



**UNCUYO**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE CUYO

**TESIS DE DOCTORADO**

**TÍTULO: Biocontrol de *Phytophthora* spp. con aislados regionales de *Trichoderma* spp. del Alto Valle de Río Negro en plantaciones de pera comercial**

**TESISTA: Ing. Agr. (Mg. Sc.) Sanchez Aixa**

**DIRECTORA: Dra. Sosa M. Cristina**

**CO-DIRECTORA: Dra. Lucero G. Susana**

**Lujan de Cuyo, Mendoza. 2018**



**UNCUYO**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE CUYO

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**TESIS DE DOCTORADO**

**TÍTULO: Biocontrol de *Phytophthora* spp. con aislados regionales de *Trichoderma* spp. del Alto Valle de Río Negro en plantaciones de pera comercial**

**DOCTORADO EN AGRONOMÍA**

**TESISTA: Ing. Agr. (Mg. Sc.) Sanchez Aixa**

**DIRECTORA: Dra. Sosa M. Cristina**

**CO-DIRECTORA: Dra. Lucero G. Susana**

**Lujan de Cuyo, Mendoza. 2018**

## RESUMEN

El Alto Valle de Río Negro es la principal región productiva de perales en Argentina con 22.728 hectáreas cultivadas, de las cuales el 46% es ocupado por el cultivar William's. La podredumbre de cuello, corona y/o raíces en pomáceas, causada por *Phytophthora cactorum* es una de las enfermedades más importantes y ampliamente distribuida en el mundo, que causa pérdidas económicas significativas y culmina generalmente con la muerte del árbol. En esta región, no hay estudios a campo sobre la diversidad de especies de *Phytophthora* presentes en los cultivos y potencialmente patógenas de peral. Las principales formas de manejo de esta enfermedad incluyen el control químico con metalaxyl, clasificado como de alto riesgo en la inducción de resistencia en patógenos. El objetivo de esta tesis fue estudiar la ocurrencia y patogenicidad de diversas especies de *Phytophthora* asociadas al cultivo de peral y su control biológico con aislados de *Trichoderma* regionales, en plantaciones comerciales de cv. William's de la zona del Alto Valle de Río Negro. Para ello se realizaron muestreos en otoño y primavera, seleccionando plantas con síntomas y el suelo circundante. El aislamiento de *Phytophthora* sp. se realizó desde madera en CMA-PARP y desde el suelo mediante cebos. Para aislar a *Trichoderma* sp. se seleccionaron plantas sanas en cercanías de plantas con podredumbre del cuello, y para su aislamiento se utilizó medio selectivo rosa de bengala. Todos los aislados de *Phytophthora* spp. fueron caracterizados por patogenicidad en frutos de pera y en brotes de dos cultivares susceptibles. Aislados representativos se identificaron por morfología y molecularmente como *P. cactorum*, *P. inundata*, *P. lacustris*, *P. rosacearum* y *P. thermophila*. Se seleccionaron por agresividad y frecuencia a 4 aislados de especies de *Phytophthora* que fueron evaluados en raíces de pie franco de peral. Las mismas causaron podredumbre en las raíces principales y secundarias. Se calculó la pérdida de raíces alcanzando un 98 % en el índice McKinney para *P. cactorum*. Del total de 78 aislados regionales de *Trichoderma*, 18 se identificaron molecularmente y seleccionaron por sus características antagónicas frente a 4 especies de *Phytophthora*. De ellos, 3 con mejores características antagónicas se evaluaron en un bioensayo frente a *P. cactorum* en plantas jóvenes de peral. Los aislados *T. harzianum* (T1330) y *T. guizhouense* (T1367) fueron capaces de reducir tanto preventiva como curativamente la podredumbre de cuello en peral, logrando hasta el 97 % de biocontrol.

## ABSTRACT

The Alto Valle of Río Negro is the region with the major productive tradition of pear trees in Argentina with 22,728 cultivated hectares, 46% of this area is cultivated with Williams cultivar. Roots, crown and collar rot of pomaceous is mostly caused by *Phytophthora cactorum*. This disease is one of the major, widely distributed, and cause high economic losses and it usually ends with the death of the tree. In Alto Valle region there are no field studies on the diversity of *Phytophthora* species present in crops and potentially pathogenic of pear. This disease is mostly controlled by use of Metalaxyl, fungicide classified as high risk in the induction of resistance in pathogens. The main objective of this thesis was to study the occurrence and pathogenicity of *Phytophthora* species associated to pear and his biological control with regional isolates of *Trichoderma* sp., in William's commercial orchards of Alto Valle of Río Negro. The orchards selected were surveyed during spring and autumn. Periderm tissues, soil and root samples were collected from trees showing early symptoms. Isolation of *Phytophthora* sp. from periderm was performed in CMA-PARP, while baits were used for soil and root samples. For *Trichoderma* isolation healthy plants were selected in the nearness of plants with collar rot, and for their isolation rose bengal selective medium was used. All the isolates of *Phytophthora* spp. were characterized by pathogenicity in pear fruits and in shoots of two susceptible cultivars. *Phytophthora* representative isolates was morphologically and molecularly identified as *P. cactorum*, *P. inundata*, *P. lacustris*, *P. rosacearum* and *P. thermophila*. Four isolates of *Phytophthora* species were selected for aggressiveness and frequency and evaluated in pear rootstock. This species caused rot in the main and secondary roots. The loss of roots was calculated reaching 98% in the McKinney index for *P. cactorum*. Of 78 *Trichoderma* regional isolates, 18 were molecularly identified and selected for their antagonism against 4 species of *Phytophthora*. Three isolates of *Trichoderma* with better antagonistic characteristics were evaluated in a bioassay against *P. cactorum* in young pear plants. The isolates *T. harzianum* (T1330) and *T. guizhouense* (T1367) were able to reduce both preventively and curatively pear collar rot, achieving up to 97% biocontrol.

## **DEDICATORIA**

*A mi mamá*

*Compañera fiel en cada uno de mis pasos.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora Dra. María Cristina Sosa, quien me brindó todo lo necesario para realizar esta tesis, además de su guía, acompañamiento, consejo y sabiduría en todo momento, aún en los más difíciles.

A mi codirectora, Dra. Gabriela Susana Lucero, quien con su consejo aún a la distancia me supo guiar y acompañar.

A mis asesoras de tesis, Dra. Laura Vélez y Dra. Viviana Barrera, especialistas en su área y aun así siempre supieron brindarme un espacio para evacuar mis dudas.

A mi compañera de laboratorio, Dra. María Cecilia Lutz, siempre acompañando con ayuda y experiencia en el laboratorio.

A Julia Ousset, que con su ayuda todo procedimiento molecular parece fácil.

A la Ing. Nazarena Spera, Mg. Laura Vita y Mg. Graciela Colavita, las chicas de Fisiología Vegetal, siempre dispuestas a ayudar o acompañar con algún mate.

A la cátedra de Bioestadística de la FACA, especialmente Mg. Gustavo Giménez y PhD. Pablo Reeb, quienes supieron entenderme en el último tramo de la tesis y escritura y colaboraron evacuando dudas en su área.

A los alumnos Lucas Vera, Gaston Carreño, Marianela Riera, Catherine Davies y Carla Basso, quienes colaboraron en algunos de los ensayos o simplemente me escucharon en alguna de mis catarsis en el laboratorio.

Al personal de laboratorio de docencia, Marito, Lucy y Nancy, quienes me guiaron en la realización de algunas de las soluciones evaluadas en esta tesis.

Al personal de chacra, especialmente Fernando Aredondo, quienes supieron ayudarme en la realización de los ensayos en chacra.

Y fundamentalmente, a mi pilar en esta vida y que sin ellos no hubiera nunca podido llegar a este punto, mi amada y fiel familia.

# ÍNDICE GENERAL

<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	15
<b>1. El Alto Valle de Río Negro</b> .....	16
<b>1.1. Características generales</b> .....	16
<b>1.2. Aspectos históricos y productivos de la actividad frutícola</b> .....	17
<b>2. El peral (<i>Pyrus communis</i> L.)</b> .....	18
<b>2.1. Clasificación botánica y características morfológicas</b> .....	18
<b>2.2. Producción de peras y superficie cultivada</b> .....	19
<b>2.3. Comercialización de peras</b> .....	19
<b>2.4. Peral cultivar William's</b> .....	20
<b>2.5. Enfermedades que afectan al cultivo</b> .....	20
<b>2.5.1. Virosis</b> .....	21
<b>2.5.2. Enfermedades bacterianas</b> .....	21
<b>2.3.2.1. Tizón de las flores del peral.</b> .....	21
<b>2.3.2.2. Agalla de corona</b> .....	21
<b>2.5.3. Enfermedades fúngicas</b> .....	22
<b>2.5.3.1. Sarna del peral</b> .....	22
<b>2.5.3.2. Oídio del peral</b> .....	22
<b>2.5.3.3. Podredumbres radicales y del cuello</b> .....	22
<b>3. La situación de la podredumbre de cuello por <i>P. cactorum</i> en perales del Alto Valle</b> ....	23
<b>3.1. Decaimiento del peral</b> .....	24
<b>3.2. El género <i>Phytophthora</i> en frutales</b> .....	25
<b>3.2.1. Antecedentes de <i>P. cactorum</i> en Argentina</b> .....	26
<b>3.2.2. Ubicación taxonómica de <i>P. cactorum</i></b> .....	26
<b>3.2.3. Hospedantes</b> .....	27
<b>3.2.4. Epidemiología de <i>P. cactorum</i> en perales</b> .....	28
<b>4. Manejo de la enfermedad</b> .....	29
<b>4.1. Manejo químico</b> .....	29
<b>4.2. Control biológico</b> .....	29
<b>5. El género <i>Trichoderma</i></b> .....	30
<b>6. Hipotesis general</b> .....	31
<b>ESQUEMA GENERAL</b> .....	33
<b>CAPÍTULO II. Aislamiento, identificación y caracterización por virulencia de <i>Phytophthora</i> spp.</b> .....	34

INTRODUCCIÓN .....	35
Objetivo general del capítulo.....	39
Objetivos específicos .....	39
ESQUEMA GENERAL .....	40
MATERIALES Y METODOS.....	41
1. Aislamiento del patógeno .....	41
1.1. Área de estudio .....	41
1.2. Estrategia de aislamiento .....	42
2. Identificación a nivel especie .....	44
2.1. Caracterización morfológica.....	44
2.2. Identificación molecular de los aislamientos de <i>Phytophthora sp.</i> .....	45
2.2.1. Extracción de ADN .....	45
2.2.2. Cuantificación .....	45
2.2.3. Amplificación .....	46
3. Caracterización de la patogenicidad de los aislados de <i>Phytophthora spp.</i> .....	47
3.1. Experimentos -Primer etapa- .....	47
3.1.1. Patogenicidad en brotes .....	47
3.1.2 Patogenicidad en fruto.....	48
3.2. Experimento -Segunda etapa-.....	49
3.2.1 Patogenicidad en pie franco de peral .....	49
RESULTADOS.....	52
1. Aislamiento del patógeno .....	52
2. Identificación a nivel especie .....	55
2.1 Caracterización e Identificación morfológica .....	55
2.2 Identificación molecular.....	56
2.3. Descripción de especies identificadas de <i>Phytophthora spp.</i> .....	59
2.3.1. <i>Phytophthora cactorum</i> .....	59
2.3.2. <i>Phytophthora lacustris</i> .....	59
2.3.3. <i>Phytophthora inundata</i> .....	60
2.3.4. <i>Phytophthora rosacearum</i> .....	61
2.3.5. <i>Phytophthora thermophila</i> .....	61
2.4. Descripción morfológica de otras especies de Oomycetes identificadas molecularmente .....	62
2.4.1. <i>Phytophthium mercuriale</i> .....	62
3. Caracterización de la patogenicidad de los aislados de <i>Phytophthora sp.</i> .....	63
3.1. Patogenicidad en brotes de peral .....	63

3.2. Patogenicidad en fruta de pera.....	64
3.3. Patogenicidad en pie franco de peral .....	65
DISCUSIÓN .....	68
CONCLUSIONES PARCIALES .....	72
CAPÍTULO III. Aislamiento, selección e identificación de <i>Trichoderma</i> spp. ....	74
INTRODUCCIÓN .....	75
Objetivo general del capítulo.....	76
Objetivos específicos .....	77
ESQUEMA GENERAL .....	78
MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
1. Aislamiento de hongos del género <i>Trichoderma</i> spp.....	79
1.1. Área de estudio .....	79
1.2 Estrategia de aislamiento.....	79
2. Estudios de la capacidad antagónica contra especies de <i>Phytophthora</i> .....	80
ESTRATEGIA DE SELECCIÓN .....	80
2.1. Primera etapa .....	81
2.1.1. Efecto antagónico <i>in vitro</i> .....	81
2.1.2. Evaluación del micoparasitismo .....	82
2.1.2.1. Micoparasitismo del antagonista sobre el patógeno en cultivo dual .....	82
2.1.2.2. Caracterización del micoparasitismo por microscopia electrónica de barrido. ....	83
2.2. Segunda etapa .....	83
2.2.1. Velocidad de crecimiento .....	83
2.2.2. Producción de metabolitos antimicrobianos.....	84
2.2.3. Promoción de crecimiento <i>in vitro</i> .....	84
2.2.3.1. Crecimiento de plántulas.....	85
2.2.3.2. Contenido de clorofila .....	85
2.2.4. Análisis estadístico .....	86
2.3. Tercera etapa.....	86
2.3.1. Tolerancia <i>in vitro</i> a <i>Ridomil Gold</i> .....	86
2.3.2. Tolerancia <i>in vitro</i> a Fosfito de potasio .....	87
3. Identificación de aislados de <i>Trichoderma</i> spp. ....	87
3.1. Extracción de ADN .....	87
3.2. Cuantificación .....	88
3.3. Amplificación .....	88
3.4. Análisis de homología .....	89
RESULTADOS.....	90

1. Aislamiento de <i>Trichoderma sp.</i> .....	90
2. Estrategia de selección .....	90
2.1. Primera etapa .....	90
2.1.1. Efecto antagónico <i>in vitro</i> .....	90
2.1.2. Evaluación del micoparasitismo .....	92
2.1.2.1. Micoparasitismo del antagonista sobre el patógeno en cultivo dual. ....	92
2.1.2.2. Caracterización del micoparasitismo por microscopía electrónica de barrido. ....	93
2.2. Segunda etapa .....	94
2.2.1. Velocidad de crecimiento .....	94
2.2.2. Efecto antagónico de metabolitos antimicrobianos .....	95
2.2.3. Promoción de crecimiento de plántulas de tomate <i>in vitro</i> .....	96
2.2.4. Análisis estadístico .....	97
2.3. Tercera etapa.....	97
2.3.1. Tolerancia <i>in vitro</i> a Ridomil Gold .....	98
2.3.2. Tolerancia <i>in vitro</i> al Fosfito de potasio .....	98
3. Identificación molecular de <i>Trichoderma</i> a nivel de especie.....	99
DISCUSIÓN .....	101
CONCLUSIONES PARCIALES .....	107
CAPÍTULO IV. Biocontrol de <i>Phytophthora cactorum</i> con aislados regionales de <i>Trichoderma</i> sp. en peral .....	109
INTRODUCCIÓN .....	110
Objetivo principal .....	114
MATERIALES Y METODOS.....	115
1. Patógeno .....	115
1.1. Cultivo .....	115
1.1.1. Preparación del inóculo .....	115
2. Hongos Antagonistas.....	115
2.1. Cultivo .....	115
2.2. Preparación de suspensiones.....	115
3. Estudio de eficacia de biocontrol a campo de aislados regionales de <i>Trichoderma spp.</i> frente a <i>Phytophthora cactorum</i> . ....	116
3.1. Características de la plantación .....	116
3.2. Tratamientos .....	116
2.3.3. Formas de aplicación del antagonista y el patógeno .....	117
3.4. Experimentos.....	117
3.4.1. Experimento de efecto preventivo .....	117

3.4.2. Experimento de efecto Curativo.....	118
3.5. Evaluación.....	119
3.6. Análisis estadístico .....	119
4. Mejora de la eficacia preventiva por agregado de un adherente .....	119
5. Evaluación de otros mecanismos de acción de aislados seleccionados de <i>Trichoderma</i> sp.....	120
5.1. Preparación de suspensiones de <i>Trichoderma</i> sp.....	120
5.2. Producción de ácido indol acético (AIA).....	120
5.3. Producción de quelantes del hierro.....	121
5.4. Efecto in vivo sobre el área fotosintéticamente activa.....	121
RESULTADOS.....	122
1. Estudio de eficacia de biocontrol a campo de aislados regionales de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Phytophthora cactorum</i> . .....	122
1.1. Experimento de efecto de biocontrol preventivo .....	122
1.2. Experimento de efecto de biocontrol curativo .....	123
2. Mejora de la eficacia preventiva por agregado de un adherente .....	125
3. Evaluación de otros mecanismos de acción de aislados seleccionados de <i>Trichoderma</i> sp.....	126
3.1. Producción de ácido indol acético .....	126
3.2. Producción de sustancias quelantes del hierro.....	127
3.3. Efecto in vivo sobre el área fotosintéticamente activa.....	128
DISCUSIÓN .....	130
CONCLUSIONES PARCIALES.....	133
CONSIDERACIONES FINALES.....	134
ANEXOS .....	137
BIBLIOGRAFÍA GENERAL.....	141

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Origen geográfico y ubicación en planta de los aislados provenientes de madera	52
Tabla 2	Origen geográfico y método de aislamiento de cada uno de los aislados procedentes de muestras de suelo y raíces.	53
Tabla 3	Identificación molecular a nivel de especies de aislados de peral representativos del género <i>Phytophthora</i> sp. y otros Oomycetes	57
Tabla 4.	Medidas promedio de zoosporangios de las distintas especies del género <i>Phytophthora</i> identificadas	61
Tabla 5	Patogenicidad en raíces de aislados seleccionados de <i>Phytophthora</i> sp.	66
Tabla 6	Escala de micoparasitismo in vitro de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Phytophthora</i> spp.	81
Tabla 7	Distribución de aislados de <i>Trichoderma</i> spp. por origen y tipo de muestra	89
Tabla 8	Porcentaje de inhibición y micoparasitismo de los aislados de regionales de sp. <i>Trichoderma</i> sp. preseleccionados frente a aislados de <i>Phytophthora</i>	90
Tabla 9	Caracterización cultural de los aislados regionales de <i>Trichoderma</i> sp.	94
Tabla 10	Evaluación de promoción de crecimiento en plántulas de tomate.	95
Tabla 11	Identificación molecular a nivel de especies de aislados de peral preseleccionados de <i>Trichoderma</i> sp.	99
Tabla 12	Requerimientos hídricos para perales William's jóvenes	115
Tabla 13	Efecto de biocontrol preventivo y curativo de aislados de <i>Trichoderma</i> sp. sobre el arede podredumbre necrótica en plantas de peral inoculadas con <i>P. cactorum</i>	122
Tabla 14	Área de necrosis generadas en plantas de peral inoculadas con <i>P. cactorum</i> y tratadas preventivamente con los aislados de <i>Trichoderma</i> más el agregado de adherente	124
Tabla 15	Origen y ubicación de aislados regionales de <i>Trichoderma</i> spp.	137

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Mapa de la provincia de Río Negro dividido por zonas geográficas	40
Figura 2	Avance de podredumbre producida por <i>Phytophthora</i> sp. en plantas de peral cv. Williams's	41
Figura 3	Esquema de la estrategia de aislamiento de <i>Phytophthora</i> sp. en madera y suelo, con la utilización de cebos "in situ" y en laboratorio.	42
Figura 4	Dibujo del procedimiento de inoculación de las macetas	49
Figura 5	Detalle del procedimiento de inoculación de macetas	49
Figura 6	Detalle de estructuras asexuales y sexuales de <i>P.cactorum</i> observadas al microscopio óptico	58
Figura 7	Detalle de estructuras asexuales de <i>P.lacustris</i> observadas al microscopio óptico	59
Figura 8	Detalle de estructuras asexuales de <i>P.inundata</i> observadas al microscopio óptico	59
Figura 9	Detalle de estructuras asexuales de <i>P.rosacearum</i> observadas al microscopio óptico	60
Figura 10	Detalle de estructuras asexuales de <i>P.thermophila</i> observadas al microscopio óptico	60
Figura 11	Detalle de las estructuras de reproducción asexual producidas por <i>Phytophythium mercuriale</i> observadas al microscopio óptico	61
Figura 12	Largo promedio de lesión para cada especie de <i>Phytophthora</i> spp. en los cv. de pera William's y d'Anjou	63
Figura 13	Fotografía de la podredumbre causada por <i>Phytophthora</i> sp. en frutos de cv. William's.	63
Figura 14	Diámetro de podredumbre promedio producido por aislados de <i>Phytophthora</i> sp. en fruta de pera cv William's y d'Anjou	64
Figura 15	Mapa del Alto Valle de Río Negro donde se observan las localidades en las cuales se seleccionaron los establecimientos productivos	78
Figura 16	Esquema representando la técnica de cultivo dual modificada.	81
Figura 17	Imagen de las placas de Petri con cultivos de <i>Trichoderma</i> .	91
Figura 18	Escala de micoparasitismo representada con distintos aislados de <i>Trichoderma</i> frente a las cuatro especies de <i>Phytophthora</i> .	91
Figura 19	Fotografías al microscopio óptico (40 X) de la zona de interacción de los aislados de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Phytophthora cactorum</i>	92
Figura 20	Fotografías al microscopio electrónico de barrido de la interacción entre aislados de <i>Trichoderma</i> y <i>P. cactorum</i>	93

Figura 21	Análisis de componentes principales de los aislados de <i>Trichoderma</i> sp. pre-seleccionados en la primer etapa de selección	96
Figura 22	Fotografía donde se observa la tolerancia al fosfito de potasio de aislados regionales de <i>Trichoderma</i> spp.	97
Figura 23	Mecanismos de acción de diferentes agentes de control biológico contra patógenos de raíz	111
Figura 24	Esquema del proceso de inoculación de los tratamientos preventivos	117
Figura 25	Esquema del proceso de inoculación de los tratamientos curativos	117
Figura 26	Detalle de la inoculación de <i>P. cactorum</i> en la herida del injerto entre el pie y la variedad	118
Figura 27	Imagen ilustrativa del aspecto en la zona de injerto inoculada únicamente con <i>P. cactorum</i>	121
Figura 28	Imagen ilustrativa del aspecto en la zona de injerto inoculada con <i>P. cactorum</i> (1378).	123
Figura 29	Aislamientos regionales y comercial de <i>Trichoderma</i> sp. tanto en medio APD como selectivo para <i>Phytophthora</i> sp.	123
Figura 30	Comparación del tamaño de lesión generado por <i>P. cactorum</i> (1378) en la zona de injerto con aplicación del tratamiento preventivo más adherente	125
Figura 31	Placas de Petri con porciones de membranas de nitrocelulosa luego de la incubación con reactivo Salkowski	126
Figura 32	Reacción negativa a producción de sideróforos por parte de los aislados de <i>Trichoderma</i> seleccionados	127
Figura 33	Área foliar promedio de las plantas inoculadas con los distintos aislados de <i>Trichoderma</i> sp.	128

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL



## **1. El Alto Valle de Río Negro**

### **1.1. Características generales**

El Alto Valle de Río Negro o simplemente Alto Valle es la región constituida por los valles irrigados ubicados en su mayor parte en la margen izquierda (norte) del curso superior del río Negro, al norte de la meseta patagónica en Argentina. El Alto Valle del río Negro propiamente dicho comienza en la confluencia de los ríos Limay y Neuquén, donde nace el río Negro, comprende unas cien mil hectáreas, de las cuales alrededor del sesenta por ciento se encuentra bajo riego (Blanco, 1999). Estos valles están limitados hacia el norte y hacia el sur por barrancas de formación sedimentaria. Los valores de altitud van desde 200 a 400 metros sobre el nivel del mar. Las menores altitudes se registran hacia el este del valle (Rodríguez & Muñoz, 2006). El clima es desértico frío con verano cálido (Cogliati & Mazzeo 1999).

La precipitación media anual de la región para el período 1990-2004 fue de 243,7 mm. Este régimen pluviométrico no es apto para la realización de cultivos de secano por lo cual se han desarrollado técnicas de sistematización, distribución y manejo del agua para riego (Rodríguez & Muñoz, 2006).

La temperatura media anual del aire es de 15°C. El mes más caluroso es enero con temperaturas medias de 23,6°C. En el mes de julio la temperatura media es de 6,6°C siendo éste el mes más frío (Rodríguez & Muñoz, 2006).

Entre las adversidades climáticas de la región se encuentran las heladas primaverales, el viento, la elevada radiación solar y el granizo. Las heladas primaverales son mucho menos frecuentes que las invernales y otoñales pero de mayor interés agronómico ya que los frutales de pepita y carozo son más susceptibles al daño por bajas temperaturas durante ese período. La frecuencia anual media de heladas es de 67,5 y los valores medios para los meses de septiembre y octubre son 6,3 y 1,3 heladas/año respectivamente (Rodríguez & Muñoz, 2006).

El viento es un factor climático de importancia en la zona, principalmente durante los meses de octubre a diciembre. Puede producir quebrado de ramas, heridas en los frutos y su caída; asimismo, limita los momentos de intervención de determinadas prácticas de manejo de los frutales de pepita y carozo principalmente sanitarias. Su intensidad

obliga a la utilización de cortinas rompevientos, para la cual se utilizan tradicionalmente diferentes especies de álamos, o cortinas artificiales. Los vientos predominantes de la región son de los cuadrantes oeste y sudoeste (Cordon *et al.*, 2000).

Los valores de radiación global aumentan desde el ecuador, registrándose los más altos entre los 28º y 40º de latitud sur. La región del Alto Valle, ubicada a 67º 40' de longitud oeste y 39º 01' de latitud sur, se caracteriza por tener altos valores de radiación global y de insolación (Rodríguez, 2004; Rodríguez y Muñoz, 2006). El promedio de días con cielo claro es de 113,5 días/año, siendo enero (13,1 días) y febrero (13,7 días) los meses con mayor cantidad de días claros, mientras que junio presenta el número menor (6,1 días) (Cordon *et al.*, 2000).

Los suelos de la región son típicos de desierto. Se caracterizan por su baja meteorización y son clasificados en suelos de barda, suelos de media barda, suelos de media costa y suelos de costa. Son de origen coluvial, de texturas no muy pesadas, entre arenosos y franco limoso, escasos en materia orgánica (menos del 1%), con velocidad de infiltración media a alta y con perfil profundo, sin gran desarrollo edáfico (Bestvater & Casamiquela, 1983).

## **1.2. Aspectos históricos y productivos de la actividad frutícola**

La utilización productiva del Valle se hizo posible cuando se ejecutaron las obras de riego indispensables a ese fin. Ya en 1884 se inició la construcción del primer canal de riego, usualmente conocido como “canal de los milicos”. Con una bocatoma sobre el río Neuquén, esa primitiva construcción recorría cincuenta kilómetros llegando a regar solamente mil quinientas hectáreas (Blanco, 1999). La puesta en producción efectiva se inició hacia comienzos del siglo pasado y se estructuró definitivamente como economía frutícola alrededor del año 1930, cuando la producción regional se orientó definitivamente hacia el mercado externo. Previo a ello el comienzo de la construcción del Dique Ballester en 1910 permitió asegurar el riego, la incorporación progresiva de superficies regables produciría un consecuente proceso de subdivisión y venta de las grandes propiedades territoriales originadas en la conquista militar, que se acentuó a lo largo de la década de 1920 contribuyendo a la constitución, como agente económico mayoritario, de un pequeño productor propietario relativamente próspero, que fuera durante muchos años el sujeto social característico del desarrollo económico del Valle

(Blanco, 1999; Worcel, 2006). Hacia 1930 se instalaron las primeras plantas procesadoras de fruta, favoreciendo al desarrollo agroindustrial en la región del Alto Valle y consolidando su poblamiento (Worcel, 2006). Además, el ritmo de la producción marcaba un importante crecimiento, alrededor del 70% de las peras y manzanas exportadas por Argentina eran provistas por el Alto Valle, ocupando la región el primer puesto en el volumen de producción nacional. Esta participación se fue incrementando en forma sostenida a partir de entonces. Con anterioridad a la Segunda Guerra Mundial, la pera -sobre todo en su variedad William's Bon Chretien- era la protagonista casi exclusiva de la producción.

## **2. El peral (*Pyrus communis* L.)**

### **2.1. Clasificación botánica y características morfológicas**

El cultivo del peral se inicia en el oeste asiático, en los valles de la cadena montañosa Tian Shan en China, hace cerca de 3000 años (Sanchez *et al.*, 2010). El peral común o peral europeo (*Pyrus communis* L.) en occidente sus ancestros serían *P. communis* var. *caucasica* y *P. communis* var. (Jeffers & Wilcox, 1990; Sanchez *et al.*, 2010).

El género *Pyrus* incluye 22 especies, las más utilizadas en la actualidad son *P. betulifolia*, *P. calleryana*, *P. pyrifolia*, y *P. ussuriensis* (orientales), y *P. communis*, *P. communis* var. *pyraster*, *P. amygdaliformis*, y *P. salicifolia* (occidentales) (Sanchez *et al.*, 2010). *P. communis* se encuentra clasificado en la Subdivisión Angiosperma; Clase Dicotiledónea; Subclase *Rosidae*; Orden Rosales; familia *Rosaceae*; Subfamilia *Maloideae* y Género *Pyrus* (Giayetto & Villarreal, 2010).

El árbol del peral europeo es piramidal que puede alcanzar los 20 metros de altura y poseer una vida media de 65 años. Su tronco es alto, gris, grueso y de corteza agrietada (Giayetto & Villarreal, 2010). Las flores blancas o blanco rosadas forman corimbos umbeliformes en la terminación de las ramillas en grupos de 3 a 7 y son hipóginas porque poseen ovario ínfero, el cual da origen a un pomo como fruto. La piel de dicho fruto es más o menos lisa, de color verde, que se torna parda o amarillenta al madurar. La pulpa de la pera es dura, ácida al comienzo, blanda y dulce a la madurez (Jeffers & Wilcox, 1990; Giayetto & Villarreal, 2010).

## **2.2. Producción de peras y superficie cultivada**

En la actualidad en el Alto Valle, las principales frutas cultivadas en la provincia son las manzanas y peras, ocupando 18.921 ha y 20.728 ha respectivamente (Loyola, 2014). La producción se desarrolla en forma muy vinculada con la provincia de Neuquén. Entre ambas provincias producen más del 90% de la producción de Argentina, siendo el país que ocupa el primer puesto como exportador de peras y el onceavo en el comercio mundial de manzanas (Loyola, 2014; Zubeldía, 2007).

Entre 2003 y 2013, la producción de pera creció a una tasa anual de 2,3%, alcanzando el último año 773 mil toneladas. Este incremento se explica, fundamentalmente, por las inversiones en tecnología y nuevas plantaciones que permitieron la adaptación del complejo a las tendencias del mercado mundial bajo un modelo de inserción internacional basado, esencialmente, en las ventajas naturales de la región (Storti, 2016). El complejo de manzanas y peras, comprende además de la producción primaria, las etapas de empaque, frío y procesamiento (Loyola, 2014). Para ambas provincias, la producción estimada en 2013 fue de 773.040 toneladas de peras. (78% de Río Negro) (Filadoro & Dicovsky, 2014). De ellas un 66% se destinó a frutas para consumo en fresco (40,5% al mercado externo y 25,4% al mercado interno). El 34% restante es industrializado por deficiencias en su calidad.

Dentro de este panorama, orientado mayoritariamente a la producción de pera, el cultivar William's ocupa el 46% de la superficie en esta región, destacándose entre las demás peras debido a su gran aceptación internacional (Bruzzone, 2010; Giayetto & Villarreal, 2010).

## **2.3. Comercialización de peras**

Argentina se ha consolidado como principal exportador en contra-estación de peras, los ingresos globales del complejo se han calculado en 800 millones de dólares anuales, de los cuales 570 millones de dólares corresponden a exportaciones de fruta fresca y jugo (Loyola, 2014). Las exportaciones en fresco constituyen el principal producto exportado, representando el 98% para la pera. Los principales destinos de la fruta fresca fueron Brasil, Rusia y Estados Unidos, representando el 67% de las exportaciones de pera (Filadoro & Dicovsky, 2014; Storti, 2016). Aunque entre 2014 y 2017 la exportación de

peras desde el puerto disminuyó de 393.250 toneladas a 254.464, mientras la de manzanas bajó de 142.228 toneladas a 71.449, siendo los problemas sanitarios una de las razones de este acontecimiento (SENASA, 2017). ‘William’s’ es la principal cultivar comercializada en los mercados externos y nacional, alcanzando el 40% y el 55% respectivamente del total de peras (FunBaPa, 2014).

#### **2.4. Peral cultivar William’s**

‘William’s’, también conocida como ‘William’s Bon Chrétien’ o ‘Bartlett’, se ha convertido en la cultivar de pera con mayor demanda en el mercado en fresco a nivel mundial, debido a sus cualidades organolépticas (Avellá & Viñuela, 2009).

Fue descubierta originalmente en 1765 en Inglaterra por Stair y denominada “*Stair’s pear*”. Luego el viverista William’s la adquirió y diseminó, por lo que comenzó a denominarse “*William’s pear*”. Sin embargo, su nombre completo es *William’s Bon Chertien*. En Argentina fue introducida en 1817 por James Brittain, quien la cultivó en su finca a orillas de la desembocadura del Riachuelo en Buenos Aires. Mientras que el cultivo y propagación de esta variedad en el Alto Valle inició cerca de 1910 en Allen (Giayetto & Villarreal, 2010).

El peral cv. William’s encuentra en la región del Alto Valle condiciones óptimas para su desarrollo, donde florece a fines de septiembre o principios de octubre, con una fecha media del 26 de septiembre según registros históricos de los últimos 35 años (Benítez *et al.*, 1998). El fruto de esta cultivar es piriforme, de tamaño medio a grande, de 230 a 235 g, 105 mm de altura y 65 mm de calibre (Red Agraria, 2009). Las condiciones para el inicio de cosecha de esta pera en el Alto Valle se producen la primer quincena de enero, con frutos de 106 días de edad media; valores mínimos de calibre de 64 a 65 mm; valores de firmeza inferiores a 88,9 a 93,3 Newton (20-21 libras); valores de sólidos solubles superiores al 10%; valores de acidez titulable de 3-4 g/L y valores de degradación de almidón de 20 a 25% (Benítez, 2001; Red Agraria, 2009).

#### **2.5. Enfermedades que afectan al cultivo**

Las escasas precipitaciones y baja humedad relativa características de la región del Alto Valle, determinan que las patologías microbianas presenten un grado variable (Giayetto

& Rossini, 2010). A continuación se citan las enfermedades que presentan mayor incidencia sobre el cultivo del peral en el Alto Valle de Río Negro:

### **2.5.1. Virosis**

Las virosis constituyen un grupo de enfermedades sistémicas que no disponen de un control eficiente una vez que han penetrado la planta. Por ello, el manejo se basa principalmente en prevención mediante el uso de plantas libres de virus (Giayetto & Rossini, 2010).

Tres virosis del manzano, *Apple Stem Pitting Virus* (ASPV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) y *Apple stem grooving virus* (ASGV) son responsables de tres enfermedades existentes en la región en pera: *Pear ring pattern mosaic*, *Pear Stem grooving* y *Pear Vein Yellows*. *Pear Stony Pit* es de gran importancia económica ya que la fruta pierde su calidad estética afectando su comercialización (Cichón *et al.*, 1996; Giayetto & Rossini, 2010; Rossini, 2007). *Pear Vein Yellows* es una enfermedad potencialmente peligrosa ya que ante una combinación cultivar/portainjerto de elevada sensibilidad podría causar importantes pérdidas económicas (Rossini & Pérez, 2009). En el Alto Valle de Río Negro se lo aisló de hojas sintomáticas de peral cv. William's (Rossini, 2007; Giayetto & Rossini, 2010).

### **2.5.2. Enfermedades bacterianas**

#### **2.3.2.1. Tizón de las flores del peral.**

Una de las enfermedades bacterianas presente es el tizón de las flores causada por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall. La incidencia de esta enfermedad está muy relacionada con las condiciones meteorológicas. Se desarrollan importantes epifitias en primaveras lluviosas o con alta humedad relativa y bajas temperaturas, pero en años secos no se registran daños (Dobra *et al.*, 2007), en ataques muy severos también puede afectar dardos (Cichón *et al.*, 1996). En el Alto Valle se la ha observado, hasta el momento, sólo en el cv. Packham's Triumph (Cichón *et al.*, 1996).

#### **2.3.2.2. Agalla de corona**

Otra de las bacteriosis de importancia en la región es la agalla de corona producida por *Agrobacterium tumefaciens* (E.F. Smith y Townsend) Conn. Los daños que produce son

importantes en los viveros, donde las plantas se infectan a través de las heridas generadas en los trasplantes y laboreos del suelo. En los montes comerciales la importancia de los daños tiene relación directa con la edad de la planta. Al alcanzar la madurez, la planta puede convivir con la enfermedad y los daños son de importancia menor (Dobra *et al.*, 2007). Esta bacteria induce la formación de tumores globosos en el cuello y raíces de las plantas afectadas. *A. tumefaciens* ha sido aislada en varias oportunidades en la región del Alto Valle de Río Negro (Rossini & Pérez, 2009).

### **2.5.3. Enfermedades fúngicas**

#### *2.5.3.1. Sarna del peral*

La sarna del peral es producida por *Venturia pyrina* Aderhold, anamorfo *Fusicladium pyrorum* (Lib.) Fuckel. Los síntomas pueden aparecer en las hojas jóvenes de las yemas mixtas y en el envés de los sépalos. Produce manchas translúcidas que luego toman color verde-oliváceo-grisáceo y aspecto aterciopelado y que finalmente necrosan el tejido y finalmente el tejido se necrosa (Cichón *et al.*, 1996; Dobra *et al.*, 2007). En el Alto Valle de Río Negro, la precipitación media anual y la baja humedad relativa del aire determinan que sea una zona con baja incidencia de sarna del peral, a diferencia de las demás regiones productoras de frutales de pepita (Rossini, 2007).

#### *2.5.3.2. Oídio del peral*

El oídio del manzano y del peral es producida por *Podosphaera leucotricha* (Ell. y Ev.) Salmon, anamorfo *Oidium farinusum* Cooke. Afecta a los órganos aéreos jóvenes de la parte aérea del árbol, los que son cubiertos por manchas pulverulentas de color blanco, deteniendo su crecimiento en las zonas afectadas. En peral los síntomas se manifiestan en los frutos y raramente en los órganos vegetales de la planta (Cichón *et al.*, 1996; Rossini, 2001). Los manzanos y perales de la zona del Alto Valle de Río Negro son particularmente afectados debido a la escasez de precipitaciones (Dobra *et al.*, 2007).

#### *2.5.3.3. Podredumbres radicales y del cuello*

A nivel mundial existe un número considerable de patógenos que afectan el sistema radicular y el cuello de los frutales de pepita. Algunos ejemplos son *Rosellinia necatrix*

Prill., *Armillaria mellea* (Vahl) Kummer, *Xylaria mali* Fromme, *Sclerotium rolfsii* Sacc. y *Phytophthora* spp. (Dobra *et al.*, 2007).

De ellos, el género *Phytophthora* se encuentra entre los más importantes, tanto por la distribución alcanzada, como por los daños que produce (Dobra *et al.*, 2007; Erwin & Ribeiro, 1996).

### **3. La situación de la podredumbre de cuello por *P. cactorum* en perales del Alto Valle**

En el Alto Valle es frecuente observar síntomas de podredumbres de cuello en plantas de perales aunque no suelen atribuirse a *Phytophthora*. Si bien existen en otras zonas productivas del mundo registros de ataques de diversas especies de *Phytophthora* en montes de peral, en la región del Alto Valle sólo se ha identificado *P. cactorum* (Rivero, 2010). Asimismo sólo existe en la región un trabajo de relevamiento realizado por Rossini *et al.* (1997) en manzanos y perales y este estudio se llevó a cabo hace más de 20 años, existiendo una actualización de Rivero (2010), trabajo en el cual se centra únicamente en la identificación de *P. cactorum*.

Los síntomas producidos por *P. cactorum* en la canopia podrían confundirse con alteraciones provocadas por otras enfermedades o por factores abióticos. Si bien las manchas oleosas en el tronco y las líneas concéntricas formadas en el tejido floemático son síntomas propios de *P. cactorum*, su detección requiere un mínimo entrenamiento necesario para evitar diagnósticos erróneos (Rivero, 2010).

El avance de esta enfermedad implica un debilitamiento progresivo de la planta afectada y una reducción en los kilos de frutos obtenidos, culminando en la muerte del árbol; situación que trae aparejada una disminución progresiva de la rentabilidad debido a la reducción en los rendimientos. Asimismo el reemplazo de un ejemplar en plena producción conlleva años ya que se trata de plantas leñosas y plurianuales. Sin embargo, no hay estudios en la región o en el país que cuantifiquen la reducción del crecimiento y del rendimiento en perales afectados (Dobra *et al.*, 2007; Giayetto & Rossini, 2010).

El estado fisiológico de la fruta al momento de la cosecha es el principal factor condicionante de la vida durante la poscosecha de dichos frutos y por ende de su

comercialización. Este estado es cuantificado a través de índices de calidad tales como tamaño de fruto, firmeza, color, contenido de sólidos solubles y acidez titulable que son usados en la región como procedimiento estándar para determinar la fecha óptima de cosecha; de esta manera se garantiza el mantenimiento de los parámetros de calidad del fruto durante la conservación. Si bien la podredumbre de cuello causada por *P. cactorum* afectaría la calidad de frutos de esta cultivar, no existen antecedentes que evalúen esta situación al momento de la cosecha comercial (Rivero, 2010).

Períodos repetidos de saturación del suelo son altamente favorables al desarrollo de *Phytophthora* spp. en frutales de pepita. Además, el anegamiento puede aumentar la severidad de la enfermedad debido a una disminución en la resistencia del hospedante a la colonización por *Phytophthora* spp. y a un incremento en la liberación y dispersión de zoosporas y en la cantidad de inóculo formado (Erwin & Ribeiro, 1996; Rivero, 2010)

El agua utilizada para irrigar frutales de pepita es un medio óptimo para la diseminación de los propágulos de *Phytophthora* spp. (Erwin & Ribeiro, 1996). El anegamiento adquiere particular importancia en la región del Alto Valle ya que el principal método de riego utilizado es el gravitacional. En el mismo, se aplican grandes volúmenes de agua registrándose láminas de riego hasta tres veces superiores a las que debieran aplicarse sometiendo al suelo a períodos de anoxia; a esto se suma en muchos casos el uso ineficiente del agua de riego y la existencia de deficiencias en el sistema de drenaje (Dobra *et al.*, 2007). En el mundo y en la región del Alto Valle hay reportes en los que se ha detectado la presencia y dispersión de *Phytophthora* spp. desde plantas afectadas hacia plantas sanas a través del agua de riego (Rivero, 2010).

### **3.1. Decaimiento del peral**

La presencia de síntomas de decaimiento en la parte aérea de perales y otros frutales de hoja caduca podría deberse a diferentes alteraciones que estarían afectando el sistema vascular del árbol (Rossini & Di Masi, 1996). Dichas alteraciones podrían ser provocadas por factores abióticos tales como daño por frío (Jeffers & Wilcox, 1990) o asfixia radical (Jeffers y Wilcox, 1990; Rossini & Di Masi, 1996; Rossini *et al.*, 1997; Guzmán Lyon, 2003). Asimismo, ésta sintomatología podría ser causada por deficiencias nutricionales (Harris, 1991; Tomlinson *et al.*, 2005) y por otras enfermedades (Jeffers &

Wilcox, 1990; Harris, 1991; Tomlinson *et al.*, 2005). Entre los problemas sanitarios causales de la sintomatología asociada al decaimiento del peral, se atribuye especial responsabilidad a las podredumbres provocadas por ataques de *Phytophthora* spp. (Erwin & Ribeiro, 1996).

### 3.2. El género *Phytophthora* en frutales

Desde la clasificación de las especies en 6 grupos propuesta por Waterhouse (1963), el género *Phytophthora* gracias a las herramientas moleculares actualmente alcanza 12 clados que surgen con el objetivo de acomodar el creciente número de especies (Jung *et al.*, 2017). Si bien en los estudios filogenéticos subsiguientes se utilizaron números crecientes de especies de *Phytophthora* y números crecientes de regiones genéticas nucleares y mitocondriales, la estructura básica del género permaneció inalterada (Jung *et al.*, 2018).

Las especies de *Phytophthora* provocan podredumbre en raíz y la corona de varios cultivos de frutas de hoja caduca, incluyendo manzana, cereza, damasco, durazno y frambuesa (Bielenin *et al.*, 1988). En Chile se detectó en raíces y tejidos de la corona infectados naturalmente a *P. cactorum* en manzana; *P. cinnamoni* en palta; *P. cryptogea* en uva; y a *P. cryptogea*, *P. citricola*, *P. fragariae* var. *rubi* y *P. megasperma* en frambuesa (Latorre & Wilcox, 1996). En Cuba se reportó a *Phytophthora nicotianae* en plantas de palta con síntomas de muerte regresiva (Machado *et al.*, 2013). En California (EEUU), en producciones comerciales de Nogal se encontraron asociadas al decaimiento y síntomas de “pie mojado” a las especies *P. cactorum*, *P. citrícola*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. megasperma* y *P. cryptogea* (Mircetich & Matheron, 1983). En este mismo estado pero en árboles frutales moribundos de cereza con podredumbres de raíz y corona se aislaron a *P. cambivora*, *P. megasperma* y *P. drechsleri* (Mircetich & Matheron, 1976). McIntosh (1964) encontró en Canadá que aislados de suelo de las especies *P. cactorum*, *P. cryptogea* y *P. cambivora* resultaron patógenas para raicillas de plántulas de pera, cereza, damasco y durazno. Mientras que *P. megasperma* var. *sojae* y *P. drechsleri* fueron patógenos débiles ó no patogénicos para estos huéspedes.

### **3.2.1. Antecedentes de *P. cactorum* en Argentina**

Lindquist (1938) aisló por primera vez *P. cactorum* de troncos y raíces de manzanos en La Plata (Argentina). En 1942 se describió la enfermedad causada por este microorganismo en plantaciones de manzano en Córdoba (Frezzi, 1950). En 1981, Feldman y Gracia aislaron este patógeno de plantaciones de peral cv. William's en Mendoza. Asimismo, Alcoba *et al.* (2005) lograron aislarlo de perales en la provincia de Jujuy. En la región del Alto Valle de Río Negro *P. cactorum* fue aislado por Bergna (1982) en plantaciones comerciales de peral cvs. William's, Packham's Triumph, Red Bartlett y Clapp' Favorite en esta región.

La única especie aislada tanto en perales como en manzanos en Argentina a campo es *P. cactorum* (Dobra *et al.*, 2008; Rossini, 2013). Las infecciones con este patógeno ocurren principalmente en la herida provocada por el injerto de la variedad en el pie (Rossini, 2013). Aunque la podredumbre del cuello podría afectar la calidad de la fruta cosechada, existen pocos antecedentes de podredumbre por *Phytophthora sp.* en fruto de peral en Argentina (Rivero, 2010)

### **3.2.2. Ubicación taxonómica de *P. cactorum***

*P. cactorum* pertenece al género *Phytophthora*, el cual comprende al momento 123 especies formalmente descritas (Phytophthora database).

Frezzi (1950) describió para la Argentina once especies aisladas de 78 hospedantes distintos de diversas procedencias. El nombre del género *Phytophthora* deriva del griego y significa *phyto*: planta y *phthora*: destructor o 'destructor de plantas'. Este género fue creado por Anton de Bary en 1876 con *P. infestans* como la especie tipo (Fernández Valiela, 1979; Erwin y Ribeiro, 1996).

Los géneros *Phytophthora* y *Pythium* comprenden a los patógenos de plantas más destructivos y ampliamente distribuidos en el mundo (Smith *et al.*, 1992). A los integrantes de ambos géneros se los denomina 'water molds' debido a que -por su capacidad de formar zoosporas flageladas- son ecológicamente favorecidos por la presencia de agua libre tanto en el suelo como en el follaje (Smith *et al.*, 1990). *Phytophthora spp.* y *Pythium spp.* están estrechamente relacionados, siendo la

zoosporogénesis el factor más importante que los diferencia (Agrios, 1996). Ambos géneros se encuentran ubicados dentro de la Familia *Pythiaceae*, la cual reúne aquellos parásitos facultativos cuyos esporangios se forman en hifas somáticas o en esporangióforos de crecimiento indeterminado (Agrios, 1996; Erwin y Ribeiro, 1996). El orden *Peronosporales*, el cual contiene a la Familia *Pythiaceae*, está integrado por hongos con micelio bien desarrollado, con esporangios libres formados en las puntas de las hifas y con capacidad de producir oosporas (Agrios, 1996). Este orden pertenece a la Clase *Oomycetes* cuyo carácter morfológico sistemático son las hifas mayormente no septadas y zoosporas biflageladas formadas en zoosporangios (Agrios, 1996).

Los *Oomycetes* son organismos miceliares que tradicionalmente han estado ubicados dentro del Reino *Myceteae* o *Fungi* debido a su hábito de crecimiento filamentoso (Alexopoulos *et al.*, 1996; Kamoun, 2003). Posteriormente se los ubicó en el reino Chromista, conformado por organismos con mitocondrias de crestas tubulares y/o con células cuyos flagelos presentan pequeños pelos adosados llamados mastigonemas (Erwin & Ribeiro, 1996). Nuevas investigaciones sugieren que los *Oomycetes* están filogenéticamente más relacionados con los organismos superiores como las algas marrones y diatomeas que con los hongos verdaderos (Bush, 2002). Por este motivo han pasado a formar parte del Reino *Straminipila* representando una línea evolutiva alejada de los hongos verdaderos del Reino *Myceteae*. Los *Oomyetes* pertenecientes a este nuevo Reino se caracterizan por producir esporas asexuales móviles con dos flagelos morfológicamente diferentes, siempre con uno de ellos recubierto de dos hileras laterales de mastigonemas (Dick, 2001).

### **3.2.3. Hospedantes**

Diferentes especies de *Phytophthora* causan importantes enfermedades en cultivos agrícolas y ecosistemas naturales (Cooke *et al.*, 2000; Bush, 2002). Su grado de especialización es variable; mientras que algunas especies están asociadas a un solo hospedante, la mayoría ejerce su parasitismo sobre un amplio abanico de plantas (Erwin & Ribeiro, 1996).

Entre las especies más comunes, *P. cinnamomi* y *P. cactorum* muestran un rango de hospedantes muy amplio en contraste con *P. infestans*, que exhibe un rango estrecho.

Se sabe que *Phytophthora cinnamomi* tiene el rango de hospedantes más amplio de todas las especies y es capaz de afectar a más de 1000 plantas (Zentmyer, 1980).

*P. cactorum* parasita a un número considerable de plantas, por ello es que De Bary la designó originalmente con el nombre *P. omnivora* (Frezzi, 1950). Es patógena en más de 200 especies (entre ellas malezas) de 150 géneros distribuidos en 60 familias botánicas (Erwin y Ribeiro, 1996), pero los mayores daños los provoca en la familia *Rosaceae*, más precisamente en los géneros *Malus* y *Pyrus* (Fernández Valiela, 1979; Smith *et al.*, 1992).

#### **3.2.4. Epidemiología de *P. cactorum* en perales**

*P. cactorum* se considera un patógeno policíclico ya que, una vez producida la infección primaria, la cantidad de inóculo secundario (zoosporangios y zoosporas) puede aumentar en pocos días o semanas, de niveles bajos o incluso no detectables a niveles elevados. Este aumento tiene mayor impacto en la tasa de desarrollo de la enfermedad cuando las condiciones ambientales, principalmente la presencia de agua libre, son favorables (Erwin & Ribeiro, 1996).

Muchas especies de *Phytophthora* son consideradas competidores saprofitos pobres (Jeffers & Wilcox, 1990), es por ello que los niveles de inóculo en suelo dependen principalmente de su producción en plantas enfermas (Mitchell & Kannwischer-Mitchell, 1983). Sin embargo *P. cactorum* puede colonizar frutos, pétalos y hojas caídos al suelo (Harris, 1991). Las pasturas y malezas ubicadas en el interfilas también son importantes fuentes de inóculo ya que pueden ser colonizadas por el hongo, el cual ataca posteriormente a los frutales (Harris, 1991), lo que le confiere ventaja competitiva respecto a otras especies del género (Rossini & Di Masi, 1996).

Siguiendo el criterio de MacKenzie *et al.* (1983) en cuanto a la duración de las epidemias, y en comparación con aquellas producidas por otras especies del mismo género, *P. cactorum* produce una epidemia de larga duración. Si bien podría relacionarse la naturaleza perenne del cultivo hospedero con la duración de la epidemia, existen cultivos de dichas características atacados por especies de *Phytophthora* que producen epidemias de corta duración (semanas o meses) como la vaina negra en cacao producido por *P. palmivora* (MacKenzie *et al.*, 1983). La duración de la epidemia tiene implicancias en el manejo de la enfermedad ya que resulta más complejo con las de larga duración

debido a la implicancia que tiene en los costos de control y en las pérdidas económicas (MacKenzie *et al.*, 1983).

#### **4. Manejo de la enfermedad**

Para el control de la podredumbre del cuello en peral las recomendaciones actuales consisten en un control integrado, que incluya la selección de pies resistentes, selección y/o modificación del sitio de plantación y adoptar técnicas de prácticas culturales con el objetivo de minimizar episodios de saturación del suelo cerca de la zona del injerto, y únicamente la utilización de fungicidas sistémicos en situaciones de extrema gravedad (Smith *et al.*, 1990).

##### **4.1. Manejo químico**

Resulta fundamental realizar un estudio local sobre las especies presentes en las plantaciones comerciales, patógenas de peras y potenciales causales de pérdidas económicas por podredumbres en postcosecha; y establecer un plan de manejo sustentable de la enfermedad que incluya alternativas a los fungicidas para el control.

Las principales formas de manejo de esta enfermedad incluyen el uso de control químico mediante el uso de fungicidas. El control químico no resulta una herramienta eficaz para el manejo de enfermedades que se desarrollan en el suelo, ni para las de postcosecha. En Argentina, para el control de esta enfermedad el fungicida más utilizado es Metalaxyl, sin embargo este fungicida se clasifica como de alto riesgo en la inducción de resistencia en patógenos (FRAC, 2009).

##### **4.2. Control biológico**

Actualmente, las prácticas agrícolas convencionales están siendo gradualmente reemplazadas en todo el mundo con prácticas agroecológicas para obtener mayores rendimientos de cultivos (Thakur & Singh, 2018). Sin embargo, existen citas que contradicen lo anterior, explicando que anualmente se utilizan cerca de tres mil millones de kilogramos de distintos agroquímicos (Pimentel, 2009). Por lo tanto, algunos de los principales desafíos en el siglo XXI son producir cultivos saludables y sostenibles y mejorar la producción agrícola (Thakur & Singh, 2018). En este sentido, una de las herramientas más prometedoras que se utilizan hoy en día es el control biológico. Éste

no solo protege a los cultivos de los efectos de varios patógenos de plantas, sino que también protege el medio ambiente y la salud humana (Handelsman & Stabb, 1996).

La reducción de la dependencia de los productores de agroquímicos mediante la promoción de métodos de control biológico es uno de los enfoques positivos hacia el manejo integrado de plagas (MIP). El control biológico de patógenos basado en la utilización de microorganismos antagonistas, ha recibido especial atención en los últimos treinta años y se presenta como una estrategia de control alternativa al uso de fungicidas de síntesis química. La introducción del biocontrol en el manejo integrado de enfermedades de un cultivo es la forma de explotar sus posibilidades (Wilson & Wisniewski, 1989).

Se conoce que muchos hongos y otros microorganismos son capaces de controlar varios patógenos de plantas. Estos agentes de biocontrol son particularmente atractivos porque son capaces de proteger y colonizar varias porciones de plantas que particularmente son inaccesibles a los tratamientos agrícolas convencionales (Harman, 1992).

La excesiva dependencia de agroquímicos, la generación de sistemas agrícolas no sustentables, en sitios de plantación con problemas de compactación, napas freáticas altas, anegamientos y desnivel y problemas en la calidad de las plantas son ejemplos de los problemas agrícolas que enfrentan los productores (Monte, 2001). El biocontrol ofrece una alternativa al uso de fungicidas en estos sistemas productivos, convirtiéndose en un componente esencial del manejo de enfermedades.

## **5. El género *Trichoderma***

*Trichoderma* spp. se encuentran entre los hongos del suelo más frecuentemente aislados y presentes en los ecosistemas de raíces de plantas (Harman *et al.*, 2004). Estos hongos son oportunistas, simbioses avirulentos de plantas y parásitos y antagonistas de muchos hongos fitopatógenos, protegiendo así las plantas de enfermedades (Vinale *et al.*, 2008). Sus habilidades antifúngicas son conocidas desde 1930, y ha habido desde entonces grandes esfuerzos para utilizarlos en el control de enfermedades (Samuels, 1996). Hasta ahora, las especies de *Trichoderma* spp. han sido las más estudiadas como agentes de control biológico (ACB) y comercializados como biopesticidas,

biofertilizantes y enmiendas (Harman, 2000; Harman *et al.*, 2004). Dependiendo del sustrato utilizado, el uso de *Trichoderma* en la agricultura provee numerosas ventajas: (I) colonización de la rizosfera como ACB dado que posee un rápido establecimiento entre las comunidades microbianas estables de la rizosfera; (II) control de la microflora patógena por el uso de una variedad de mecanismos—competencia, entre otros—; (III) mejoramiento de la resistencia de la planta y (IV) estimulación del crecimiento radicular (Harman *et al.*, 2004).

Muchas son las cepas de *Trichoderma* identificadas con potencial para aplicaciones en control biológico en distintos cultivos, entre ellas *T. harzianum*, *T. virens*, *T. viridae*, *T. hamatum*, *T. roseum* y *T. koningii*, las cuales han sido documentadas como micoparásitas y antagonistas de patógenos de suelo en numerosos trabajos (Lumsden & Locke, 1989; Smith *et al.*, 1990; Datnoff *et al.*, 1995; Alonso Reyes *et al.*, 2002; Guigón Lopez *et al.*, 2010). *T. harzianum* es la especie más frecuentemente aislada en la mayoría de las muestras en todo el mundo (Druzhinina *et al.*, 2010). Se la caracteriza por ser el principio activo en varias formulaciones comerciales debido a su exitosa habilidad antagonista frente a otros hongos patogénicos.

Se ha reportado el control de *Rhizoctonia solani* y *Pythium* sp. en soja, poroto, papa y algodón (Lumsden & Locke, 1989); *Sclerotium rolfsii* en tomate (Alonso Reyes *et al.*, 2002); *Sclerotium cepivorum* en ajo y cebolla (Ozbay & Newman, 2004); *Phytophthora parasitica*, *P. capsicii* y *P. infestans* en pimiento y papa (Smith *et al.*, 1990); *P. cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en palta (Ozbay & Newman, 2004); *Fusarium oxysporum* en tomate y cebolla (Datnoff *et al.*, 1995); entre otros.

Las especies de *Trichoderma* utilizan numerosos mecanismos en el ataque a otros hongos y crecimiento radicular de las plantas. Los más destacados incluyen: competencia por espacio y nutrientes (Bailey & Lumsden, 1998; Benítez *et al.*, 2004), producción de metabolitos secundarios (antibiosis) (Bailey & Lumsden, 1998; Ozbay & Newman, 2004), micoparasitismo y resistencia inducida a las plantas (Harman, 2000).

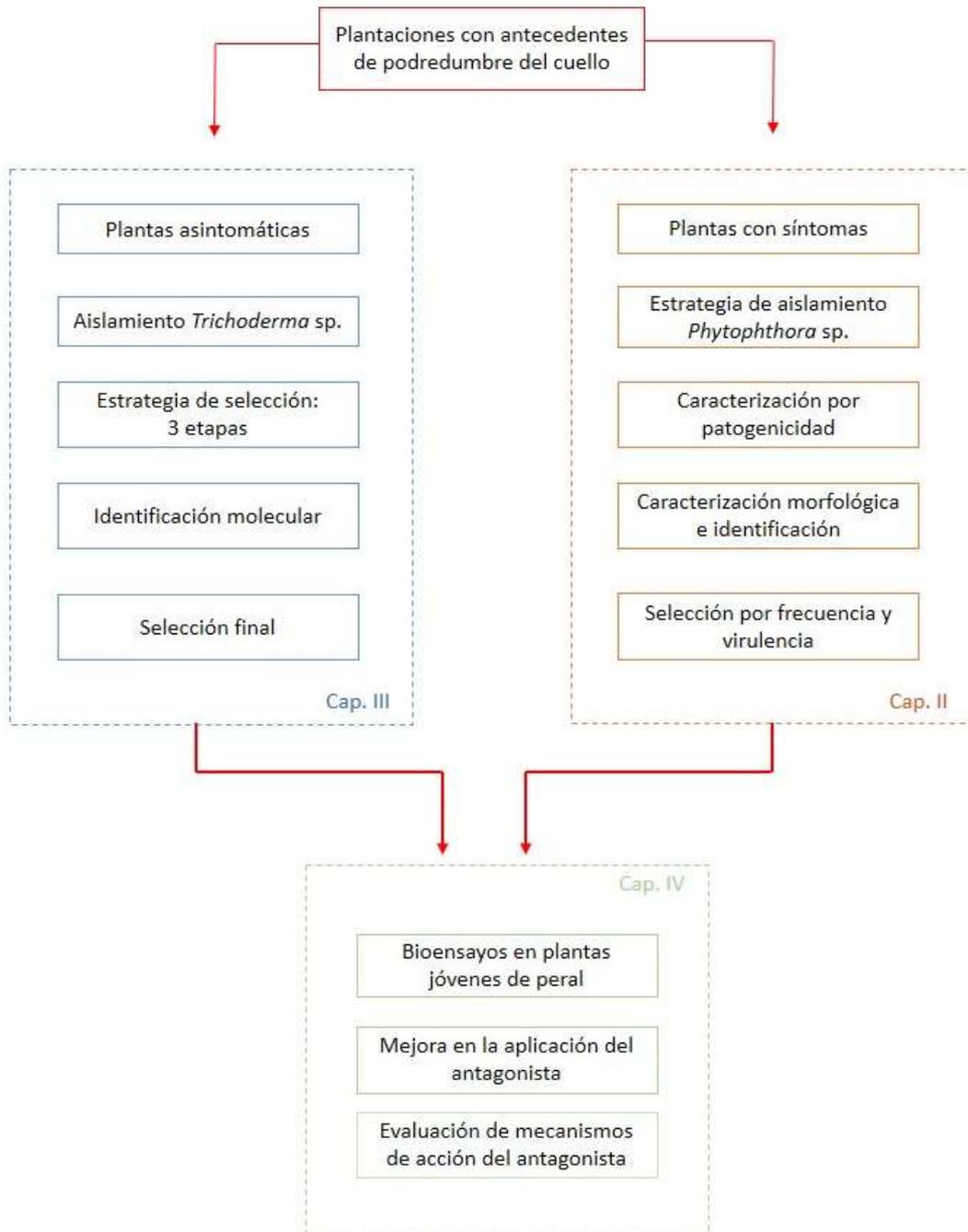
## **6. Hipotesis general**

Dada la importancia del cv William's para la región productiva del Alto Valle de Río Negro, los daños que puede causar *Phytophthora cactorum* en plantaciones comerciales

de los mismos y la necesidad de un relevamiento de más especies con potencial patógenicos para éste cultivo; además de la cada vez más creciente necesidad de encontrar formas de control inocuas y amigables con el ambiente, es que la hipótesis de esta tesis fue:

“Aislados nativos de *Trichoderma* spp. antagonistas naturales de patógenos de suelo en peral resultan óptimos para alcanzar el biocontrol de distintas especies de *Phytophthora* en cultivares susceptibles”.

# ESQUEMA GENERAL



CAPÍTULO II. Aislamiento, identificación y  
caracterización por virulencia de *Phytophthora*  
spp.



## INTRODUCCIÓN

El Alto Valle de Río Negro es la región constituida por los valles irrigados ubicados en el curso superior del Río Negro, con una extensión de 65 km junto al río Neuquén y 120 km aguas abajo de la confluencia de los ríos Limay y Neuquén junto al Río Negro (Rivero, 2010). En la actualidad esta región es la principal zona exportadora de pera a nivel mundial, con una superficie cercana a las 20000 ha. En ellas, el cultivo de pera William's ocupa 9600 ha., siendo la principal especie producida (45%) (Sanchez, 2010). En orden de importancia le siguen Packham's Triumph (30%), Beurre D'Anjou (10%), Red Bartlett (6%) y Abate Fetel con el 2% del volumen producido. El porcentaje restante incluye a Beurre Bosc, Beurre Giffard, Clapps Favourite y Red Beurre D'Anjou (Bruzzone, 2010; CAFI 2018).

Entre las enfermedades más importantes que afectan a este cultivo, se destacan las provocadas por hongos y stramenopilas, más que las virósicas y bacterianas. Entre las enfermedades de origen fúngico, la principal en estas últimas temporadas ha sido la sarna del peral (*Venturia pyrina*) (Sosa 2018, *com.pers*). La enfermedad produce manchas pardas circulares que luego toman color verde-oliváceo-grisáceo y aspecto aterciopelado y finalmente necrosan el tejido afectado. Estas manchas pueden aparecer en hojas, ramitas, flores y frutos disminuyendo directamente la productividad y afectando la calidad comercial (Cichón *et al.*, 1996; Dobra *et al.*, 2008).

Dentro del reino Stramenopila, la podredumbre de cuello y raíces causada por *Phytophthora* spp. en pomáceas es una de las enfermedades más importantes y ampliamente distribuida en el mundo (Erwin & Ribeiro, 1996; Bush, 2002; Bhat *et al.*, 2006). Esta enfermedad causa pérdidas económicas significativas y generalmente provoca la muerte de los árboles afectados (Harris, 1991; Guzmán Lyon, 2003; Causin *et al.*, 2005).

*Phytophthora cactorum* causa principalmente podredumbre de cuello en pera, pero también se la ha aislado generando podredumbre de raíz (Cameron 1962; Erwin & Ribeiro 1996). Los síntomas de decaimiento en pera han sido asociados en gran medida a infecciones causadas por *Phytophthora* sp. En Canadá, *P. cactorum* fue reportada como causa de podredumbre de cuello, específicamente fue responsable de muerte de la corteza alrededor del suelo en plantas de pera de 5-6 años de los cultivares d'Anjou y William's (McIntosh 1959, 1960). En este mismo país, *P. cactorum*, *P. cambivora*, y *P. cryptogea* fueron aislados de suelos regados, y resultaron patogénicos de raicillas de plántulas de peral. Por otro lado, *P. drechsleri* y *P. megasperma* var. *sojae* causaron pocas lesiones en raicillas de peral (McIntosh 1964).

En Oregon, Estados Unidos, *P. cinnamomi* fue reportada como responsable de podredumbre de raíces de plántulas de peral cv. William's, y la especie estuvo asociada a un rápido colapso de perales (Cameron 1960). Sin embargo, *P. syringae* fue aislada de suelo de alrededor de perales colapsados, pero sin encontrar raíces infectadas con este patógeno (Cameron, 1960). En otro estudio, *P. cinnamomi* y *P. cactorum* fueron reportadas como patógenos de la mayoría de las variedades de peral estudiadas susceptibles y en condiciones favorables para la infección. Ambas especies, *P. cinnamomi* y *P. cactorum*, fueron encontradas en infecciones de raíces de plántulas de peral cvs. Winter Nelis y William's (Cameron, 1962). En Turquía, *P. palmivora* fue recientemente reportada causando podredumbre de cuello y raíz en plantaciones de peral con síntomas de marchitamiento, y estos síntomas disminuyeron luego del período de crecimiento de los árboles (Türkölmez *et al.* 2016).

En Grecia, Elena y Paplomatas (1999) reportaron a *P. citrophthora* como causa de podredumbre de cuello en perales variedad Kondoula injertados en portainjertos de membrillo. En otro estudio realizado en ese país, aislados de *P. cactorum* y *P. citricola* fueron reportados como patogénicos de portainjertos de pera, y además, se observó que los aislados de *P. cactorum* resultaron más agresivos que los de *P. citricola* (Thomidis *et al.*, 2002). En el estado de Washington, ambas especies, *P. cactorum* y *P. citricola*, patógenas de fruta de pera, fueron aisladas del agua de riego durante las etapas de susceptibilidad al desarrollo de la fruta (Yamak *et al.*, 2002). En España, se describió a *P.*

*cactorum* como causa de la infección en frutales de peral cvs. Blanca de Aranjuez y Roma en plantaciones con podredumbre de cuello (Tuset *et al.* 2002).

Las principales fuentes de infección de *Phytophthora* sp. en todo el mundo incluyen árboles de vivero, suelos contaminados y agua de riego. En plantaciones comerciales, *P. cactorum* es el principal patógeno asociado a la podredumbre favorecida por riego por aspersión en manzana y pera, y se lo ha encontrado como la especie predominante en el agua de riego (Erwin & Ribeiro 1986; Yamak 2002). En el estado de Washington, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. citrophthora* y *P. parasitica* fueron aisladas del agua de riego, pero sólo *P. citricola* y *P. cactorum* fueron patógenas de frutos de pera (Yamak *et al.*, 2002).

La podredumbre de cuello en peral William's es ampliamente conocida en Argentina. En los valles irrigados de la región Patagonia Norte, *P. cactorum* ha sido la única especie reportada hasta la fecha como causa de esta enfermedad en perales (Dobra *et al.*, 2008; Rossini, 2013). Las infecciones por *Phytophthora* ocurren principalmente a través de las heridas del injerto entre portainjerto y variedad (Rossini, 2013). Los árboles afectados generalmente muestran un decaimiento generalizado que puede confundirse con un problema vascular. Otros síntomas pueden ser un crecimiento reducido de los brotes, enrojecimiento prematuro de las hojas a fines de verano, follaje ralo y de menor tamaño (Sanchez *et al.*, 2010). En el Alto Valle esto ocurre asociado a los riegos primaverales excesivos, aunque la época ideal para observar dichos síntomas es el inicio del otoño. En la zona del injerto la corteza se presenta hundida, y al levantarla se observa una podredumbre húmeda, de diferentes tonalidades de marrón (Sanchez, 2010).

Aunque la podredumbre de cuello podría afectar la calidad de la fruta y la productividad, hay pocos estudios de podredumbres causadas por *Phytophthora* en William's en Argentina (Rivero, 2010). En los últimos años, se han observado nuevas especies y nuevos problemas asociados al género *Phytophthora* que afectan frutos de peral en la región. *Phytophthora* sp. *salixsoil*, una especie no descrita del clado 6 de *P. gonapodyides*-*P. megasperma* fue identificada como agente causal de podredumbre de frutas de William's, Packham's Triumph y Red Bartlet durante almacenamiento en frío (Dobra *et al.*, 2011). Más recientemente, se identificó a *P. lacustris* (anteriormente

denominada *Phytophthora* sp. *salixsoil*) y *P. drechsleri* en etapas previas a cosecha en frutos de peral cv. Golden Rusett Bosc con síntomas de pudrición en una plantación comercial (Sosa *et al.*, 2016). Según la literatura, ambas especies, *P. lacustris* y *P. drechsleri* son potencialmente patógenas en árboles frutales cultivados (Jeffers *et al.*, 1982; Lamour *et al.*, 2003). Más recientemente, se encontraron infecciones mixtas causadas por *Phytophthora* spp. y *Botrytis cinerea* durante la postcosecha de frutos de peral cv. Packham's Triumph (Sosa *et al.*, 2016).

Sin embargo, en muchos casos, factores abióticos o patógenos secundarios se consideran agentes causales de enfermedades causadas por *Phytophthora* sp. Para evitar estos errores de diagnóstico, se requieren métodos de aislamiento altamente específicos para excluir a hongos y otros oomicetes tales como *Pythium* o *Phytophythium*, que generalmente son de crecimiento mucho más rápido que las especies de *Phytophthora* (Erwin & Ribeiro 1996; Jung *et al.*, 1996; 2018).

Los enfoques de aislamiento específicos de *Phytophthora* incluyen, entre otros, la utilización de cebos, medios de aislamiento específicos que contienen diversos antibióticos y fungicidas, diversas temperaturas de incubación, lixiviación de polifenoles de las muestras de corteza y secado y re humectación de muestras de suelo (Jeffers & Aldwinckle 1987; Erwin & Ribeiro 1996; Jung *et al.*, 1996; 2018). Otro problema para los aislamientos de *Phytophthora* sp. son las fluctuaciones del inóculo según la fase de la enfermedad (Jung *et al.*, 2018). Cuando los primeros síntomas se vuelven visibles, la destrucción de las raíces finas ya se encuentra avanzada, dando como resultado una disminución del inóculo del patógeno. Como consecuencia, se desarrolla un proceso secundario de enfermedad causado por otras poblaciones de hongos patógenos y saprófitos, enmascarando la causa principal de la enfermedad (Erwin & Ribeiro 1996; Jung *et al.*, 1996).

Dada la importancia del cultivo de pera para el Alto Valle y el país, la problemática de esta enfermedad en la producción de frutales de pepita en la región y el mundo y el potencial destructivo del género *Phytophthora* sp. en este capítulo se planteó la siguiente hipótesis:

“En las plantaciones de perales comerciales de la región existen otras especies diferentes a *Phytophthora cactorum*, que son potencialmente patógenas en fruta de pera”.

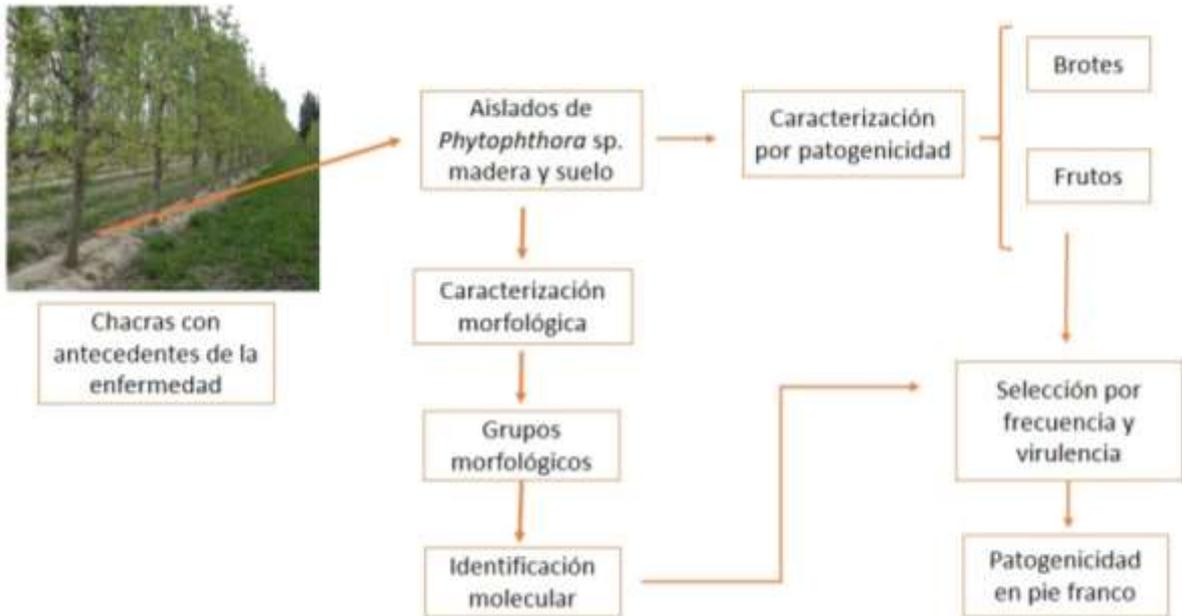
#### **Objetivo general del capítulo**

Estudiar la diversidad de especies de *Phytophthora* asociadas a plantaciones comerciales de pera en Argentina.

#### **Objetivos específicos**

1. Aislar e identificar especies del género *Phytophthora* desde plantaciones comerciales de peral afectados.
2. Establecer la ocurrencia de cada especie de *Phytophthora* detectada en la región.
3. Caracterizar a los aislados de *Phytophthora* spp. por su virulencia en plantas de peral.

# ESQUEMA GENERAL

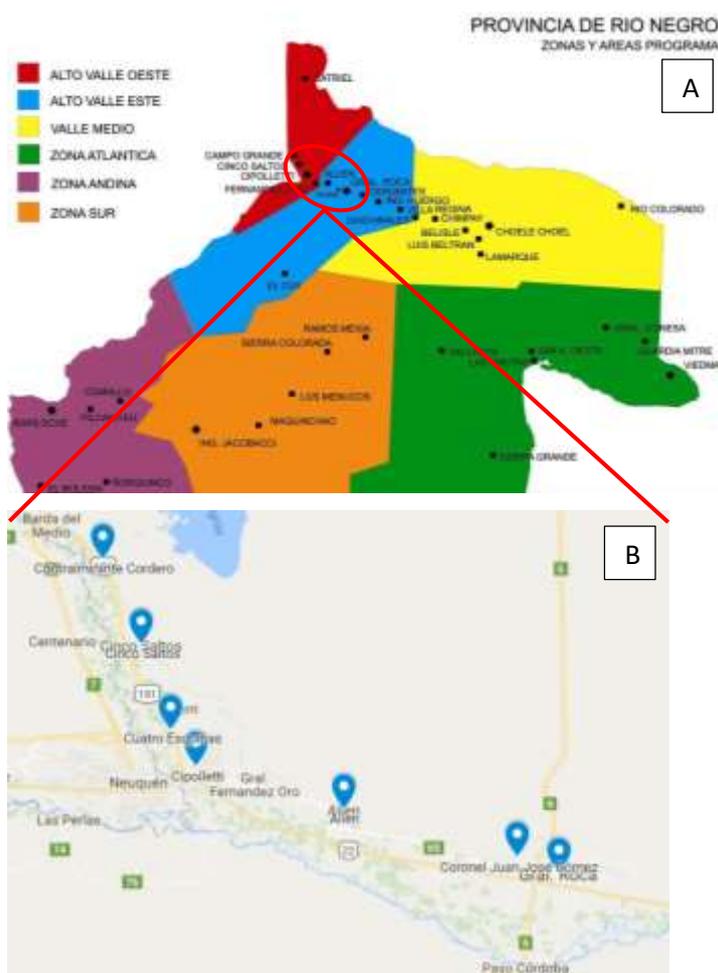


## MATERIALES Y METODOS

### 1. Aislamiento del patógeno

#### 1.1. Área de estudio

El presente estudio fue realizado en el área productiva ubicada en el Alto Valle Este y Oeste, provincia de Río Negro. Dicha área estuvo conformada por plantaciones comerciales situadas próximas a las localidades de General Roca, Coronel Juan José Gómez, Allen, Cipolletti, Cuatro Esquinas, Cinco Saltos y Contraalmirante Cordero (Figura 1).



**Figura 1.** A. Mapa de la provincia de Río Negro dividido por zonas geográficas. B. Detalle de las ciudades con las plantaciones comerciales de pera seleccionadas para los muestreos

Durante la primavera y el otoño de la temporada 2014 – 2015, y el otoño de 2016, se relevaron plantaciones comerciales de peral cv. William's que presentaban síntomas compatibles con los producidos por la podredumbre de cuello provocada por *Phytophthora* spp. (Figura 2).



**Figura 2.** Avance de podredumbre producida por *Phytophthora* sp. en plantas de peral cv. Williams's

## **1.2. Estrategia de aislamiento**

A efectos de optimizar el aislamiento de las diferentes especies presentes, se realizaron muestreos en plantaciones comerciales de peral de plantas con síntomas de la enfermedad (Jeffers & Aldwinckle, 1987; Fitria *et al.*, 2013) y de suelo y raíces (Das *et al.*, 2016; Vettraino *et al.*, 2005).

En cada planta seleccionada, se observaron síntomas de podredumbre del cuello y se ubicaron canchros típicos producidos por *Phytophthora* sp. Se tomaron muestras de tejido afectado, incluyendo tejido sano con una navaja desinfectada (Jeffers & Aldwinckle, 1987). Pequeñas piezas de tejido se desinfectaron con alcohol etílico (70% V/V) durante 30"; luego hipoclorito de sodio (5% V/V) durante 1 minuto, y finalmente se lavó con agua estéril y se secó con papel estéril. Finalmente, cada pieza de tejido fue transferido a medio selectivo agar harina maíz natural (CMA-N) desde granos enteros, enmendado con pimaricina 10 ppm, amplicilina 200 ppm, rifampicina 10 ppm y pentacloronitrobenceno 60 ppm; adaptado de Erwin & Ribeiro (1996).

El aislamiento desde suelo y raíces se realizó mediante la utilización de cebos, considerado un medio selectivo a la hora del aislamiento (Erwin & Ribeiro, 1996) (Figura

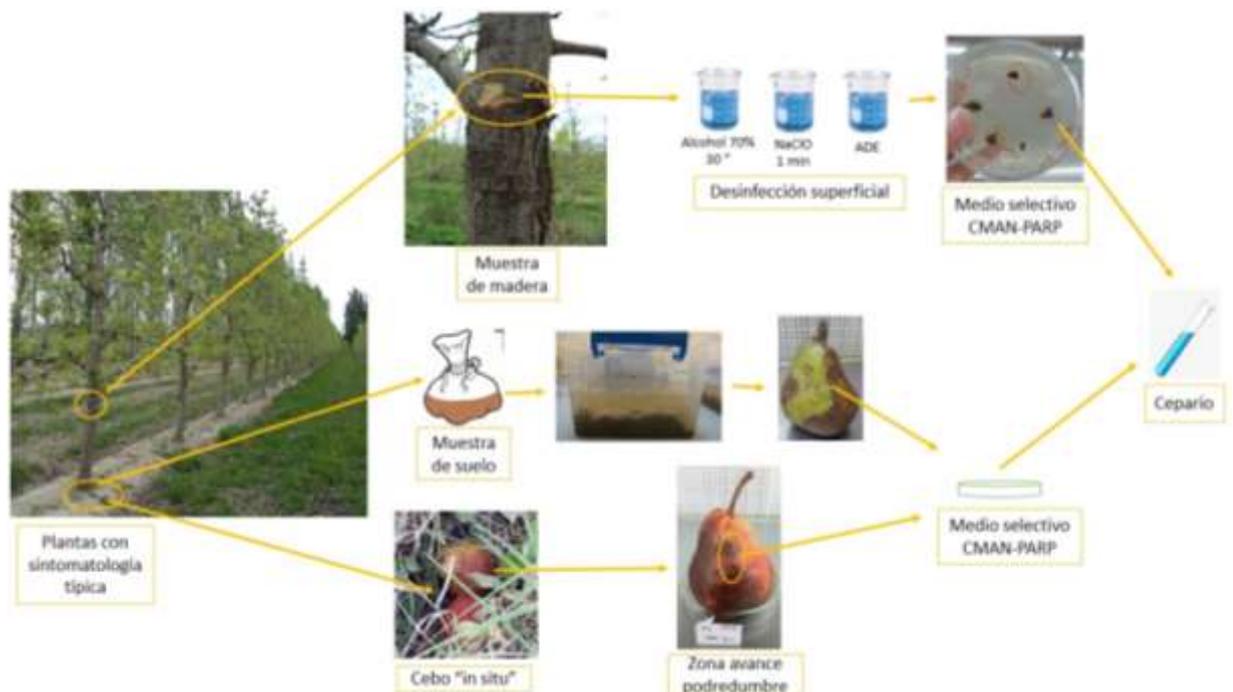
3). Para esto, se utilizaron frutos de pera de variedades susceptibles, como es el caso de William's y Beurre d'Anjou (Harris & Bielenin, 1986; Yamak *et al.*, 2002; Cooke *et al.*, 2007). Previo a su utilización, el fruto fue lavado y desinfectado superficialmente con alcohol 70%. El fruto de pera-cebo se utilizó de tres formas:

I. En el laboratorio, en recipientes plásticos desinfectados superficialmente. Se colocaron las muestras de suelo-raíces tomadas en cada lugar de muestreo y se las diluyó con ADE, sobre la cual se colocaron los frutos-cebo y se dejaron de 3-5 días hasta que se desarrollaba una podredumbre incipiente (Erwin & Ribeiro, 1996);

II. Directamente en el suelo "in situ", se colocaron semi-enterrados debajo de una planta con síntomas típicos de la enfermedad, inmediatamente después de la realización de un riego por manto en la chacra. Se los dejó por 3 días previo a la colecta, según metodología adaptada de Ownley & Benson, (1991);

III. Colecta de cebos naturales, fruta de pera caída en el suelo durante la temporada anterior.

Una vez retirados los frutos con síntomas de podredumbre producida por *Phytophthora* sp., en el laboratorio se tomaron porciones de la zona de avance de la podredumbre y se colocaron en cajas de Petri con medio selectivo PARP.



**Figura 3.** Esquema de la estrategia de aislamiento de *Phytophthora* sp. en madera y suelo, con la utilización de cebos "in situ" y en laboratorio.

Los cultivos puros de cada aislado de *Phytophthora* spp. se obtuvieron mediante la técnica de punta de hifa de una colonia joven. Los aislados se almacenaron tanto en agar papa dextrosa (PDA) como en solución de agua con suelo estéril en tubos de vidrio a 16°C (Pérez-Sierra *et al.*, 2013) y se incorporaron al cepario de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNCo

## **2. Identificación a nivel especie**

### **2.1. Caracterización morfológica**

Todos los aislados fueron caracterizados siguiendo descripciones y claves específicas basados en características de la colonia y características morfo-microscópicas (estructuras miceliales, clamidosporas, producción, morfología y tamaño de esporangios, formación de oogonios y anteridios) (Abad, 2008; Erwin & Ribeiro, 1996; Pérez-Sierra *et al.*, 2013). Debido a su relevancia como carácter taxonómico distintivo a nivel de especie, en este trabajo de tesis se hizo especial referencia a la morfología y morfometría de los esporangios (Erwin & Ribeiro, 1996).

Los esporangios se indujeron sumergiendo 1,5 cm<sup>2</sup> del borde de una colonia en crecimiento en medio de cultivo V8-agar (agar 15 g, CaCO<sub>3</sub> 2g, jugo de V8 filtrado 200 mL, agua destilada 800 mL, pH 7) de 4 días de edad en placas de Petri de 9 cm con solución de suelo estéril (Jung *et al.*, 1999; Pérez-Sierra *et al.*, 2013). Las placas fueron incubadas por 48-72 h a 20°C en oscuridad. Las características morfológicas como forma del esporangio, papilación y caducidad fueron evaluadas y comparadas con descripciones en la literatura (Abad, 2008; Erwin & Ribeiro 1996; Jung et al. 1999, 2002).

Cultivos de cada aislado de dos a tres semanas de edad fueron observados para evaluar la formación de oogonios y oosporas, y sus características como el alargamiento del oogonio y la inserción anteridial.

Las características culturales y morfológicas estudiadas se utilizaron para realizar el agrupamiento de los aislados e identificar a nivel de especie.

## **2.2. Identificación molecular de los aislamientos de *Phytophthora* sp.**

Con el objetivo de identificar las especies aisladas, se procedió a la identificación molecular en el Laboratorio de IBAC (CITAAC). Aislados representativos obtenidos por diferentes estrategias de aislamiento y orígenes fueron identificados por secuenciación del gen ITS, mediante la utilización del protocolo de Dellaporta (1983) modificado.

### **2.2.1. Extracción de ADN**

Para la obtención de los pellets de ADN de los aislados obtenidos, se tomó una porción de micelio y se transfirió a placas de Petri de 60 mm de diámetro conteniendo Caldo Papa Dextrosa (CPD). Los cultivos fueron incubados por 72 hs a 20°C en oscuridad.

Pasado ese tiempo, las colonias formadas en el medio fueron extraídas y se eliminó el excedente de medio de cultivo con un papel secante estéril. Cada colonia se colocó en un tubo de eppendorf de 1,5 mL al cual se le agregó 700 µL de buffer de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 8.0; EDTA 10 mM; ClNa 100 mM; SDS 1%). Los tubos fueron llevados al freezer a -20°C durante 24 h, se retiraron y se procedió a macerar el micelio con un émbolo plástico estéril hasta pulverizarlo. Se llevaron a incubación por 10 minutos a 65°C y posteriormente se les agregó 250 µL de acetato de potasio (ACOK). Se los dispuso en hielo por 20 minutos, para luego centrifugar por 30 minutos a 10000 rpm a 4°C en microcentrífuga refrigerada (Eppendorf). Se tomaron 500 µL del sobrenadante y se transfirieron a otro tubo estéril con 500 µL de isopropanol. Nuevamente, se centrifugó durante 15 minutos a 10000 rpm a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó dos veces con 250 µL de etanol 70% (ETOH). Se centrifugó por 10 minutos a 10000 rpm a temperatura ambiente, y se dejó secar al aire. A los pellets de ADN se les agregó 50 µL de buffer Tris-acetato EDTA (TAE) por 12 horas para resuspender el contenido del mismo.

### **2.2.2. Cuantificación**

La cuantificación del ADN extraído se realizó por medio de una electroforesis en gel de agarosa 1%; donde se sembraron las muestras: 5 µL de ADN con 3 µL de marcador de corrida, en el gel sumergido en buffer TAE 1X. Se dejó correr el gel durante 30 minutos

con un voltaje constante de 90 V. Se retiró la cama de la cuba y se tiñó con Gel Red (1%) para ser revelado en un transiluminador de luz UV (Maestrogen).

### **2.2.3. Amplificación**

Se amplificó el sector del espaciador del transcripto interno (Internal transcribed spacer-ITS) de cada aislamiento, utilizando los primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). La mezcla de reacción en tubos de 0,2 mL para PCR contenía 12,5 µL del Master Mix (New England Bio Labs, Taq Polimerasa, dNTP y buffer), 1 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) y 0,5 µL de cada "primer". La mezcla de reacción fue llevada a un volumen final de 25 µL.

Las amplificaciones del gen ITS se realizaron en termociclador (Gene Pro BIOER), utilizando el siguiente programa de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización de 1 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 15 s a 94°C (desnaturalización), 15 s a 58°C (anealing) y 15 s a 72°C (elongación). Con una elongación final de 3 min a 72°C (White, 1990). Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit AccuPrep PCR Purification Kit (BIONEER). El producto final fue enviado a secuenciar en ambos sentidos (3'-5' y 5'-3) al Servicio de Secuenciación MACROGEN (China). Las secuencias fueron editadas y alineadas utilizando el programa MEGA (Versión 7.0).

En aquellas identificaciones en las cuales el porcentaje de identificación fue menor al 97%, la misma fue confirmada mediante la amplificación del gen mitocondrial COX I (citocromo oxidasa subunidad I), utilizando los primers Fm83 y Fm83 (Martin y Tooley, 2003). La mezcla de reacción en tubos de 0,2 mL para PCR contenían 2 µL de PCR buffer (1X), 0,6 µL de MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), 2 µL de cada dNTP (0,2 mM), 2 µL de cada primer (1 µM), 1 Unidad de Taq polimerasa (Pegasus) y 1µL de molde de ADN. Esta reacción se realizó mediante el siguiente programa de amplificación: una desnaturalización inicial de 95°C por 2,30 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, annealing a 48 °C por 1 min y una extensión a 72 °C por 5 min; seguido de una extensión final a 72 °C por 5 minutos (adaptado de Martin & Tooley, 2003).

Cada secuencia de los aislados representativos seleccionados fueron identificados mediante comparación con cepas de colección por BLAST en la página del NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Zhang et al. 2000). Posteriormente cada una de las secuencias representativas fueron almacenadas en la página del NCBI.

Una vez identificados los aislados del patógeno por morfología y/o por técnicas moleculares, se procedió a establecer la ocurrencia de cada especie identificada en base al número de aislados estudiados. Aquellas especies aisladas con mayor frecuencia serán seleccionadas para evaluarlas por patogenicidad en ensayos a campo.

### **3. Caracterización de la patogenicidad de los aislados de *Phytophthora* spp.**

Teniendo en cuenta que *Phytophthora* spp. podría afectar el cuello de la variedad de la planta, los frutos de pera, y las raíces del pie franco, los experimentos de patogenicidad de los aislados de *Phytophthora* spp. se realizaron en dos etapas. En una primera etapa, se realizaron las pruebas de patogenicidad en brotes de peral y en fruta.

#### **3.1. Experimentos -Primer etapa-**

##### **3.1.1. Patogenicidad en brotes**

En este experimento se generaron condiciones similares a las que permiten las infecciones de *Phytophthora* spp. por heridas del injerto en la variedad en el cultivo. Todos los aislados de *Phytophthora* spp. fueron evaluados por su patogenicidad en brotes de madera de dos cultivares susceptibles William's y d'Anjou, de un año de edad y que fueron cosechados en época de dormancia siguiendo la metodología de Latorre et al., 2001.

Los brotes del año de cada cultivar de pera fueron desinfectados superficialmente con alcohol 70% en laboratorio. Los brotes fueron semi-enterrados a 3 cm de profundidad en macetas con sustrato estéril perlita: arena lavada de río (1:3 v/v), que fue inoculado con una suspensión micelial de cada aislado.

Cada suspensión se preparó inoculando en un Erlenmeyer de 250 mL, con 50 mL de caldo papa glucosa (CPG) (papa con piel 250 g; agua destilada 1 L; azúcar 10 g; agar-agar 20 g), con 5 discos tomados del margen de una colonia de 7 días con activo crecimiento de cada aislado de *Phytophthora* spp. Los mismos se dejaron en oscuridad, a 20 °C, en

agitación constante por 14 días a 100 rpm. Una maceta con brotes de cada cultivar de pera y sin inocular fue utilizada como testigo absoluto.

Se utilizaron 5 brotes de cada cultivar por maceta. Las macetas se sometieron a un período de 72 horas de inundación y posterior drenaje para brindarle al patógeno óptimas condiciones de infección. Finalmente, el ensayo se dejó por 28 días a temperatura ambiente para su posterior evaluación.

Pasado este tiempo, de cada brote se midió el largo y ancho de la lesión generada y mediante cortes transversales se observó la profundidad de la podredumbre. Los Postulados de Koch se completaron mediante el re-aislamiento del patógeno desde las zonas inoculadas y afectadas.

### **3.1.2 Patogenicidad en fruto**

Con el fin de evaluar el potencial patogénico de los aislados de *Phytophthora* spp. en fruta como causales de podredumbres en postcosecha, se realizó este experimento. Se utilizaron frutos de pera con madurez comercial de los mismos cultivares comerciales que en el experimento anterior (Dobra *et al.*, 2011).

Por cada aislado de *Phytophthora* spp. se tomaron 5 frutos, los cuales fueron desinfectados superficialmente con alcohol 70%. Posteriormente, se inocularon con discos de micelio de cultivos jóvenes en heridas realizadas con sacabocado (3 x 3 mm) en la zona ecuatorial del fruto. Fruta testigo fue herida e inoculada con discos de medio de cultivo agar papa dextrosa sin el patógeno.

Los frutos fueron colocados en bandejas y estas a su vez en cajas de embalaje con bolsas microperforadas. Se incubaron durante 7 días a temperatura ambiente ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Posteriormente se evaluó incidencia de fruta con síntomas donde  $\%I = (\text{N}^\circ \text{ brotes afectados} / \text{brotes totales}) * 100$  y la severidad como diámetro de podredumbre medida con regla en milímetros.

Al finalizar ambos experimentos se realizaron análisis de la varianza para las variables largo de necrosis en brote y diámetro de podredumbre en fruto, mediante la utilización del programa R commander (R Core Team, 2013).

### **3.2. Experimento -Segunda etapa-**

Aquellos aislados identificados que presentaron mayor ocurrencia y se destacaron en las pruebas de patogenicidad de la primera etapa por su virulencia en brote y/o fruto, se seleccionaron para su evaluación *in vivo* en raíces de peral.

#### **3.2.1 Patogenicidad en pie franco de peral**

Este experimento se realizó en raíces de plantas jóvenes de peral (pie franco), utilizando la metodología adaptada de Thomidis *et al.*, 2002 y Pérez-Sierra *et al.*, 2013.

Para el experimento se seleccionaron 3 aislados de *Phytophthora* spp, y uno de *Pythium* spp., identificados con el número de colección de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNCo. Ellos fueron:

- *Phytophthora cactorum* (Aislado nº 1378)
- *Phytophthora inundata* (Aislado nº 1353)
- *Phytophthora lacustris* (Aislado nº 1368)
- *Phytophthora rosacearum* (Aislado nº 1315)
- *Pythium aphanidermatum* (Aislado nº 1358)

La patogenicidad de cada aislado se evaluó en plantas de vivero William's de dos años de edad. El pie franco se obtuvo por germinación directa de semillas de plantas madres, trasplantado en invierno, luego de dos año de crecimiento.

Por cada aislado se evaluaron 3 plantas, cada una se colocó en macetas de 10 litros con sustrato estéril compuesto de perlita: arena lavada de río (1:3 v/v). Cada planta fue herida cortando tanto la raíz principal como las secundarias, con el fin de exponer el cambium (Thomidis *et al.*, 2002). Como forma de inoculación se utilizó para cada aislado una placa de Petri con agar papa dextrosa totalmente colonizada por el microorganismo. Con el objetivo de colocar el inóculo en cercanía de las raíces, se colocaron en el sustrato dos tubos de 2 cm de ancho por 24,5 cm de largo, uno a cada lado de la planta) (Figura 4 y 5). Los mismos se retiraron originando dos canales en el sustrato, en el cual se colocaron los discos de agar con el micelio de cada aislado. Una maceta en que se colocó sólo medio de cultivo sin microorganismo fue usada de testigo absoluto.

Inmediatamente después de la inoculación se procedió a inundar las macetas. Las plantas fueron sometidas a períodos de inundación para brindarle al patógeno las condiciones óptimas de infección (Pfender *et al.*, 1977; Erwin & Ribeiro, 1996; Jung *et al.*, 1996; Latorre *et al.*, 2001; Pérez-Sierra *et al.*, 2013). Las plantas se colocaron en condiciones de campo durante 50 días.



**Figura 4.** Dibujo del procedimiento de inoculación de las macetas



**Figura 5.** Detalle del procedimiento de inoculación de macetas. a. armado de macetas con orificio para el inóculo. b. inoculación de las macetas. c. inundación

Pasado este tiempo, se procedió a retirar las plantas de las macetas evitando dañar las raíces. En el laboratorio se lavaron cuidadosamente las mismas y se evaluó el desarrollo radicular de la planta inoculada con cada microorganismo. Además se evaluó la existencia de áreas necróticas y se midió el tamaño de las mismas mediante una escala creada en función de su tamaño: lesión de 1-3 mm: INICIAL; 4-9 mm: MEDIO; > 10 mm: SEVERO.

Se utilizó una escala de cuantificación del desarrollo radicular según metodología propuesta por Pérez-Sierra *et al.*, 2013, comparándolas con las plantas testigo. Se

agruparon en cuatro clases según el porcentaje de afectación de las raíces. Grupos 1= 0-25%; 2= 26-50%; 3= 51-75%; 4= 76-100% de pérdida de raíces (Pérez-Sierra *et al.*, 2013). Para calcular la severidad se utilizó el índice de McKinney:  $MI = [\sum (R \cdot N)] \cdot 100 / H \cdot T$ ; donde R es la clase evaluada previamente, N es el número de plantas en esa clase, H es el mayor valor de esa clase y T es el total del número de plantas).

Finalmente, se completaron los Postulados de Koch mediante el re-aislamiento del patógeno de la zona de avance de la podredumbre en las raíces afectadas y del sustrato utilizando la metodología de cebos en el laboratorio y medio selectivo CMA-PARP.

### 1. Aislamiento del patógeno

De los muestreos realizados entre la primavera de 2014 y el otoño de 2016, se obtuvo un número total de 185 aislados con el uso de las diferentes técnicas de aislamiento: 150 desde madera de la zona de avance de la podredumbre en el cuello de la planta y con utilización de medio selectivo CMA - PARP; mientras los restantes 35 fueron obtenidos mediante aislamiento desde fruta-cebo (medio selectivo) y posterior aislamiento en placa de Petri con CMA - PARP.

Del total de los aislados de madera, 132 correspondieron a hongos endófitos representantes de la familia Botryosphaeriaceae, mientras que 18 correspondieron al género *Phytophthora* spp. Es decir, que se obtuvieron para el género *Phytophthora*, 18 aislados de madera de 30 plantas sintomáticas; esto representa el 60% de aislamientos positivos. El mayor éxito en la obtención de aislados de *Phytophthora* spp. correspondió a los muestreos realizados durante la primavera (Tabla 1).

De 48 muestras tomadas de suelo y raíces de perales con sintomatología característica de la enfermedad, sólo en 35 muestras se obtuvieron aislados del género. De ellas, 7 muestras tuvieron resultados positivos mediante la utilización de frutos-cebos en laboratorio. Por otro lado, mediante la utilización de la técnica de frutos-cebos naturales se llegó a un número final de 18 aislados positivos para el género. Y finalmente, 10 aislados fueron obtenidos utilizando cebos de fruta de pera semi-enterrada en el interfilas posteriormente a realizado el riego por manto (Tabla 2).

**Tabla 1.** Origen geográfico y ubicación en planta de los aislados provenientes de madera

<b>Numero</b>	<b>Origen</b>	
	<b>Aislado</b>	<b>Ubicación</b>
<b>1200</b>	Gral. Roca	Lesión en cuello
<b>1201</b>	Gral. Roca	Lesión en cuello
<b>1203</b>	Allen	Lesión en cuello
<b>1208</b>	Allen	Lesión en cuello
<b>1209</b>	Allen	Lesión en cuello
<b>1211</b>	Allen	Lesión en cuello
<b>1212</b>	Allen	Lesión en cuello
<b>1213</b>	Allen	Lesión en cuello
<b>1224</b>	Allen	Lesión en cuello
<b>1232</b>	Allen	Lesión en cuello
<b>1236</b>	Allen	Lesión en cuello
<b>1238</b>	Allen	Lesión en cuello
<b>1242</b>	Allen	Lesión en cuello
<b>1248</b>	Allen	Lesión en cuello
<b>1250</b>	Allen	Lesión en cuello
<b>1260</b>	Cmte. Cordero	Lesión en cuello
<b>1262</b>	Cnel. J. J. Gomez	Lesión en cuello
<b>1378</b>	Cinco Saltos	Lesión en cuello

**Tabla 2.** Origen geográfico y método de aislamiento de cada uno de los aislados procedentes de muestras de suelo y raíces.

<b>Número Aislado</b>	<b>Origen geográfico</b>	<b>Método de aislamiento</b>
1314	Cmte. Cordero	Cebo en laboratorio
1315	Cmte. Cordero	Cebo en laboratorio
1316	Cmte. Cordero	Cebo en laboratorio
1339	Cmte. Cordero	Cebo en laboratorio
1353	Cmte. Cordero	Cebo en laboratorio
1358	Cmte. Cordero	Cebo en laboratorio
1359	Cmte. Cordero	Cebo en laboratorio
1363	Cinco Saltos	Cebo in situ
1364	Cinco Saltos	Cebo in situ
1365	Cinco Saltos	Cebo in situ
1366	Cinco Saltos	Cebo in situ
1367	Cinco Saltos	Cebo in situ
1368	Cinco Saltos	Cebo in situ
1369	Cinco Saltos	Cebo in situ
1370	Cinco Saltos	Cebo in situ
1371	Cinco Saltos	Cebo in situ
1372	Cipolletti	Cebo natural
1373	Cinco Saltos	Cebo natural
1374	Cinco Saltos	Cebo natural
1375	Cinco Saltos	Cebo natural
1376	Cinco Saltos	Cebo natural
1377	Cinco Saltos	Cebo natural
1378	Cinco Saltos	Cebo natural
1379	Cinco Saltos	Cebo natural
1380	Cinco Saltos	Cebo natural
1381	Cinco Saltos	Cebo natural
1382	Cinco Saltos	Cebo natural
1383	Cinco Saltos	Cebo natural
1384	Cinco Saltos	Cebo natural
1385	Cinco Saltos	Cebo natural
1386	Cinco Saltos	Cebo natural
1387	Cinco Saltos	Cebo natural
1388	Cinco Saltos	Cebo natural
1389	Cinco Saltos	Cebo natural
1390	Cinco Saltos	Cebo in situ

## 2. Identificación a nivel especie

### 2.1 Caracterización e Identificación morfológica

Con el objetivo de observar las estructuras formadas por cada aislado mediante el estudio de cultivos del patógeno en jugo V8-agar y solución de suelo no estéril, los aislados fueron divididos en dos grupos en función de su origen: madera y suelo/raíces.

En primer lugar, en todos los aislados provenientes de madera se observaron colonias blancas, levemente radiadas, esponjosas y compactas sin un borde definido. Se observó al microscopio micelio continuo, esporangios papilados, con forma ovoide (comúnmente llamados “alimonados”), terminales y caducos. Los zoosporangióforos fueron simples y con pedicelo corto. Ocasionalmente se formaron clamidosporas y se observó formación de estructuras de origen sexual, anteridio parágino y oosporas pleróticas. Los zoosporangios tuvieron un largo promedio de 37,8  $\mu\text{m}$  (rango: 34,6 - 42,3  $\mu\text{m}$ ); un ancho promedio de 25,1  $\mu\text{m}$  (rango: 24,6 - 30,1  $\mu\text{m}$ ) y una relación largo/ancho de 1,4. Estas características son típicas y corresponden con las descritas para la especie *Phytophthora cactorum*.

El segundo grupo corresponde a los aislados con origen en suelo/raíces. Éste a su vez fue subdividido en cuatro grupos: aquellos en que su morfología concordaba con la descrita en la literatura para *P. cactorum* (18/35); un segundo subgrupo con esporangios no papilados, algunos con proliferación interna similares a las especies descritas en el clado 6 (14/35); y finalmente un tercer grupo con aislados que no formaron esporangios típicos del género *Phytophthora* spp. (3/35).

Los aislados 1363 y 1368 obtenidos mediante la técnica “cebo *in situ*” presentaron zoosporangios no caducos y no papilados, con forma ovoide, terminales, desarrollados en zoosporangioforos simple. Usualmente se observó en los mismos proliferación interna tanto anidada como externa. Los zoosporangios tuvieron un largo promedio de 43,1  $\mu\text{m}$  (rango: 65,7 – 31,9  $\mu\text{m}$ ); un ancho promedio de 26,5  $\mu\text{m}$  (rango: 36,5 - 20,7  $\mu\text{m}$ ) y una relación largo/ancho de 1,6. Estas características corresponden con las descritas para la especie *Phytophthora lacustris*.

Por otra parte, los aislados 1339, 1353 y 1359 obtenidos mediante la utilización de la técnica de cebo en laboratorio produjeron zoosporangios no papilados, grandes, de

forma ovoidal, persistentes, terminales y con proliferación interna. Los mismos presentaron un promedio en largo de 63,3  $\mu\text{m}$  (rango: 71,9 – 49,0  $\mu\text{m}$ ), ancho de 41,2  $\mu\text{m}$  (rango: 55,8 – 34,4  $\mu\text{m}$ ) y una relación largo/ancho de 1,5. Además no se observó formación de clamidosporas en ningún caso. Estas características corresponden con las descritas para la especie *Phytophthora inundata*.

Los aislados 1315 (obtenido mediante cebo en laboratorio), 1369 y 1390 obtenidos desde cebo *in situ*, presentaron zoosporangios ovoides y no papilados, con proliferación interna y zoosporangióforos no ramificados. El promedio del largo de los zoosporangios fue de 52.2  $\mu\text{m}$  (60.0 - 36.4  $\mu\text{m}$ ), por 32.8  $\mu\text{m}$  (40.9 - 29.79  $\mu\text{m}$ ) de ancho y una relación largo/ancho de 1,6. De acuerdo con las anteriores características estos aislados podrían ser correspondientes a la especie *P. megasperma*.

Finalmente, el aislado 1366 presentó formación de clamidosporas, zoosporangios no papilados, de forma ovoide, sin proliferación interna y zoosporangióforos simples. Las dimensiones promedio de los zoosporangios fueron 46.6  $\mu\text{m}$  (54.7 - 37.1  $\mu\text{m}$ ) de largo, 28.2  $\mu\text{m}$  (36.5 - 23.2  $\mu\text{m}$ ) de ancho y una relación largo/ancho de 1,7.

## **2.2 Identificación molecular**

Dada la dificultad de identificar a nivel especie a todos los aislados utilizando sólo técnicas morfo-métricas, se procedió a la utilización de técnicas moleculares de identificación. En esta instancia, sólo se identificó molecularmente un aislado de madera (1378) a modo confirmatorio ya que las características morfológicas de los aislados de este origen eran consistentes con la descripción bibliográfica para la especie *Phytophthora cactorum*. Y del grupo de aislados de suelo y raíces, se seleccionaron aislados representativos de cada grupo formado por morfología.

La identificación molecular fue llevada a cabo mediante secuenciación del fragmento del gen amplificado ITS ADNr, utilizando los primers ITS1-ITS4. Los fragmentos de ADN amplificados tuvieron un tamaño entre las 800 y 900 pares de bases. Las secuencias fueron identificadas mediante análisis BLAST por su porcentaje de homología con cepas del database de *Phytophthora* y del GenBank. Se tomó como criterio de identidad que los aislados de *Phytophthora* sp. que posean un 97% o más de homología con las cepas de referencia.

Se lograron identificar molecularmente 21 aislados de Oomycetes, con un total de 8 especies. La especie con mayor frecuencia de aislamiento fue *P. cactorum* con un 63,16%. Las demás especies identificadas fueron: *P. lacustris*, *P. rosacearum*, *P. inundata* y *P. termophila* (Tabla 2).

La identificación de siete aislados de *Phytophthora* sp. fue confirmada mediante amplificación del gen COX I (Tabla 3). En todos los casos el producto de PCR resulto en aproximadamente 1200 pb. Las secuencias de los aislados identificados con ambos genes fueron almacenadas en la página del GenBank (Tabla 3).

Además de especies del género *Phytophthora* se lograron aislar e identificar molecularmente otros Oomycetes: *Phytopythium mercuriale* (1314), *Pythium alf. heterothallicum* (1316) y *Pythium aphanidermatum* (1358). Con estas especies se continúa trabajando en la identificación molecular.

**Tabla 3.** Identificación molecular a nivel de especies de aislados de peral representativos del género *Phytophthora sp.* y otros Oomycetes

N° Aislado	ITS <sup>1</sup>			COX <sup>2</sup>			Especie identificada
	Identidad (%)	Cepa de referencia	N° Acceso GenBank <sup>3</sup>	Identidad (%)	Cepa de referencia	N° Acceso GenBank	
1315	99	KU211258	-				<i>Phytophthora rosacearum</i>
1353	99	KP420011	MH397235				<i>Phytophthora inundata</i>
1363	98	KT383052	MH397236	100	JX272347.1	MK088529	<i>Phytophthora lacustris</i>
1366	99	MG865593	MH397237				<i>Phytophthora thermophila</i>
1368	98	KT383052	-	100	JX272347.1	MK088527	<i>Phytophthora lacustris</i>
1369	93	KU211241	MH397238	99	MF326858.1	MK105840	<i>Phytophthora rosacearum</i>
1372	97	KJ755110	MH397239				<i>Phytophthora cactorum</i>
1376	99	KJ128036	MH397240				<i>Phytophthora cactorum</i>
1377	99	KJ128036	MH397241				<i>Phytophthora cactorum</i>
1378	99	KJ128036	MH397242				<i>Phytophthora cactorum</i>
1383	99	KJ128036	MH397243				<i>Phytophthora cactorum</i>
1384	96	KJ128036	MH397244	92	MH620014.1	MK105841	<i>Phytophthora cactorum</i>
1385	99	KJ128036	-				<i>Phytophthora cactorum</i>
1386	92	KJ128036	MH397245	100	MH620014.1	MK105842	<i>Phytophthora cactorum</i>
1387	96	KJ128036	MH397246	99	AY129174.1	MK105843	<i>Phytophthora cactorum</i>
1390	93	KU211258	MH397247	97	MF326856.1	MK088528	<i>Phytophthora rosacearum</i>

<sup>1</sup> Aislados identificados mediante amplificación del gen ITS (Espaciador del transcritto interno)

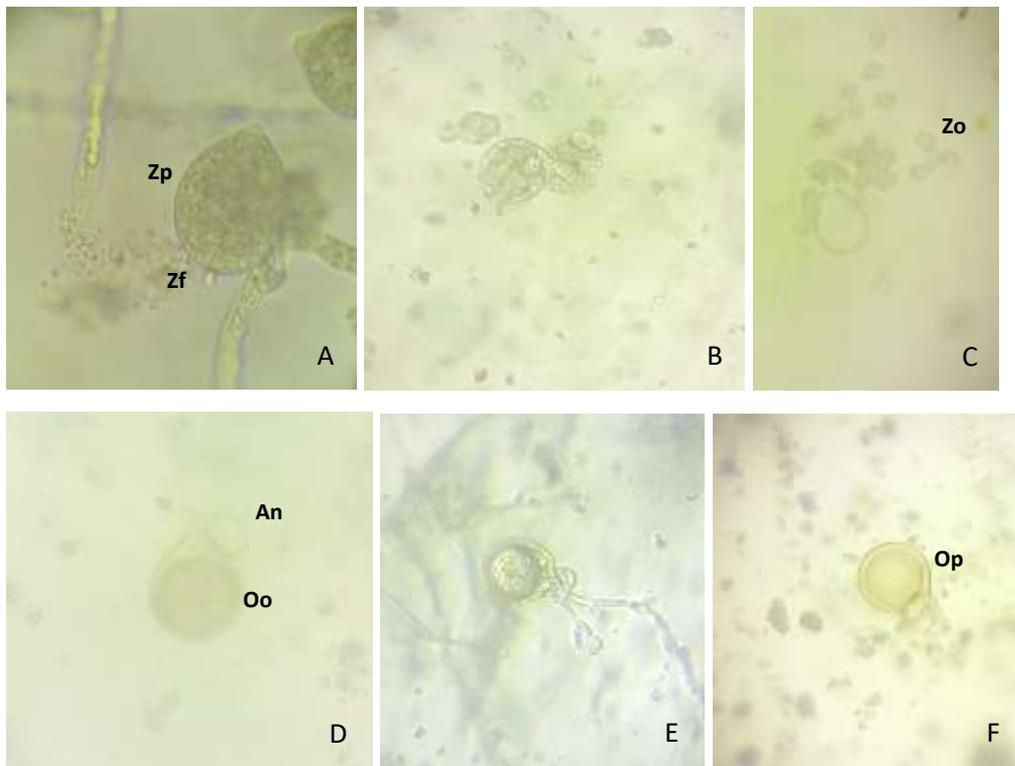
<sup>2</sup> Aislados identificados mediante amplificación del gen COX I (Citocromo oxidasa subunidad I)

<sup>3</sup> Número de acceso de las secuencias amplificadas del gen ITS y COX I depositadas en GenBank.

### 2.3. Descripción de especies identificadas de *Phytophthora* spp.

#### 2.3.1. *Phytophthora cactorum*

Los aislados identificados molecular y morfológicamente como esta especie formaron micelio no tabicado, presentaron formación de zoosporangios caducos con pedicelos cortos. Los zoosporangios (20-30) de cada aislamiento se midieron mediante utilización de un microscopio óptico (Tabla 4). Asimismo, todos los esporangios presentaron un ápice papilado, confiriéndole la forma característica de limón. La forma predominante observada fue ovoide o limoniforme (Figura 6). Los anteridios formados presentaron forma paráquina, con oosporas apleróticas (Figura 6). No se observaron clamidosporas (estructuras de resistencia).

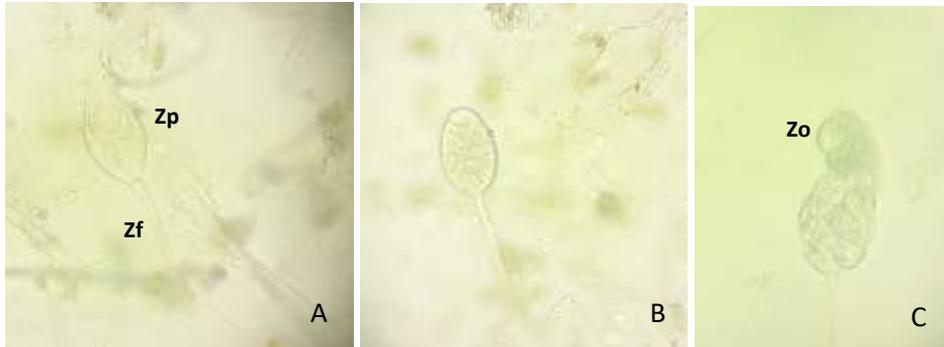


**Figura 6.** Detalle de estructuras asexuales y sexuales de *P.cactorum* observadas al microscopio óptico (40 X). Zoosporangio (Zp) papilado con zoosporangióforo (Zf) corto (A); zoosporangio germinado y liberando zoosporas (Zo) (B y C); oogonio (Oo) con anteridio paráquina (An) (D y E); oospora (Op) (F).

#### 2.3.2. *Phytophthora lacustris*

Los aislados de esta especie presentaron micelio continuo, sin tabiques. No se observaron hinchamientos en las hifas ("swellings") ni agrupaciones de hifas.

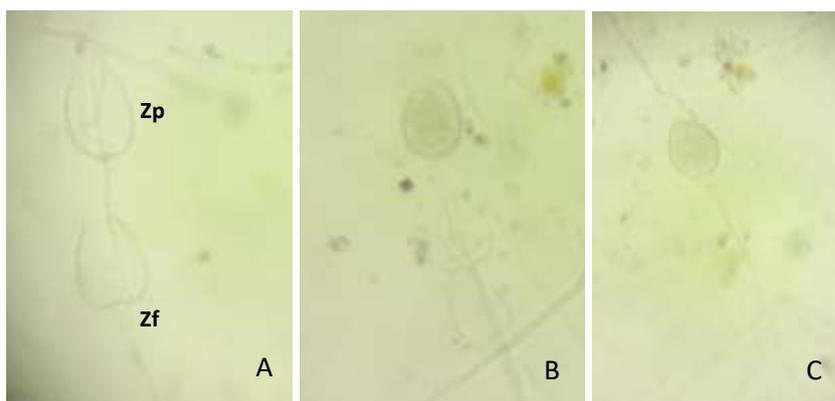
Presentaron zoosporangios con proliferación interna, no caducos, no papilados, terminales, ovoides, con zoosporangioforos no ramificados (Figura 7- Tabla 4). No se observaron estructuras sexuales ni de resistencia.



**Figura 7.** Detalle de estructuras asexuales de *P.lacustris* observadas al microscopio óptico (40 X). Zoosporangio anidado (Zp) con zoosporangióforo (Zf) largo (A); zoosporangio germinado (B); zoosporangio liberando zoosporas (Zo) (C).

### 2.3.3. *Phytophthora inundata*

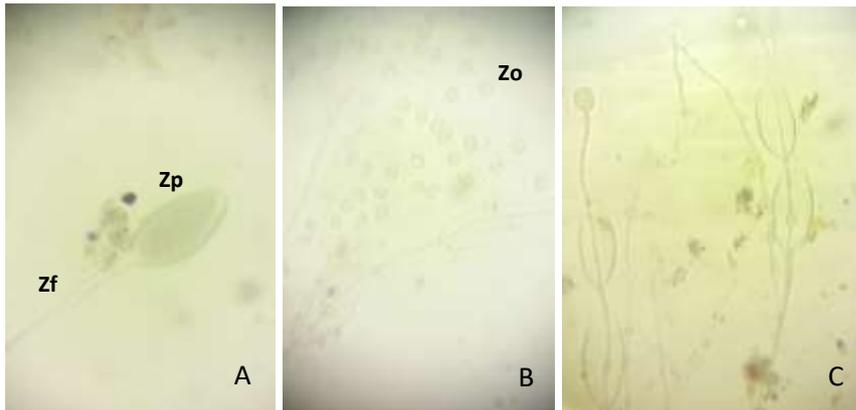
Los aislados de esta especie presentaron micelio continuo, sin tabiques. No se observaron hinchamientos en las hifas ("swellings") ni agrupaciones de hifas. Presentaron zoosporangios terminales, persistentes, no papilados de forma ovoide, con proliferación interna extendida. Los zoosporangioforos se observaron simples en su mayoría y algunos con ramificación simpodiales (Figura 8- Tabla 4). No se observaron estructuras sexuales ni de resistencia.



**Figura 8.** Detalle de estructuras asexuales de *P.inundata* observadas al microscopio óptico (40 X). Zoosporangio anidado (Zp) con zoosporangióforo (Zf) largo (A y B); zoosporangio germinado (C).

#### 2.3.4. *Phytophthora rosacearum*

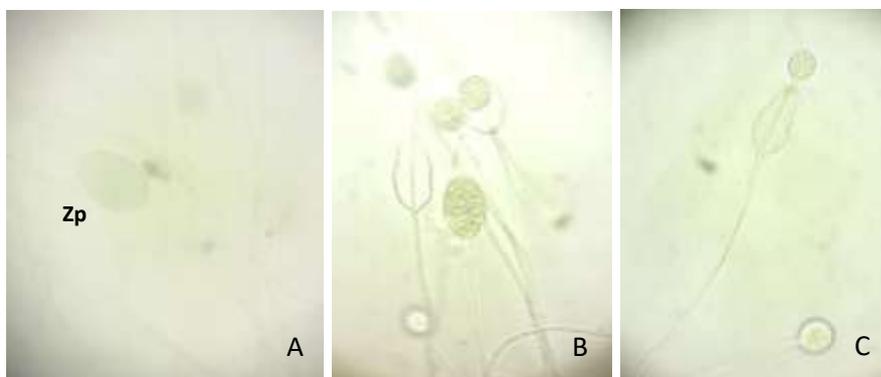
Los aislados de esta especie presentaron micelio continuo, sin tabiques. No se observaron hinchamientos en las hifas ("swellings") ni agrupaciones de hifas. Presentaron zoosporangios ovoides, no papilados con proliferación interna y extendida con zoosporangióforos simples. No se observaron estructuras sexuales ni de resistencia (Figura 9- Tabla 4).



**Figura 9.** Detalle de estructuras asexuales de *P.rosacearum* observadas al microscopio óptico (40 X). Zoosporangio (Zp) con zoosporangióforo (Zf) largo (A); zoosporangio germinado liberando zoosporas (Zo) (B); zoosporangios anidados (C).

#### 2.3.5. *Phytophthora thermophila*

Los aislados de esta especie presentaron micelio continuo, sin tabiques. No se observaron hinchamientos en las hifas ("swellings") ni agrupaciones de hifas. Se observaron zoosporangios ovoides, no papilados, en zoosporangióforos simples. Se observó formación de clamidosporas, no así de estructuras sexuales (Figura 10).



**Figura 10.** Detalle de estructuras asexuales de *P.thermophila* observadas al microscopio óptico (40 X). Zoosporangio (Zp) (A); zoosporangios anidados (B y C).

Las medidas micrométricas promedio de los zoosporangios correspondientes a aislados de cada especie se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Medidas promedio de zoosporangios de las distintas especies del género *Phytophthora* identificadas

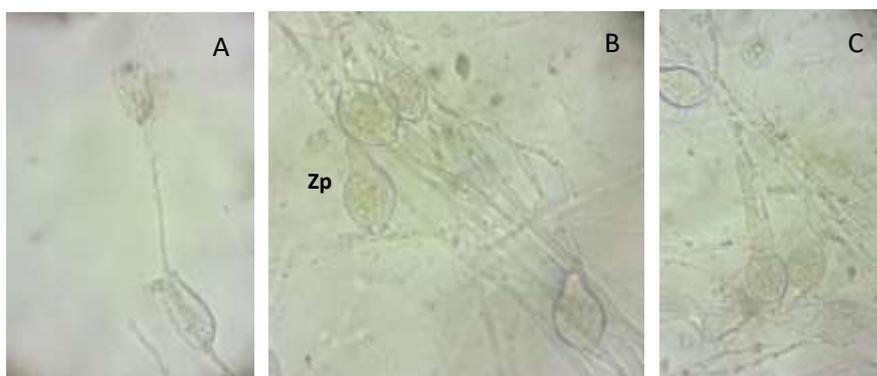
Especie	Largo (μm)	Ancho (μm)	Relación L/A	Rango Largo	Rango Ancho
<i>P. rosacearum</i>	52,2	32,8	1,6	60,0 - 36,4	40,9 - 29,79
<i>P. inundata</i>	63,3	41,2	1,5	71,9 - 49,0	55,8 - 34,4
<i>P. lacustris</i>	43,1	26,5	1,6	65,7 - 31,9	36,5 - 20,7
<i>P. thermophila</i>	46,6	28,2	1,7	54,7 - 37,1	36,5 - 23,2
<i>P. cactorum</i>	36,5	26,8	1,4	32,9 - 41,6	25,7 - 29,3

#### 2.4. Descripción morfológica de otras especies de Oomycetes identificadas molecularmente

En este caso, se describen las especies que fueron separadas morfológicamente como el grupo de aislados que no formaron estructuras morfológicas típicas, como *Pythium* spp., ó que formaron estructuras no típicas del género *Phytophthora* spp.

##### 2.4.1. *Phytopythium mercuriale*

Este aislado presentó zoosporangios papilados, de forma subglobosos u ovoides. Con proliferación interna extendida y zoosporangióforos sin ramificar. Cabe destacar que la característica de poseer zoosporangios papilados y además con proliferación interna, es típica del género *Phytopythium* (Figura 11).



**Figura 11.** Detalle de las estructuras de reproducción asexual producidas por *Phytopythium mercuriale* observadas al microscopio óptico (40 X). Zoosporangio anidado (Zp) (A); zoosporangios (B y C).

Respecto de los aislados de *Pythium* spp. presentaron colonias con abundante formación de micelio blanco de crecimiento abundante y superficial. No formaron estructuras reproductivas, sólo se observó al microscopio óptico el micelio continuo.

### **3. Caracterización de la patogenicidad de los aislados de *Phytophthora* sp**

En esta primera etapa se realizaron los experimentos de patogenicidad en brotes de dos variedades de la planta y en la fruta de pera.

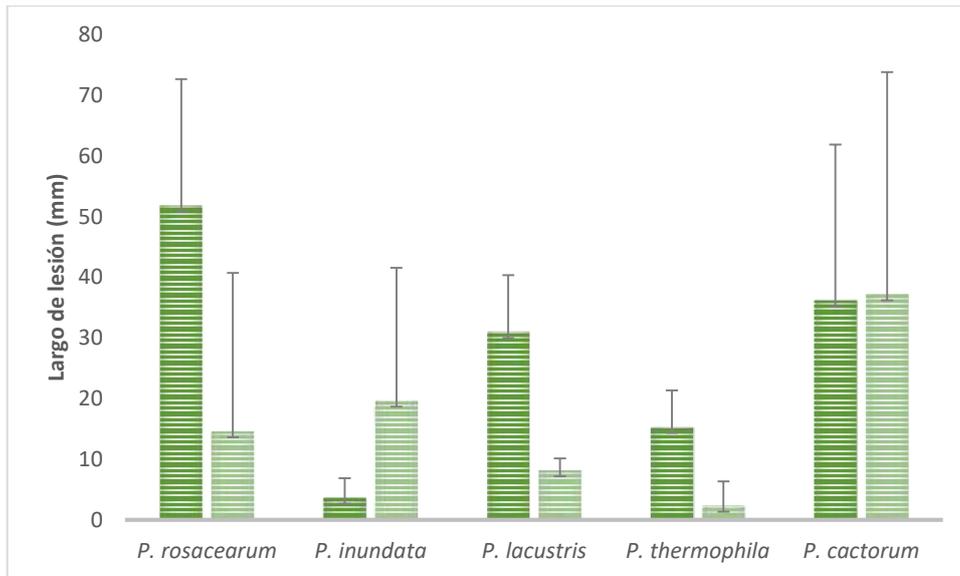
#### **3.1. Patogenicidad en brotes de peral**

Se evaluó la capacidad de cada aislado de *Phytophthora* sp. para producir infección en madera en dos cultivares de peral William's y d'Anjou, en un experimento macetas con sustrato estéril inoculadas.

Los aislados de todas las especies identificadas: *P. cactorum*, *P. rosacearum*, *P. inundata*, *P. termophila* y *P. lacustris* fueron patogénicos, produciendo lesiones en forma de cancro en los brotes de un año de pera. Estas lesiones tuvieron una coloración subcortical marrón-rojiza, y un largo promedio de lesión que varió desde 2,3 mm hasta 51,8 mm. El tratamiento testigo por su parte no presentó ninguna lesión, a excepción de una leve coloración oxidativa en la zona del corte.

*Phytophthora cactorum* fue la especie con aislados más patogénicos en ambos cultivares de pera con lesiones que variaron desde 36 a más de 50 mm (Figura 12).

El largo de la lesión producido por las distintas especies de *Phytophthora* spp. varió en función del cultivar evaluado. Por ejemplo, la especie *P.rosacearum* produjo una lesión mayor en el cv William's, mientras que *P. cactorum* e *P. inundata* produjeron mayores lesiones en brotes de d'Anjou (37,2 y 19,7 mm, respectivamente).



**Figura 12.** Largo promedio de lesión para cada especie de *Phytophthora* spp. en los cv. de pera William's y d'Anjou. El promedio resulta de las lesiones obtenidas de todos los aislados de cada especie a los 30 días; donde se utilizaron 5 brotes por aislado y por variedad. La barra en verde oscuro representa al cv William's y en verde claro al cv d'Anjou. Las líneas arriba de las barras corresponden al desvío estándar.

### 3.2. Patogenicidad en fruta de pera

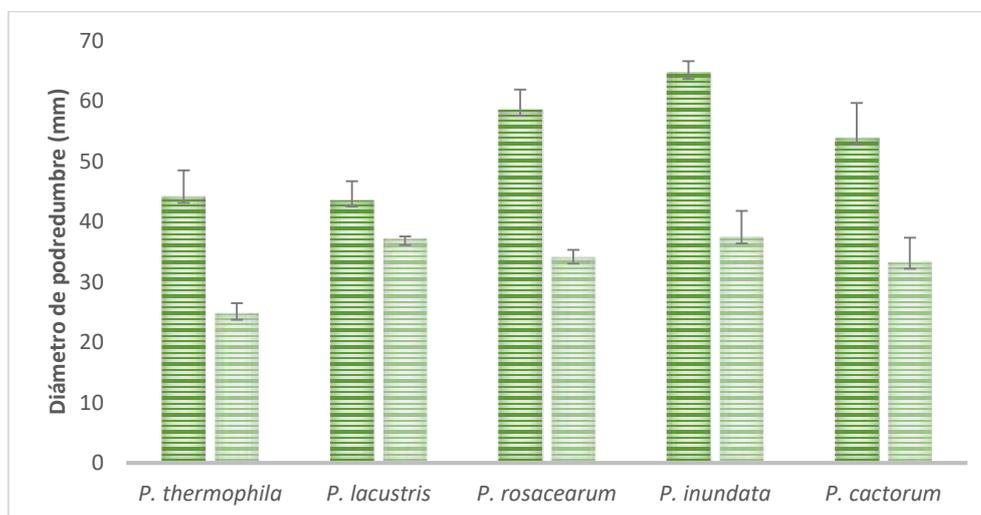
Se evaluó la capacidad de cada aislado de producir podredumbre en fruta de pera de cv. William's y d'Anjou, con inoculación artificial del patógeno en una herida.

El 98% de los aislados inoculados en fruta de pera tanto de William's como de d'Anjou produjeron podredumbre a los 5 días de la inoculación. Las podredumbres comenzaron a mostrar manchas de color marrón oscuro a marrón claro, firmes al tacto con márgenes irregulares y difusos (Figura 13). A 15 días de la inoculación, más del 50% de los aislados había colonizado la superficie del fruto con micelio y en algunos casos, se observó la formación de estructuras de reproducción asexual (zoosporangios).



**Figura 13.** Fotografía de la podredumbre causada por *Phytophthora* sp. en frutos de cv. William's.

La especie más agresiva en ambos cultivares de pera fue *Phytophthora inundata*. Esta especie produjo una podredumbre que alcanzó los 64,6 mm en William's y 37,4 mm en d'Anjou (Figura 14).



**Figura 14.** Diámetro de podredumbre promedio producido por aislados de *Phytophthora* sp. en fruta de pera cv William's y d'Anjou. El promedio resulta de las lesiones obtenidas de todos los aislados de cada especie a los 7 días; donde se utilizaron 5 frutos por aislado y por variedad. Barras de color verde oscuro representan al cv William's y las de color verde claro a d'Anjou. Promedio de 5 frutos por especie y variedad. Las líneas arriba de las barras corresponden al desvío estándar.

Aquellos aislados de las especies de *Phytophthora* que tuvieron mayor virulencia y frecuencia de aislamiento fueron seleccionados para su evaluación como patógenos de raíces en pie franco de peral. Además, se incorporó un aislado de *Pythium aphanidermatum* ya que generó podredumbre tanto en madera (brotes), como en fruto de pera.

### 3.3. Patogenicidad en pie franco de peral

Todos los aislados evaluados fueron patogénicos en las raíces de pie franco de 2 años de edad. Al final del ensayo las raíces principales de los pies presentaban lesiones necróticas de diferentes dimensiones, podredumbre de las raíces secundarias y la principal con una fuerte reducción del sistema radicular en su totalidad.

El aislado más agresivo correspondió a *Phytophthora cactorum*, que desarrolló lesiones necróticas en la raíz principal, las que cubrían totalmente el diámetro de la misma y en algunos casos superaban los 30 mm de largo. Además, en las plantas inoculadas con este

aislado se observó que no hubo desarrollo alguno de pelos absorbentes ni raíces secundarias.

Por otra parte, *P. lacustris* produjo lesiones necróticas de tamaño medio, similares a manchas. Se observó un desarrollo incipiente de raíces secundarias y muy poco desarrollo de pelos absorbentes.

*P. rosacearum* tuvo un comportamiento similar al de *P. lacustris*, con lesiones necróticas en el sistema radicular de un tamaño medio a pequeño y un desarrollo incipiente de raíces secundarias.

En el caso de *P. inundata* fue la menos virulenta. Desarrolló lesiones necróticas del tamaño de puntos pequeños (menos de 3 mm) en la raíz principal. El pie presentó un desarrollo incipiente de pelos absorbentes y raíces secundarias,

*Pythium aphanidermatum* si bien produjo lesiones tipo puntuaciones, de escaso desarrollo (menores de 3 mm), no permitió el desarrollo del sistema radicular. El portainjerto sólo presentaba desarrollada la raíz principal, con muy poco desarrollo de pelos absorbentes y raíces secundarias.

Si bien entre los aislados de las diferentes especies no se encontraron diferencias significativas (Tukey, 95% confianza), cuando se realizó el análisis con la escala adaptada de Pérez-Sierra *et al.* (2013) a nivel de desarrollo radicular, todos los aislados resultaron sumamente virulentos, se observándose diferencias en el tamaño de lesión desarrollada en la raíz principal de cada planta (Tabla 6).

Todos los aislados fueron reaislados tanto desde raíces afectadas en medio selectivo AHM-PARP como del suelo de las macetas en cebos-trampa.

**Tabla 5.** Patogenicidad en raíces de aislados seleccionados de *Phytophthora sp.*

Aislados	Desarrollo radicular*	Índice McKinney**	Tamaño lesiones
<i>P. cactorum</i>	93,33± 2,89 <sup>a</sup>	98,25	> 10 mm
<i>P. rosacearum</i>	92,00 ± 5,57 <sup>a</sup>	96,84	3-9 mm
<i>P. lacustris</i>	91,67 ± 7,64 <sup>a</sup>	96,49	3-9 mm
<i>P. inundata</i>	90,00 ± 8,66 <sup>a</sup>	94,74	<3mm
<i>P. aphanidermatum</i>	88,33 ± 12,58 <sup>a</sup>	92,98	<3mm
Testigo	18,33 ± 7,64 <sup>b</sup>	19,30	Sin lesiones

\*El desarrollo radicular se calcula mediante la comparación de las plantas con el testigo, formando grupos 1= 0-25%; 2= 26-50%; 3= 51-75%; 4= 76-100% de pérdida de raíces. \*\*Para calcular el índice McKinney se utiliza la siguiente fórmula:  $MI = [\sum (R \cdot N)] \cdot 100 / H \cdot T$ ; donde R es el grupo evaluado previamente, N es el número de plantas en esa clase, H es el mayor valor de esa clase y T es el total del número de plantas.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó un muestreo en sitios de producción de pera del Alto Valle de Río Negro y se lograron aislar, identificar y caracterizar por patogenicidad a 35 aislados de *Phytophthora* sp. en peral.

Teniendo en cuenta la dificultad para el aislamiento de especies de *Phytophthora*, se evaluaron diferentes técnicas que incluyeron el muestreo de madera con síntomas de canchales producidos por *Phytophthora* sp. como de suelo/raíces en plantaciones de pera con antecedentes de la enfermedad. La técnica más eficaz fue la utilización de frutos-cebos, particularmente “cebos *in situ*” y “cebos naturales”. En este trabajo se utilizaron como cebos a frutos de pera en estado óptimo de madurez fisiológica, otros autores como McIntosh (1966), han utilizado esta misma técnica pero con fruta inmadura obteniendo resultados similares. Autores tales como Cooke *et al.* (2007), Jeffers & Aldwinckle (1987), Harris & Bielenin (1986), Reeser *et al.* (2011), Vettraino *et al.* (2005), coinciden en que la mejor técnica de aislamiento de *Phytophthora* principalmente desde suelo y cursos de agua, es mediante el uso de cebos de huéspedes selectivos, y en menor importancia desde tejidos infectados del hospedante. Este método está basado en el uso de hospedantes altamente susceptibles que son rápidamente infectados por *Phytophthora* sp. y por ello es tan ampliamente utilizado, inclusive más que la utilización únicamente de medios selectivos (Cooke *et al.*, 2007; Erwin & Ribeiro 1996). Sin embargo, la utilización de cebos posee algunas desventajas, entre ellas la más importante es que cuando es utilizado para establecer ocurrencia y distribución, dado que sólo especies específicas del fruto-trampa utilizado lograrán colonizarlo, se reduce así el número total de aislados que pueden ser encontrados. Aún si algunas especies son capaces de colonizar el tejido del cebo, existen otras especies que son más competitivas y pueden excluir al resto durante el proceso de incubación (Cooke *et al.*, 2007).

Se lograron identificar cinco especies del género *Phytophthora*, un aislado de *Phytophthora mercuriale* y dos especies de *Pythium* spp. Todos aislados de suelo y

corteza de plantas con síntomas de la enfermedad “Podredumbre del cuello” en peral, cv. William’s. Rivero (2010) y Rossini *et al.* (1997) en estudios en esta provincia lograron identificar como única causa de la podredumbre de cuello a *P. cactorum*, en este trabajo se demuestra que si bien esta especie fue la más frecuentemente aislada, existen otras especies relacionadas a la podredumbre de cuello y raíces en cv William’s.

De las especies identificadas, cuatro pertenecen al clado 6: *P. inundata*, *P. rosacearum*, *P. lacustris* y *P. thermophila*. Las especies de *Phytophthora* (del griego “destructor de plantas”) tienen un estilo de vida hemibiotrófico o necrotrófico como patógenos primarios de plantas, aunque muchas especies del género denominadas “acuáticas” pertenecientes a los clados filogenéticos 6 y 9 poseen un estilo de vida como saprófitos y patógenos necrotrófos oportunistas (Erwin & Ribeiro 1996, Brasier *et al.*, 2003, Jung *et al.*, 2011; 2018, Nechwatal *et al.*, 2013).

Abad (2008) expone que debido a que *Phytophthora* es un género que posee un número limitado de caracteres morfológicos y con una gran variabilidad en los mismos, que existen aislados atípicos y que posee una gran dificultad a la hora de esporular en condiciones de laboratorio, es necesaria una identificación con técnicas moleculares. Autores como Martin *et al.* (2012) agregan que, con la mayor atención prestada al género *Phytophthora* en los últimos 15 años en respuesta al impacto ecológico y económico de varias especies invasoras (por ejemplo *P. ramorum*), ha habido un aumento significativo en el número de especies descritas, lo cual dificulta aún más su identificación.

En cultivo de peral, Yamak *et al.* (2002) lograron identificar con técnicas culturales sólo al 5-10% de un total de 749 aislados. Con el uso de técnicas moleculares el número alcanzó a 180 aislados identificados distribuidos en 5 clados distintos. En esta tesis, mediante la amplificación de la región ITS y confirmación mediante COX I, se lograron identificar más del 54% de los aislados, resultados similares a los obtenidos por Yamak *et al.* (2002).

Aunque todos los aislados de *Phytophthora* spp. evaluados fueron patógenos en las distintas pruebas de patogenicidad, *P. cactorum* fue la especie más frecuentemente aislada y la especie más virulenta en portainjerto franco de peral. Esto coincide con

reportes de otras partes del mundo tales como Grove & Boal (1991); Erwin & Ribeiro (1996); Thomidis (2001) y Yamak *et al.* (2002), donde se demuestra que esta especie es patogénica en peral. Sin embargo, en la región no existen antecedentes de *Phytophthora* sp. afectando raíces de peral sino afectando la variedad, dado que el pie franco y de membrillero era considerado resistente al patógeno (Rivero, 2010; Rossini *et al.*, 1997). Este sería el primer reporte de especies de *Phytophthora* afectando raíces de peral.

En este trabajo, se pudo comprobar que hay mayor diversidad de especies de *Phytophthora* asociadas al cultivo de pera. Se pudieron establecer que existen otras especies además de *P. cactorum* relacionadas a la podredumbre de raíces y cuello en plantaciones de peral cv. William's relevadas en la región del Alto Valle Oeste, a diferencia de lo expuesto por Rivero (2010) y Rossini *et al.* (1997).

En trabajos previos, en la región del Alto Valle de Río Negro ya se había citado a *P. lacustris* como causa de podredumbres en frutos de peral a campo (Sosa *et al.*, 2016), pero esta es la primera vez que se lo encuentra relacionado a la podredumbre de raíces y cuello del peral. *P. lacustris* puede comportarse como patógeno de raíces finas de árboles estresados por episodios de inundación o sequía. Por lo tanto, se lo considera un patógeno oportunista de raíces en hábitats húmedos (ó húmedos temporalmente) y ya se lo ha encontrado infectando raíces de distintos árboles frutales y forestales que se encuentran en suelos húmedos o ambientes ribereños en Europa, Estados Unidos y Australia (Nechwatal *et al.*, 2013).

Por otra parte, *P. inundata* ha sido citada como causa de podredumbre de raíces en arbustos y plantas nativas en Australia y Chile, luego de periodos de anegamiento (Brasier *et al.*, 2003; Stukely *et al.*, 2007; Vial *et al.*, 2005) pero no había sido citada hasta el momento en Argentina ni en raíces de peral.

Por su parte, *P. rosacearum* y *P. termophila* han sido citadas en bosques y ecosistemas ribereños y en suelos con anegamiento en Australia y Sudáfrica (Bily *et al.* 2018; Hansen *et al.* 2009, Hüberli *et al.* 2013, Jung *et al.* 2011, Nagel *et al.* 2013), junto con *P. inundata*, representantes del clado 6 reconocidos como patógenos oportunistas que pueden llegar

a ser agresivos en árboles si se les dan las condiciones de humedad apropiadas (Jung & Nechwatal, 2008).

El género *Phytophthium* ha sido citado como causal de podredumbres radiculares, particularmente las especies *Phpy. helicoides* y *Phpy. Vexans* en plantas ornamentales (Yang & Hong, 2016) pero hasta el momento se desconoce la virulencia de aislados de la especie *Phytophthium mercuriale*. Caso similar ocurre con *Pythium aphanidermatum* que ha sido citado como causal de enfermedades en plantas, especialmente “damping-off” y podredumbres radiculares (Daughtrey & Benson 2005; Sutton *et al.*, 2006).

## CONCLUSIONES PARCIALES

En esta tesis, se obtuvo variabilidad de especies del género *Phytophthora* además de *P. cactorum* afectando tanto el cuello como raíces de perales en plantaciones comerciales del Alto Valle de Río Negro.

Éste se considera el primer estudio de diversidad de especies de *Phytophthora* en plantaciones de peral. Cinco especies de *Phytophthora*: *P. cactorum*, *P. lacustris*, *P. inundata*, *P. rosacearum* y *P. thermophila* fueron identificadas molecularmente.

La especie *P. cactorum* es la especie aislada con mayor frecuencia, sin embargo se verificó la patogenicidad de *P. lacustris* en madera de cultivares de pera, ya descritos en la zona como patógenos de fruta de pera en poscosecha.

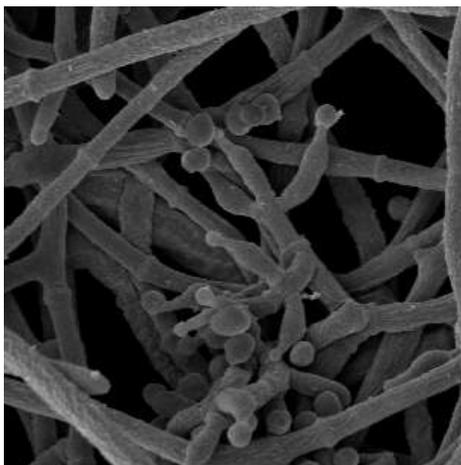
Por primera vez para la región se establece a *Phytophthora* spp. como patógeno de raíz en pie franco de peral. Aislados de *P. cactorum*, *P. lacustris*, *P. inundata* y *P. rosacearum* fueron responsables de pérdida de raíces superiores al 90%.

Queda demostrado el potencial de estas especies de *Phytophthora* como patógenos de poscosecha en fruta de las variedades susceptibles William's y D'anjou.

Se identificaron especies de otros géneros de Oomycetes, por lo cual se continúa trabajando en la identificación precisa con el uso de otros genes.



### CAPÍTULO III. Aislamiento, selección e identificación de *Trichoderma* spp.



## INTRODUCCIÓN

El control biológico de patógenos basado en la utilización de microorganismos antagonistas, ha recibido especial atención en los últimos treinta años, y se presenta como una estrategia promisorio alternativa al uso de fungicidas de síntesis química. La introducción del biocontrol en el manejo integrado de enfermedades de un cultivo, es la forma de explotar sus posibilidades de uso (Wilson & Wisniewski, 1989). Los agentes de control biológico (ACB) de enfermedades de suelo promisorios incluyen hongos antagonistas del género *Trichoderma* spp. (Coşkuntuna & Özer, 2008). Manejar la microflora existente en contacto con las plantas es posible controlar a los patógenos de las plantas (Mondino & Vero, 2006).

El control o prevención de algunas enfermedades de plantas por hongos de las especies del género *Trichoderma*, es una alternativa atractiva al uso de fungicidas químicos (Cook, 1993), y por lo tanto, un componente importante de la agricultura ecológica moderna en que se plantea el Manejo Integrado de Plagas (MIP) (Monte, 2001).

Las especies del género *Trichoderma* son hongos oportunistas, simbioses avirulentos de plantas, que cumplen una función importante como parásitos y antagonistas de muchos patógenos, protegiendo a las plantas de enfermedades (Howell, 2003). Especies de *Trichoderma* son comúnmente aisladas de suelos, madera húmeda, hongos o árboles en bosques, donde son fácilmente reconocidos por sus masas de conidios que son generalmente de color verde, y con menos frecuencia blanco o amarillo (Chaverri & Samuels, 2003).

Las características antifúngicas de *Trichoderma* spp. son conocidas desde 1930, y desde entonces se han realizado grandes esfuerzos para utilizar a este hongo en el control de enfermedades (Samuels, 1996). Hongos del género *Trichoderma* no sólo son antagonistas de patógenos de plantas (Harman *et al.*, 2004; Benitez *et al.*, 2004) sino también, son un componente de la rizósfera que permite mejorar el crecimiento de las plantas con asociaciones endófitas (Bailey & Lumsden, 1998; Druzhinina *et al.*, 2010). El hecho de que muchas especies de *Trichoderma* hayan demostrado actividad antifúngica y de estimulación de crecimiento de plantas, ha llevado a su explotación como agentes

de control biológico, y en este sentido, algunos aislados se utilizan en formulaciones disponibles comercialmente (Chaverri & Samuels, 2003).

Muchas son las especies de *Trichoderma* que se han identificado con potencial para aplicaciones en control biológico en distintos cultivos. Se ha reportado el biocontrol de aislados de *T. harzinaum* sobre la enfermedad causada por *Sclerotium rolfsii* en plántulas de tomate (Alonso Reyes *et al.*, 2002); *Sclerotium cepivorum* en ajo y cebolla (Ozbay & Newman, 2004); *Fusarium oxysporum* en tomate y cebolla (Datnoff *et al.*, 1995); *Phytophthora parasitica*, *P. capsicii* y *P. infestans* en pimiento y papa (Smith *et al.*, 1990); distintos aislados de *Trichoderma* sp. frente a *Phytophthora capsici* en pimiento picante (Bae *et al.*, 2011); entre otros. En árboles frutales existe también una amplia lista de antecedentes de control, por parte de *Trichoderma*, de distintos patógenos como ser *Phytophthora nicotianae* y *P. boehmeriae* de manzana en cultivos *in vitro* (Bhaik, 2017); *P. cactorum* en plantaciones comerciales de manzana. (Smith *et al.*, 1990); *Stemphylium vesicarium* en perales mediante uso de productos comerciales (Rossi & Pattori, 2009); *Rosellinia necatrix* y *P. cinnamomi* en palta (Freeman *et al.*, 1986; Ozbay & Newman, 2004); control de *Armillaria tabescens* en raíces de durazneros (Schnabel *et al.*, 2011), entre otros.

Teniendo en cuenta que *Trichoderma* sp. es un importante biocontrolador utilizado ampliamente a nivel mundial, que actualmente se demandan métodos de producción más amigables e inoocuos con el ambiente, el productor y el consumidor y que hasta el momento no existen citas de aislados de *Trichoderma* spp. de plantaciones de perales y su aplicación en ellos; en este capítulo se plantea la siguiente hipótesis:

“En plantas sanas que se encuentran en plantaciones comerciales de pera de la región del Alto Valle de Río Negro, con antecedentes de podredumbre del cuello y corona causada por *Phytophthora* sp., existen especies nativas del género *Trichoderma* con potencial biocontrolador de este patógeno”.

#### **Objetivo general del capítulo**

Obtener aislados de *Trichoderma* spp. de las zonas de producción de pera, capaces de controlar a aislados de *Phytophthora* spp. causales de podredumbre y declinamiento de plantas de peral.

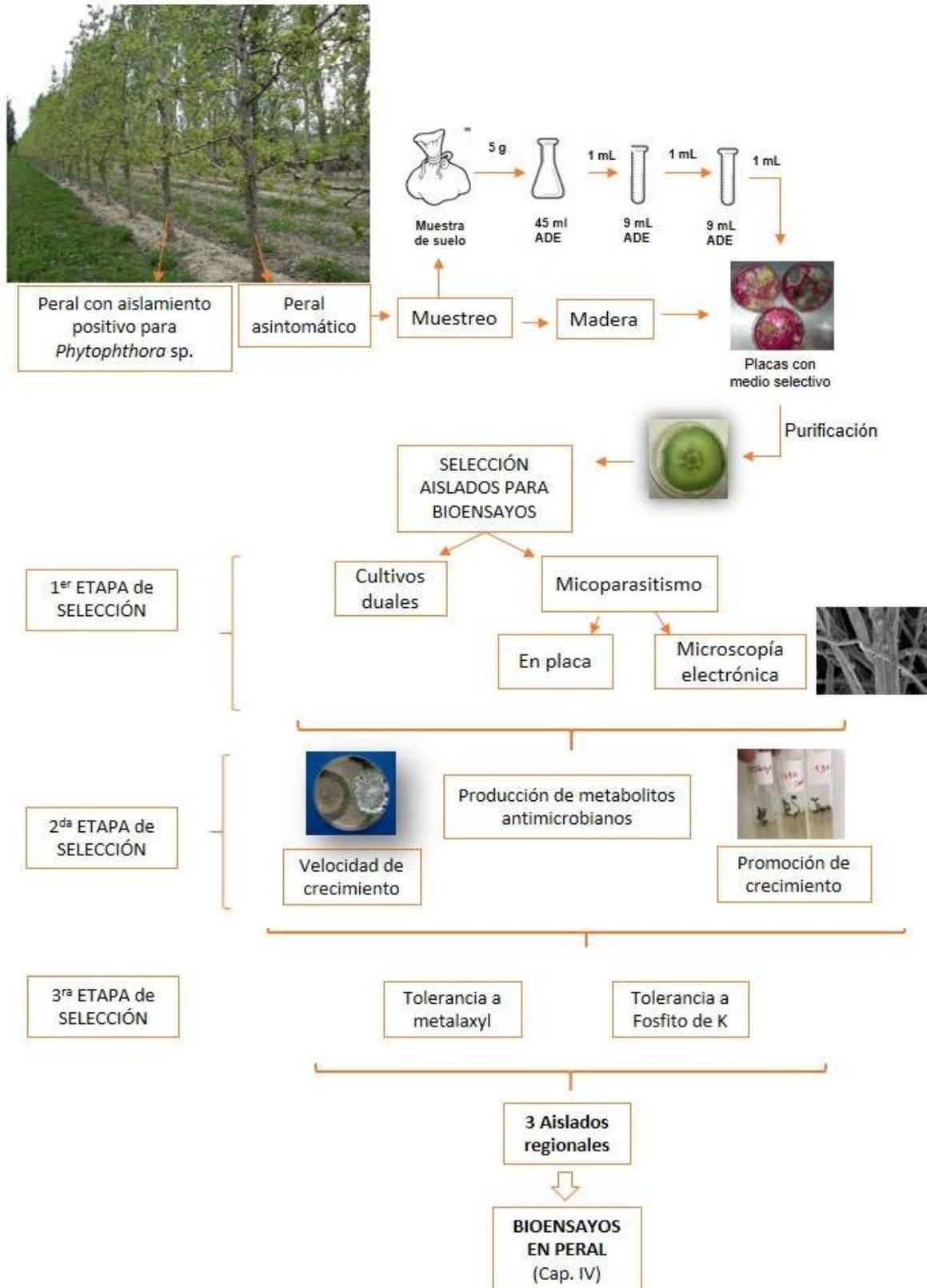
### **Objetivos específicos**

-Aislar e identificar hongos del género *Trichoderma* de suelo y madera de peral, en los mismos sitios productivos de los cuales se aisló a *Phytophthora* spp.

-Estudiar la capacidad antagónica de los aislados de *Trichoderma* obtenidos en el objetivo anterior frente a aislados de *Phytophthora cactorum*, *P. inundata*, *P. rosacearum* y *P. lacustris*.

-Seleccionar aquellos aislados de *Trichoderma* spp. con mejores capacidades antagónicas para su utilización en bioensayos en plantas de peral.

# ESQUEMA GENERAL

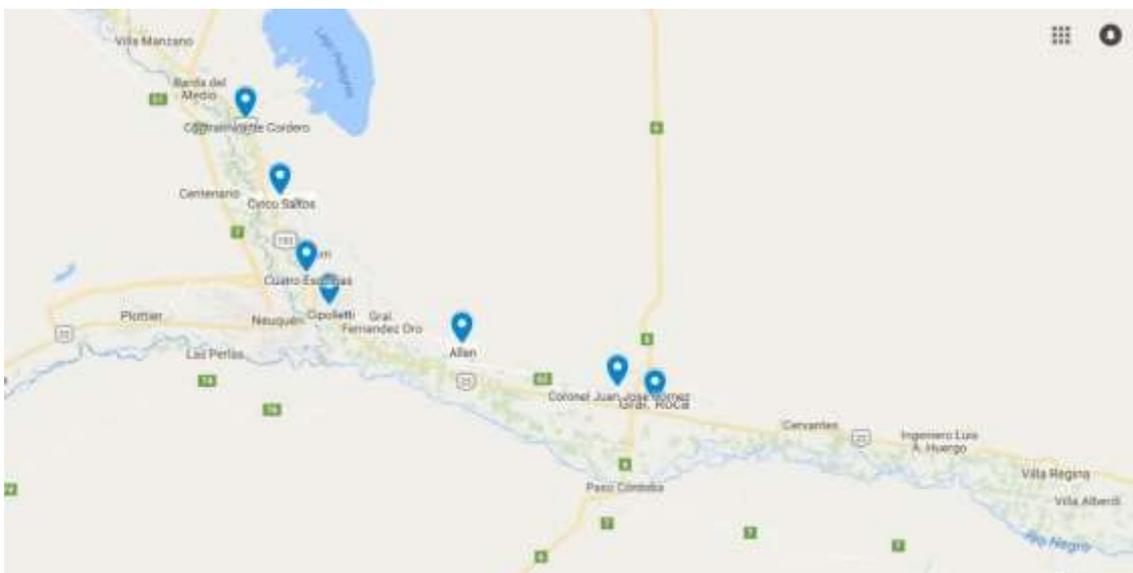


## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Aislamiento de hongos del género *Trichoderma* spp.

#### 1.1. Área de estudio

Con el objetivo de obtener aislados de *Trichoderma* spp. representativos de las zonas de producción de pera del Alto Valle de Río Negro (Patagonia Norte), se realizó el muestreo a campo en las siguientes localidades de producción: General Roca, Coronel Juan José Gómez, Allen, Cipolletti, Cuatro Esquinas, Cinco Saltos y Contraalmirante Cordero (Figura 15).



**Figura 15.** Mapa del Alto Valle de Río Negro donde se observan las localidades en las cuales se seleccionaron los establecimientos productivos

#### 1.2 Estrategia de aislamiento

A efectos de verificar la hipótesis planteada, de que el antagonista presenta mayor eficacia cuando se aísla del mismo lugar y condiciones en que debe actuar frente al patógeno, y con el propósito de aumentar la presión de selección en el aislamiento, se trabajó en plantaciones comerciales de pera con antecedentes de la enfermedad podredumbre del cuello y corona causada por *Phytophthora* sp.

Se realizó un muestreo dirigido obteniendo corteza y suelo, de aquellas plantas que no presentaran síntomas de la enfermedad y se encontraran en cercanía de plantas con

síntomas de podredumbre por *Phytophthora*. El mismo se llevó a cabo dejando las primeras dos filas de plantas como bordura y las primeras tres plantas de cada fila. El muestreo de suelo se realizó a 15 cm de profundidad, descartando los primeros 5 cm del mismo y consistió en muestras compuestas, se tomaron 4 puntos del suelo de alrededor de la planta seleccionada y luego se mezclaron en una misma bolsa estéril para ser evaluada en el laboratorio.

En laboratorio, el aislamiento se realizó, para las muestras de suelo, mediante siembra de 100 µL de una suspensión de suelo con agua destilada estéril del orden de  $1 \times 10^{-3}$ . La siembra se realizó por duplicado en placas de Petri con medio de cultivo selectivo para *Trichoderma*, rosa de bengala de Martin (Dhingra & Sinclair 1985). Las placas fueron incubadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 48 a 72 horas. Luego, los aislados se repicaron en placas con medio de cultivo agar papa dextrosa (39 g/L APD, Britania).

Para el aislamiento de las muestras de corteza de peral, se tomaron 5 fragmentos de 1cm de ancho por 3-4 cm de largo de la corteza muestreada. Los mismos se desinfectaron superficialmente colocándolos por 30 segundos en alcohol al 70% (V/V), seguida de 1 minuto en hipoclorito de sodio al 5% (V/V) y posterior enjuague por 30 segundos en agua destilada estéril (ADE) (Ek-Ramos *et al.* 2013). Posteriormente los trocitos fueron transferidos a placas con medio selectivo rosa de bengala de Martin.

Una vez desarrolladas las colonias y verificada la presencia de aislados de *Trichoderma*, de todos los aislados desarrollados se hicieron cultivos monospóricos puros utilizando la técnica de punta (Alfenas, 2007). Los aislados obtenidos fueron luego conservados en el cepario de Fitopatología del Instituto de Biotecnología Agropecuaria (IBAC), de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, a  $5^\circ\text{C}$ , en tubos Eppendorf con 1 mL de ADE.

## **2. Estudios de la capacidad antagónica contra especies de *Phytophthora*.**

### **ESTRATEGIA DE SELECCIÓN**

Con el fin de seleccionar aquellos aislados de *Trichoderma* spp. con mayores capacidades o atributos como biocontrolador de *Phytophthora* spp. para los ensayos a campo, se llevó a cabo una estrategia de selección dividida en 3 etapas:

## 2.1. Primera etapa

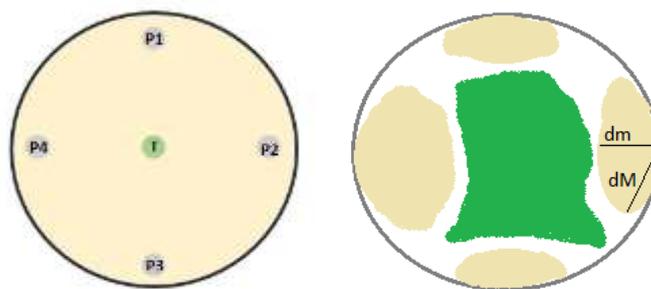
Para realizar el primer “screening” *in vitro* de los aislados de *Trichoderma* spp. se utilizaron las siguientes especies de *Phytophthora* (número de aislado) obtenidas en el Capítulo II:

- *P. cactorum* (1378)
- *P. inundata* (1353)
- *P. rosacearum* (1315)
- *P. lacustris* (1368)

### 2.1.1. Efecto antagónico *in vitro*

Uno de los atributos destacados en un agente biocontrolador es la capacidad de inhibición de crecimiento de la colonia del patógeno por producción de sustancias solubles y capaces de difundir en el agar o competencia por espacio. Por ello, en esta primera etapa, se evaluó mediante el método de cultivos duales modificado (Crovo & Clemente, 2015). Placas de Petri de 90 mm con 15 mL de APD se dividieron en 4 cuadrantes y en cada uno de ellos y a 2 mm del borde se sembraron discos de 3 mm de diámetro de cultivos de 7 días de crecimiento de cada una de las especies de *Phytophthora* evaluadas. En el centro de la placa, se colocó un disco con el antagonista. En todos los casos, se realizaron 3 repeticiones, siguiendo un diseño completamente aleatorizado. Las placas se incubaron a  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , con fotoperíodo de 12 horas de luz-oscuridad (Figura 2). Placas con sólo el disco de los patógenos y sólo el antagonista se utilizaron como testigos. A las 72 h se midió el diámetro mayor y menor de las colonias de los patógenos, y se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno según la fórmula que se detalla a continuación (Figura 16) (Guigón-López et al., 2010).

$$\% \text{ de Inhibición} = \left( \frac{\text{Diámetro mayor} - \text{Diámetro menor}}{\text{Diámetro mayor}} \right) \cdot 100$$



**Figura 16.** Esquema representando la técnica de cultivo dual modificada. P<sub>1-4</sub> representa cada uno de las especies de *Phytophthora*. T representa al aislado de *Trichoderma sp.* evaluado. dm representa el diámetro menor de la colonia del patógeno y dM el diámetro mayor.

### 2.1.2. Evaluación del micoparasitismo

Teniendo en cuenta que el micoparasitismo es un atributo importante de un agente biocontrolador, se estableció la capacidad de micoparasitismo de los aislados de *Trichoderma* frente a *Phytophthora* utilizando dos metodologías.

#### 2.1.2.1. Micoparasitismo del antagonista sobre el patógeno en cultivo dual

Se estudió la zona de interacción entre el patógeno y el antagonista en cultivos duales en placa con medio APD. Para evaluar la capacidad antagónica por micoparasitismo, se utilizó la escala creada por Elías & Arcos (1984), que se basa en el nivel de invasión de la superficie, colonización y esporulación de *Trichoderma sp.* sobre *Phytophthora sp.* para establecer 5 grados (0-4) (Tabla 6).

**Tabla 6.** Escala de micoparasitismo *in vitro* de *Trichoderma spp.* frente a *Phytophthora spp.* tomada de Elías & Arcos (1984)

Grado	Capacidad antagónica
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno
1	Invasión de $\frac{1}{4}$ de la superficie de la colonia del hongo patógeno
2	Invasión de $\frac{1}{2}$ de la superficie de la colonia del hongo patógeno
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno
4	Invasión total de la colonia del hongo patógeno y esporulación sobre ella

Además, a aquellos aislados que presentaron grados altos de micoparasitismo según dicha escala, se les realizaron preparados de la zona de contacto de ambos microorganismos para observar al microscopio óptico.

#### *2.1.2.2. Caracterización del micoparasitismo por microscopía electrónica de barrido.*

Con el objetivo de caracterizar la zona de interacción antagonista-patógeno, se estudió un aislado de *Trichoderma* calificado en cada grado de la escala de micoparasitismo mencionada en el punto anterior siguiendo la metodología de Chambers & Scott, 1995 y Kexiang *et al* 2002. Posteriormente, las muestras fueron enviadas y procesadas a través del servicio de microscopía electrónica de CONICET-CCT-BB (Ex CRIBABB), Bahía blanca, Buenos Aires.

## **2.2. Segunda etapa**

En esta segunda etapa de selección de aislados regionales de *Trichoderma* sp., se partió de aquellos aislados con mejores características para el biocontrol de *Phytophthora* sp preseleccionados en la primer etapa. En esta etapa fueron caracterizados por velocidad de crecimiento, producción de metabolitos antimicrobianos y promoción del crecimiento. En estos estudios sólo fueron estudiados frente al aislado 1378 de *P. cactorum*, especie más frecuentemente encontrada en plantaciones de peral en la zona bajo estudio y aislado con mayor virulencia

### **2.2.1. Velocidad de crecimiento**

Dado que los aislados de *Trichoderma* spp. una vez incorporados al suelo deben crecer rápidamente en la zona de la raíz para colonizarla (Ahmad & Baker, 1987; Harman, 2000; Howell, 2003), un atributo a evaluar de suma importancia en la selección de aislados regionales es la velocidad de crecimiento. La misma se evaluó a  $22 \pm 2$  °C en placas de Petri de 90 mm con 15 ml de APD durante 72 h. Para cada aislado se utilizaron tres repeticiones.

Además se evaluó el tiempo de aparición y cantidad de conidios siguiendo la metodología de Samuels *et al.* (2006). Para cuantificar cantidad de conidios, se estableció una escala cuantitativa poco: entre 1 y  $10^2$  conidios.mL<sup>-1</sup>; abundantes:  $10^4$  a  $10^6$  conidios.mL<sup>-1</sup>; muy abundante:  $10^7$  o más conidios.mL<sup>-1</sup>.

### 2.2.2. Producción de metabolitos antimicrobianos

Con el objetivo de evaluar la producción de metabolitos secundarios por parte de los aislados de *Trichoderma* sp. pre-seleccionados en la primer etapa, se siguió la metodología adaptada de Vizcaíno *et al.*, 2005.

Preparación de cultivos líquidos. En frascos de vidrio de 25 ml con tapa a rosca, estériles, se colocaron 10 ml de caldo papa glucosa (CPG) y 2 ml de una suspensión de conidios de cada uno de los aislados de *Trichoderma* sp., ajustada a  $10^6$  conidios/ml. Estos frascos fueron incubados en agitación constante de 220 rpm por 14 días en oscuridad, a temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Extracción de metabolitos secundarios. Los cultivos en agitación luego de 14 días se trasvasaron a tubos falcon de 15 ml estériles, a los que se les agregó 2 ml de metanol 100%. Luego de esto, fueron llevados nuevamente al shaker a 220 rpm por 15 minutos. Pasado este tiempo, se llevó a centrífuga (Rolco, modelo 2036) a 2000 g por 15 minutos. Finalmente, se tomaron 2 ml del sobrenadante y se llevó a evaporación en campana de extracción de gases hasta reducir el volumen a la mitad.

Las pruebas de eficacia antimicrobiana del extracto *in vitro* se realizaron mediante la utilización de la técnica modificada de cultivo dual (Vizcaíno *et al.*, 2005). En placas de Petri con 15 ml de APD, se colocó en un pocillo 10  $\mu\text{l}$  de la solución de cada aislado, y en el extremo opuesto se colocó un disco de una colonia con activo crecimiento de *Phytophthora cactorum* en APD de 3mm de diámetro. El tratamiento testigo consistió en enfrentar el aislado del patógeno con 10  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril. Cada tratamiento se realizó por triplicado y se evaluó el porcentaje de inhibición (descrito en 2.1.1.) luego de 72 hs.

### 2.2.3. Promoción de crecimiento *in vitro*

Para este ensayo, se utilizaron aquellos aislados que presentaron esporulación en placa de Petri con APD en 72 hs o menos (punto 2.2.1) y dieron resultado positivo en el ensayo de antagonismo por metabolitos antimicrobianos.

En este experimento, el efecto de los aislados de *Trichoderma* spp. sobre la mejora del crecimiento, se probó mediante la colonización de las raíces de plántulas de tomate en

medio de Jensen modificado (Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2g; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,2g; ClNa 0,2g; FeCl<sub>3</sub> 0,1g; Agar agar 8 g; Agua destilada 1000 ml).

Para la preparación de la suspensión de conidios, se colocó en el centro de una placa de Petri con 15 ml de APD, un disco de micelio de 5 mm de diámetro de un cultivo de 7 días de cada aislado de *Trichoderma*. Luego de 5 días de crecimiento a cada placa se le colocaron 3 ml de ADE y con la ayuda de una espátula flameada, se procedió a levantar los conidios y posteriormente se filtró con embudo de papel y algodón estéril. Cada suspensión de conidios de *Trichoderma* spp. fue calibrada a 10<sup>6</sup> conidios.mL<sup>-1</sup> mediante la utilización de la cámara de Thoma al microscopio óptico.

#### 2.2.3.1. Crecimiento de plántulas

Con cada suspensión ajustada se procedió a inocular en tubos de 2 cm de diámetro y 15 cm de largo estériles con 12 ml de medio de cultivo Jensen modificado, para llegar a una concentración final de 10<sup>6</sup> conidios/ml de medio de cultivo (Azarmi *et al.*, 2011). Una vez solidificado, se sembraron en cada tubo 3 semillas de tomate variedad Elpida, esterilizadas superficialmente. La zona inferior de cada tubo fue envuelto en papel aluminio con el objetivo de brindar oscuridad para el desarrollo normal de las raíces. El ensayo se llevó a cabo en una cámara de cultivo con 60% de humedad relativa, fotoperíodo de 8- 16 hs luz- oscuridad y temperatura de 22 ±1°C, por 21 días. Al finalizar el experimento se midió el largo de raíz, cantidad de hojas, peso fresco de las plantas.

#### 2.2.3.2. Contenido de clorofila

El contenido de clorofila en las hojas de las plántulas al final del ensayo (2.2.3.1.) se determinó a través de la extracción con dimetilsulfóxido y la cuantificación a través de espectrofotometría. Se extrajeron con sacabocado 3 discos de hojas de 10 mm de diámetro. Los discos fueron pesados y colocados en un tubo de ensayo con 3 ml de dimetilsulfóxido. Se colocaron las muestras en estufa a 65 °C durante 2 h. Pasado el tiempo de reacción, se dejó enfriar durante 15 min y se procedió a medir la absorbancia de clorofila A a 665,1 nm y clorofila B a 649,1 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro UV-Vis DU-80 Beckman Coulter, Alemania. Con los valores de absorbancia, se determinó el contenido de clorofila por triplicado por medio de las ecuaciones propuestas por Wellburn, (1994).

Clorofila A = 12,47 . A 665.1 – 3,62 . A 649.1

Clorofila B = 25,06 . A 649.1 – 6,50 . A 665.1

Cada una de las variables medidas fue comparada estadísticamente mediante análisis de diferencia de medias de Tuckey, frente a un testigo sin inoculación de *Trichoderma*.

#### **2.2.4. Análisis estadístico**

Con el objetivo de seleccionar objetivamente aquellos aislados con mayores aptitudes para ser utilizados en la tercer etapa, se realizó un análisis de componentes principales utilizando el programa estadístico Infostat, versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2011) con los aislados pre-seleccionados de la primer etapa y todas las variables evaluadas.

#### **2.3. Tercera etapa**

El uso de microorganismos antagonistas se plantea en el marco de un manejo integrado de la enfermedad “podredumbre del cuello peral”, por lo que es necesario establecer la tolerancia a los fungicidas de síntesis utilizados en la región. Aquellos aislados seleccionados luego de las dos etapas previas de selección (2.1 y 2.2), fueron evaluados por su tolerancia a sustancias químicas de uso comercial en plantaciones de peral.

##### **2.3.1. Tolerancia *in vitro* a Ridomil Gold**

Se preparó una suspensión de conidios de cada aislado preseleccionado de *Trichoderma harzianum* (aislados n° 1330, 1336 y 1371), *T. guizhouense* (aislados n° 1367 y 1384) y *T. sp* (aislado n° 1349) provenientes de un cultivo de 7 días de crecimiento en APD a 21±1° C a la luz. La suspensión de conidios se calibró a 1 x 10<sup>5</sup> conidios/ml. Se añadieron alícuotas de 0,5 ml de cada suspensión de conidios y de Ridomil Gold (Mancozeb 64%; Metalaxyl 4%) a la dosis comercial (300 g/hL) en tubos Eppendorf de 1,5 ml. El testigo consistió en agua destilada estéril sin fungicida como tratamiento. Cada mezcla de conidios/fungicida se repitió cuatro veces (McLean *et al.*, 2001).

Después de 24 h, se tomaron cuatro alícuotas de 10 µL de cada tubo y se observaron al microscopio óptico registrándose la germinación de 50 conidios por muestra. Los conidios se consideraron germinados cuando la longitud del tubo germinal igualó el diámetro del mismo. Se determinaron diferencias significativas en la germinación de los

conidios entre los aislados y el testigo mediante un análisis de diferencia de medias de Tukey.

### **2.3.2. Tolerancia in vitro a Fosfito de potasio**

Desde cultivos de 5 días de cada aislado de *Trichoderma* seleccionado (*Trichoderma harzianum*: aislados n° 1330, 1336 y 1371; *T. guizhouense*: aislados n° 1367 y 1384; y *T. sp*: aislado n° 1349), se tomaron discos de 4 mm de diámetro del borde de cada colonia y se colocaron en el centro de una placa de Petri que contenía 15 ml de APD con fungicida (placa enmendada) ó sin fungicida, mediante técnica adaptada de Holmes & Eckert, 1999. Las dosis evaluadas fueron: 0; 0,1; 1,0; 10,0; 50,0 y 100,0 ppm de Fosfito de potasio (Marca Ando & cía: 12,9% Fosforo; 16,3% Potasio). Se utilizaron 3 placas por aislado y luego de 72 h se midió el diámetro de crecimiento. Se calculó un porcentaje de tolerancia en función del diámetro del testigo (APD sin agregado de fungicida), como porcentaje de inhibición inverso. Se seleccionaron aquellos aislados que demostraron un porcentaje de inhibición nulo o negativo (es decir, que crecieron más que el testigo sin enmendar).

## **3. Identificación de aislados de *Trichoderma* spp.**

Dada la dificultad de la identificación de aislados del género *Trichoderma* sp. por métodos morfológicos, se procede a la identificación de los mismos molecularmente.

### **3.1. Extracción de ADN**

Con el objetivo de identificar las especies aisladas, se procedió a la identificación molecular por secuenciación del gen Tef 1- $\alpha$ , mediante la utilización del protocolo de Liu *et al.*, (2000), modificado. Para la obtención de los pellets de ADN, de los aislados obtenidos y preseleccionados, se tomó una porción de micelio y se transfirió a placas de Petri de 60 mm de diámetro conteniendo APD (Britania). Los cultivos fueron incubados a 25°C con 12 horas de luz blanca fluorescente.

Las colonias formadas en el medio se extrajeron con ayuda de un bisturí estéril después de 72 h. Cada colonia se colocó en un tubo de Eppendorf de 1,5 ml, al cual se le agregaron 500  $\mu$ L de buffer de extracción (400 mM Tris-HCl [pH 8.0], 60 mM EDTA [pH 8.0], 150 mM NaCl, 1% SDS). Los tubos fueron llevados a heladera a 5°C durante la

noche. Al siguiente día, se retiraron y se dejaron a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente se le agregó a cada tubo 150  $\mu$ l de solución de acetato de potasio (pH 4.8; 60 ml de 5 M acetato de potasio, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua destilada), se mezclaron en vórtex y luego se centrifugaron a 10000 g por 1 minuto. De cada tubo se tomó el sobrenadante y se transfirió a otro tubo de 1,5 ml al cual se le colocó la misma cantidad de volumen de alcohol isopropílico. Estos tubos se mezclaron suavemente y se llevaron nuevamente a centrifugación 10000 g por 2 minutos. Luego de esto, el sobrenadante se descartó y el pellet de ADN se lavó con 300  $\mu$ L de etanol al 70% y centrifugó a 10000 rpm por 1 minuto, para posteriormente descartar el sobrenadante. El pellet de ADN resultante se secó en cámara de flujo laminar y posteriormente disolvió en 30  $\mu$ L de buffer Tris-EDTA (1X).

### **3.2. Cuantificación**

La cuantificación del ADN extraído se realizó por medio de una electroforesis en gel de agarosa 1 %; donde se sembraron: 5  $\mu$ L de ADN de las muestras con 3  $\mu$ L de marcador de corrida, en el gel sumergido en buffer TAE 1X. Se dejó correr el gel durante 30 minutos con un voltaje constante de 90 V. Se retiró la cama de la cuba y se tiñó con gel red para ser revelado en un transiluminador de luz UV (Maestrogen) (Samuels *et al.*, 2011).

### **3.3. Amplificación**

Una porción del gen TEF-1 $\alpha$  que codifica al factor de elongación de la traducción de proteínas fue amplificado utilizando los primers: EF728 M 5'- CAT YGA GAA GTT CGA GAA GG y EF2 5'- GGA RGT ACC AGT SAT CAT GTT. La mezcla de reacción en tubos de 0,5 mL para la PCR contenían 1  $\mu$ L de ADN de cada muestra, 2  $\mu$ L de buffer, 0,6  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ L de cada primer, 2  $\mu$ L de dNTPs, 0,2  $\mu$ L de Taq (marca: Pb-I) y se completó el volumen de 20  $\mu$ L con agua Mq (Genbiotech). La mezcla de reacción se colocó en un termociclador Gene Pro (marca Bioer). El programa usado fue el descrito por Barrera (2012).

Los productos de PCR se prepararon para la secuenciación, purificándolos con kit de purificación (Bioneer). Posteriormente fueron enviados a macrogen (Korea) para su secuenciación.

### **3.4. Análisis de homología**

El análisis de similitud u homología entre las secuencias obtenidas para cada aislado y las secuencias publicadas en la bases de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information) se hizo por análisis de BLAST (Zhang *et al.*, 2000).

## 1. Aislamiento de *Trichoderma sp.*

Como resultado de los aislamientos realizados se obtuvieron 88 aislados de *Trichoderma* spp. correspondientes a las distintas localidades muestreadas de la Patagonia Norte (Tabla 15 –Anexo-), los que se incorporaron al cepario de Fitopatología del Instituto de Biotecnología Agropecuaria (IBAC), de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue. El número de aislados fue variable según el origen. Se obtuvieron mayor cantidad de aislados de suelo y en menor medida de madera (16 %) de planta. En cuanto a las localidades, la mayor cantidad de aislados se obtuvo de la ciudad de Cinco Saltos, de los cuales todos fueron aislados de suelo (Tabla 7).

**Tabla 7.** Distribución de aislados de *Trichoderma* spp. por origen y tipo de muestra

Localidad de origen	Tipo de Muestras		Total
	Madera	Suelo	
General Roca	8 (9)*	0 (0)	8 (9)
Cinco Saltos	0 (0)	29 (33)	29 (33)
Cipolletti	4 (4,5)	19 (21,5)	23 (26)
Cnel. Gomez	1 (1,2)	0 (0)	1 (1,2)
Cmte. Cordero	1 (1,2)	14 (15,9)	15 (17,1)
Allen	0 (0)	12 (13,6)	12 (13,6)
<b>Total</b>	<b>14 (16)</b>	<b>74 (84)</b>	<b>88 (100)</b>

\*Los números indican los aislados obtenidos según origen y tipo de muestra y entre paréntesis se expresa el porcentaje del total de aislados

## 2. Estrategia de selección

### 2.1. Primera etapa

#### 2.1.1. Efecto antagónico *in vitro*

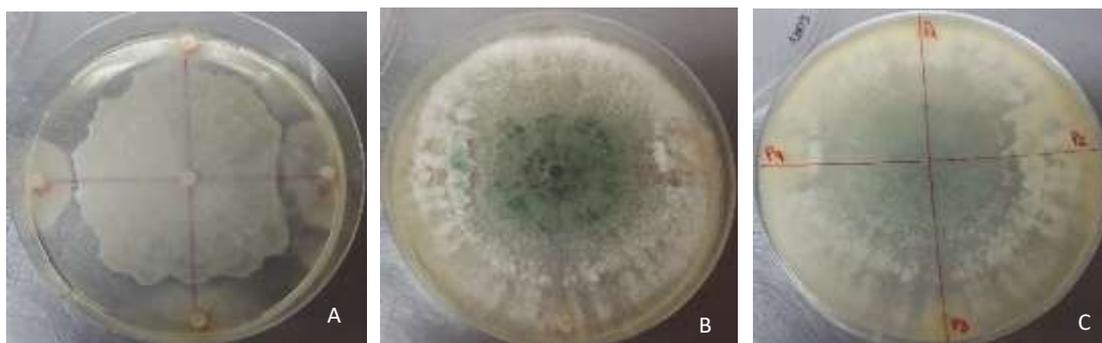
Utilizando la técnica de cultivos duales modificada, de 88 aislados de *Trichoderma sp.* evaluados, se destacaron 16 aislados con porcentajes de inhibición de más del 50% de al menos 2 aislados distintos de *Phytophthora sp.*; mientras que otros 25 aislados de

*Trichoderma* alcanzaron porcentajes semejantes sólo con uno de los aislados del patógeno (Tabla 3, Figura 17). Sólo un aislado de *Trichoderma* (1384) superó el 50% de inhibición con las 4 especies de *Phytophthora* evaluadas. Por su parte, *Phytophthora cactorum* fue el aislado con el que se obtuvieron los valores más bajos de inhibición, sin embargo rondaron entre el 18,4 y 52,6% de inhibición. Mientras que *P. inundata* obtuvo los valores más altos de inhibición llegando a más del 65%.

**Tabla 8.** Porcentaje de inhibición y micoparasitismo de los aislados de regionales de *Trichoderma sp.* preseleccionados frente a aislados de *Phytophthora sp.*

Aislado	Localidad de origen	Muestra	% de Inhibición				Escala Micoparasitismo <sup>1</sup>
			<i>P. rosacearum</i> (1315)	<i>P. inundata</i> (1353)	<i>P. lacustris</i> (1368)	<i>P. cactorum</i> (1378)	
1310	General Roca	Madera	45,45	48,78	38,23	42,1	4
1317	Cipolletti	Suelo	47,27	53,65	41,17	42,1	4
1322	Cipolletti	Suelo	49,09	51,21	26,47	44,73	1
1327	Cipolletti	Suelo	61,81	65,85	50	36,84	4
1330	Cipolletti	Suelo	52,72	52,43	55,88	44,73	4
1336	Cinco Saltos	Suelo	50	49,39	35,29	44,73	4
1343	Cinco Saltos	Suelo	46,36	47,56	38,23	42,1	4
1349	Cordero	Suelo	49,09	54,87	41,17	47,36	4
1351	Cordero	Suelo	47,27	52,43	35,29	42,1	4
1366	Allen	Suelo	49,09	47,56	38,23	44,73	0
1367	Allen	Suelo	45,45	52,43	32,35	42,1	4
1368	Allen	Suelo	45,45	51,21	20,58	31,57	4
1371	Allen	Suelo	44,54	46,95	44,11	42,1	4
1375	Cipolletti	Madera	50,9	51,21	47,05	34,21	4
1377	Cinco Saltos	Suelo	43,63	50	41,17	42,1	2
1379	Cinco Saltos	Suelo	52,72	50	50	43,42	4
1383	Cinco Saltos	Suelo	54,54	64,63	45,58	42,1	4
1384	Cinco Saltos	Suelo	58,18	62,19	50	52,63	4

<sup>1</sup>Escala de colonización del antagonista sobre la colonia del patógeno. Tomada de Elías & Arcos, 1984. 0: ninguna invasión de la colonia del patógeno por el antagonista; 1: invasión de ¼ de la colonia; 2: invasión de ½ de la colonia; 3: invasión del total de la colonia; 4: invasión total y esporulación del antagonista sobre el patógeno

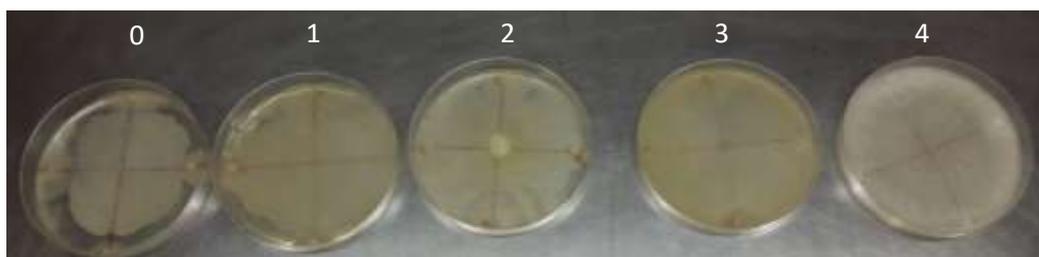


**Figura 17.** Imagen de las placas de Petri con cultivos de *Trichoderma*. A. Aislado de *Trichoderma* spp. con bajo porcentaje de inhibición frente a los 4 aislados de *Phytophthora* spp. B. y C. Frente y dorso de una placa con un aislado de *Trichoderma* con alto porcentaje de inhibición frente a los 4 aislados de *Phytophthora* spp.

### 2.1.2. Evaluación del micoparasitismo

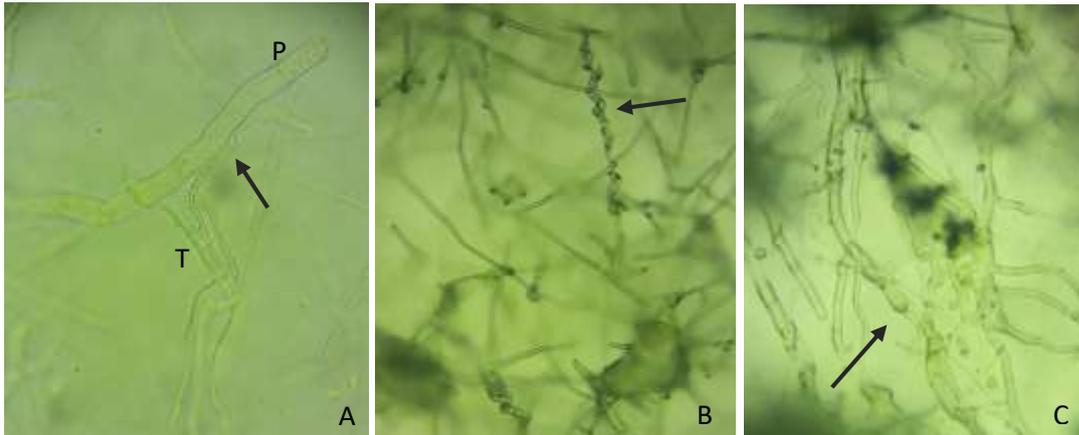
#### 2.1.2.1. Micoparasitismo del antagonista sobre el patógeno en cultivo dual.

Del estudio de micoparasitismo a través del cultivo dual, se observa que más del 81% de los aislados de *Trichoderma* sp. presentaron el grado más alto (4) en la escala de micoparasitismo sobre *Phytophthora cactorum*, *P. inundata*, *P. rosacearum* y *P. lacustris* en placa. Es decir, que colonizaron totalmente la colonia del patógeno y esporularon sobre la misma (Figura 18). Tan sólo 5 aislados no presentaron ningún tipo de micoparasitismo en placa frente a las cuatro especies de *Phytophthora* evaluadas (Tabla 2).



**Figura 18.** Escala de micoparasitismo representada con distintos aislados de *Trichoderma* frente a las cuatro especies de *Phytophthora*.

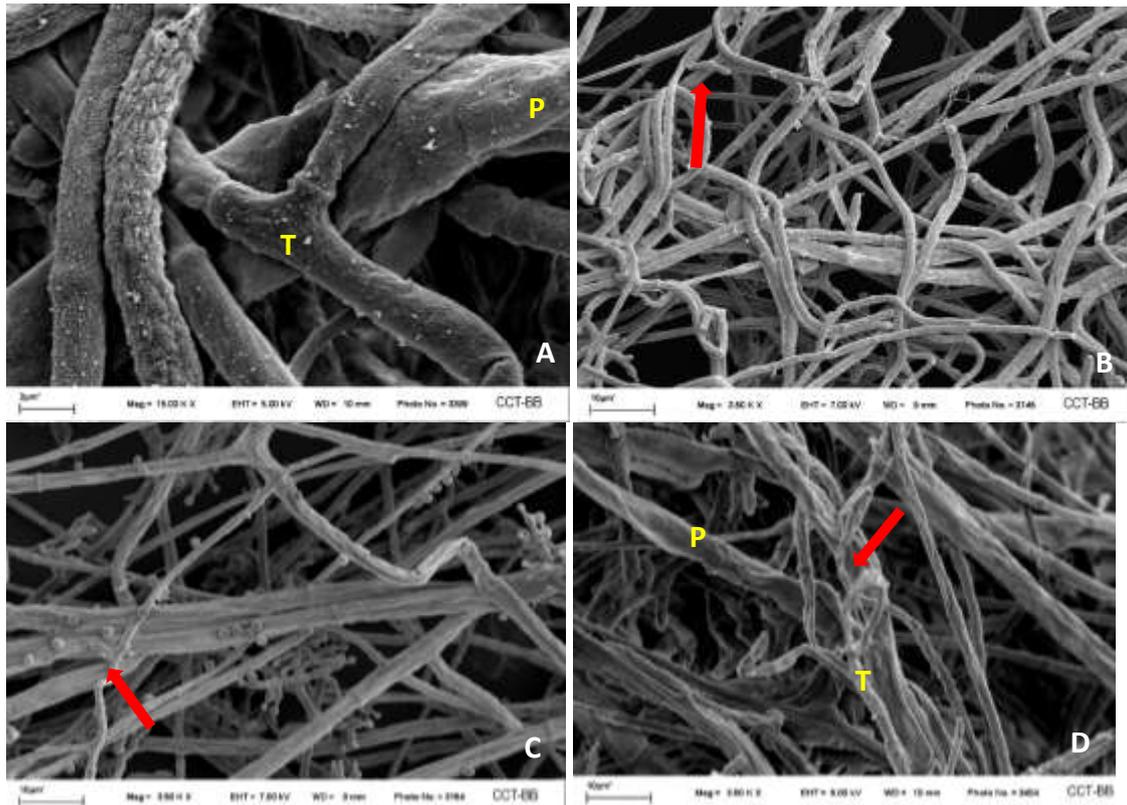
Se seleccionaron aislados fúngicos que presentaron valor 4 en la escala de micoparasitismo, y se realizaron preparados de la zona de contacto de ambos microorganismos (*Trichoderma/Phytophthora*). En todos los casos, se observaron enrollamientos (“coiling”) y crecimiento adherido por parte de *Trichoderma* sp. sobre las hifas de *Phytophthora* (Figura 19 a y b). Además se observó el micelio de *Phytophthora cactorum*, *P. inundata* y *P. lacustris* vacuolizado (Figura 19 c).



**Figura 19.** Fotografías al microscopio óptico (40 X) de la zona de interacción de los aislados de *Trichoderma* frente a *Phytophthora cactorum*. A. Crecimiento adherido. B. Enrollamiento de hifas. C. Hifas vacuolizadas; P: *Phytophthora* T: *Trichoderma*

#### 2.1.2.2. Caracterización del micoparasitismo por microscopía electrónica de barrido.

Con el objetivo de caracterizar en detalle la zona de inhibición en cultivos duales, a los aislados de *Trichoderma* spp., con distinto grado de micoparasitismo (inciso 2.2.1.), se los evaluó mediante microscopía electrónica de barrido. En todos los aislados se observó (sin importar el grado de micoparasitismo observado previamente), un crecimiento de las hifas de *Trichoderma* spp. estrechamente adheridas a las hifas de *Phytophthora*. Se observó crecimiento del antagonista sobre las hifas del patógeno, alrededor del mismo y penetrando las hifas de *Phytophthora* sp. (Figura 20).



**Figura 20.** Fotografías al microscopio electrónico de barrido de la interacción entre aislados de *Trichoderma* (T) y *P. cactorum* (P). Se observa cómo las hifas del antagonista se acercan a las del patógeno. A) Aislado de *Trichoderma* 1310; B) Aislado de *Trichoderma* 1377; C) Aislado de *Trichoderma* 1322; y D) fotografía donde muestra cómo se enrollan las hifas de *Trichoderma* alrededor de las hifas del patógeno.

Al finalizar esta primer etapa de selección de antagonistas, se llegaron a 18 aislados de *Trichoderma* sp. que poseían más del 40% de inhibición frente a *Phytophthora cactorum*, *P. rosacearum*, *P. inundata* y *P. lacustris* y que demostraron micoparasitismo observada en placa y/o mediante observación de preparados en microscopía óptica y electrónica. La mayor cantidad de aislados preseleccionados fue originaria de suelo, habiéndose aislado de madera sólo a dos aislados, uno de la ciudad de Cipolletti y uno de la ciudad de General Roca.

## 2.2. Segunda etapa

### 2.2.1. Velocidad de crecimiento

La velocidad de crecimiento es un atributo deseado en un antagonista para la rápida colonización del sustrato. Es por ello que a los aislados de *Trichoderma* sp. preseleccionados por su antagonismo *in vitro* frente a *Phytophthora* sp. se les evaluó este atributo. Todos los aislados tuvieron crecimiento positivo en APD a  $22 \pm 2^\circ$  C, luego

de 72 h (Tabla 9). El aislado 1310 fue el que presentó el menor crecimiento (50 mm) mientras que del resto los aislados evaluados, cinco de ellos superaron los 70 mm a las 72 horas y once completaron placa (90 mm).

Por otra parte, los aislados 1351 y 1368 presentaron la velocidad más lenta de formación de conidios. A las 96 horas aún no habían esporulado a pesar de haber completado casi la placa de Petri. Es por esta razón que fueron descartados para la siguiente etapa de selección.

### 2.2.2. Efecto antagonico de metabolitos antimicrobianos

Al evaluar la actividad antifúngica de extractos de metanol con metabolitos secundarios de aislados de *Trichoderma* spp., en cultivos duales modificados, no se observaron altos porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del patógeno. El rango de inhibición observado fue de 2,2 al 24,2 %, destacándose el aislado de *Trichoderma* sp. 1367, que presentó el mayor porcentaje de control (Tabla 9).

**Tabla 9.** Caracterización cultural de los aislados regionales de *Trichoderma* sp.

Número de aislado	Velocidad de Crecimiento <sup>1</sup>	Conidios Cantidad <sup>2</sup>	Conidios Tiempo <sup>3</sup>	% Inhibición por metabolitos Secundarios <sup>4</sup>
1310	50	Muy abundante	48	9,66
1317	85	Poco	72	4,6
1322	85	Poco-Abundante	72	2,22
1327	77,5	Muy abundante	48-72	11,43
1330	85	Abundante	48	12,35
1336	73,5	Abundante	48-72	12,89
1343	85	Muy abundante	48	22,24
1349	71	Muy abundante	48	15,17
1351	76	Poco	> 96	10,66
1366	85	Abundante	72	15,71
1367	85	Muy abundante	48	24,21
1368	78,5	Abundante	> 96	20,99
1371	85	Abundante	48	18,12
1375	85	Abundante	48-72	-
1377	85	Abundante	72	6,23
1379	85	Muy abundante	48	15,94
1383	85	Muy abundante	48	16,87
1384	58	Muy abundante	48-72	17,66

<sup>1</sup>Velocidad de crecimiento: diámetro de colonia obtenido a las 72 h de crecimiento. <sup>2</sup>Cantidad: Poco: entre 1 y 10<sup>2</sup> conidios.mL<sup>-1</sup>; Abundantes: 10<sup>4</sup> a 10<sup>6</sup> conidios.mL<sup>-1</sup>; Muy abundante: 10<sup>7</sup> o más conidios.mL<sup>-1</sup>. <sup>3</sup>Tiempo: tiempo de aparición de conidios en horas. <sup>4</sup>Porcentaje de inhibición del patógeno por producción de metabolitos secundarios de aislados de *Trichoderma*.

### 2.2.3. Promoción de crecimiento de plántulas de tomate *in vitro*

El efecto de los aislados de *Trichoderma* sp. fue observado sobre la mejora del crecimiento de plántulas de tomate y su colonización en las raíces en medio semisólido. Sobre la variable largo de raíz se destacaron 11 aislados que tuvieron diferencias significativas en relación al testigo. Se destacaron significativamente el aislado regional 1367, que superó en 2 cm al testigo. Respecto del peso fresco, el aislado 1371 obtuvo el mayor valor del ensayo, aunque sin diferenciarse estadísticamente del testigo (Tabla 10).

Respecto a la medición de clorofila, todos los tratamientos se diferenciaron estadísticamente del testigo, obteniendo valores de contenido de clorofila total mayores que el tratamiento sin inoculación. El aislado 1336 se destacó, ya que produjo casi 4 veces más la cantidad de clorofila en hoja, que los demás aislados evaluados (Tabla 10).

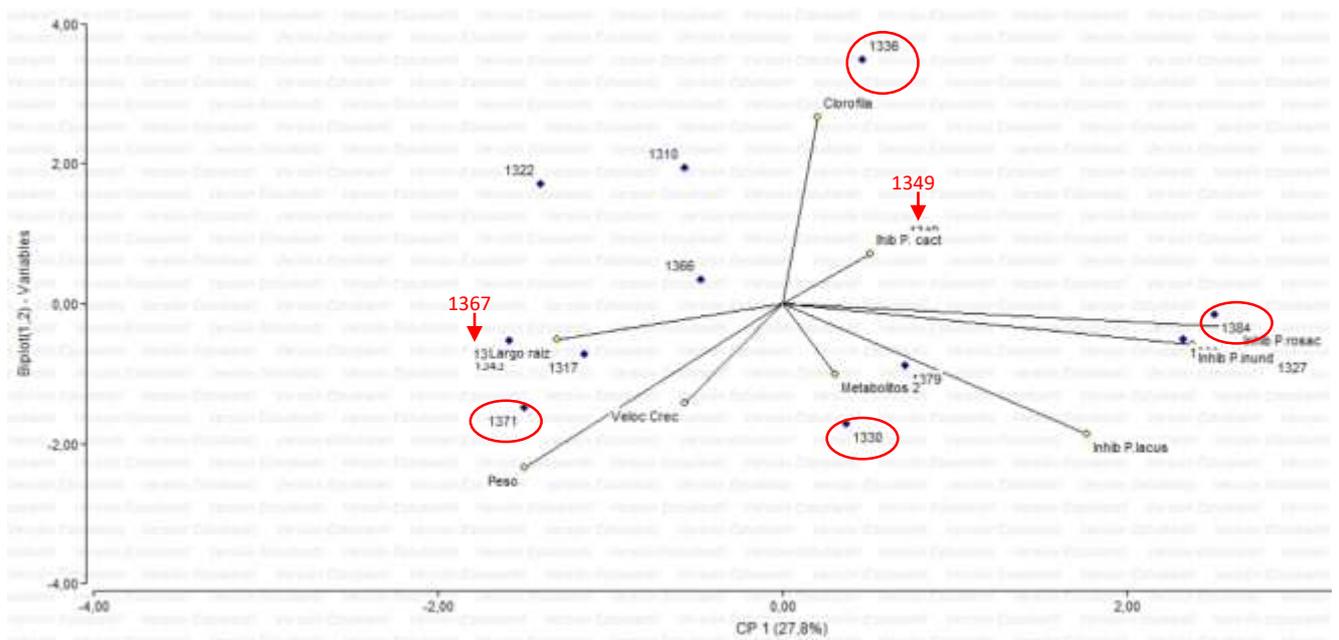
**Tabla 10.** Evaluación de promoción de crecimiento en plántulas de tomate.

Número de aislado	Largo raíz (cm)	Peso fresco (g)	Clorofila A+B (µg.g-1PF)
1310	5,41 <sup>abcd*</sup>	0,06 <sup>a</sup>	318,0 <sup>m</sup>
1317	6,05 <sup>abcd</sup>	0,09 <sup>ab</sup>	220,1 <sup>h</sup>
1322	6,43 <sup>cd</sup>	0,07 <sup>ab</sup>	354,4 <sup>n</sup>
1327	5,42 <sup>abcd</sup>	0,06 <sup>ab</sup>	243,9 <sup>j</sup>
1330	5,74 <sup>abcd</sup>	0,09 <sup>ab</sup>	216,2 <sup>g</sup>
1336	3,97 <sup>abc</sup>	0,05 <sup>a</sup>	631,1 <sup>o</sup>
1343	6,42 <sup>cd</sup>	0,08 <sup>ab</sup>	226,9 <sup>i</sup>
1349	4,68 <sup>abcd</sup>	0,07 <sup>ab</sup>	199,3 <sup>e</sup>
1366	4,54 <sup>abcd</sup>	0,07 <sup>ab</sup>	249,9 <sup>k</sup>
1367	6,78 <sup>d</sup>	0,08 <sup>ab</sup>	175,4 <sup>b</sup>
1371	4,35 <sup>abcd</sup>	0,10 <sup>ab</sup>	203,0 <sup>f</sup>
1375	6,26 <sup>bcd</sup>	0,07 <sup>ab</sup>	191,7 <sup>d</sup>
1377	5,90 <sup>abcd</sup>	0,08 <sup>ab</sup>	167,7 <sup>h</sup>
1379	3,60 <sup>a</sup>	0,08 <sup>ab</sup>	222,0 <sup>h</sup>
1383	3,77 <sup>ab</sup>	0,06 <sup>ab</sup>	187,0 <sup>c</sup>
1384	5,62 <sup>abcd</sup>	0,07 <sup>ab</sup>	260,1 <sup>l</sup>
TESTIGO	4,56 <sup>abcd</sup>	0,10 <sup>ab</sup>	168,6 <sup>a</sup>

\*Letras iguales no representan diferencias significativas mediante análisis de diferencia de medias de Tukey con un 95% de confianza.

## 2.2.4. Análisis estadístico

Al finalizar la segunda etapa de selección, mediante un análisis de componentes principales se preseleccionaron seis aislados del antagonista con las mejores condiciones evaluadas hasta este punto. En el gráfico se observa que el aislado 1336 generó los valores más altos en contenido total de clorofila en tomate, 1371 generó el mayor valor en peso del aparato radicular y 1367 en largo de raíz. Mientras que 1349 generó el mayor valor en porcentaje de inhibición del micelio de *P. cactorum*, 1384 frente a *P. rosacearum* y 1330 frente a *P. lacustris* (Figura 21).



**Figura 21.** Análisis de componentes principales de los aislados de *Trichoderma* sp. pre-seleccionados en la primera etapa de selección. En círculos se muestra a los aislados seleccionados para la tercer etapa. Von flechas se indica el lugar en el que se ubican aislados que no se observan por quedar cubiertos por otro o por el nombre de alguna variable.

De acuerdo a los atributos de los aislados en esta etapa se seleccionaron a los aislados de *Trichoderma harzianum* n° 1330, 1336 y 1371, de *T. guizhouense* n° 1367 y 1384 y de *Trichoderma* sp. n° 1349.

## 2.3. Tercera etapa

Los seis aislados seleccionados en la etapa precedente se evaluaron frente a dos formulados comerciales de fungicidas.

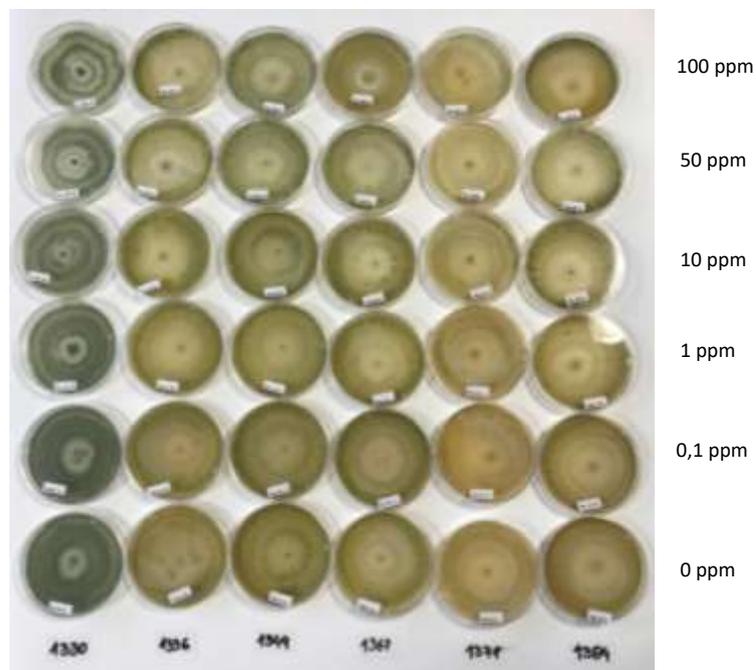
### 2.3.1. Tolerancia *in vitro* a Ridomil Gold

Ninguno de los aislados de *Trichoderma* evaluados tuvo capacidad de germinación de sus conidios a la concentración comercial del fungicida Ridomil Gold (metalaxyl M 4 % + mancozeb 24 %). La dosis comercial recomendada para uso a campo, resultó tóxica para *Trichoderma sp.*

### 2.3.2. Tolerancia *in vitro* al Fosfito de potasio

En el estudio sobre la capacidad de crecimiento en placa de los aislados del antagonista frente al fungicida fosfito de potasio *in vitro* (Figura 22) se observó que todos los 6 aislados evaluados tuvieron capacidad de crecer en condiciones normales en todas las concentraciones del agroquímico evaluadas. Para la selección se tomaron como referencia aquellos aislados que no tuvieran diferencias en velocidad de crecimiento con el testigo (sin fungicida).

De esta manera, se seleccionaron finalmente tres aislados regionales 1330, 1367, 1371 tolerantes a fosfito de potasio.



**Figura 22.** Fotografía donde se observa la tolerancia al fosfito de potasio de aislados regionales de *Trichoderma* spp.

### 3. Identificación molecular de *Trichoderma* a nivel de especie.

Se identificaron a nivel de especie 15 aislados preseleccionados luego de la primera etapa de selección. Del total, se identificaron 6 especies diferentes de *Trichoderma* spp. Las especies identificadas correspondieron a *Trichoderma harzianum* (7), *T. longibrachiatum* (2), *T. atroviride* (1), *T. deliquescens* (1), *T. guizhouense* (3) y *T. brevicompactum* (1) (Tabla 11).

Las especies *T. deliquescens* y *T. guizhouense* son especies recientemente nombradas, derivadas de la especie *T. harzianum*, ahora renombrada como clado “harzianum”. Mientras que la especie *T. brevicompactum* pertenece al clado “longibrachiatum”.

**Tabla 11.** Identificación molecular a nivel de especies de aislados de peral preseleccionados de *Trichoderma sp.*

<b>Aislado</b>	<b>Origen</b>		<b>Identificación</b>	<b>Homología (%)</b>	<b>Cobertura (%)</b>	<b>pb</b>	<b>Cepa de referencia NCBI</b>
1310	Villa Regina	Madera	<i>Trichoderma atroviride</i>	99	100	489	AF456886.1
1317	Cipolletti	Suelo	<i>Trichoderma harzianum</i>	93	87	490	KJ871186.1
1322	Cipolletti	Suelo	<i>Trichoderma harzianum</i>	100	100	426	KJ871174.1
1327	Cipolletti	Suelo	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	99	100	460	AY865640.1
1330	Cipolletti	Suelo	<i>Trichoderma harzianum</i>	99	99	489	AY605764.1
1336	C. Saltos	Suelo	<i>Trichoderma harzianum</i>	98	99	491	AY605764.1
1343	C. Saltos	Suelo	<i>Trichoderma deliquescens</i>	93	100	460	AB856691.1
1351	Cordero	Suelo	<i>Trichoderma harzianum</i>	99	100	430	AY605764.1
1367	Allen	Suelo	<i>Trichoderma guizhouense</i>	99	100	489	KT619059.1
1368	Allen	Suelo	<i>Trichoderma harzianum</i>	99	100	453	KX463434.1
1371	Allen	Suelo	<i>Trichoderma harzianum</i>	98	99	450	AY605764.1
1375	Cipolletti	Madera	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	99	100	446	KP008877.1
1377	C. Saltos	Suelo	<i>Trichoderma brevicompactum</i>	97	100	500	AY857297.1
1379	C. Saltos	Suelo	<i>Trichoderma guizhouense</i>	99	100	431	KJ665506.1
1384	C. Saltos	Suelo	<i>Trichoderma guizhouense</i>	99	100	440	KJ665506.1

## DISCUSIÓN

Las especies del género *Trichoderma* son hongos oportunistas, simbioses no patogénicos de plantas que pueden funcionar como antagonistas de muchos patógenos de plantas, protegiéndolas de enfermedades (Samuels, 2004). El uso de *Trichoderma* en la agricultura provee numerosas ventajas: (I) colonización de la rizosfera como ACB dado que posee un rápido establecimiento entre las comunidades microbianas estables de la rizosfera; (II) control de la microflora patógena por el uso de una variedad de mecanismos—competencia, entre otros—; (III) mejoramiento de la resistencia de la planta y (IV) estimulación del crecimiento radicular (Harman *et al.*, 2004). Estas características hacen que sean herramientas biotecnológicas con un elevado potencial para distintos fines y principalmente como agentes de control biológico de enfermedades que ocurren principalmente en suelo y raíces.

Los procesos de aislamiento y selección son etapas claves en las distintas estrategias de búsqueda de antagonistas de enfermedades. En este sentido, de acuerdo al objetivo de este capítulo, la hipótesis de partida se basa en que la mejor estrategia de aislamiento de potenciales antagonistas frente a un patógeno específico, es la búsqueda en los sitios propicios para el desarrollo de los mismos (Baker & Cook, 1974). Los resultados obtenidos en este capítulo concuerdan con dicha hipótesis ya que mediante un muestreo dirigido en plantas asintomáticas, se lograron aislar a 84 aislados del género biocontrolador *Trichoderma*.

La metodología aquí adoptada se centra en la búsqueda de aislados de *Trichoderma* con capacidad antagónica en los mismos sitios de plantación de peral donde fue encontrado el patógeno. El aislamiento de microorganismos antagonistas en estos sitios, representa una ventaja adaptativa de estos sobre los patógenos que causan podredumbres en el sistema radicular de las plantas (Wilson & Wisniewsky, 1989).

El aislamiento es un paso fundamental en el proceso de encontrar un buen biocontrolador, autores como Chet & Baker, 1981; Smith *et al.*, 1990 y Chambers & Scott, 1995; entre otros, coinciden en que la mejor estrategia de aislamiento es la utilización de suelos supresivos, donde el patógeno que causa la enfermedad está

presente, pero la enfermedad no se produce. Otros autores (Roiger & Jeffers, 1991; McLeod *et al.*, 1995) aseguran que puede haber excepciones a esta regla, tal es así, que Cook (1985) declaró que "los antagonistas están donde se los encuentra". El aislamiento positivo de estos antagonistas en suelos en los cuales la enfermedad está presente pero en cercanías de plantas sanas, concuerda con la hipótesis de suelos supresivos y descarta la hipótesis planteada por Cook (1985).

En este trabajo el uso del medio selectivo rosa de bengala de Martin, para el aislamiento de *Trichoderma* desde suelo y raíces de plantas asintomáticas de peral, permitiendo llegar a un número total de 74 aislados. Referido a este tema Smith *et al.*, (1990), utilizaron medios selectivos con antibióticos y fungicidas a partir de suelos con cultivos de manzano, identificados como supresivos para *Phytophthora* spp. permitiéndoles aumentar el hallazgo de especies de *Trichoderma*. Este medio selectivo ha sido propuesto para optimizar el aislamiento de *Trichoderma* spp. desde suelos agrícolas (Khang *et al.*, 2013; Kubicek & Harman, 1998; Vargas Gil *et al.*, 2009).

Aunque las especies de *Trichoderma* son típicamente consideradas saprófitas del suelo, son capaces también de generar asociaciones íntimas con el sistema radicular de las plantas, en una relación simbiótica avirulenta oportunista (Harman *et al.*, 2004). Pero en los últimos años se ha demostrado que las especies de *Trichoderma* pueden persistir no solo dentro del sistema de raíces de la planta sino también dentro de los tejidos sobre el suelo en asociaciones endofíticas (Bailey *et al.* 2009). Si bien se aislaron en menor medida que aquellas recuperadas del suelo, este hecho queda demostrado en este trabajo en el aislamiento de distintas cepas desde corteza de plantas asintomáticas de peral.

Se evaluó la capacidad de éstos posibles agentes de control biológico frente a 4 especies patogénicas de *Phytophthora* aisladas de plantaciones de perales con resultados sumamente alentadores, ya que en la mayoría de los mismos se observaron inhibiciones en el crecimiento de al menos una de estas especies patogénicas. Existe una gran cantidad de trabajos en los cuales se cita la capacidad antagónica de distintas especies de *Trichoderma* sobre especies de *Phytophthora* en diversas plantaciones pero no en plantaciones de peral. En manzana frente a *P. cactorum*, causal de la podredumbre de raíz y corona en suelo (Smith *et al.*, 1990) y en plantines (Roiger & Jeffers, 1991). En cacao se utilizó a *Trichoderma martiale* contra *Phytophthora palmivora*, causal de la

enfermedad de la vaina negra (Hanada *et al.*, 2009). Se utilizaron granulos de arcilla impregnados con *T. harzianum* para el control de *Phytophthora cinnamomi*, causal del damping-off en plántulas de pinos (Kelley, 1976), entre otros.

Por otro lado, la capacidad de un agente biocontrolador de micoparasitar a un patógeno es una de los atributos más indagados por sus beneficios directos en la aplicación del biocontrol. Los aislados regionales evaluados en esta instancia no permitieron un crecimiento normal de los patógenos ya que se observaron desde un menor crecimiento de la colonia, acercamiento de hifas de *Trichoderma sp.* a las de *Phytophthora sp.*, enrollamientos y hasta vacuolización de las hifas de *Phytophthora*, demostrando la capacidad de micoparasitar a estas especies del patógeno. Diversas especies de *Trichoderma* se han asociado con un antagonismo de la fase vegetativa de *Phytophthora* (Harman, 2000; Malajczuk, 1983; Stefanova *et al.*, 1999). En estos trabajos se concluye que dicho proceso se puede llevar a cabo mediante metabolitos volátiles o solubles, los cuales reducen el crecimiento del patógeno, seguido por una vacuolación del contenido celular que eventualmente resulta en lisis de las hifas. Esta podría ser una hipótesis a evaluar en trabajos futuros ya que en este trabajo no se comprobó la producción de metabolitos antimicrobianos mediante purificación de los mismos, sino una evaluación cualitativa y observación de la zona de interacción entre ambos microorganismos al microscopio óptico y electrónico de barrido.

Se evaluó la capacidad de producción de metabolitos antimicrobianos difusibles en agar de aislados preseleccionados de *Trichoderma sp* mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento del patógeno en placa. En este ensayo no se destacaron altos porcentajes de inhibición del crecimiento del patógeno *in vitro* mediante la utilización de extractos de metanol del antagonista. El mayor porcentaje de inhibición (24%) se observó con el aislado 1367, identificado como *Trichoderma guizhouense* (parte del complejo *T. harzianum*). Esto coincide con Vizcaíno *et al.*, 2005; quienes tuvieron mejores resultados con aislados del clado *Pachybasium* y en medio sólido, el clado al cual corresponde *T.harzianum* tuvo valores de actividad antifúngica de hasta el 33%. Una misma especie puede no siempre llegar a producir los mismos compuestos o responder de la misma forma, esto va a depender del microorganismo, del medio ambiente (pH y temperatura) y del sustrato. Cualquier especie de *Trichoderma* puede producir varios compuestos antibióticos y, de manera similar, un antibiótico puede ser

producido por diferentes especies de *Trichoderma* (Sivasithamparam & Ghisalberti 1998).

La capacidad de aislados de *Trichoderma* sp. de promocionar el crecimiento en plantas, ha sido bastante documentada (Harman 2006; Harman *et al.*, 2004; Hermosa *et al.*, 2013; Vinale *et al.*, 2008). En este trabajo se evaluó la capacidad de aislados regionales de generar un aumento en el crecimiento de plántulas de tomate enmendando medio semi sólido con conidios de cada uno de ellos. Se observaron diferencias significativas con el testigo sin antagonista en el contenido de clorofila, siendo la mayor diferencia con el aislado 1336 (*T.harzianum*). Esto coincide con lo reportado por Azarmi *et al.*, 2011; quienes reportan un aumento en el contenido de clorofila en hojas de tomate, con la inoculación del medio de cultivo con *T. harzianum*. Además, se destacaron otros dos aislados de esta misma especie (aislados n°1310 y 1322). Este resultado indica que los efectos de *Trichoderma* sobre el crecimiento y vigor de las plántulas dependen del aislado de *Trichoderma* utilizado y no de la especie.

Tomando como objetivo la utilización de biocontroladores en el marco del manejo integrado de la enfermedad, se evaluó la posibilidad de aplicación conjunta de fungicidas que se utilizan para controlar a *Phytophthora* sp. en plantaciones de peral, y para ello se prueba la compatibilidad del antagonista y el fungicida *in vitro*. La evaluación de compatibilidad de los aislados regionales con el fungicida químico Ridomil Gold fue negativa, en el cual no se pudo observar germinación de los conidios del antagonista. Tapwal *et al.*, (2012), señalan que aislados de *Trichoderma* sp. son incapaces de crecer en medios de cultivos enmendados con Ridomil en cualquiera de las dosis evaluadas. Al igual que McLean *et al.*, (2001), quienes reportan que *T. harzianum* es altamente susceptible a Mancozeb (uno de los principales componentes del fungicida utilizado en este ensayo).

El fosfito de potasio aplicado en raíz es un eficiente controlador del crecimiento de distintas especies de *Phytophthora* en diversos cultivos y evaluado además en distintas concentraciones en evaluaciones *in vitro* (Smillie *et al.*, 1989). Se evaluó la tolerancia de los aislados del antagonista a la aplicación conjunta con fosfito de potasio, mediante la utilización de la técnica de placa enmendada. Todos los aislados evaluados resultaron ser tolerantes a este químico, lo cual representa una gran ventaja de aplicación ya que se los puede aplicar en conjunto para disminuir la incidencia de esta enfermedad en

plantaciones de peral. A diferencia de lo observado por Paredes Angulo (2016), quien evaluó esta combinación y concluye que el fosfito de potasio disminuye la germinación de conidios y tasa de crecimiento del antagonista. Además este químico es ampliamente utilizado como fertilizante lo cual aumenta sus ventajas a la hora de utilizarlo. Actualmente se utiliza en una gran diversidad de cultivos para controlar tanto de manera directa (fungicida) como indirecta (inductor de defensa), enfermedades causadas por *Phytophthora* sp. (Jackson *et al.*, 2000; Hardy *et al.*, 2001; Machinandiaarena *et al.*, 2012) pero en este trabajo queda establecida la posibilidad de uso en conjunto con biocontroladores del género *Trichoderma* en peral.

Durante el desarrollo del presente capítulo se han identificado seis especies distintas del género *Trichoderma*: *Trichoderma harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. atroviride*, *T. deliquescens*, *T. guizhouense* (ex: *T. harzianum*) y *T. brevicompactum*, en el cultivo de peral del Alto Valle de Río Negro. *Trichoderma harzianum* fue la especie encontrada en mayor abundancia en este estudio, incluyendo a *T. guizhouense* recientemente renombrada como tal, lo cual se corresponde a su carácter de cosmopolita, es decir que se encuentra en una gran variedad de sustratos (Chaverri & Samuels, 2003; Chaverri *et al.*, 2015). *T. deliquescens* por su parte, no se encuentra citada en Argentina, posiblemente por su reciente cambio de nombre (ex: *Gliocladium deliquescens*), pertenece al clado *Deliquescens*, conformado por ésta y dos especies más (Bissett *et al.*, 2015; Jaklitsch & Voglmayr, 2015). *T. brevicompactum* pertenece al clado denominado con el mismo nombre (Jaklitsch & Voglmayr, 2015). Este clado no se encuentra estrechamente relacionado con las especies que tienen aplicación biológica, pero se lo encuentra citado por su capacidad de producir toxinas tales como “trichodermin”, antibiótico que utilizado en bajas concentraciones, limita el crecimiento de varias especies de hongos (Degenkolb *et al.*, 2008; Godtfredsen & Vangedal, 1965). *T. atroviride* (Clado: *Viride*) (Jaklitsch & Voglmayr, 2015), es una de las especies más conocidas por su capacidad de generar enzimas del tipo glucanasas y de esta manera micoparasitar hifas de otras especies de hongos (Benítez *et al.*, 2004). Además es una de las pocas especies reconocidas como endófito, lo cual concuerda con el hecho de que fue aislada de la corteza de perales (Ming *et al.*, 2013). Finalmente *T. longibrachiatum* (clado: *Longibrachiatum*) (Jaklitsch & Voglmayr, 2015), es una de las especies estudiadas

más intensamente, como el productor industrial de celulasa ó como patógenos humanos oportunistas facultativos (Druzhinina *et al.*, 2012).

## CONCLUSIONES PARCIALES

Se lograron aislar 87 aislados regionales del género *Trichoderma* con potencial biocontrolador desde plantaciones comerciales de peral del Alto Valle de Río Negro.

Dieciocho aislados fueron seleccionados *in vitro* por su potencial biocontrolador de *Phytophthora cactorum*, *P. rosacearum*, *P. inundata* y *P. lacustris*.

Se identificaron molecularmente a 6 especies distintas desde 15 aislados regionales de *Trichoderma*. Las mismas fueron: *Trichoderma harzianum*, *T. brevicompactum*, *T. longibrachiatum*, *T. atroviride*, *T. deliquescens* y *T. guizhouense*.

Se consiguieron aislados regionales de *Trichoderma* sp. con potencial biocontrolador de la podredumbre del cuello del peral y tolerancia al fosfito de potasio, permitiendo su uso conjunto en el marco de un manejo integrado de la enfermedad.

Se seleccionaron mediante pruebas *in vitro* y ensayos en plántulas de tomate a 3 aislados de *Trichoderma* de las especies *T. harzianum* y *T. guizhouense*, con potencial antagónico para ser evaluados en ensayos a campo en plantas jóvenes de peral.



## CAPÍTULO IV.

Biocontrol de *Phytophthora cactorum* con aislados regionales de *Trichoderma* sp. en peral



## INTRODUCCIÓN

El control biológico en su definición más conocida, es la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, mediante uno o más organismos, y que sucede de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedante o del antagonista o por la introducción masiva de uno o más antagonistas (Baker & Cook, 1974).

El control biológico también llamado biocontrol, implica el uso de microorganismos antagonistas para reducir diversas enfermedades (Thakur & Singh, 2018). En este sentido, el control biológico se puede definir como la práctica de introducir o manejar poblaciones de organismos naturales o genéticamente modificados contra plagas y patógenos de una planta con el fin de reducir su población o al menos ralentizar su tasa de reproducción (Stirling, 2014). Actualmente se considera al biocontrol como una estrategia prometedora para la disminución de patógenos con el fin de mantener la producción agrícola de manera sostenible, y reducir la aplicación de plaguicidas de origen químico en la agricultura con efectos nocivos al ambiente (Thakur & Singh, 2018).

Los efectos del biocontrol no sólo se caracterizan por la supresión de patógenos sino también por el efecto en las plantas tratadas que presentan mayor tolerancia y/o resistencia a las enfermedades, mayor crecimiento y mejores rendimientos y calidad de los productos (Pal & Gardener, 2006). El control biológico mediante la utilización de microorganismos antagónicos posee muchas ventajas en el manejo de la enfermedad, tales como control a largo plazo de las enfermedades y prevención de otras secundarias, pocos o ningún efecto contradictorio, baja capacidad de generar resistencia en los patógenos, relación costo/beneficio favorable y ausencia de toxicidad y efecto nocivo sobre las plantas y demás organismos benéficos. Estas características lo convierten en la mejor alternativa para eliminar completa o disminuir sustancialmente el uso de agroquímicos sintéticos como parte fundamental del manejo integrado de la enfermedad (Guédez *et al.*, 2008).

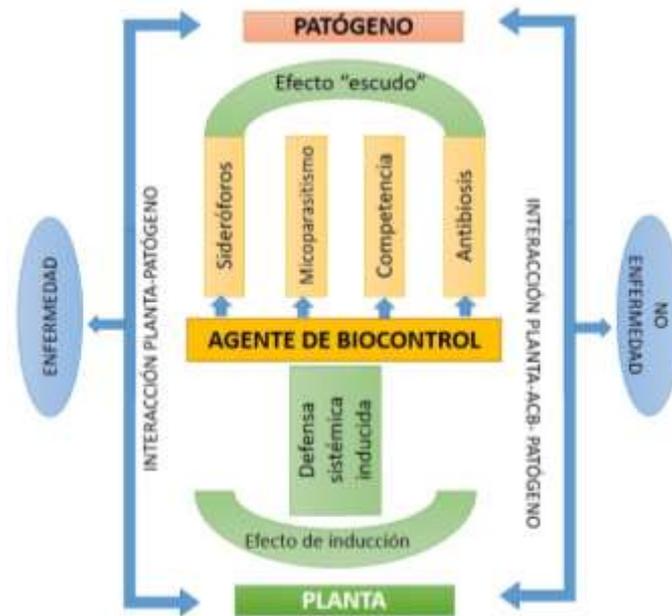
El biocontrol mediante el uso de microorganismos representa un enfoque favorable al medio ambiente para el manejo de diversos patógenos, particularmente del suelo, y para la reducción de enfermedades de las plantas, que ya muestra amplias perspectivas en la agricultura (Thakur & Singh, 2018). El biocontrol de patógenos de suelo puede incluir la incorporación del microorganismo antagonista al suelo para reducir los niveles del patógeno o el tratamiento directo a la semilla o sistema radicular del plantín o planta, para protegerla contra posibles infecciones (Coşkuntuna & Özer, 2008).

El importante papel que los métodos de control biológico pueden desempeñar para reducir la actividad y la propagación de fitopatógenos es posible gracias al enorme progreso realizado en el conocimiento de la interacción planta-patógeno en las últimas décadas (Hussain *et al.*, 2016). En cualquier método de biocontrol, la selección de los agentes de control biológico (ACB) es el paso fundamental. En este sentido, se evalúan varios caracteres – cualidades, entre ellos, la eficacia frente al patógeno, la presencia de algún efecto adverso (si hubiera) en el huésped u otros organismos benéficos, los mecanismos de inhibición involucrados, la producción a gran escala, la formulación, las condiciones de conservación, la vida útil y los métodos de aplicación (Deketelaere *et al.*, 2017).

Si bien los ACB incluyen microorganismos como virus, bacterias, hongos y nematodos que colaboran en la protección de cultivos (Mehta *et al.*, 2014), los más promisorios son los hongos antagonistas del género *Trichoderma*, que actúan como reguladores naturales en el suelo e impiden el desarrollo de hongos y oomycetes patógenos (Coşkuntuna & Özer, 2008; Fernández Barbosa & Suárez Meza, 2009). Las características antifúngicas de *Trichoderma* se conocen desde 1930, y ha habido desde entonces grandes esfuerzos para utilizar a este hongo en el control de enfermedades (Samuels, 1996). Este hongo no solo antagoniza con patógenos de plantas (Harman *et al.*, 2004; Benitez *et al.*, 2004), sino que también son un componente de la rizósfera que permite mejorar el crecimiento de plantas en asociaciones endófitas (Bailey & Lumsden, 1998; Druzhinina *et al.*, 2010).

Para el empleo de cualquier método de biocontrol lo más importante es la selección del agente y el estudio de los mecanismos que éste utiliza en el control del patógeno. Los microorganismos antagonistas utilizan diferentes estrategias o mecanismos por los

cuales ejercen su acción antagonista estos pueden dividirse en dos grandes categorías: la primera incluye un efecto protector sobre las plantas, y la segunda, es la que desencadena un efecto inductor en las plantas, es decir activa el sistema de defensa de las plantas, lo cual genera plantas más resistentes a las enfermedades (Thakur & Singh, 2018) (Figura 23).



**Figura 23.** Mecanismos de acción de diferentes agentes de control biológico contra patógenos de raíz (Adaptado de Thakur & Singh, 2018).

Específicamente, las especies de *Trichoderma* utilizan diversos mecanismos en el ataque a otros hongos y en la colonización del sistema radicular de las plantas. Los más destacados incluyen:

- *Competencia.* Las especies de este género son generalmente consideradas como competidoras agresivas (Samuels, 1996). Muy a menudo, son especies que poseen un rápido crecimiento y rápida colonización del sustrato, limitando el crecimiento de hongos patógenos (Papavizas, 1985). La competencia es uno de los mecanismos propuestos mediante el cual este género inhibe o limita el desarrollo del patógeno, aunque no ha demostrado ser el único (Howell, 2003).
- *Antibiosis.* Muchos aislamientos de *Trichoderma* producen antibióticos volátiles y no volátiles (Dennis & Webster, 1971). Howell & Stipanovic (1983) aislaron y describieron un antibiótico denominado gliovin de *Gliocladium virens* que fue fuertemente inhibidor de *Pythium ultimum* y de especies de *Phytophthora*. Sivan

*et al.* (1984) reportaron que el crecimiento de *Trichoderma*, antagonista de *Pythium aphanidermatum*, produce compuestos inhibitorios *in vitro*. Liftshitz *et al.* (1986) demostraron que el control de especies de *Pythium* en arvejas por cepas de *T. harzianum* y *T. koningii* fue debida a la producción de un factor tóxico producido por el organismo biocontrolador en la espermósfera inhibiendo el crecimiento del patógeno. La literatura demuestra que *Trichoderma* spp. secreta un número de antibióticos antifúngicos incluyendo pyrones, isocianatos, péptidos, peptaibols y trichotenos (Ghisalberti & Sivasithamparam, 1991; Schirmbock *et al.*, 1994). Sin embargo, aún falta correlacionar la antibiosis *in vitro* producida por *Trichoderma* spp., con lo que ocurre en la naturaleza.

- *Micoparasitismo*. Es la capacidad de un organismo de degradar y asimilar a otros hongos (Mondino & Vero, 2006), ha sido reportado para *Trichoderma* spp. contra muchos hongos patógenos del suelo (Elad *et al.*, 1983). *Trichoderma* spp. crece típicamente hacia la hifa de otro hongo, se enrolla sobre ella en una reacción mediada por lectinas, y degrada las paredes celulares del hongo objetivo por la secreción de diferentes enzimas líticas. Este proceso limita el crecimiento y actividad de hongos patogénicos (Ghisalberti & Sivasithamparam, 1991). Los ataques de *Trichoderma* a la hifa del huésped son mediante enrollamiento, generación de estructuras tipo ganchos y cuerpos similares a apresorios, que le permiten penetrar la célula del huésped secretando enzimas líticas. La interacción es específica, el hongo antagonista reconoce señales del hongo huésped, desencadenando el enrollamiento y penetración (Sivan & Chet, 1989). Las enzimas han sido reportadas mayoritariamente en aislamientos de *T. harzianum* (Harman, 2005).
- *Inducción de defensas en las plantas*. Cepas específicas del género *Trichoderma* colonizan y penetran los tejidos radiculares de las plantas e inician una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en ellas, considerados como parte de la respuesta de defensa de la planta, que concluye en una resistencia sistémica inducida en toda la planta (Bailey & Lumsden, 1998).

Actualmente existen en el mercado formulados biológicos basados en este microorganismo como principio activo. El uso de formulados comerciales presenta

algunos inconvenientes como su persistencia en el suelo, debido por un lado a las características genéticas de las cepas y por el otro, a las condiciones del medio ambiente, dado que son agentes introducidos a nuevos agroecosistemas (Aquino Martínez *et al.*, 2008). Por otra parte, se considera que parte del éxito del control biológico radica en obtener y utilizar microorganismos que sean aislados en los lugares nativos donde se presenta la enfermedad, ya que para controlar a un patógeno se debe considerar la variabilidad del aislamiento del antagonista en términos de su adaptación a las condiciones bióticas y abióticas específicas (Harman, 2006).

Dada la importancia a nivel mundial de la utilización del control biológico como una herramienta más en el marco de un manejo integrado de plagas y enfermedades; y a que regionalmente faltan alternativas eco-compatibles para el control de patógenos de suelo, en este capítulo se plantea como hipótesis: “Aislados nativos de *Trichoderma* spp. antagonistas naturales de patógenos de suelo en peral resultan efectivas para alcanzar el biocontrol de distintas especies de *Phytophthora* en cultivares susceptibles”.

#### **Objetivo principal**

Seleccionar aquellos aislados de *Trichoderma* spp. que manifiesten mayor capacidad de control y presenten varios mecanismos de acción; y compararlos con formulados comerciales en bioensayos en plantas jóvenes de peral

## MATERIALES Y METODOS

### 1. Patógeno

#### 1.1. Cultivo

En este estudio fue utilizado el aislado de *Phytophthora cactorum* (1378) incorporado al cepario de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNCo, seleccionado por ser la especie aislada con mayor frecuencia y por ser más patogénico. El aislado conservado en solución de agua con suelo estéril a 16 °C fue cultivado a partir de discos según metodología descrita en Cap II.

##### 1.1.1. Preparación del inóculo

El inóculo del patógeno consistió en discos de 5 mm de diámetro de la colonia en activo crecimiento, en medio selectivo CMA.

### 2. Hongos Antagonistas

#### 2.1. Cultivo

Los aislados de *Trichoderma* spp. seleccionados en el Capítulo III, fueron utilizados para la realización de ensayos de biocontrol a campo a escala semi-comercial. Los mismos fueron *Trichoderma harzianum* (T1330), *T. guizhouense* (T1367) y *T. harzianum* (T1371). Cada antagonista fue cultivado en medio sintético APD, a partir de discos conservados en tubos de 2 mL con agua destilada estéril (ADE) a 4 °C.

#### 2.2. Preparación de suspensiones

El inóculo se preparó como suspensión conidial ajustada en agua estéril (conidios/mL). Las suspensiones conidiales se obtuvieron por raspado de la superficie de la colonia de 5 días con escalpelo estéril, con re-suspensión en agua estéril y filtración a través de malla de tela estéril para eliminar restos de micelio. Las suspensiones fueron ajustadas a diferentes concentraciones de acuerdo a cada experimento, por recuento directo con cámara de Neubauer al microscopio óptico (Olympus, modelo CX21).

### 3. Estudio de eficacia de biocontrol a campo de aislados regionales de *Trichoderma* spp. frente a *Phytophthora cactorum*.

#### 3.1. Características de la plantación

El bioensayo se llevó a cabo en una parcela experimental (cuadro N° 8) en la Facultad de Ciencias Agrarias durante la temporada 2017/2018. La parcela se realizó con el siguiente marco de plantación: 6 filas distanciadas cada una entre sí por 1,20 m. y conformadas por 11 plantas distanciadas entre sí por 0,6m.

Las plantas utilizadas se adquirieron en el vivero de árboles frutales “Los Álamos de Rosauer”. Las mismas estaban conformadas por un portainjerto (pie) franco de dos años, injertadas con la variedad William's. Cada portainjerto se obtuvo por germinación directa de semillas de plantas madres, que luego de un año se trasplantaron los pies a campo y al invierno siguiente fueron injertados con la variedad William's. Luego de un año de crecimiento de la variedad, estuvieron disponibles para ser transplantados a campo.

Las plantas se colocaron en macetas de 20 litros con suelo de chacra (sin esterilizar). Las condiciones de riego fueron optimizadas por mes de acuerdo a los requerimientos hídricos de la planta, que se calcularon en función de su edad y las condiciones climáticas de la zona (Tabla 12) (Sanchez, 2010). El riego establecido fue por goteo (controlador de riego Galcon).

**Tabla 12.** Requerimientos hídricos para perales William's jóvenes (Sanchez, 2010)

Mes	Requerimiento hídrico
Sept-Oct	2 L/día
Noviembre	4 L/día
Diciembre	7 L/día
Enero	9 L/día
Febrero	7 L/día
Marzo-Abril	2 L/día

#### 3.2. Tratamientos

Para el ensayo se seleccionaron 3 aislados regionales *T. harzianum* (T1330), *T. guizhouense* (T1367) y *T. harzianum* (T1371) de acuerdo a lo descrito previamente y un

aislado comercial obtenido de un formulado comercial combinado de *Trichoderma* y micorriza (TiFi, Bioaggil; i.a: *T. atroviride* Cepa 898G con *Glomus* sp).

Los tratamientos controles fueron:

- Testigo químico: plantas inoculadas con el patógeno y tratadas con una solución de fosfito de potasio en dosis comercial.
- Testigo enfermo: plantas sólo inoculadas con el patógeno.
- Testigo *Trichoderma*: plantas inoculadas en suelo únicamente con suspensión de los aislados antagonistas regionales y comerciales.

Para cada uno de los 7 tratamientos se usaron 3 réplicas de plantas de pera (adaptado de McLeod *et al.*, 1995).

### **2.3.3. Formas de aplicación del antagonista y el patógeno**

A efectos de simular las condiciones naturales en que *Phytophthora* sp. infecta por la herida en la zona de injerto portainjerto-variedad, en los experimentos de bioensayo se realizó en dicha zona una herida con elemento cortante desinfectado.

Los antagonistas se inocularon como suspensión conidial (1 mL de  $10^6$  conidios/mL) y el patógeno como discos de micelio de 3 mm de diámetro (1 disco por herida).

## **3.4. Experimentos**

Para evaluar el control biológico se realizaron dos experimentos:

### **3.4.1. Experimento de efecto preventivo**

En la herida del injerto se inoculó con 1 mL de la suspensión del antagonista y luego de 48 horas, se repitió la inoculación con el mismo volumen de los mismos. Finalmente 24 horas después de la segunda inoculación, se inoculó con el patógeno en la herida (Figura 24).



**Figura 24.** Esquema del proceso de inoculación de los tratamientos preventivos.

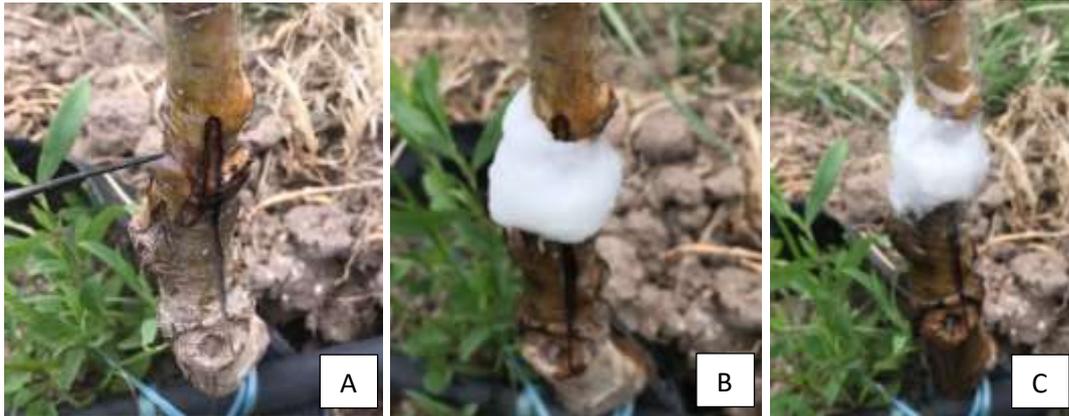
### 3.4.2. Experimento de efecto Curativo

Para probar el efecto curativo de los antagonistas, primero se procedió a inocular al patógeno en la herida del injerto (Figuras 25 y 26), luego de 24 horas se inoculó con el antagonista (volumen y concentración descrita anteriormente), repitiendo esta última inoculación luego de 48 horas.



**Figura 25.** Esquema del proceso de inoculación de los tratamientos curativos.

Con el objetivo de brindarle al patógeno las condiciones óptimas de humedad, luego de la inoculación, se cubrió la herida con algodón estéril, humedecido con agua destilada estéril (ADE), con posterior sellado con cinta adhesiva transparente.



**Figura 26.** Detalle de la inoculación de *P. cactorum* en la herida del injerto entre el pie y la variedad (A). Sellado de la herida para brindar condiciones adecuadas de humedad (B y C).

### 3.5. Evaluación

Tanto en el experimento de efecto preventivo como de efecto curativo, fueron incubados durante una temporada completa de crecimiento, desde septiembre (inoculación) hasta abril del año siguiente (caída total de las hojas de cada planta). Para establecer el biocontrol por parte de los tratamientos evaluados en cada experimento se estudió el desarrollo de sintomatología típica de la enfermedad, la comparación con el testigo enfermo, la evaluación de la presencia de zonas necróticas en el área del injerto y su medida como área (cm<sup>2</sup>) mediante el programa Image J 1x (Schneider *et al.*, 2012). Además para completar el estudio, se evaluó la recuperación tanto del patógeno como del antagonista. Para ello, se tomaron muestras de corteza de la zona del injerto y se realizaron aislamientos en medio selectivo PARP (para *Phyophthora cactorum*) y APD (para *Trichoderma* sp.).

### 3.6. Análisis estadístico

Dado el carácter cuantitativo de las variables respuestas de ambos experimentos, se procedió a utilizar un análisis de diferencia de medias de Tukey con el uso del programa estadístico R commander, plugin NMBU (R Core Team, 2013).

## 4. Mejora de la eficacia preventiva por agregado de un adherente

Dado que la aplicación por inmersión de las plantas en tratamiento con suspensión de *Trichoderma*, es una práctica factible a realizar en la región, en este ensayo se optimizó la inoculación de los antagonistas mediante el agregado de un adherente comercial

(RINO, Coadyuvante concentrado soluble S. Ando y Cía.). El adherente a una dosis de 10 cm<sup>3</sup>/hL se añadió a cada solución del antagonista *Trichoderma* sp. previo a su aplicación. Se utilizó la misma metodología para inocular las plantas descritas en el experimento de tratamiento preventivo. Cada tratamiento tuvo 3 repeticiones y se dejó una temporada completa de crecimiento. Se utilizó como testigo al tratamiento sin adherente. Se realizó la misma evaluación que en el tratamiento preventivo.

## **5. Evaluación de otros mecanismos de acción de aislados seleccionados de *Trichoderma* sp.**

Como experimentos complementarios y a efectos de caracterizar otros mecanismos de acción que podrían estar involucrados en el biocontrol de *Phytophthora* spp. en planta por *Trichoderma* spp. se evaluó la capacidad de los aislados de generar una hormona de crecimiento radicular y de producir moléculas con capacidad de quelar el hierro. Estas propiedades mejoran la disponibilidad de nutrientes para la planta, como en el caso del hierro y permiten un mejor aprovechamiento de los mismos al generar reguladores del crecimiento de la planta, que estimulan el crecimiento radicular.

### **5.1. Preparación de suspensiones de *Trichoderma* sp.**

Para cada uno de los ensayos, los tres aislados seleccionados se hicieron crecer en placas de Petri con 15 mL de APD. Luego de una semana de crecimiento, se obtuvieron suspensiones conidiales procediendo de la misma manera que en el punto 2.2.

### **5.2. Producción de ácido indol acético (AIA)**

En placas de Petri con medio triptocaseína de soja enriquecido con 5mM de L-triptofano (peptona de caseína 17g; peptona de soja 3g; ClNa 5g; fosfato di potásico 2,5g; L-triptofano 1,021 g/L; agar 15g; agua destilada 1000 ml, ajustado a pH 7,3), se colocaron segmentos de membranas de nitrocelulosa estériles.

Sobre cada segmento de membrana se sembraron 10 ul de una suspensión de conidios (10<sup>6</sup> conidios/mL) del antagonista y se incubaron en oscuridad a 28-30 °C durante 72 hs. Pasado el período de incubación, se retiraron las membranas conteniendo los cultivos y se colocaron en una caja de Petri vacía. Posteriormente se impregnaron con reactivo

Salkowski, preparado a partir de cloruro férrico en ácido sulfúrico (Glickmann & Deessaux, 1995). Se incubó entre 30 minutos y 3 horas a temperatura ambiente. Cada experimento por aislado de antagonista se realizó por triplicado.

Los microorganismos productores de AIA se evidenciaron por producción de una coloración rojiza sobre la membrana luego de la incubación.

### **5.3. Producción de quelantes del hierro**

Para evaluar la producción de sideróforos por parte de los aislados de *Trichoderma* sp. se empleó como medio de cultivo: sacarosa 5g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,8g;  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  0,6g; ácido cítrico 0,2g;  $\text{MgSO}_4$  trazas;  $\text{ZnSO}_4$  trazas; agua destilada 200 ml. En placas de Petri estériles se sembraron 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión de conidios ( $10^6$  conidios/mL), sobre la misma se colocaron 10 mL del medio de cultivo, se homogeneizó y se dejó incubar a  $26 \pm 2$  °C durante 72 horas. Se realizaron tres repeticiones por aislado.

Pasado el tiempo de incubación a cada placa se le realizaron orificios de 3 mm de diámetro con un sacabocado estéril. En los mismos se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de una solución estéril de perclorato férrico y se dejaron por 30 minutos para observar la formación y el color del halo. La reacción positiva se visualiza de color rojizo mientras la negativa no cambia de color, se observa color amarillo claro.

### **5.4. Efecto in vivo sobre el área fotosintéticamente activa**

A efectos de observar el efecto de los aislados seleccionados de *Trichoderma* sobre las plantas, y evaluados en experimentos de biocontrol, se realizó este estudio. Perales con las características descritas en 2.4.1. fueron tratados únicamente con los aislados antagonistas que se incorporaron al suelo. Se evaluó el área fotosintéticamente activa a través del área foliar del total de hojas de cada una, mediante la recuperación previa a la caída natural, con utilización del programa Image J 1x (Schneider *et al.*, 2012).

## RESULTADOS

### 1. Estudio de eficacia de biocontrol a campo de aislados regionales de *Trichoderma* spp. frente a *Phytophthora cactorum*.

En este estudio se evaluaron tres aislados regionales de *Trichoderma* sp. seleccionados en el capítulo III, frente a *Phytophthora cactorum* (1378) en perales de tres años. Luego de 8 meses del tratamiento, se comparó la eficacia de cada tratamiento con un aislado del antagonista del formulado comercial (*T. harzianum*) y un tratamiento químico (fosfito de potasio) convencional utilizado a campo en nuestra región. Si bien ningún aislado de *Trichoderma* sp. logró disminuir la incidencia de la podredumbre por *Phytophthora* sp., presentaron alta eficacia en el biocontrol de la severidad evaluada como área de podredumbre en la zona de injerto.

#### 1.1. Experimento de efecto de biocontrol preventivo

Todos los aislados de *Trichoderma* sp. evaluados disminuyeron significativamente la severidad de la podredumbre de cuello en peral por *P. cactorum*. La aplicación preventiva del antagonista 48 h antes que la inoculación del patógeno tuvo efecto al disminuir el área necrótica en relación con el testigo enfermo y no presentaron diferencias significativas con el aislado de *T.* comercial y el control químico (Tabla 2; Figura 27).



**Figura 27.** Imagen ilustrativa del aspecto en la zona de injerto inoculada únicamente con *P. cactorum* (1378). Flechas blancas indican el margen superior e inferior de la lesión.

Dentro de las especies de *Trichoderma* evaluadas, que fueron aisladas de perales del Alto Valle de Río Negro, se destaca el aislado *Trichoderma guizhouense* (T1367) que preventivamente controló la podredumbre necrótica generada por *P. cactorum* que sólo alcanzó 0,15 cm<sup>2</sup> de área.

## 1.2. Experimento de efecto de biocontrol curativo

En este experimento, si bien los aislados regionales de *Trichoderma* sp. aplicados 24 h después de inoculado el patógeno no presentaron diferencias significativas con el control químico y el aislado de *T. comercial*, se destacaron por los porcentajes de biocontrol más altos frente a *P. cactorum* (Tabla 2). Todos los tratamientos presentaron diferencias significativas respecto al testigo enfermo.

En relación al aislado de *T. comercial* presentó la menor eficacia de control frente a *P. cactorum*. Nuevamente, el aislado *T. guizhouense* (T1367) se destacó, en este experimento aplicado de manera curativa, logró controlar en 97 % la podredumbre por *P. cactorum* observándose la menor área de lesión promedio (0,11 cm<sup>2</sup>) (Tabla 2).

**Tabla 13.** Efecto de biocontrol preventivo y curativo de aislados de *Trichoderma* sp. sobre el área de podredumbre necrótica en plantas de peral inoculadas con *P. cactorum* (1378)

Tratamiento	Acción preventiva		Acción curativa	
	Área de lesión (cm <sup>2</sup> )	% Biocontrol	Área de lesión (cm <sup>2</sup> )	% Biocontrol
<i>T. harzianum</i> (T1330)	0,62 <sup>a*</sup>	86,97	0,55 <sup>a</sup>	82,65
<i>T. guizhouense</i> (T1367)	0,15 <sup>a</sup>	96,8	0,11 <sup>a</sup>	96,53
<i>T. harzianum</i> (T1371)	0,76 <sup>a</sup>	84	0,46 <sup>a</sup>	85,48
<i>T. comercial</i>	0,00 <sup>a</sup>	100	1,24 <sup>ab</sup>	60,88
Control químico	0,33 <sup>a</sup>	93	0,97 <sup>a</sup>	69,40
Testigo enfermo	4,76 <sup>b</sup>		3,17 <sup>b</sup>	

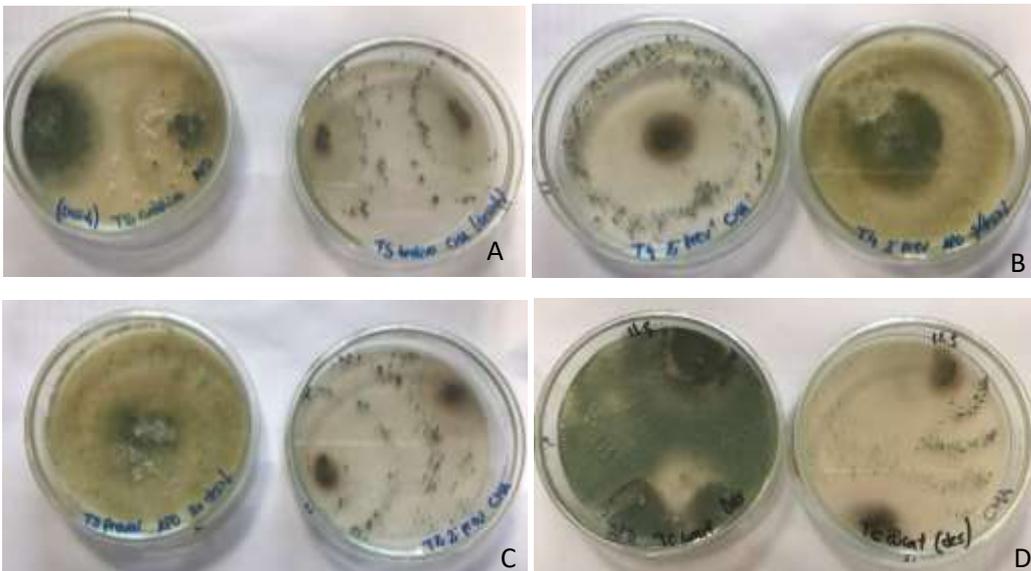
\*Letras iguales en la misma columna implican que no poseen diferencias significativas mediante análisis de diferencia de medias de Tuckey, con 95% de significancia. Área promedio de 3 repeticiones calculada con el programa Image J 1x.

En ambos experimentos, con el tratamiento del fungicida comercial (Fosfito de potasio) se observó en la herida tratada el desarrollo de tejido de cicatrización (callo). La formación del callo en la herida tratada de zona de injerto también se observó con el aislado *Trichoderma guizhouense* (T1367) (Figura 28).



**Figura 28.** Imagen ilustrativa del aspecto en la zona de injerto inoculada con *P. cactorum* (1378). (A) Desarrollo de callo en la herida de la zona de injerto en el tratamiento químico. (B) Escaso desarrollo de podredumbre necrótica en el tratamiento con aislado regional de *guizhouense* (T1367) (C) Avance de la podredumbre por *P. cactorum* (testigo enfermo). Flechas blancas indican el margen superior e inferior de la lesión.

Finalizados ambos experimentos, de cada una de las plantas de peral se tomaron muestras de corteza desde la zona del injerto y se llevó a cabo el aislamiento en medios de cultivo específicos para cada uno de los géneros evaluados (*Trichoderma* sp. y *P. cactorum*). En todas las muestras se logró recuperar a los aislados de *Trichoderma* sp. tanto en las evaluaciones de efecto preventivo como curativo. Asimismo, en el medio de cultivo CMA enmendado (PARP), específico para *Phytophthora* se observó el desarrollo de colonias miceliales de los antagonistas, mientras que *P. cactorum* sólo se logró aislar del control enfermo (Figura 29).



**Figura 29.** Aislamientos regionales y comercial de *Trichoderma* sp. tanto en medio APD como selectivo para *Phytophthora* sp. (CMA enmendado -PARP-) desde la zona de injerto tratada. Placas con 7 días desde el aislamiento. *T. harzianum* (T1371) (A); *T. guizhouense* (T1367) (B); *T. harzianum* (T1330) (C); T. comercial (D)

## 2. Mejora de la eficacia preventiva por agregado de un adherente

En este ensayo se evaluó la forma de aplicación preventiva y a las suspensiones ajustadas de los antagonistas se les adicionó un adherente comercial para mejorar la aplicación de los mismos.

En este ensayo nuevamente no hubo diferencias significativas entre los aislados de *Trichoderma* sp. regionales y la comercial o el fungicida comercial. Sin embargo, se destacó el tratamiento *T. harzianum* (T2) que inhibió casi en su totalidad el desarrollo del área necrótica por *P. cactorum* en la herida de injerto en peral inoculada.

Los únicos tratamientos que no generaron ningún tipo de lesión fueron la aplicación del fungicida químico y del aislado de *Trichoderma harzianum* comercial.

En este experimento se observaron lesiones de mucho menor longitud en comparación con los experimentos previos, por lo cual, el agregado del adherente mejora la eficacia del antagonista, disminuyendo el chorreado del mismo aplicado en una herida en el tronco (Tabla 14; Figura 30).

**Tabla 14.** Área de necrosis generadas en plantas de peral inoculadas con *P. cactorum* y tratadas preventivamente con los aislados de *Trichoderma* más el agregado de adherente.

Tratamiento	Área necrosis (cm <sup>2</sup> )	% Biocontrol
<i>T. harzianum</i> (T1330)	0,13 <sup>a</sup>	97,13
<i>T. guizhouense</i> (T1367)	0,42 <sup>a</sup>	90,74
<i>T. harzianum</i> (T1371)	0,16 <sup>a</sup>	96,47
<i>T. comercial</i>	0,00 <sup>a</sup>	100
Control químico	0,00 <sup>a</sup>	100
Control enfermo	4,54 <sup>b</sup>	-



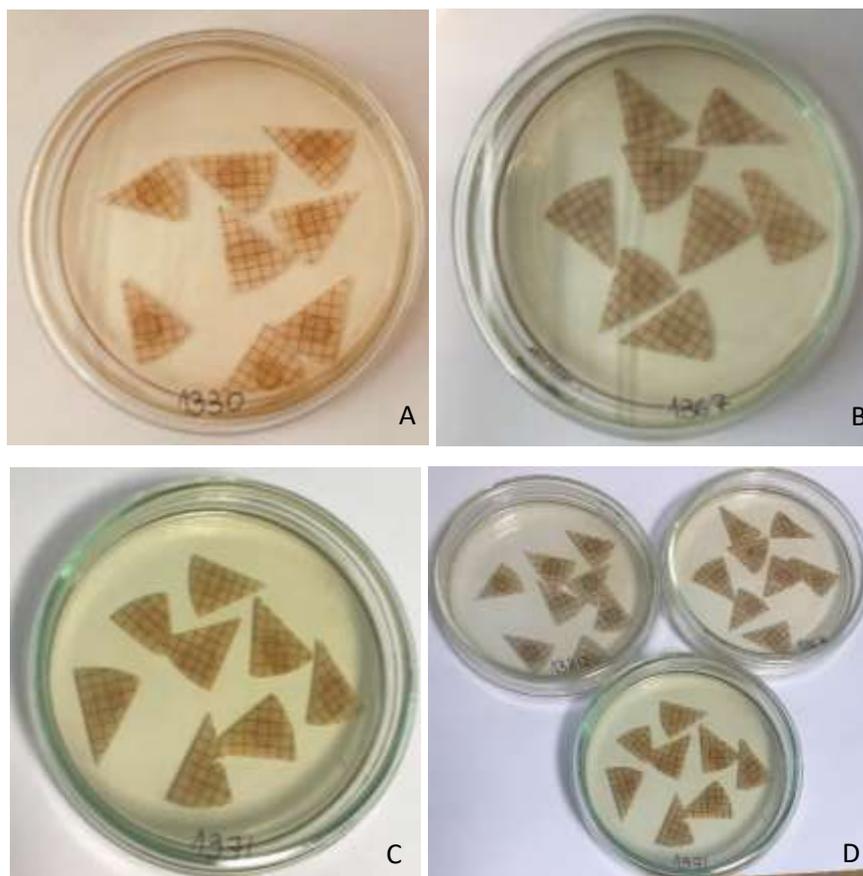
**Figura 30.** Comparación del tamaño de lesión generado por *P. cactorum* (1378) en la zona de injerto con aplicación del tratamiento preventivo más adherente (A), aplicación preventiva sin adherente (B) y testigo enfermo (C). Flechas blancas indican el margen superior e inferior de la lesión.

### 3. Evaluación de otros mecanismos de acción de aislados seleccionados de *Trichoderma* sp.

#### 3.1. Producción de ácido indol acético

Se evaluó cualitativamente la capacidad de producir AIA de los tres aislados regionales seleccionados de *Trichoderma* sp.

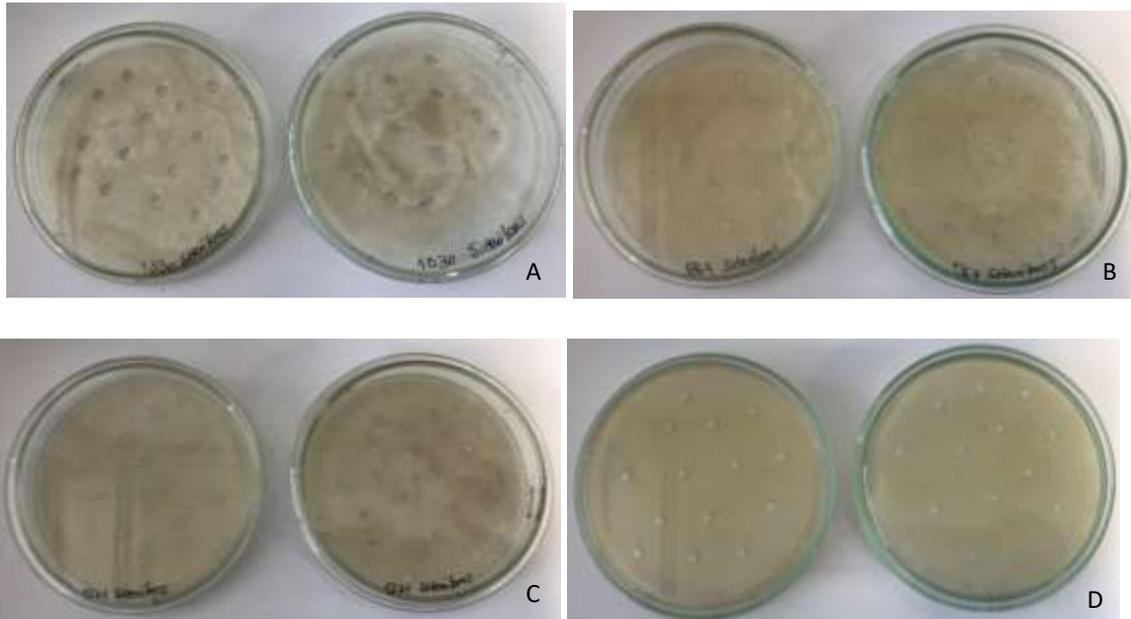
Se observó producción de ácido indol acético observado como una coloración rojiza en las membranas de nitrocelulosa en la zona en la cual fue inoculada con la suspensión de conidios de los aislados *T. harzianum* (T1330) y (T1371). Es decir que la producción de AIA fue positiva para estos dos aislados y favorecida con el agregado del precursor L-triptófano al medio de cultivo tripticaseína de soja (Figura 31).



**Figura 31.** Placas de Petri con porciones de membranas de nitrocelulosa luego de la incubación con reactivo Salkowski. Coloración positiva para la producción de AIA en los aislados 1330 (A) y 1371 (C); y negativa para el aislado 1367 (B). Evaluación comparativa de placas con membranas de los tres aislados (D).

### **3.2. Producción de sustancias quelantes del hierro**

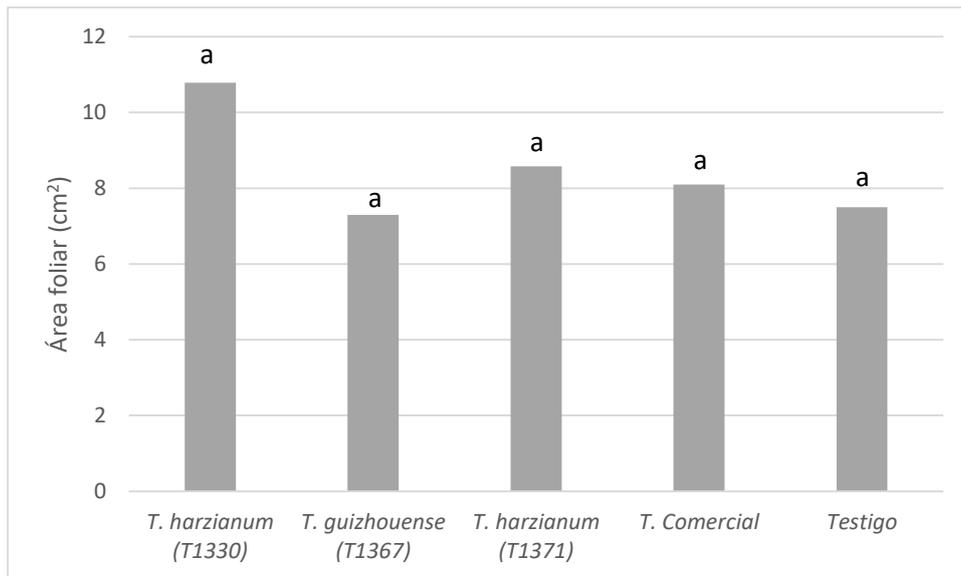
En las placas de Petri, luego del período de incubación con el agregado de la solución de perclorato férrico para la detección de formación de sideróforos, no se observó la aparición de ningún tipo de halo. En el caso de ser positiva la formación de sideróforos, se evidencia mediante la generación de halos de color naranja-rojizo alrededor de los orificios realizados en las placas con el microorganismo. Lo cual indicaría que no hay producción de sideróforos para los antagonistas (Figura 32).



**Figura 32.** Reacción negativa a producción de sideróforos por parte de los aislados de *Trichoderma* seleccionados. Placas de Petri luego de 24 horas de incubación con solución de perclorato férrico. No se evidencia generación de ningún tipo de halo alrededor de las perforaciones tanto en el frente (A, B y C) como en el fondo de las placas (D). *T. harzianum* (a); *T. guizhouense* (b); *T. harzianum* (c).

### 3.3. Efecto in vivo sobre el área fotosintéticamente activa

En este experimento se determinó el efecto de los antagonistas seleccionados sobre el área fotosintéticamente activa en peral luego de 8 meses de aplicación. Se midió el área foliar de todas las hojas de la planta (3 repeticiones) al finalizar el bioensayo. Si bien no existieron diferencias significativas entre los distintos tratamientos, se destaca ampliamente el tratamiento con el aislado regional *Trichoderma harzianum* (T2), con un promedio del área foliar de más de 10 cm<sup>2</sup> (Figura 33).



**Figura 33.** Área foliar promedio de las plantas inoculadas con los distintos aislados de *Trichoderma* sp.

## DISCUSIÓN

El objetivo de este capítulo fue evaluar la capacidad de aislados regionales seleccionados: *Trichoderma harzianum* (T1330), *T. guizhouense* (T1367) y *T. harzianum* (T1371), de biocontrolar a *Phytophthora cactorum* en perales de tres años, con el fin último de encontrar una herramienta para el control de esta enfermedad a campo.

De los tres aislados preseleccionados aquí evaluados, aislados del mismo sitio productivo en el cual se desarrolla la enfermedad, dos fueron identificados como *Trichoderma harzianum* (T1330 y T1371) una de las especies más utilizadas a nivel mundial en biocontrol. Las formulaciones comerciales que se aplican en campo suelen estar compuestas por varias especies de *Trichoderma* y entre las más utilizadas figuran *T. harzianum*, *T. viride* y *T. atroviride* (Lorito *et al.*, 2010). Generalmente estas cepas pertenecen a una región diferente a la que se aplica, lo que deriva en la menor eficiencia en el control (Harman *et al.*, 2010). Al respecto Altieri (1999) recomienda la utilización de especies nativas adaptadas a las condiciones ecológicas de la región de aplicación para garantizar la acción exitosa de biocontrol. En el mismo sentido Smith *et al.* (1990) encontraron que cepas de *Trichoderma sp.* provenientes de sitios donde el patógeno no estaba presente no fueron efectivas en el biocontrol.

En todas las evaluaciones de efecto de acción preventivo o curativo, los aislados de *Trichoderma sp.* disminuyeron significativamente la podredumbre de cuello y corona en peral causada por *Phytophthora cactorum*, llegando a valores de biocontrol de la enfermedad superiores al 90%. Esto representa una gran ventaja en el modo de aplicación del mismo ya que se podrían utilizar tanto en raíces preventivamente como en lesiones activas cuando la enfermedad haya sido diagnosticada.

Existen numerosas citas en la bibliografía que demuestran la efectividad de aislados regionales de *Trichoderma sp.* frente a distintas especies de *Phytophthora sp.* en plantas leñosas. Alexander & Stewart (2001); Roiger & Jeffers (1991); y Smith *et al.*, (1990) llegaron a resultados similares en el biocontrol de podredumbres radiculares en plántulas de manzanos. McLeod *et al.*, (1995) lograron disminuir la incidencia de podredumbre radicular en plantas de palta, ocasionadas por *P. cinnamomi*. Mpika *et*

*al.*, (2009), evaluaron aislados regionales de *Trichoderma* sp. frente a *Phytophthora palmivora*, con una amplia disminución de la enfermedad “vaina negra” en cacao. En todos estos casos la aplicación del antagonista se realizó de manera preventiva, por lo cual la eficiencia en el biocontrol de la enfermedad aplicado de manera curativa representa una gran ventaja.

Los mecanismos de acción de los agentes de control biológico pueden variar de acuerdo a los distintos sistemas de control, es decir, que están determinados por una compleja interacción ACB - patógeno - hospedante y el medio ambiente en el que desarrollan (Liu *et al.*, 2013). Además es claro que no existe un único modo de acción de los mismos para suprimir al patógeno, sino una combinación de micoparasitismo, antibiosis y competencia por espacio y nutrientes, similar a lo observado por McLeod *et al.*, (1995).

Un factor que contribuye a las actividades biológicas beneficiosas ejercidas por las cepas de *Trichoderma* es la amplia variedad de metabolitos secundarios que pueden producir (Vinale *et al.*, 2013). En este estudio se completó el análisis exploratorio del capítulo previo de distintos mecanismos de acción utilizados por los aislados preseleccionados. Los resultados de este estudio demuestran que tanto *T. harzianum* T1330 como T1371, son capaces de generar AIA en medio de cultivo enriquecido con L-triptófano. La producción controlada de estos compuestos podría mejorar la biofertilización cuando estos aislados se apliquen directo al suelo, ya que este compuesto es la principal fitohormona encargada de estimular el desarrollo radicular. Esto coincide con lo reportado por Gravel *et al.* (2007) y Hoyos-Carvajal *et al.* (2009), quienes obtuvieron resultados similares con otras especies del género. Se sabe que la producción microbiana de AIA resulta de diferentes vías metabólicas, y aunque se han identificado vías de biosíntesis independientes del triptófano en numerosos microorganismos, este precursor sigue siendo el más común en la producción de AIA de origen microbiano (Gravel *et al.*, 2007).

En este trabajo no se evidenció la producción de sideróforos en los aislados seleccionados de *Trichoderma*. La producción del mismo es importante ya que las moléculas quelantes pueden ser beneficiosas para las plantas porque pueden solubilizar el hierro que de otra manera no está disponible y pueden suprimir el crecimiento de microorganismos patógenos al privarlos de este micronutriente necesario para su

crecimiento (Vinale *et al.*, 2013). Este tipo de mecanismo de competencia por nutrientes se ha encontrado en muy pocos aislados del género *Trichoderma*. Hoyos-Carvajal *et al.* (2009) reportan que sólo el 8% de más de 100 aislados evaluados demostró poseer este mecanismo, mientras que el 60% de los mismos resultó positivo para las pruebas de producción de AIA. Este mecanismo de competencia por nutrientes implica una ventaja competitiva en aislados de suelos con deficiencias en este micronutriente, hecho que no ocurre en los suelos de la zona evaluada (Aruani & Sanchez, 2003).

Si bien el aumento del área foliar de las plantas inoculadas únicamente con los aislados del antagonista no fue estadísticamente mayor que las plantas sin inoculación, la estimulación del crecimiento producida por *Trichoderma* sp. en ausencia del patógeno fue evidente. Esto se observó particularmente con *T. harzianum* T1330 en que el área fotosintéticamente activa se incrementó en 43% en relación al testigo. Roiger & Jeffers (1991) encontraron que al aplicar *T. harzianum* al suelo en plántulas de manzana, aumenta el peso seco de los brotes y tallos de las plantas. Esto es una beneficio extra en la aplicación de un agente de control biológico que además de controlar a *P. cactorum*, aumenta el área fotosintéticamente activa de la planta.

## CONCLUSIONES PARCIALES

Los aislados regionales *T. harzianum* (T1330 y T1371) y *T. guizhouense* (T1367) seleccionados por sus atributos como biocontroladores, evaluados *in vivo* tienen la capacidad de reducir tanto preventiva como curativamente la podredumbre de cuello en peral, logrando hasta el 97 % de biocontrol de la necrosis ocasionada por *Phytophthora cactorum* en la zona del injerto.

Los aislados regionales seleccionados de *Trichoderma* presentaron porcentajes de biocontrol superiores a los alcanzados por el aislado comercial (*T. harzianum*) en el tratamiento de acción curativa frente a *P. cactorum*.

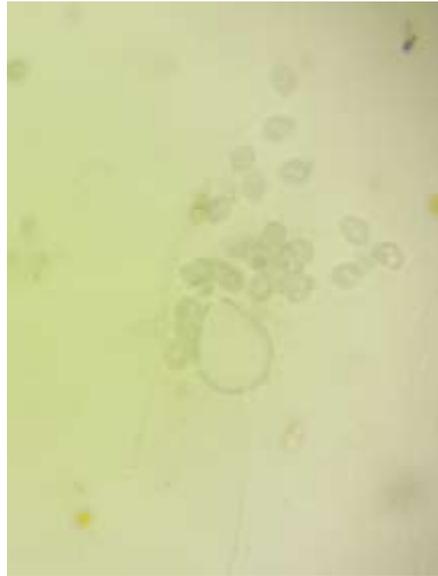
Se pudo comprobar que los aislados *T. harzianum* (T1330) y (T1371) tienen la capacidad de producir AIA y aumentar la capacidad fotosintética, atributos complementarios para la capacidad de los microorganismos de controlar a la enfermedad.

El biocontrol mediante el uso de los aislados regionales de *Trichoderma* es una herramienta que los productores pueden utilizar como baño de inmersión del sistema radicular, hasta la zona del injerto, previo a la implantación.

En evaluaciones futuras se planea evaluar mezclas de los aislados regionales que tuvieron mejores resultados en los bioensayos: *T. harzianum* (T1330) y *T. guizhouense* (T1367) frente a *P. cactorum*.

Dado que quedó demostrado que *P. cactorum* es capaz de producir podredumbre de raíz en pie franco de peral, se debería evaluar en un futuro la inoculación de estos antagonistas y el patógeno por inmersión de la planta o aplicando al sustrato.

## CONSIDERACIONES FINALES



En este trabajo de tesis se identificaron por primera vez para Argentina a las especies *Phytophthora rosacearum*, *Phytophthora thermophila*, *Phytophthora inundata*, *P. lacustris* y *Phytophythium mercuriale* relacionados a plantaciones comerciales de peral William's con síntomas de debilitamiento.

Si bien *Phytophthora cactorum* fue la principal especie causal de la podredumbre del cuello del peral, las especies *P. rosacearum*, *P. inundata* y *P. lacustris* se comportaron como patógenos en los experimentos en brotes tanto de William's y d'Anjou. Estas especies además de *Phytophthora cactorum*, presentaron capacidad para producir podredumbre de fruta, representando un riesgo para la poscosecha.

Se demostró que las especies de *Phytophthora* identificadas en esta tesis, tienen potencial para causar podredumbre en raíz de pie franco, demostrando que el mismo no es resistente y la podredumbre ocasionada por las mismas no se localiza únicamente en la variedad, tal como se indica en bibliografía.

A la podredumbre de cuello del peral William's, enfermedad ampliamente conocida en la región de la Norpatagonia, se incorpora la podredumbre de raíces del peral, por lo que se debe cambiar el manejo de las enfermedades causadas por *Phytophthora* spp. Además, se verificó que el cultivar d'Anjou es susceptible a podredumbres de brotes (cuello) y fruta por *Phytophthora*.

Se lograron identificar y seleccionar aislados regionales de *Trichoderma* spp. con potencial biocontrolador de *Phytophthora cactorum*, *P. lacustris*, *P. rosacearum* y *P. thermophila*. Estos aislados además presentan alta velocidad de crecimiento, rápida generación de conidios, inhibición del crecimiento micelial por generación de metabolitos difusibles, capacidad de promoción de crecimiento de raíces y generación de ácido indol acético.

Los aislados regionales *T. harzianum* (T1330 y T1371) y *T. guizhouense* (T1367), evaluados en plantas jóvenes de peral tienen la capacidad de reducir tanto preventiva como curativamente la podredumbre de cuello en peral ocasionada por *Phytophthora cactorum*, logrando hasta el 97 % de biocontrol.

En esta tesis se estudió la diversidad de especies de *Phytophthora* asociadas a cultivos debilitados de pera William's, responsables de podredumbres en cuello y raíces de peral William's y d'Anjou. Aislados regionales de *Trichoderma* spp. tuvieron muy buena capacidad de biocontrol de *Phytophthora* spp., lo que resulta promisorio para optimizar el uso como prácticas de manejo integrado de las podredumbres radiculares y de cuello del peral.

### Perspectivas futuras

Dada la relevancia de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis acerca de la patogenicidad de aislados de *Phytophthora* y los resultados de alta eficacia en biocontrol de los aislados de *Trichoderma* spp:

Se profundizarán en ensayos de biocontrol a escala semicomercial mediante el uso de éstos aislados individualmente y en uso combinado.

La evaluación del escalado para la producción de biomasa de aislados regionales de *Trichoderma* sp. y su evaluación en plantaciones comerciales de manzana, y en otros sistemas comerciales con problemáticas de suelo similares.

La posibilidad de evaluación de éstos aislados como inductores de defensa en cultivos comerciales de menor escala.

# ANEXOS

**Tabla 15.** Origen y ubicación de aislados regionales de *Trichoderma spp.*

<b>Numero</b>	<b>Especie</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Origen Geográfico</b>
1300	<i>Trichoderma sp</i>	Madera	General Roca
1301	<i>Trichoderma sp</i>	Madera	General Roca
1302	<i>Trichoderma sp</i>	Madera	General Roca
1303	<i>Trichoderma sp</i>	Madera	General Roca
1304	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1305	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1306	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1307	<i>Trichoderma sp</i>	Madera	General Roca
1308	<i>Trichoderma sp</i>	Madera	General Roca
1309	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Allen
1310	<i>Trichoderma sp</i>	Madera	General Roca
1311	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cnel. Gomez
1312	<i>Trichoderma sp</i>	Madera	Cmte. Cordero
1313	<i>Trichoderma sp</i>	Madera	General Roca
1314	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cipolletti
1315	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cipolletti
1316	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cipolletti
1317	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cipolletti
1318	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cipolletti
1319	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cipolletti
1320	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cipolletti
1321	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cipolletti
1322	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cipolletti
1323	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cipolletti
1324	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cipolletti
1325	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cipolletti
1326	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cipolletti
1327	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cipolletti
1328	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cipolletti
1329	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cipolletti
1330	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cipolletti
1331	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cipolletti
1332	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cipolletti
1333	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1334	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1335	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1336	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1337	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1338	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1339	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1340	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1341	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1342	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1343	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos

1344	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1345	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1346	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1347	<i>Trichoderma sp</i>	Madera	Cuatro Esquinas
1348	<i>Trichoderma sp</i>	Madera	Cuatro Esquinas
1349	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cmte. Cordero
1350	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cmte. Cordero
1351	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cmte. Cordero
1352	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cmte. Cordero
1353	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cmte. Cordero
1354	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cmte. Cordero
1355	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cmte. Cordero
1356	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cmte. Cordero
1357	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cmte. Cordero
1358	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cmte. Cordero
1359	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cmte. Cordero
1360	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cmte. Cordero
1361	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cmte. Cordero
1362	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cmte. Cordero
1363	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Allen
1364	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Allen
1365	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Allen
1366	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Allen
1367	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Allen
1368	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Allen
1369	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Allen
1370	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Allen
1371	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Allen
1372	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Allen
1373	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Allen
1374	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Allen
1375	<i>Trichoderma sp</i>	Madera	Cuatro Esquinas
1376	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1377	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1378	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1379	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1380	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1381	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1382	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1383	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1384	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1385	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1386	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos
1387	<i>Trichoderma sp</i>	Suelo	Cinco Saltos

---



## BIBLIOGRAFÍA GENERAL

Abad G. 2008. Methods for identification of *Phytophthora* species. WORKSHOP: Fighting *Phytophthora*: How to Detect, Investigate, and Manage Phytophthora. APS Centennial Meeting 2008

Agrios G.N. 1996. Fitopatología. Segunda Edición. Editorial Limusa S.A. México. 820pp.

Ahmad J. S. & Baker R. 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77: 182-189.

Alcoba N. J., Bejarano N. & Catacata J. 2005. Enfermedades de los cultivos de Jujuy y Salta diagnosticadas en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNJu. 1ª Edición. Editorial de la Universidad Nacional de Jujuy. Ediunju. San Salvador de Jujuy. 74pp.

Alexander B. J. R., & Stewart A. 2001. Glasshouse screening for biological control agents of *Phytophthora cactorum* on apple (*Malus domestica*). *New Zealand journal of crop and horticultural science*, 29(3), 159-169.

Alexopoulos C.J., Mims C.W. & Blackwell M. 1996. *Introductory Mycology*. 4th edition. Wiley, New York. 868 pp.

Alfenas A. C. 2007. *Métodos em fitopatologia*. UFV. 382 pp.

Alonso Reyes R., Barranco Martínez B., Gracia Rivero G. & Jiménez Montejó G. 2002. Actividad *in vivo* de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* en plántulas de tomate. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 66: 45-48.

Altieri A. 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 74: 19-31.

Aquino Martínez, J. G., Vázquez García, L. M. & Reyes Reyes, B. G. 2008. Biocontrol *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans. con Hongos Antagonistas Nativos de la Zona Florícola de Villa Guerrero, Estado de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 26 (2): 127-137.

Aruani M. C. & Sanchez E. E. 2003. Fracciones de micronutrientes en suelos del Alto Valle de Río Negro, Argentina. *Ciencia del Suelo* 21 (2): 78-81.

Avellá B. y Viñuela M. 2009. Alto Valle Variedades. CAR 2005. Censo Provincial de Agricultura Bajo Riego. Secretaria de Fruticultura de Río Negro. 37 pp.

Azarmi R., Hajieghrari B. & Giglou A. 2011. Effect of *Trichoderma* isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake. *African Journal of Biotechnology*, 10 (31): 5850-5855.

Bae H., Roberts D. P., Lim H. S., Strem M. D., Park S. C., Ryu C. M., Melnick R. L. & Bailey B. A. 2011. Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(3), 336-351.

- Bailey B. A., & Lumsden R.D. 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to plant pathogens. Enzymes, biological control and commercial applications. In: Harman G.E., & Kubicek C.P. (Eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 2: 185-204.
- Bailey, B. A., Strem, M. D., & Wood, D. 2009. *Trichoderma* species form endophytic associations within *Theobroma cacao* trichomes. *Mycological research*, 113(12), 1365-1376.
- Baker K. F. & Cook R. J. 1974. *Biological Control of Plant Pathogens*. Freeman. San Francisco. USA 442 pp.
- Barrera V. A. 2012. El género *Hypocrea* (Hypocreales, Ascomycota) en la Argentina. Estudio de la variabilidad molecular de su estado anamórfico *Trichoderma*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 241 pp.
- Benitez, C., Insúa, E., Duprat, F., & Grotte, M. 1998. Fruit Placement on the Tree and Its Influence on Maturity and Quality of Pears. In VII International Symposium on Pear Growing 475 (pp. 527-534).
- Benitez T., Rincon A. M., Limon M. C. & Codon A .C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7:249-260.
- Bergna D. A. 1982. Etiología de la podredumbre del tronco de los perales en el Alto Valle de Río negro. 2º Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Libro de Resúmenes. Ciudad de Buenos Aires. 20-26 de noviembre.
- Bestvater C.R. & Casamiquela C.H. 1983. Distribución textural de los suelos del Alto Valle. Boletín de divulgación técnica N°29. INTA. 7 pp.
- Bhaik A. 2017. Studies on *Phytophthora* fruit rot of apple and its management. Tesis Doctoral 85 pp.
- Bhat R.G., Colowit P.M., Tai T.H. & Browne G.T. 2006. Genetic and pathogenic variation in *Phytophthora cactorum* affecting fruit and nut crops in California. *Plant Disease* 90:161-169.
- Bielenin A., Jeffers S. N., Wilcox W. F., & Jones A. L. 1988. Separation by protein electrophoresis of six species of *Phytophthora* associated with deciduous fruit crops. *Phytopathology*, 78(11), 1402-1408.
- Bily D. S., Diehl S.V., Cook M., Wallace L. E., Sims L.L., Watson C., & Baird R. E. 2018. Temporal and Locational Variations of a *Phytophthora* spp. Community in an Urban Forested Water Drainage and Stream-runoff System. *Southeastern Naturalist* 17 (1) 176 - 201
- Bissett J., Gams W., Jaklitsch W., Redhead S. A. & Samuels G. J. 2015. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus* 6: 263–295
- Blanco G. 1999. El Alto Valle del Río Negro y la fruticultura. La historia de un origen pionero, un pasado de gloria y un presente difícil. En: Fruticultura moderna: tecnología, transferencia, capacitación y organización. Nueve años de cooperación técnica p. 17 - 29

- Brasier C. M., Sanchez- Hernandez E. & Kirk S. A. 2003. *Phytophthora inundata* sp. nov., a part heterothallic pathogen of trees and shrubs in wet or flooded soils. *Mycological Research*, 107 (4): 477–484.
- Bruzone I. 2010. Pera. Análisis de la cadena alimentaria. Ministerio de Agricultura, ganadería y pesca - Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos - Subsecretaría de Política Agropecuaria y Alimentos Dirección Nacional de Alimentos- Sector frutas. on line. Revisado: junio 2013 [www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r\\_32/cadenas/Frutas\\_Pera.html](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r_32/cadenas/Frutas_Pera.html)
- Bush E.A. 2002. Characterization of *Phytophthora* species in recycled irrigation water at a container nursery in southwestern Virginia. Thesis Master of Science. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia. 142 pp.
- Cámara Argentina de Fruticultores Integrados. Producción de peras y manzanas en Argentina. <http://www.cafi.org.ar/nuestra-produccion/> on line. Revisado Abril 2018
- Cameron H.R. 1960. Infection of Pear roots with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, 50, (9), 630.
- Cameron H.R. 1962. Susceptibility of pear roots to *Phytophthora*. *Phytopathology* 52: 1295-1297
- Causin R., Scopel C., Grendene A. & Montecchio L. 2005. An improved method for detection of *Phytophthora cactorum* (L.C.) Schröeter in infected plant tissues using SCAR markers. *Journal of Plant Pathology* 87:25- 35.
- Chambers S. M. & Scott E. S. 1995. *In vitro* antagonism of *Phytophthora cinnamomi* and *P. citricola* by isolates of *Trichoderma spp.* and *Gliocladium virens*. *Journal of Phytopathology*, 143: 471-477.
- Chaverri P., Branco-Rocha F., Jaklitsch W., Gazis R., Degenkolb T., & Samuels G. J. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107(3), 558-590.
- Chaverri P. & Samuels G. J. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. 119 pp.
- Chet I. & Baker R. 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from naturally suppressive of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 71: 286-290.
- Cichón L. I., Di Masi S.N., Fernández D.E., Magdalena J.C., Rial E.J. y Rossini M.N. 1996. Guía ilustrada para el monitoreo de plagas y enfermedades en frutales de pepita. INTA - EEA Alto Valle. 72 pp.
- Cogliati M., & Mazzeo N. A. 1999. Climatología del viento en el Alto Valle del Río Negro. *Energías Renovables y Medio Ambiente*, 3, 181-184.
- Cook R. J. 1985. Biological control of plant pathogens: theory to application. *Phytopathology*. 75: 25–29.
- Cook R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review Phytopathology* 31:53-80.

- Cooke D.E.L., Drenth A., Duncan J.M., Wagels G. & Brasier C.M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related *Oomycetes*. *Fungal Genetics and Biology*. 30:17-32.
- Cooke D.E.L., Schena L. and Cacciola S.O. 2007. Tools to detect, identify and monitor *Phytophthora* species in natural ecosystems. *Journal of Plant Pathology* 89 (1), 13-28
- Cordon V., Forquera J., Gastiazoro J., Lassig J., Bastanki M. y Nordestrom G. 2000. Caracterización climática del Alto Valle del Río Negro y Neuquén-Limay Inferior. Cátedra de Climatología y Fenología Agrícola. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Comahue. Cinco Saltos, Río Negro, Argentina. 53 pp.
- Coşkuntuna A. & Özer N. 2008. Biological control of onion basal rot disease using *Trichoderma harzianum* and induction of antifungal compounds in onion set following seed treatment. *Crop Protection* 27:330-336.
- Crovo V. & Clemente G. E. 2015. Eficacia de fungicidas de síntesis y biológico en base a *Trichoderma harzianum* para controlar patógenos de semillas de soja. *Fave. Sección ciencias agrarias*, 14(2)
- Das, A. K., Nerkar, S., Kumar, A. & Bawage S. 2016. Detection, identification and characterization of *Phytophthora* spp. Infecting citrus in India. *Journal of Plant Pathology*, 98 (1): 55-59
- Datnoff L.; Nemeš S. & Pernešny. 1995. Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. *Biological Control* 5:427-431.
- Daughtrey M. L. & Benson D. M. 2005. Principles of plant health management for ornamental plants. In. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 141-169.
- Degenkolb T., Von Doehren H., Fog Nielsen K., Samuels G. J., & Brückner H. 2008. Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chemistry & Biodiversity*, 5(5), 671-680.
- Deketelaere S., Tyvaert L., França S. C., & Höfte M. 2017. Desirable traits of a good biocontrol agent against *Verticillium* wilt. *Frontiers in microbiology*, 8, 1186.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. 1983. A rapid method for DNA extraction from plant tissue. [Plant Molecular Biology Reporter](#), 1: 19-21.
- Dennis C. & Webster J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: III. Hyphal interaction. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(3), 363-369.
- Dhingra O. D. & Sinclair, J. B. 1985. *Basic plant pathology methods*. CRC Press, Boca Raton, FL. 261 pp.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., González L., Tablada M., & Robledo Y. C. 2011. *InfoStat versión 2011*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar> 8, 195-199.
- Dick M. W. 2001. *Straminipilous Fungi*. Systematics of the *Peronosporomycetes* including accounts of the marine *Straminipilous* protists, the *Plasmodiophorids* and similar

organisms. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 670 pp. Dobra A. C., Rossini M. N., Barnes N. E. & Sosa M. C. 2007. Manejo integrado de enfermedades de los frutales de pepita. En: Árboles frutales: Ecofisiología, cultivo y aprovechamiento. Ed. Sozzi Gabriel. 589-615 pp

Dobra A. C., Rossini M. N., Barnes N. E. & Sosa M. C. 2007. Manejo integrado de enfermedades de los frutales de pepita. En: Árboles frutales: ecofisiología, cultivo y aprovechamiento. Sozzi G. Ed. Facultad de Agronomía, UBA. 589-612

Dobra A.; Sosa M.C., & Dussi M.C. 2008. Low Incidence of Fungal and Bacterial Diseases in the Pear Production of North Patagonia, Argentina. Proc. of the 10th International Pear Symposium. Ed: Webster-Oliveira ISHS. Acta Horticulturae 800: 907-912.

Dobra A. C., Sosa M.C., Lutz M.C. & Rodriguez G. 2011. Fruit Rot Caused by *Phytophthora* sp. in Cold-Stored Pears in the Valley of Rio Negro and Neuquén, Argentina. Acta Hort. 909, ISHS 2011.505-510.

Druzhinina I. S., Komoń-Zelazowska M., Ismaiel A., Jaklitsch W., Mullaw T., Samuels G. J., & Kubicek C. P. 2012. Molecular phylogeny and species delimitation in the section Longibrachiatum of *Trichoderma*. Fungal Genetics and Biology, 49(5), 358-368.

Druzhinina I. S., Kubicek C. P., Komoń-Zelazowsk M., Mulaw T. B. & Bissett J. 2010. The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. Evolutionary Biology, 10:94

Elad, Y., Boyle, P. & Henis, Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*- Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. Phytopathology 73: 85-88.

Ek-Ramos M. J., Zhou W., Valencia C. U., Antwi J. B., Kalns L. L., Morgan G. D., Kerns D. L. & Sword, G. A. 2013. Spatial and temporal variation in fungal endophyte communities isolated from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*). PLoS One, 8(6), e66049.

Elena K. & Paplomatas E.J. 1999. Collar Rot Caused by *Phytophthora citrophthora* on Pear Trees in Greece. *Phytoparasitica* 27 (4), 291-298

Elias R. A., & Arcos O. S. 1984. Contribución al estudio del control biológico de *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium* sp. mediante diferentes especies de *Trichoderma* (Dissertation). Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. 72 pp.

Erwin D.C. y Ribeiro O.K. 1996. *Phytophthora* Diseases World wide. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minn, USA.562 pp.

Etebarian, H. R., Scott, E. S., & Wicks, T. J. 2000. *Trichoderma harzianum* T39 and *T. virens* DAR 74290 as potential biological control agents for *Phytophthora erythroseptica*. European Journal of Plant Pathology, 106(4), 329-337.

Ezziyyani, M., Requena, M. E., Egea-Gilabert, C., & Candela, M. E. 2007. Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. Journal of Phytopathology, 155(6), 342-349.

Feldman J.M. & Gracia O. 1981. La podredumbre del tronco del peral causada por *Phytophthora cactorum* en Mendoza. IV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Libro de Resúmenes: 23. Ciudad de Córdoba.

Fernández Barbosa R. J., & Suárez Meza, C. L. 2009. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. Flavicarpa) del municipio zona bananera colombiana. Revista Facultad Nacional de Agronomía, 62(1), 4743-4748.

Fernández Valiela M.V. 1979. Introducción a la Fitopatología. 3ra<sup>a</sup> Edición. INTA. Colección Científica. Vol. III. Hongos. Talleres de Artes Gráficas Don Bosco. Ciudad de Buenos Aires. 613pp

Filadoro A. & Dicovskiy J. P. 2014. Complejo fruta de pepita serie “complejos productivos”. Secretaría de Política Económica y Planificación del Desarrollo Subsecretaría de Planificación Económica Dirección Nacional de Planificación Regional - Dirección Nacional de Planificación Sectorial. On line. Revisado: Julio 2018 [https://www.economia.gov.ar/peconomica/docs/Complejo pepitas.pdf](https://www.economia.gov.ar/peconomica/docs/Complejo_pepitas.pdf)

Fitria W., Suharjono L. & Arumingtyas E. L. 2013. Phylogenetic Identification of Pathogenic Fungi from Apple in Batu City, Malang, Indonesia. *Advances in Microbiology*, 3: 69-75

FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) 2009. Frac Code List: fungicides sorted by mode of action (including Frac Code numbering) [www.scribd.com/doc/13649437/Frac-Code List-2009-Web-MoAction-fungicidas](http://www.scribd.com/doc/13649437/Frac-Code-List-2009-Web-MoAction-fungicidas). On line. Revisado: abril 2017

Freeman S., Szejnberg A., & Chet I. 1986. Evaluation of *Trichoderma* as a biocontrol agent for *Rosellinia necatrix*. *Plant and Soil*, 94(2), 163-170.

Frezzi M.J. 1950. Las especies de *Phytophthora* en la Argentina. *Revista de investigaciones agrícolas*. 4: 47-133. Eds. INTA.

Fundación Barrera Zoofitosanitaria Patagónica (FunBaPa). Mensuario estadístico-Agosto 2014. Egreso de peras y manzanas de la región protegida Patagónica. On line. Revisado Abril 2018. <http://www.funbapa.org.ar/funbapa/wp-content/uploads/2014/10/agosto-MANZANA-PERA-2014.pdf>

Ghisalberti, E. L. & Sivasithamparam, K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology & Biochemistry* 23 (11): 1011-1020.

Giayetto, A.L. & Villarreal P. 2010. Introducción: Taxonomía y morfología de *Pyrus communis*. En: Pera William's: Manual para el productor y empacador. Pro Río Negro (Ed.). 167 pp.

Giayetto A. L. & Rossini M. 2010. Enfermedades y su manejo en el cultivo. En: Pera Williams: Manual para el productor y empacador. Pro Río Negro (Ed.). 167 pp

- Glickmann E. & Deessaux Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkosky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 45:631-640.
- Godtfredsen W. O., & Vangedal S. 1965. Trichodermin, a new sesquiterpene antibiotic. *Acta Chemica Scandinavica*, 19(5), 1088-102.
- Gravel V., Antoun H., & Tweddell R. J. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), 1968-1977.
- Grove, G. G. & Boal, R. J. 1991. Influence of temperature and wetness duration on duration of immature apple and pear fruit by *Phytophthora cactorum*. *Phytopathology* 81: 1465-1471.
- Guédez C., Castillo C., Cañizales L., & Olivar R. 2008. Biological control a tool for sustaining and sustainable development. *Control Biológico*, 7(13), 50-74.
- Guigón-López C., Guerrero-Prieto V., Vargas-Albores F., Carvajal-Millan E., Ávila-Quezada G., Bravo-Luna L., Ruocco M., Lanzuise S., Woo S. & Lorito M. 2010. Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. Su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28:87-96.
- Guzmán Lyon G. 2003. Identificación de especies de *Phytophthora* asociadas a *Prunus* spp., efecto de la saturación del suelo en el desarrollo de la pudrición radical y del cuello causada por *P. cryptogea* en portainjertos para duraznero y evaluación de nuevos fungicidas. Tesis Magíster en Ciencias Vegetales, Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Dirección de Investigación y Postgrado, Programa de postgrado en Ciencias de la Agricultura. 63 pp.
- Hanada, R. E., Pomella, A. W., Soberanis, W., Loguercio, L. L., & Pereira, J. O. 2009. Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against the black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. *Biological Control*, 50(2), 143-149.)
- Handelsman J. & Stabb E. V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* 8 (10):1855–1869
- Hansen E. M., Wilcox W. F., Reeser P. W. & Sutton W. 2009. *Phytophthora rosacearum* and *P. sansomeana*, new species segregated from the *Phytophthora megasperma* "complex". *Mycologia* 101: 129 – 135.
- Hardy G. S. J., Barrett S., & Shearer B. L. 2001. The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australasian Plant Pathology*, 30(2), 133-139.
- Harman G. E. 1992. The development and benefits of rhizosphere competent fungi for biological control of plant pathogens. *Journal of Plant Nutrition*. 15: 835-843.

- Harman G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84:377-393.
- Harman G. E. 2005. *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. *Biological Control: A Guide to Natural Enemies in North America*.
- Harman G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96 (2):190-194.
- Harman G. E., Howell R. C., Viterbo A., Chet I & Lorito M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*: Vol 2. 43-56
- Harman G., Obregon M., Samuels G. & Lorito M. 2010. Changing models for commercialization and implementation of biocontrol in the developed and developing world. *Plant Disease* 94: 928-939.
- Harris D.C. 1991. The *Phytophthora* diseases of apple. Review article. *Journal of Horticultural Science* 66:513-544.
- Harris D. C. & Bielenin A. 1986. Evaluation of selective media and bait methods for estimating *Phytophthora cactorum* in apple orchards soils. *Plant Pathology* 35:565-574
- Hermosa R., Rubio M. B., Cardoza R. E., Nicolás C., Monte E., & Gutiérrez S. 2013. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology*: 16, 69-80.
- Holmes G. J., & Eckert J. W. 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology* 89:716-721
- 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 (1): 4-10
- Howell C. R., & Stipanovic, R. D. 1983. Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens* and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. *Canadian Journal of Microbiology*. 29:321-324
- Hoyos-Carvajal L., Orduz S., & Bissett J. 2009. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological control*, 51(3), 409-416.
- Hüberli D., Hardy G. S. J., White D., Williams N., & Burgess T. I. 2013. Fishing for *Phytophthora* from Western Australia's waterways: a distribution and diversity survey. *Australasian Plant Pathology*, 42(3), 251-260.
- Hussain I., Alam S. S., Khan I., Shah B., Naeem A., Khan N., Ullah W., Adnan M., Shah S. R. A., Junaid K., Iqbal M. & Ahmed N. 2016. Medicinal plants rhizosphere exploration for the presence of potential biocontrol fungi. [Journal of Entomology and Zoology Studies](#), 4(3), 108-113.

- Jaklitsch W. M., & Voglmayr H. 2015. Biodiversity of Trichoderma (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in mycology*, 80, 1-87.
- Jackson T. J., Burgess T., Colquhoun, I., & Hardy G. S. 2000. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, 49(1), 147-154.
- Jeffers, S.N., Aldwinckle, H. S., Burr, T. J., Arneson, P. A. 1982. *Phytophthora* 448 and *Pythium* species associated with crown rot in New York apple orchards. *Phytopathology* 72 (5), 533-538
- Jeffers S.N. & Aldwinckle H.S. 1987. Enhancing detection of *Phytophthora cactorum* in naturally infested soil. *Phytopathology* 77:1475-1482
- Jeffers S.N. & Wilcox W.F. 1990. *Phytophthora* crown, collar and root rots. 43-45. En: Jones, A.L. y Aldwinckle, H.S. (Eds.). *Compendium of Apple and Pear Diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 100 pp.
- Jung T, Blaschke H & Neumann P. 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *European Journal of Forest Pathology* 26: 253–272
- Jung T., Cooke D. E. L., Blaschke H., Duncan J. M., Oßwald W., 1999. *Phytophthora quercina* sp. nov., causing root rot of European oaks. *Mycol. Res.* 103, 785–798.
- Jung T., Hansen E. M., Winton L., Oßwald W., Delatour C., 2002. Three new species of *Phytophthora* from European oak forests. *Mycol. Res.* 106, 397–411
- Jung T. & Nechwatal J. 2008. *Phytophthora gallica* sp. nov., a new species from rhizosphere soil of declining oak and reed stands in France and Germany. *Mycological Research* 112: 1195 – 1205
- Jung T., Pérez-Sierra A., Durán A., Jung M. H., Balci Y., & Scanu B. 2018. Canker and decline diseases caused by soil-and airborne *Phytophthora* species in forests and woodlands. *Persoonia*, 40, 182-220.
- Jung T., Scanu B., Bakonyi J., Seress D., Kovács G. M., Durán A., Sanfuentes von Stowasser E., Schena L., Mosca S., Thu P. Q., Nguyen C. M., Fajardo S., González M., Pérez-Sierra A., Rees H., Cravador A., Maia C. & Jung M. 2017. *Nothophytophthora* gen. nov., a new sister genus of *Phytophthora* from natural and semi-natural ecosystems. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 39, 143.
- Jung T., Stukely M. J. C. Hardy., G. E. St. J, White D., Paap T., Dunstan W.A. & Burgess T.I. 2011. Multiple new *Phytophthora* species from ITS Clade 6 associated with natural ecosystems in Australia: evolutionary and ecological implications. *Persoonia* 26: 13–39
- Kelley, W. D. 1976. Evaluation of *Trichoderma harzianum*-impregnated clay granules as a biocontrol for *Phytophthora cinnamomi* causing damping-off of pine seedlings. *Phytopathology*, 66, 1023-1027.
- Kamoun S. 2003. Molecular genetics of pathogenic Oomycetes. *Eukariotic cell*. 2:191-199

- Kexiang G., Xiaoguang L., Yonghong L., Tianbo Z. & Shuliang W. 2002. Potential of *Trichoderma harzianum* and *T. atroviride* to Control *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*, the Cause of Apple Ring Rot. *Journal of Phytopathology*, 150: 271–276.
- Khang V. T., Thi My Anh N., Minh Tu P. & Thi Hong Tham T. 2013. Isolation and selection of *Trichoderma* spp. exhibiting high antifungal activities against major pathogens in Mekong Delta. *Omonrice* 19: 159-171.
- Kubicek C. P. & Harman G. E. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. 293 pp. 1a Ed.
- Lamour, K.H., Daughtrey, M.L., Benson, D.M., Hwang, J., & Hausbeck, M.K. 2003. Etiology of *Phytophthora drechsleri* and *P. nicotianae* (= *P. parasitica*) diseases affecting floriculture crops. *Plant Dis* 87: 854–858.
- Latorre B. A., Rioja M. E., & Wilcox W. F. 2001. *Phytophthora* species associated with crown and root rot of apple in Chile. *Plant disease*, 85(6), 603-606.
- Latorre B. A., & Wilcox W. F. 1996. Detection of *Phytophthora* spp. in fruit trees by immunological assays. *Fitopatologia*, 31(3), 202-206.
- Lifshitz, R., Windham, M. T. & Baker, R. 1986. Mechanism of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76: 720-725.
- Lindquist J.C. 1938. Muerte de manzanas ocasionada por *Phytophthora cactorum*. *Revista de la Facultad de Agronomía de La Plata*. Ed. Coni, Bs. As. 21:195-199.
- Liu D., Coloe S., Baird R., & Pedersen J. 2000. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 471-471.
- Liu J., Sui Y., Wisniewski M., Droby S., & Liu Y. 2013. Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International journal of food microbiology*, 167(2), 153-160.
- Lumsden R. & Locke J. 1989. Biological control of *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* damping-off with *Gliocladium virens* in soil less mix. *Phytopathology* 70,301–366
- Lorito M., Woo S., Harman G. & Monte E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. *Annual Review of Phytopathology* 48: 395-417.
- Loyola L. 2014. Informe de Diagnóstico de los principales valles y áreas con potencial agrícola de la Provincia de Río Negro. Proyecto FAO UTF ARG 017 – “Desarrollo Institucional para la Inversión”. On line. Consultado: Agosto 2018. <http://www.fao.org/3/a-br171s.pdf>
- Machado M., Collazo C., Peña M., Coto O., & López M. O. 2013. First report of root rot caused by *Phytophthora nicotianae* in avocado trees (*Persea americana*) in Cuba. *New Disease Reports*, 28(9).
- Machinandiarena M. F., Lobato M. C., Feldman M. L., Daleo G. R., & Andreu A. B. 2012. Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Physiology*, 169(14), 1417-1424.

- MacKenzie D.R., Elliott V.J., Kidney B.A., King E.D., Royer M.H. & Theberge R.L. 1983. Application of modern approaches to the study of the epidemiology of diseases caused by *Phytophthora*. En: *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. Erwin D.C., Barnicki-García S. y Tsao P.H. (Eds.). pp. 303-313.
- Malajczuk N. 1983. Microbial Antagonism to *Phytophthora*. pp. 197-218. En: D.C. Erwin, S. Barnicki-Garcia, and P.H. Tsao (eds.). *Phytophthora. Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Epidemiology*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 392 p.
- Martin, F. N., Abad, Z. G., Balci, Y., & Ivors, K. 2012. Identification and detection of *Phytophthora*: reviewing our progress, identifying our needs. *Plant Disease*, 96(8), 1080-1103.
- McIntosh, D.L. 1959. Collar rot of pear trees in British Columbia. *Phytopathology*, 49, 795-797.
- McIntosh, D.L. 1960. The infection of pear rootlets by *Phytophthora cactorum*. *Plant Disease Reporter*, 44, 262-4.
- McIntosh, D. L. 1964. *Phytophthora* spp. in soils of the Okanagan and Similkameen valleys of British Columbia. *Canadian Journal of Botany*, 42 (10), 1411-1415.
- McIntosh, D. L. 1966. The occurrence of *Phytophthora* spp. in irrigation systems in British Columbia. *Canadian Journal of Botany*, 44(12), 1591-1596.
- McLean K. L., Hunt J. & Stewart A. 2001. Compatibility of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* C52 with selected fungicides. *New Zealand Plant Protection* 54:84-88.
- McLeod A., Labuschagne N., & Kotzé J. M. 1995. Evaluation of *Trichoderma* for biological control of avocado root rot in bark medium artificially infested with *Phytophthora cinnamomi*. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, 18, 32-37.
- Mehta C. M., Palni U., Franke-Whittle I. H., & Sharma A. K. 2014. Compost: its role, mechanism and impact on reducing soil-borne plant diseases. *Waste management*, 34(3), 607-622.
- Ming Q., Su C., Zheng C., Jia M., Zhang Q., Zhang H., Rahman K., Han T. & Qin, L. 2013. Elicitors from the endophytic fungus *Trichoderma atroviride* promote *Salvia miltiorrhiza* hairy root growth and tanshinone biosynthesis. *Journal of experimental botany*, 64(18), 5687-5694.
- Mircetich S. M., & Matheron M. E. 1976. *Phytophthora* root and crown rot of cherry trees. *Phytopathology*, 66(5), 549-558.
- Mircetich S. M., & Matheron M. E. 1983. *Phytophthora* root and crown rot of walnut trees. *Phytopathology*, 73(11), 1481-1488.
- Mitchell & Kannwischer-Mitchell. 1983. Relationship of inoculum density of *Phytophthora* species to disease incidence in various hosts. En: *Phytophthora: Its*

- biology, taxonomy, ecology and pathology. Erwin D.C., Barnicki-García S. y Tsao P.H. (Eds.). pp. 259-269
- Mondino, P. & Vero, S. 2006. Control biológico de patógenos de plantas. Facultad de Agronomía. Universidad de la república. Unidad de Educación Permanente. 1ª Ed. 160 pp.
- Monte E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology* 4: 1-4.
- Mpika J., Kébé I. B., Issali A. E., N'guessan F. K., Druzhinina S., Komon-Zélazowska M., Kubicek C. P. & Aké S. 2009. Antagonist potential of *Trichoderma* indigenous isolates for biological control of *Phytophthora palmivora* the causative agent of black pod disease on cocoa (*Theobroma cacao* L.) in Côte d'Ivoire. *African Journal of Biotechnology*, 8(20).
- Nagel J. H., Gryzenhout M., Slippers B., Wingfield M. J., Hardy G. E. S. J., Stukely M. J., & Burgess T. I. 2013. Characterization of *Phytophthora* hybrids from ITS clade 6 associated with riparian ecosystems in South Africa and Australia. *Fungal Biology*, 117(5), 329-347.
- Nechwatal J., Bakonyi J., Cacciola S. O., Cooke D. E. L., Jung T., Nagy Z. A., Vannini A., Vettraino A. M. & Brasier, C. M. 2013. The morphology, behaviour and molecular phylogeny of *Phytophthora* taxon Salixsoil and its redesignation as *Phytophthora lacustris* sp. nov. *Plant Pathology*, 62(2), 355-369.
- Ownley B. H. & Benson D. M. 1991. Relationship of matric water potential and air-filled porosity of container media to development of *Phytophthora* root rot of rhododendron. *Phytopathology* 81: 936-941
- Ozbay N. & Newman S. E. 2004. Biological control with *Trichoderma* spp with emphasis on *T. harzianum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 7 (4): 478-484.
- Pal K. K., & Gardener B. M. 2006. Biological control of plant pathogens. *The plant health instructor*, 2, 1117-1142.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 23: 23-54
- Paredes Angulo L. A. 2016. Efecto del glifosato y fosfito de potasio sobre la germinación, crecimiento y la capacidad antagonista de *Trichoderma asperellum* (TSV2), *Trichoderma asperellum* (TCA21) y *Trichoderma harzianum* (TCA23) en condiciones de laboratorio. Tesis de grado. 73 pp.
- Perazzolli M., Dagostin S., Ferrari A., Elad Y., & Pertot I. 2008. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. *Biological control*, 47(2), 228-234.
- Pérez-Sierra A., López-García C., León M., García-Jiménez J., Abad-Campos P. & Jung T. 2013. Previously unrecorded low-temperature *Phytophthora* species associated with *Quercus* decline in a Mediterranean forest in eastern Spain. *Forest Pathology* 43, 331–339

- Pimentel D. 2009. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. In: Peshin R, Dhawan AK (eds) Integrated pest management: innovation development process, vol 1. Springer, Dordrecht, pp 89–111
- Pfender W. F., Hine R. B. & Stanghellini M. E. 1977. Production of sporangia and release of zoospores by *Phytophthora megasperma* in soil. *Phytopathology* 67: 657-663
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Red Agraria. 2009. Diferenciación de variedades de Peras y Manzanas cultivadas en la Nord Patagonia con fines comerciales. Universidad Nacional del Comahue - Facultad de Ciencias Agrarias Área PostCosecha - Tecnología de Frutas. On line. <[http://www.redagraria.com/investigacion/fca\\_unc/tecnologia/frutas/Peras/Williams.html](http://www.redagraria.com/investigacion/fca_unc/tecnologia/frutas/Peras/Williams.html)> Consultado: Agosto 2018
- Reeser, P. W., Sutton, W., Hansen, E. M., Remigi, P., & Adams, G. C. 2011. *Phytophthora* species in forest streams in Oregon and Alaska. *Mycologia*, 103(1), 22-35.
- Rivero V. 2010. *Phytophthora cactorum*: Caracterización, epidemiología e incidencia en la productividad y en la calidad de frutos de peral cv. Williams. Trabajo de tesis para acceder al título de magíster en la maestría y especialización en fruticultura de clima templado-frio.
- Rodríguez A. B. 2004. Factores climáticos. Efectos sobre la calidad de la fruta. *Rompecabezas Tecnológico* 40:4-9.
- Rodríguez A. B. & Muñoz A. R. 2006. Síntesis agrometeorológica para el período 1990-2004. EEA Alto Valle. Boletín de divulgación técnica Nº 53. EEA Alto Valle. CR Patagonia Norte. General Roca, Argentina. 38 pp
- Roiger D. J., & Jeffers S. N. 1991. Evaluation of *Trichoderma* spp. for biological control of *Phytophthora* crown and root rot of apple seedlings. *Phytopathology*, 81(8), 910-917.
- Rossi V., & Patteri E. 2009. Inoculum reduction of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, through application of Trichoderma-based products. *Biological control*, 49(1), 52-57.
- Rossini M.N. 2001. Oídios de frutales de clima templado. En: Oídios. Stadnik, M.J. y M.C. Rivera (Eds.). Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna. 335-360
- Rossini M.N. 2007. Relevamiento e incidencia de virosis en frutales de pepita en el Alto Valle de Río Negro. Tesis para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba Facultad de Ciencias Agropecuarias Escuela para Graduados. 122 pp
- Rossini M. 2013. Enfermedades de *Malus domestica*. En: Atlas fitopatológico INTA, Argentina
- Rossini M, Dobra A. & Di Masi S. 1997. Las podredumbres radicales y del cuello en manzanos y perales en Alto Valle de Río Negro y Neuquén. *RIA Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 28: 73-79.

- Rossini M. & Di Masi S. 1996. Las podredumbres radicales en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén. Boletín técnico. INTA Alto Valle. 14 pp
- Rossini M. & Pérez B.A. 2009. Enfermedades de *Pyrus communis* L. (peral). Atlas Fitopatológico Argentino. On line. <http://www.fitopatoatlas.org.ar/default.asp?hospedante=786>> Consultado: Agosto 2018.
- Samuels G. J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycological Research. 100 (8): 923-935.
- Samuels G. J. 2004. *Trichoderma* a guide to identification and biology. United States. Department of Agriculture-Agricultural Research Service. Systematic Bitany and Mycology Laboratory. 40 p
- Samuels G. J. 2006. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology 96(2): 195-206.
- Sanchez E. 2010. Pera Williams. Manual para el productor y el empacador. 168 pp. 1ra. ed. Gral. Roca, Río Negro AR: Erregé.
- Schnabel G., Rollins A. P., & Henderson G. W. 2011. Field evaluation of *Trichoderma* spp. for control of Armillaria root rot of peach. Plant Health Progress. doi:10.1094/PHP-2011-1129-01-RS.
- Schneider C. A., Rasband W. S. & Eliceiri K. W. 2012. [NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis](#)". Nature methods 9(7): 671-675
- Servicio nacional de sanidad y calidad agroalimentaria (SENASA). On line. Consultado Julio 2018. [www.senasa.gob.ar](http://www.senasa.gob.ar)
- Sivan A. & Chet I. 1989. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. Phytopathology 79, 198–203.
- Sivan A., Elad Y. & Chet I. 1984. Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. Phytopathology 74: 498-501.
- Sivasithamparam K. & Ghisalberti E. L. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. En *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics (C. P. Kubicek & G. E. Harman, eds): 139–191. Taylor & Francis, London.
- Smillie R., Grant B. R., & Guest D. 1989. The mode of action of phosphite: Evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp. in plants. Phytopathology 79: 921-926
- Smith I. M., Dunez J., Lelliott R.A., Phillips D.H. & Archer S.A. 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Mundi-Prensa Libros. 671 pp.
- Smith V., Wilcox W. & Harman G. 1990. Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. Phytopathology 80: 880-885.

- Sosa M.C., Lutz M.C., Velez M.L. & Greslebin A.G. 2016. Pre-harvest rot of pear fruits Golden Russet Bosc caused by *Phytophthora lacustris* and *Phytophthora drechsleri* in Argentina. Australasian Plant Diseases Notes: 10:18. 1833-928X
- Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga, L., & Coronado, M.F. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Revista Facultad de Agronomía (Luz) 16:509-516.
- Stirling G. R. 2014. Biological control of plant-parasitic nematodes: soil ecosystem management in sustainable agriculture. Biological Crop Protection/CAB International, Brisbane/Oxfordshire
- Storti L. 2016. Informes de cadena de valor frutícola: manzana y pera. SUBSECRETARIA DE PLANIFICACIÓN ECONÓMICA. 58 pp. On line. Consultado: Julio 2018. [https://www.economia.gob.ar/peconomica/docs/2017/SSPE\\_Cadena\\_de\\_Valor\\_Manzana\\_y\\_pera.pdf](https://www.economia.gob.ar/peconomica/docs/2017/SSPE_Cadena_de_Valor_Manzana_y_pera.pdf)
- Stukely M. J. C., J. Webster L., Ciampini J. A., Brown E., Dunstan A., Hardy G. E., Woodman G. J., Davison E. M. & Tay F. C. S. 2007. *Phytophthora inundata* from native vegetation in Western Australia. Australasian Plant Pathology, 36, 606–608.
- Sutton J. C., Sopher C. R. & Owen-Going T.N. 2006. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: Current knowledge and perspectives. Summa Phytopathologica 32, 307-21.
- Thakur P. & Singh I. 2018. Biocontrol of Soilborne Root Pathogens: An Overview. In Root Biology (pp. 181-220). Springer, Cham.
- Tapwal A., Kumar R., Gautam N., & Pandey S. 2012. Compatibility of *Trichoderma viride* for selected fungicides and botanicals. International Journal of Plant Pathology, 3(2), 89-94.
- Thomidis T. 2001. Testing Variability in Pathogenicity of *Phytophthora cactorum*, *P. citrophthora* and *P. syringae* to Apple, Pear, Peach, Cherry and Plum Rootstocks. Phytoparasitica 29 (1): 149-151
- Thomidis T., Tsipouridis C. & Cullum J. 2002. Pathogenicity and relative virulence of 11 Greek *Phytophthora* species on apple and pear rootstocks. New Zeland Journal of Crop and Horticultural Science, 30: 261-264.
- Tomlinson J.A., Boonham N., Hughes K.J.D., Griffin R.L. & Barker I. 2005. On-site DNA extraction and real-time PCR for detection of *Phytophthora ramorum* in the field. Applied and Environmental Microbiology Nov:6702-6710.
- Türkölmez, Ş. & Çiftçi, O. 2016. First Report of *Phytophthora palmivora* Causing Crown and Root Rot on Pear (*Pyrus communis*) Trees in Turkey. *Plant Diseases Notes*, 100 (2), 519.
- Tuset J.J., Hinarejos C. & Mira J. L. 2002. Podredumbre de los frutos del peral causada por *Phytophthora cactorum* en el área mediterránea española *Bol. San. Veg. Plagas*, 28, 639-645.

- Vargas Gil S., Pastor S. & March G. J. 2009. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. *Microbiological Research* 164 (2): 196-205.
- Vettarino A. M., Morel O., Perlerou C., Robin C., Diamandis S. & Vannini A. 2005. Occurrence and distribution of *Phytophthora* species in European chestnut stands, and their association with Ink Disease and crown decline. *European Journal of Plant Pathology* 111: 169–180
- Vial A., Latorre B. A. & Ortúzar J. 2006. Characterization of *Phytophthora citrophthora* and *P. inundata* associated to foot and root rot of citrus trees in Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*, 33(3): 205-216.
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L., Marra R., Barbetti M. J., Li H., Woo S. L. & Lorito M. 2008. Trichoderma-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*. 40: 1-10.
- Vinale F., Nigro M., Sivasithamparam K., Flematti G., Ghisalberti E. L., Ruocco M., Varlese R., Marra R., Lanzuise S., Eid A., Woo S. L. & Lorito M. 2013. Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS microbiology letters*, 347(2), 123-129.
- Vizcaíno J. A., Sanz L., Basilio A., Vicente F., Gutiérrez S., Hermosa M. R. & Monte E. 2005. Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections. *Mycological Research*, 109 (12): 1397–1406.
- Waterhouse G. M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Barry. 24 pp
- Wellburn A. R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, 144(3), 307-313.
- White T. J., Bruns T., Lee S., & Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Ed. by Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.; White, T. J. San Diego: Academic Press, pp. 315–321.
- Wilson C. & Wisniewski M. 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology* 27:425-441.
- Worcel G. 2006. Diagnóstico regional del Alto Valle de Río Negro. Proyecto FAO TCP/ARG/3002. On line. <[http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/programas/fao\\_sagpya/3002/DiagRegionalAV.pdf](http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/programas/fao_sagpya/3002/DiagRegionalAV.pdf)> Consultado: Junio 2018.
- Yamak F., Peever T. L., Grove G. G., and Boal R. J. 2002. Occurrence and identification of *Phytophthora* spp. pathogenic to pear fruit in irrigation water in the Wenatchee River Valley of Washington State. *Phytopathology* 92:1210-1217.
- Yang X., & Hong C. X. 2016. Diversity and populations of *Phytophthora*, *Phytophthium* and *Pythium* species recovered from sediments in an agricultural run-off sedimentation reservoir. *Plant Pathology*, 65(7), 1118-1125.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*. 7:203–214.

Zentmyer G. A. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph No. 10. APS Press, St. Paul

Zubeldía H. 2007. Breve comentario sobre el sector frutícola regional. 2007/2008. Secretaría de Fruticultura de Río Negro. On line. <<http://www.fruticultura.gov.ar/contenido/1.1-Datos-sector-fruticola-07-08.pdf>> (Consultado: Junio 2018)