en diferentes ambientes, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición (Martinez *et al.*, 2013).

Trichoderma predomina en ecosistemas terrestres (bosques o suelos agrícolas), tiene bajo requerimiento nutrimental pero relativamente amplio rango de temperatura (25-30°C) para su crecimiento (Sandle, 2014). Además, poseen alta adaptabilidad a condiciones ecológicas y pueden crecer de manera saprofítica, interactúan con animales y plantas (Zeilinger *et al.*, 2016), y se desarrollan en diversos sustratos, lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura (Ramos *et al.*, 2008).

Diversas especies de este género están asociadas con la rizósfera de plantas o pueden relacionarse de manera endofítica, por lo que pueden promover el crecimiento y desarrollo de las plantas, mediante la producción de auxinas y giberelinas; también pueden producir ácidos orgánicos (glucónico, fumárico, y cítrico) que pueden disminuir el pH del suelo y propiciar la solubilización de fosfatos, magnesio, hierro y manganeso, los cuales son vitales para el metabolismo vegetal (Torres-De la Cruz *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2017).

Trichoderma, es también importante para las plantas, al contribuir en el control de hongos fitopatógenos, ya que posee propiedades micoparasitarias y antibióticas, por lo que algunas especies han sido catalogadas como excelentes agentes de control biológico de hongos causantes de enfermedades en diferentes plantas (Argumedo-Delira *et al.*, 2009). Este hongo toma nutrientes de los hongos que parasita y de materiales orgánicos, ayudando a su descomposición, por lo cual las incorporaciones de materia orgánica y compostas favorecen su proliferación (Ramos *et al.*, 2008).

Según Fernández (2004), el género *Trichoderma* es un excelente modelo para ser estudiado debido a su fácil aislamiento y cultivo, rápido desarrollo en varios sustratos y por su condición de controlador biológico de una amplia gama de fitopatógenos.

Su taxonomía es la que sigue: reino: Fungi; división: Mycota; subdivisión: Eumycota; clase: Hyphomycetes; orden: Moniliales; familia: Moniliaceae; género: *Trichoderma* (Villegas, 2005).

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco (Figura 7), que se tornan a verde oscuro o amarillento (Figura 8), con esporulación densa (Rifai, 1969). El micelio es ralo en su mayoría, y visto al microscopio es fino, los conidióforos son ramificados, parecen un árbol pequeño (Figura 9). Los mismos se presentan como penachos compactados que forman anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal. Estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies. Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del período vegetativo de las plantas (Rifai, 1969). Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos (Harman, 2004). Además de los conidióforos, los conidios se pueden producir sobre fiálides que emergen directamente del micelio.

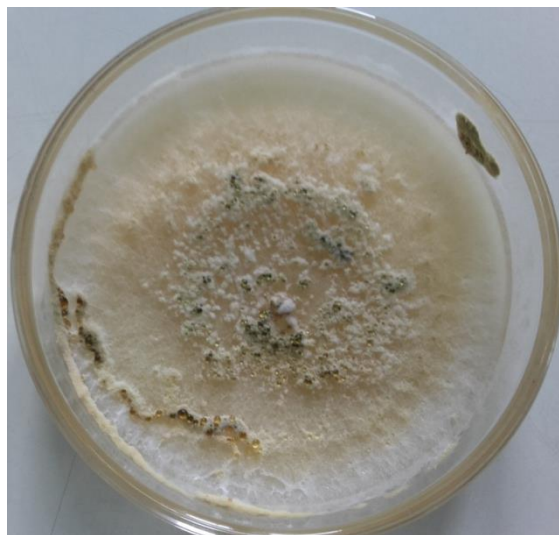


Figura 7. Colonia joven de *Trichoderma* sobre medio agar papa glucosado. Fuente: Rafart (2019).



Figura 8. Colonia madura de *Trichoderma* desarrollada sobre explantos de hoja de frutilla. Fuente: Gilardino (2019).

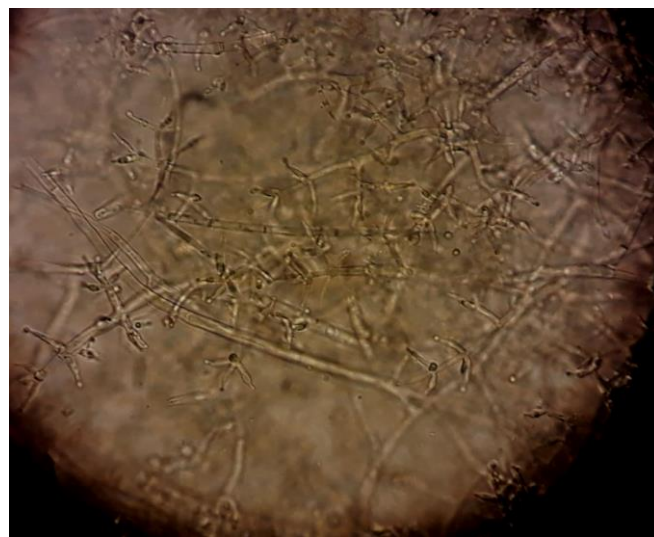


Figura 9. Conidióforos y conidios de *Trichoderma* (400X). Fuente: Gilardino (2019).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* presentan clamidosporas intercalares y en ocasiones terminales. Las clamidosporas toleran condiciones ambientales adversas, son estructuras de sobrevivencia y permiten que el hongo pueda perdurar a través del tiempo (Stefanova *et al.*, 1999).

En su acción biocontroladora, “se han descrito diferentes mecanismos de acción que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos dianas. Estos mecanismos incluyen la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, los que tienen una acción directa frente al hongo fitopatógeno” (Lorenzo, 2001). Estos mecanismos se ven favorecidos por la habilidad de los aislamientos de *Trichoderma* para colonizar la rizósfera de las plantas. Otros autores han sugerido distintos mecanismos responsables de su actividad biocontroladora, que incluyen, además de los mencionados, la secreción de enzimas y la producción de compuestos inhibidores (Haram *et al.*, 1999, Zimand *et al.*, 1996).

El micoparasitismo es definido como una simbiosis antagónica entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados (Díaz, 1994; Lorito *et al.*, 1996, Melgarejo *et al.*, 1989; Ulloa, 1996). Las especies de *Trichoderma* durante el proceso de micoparasitismo crecen quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. Durante el proceso de micoparasitismo, *Trichoderma* secreta enzimas que hidrolizan la pared celular de los hongos que parasita, siendo las más conocidas las proteasas, las quitinasas y las glucanasas (Marcello *et al.*, 2010; García-Espejo *et al.*, 2016), y provocan la retracción de la membrana plasmática y la desorganización del citoplasma. También inhiben la germinación de esporas y la elongación del tubo germinativo (Romero-Cortes *et al.*, 2016). La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso

parasítico (Carsolio *et al.*, 1999), que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno.

Además, “se conoce que presenta otros mecanismos, cuya acción biorreguladora es de forma indirecta. Entre estos se pueden mencionar los que inducen mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos como es la activación en la planta de compuestos relacionados con la resistencia (Inducción de Resistencia), con la detoxificación de toxinas excretadas por patógenos y la desactivación de enzimas de estos durante el proceso de infección; la solubilización de elementos nutritivos, que en su forma original no son accesibles para las plantas. Tienen la capacidad, además, de crear un ambiente favorable al desarrollo radical lo que aumenta la tolerancia de la planta al estrés” (Harman, 2004).

La presencia de *Trichoderma* en suelos agrícolas y naturales en todo el mundo es una evidencia, de que es un excelente competidor por espacio y recursos nutricionales (Hjeljord y Tronsmo, 1998), y de su plasticidad ecológica (Martínez *et al.*, 2013). La competencia por nutrientes de *Trichoderma*, es principalmente por carbono, nitrato e hierro (Sivan y Chet, 1986). De forma general, entre las cualidades que favorecen la competencia de este antagonista se encuentra, la alta velocidad de crecimiento que posee gran parte de sus aislamientos y la secreción de metabolitos de diferente naturaleza, que frenan o eliminan a los competidores en el microambiente. Este modo de acción influye en “bloquear el paso” al patógeno y resulta importante para la diseminación del antagonista. (Martínez *et al.*, 2013).

Trichoderma está biológicamente adaptado para una colonización agresiva de los sustratos y en condiciones adversas para sobrevivir, fundamentalmente, en forma de clamidosporas. La alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, debido a la riqueza de enzimas que posee, hacen que sea muy eficiente como saprófito y aún más como agente de control biológico (Hjeljord *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2013).

1.2.2. Antecedentes acerca de la utilización de control biológico para el manejo de enfermedades

La acción de *Trichoderma* como micoparásito natural fue demostrada por Weindling en 1932, y su utilización en experimentos de control biológico se implementó a partir de 1970, cuando se incrementaron los estudios de campo para su uso en cultivos de hortalizas y ornamentales (Hurnby, 1990).

Trichoderma está entre los agentes de control biológico más exitosos en la agricultura, formando parte de más del 60% de los biofungicidas registrados en el mundo. Este microorganismo está presente en el mercado como bioplaguicida, biofertilizante, promotor del rendimiento y crecimiento vegetal, y como solubilizador de nutrientes en campos agrícolas o descomponedor de materia orgánica (Vinale *et al.*, 2008; Charoenrak y Chamswarng, 2016). *Trichoderma* se produce en formulaciones sólidas y líquidas con inóculo viable (hifas, clamidosporas y conidias) para usarlo como agente de biocontrol (Cumagun, 2014). “Ambas formulaciones requieren el secado para obtener un producto estable con prolongada vida de anaquel; así, el secado por aspersión es el más utilizado a escala industrial por su bajo costo y eficiencia (Morgan *et*

al., 2006). La mayoría de estos bioformulados se preparan a base de las especies *T. viride*, *T. virens*, y en mayor proporción *T. harzianum*” (Vargas-Hoyos y Gilchrist-Ramelli, 2015).

Para asegurar el éxito de *Trichoderma* como biocontrolador, éste debe ser inmovilizado en ciertos portadores, y preparado en formulaciones de fácil aplicación, almacenamiento, comercialización y aplicación en campo. Algunas formulaciones comerciales de este microorganismo corresponden a talcos, vermiculita-salvado de trigo, gránulos de pesta (masa cohesiva hecha de harina de trigo, rellenos y otros aditivos que contienen al hongo), cáscara de café, aceite vegetal o mineral, y desechos de banano (*Musa paradisiaca*) (Kumar *et al.*, 2014).

“Diversos investigadores han encontrado que algunas especies de *Trichoderma* y de *Gliocladium* tienen una gran actividad antagonistas sobre hongos productores de esclerocios como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*, causando una disminución importante de las enfermedades que ocasionan (Merriman, 1976; Papavizas, 1985; Chet, 1987). Se han utilizado cepas comerciales como biofungicidas en un amplio rango de situaciones, incluyendo la prevención y el control de enfermedades en plantas. Entre algunos de los patógenos que se controlan con este hongo se encuentran *Alternaria*, *Botrytis*, *Didymella*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* y *Sclerotinia*” (Helyer *et al.*, 2014).

1.2.3. Antecedentes acerca de la utilización de técnicas de control biológico en el cultivo de frutilla

“Distintos autores evaluaron la eficiencia de antagonistas fúngicos y bacterianos como promotores del crecimiento en plantines de frutilla en invernáculo, aplicados por inmersión de raíces antes del trasplante. Se observaron diferencias significativas entre las cepas de *Trichoderma* y *Bacillus* y el fertilizante químico en peso fresco y seco de las raíces” (Sobero *et al.*, 2006).

Sobero Rojo *et al.* (2006), mostraron que la aspersión de plantas con suspensiones de *Trichoderma* disminuyó la incidencia de pudrición de frutos por *Botrytis cinérea* en un cultivo de frutilla en la provincia de Buenos Aires.

En Tucumán, se realizaron varios estudios de control de la antracnosis de la frutilla causada por *Colletotrichum acutatum*. Salazar *et al.* (2007) observaron que la cepa avirulenta de *C. fragariae* F7 creció sobre las plantas sin ocasionar síntomas y en laboratorio no mostró antagonismo frente al patógeno. Ello permitió inferir que desencadena una respuesta de defensa contra *C. acutatum*, luego confirmada por la detección de una respuesta oxidativa dentro de las 4 horas de la inoculación con F7 y alteraciones anatómicas asociadas con mecanismos de defensa hasta 50 días. La respuesta de resistencia a la infección sería elicitada por compuestos difusibles producidos por F7.

En Corrientes, Lovato Echeverría (2009) obtuvo una colección de aislamientos de *Trichoderma* de hojas, flores y rizósfera de plantas sanas de frutilla y evaluó su potencial antagónico *in vitro* contra *Botrytis cinerea*. Como resultado, encontró diferencias en la disminución del crecimiento del patógeno. Todos los

aislamientos de *Trichoderma* presentaron formación de clamidosporas y micoparasitismo y algunos, antibiosis, destacándose tres de ellos.

Martinengo de Mitidieri (1996) detectó antagonismo contra *Pythium*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor* utilizando las cepas de *Trichoderma* T473, T643 y T668, seleccionadas entre 1.200 aislamientos por su comportamiento en laboratorio, invernáculo y campo sobre tomate, pimiento, lechuga y frutilla. Ninguna de las tres cepas afectó el desarrollo vegetal y en algunos casos indujeron el crecimiento de las plantas.

1.3. Situación problema

El control de los organismos fitopatógenos del suelo como es el caso de *Fusarium*, es de los más difíciles de lograr; para ello se han desarrollado prácticas culturales, control biológico y control químico (Rubio *et al.*, 2008).

En frutilla, la mayor parte de las estrategias de control utilizadas hasta el momento, tanto en cultivo como en poscosecha, se han basado en el empleo de fungicidas sintéticos. Sin embargo, estas prácticas son cada vez menos recomendables y están más restringidas debido a los problemas de contaminación ambiental y por representar un potencial riesgo para la salud humana, además de la aparición de cepas del patógeno, resistentes a los fungicidas utilizados (Benito *et al.*, 2000). En la búsqueda de alternativas naturales para el control de pudriciones en pre y poscosecha se ha valorado el empleo del control biológico (Guédez *et al.*, 2008)

En este contexto, el presente proyecto se propuso evaluar el efecto de la utilización de *Trichoderma* como agente de control biológico del marchitamiento y podredumbre causados por *Fusarium* en el cultivo de frutilla.

1.4. Objetivos

- i) Aislar y caracterizar cepas de *Trichoderma* spp. Persoon a partir de filoplano, rizoplano y rizósfera de plantas de frutilla;
- ii) Evaluar *in vitro* e *in vivo* el efecto antagónico de cepas de *Trichoderma* spp sobre el crecimiento y esporulación de *Fusarium* spp.;

1.5. Hipótesis

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. obtenidos a partir de suelo, rizósfera y tejidos vegetales rizoplano de plantas de frutilla (*Fragaria* x *ananassa* Duchesne) pueden actuar como agentes de biocontrol frente al patógeno *Fusarium* spp.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales utilizados

Antagonistas: Aislamientos de *Trichoderma* spp obtenidos a partir de rizósfera y tejidos vegetales de plantas de frutilla en producción en lotes pertenecientes a la Asociación 1610, de Florencio Varela, provincia de Buenos Aires. Los aislamientos se conservaron mediante transferencias periódicas a medio de cultivo agar papa glucosado (APG 2%) y agar extracto de malta, incubándolas siete o más días a 26° C de temperatura y 16 horas de fotoperíodo.

Patógeno: Aislamientos de *Fusarium* spp obtenidos a partir de tejidos vegetales de plantas de frutilla con síntomas de podredumbre y marchitamiento. Estas plantas se encontraban en producción en lotes pertenecientes a la Asociación 1610, de Florencio Varela, provincia de Buenos Aires, cultivadas en APG (2%), y conservados por transferencias periódicas a medio de cultivo fresco e incubados a 26° C de temperatura y 16 horas de fotoperíodo.

A continuación se detalla la metodología seguida en función de los objetivos específicos planteados:

Primer objetivo: Aislar y caracterizar cepas de *Trichoderma* spp. Persoon a partir de filoplano, rizoplano y rizósfera de plantas de frutilla.

Aislamiento de cepas de *Trichoderma* spp. Se siguieron los siguientes métodos: i) Tejidos vegetales de acuerdo a la técnica descrita por Slesman y

Leben (1976); y, ii) Rizoplano y rizósfera. Cada muestra fue subdividida en secciones de tamaño adecuado y desinfectada con hipoclorito de Na al 2 % (v/v) durante tres a cinco minutos (dependiendo de la consistencia del material) y enjuagada tres veces con agua destilada estéril; eliminando el exceso de humedad por secado con papel de filtro esterilizado. El material fue sembrado (por triplicado) en placas de Petri con APG (2 %) (Figura 8). En el caso de rizósfera, cada muestra consistió en 100 gr de suelo (del área inmediatamente cercana a la raíz), homogeneizada por agitación. Por partición se obtuvieron submuestras de un gramo, con las que se realizaron diluciones sucesivas en agua peptona (1% p/v). Con 0,001 ml de la dilución 10^{-3} se procedió a la siembra de placas con APG (2 %). En todos los casos las condiciones de incubación fueron las siguientes: 8 días en condiciones de luz y temperatura ambiente.

Para la identificación de colonias desarrolladas en placas, se recurrió a la observación de caracteres macro y microscópicos de las mismas. Esta información fue contrastada con la existente en claves taxonómicas apropiadas (Rifai, 1969; Samuels, 2006; Samaniego, 2018).

Las colonias positivamente identificadas como *Trichoderma* spp (Figura 10), fueron transferidas a placas con APG (2%) utilizando la técnica de “siembra de extremo de hifa”.



Figura 10. Colonia de *Trichoderma* en medio de cultivo APG

Segundo objetivo: Evaluar *in vitro* e *in vivo* el efecto antagónico de cepas de *Trichoderma spp* sobre el crecimiento y esporulación de *Fusarium spp*.

Pruebas *in vitro*

Para la detección de capacidad inhibitoria del crecimiento del patógeno en laboratorio se utilizó la técnica del cultivo dual. Para lo cual se procedió a sembrar en el centro de cajas de Petri con medio APG (2%) una sección de 0,5 cm de un cultivo puro del patógeno (en APG 2%), enfrentada a una sección de igual tamaño del aislamiento de *Trichoderma*, con una distancia entre ambos de 4 cm. Las placas (envueltas en papel film transparente) fueron incubadas durante 7 días a 26° C. Una vez incubadas se evaluó el grado de antagonismo utilizando la escala de Bell *et al.* (1982) (Tabla 1) (CET, 2004).

Tabla 1. Escala de clases de antagonismo.

Clases	Descripción
1	<i>Trichoderma</i> crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio de cultivo
2	<i>Trichoderma</i> crece al menos sobre dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo
3	<i>Trichoderma</i> y el patógeno cubren aproximadamente la mitad

	de la superficie del medio de cultivo
4	El patógeno crece al menos en las dos terceras partes del medio de cultivo limitando el crecimiento de <i>Trichoderma</i>
5	El patógeno crece sobre la colonia de <i>Trichoderma</i> ocupando toda la superficie del medio de cultivo

Durante las pruebas, se midió, además, el diámetro de las colonias del patógeno y del antagonista en cultivo dual e individual (Véase Anexo 1). Con los datos obtenidos se realizó un ANOVA utilizando el programa Vassarstats.net

Las pruebas se realizaron por triplicado y se replicaron en tres oportunidades; como testigos se utilizaron cajas sembradas en forma individual con el patógeno y *Trichoderma*. Se utilizó una cepa del antagonista seleccionada según caracteres morfológicos detallados en el ítem precedente, y una cepa de *Fusarium* seleccionada por el grado de síntomas observado en el campo.

Pruebas *in vivo* en invernáculo

Para las pruebas *in vivo*, realizadas en el invernáculo de la FCA (sede bosque), se procedió a la inoculación de plantas de frutilla contenidas en macetas (Figura 11). Para la preparación del inóculo se partió de cultivos puros sobre medio APG del antagonista y del patógeno. Los cultivos en placas de Petri fueron cubiertos con agua destilada estéril y desleídos con ayuda de una espátula esterilizada. La suspensión obtenida fue utilizada para regar las macetas (15 ml por maceta) según los siguientes tratamientos: i) *Fusarium*; ii) *Trichoderma*; iii) *Fusarium* + *Trichoderma*; y iv) Agua destilada estéril (testigo).



Figura 11. Plantas de frutilla utilizadas en las pruebas *in vivo*

Se realizaron cinco repeticiones (una maceta por repetición). Las plantas fueron observadas dos veces por semana, durante tres meses, para detectar la aparición de síntomas. Pasados los tres meses de iniciado el ensayo, se descalzaron las plantas. En el laboratorio se procedió al lavado de raíces y a la separación de la parte aérea y de las raíces de cada una de las plantas para su posterior pesado y determinación del peso fresco de raíces (Véase datos en Anexo). Por otra parte, se obtuvo una muestra de suelo contenida en cada maceta. A partir de cada muestra (100 gr) se obtuvo una submuestra de un gramo. Esta muestra fue suspendida en 9 ml de agua destilada estéril y una vez agitada se prepararon diluciones sucesivas hasta obtener la dilución 10^{-3} . Con esta última dilución se sembró un 1 ml en placas de Petri con medio APG. Las placas fueron incubadas durante 8 días a temperatura ambiente. Luego de la incubación se procedió a la identificación y recuento de las colonias

desarrolladas. La siembra de suelo antes detallada se realizó con el propósito de confirmar la presencia del antagonista y/o del patógeno (calidad del inóculo)

Se utilizó un diseño en bloques completamente aleatorizado y, con los datos obtenidos se realizó un ANOVA utilizando el programa Vassarstats.net

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados en función de los objetivos planteados:

3.1. Primer objetivo

- i) Aislar y caracterizar cepas de *Trichoderma* spp. Persoon a partir de filoplano, rizoplano y rizósfera de plantas de frutilla.

Se aislaron cuatro cepas de *Trichoderma* spp (Figura 12), dos procedentes de filoplano y dos procedentes de rizoplano de plantas de frutilla. La caracterización realizada en base a caracteres macroscópicos (cobertura miceliar, desarrollo de círculos concéntricos y/o penachos, color y forma de la colonia) y microscópicos (clamidosporas, aspecto de conidios y conidióforos) (Figura 13) mostraron que las cuatro cepas presentaban diferencia en uno o más caracteres



Figura 12. Cepas de *Trichoderma* spp. aisladas durante las pruebas.

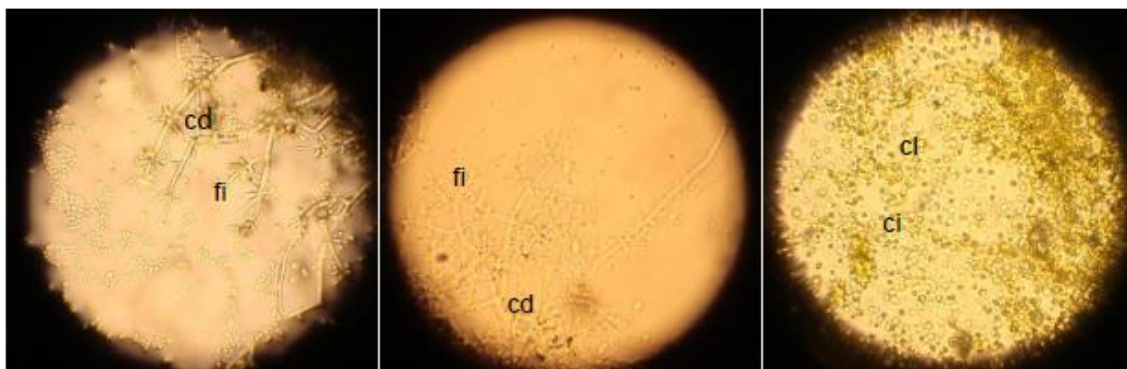


Figura 13. Estructuras de *Trichoderma* (40X) observadas: conidióforos (cd); fiálides (fi); conidios (ci); clamidosporas (cl).

Las dos cepas procedentes de filoplano se caracterizaron por una alta producción de clamidosporas intercalares y la formación de conidios agrupados en penachos; y se diferenciaron en la formación de anillos concéntricos y la pigmentación conidial: verde oscuro en una de la cepas y verde claro en la restante. Mientras que, las dos cepas procedentes de rizoplano no formaron anillos concéntricos, presentaron escasa pigmentación conidial y escaso desarrollo micelial. Las diferencias entre ambas cepas se debieron a la rápida formación de conidios y la morfología de los mismos: ovoides, de paredes lisas, dispuestos en roseta y rápida esporulación en una cepa y globosos con pared levemente reticulada en otra cepa.

A partir de estos datos se seleccionó la cepa procedente de rizoplano que mostró rápida formación de conidios ovoides dispuestos en roseta. La velocidad de formación de colonias y su agrupamiento en forma de penachos son características ampliamente citadas en la bibliografía como favorables en

el control biológico (Guedez *et al.*, 2009). En tal sentido, los conidios al germinar rápidamente y colonizar tanto estructuras del patógeno como del hospedante contribuyen al manejo de patógeno fungosos (Agamez *et al.*, 2008)

Además, la búsqueda de un tipo determinado de estructura fungica está orientada por el patógeno objeto de control biológico. Por ejemplo, en patógenos que causan enfermedades como el damping off (de pre y pos emergencia) las hifas de *Trichoderma* pueden competir de manera eficaz con otros microorganismos patógenos o saprófitos, en la colonización de las raicillas de las plántulas debido a que las esporas del antagonista se encuentran en forma quiescente, y por lo tanto inactivas frente al patógeno. Por otra parte, cuando el patógeno afecta raíces y otros órganos de plantas adultas, como es el caso de *Fusarium*, los conidios y clamidosporas pueden germinar y crecer sobre estos (Sandoval y Noelting, 2011). Los conidios son, además, los propágulos más viables (Agamez *et al.*, 2008). Adicionalmente, la cepa de *Trichoderma* seleccionada es nativa (también denominado autóctona o residente) del sistema productivo estudiado. Los aislamientos autóctonos “presentan un comportamiento que se adecua a las condiciones agroecológicas regionales” (Vallejo Ilijama, 2014).

3.2. Segundo objetivo

Evaluar *in vitro* e *in vivo* el efecto antagónico de cepas de *Trichoderma* spp sobre el crecimiento y esporulación de *Fusarium* spp.

3.2.1. Pruebas *in vitro*

Los resultados alcanzados en las pruebas de cultivo dual permitieron determinar que la cepa ensayada se ubica en la clase 2 de antagonismo, según

la escala de Bell *et al.* (1982) (citada en CET, 2014) (Tabla 1). Dado que *Trichoderma* creció sobre las dos terceras partes del medio de cultivo en la prueba dual (Figura 14); una condición requerida para la inclusión de cepas de *Trichoderma* en pruebas de antagonismo *in vivo* (Sandoval y Belesansky, 2020).

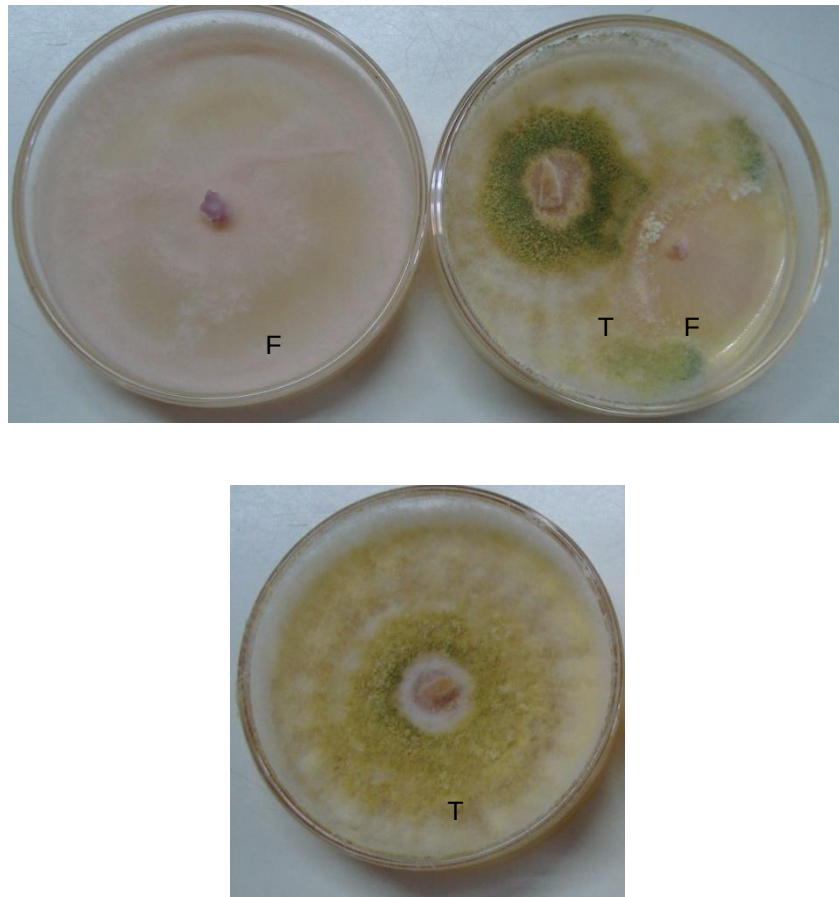


Figura 14. Cultivos individuales y duales de *Fusarium* (F) y *Trichoderma* (T). Fuente: Rafart (2019)

Las observaciones microscópicas realizadas, a partir de tomas de la zona de interacción entre las colonias del patógeno y del antagonista, mostraron la presencia de abundantes estructuras de *Trichoderma* (conidióforos y conidios) y escasa presencia de micelio y conidios de *Fusarium* (Figura 15). Se observó,

asimismo, adelgazamientos y constricciones en las hifas de *Fusarium* en los sitios donde el antagonista creció sobre las mismas (Figura 15), como resultado del micoparasitismo de *Trichoderma* sobre el patógeno (García-Espejo *et al.*, 2016).



Figura 15. Estructuras del antagonista y del patógeno, observadas en la zona de contacto de las colonias en cultivo dual (400x). Fuente: Rafart (2019).

En coincidencia con la clasificación de la cepa ensayada, según el crecimiento del antagonista en el cultivo dual, la medición del diámetro de colonias mostró la disminución del diámetro de colonias de *Fusarium* en cultivo dual en comparación con el diámetro observado en cultivo individual (testigo) (Figura 16).

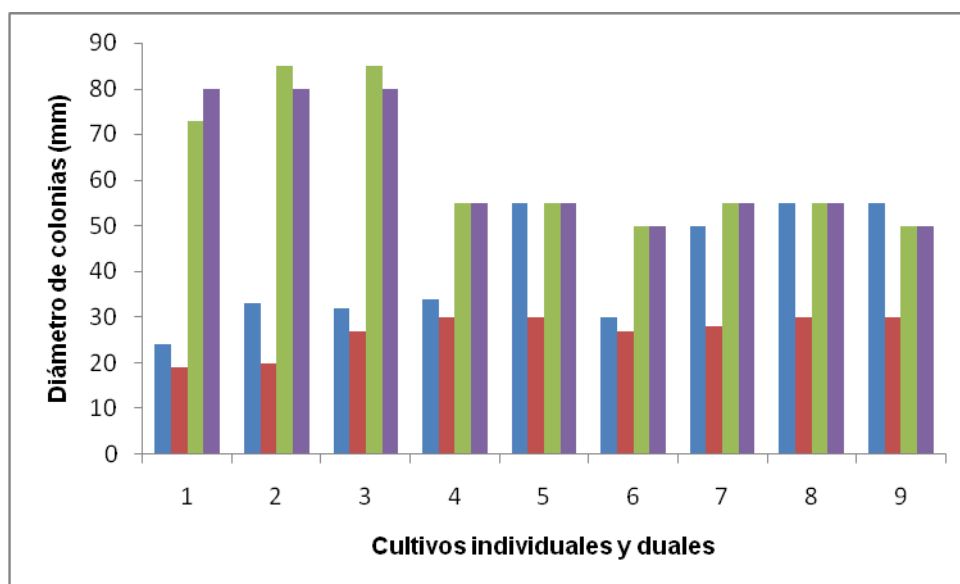


Figura 16. Diámetro de colonias de cultivos individuales (barra celeste) y duales (rojo) de *Fusarium*, e individuales (violeta) y duales (verde) de *Trichoderma*. Los datos corresponden a tres réplicas de las pruebas (cada una con tres repeticiones).

La disminución de colonias de *Fusarium* en cultivo dual se mantuvo durante los 8 días del ensayo. Las comparaciones realizadas, a partir de la medición de colonias realizadas con intervalos de 24 horas, mostraron lo siguiente: a las 24 horas de iniciado el ensayo la disminución del diámetro de colonias de *Fusarium* en cultivo dual no resultó estadísticamente significativa (Tabla 2). Mientras que si lo fue la disminución observada en cultivo dual a las 96 horas, ($p < 0.05$) en comparación con el diámetro observado en cultivo individual de *Fusarium*, esta disminución fue igual al 57% (Tabla 2).

Tabla 2. Valores correspondientes al diámetro de colonias (en mm) de *Fusarium* cultivadas en forma individual y cultivo dual con *Trichoderma* a las 24 y 96 h

Tratamiento	Promedio del diámetro de colonias (cm) +/- DS *
<i>Fusarium</i> individual (24 hs)	1,6 +/- 0,2646 a

<i>Fusarium</i> dual (24 hs)	1,433 +/- 0,0577 a
<i>Fusarium</i> individual (96 hs)	4,9 +/- 0,6557 b
<i>Fusarium</i> dual (96 hs)	2,8 +/- 0,1732 c

* Las letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).

También resultó significativa ($p < 0.05$) la disminución del diámetro de colonias de *Fusarium* a las 120 horas en cultivo dual en comparación con el diámetro observado en cultivo individual (Tabla 3), esta disminución fue igual al 55,9%.

Tabla 3. Valores correspondientes al diámetro de colonias (en mm) de *Fusarium* cultivadas en forma individual y cultivo dual con *Trichoderma* a las 96 y 120 h

Tratamiento	Promedio del diámetro de colonias (cm) +/- DS *
<i>Fusarium</i> individual (96 hs)	4,9 +/- 0,6557 a
<i>Fusarium</i> dual (96 hs)	2,8 +/- 0,1732 b
<i>Fusarium</i> individual (120 hs)	5,233 +/- 0,3786 a
<i>Fusarium</i> dual (120 hs)	2,93 +/- 0,115 b

* Las letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$).

Por consiguiente, la cepa de *Trichoderma* ensayada posee efecto antagónico sobre el crecimiento de las colonias del patógeno, este efecto comenzó a evidenciarse a partir de las 24 horas de iniciadas las pruebas y, si bien se observó crecimiento de las colonias de *Fusarium* en cultivo dual, éste fue de baja magnitud y no significativo estadísticamente, en comparación con el

registrado para el patógeno en cultivo individual. En el caso de las colonias de *Trichoderma*, la disminución del diámetro de sus colonias fue mínimo en el cultivo dual (Figura 17).

Los resultados mostrados permiten indicar que, además de micoparasitismo, la cepa de *Trichoderma* es efectiva en la competencia por espacio y nutrientes, como fuera indicado por Caballero *et al.* (2016): “el crecimiento del micelio de *Trichoderma* compite por espacio y nutrientes del medio de cultivo y provoca un efecto indirecto de reducción del crecimiento radial del patógeno, al ocupar su espacio y extraer los suministros de nutrientes”.

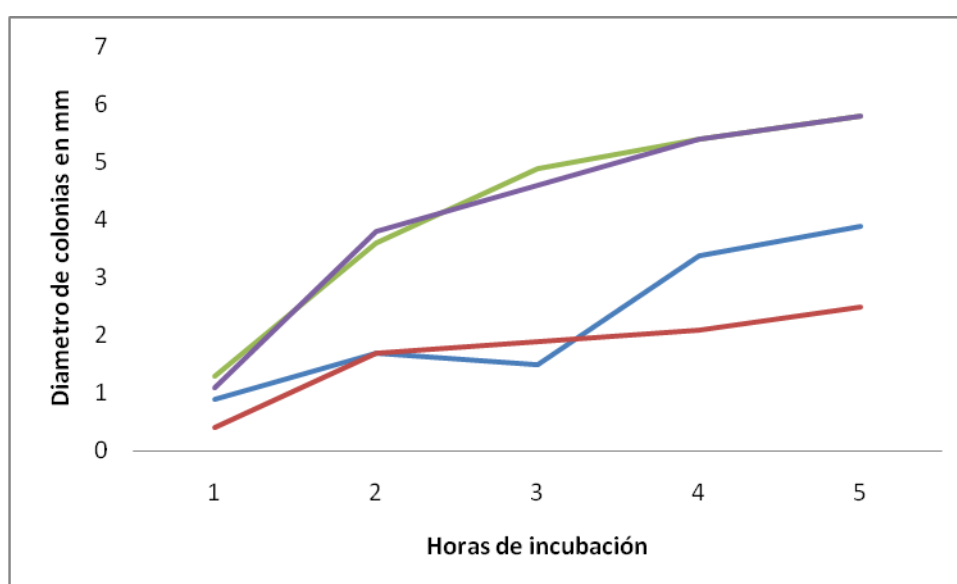


Figura 17. Valores promedio del diámetro de colonias, considerando las mediciones de las tres réplicas del ensayo, para *Fusarium* en cultivo individual y dual (líneas azul y roja, respectivamente) y para *Trichoderma* (en cultivo individual y dual (líneas verde y violeta, respectivamente), a las 24 hs.(1); 48hs. (2); 72 hs.(3); 96hs.(4); y 120hs (5).

3.2.2. Pruebas *in vivo*

El ensayo realizado en el invernáculo mostró lo siguiente: la presencia de síntomas en las plantas inoculadas con *Fusarium*, consistentes con una

marchitez progresiva, escaso vigor, hojas de menor tamaño y con un aumento de la necrosis desde la periferia hacia el centro de la lámina, pudrición en la corona y produciendo en consecuencia la una muerte gradual en las plantas (Figura 18 A). La sintomatología observada fue consistente con lo señalado por Agrios (2006): “El patógeno al ingresar a la raíz extiende su micelio por los vasos xilemáticos dificultando el desarrollo de la planta”. Por el contrario, en las plantas inoculadas con *Fusarium* + *Trichoderma* no se observaron síntomas de infección en las plantas (Figura 18 B), al igual que en plantas inoculadas con *Trichoderma* (Figura 18 C) y en el testigo (Figura 18 D). En las plantas inoculadas con *Trichoderma* se pudo observar mayor tamaño de la planta completa y de los folíolos en comparación con las plantas inoculadas y con el testigo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Valencia y Arbeláez (1999), quienes indicaron que el uso de antagonistas como *Trichoderma* spp. estimula el crecimiento y desarrollo de las plantas en comparación con tratamientos testigo; y, también con los resultados mostrados por Altomare *et al.* (1999) en cuanto que “*Trichoderma* spp. posee cualidades que le permiten ser un eficiente biocontrolador y además favorecer a las plantas tratadas por medio de la solubilización de nutrientes”. Del mismo modo, Harman *et al.*, (2004) reportaron que *Trichoderma* posee la capacidad de colonizar raíces de plantas por mecanismos similares a los de los hongos micorrizales y producir compuestos que estimulan el crecimiento como citoquininas, zeatinas y giberilinas (GA3), ya que está asociada con raíces y sus ecosistemas; así como favorecer mecanismos de defensa en plantas.



Figura 18. Pruebas de antagonismo *in vivo*: plantas inoculadas con *Fusarium* (A); con *Fusarium* + *Trichoderma* (B); con *Trichoderma* (C); y Testigo (D)

En relación a la estimulación del desarrollo de las raíces en las plantas inoculadas con *Trichoderma*, las mediciones realizadas (Véase Anexo II) mostraron que el mayor peso fresco de raíces correspondió a las plantas inoculadas con *Trichoderma*, seguido por el de las plantas inoculadas con *Trichoderma* + *Fusarium*, en comparación con las plantas inoculadas con el patógeno y las plantas testigo. Estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas (Figura 19). Tanto *Fusarium* como *Trichoderma* fueron recuperados en las muestras de suelo analizadas una vez finalizados los ensayos.

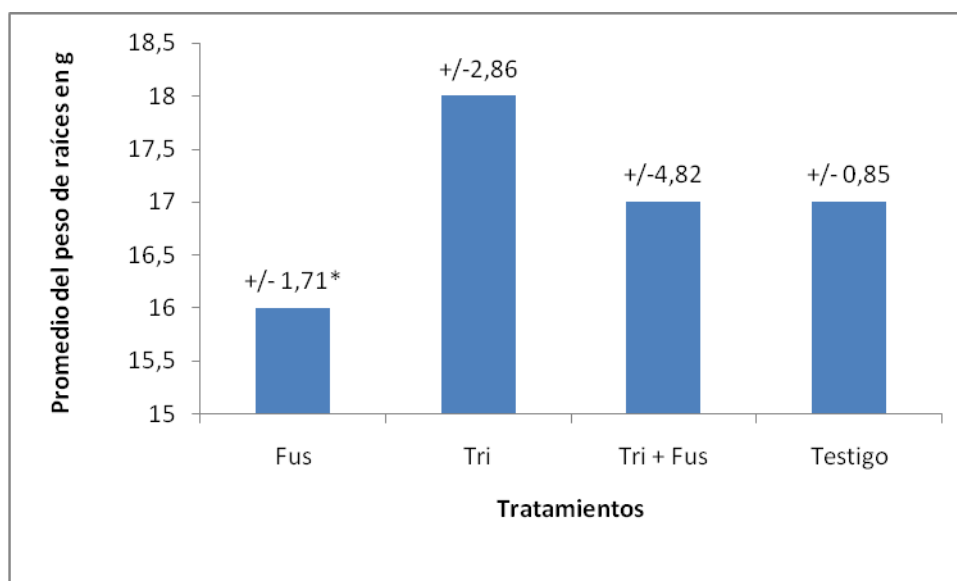


Figura 19. Valores promedio del peso de raíces de plantas tratadas con *Fusarium* en cultivo individual y dual $\pm$ Desvío estándar *

Si bien el incremento del peso de raíces fue moderado en las plantas inoculadas puede indicarse que el mismo se debió a *Trichoderma*. En tal sentido, Camargo Cepeda y Ávila (2012) reportaron que la aplicación de *Trichoderma* mejoró el peso fresco y seco de raíces de arveja; y Santana Baños *et al.* (2016) mostraron que la inoculación con *Trichoderma* incrementa la masa radical de plantas de tomate. Por consiguiente, la cepa ensayada mostró, además de capacidad antagónica contra el hongo *Fusarium*, efecto inductor del crecimiento de las plantas de frutilla inoculadas. Según Coromoto Alcedo y Reyes (2018), participa en la inducción del crecimiento de las plantas promovida por el desarrollo de raíces, y que combinado con mecanismos indirectos como la disolución de nutrientes minerales estarían incidiendo en plantas más robustas y resistentes al ataque de patógenos y a condiciones ambientales adversas. Estas asociaciones de raíz-hongo también estimulan los

mecanismos de defensa de la planta contra diferentes clases de patógenos, mediante mecanismos de resistencia sistémica.

3.2.3. Consideraciones finales

De acuerdo a los objetivos planteados en el presente trabajo, se determinó el efecto antagónico de *Trichoderma* spp sobre el crecimiento y capacidad infectiva *Fusarium* spp. Se estableció, asimismo, la persistencia en las pruebas *in vivo* del antagonismo observado *in vitro*.

Finalmente, se propone para futuras investigaciones sobre control biológico de patógenos fúngicos de suelo la complementación de los estudios con la realización de pruebas *in silico*. Pruebas que proponen una modelización matemática computacional que permite simular situaciones reales (Fina *et al.*, 2013), por ejemplo la modelación espacial y temporal del crecimiento de patógenos y biocontroladores, modificando los valores de las variables involucradas en un amplio rango de valores y contrastarlos con los valores reales. De esta manera, esta prueba, mostrarían una gama de comportamientos, entre ellos los más impredecibles, que suelen ser los que dan la variabilidad o “complican” a las pruebas *in vivo*.

Estos experimentos *in silico* son novedosos, porque incorporan computadoras y software de simulación como una nueva herramienta para ser utilizada en el campo de la fitopatología, en cada caso, estas nuevas herramientas deberán de ser ajustadas por expertos idóneos en la materia.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

La utilización de caracteres macroscópicos y microscópicos de *Trichoderma* spp. permitió la caracterización de los aislamientos del antagonista. Dicha caracterización guió la selección de una cepa de *Trichoderma* para las pruebas de efectividad *in vitro* e *in vivo*. La selección estuvo guiada por su carácter nativo en rizoplaneo de cultivo de frutilla y una rápida y abundante formación de conidios, ambos considerados caracteres favorables en la utilización de técnicas de control biológico.

En las pruebas *in vitro* (cultivo dual), la cepa de *Trichoderma* mostró un nivel adecuado de antagonismo sobre el crecimiento y desarrollo del patógeno (*Fusarium*), evidenciando el antagonista micoparasitismo y competencia por espacio. El diámetro de colonias de *Fusarium* en cultivo dual fue menor en comparación con el diámetro observado en el cultivo individual. Las diferencias en el diámetro de colonias fueron estadísticamente significativas a partir de las 96 horas de iniciada la prueba. Por consiguiente, la competencia por espacio, favorable a *Trichoderma*, se evidenció a partir del 4to. día de incubación.

En las pruebas *in vivo* (inoculación de plantas de frutilla con el patógeno), la utilización de la cepa de *Trichoderma* impidió la infección de las plantas por *Fusarium*, dado que no se observaron síntomas en las plantas inoculadas con

Fusarium + *Trichoderma* en comparación con las plantas inoculadas solamente con el patógeno que mostraron síntomas atribuibles al patógeno y finalmente murieron.

Finalmente, en relación a la hipótesis planteada:

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. obtenidos a partir de suelo, rizósfera y tejidos vegetales rizoplano de plantas de frutilla (*Fragaria* x *ananassa* Duchesne) pueden actuar como agentes de biocontrol frente al patógeno *Fusarium* spp

La hipótesis fue contrastada de manera positiva. Dado que la cepa nativa de *Trichoderma*, procedente de rizoplano de cultivo de frutilla, mostró efecto antagónico del crecimiento y desarrollo del patógeno tanto en *in vitro* como *in vivo*. Esto es, los resultados alcanzados *in vitro* se mantuvieron en condiciones *in vivo*.

V. Bibliografía

Agamez Ramos EY, Zapata Navarro RI, Oviedo Zumaqué LE, Vbarrera Violeth JE. 2008. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp.. Rev. Colomb. de Biotecnol. X (2): 23-34.

Agrios GN. 2005. Plant Pathology, 5th. Ed. San Diego: Academic Press.

Altomare C, Norvell WA, Bjorkman T, Harman G. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai. Applied Environmental Microbiology. 5:2926-2933.

Argumedo-Delira R, Alarcón A, Ferrera Cerratto R, Peña Cabriaes J. 2009. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. Revista Internacional de Contaminación Ambiental 25(4): 257-269.

Bell DK, Wells HD, Markham CR. 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal pathogens. Phytopathology 72, 396-400

Benito EP, Arranz M, Eslava AP. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. Revista Iberoamericana de Micología. 17: S43-S46

Caballero WA, Senés PJ, Toumanián AG. 2016. Evaluación de la capacidad biocontroladora de *Trichoderma atroviride* en el cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.). Universidad Nacional de Córdoba. Recuperado de:

<https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/4847/Caballero%20-%20Sen%C3%A9s%20-%20Toumani%C3%A1n%20-%20Evaluaci%C3%B3n%20de%20la%20capacidad%20biocontroladora%20de%20Trichoderma....pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Camargo Cepeda DF, Ávila ER. 2012. Efectos de *Trichoderma* sp sobre el crecimiento y desarrollo de la arveja. Ciencia y Agricultura 11(1): 91-100.

Caminiti CA. 2015. Cultivo de frutillas en la provincia de Neuquén. Buenos Aires: Ediciones INTA.

Cano MA. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp, y *Pseudomonas* spp. Una revisión. Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica 14(2): 15-31.

Cao SZ, Hu Y, Zheng S, Yang Z, Lu B. 2011. Effect of BTH on antioxidant enzymes, radical-scavenging activity and decay in strawberry fruit. Food Chem. 125, 145-149.

Casado del Castillo, V. 2017. Las funciones de FTF2 en *Fusarium oxysporum*. Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, España. 282 p.

CET. 2004. Manual producción y utilización de *Trichoderma* spp. Santiago: Centro de Educación y Tecnología.

Charoenrak P, Chamswarng. C. 2016. Efficacies of wettable pellet and fresh culture of *Trichoderma asperellum* biocontrol products in growth promoting and reducing dirty panicles of rice. *Agriculture and Natural Resources* 50:243-249.

Chet, I. 1987. *Trichoderma* application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. Pp. 137–160 in Chet I. (ed.), *Innovative Approaches to Plant Disease Control*. New York: John Wiley.

Coromoto Alcedo Y, Reyes I. 2018. Microorganismos promotores de crecimiento en el biocontrol de *Alternaria alternata* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) *Bioagro* 30(1): 59-66.

Cumagun CJR. 2014. Advances in formulation of *Trichoderma* for biocontrol. p. 527-532. En Gupta VK, Schmoll M, HerreraEstrella A, Upadhyay RS, Druzhinina I, Tuohy M.(eds.) *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Amsterdam, Netherlands

DeBach P. 1977. *Lucha biológica contra los enemigos de las plantas*. Ed. Madrid: Ed. Mundi-Prensa, 399 p

DeBach P, Rosen D .1991. *Biological control by natural enemies*, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press

Díaz J. 1994. Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* y su posible uso como biocontrol. Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria de La Habana.

Di Pietro A, Lorito M, Hayes CK, Broadway R M, Harman GE. 1993. Endochitinase from *Gliocladium virens*: Isolation, characterization and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopathology* 83: 308-313.

Desjardins AE. 2003. *Giberella* from A(venaceae) to Z(eae). *Annu. Rev. Phytopathol.* 47:177-198.

Fina BL, Lombarte M, Rigalli A. 2013. Investigación de un fenómeno natural: ¿Estudios in vivo, in vitro o in silico?. *Actual. Osteol.* 9(3): 239-240.

García-Espejo CN, Mamani-Mamani MM, Chávez Lizarraga GA, Álvarez-Aliaga MT. 2016. Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador. *J. Selva Andina Res.* 7(1): 20-32.

González I, Arias Y, Peteira B. 2012. Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-TOMATE. *Revista de Protección Vegetal*, 27(1), 1-7.

Goswami RS, Kistler HC. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol Plant Pathol.* 5: 515–525.

Guédez C, Cañizalez L, Castillo C, Olivar R. 2012. "Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate". Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología vol.32 no.1

Guédez C, Castillo C, Cañizales L, Olivar R. 2008. "Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible" Academia. 13:50-74

Haran S, Schickler H, Openheim A, Chet I. 1999. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinase during mycoparasitism. Phytopathology 86: 980-985.

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

Helyer N, Cattlin ND, Brown KC. 2014. Biological Control in Plant Protection: A Colour Handbook. EE.UU.: CRC Press.

Hjeljord L, Tronsmo A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman GE Kubice CP. (Eds). Volumen 2. p.131-151. Taylor & Francis: USA.

Hurnby, Y. (ed.) 1990. Biological control of soil-borne plant pathogens. Wallingford. CAB International

Infante D, Martínez B, González N, Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Revista de Protección Vegetal, 24(1), 14-21.

Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002&lng=es&tlng=es

Koike S, Bolda M. 2013 "Marchitez de *Fusarium* en fresa: un segundo patógeno del suelo en California".

Recuperado de:

<https://ucanr.edu/blogs/blogcore/postdetail.cfm?postnum=11131>

Kumar S, Thakur M, Rani A. 2014. *Trichoderma*: Mass production, formulation, quality control, delivery its scope in commercialization in India for the management of plant diseases. African Journal of Agricultural Research 9(53): 3838-3852. Recuperado de:

https://academicjournals.org/article/article1422553138_Kumar%20et%20al.pdf

Leslie JF, Summerell BA. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Iowa: Blacwell. 388 p.

Lorenzo N. 2001. Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de las cepas nativas

de *Trichoderma* spp. Tesis en opción al título de Master en Protección Vegetal Universidad Agraria de La Habana.

Lorito M, Woo SL, D'Ambrosio M, Harman GE, Hayes CK, Kubicek CP, Scala F. 1996. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Molecular Plant Microbe Interaction* 9: 206–213.

Lovato Echeverría AD. 2009. Aislamiento de *Trichoderma* spp posibles antagonistas de *Botrytis cinerea*, agente causal de la podredumbre gris de la frutilla. Tesina para optar por el título de Ingeniero Agrónomo, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste. 18 pp

Ma L, Cornelissen BJC, Takken FLW. 2013. A nuclear localization for Avr2 from *Fusarium oxysporum* is required to activate the tomato resistance protein I-2. *Front. Plant Sci.* 4.

Marcello CM, Steindorff AS, Silva SP, Silva RN, Bataus LAM, Ulhoa CJ. 2010. Expression analysis of the exo- β -1,3- glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiological Research* 165:75-81.

Martinengo de Mitidieri IZ. 1998. Trece años de estudio sobre control biológico de hongos patógenos del suelo con *Trichoderma* spp. Resúmenes 1er. Congreso Argentino de Control Biológico de Enfermedades de las Plantas. P17

Martínez B, Infante D, Reyes Y. 2013. “*Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos”. *Rev. Protección Veg.* 28(1):1-11

Melgarejo P, Sagasta E. 1989. Influence of *Penicillium frequentans* and two of its antibiotics on production of stromata by *Monilinia laxa* in culture. *Can. J. Bot.* 67:83-87

Merriman PR. 1976. Survival of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Soil Biol. Biochem.* 8:385-389.

Morales Cg. (editora). 2017. Manual de Manejo Agronómico de la Frutilla. Boletín INIA N° 17. Santiago: INIA-INDAP.

Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. 2006. Preservation of microorganisms by drying: a review. *Journal of Microbiological Methods* 66:183-193.

Papavizas GC. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol* 23: 23-54

Pedraza-Reyes M, López-Romero E. 1989. Purification and some properties of two forms of chitinase from mycelial cells of *Mucor rouxii*. *Journal of General Microbiology.* 135: 211- 218.

Pedraza RO, Motok J, Salazar SM, Ragout A, Mentel MI, Tortora ML, Guerrero-Molina ML, Wini BC, Díaz-Ricci JC. 2010. Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26(2), 265-272

Pérez AA, Muñoz JO, Zumelzu G, Blengini MC, Arregui GO. 2013. Utilización de *Trichoderma* spp. Como Agente Biocontrolador de Enfermedades Fúngicas y Promotor de Crecimiento Vegetal. *Nexo Agropecuario de la Facultad de Ciencias Agropecuarias* 1(1): 234-6-9147.

Pritts M. 2002. Growing strawberries, healthy communities, strong economies and clean environments: what is the role of the researcher? *Acta Hort.* 567: 411-417.

Ramos EYA, Navarro RIZ, Zumaqué LEO, Violeth JLB. 2008. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología* X (2):23-34

Rifai MA. 1969. A revisión of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116: 1-56

Romero-Cortes T, López-Pérez PA, Ramírez-Lepe M, y Cuervo-Parra JA. 2016. Modelado cinético del micoparasitismo por *Trichoderma harzianum* contra *Cladosporium cladosporioides* aislado de frutos de cacao (*Theobroma cacao*). *Chilean Journal of Agricultural and Animal Science, ex Agro-Ciencia* 31(3):32-45

Rubio MB, Cardoza RE, Hermosa R, Gutiérrez S, Monte E. 2008. Cloning and characterization of the *Thcut1* gene encoding a cutinase of *Trichoderma harzianum* T34. *Current Genetics* 54: 301-312.

Salazar-Badillo FB, Sánchez-Rangel D, Becerra-Flora A, López-Gómez M, Nieto-Jacobo F, Mendoza-Mendoza A, et al. 2015. *Arabidopsis thaliana* polyamine content is modified by the interaction with different *Trichoderma* species. *Plant Physiol. Biochem.* 95: 49–56.

Samaniego Fernández LM, Harouna M, Corbea O, Rondón Castillo J, Placeres Espinosa I. 2018. Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. antagonistas de patógenos de suelo. *Revista de Protección Vegetal* 33(3): 1-11

Samuels GJ 2006. *Trichoderma*. Sytematics, the sexual stage, and ecology. *Phytopathology* 96: 195-206.

Sandle T. 2014. *Trichoderma*. p. 644-646. En Batt CA, Tortorello ML (eds.) *Encyclopedia of Food Microbiology*, London.

Sandoval MC, Noelting MC. 2011. Producción de conidios de *Trichoderma* Peerson en dos medios de multiplicación. *Fitosanidad* 15(4): 215-221.

Sandoval MC, Belesansky C. 2020. Producción artesanal del hongo antagónico *Trichoderma* Persoon en sustrato sólido. *Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental. Facultad de Ciencias Agrarias. UNLZ.* Vol. 7 (3): 55-64

Santana Baños Y, del Busto Concepción A, González Fuentes Y, Aguiar González I, Carrodegua Díaz S, Páez Fernández PL, Díaz Lugo G. 2016. Efecto de *Trichoderma harzianum* Rifai y FitoMas-E como bioestimulante de la germinación y crecimiento de plántulas de tomate. *Centro Agrícola* 43(3): 5-12.

Seifert KA, Levesque CA. 2004. In phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi. In molecular diversity and PCR-detection of toxigenic *Fusarium* species and ochratoxigenic fungi. Springer: 449–471

Sharma V, Salwan R, Sharma N, Kanwar SS. 2017. Elucidation of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against different plant fungal pathogens: Universal yet host specific response. *International Journal of Biological Macromolecules* 95: 72-79

Sivan A, Chet I. 1986. Possible mechanism for biological control of *Fusarium* spp. by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb. Technol.* 12:180.

Sobero y Rojo MP, Lagrecca F, Gasoni L. 2006. Uso de agentes biológicos y su efecto como promotor de crecimiento vegetativo en frutilla bajo condiciones de invernáculo. *Actas XXIX Congreso Argentino de Horticultura*. Catamarca. Pág. 75

Stefanova M, Leiva A, Coronado F, Larrinaga L. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 16:509-516.

Torres-De la Cruz M, Ortiz-García CF, Bautista-Muñoz C, Ramírez-Pool JA, Ávalos-Contreras N, Cappello-García S, et al. 2015. Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 86:947-961.

Ulloa CJ. 1996. Enzimas micolíticas produzidas pelo agente de biocontrole *Trichoderma harzianum*. En: *Actas del V de Simposio de controle biológico. Anais: Conferencias y Palestras. Foz de Iguaçu-Parana-Brasil*. 234-238.

Valencia J, Arbeláez G. 1999. Control biológico de la pudrición basal del tallo en crisantemo (*Dendranthema grandiflorum*) ocasionada por *Sclerotinia sclerotiorum* con algunos aislamientos de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. *Agronomía Colombiana* 16: 144.

Vallejo Ilijama MT. 2014. Caracterización y clasificación de *Trichodermas* nativos aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio artesanal. Tesis de Maestría, Universidad Técnica de Ambato

Van Den Bosh R, Messenger PS, Gutierrez AP. 1982. An introduction to biological control. New York: Plenum Press, 247 pp

Vargas-Hoyos HA, Gilchrist-Ramelli E. 2015. Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre dos cepas de *Fusarium* aisladas de cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). *Rev. Mex. Mic.* 42: 9-16

Vestberg A, Kukkonen S, Saari K, Parikka P, Huttunen J, Tainio L, Devos D, Weekers F, Kevers C, Thonart P, Lemoine MC, Cordier C, Alabouvette C, Gianinazzi S. 2004. Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. *Applied Soil Ecology* 27(3): 243-258.

Villegas MA. 2008. *Trichoderma* Pers. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. Orius Biotecnología. Recuperado de: <http://www.oriusbiotecnologia.com/site/index.php?id=20,66,0,0,1,0>.

Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Barbetti MJ, Li H, et al. 2008. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72:80-86.

Zeilinger S, Gruber S, Bansal R, Mukherjee PJ. 2016. Secondary metabolism in - chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews* 30(2):74-90

Zimand G, Elad Y, Chet I. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathol.* 86:125-126.

ANEXOS

Anexo I

Diámetro de colonias en cultivo dual correspondientes a la primera réplica del ensayo (31/4/2019)

	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	Ancho Max (mm)		Ancho Max		Ancho Max	
T1	14	5i	30		50	
T2	18	9i	35		49	
T3	12	7i	33		47	
F1		6(i)		10		12
F2		5(i)		7		11
F3		7(i)		13		14
	T	F	T	F	T	F
T+F1	9	7(i)	32	10	46	11
T+F2	15	7(i)	27	9	40	10
T+F3	14	5	29	10	43	15

Dia 4		Dia 5		Dia 6		Dia 7	
Ancho Max		Ancho Max		Ancho Max		Ancho Max	
65		77		80		comp	
65		80		80		80	comp
60		74		80		comp	
	16		19		22		24
	12*		16		19		23
	22		25		30		32
T	F	T	F	T	F	T	F
60	13	65	15	70	17	73	19
55	13	70	13/21	77	14	85	20
57	20	72	23	83	25	85(max)	27

Diámetro de colonias en cultivo dual correspondientes a la segunda réplica del ensayo (28/11/2019).

Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4	
Ancho Max		Ancho Max		Ancho Max		Ancho Max	

	(mm)							
T1	2,6	5,5i	4,8		5,5		5,5	
±T2	3	5,5i	4,5		5,5		5,5	
T3	2,5	5i	4,5		5		5	
F1	2	6i	2,5		3		3	
F2	2,5	6i	4		4,8		5,5	
F3	1,4	5i	2		3		3	
	T	F	T	F	T	F	T	F
T+F1	2	1	5	2	5,5	3	5,5	3
T+F2	2,7	1	5	2	5,5	2,6	5,5	3
T+F3	2,4	1	4	2	5	2,5	5	2,5
Dia 5		Dia 6		Dia 7				
Ancho Max		Ancho Max		Ancho Max				
5,5								
5,5								
5								
3,4								
5,5								
3								
T	F	T	F	T	F			
5,5	3							
5,5	3							
5	2,7							

Diámetro de colonias en cultivo dual correspondientes a la tercera réplica del ensayo (10/12/2019).

	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4
	cm		Ancho Max		Ancho Max		Ancho Max
T1	1	5,5i	3,4		4,5		5,5
T2	0,8	5,5i	3,3		4,5		5,5
T3	0,9	5i	2,3		3,5		5
F1	1	5i	1,9		3		4,2
F2	0,7	5,5i	1,5		2,1		5,5
F3	0,7	5,5i	1,4		2		5
	T	F	T	F	T	F	T
T+F1 (5,5)	1,6	0,7	3,7	1,5	4,8	2,1	5,5
T+F2 (5,5)	1,1	0,7	3	1,4	4	2,3	5,5
T+F3 (5)	1	0,7	3	1,4	4	2,2	5

	Dia 5	Dia 6	Dia 7
--	-------	-------	-------

	Ancho Max		Ancho Max		Ancho Max	
	5,5		5,5		5,5	
	5,5		5,5		5,5	
	5		5		5	
	4,5		4,8		5	
3,5	5,5		5,5		5,5	
3,4	5,1		5,4		5,5	
F	T	F	T	F	T	F
2,6	5,5	2,8	5,5	2,8	5,5	2,8
2,9	5,5	3	5,5	3	5,5	3
2,9	5	3	5	3	5	3

Anexo II

Peso de raíces

TRATAMIENTOS	CANTIDAD	PESO (gr)
Testigo	PLANTA1	16,673
	PLANTA2	16,802
	PLANTA3	18,493
	PLANTA4	16,737
	PLANTA5	16,303
Trichoderma	PLANTA1	16,348
	PLANTA2	19,734
	PLANTA3	21,182
	PLANTA4	14,599
	PLANTA5	20,555
Trichoderma + Fusarium	PLANTA1	25,515
	PLANTA2	13,412
	PLANTA3	18,432
	PLANTA4	15,52
	PLANTA5	14,764
Fusarium	PLANTA1	16,567
	PLANTA2	17,694
	PLANTA3	14,418
	PLANTA4	18,46
	PLANTA5	15,006

±