



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

**Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
Universidad Nacional de La Plata**

**Herramientas biológicas.
Un aporte para elaboración de un plan de manejo
de *Nacobbus aberrans***

TESIS DOCTORAL

Ing. Agr. Mg. Sc. Sebastián Garita

**Director: Dr. Andrés Nico
Co-Director: Dra. Marcela Ruscitti**

2019

Agradecimientos

- A la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, por brindar educación de posgrado, libre, gratuita y de calidad.
- Al CONICET por la beca de estudios que me permitió dedicarme a tiempo completo al doctorado.
- Al Instituto de Fisiología Vegetal (UNLP-CONICET) por brindar un espacio donde se puede trabajar con comodidad. Equipos, espacios, recursos humanos y materiales, sean muchos o sean pocos, siempre están disponibles para que el quiera trabajar. Esto no es solo una decisión de la dirección, sino una actitud de todos los que forman parte del instituto. A todos ellos, GRACIAS.
- A mis directores por su acompañamiento y ayuda en la realización de esta tesis, siempre respetando los temas de mi interés y forzándome hacia la realización de un trabajo de calidad académica.
- Al grupo de trabajo, por ser mi sostén y mi motor diario. Su apoyo incondicional durante estos 5 años fueron claves para la realización de este trabajo. Con ellos dan ganas de seguir, de proyectar, de andar nuevos caminos, y allá vamos...!! El trabajo en equipo divide los esfuerzos y multiplica los resultados.

Dedicatoria

A los productores del Cinturón Hortícola Platense, a quienes admiro y respeto por su trabajo diario en la producción de alimentos.

A mi madre, que con amor me ha acompañado desde mis inicios académicos en salita de 4 hasta la finalización de este doctorado.

A mi padre que me espera en el cielo.

Índice

RESUMEN	8
Publicaciones vinculadas a esta Tesis doctoral	10
CAPITULO 1	12
1.1 <i>NACOBBUS ABERRANS</i> , THORNE, 1935; THORNE Y ALLEN 1944	13
1.2 Nematodos agalladores en el Cinturón hortícola platense.	14
1.3 Daños y pérdidas provocadas por <i>Nacobbus aberrans</i>	15
1.4 Situación actual y perspectivas.....	17
1.5 HIPOTESIS, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
1.5.1 Hipotesis	19
1.5.2 Objetivo general	19
1.5.3 Objetivos específicos.....	19
1.6 Referencias	20
CAPITULO 2	24
2.1 INTRODUCCIÓN.....	25
2.1.1 <i>Nacobbus aberrans</i> , Thorne 1935, Thorne & Aleen 1944.....	26
2.1.2 Morfología de <i>Nacobbus aberrans</i>	26
2.1.3 Ciclo de vida de <i>Nacobbus aberrans</i>	27
2.1.4 Factores que inciden en el ciclo de vida de <i>N. aberrans</i>	30
2.1.5 El sitio de alimentación	31
2.2 ENSAYO EXPERIMENTAL	32
2.2.1 Objetivos.....	32
2.2.2 Materiales y métodos.....	32
Diseño experimental y análisis estadístico.....	33
Detalle de las Prácticas y técnicas realizadas.....	33
2.2.3 Resultados y discusión	39
2.3 CONSIDERACIONES FINALES	51
2.4 REFERENCIAS	52
CAPITULO 3	58
3.1 INTRODUCCIÓN.....	59
3.1.1 Tipos de micorrizas	59
3.1.2 Proceso de colonización por micorrizas arbusculares	60
3.1.3 Beneficios de la simbiosis micorrícica	63

3.2 PRIMER ENSAYO EXPERIMENTAL	64
3.2.1 Objetivo	64
3.2.2 Materiales y métodos.....	64
Tinción de raíces para observación de hongos micorrícicos (Phillips y Hayman, 1970).....	65
Porcentaje de micorrización o colonización micorrícica (Trouvelot <i>et al.</i> , 1986)	65
Viabilidad de las estructuras fúngicas (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1990).....	65
3.2.3 Resultados.....	66
3.2.4 Consideraciones finales del ensayo	66
3.3 PRODUCCIÓN DE INÓCULO MICORRÍCICO	67
3.3.1 Objetivo	67
3.3.2 Materiales y métodos.....	67
Material de propagación	67
Cultivo de “plantas trampa”	68
3.3.3 Resultados.....	69
3.4 SEGUNDO ENSAYO EXPERIMENTAL	69
3.4.1 Objetivos.....	69
3.4.2 Materiales y métodos.....	70
Material vegetal	70
Trasplante	70
Inoculación con <i>N. aberrans</i>	71
Diseño experimental	71
Variables analizadas.....	71
3.4.3 Resultados y discusión	72
Comportamiento de los hongos formadores de micorrizas arbusculares	72
Variables vinculadas a la población de <i>N. aberrans</i>	74
Parámetros vinculados al crecimiento y la fisiología de las plantas	76
Indicadores de estrés en plantas.....	80
3.5 CONSIDERACIONES FINALES	83
3.6 REFERENCIAS	84
CAPITULO 4	90
4.1 INTRODUCCIÓN.....	91
4.1.1 Biofumigación con brasicáceas	92

4.1.2 Síntesis e hidrólisis de glucosinolatos	93
4.2 PRIMER ENSAYO	95
4.2.1 Objetivos:	95
4.2.3 Materiales y métodos.....	95
Material Vegetal	95
Inoculación con <i>N. aberrans</i>	96
Diseño experimental y análisis estadístico.....	96
VARIABLES ANALIZADAS.....	96
4.4 Resultados y discusión	97
4.2.5 Consideraciones finales del ensayo	93
4.3 SEGUNDO ENSAYO	94
4.3.1 Objetivos.....	94
4.3.2 Materiales y métodos.....	94
Diseño experimental	94
Preparación de plantines.....	95
Biofumigación e inoculación con <i>N. aberrans</i>.....	95
VARIABLES A ANALIZAR.....	96
4.4 Resultados y discusión	96
4.5 Consideraciones finales	98
4.4 REFERENCIAS	99
CAPITULO 5	104
5.1 INTRODUCCIÓN	105
5.1.1 Utilización de hongos para el control de nematodos fitoparásitos	107
5.1.2 <i>Purpureocillium lilacinum</i>	110
5.1.3 <i>Pleurotus spp.</i>	111
5. 2 PRODUCCIÓN DE INÓCULO FÚNGICO	112
5.2.1 Objetivos.....	112
5.2.2 Metodología.....	113
Repiques de material.....	113
Condiciones de incubación.....	114
Sustratos	114
5.2.3 Resultados.....	114
5.2.4 Consideraciones finales	116

5.3 ENSAYOS DE CONTROL DE <i>NACOBBUS ABERRANS</i> A PARTIR DE LA INOCULACIÓN DEL SUSTRATO CON <i>PURPUREOCILLIUM LILACINUM</i> Y <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i>	116
5.3.1 Objetivos.....	116
5.3.2 Materiales y métodos.....	116
5.3.3 Resultados y discusión	118
5.5 ENSAYO EXPERIMENTAL COMBINANDO HONGOS NEMATÓFAGOS Y HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES	125
5.5.1 Objetivos.....	125
5.5.2 Metodología.....	126
Material vegetal	126
Trasplante e inoculación	126
Diseño experimental y análisis de resultados	126
Variables analizadas	126
5.5.3 Resultados y discusión	126
5.4 CONSIDERACIONES FINALES DE ESTE CAPÍTULO.....	128
5.5 REFERENCIAS	128
CAPITULO 6	135
6.1 INTRODUCCIÓN.....	136
6.2 Conocimientos del ciclo de vida como herramienta en el diseño DE un plan de manejo	137
6.3 CONSIDERACIONES FINALES	139
6.4 REFERENCIAS	140

RESUMEN

Nacobbus aberrans (Thorne 1935, Thorne & Allen 1944), conocido comúnmente como el “falso nematodo del nudo” o “nematodo del rosario”, provoca importantes pérdidas de rendimiento en diversos cultivos hortícolas del continente americano y de Argentina.

De acuerdo al amplio número de hospederos, y la diversidad de ambientes donde se lo ha encontrado, se trata de un microorganismo con una gran capacidad de adaptación, lo que dificulta su control. De un modo general los síntomas en la parte aérea incluyen una reducción del crecimiento, clorosis, enrollado de los márgenes foliares y marchitez, y menor tamaño de frutos, lo que se ve reflejado en menor rendimiento. En las raíces el principal síntoma visible es la presencia de agallas y alteraciones en el crecimiento de las ramificaciones secundarias y terciarias.

Con la prohibición de uso del bromuro de metilo en la biofumigación de suelos, adversidades bióticas que se encontraban “silenciadas”, tomaron relevancia. Esto explica en parte, la presencia de *N. aberrans* como un problema fitosanitario de gran magnitud en nuestra zona.

El primer objetivo planteado en este trabajo fue relacionar el ciclo de vida *N. aberrans* y sus mecanismos de parasitismo, con las alteraciones morfofisiológicas que provoca en las plantas de tomate infectadas. Las modificaciones celulares observadas en los cortes histológicos de raíz realizados en este trabajo confirman los daños en los tejidos de conducción, causando alteraciones en el flujo normal de agua y nutrientes, lo que explica el resto de los síntomas observados, como el efecto sobre la conductancia estomática, donde los valores medidos en las plantas parasitadas fueron significativamente menores que en las plantas testigo. La eficiencia del FSII y la fijación de CO₂ (fotosíntesis neta) mostraron valores más bajos en las plantas parasitadas. Otros parámetros que disminuyeron fueron el Índice de verdor y el contenido de proteínas solubles. Mientras que los parámetros relacionados con el estrés evaluados tales como el contenido de prolina y malonildialdehído (MDA) en raíces y de azúcares totales aumentaron significativamente.

El siguiente objetivo fue evaluar el efecto de la micorrización de las plantas de tomate con hongos del género *Glomus*, sobre la población de *N. aberrans*. Esta simbiosis, que se produce entre hongos y las raíces de las plantas reporta una serie amplia de beneficios para ambos simbiosistas. Los resultados obtenidos, permitieron

afirmar que los hongos micorrícicos arbusculares constituyen una interesante herramienta para el control de *N. aberrans*, ya sea por la mejora de ciertas funciones fisiológicas de la planta o por acción directa en el control del nematodo. En este trabajo se observó una reducción significativa de la población del nematodo, sin verse afectada la colonización micorrícica, por lo cual se pudo confirmar un efecto antagonista de estas cepas sobre *N. aberrans*.

Otros microorganismos ensayados para el control de *N. aberrans* fueron los hongos nematófagos *Pleurotus ostreatus* y *Purpureocillium lilacinum*. Se seleccionaron las cepas cuya multiplicación fue factible de realizar en las condiciones del laboratorio, para luego producir inóculo en escala para los posteriores ensayos. Ajustada la producción de inóculo se evaluó la incidencia de la inoculación con ambos hongos sobre la población de *N. aberrans* y sobre el crecimiento de las plantas de tomate platense. El análisis nematológico mostró diferencias significativas entre el tratamiento control y los tratamientos con ambos hongos. Para las variables número de huevos en la raíz, número de vermiformes en el sustrato, y población final, los tratamientos con *P. ostreatus* y *P. lilacinum* presentaron valores significativamente inferiores al control. Respecto a las mediciones en las plantas, en presencia del nematodo, los controles tuvieron una reducción significativa en el peso de frutos cosechados, pero los tratamientos con hongos consiguieron mantener sus valores sin diferencias. Cuando se evaluaron los parámetros vinculados al estrés, sólo se observaron aumentos significativos en aquellos tratamientos relacionados al parasitismo de *N. aberrans*, no registrándose indicios de que los hongos nematófagos inoculados en el sustrato tengan algún efecto negativo sobre las plantas. Cabe destacar el efecto de *P. lilacinum* como promotor del crecimiento vegetal.

Otra práctica que se evaluó en este trabajo fue la biofumigación con *Brassica oleracea*, si bien en los últimos años esta práctica ha tenido una mayor difusión entre investigadores y productores, es una herramienta conocida y utilizada hace muchos años. La biofumigación provocó una reducción significativa en la población de *N. aberrans*, a las dos dosis ensayadas en comparación al testigo sin biofumigar. Al analizar las variables vinculadas al estrés, se observó un aumento significativo en la concentración de prolina y MDA del tejido radicular en las plantas biofumigadas. Si bien las plantas donde se incorporó repollo tuvieron un crecimiento mayor, estos

resultados podrían ser indicio de algún tipo de fitotoxicidad, por lo que deberían continuarse los estudios.

Existen una gran diversidad de herramientas y prácticas efectivas para ser aplicadas, solas o combinadas, en el control de *N. aberrans*, pero para ello resulta indispensable que sean accesibles para su utilización y que se acompañe con información y asesoramiento para que su uso sea parte de un plan estratégico e integrado.

Publicaciones vinculadas a esta Tesis doctoral

Garita, S.; Bernardo, V.; De Almeida Guimaraes, M.; Arango, M.C.; Ruscitti, M. 2019. Micorrización e enxertia melhoram o crescimento de tomateiro e diminuem a população de *Nacobbus aberrans*. Revista Ciência Agronômica, ISSN 1806-6690.

Garita, S.; Bernardo, V.; Ripodas, J.I.; Arango, C.; Ruscitti, M. Morphological and physiological alterations caused by *Nacobbus aberrans* in tomato plants. Anais 36° Congresso Brasileiro de Nematologia. ISBN 978-85-66836-25-7. Caldas Novas, Goiás. Brasil. 26 al 30 de mayo de 2019. Con referato

Ripodas, J.; Garita, S.; Bernardo, V.; Ruscitti, M.; Arango, C.; Hernández, M. Efecto de la aplicación in vitro de aceites esenciales sobre *Nacobbus aberrans* y *Paecilomyces lilacinus*. Dominguezia Vol. 34(Suplemento): 112-113. ISSN 1669-6859.2018. Con referato

Garita S.; Bernardo V.; Ripodas J.; Arango C.; Ruscitti M. Comportamiento de *Solanum sisymbriifolium* como portainjerto de tomate en suelos infestados con *Nacobbus aberrans*. Libro de Resúmenes 40° Congreso Argentino de Horticultura, p.310, Córdoba, 2 al 5 de octubre de 2018. Con referato.

Garita, S.; Bernardo, V.; Da Silva, J.; Arango, C.; Saparrat, M.; Ruscitti, M. Efecto de la inoculación con dos aislamientos de *Paecilomyces lilacinus* en el crecimiento inicial de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). IV Libro de resúmenes Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Mar del Plata. Argentina. 2018. Con referato.

Garita, S.; Ripodas, J.; Ruscitti, M.; Arango, C.; Bernardo, V. Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to alleviate stress caused by *Nacobbus aberrans* nematode. XV Spanish-Portuguese Congress of Plant Physiology. Barcelona, España. 2017. Con referato

Garita, S.; Ruscitti, M.; Arango, C.; Rolla Duarte, M. Uso combinado de micorrizas arbusculares y biofumigación para el control de *Nacobbus aberrans*. Anais 54 Congresso Brasileiro de Olericultura. Recife, Brasil, 2016. Con referato

Garita, S.; Ripodas, J.; Ruscitti, M.; Henning, C. Arango, C Actividad Nematicida de aceites esenciales de especies nativas de América sobre *Nacobbus aberrans*. Dominguezia - Vol. 32(2) – 2016. Con referato

CAPITULO 1

Introducción

1.1 *NACOBBUS ABERRANS*, THORNE, 1935; THORNE Y ALLEN 1944

Nacobbus aberrans (Thorne 1935, Thorne & Allen 1944), conocido comúnmente como falso nematodo del nudo o nematodo del rosario, provoca importantes pérdidas de rendimiento en cultivos hortícolas del continente americano. Su presencia y daño han sido reportados en Perú, Bolivia, Chile, Argentina, México, Ecuador y Estados Unidos (Manzanilla-López *et al.*, 2002). En Brasil, Israel, y la Unión Europea se considera una plaga cuarentenaria, ubicada en todos los casos, en la categoría de mayor peligrosidad por su potencial de causar graves daños económicos (EPPO, 2019).

El primer registro de *N. aberrans* en nuestro país es de Costilla *et al.* (1977) en un cultivo de papa a 2000 metros de altura snm en la provincia de Tucumán. Posteriormente aparecen registros de este fitoparásito en diversas regiones: Salta, Río Negro, (Chaves y Torres, 1993); Catamarca (Costilla, 1985); Misiones (Chaves, 1984); Jujuy (Muruaga de L'Argentier *et al.*, 2005); Córdoba, Santa Fe (Doucet y Gardenal, 1992) y, La Rioja (Del Toro *et al.*, 2004).

En un amplio informe realizado por Manzanilla-López *et al.* (2002) se indica que la presencia de *N. aberrans* en el continente, ha sido documentada en 18 familias botánicas y 84 spp. De esas 18 familias botánicas, en nuestro país han sido reportadas 13: Amarantaceae, Apiaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae, Convolvulaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Liliaceae, Piperaceae, Plantaginaceae, Poaceae, Portulacaceae y Solanaceae (Doucet y Lax, 2005).

Considerando la diversidad de ecorregiones y el amplio número de hospederos que ataca, se trata de un organismo con una gran capacidad de adaptación y parte de las dificultades de su control están vinculadas a su versatilidad.

Con el desarrollo de la nematología en América Latina, las investigaciones sobre este nematodo se fueron incrementando, y comenzaron a detectarse diferencias en el nivel de agresividad que distintas poblaciones del nematodo tenían sobre los hospederos. Esto dio lugar al diseño de un “*test de hospederos diferenciales*”, que clasificó las poblaciones en grupos dependiendo de la forma en que atacaban diferentes cultivos como tomate, papa, remolacha, pimiento y poroto (Castiblanco *et al.*, 1998). Con la aplicación de nuevas técnicas a la nematología, como los *perfiles isoenzimáticos*

(Ibrahim *et al.*, 1997); los *polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción* (RFLP) (Hunt *et al.*, 2003) y la secuenciación de regiones ITS del ADN ribosómico (Anthoine y Mugniéry, 2005); se pudo determinar que *N. aberrans* es un complejo de especies o al menos de razas de una misma especie (Vovlas *et al.*, 2007).

No se dispone aún de suficiente información para hacer modificaciones en los clados sistemáticos (Manzanilla-López, 2010), pero es de esperar que en los próximos años la taxonomía integrativa, es decir, la que combina caracteres morfológicos, bioquímicos y moleculares, aporte claridad a este complejo grupo taxonómico. Actualmente *N. aberrans* se ubica en el orden Tylenchida, suborden Tylenchina, familia Pratylenchidae (ITIS, 2019).

Los avances en este sentido, cobran importancia en dos aspectos: uno referido al estudio de herramientas de control y resistencia genética, y otro relacionado a los controles de cuarentena, ya que en el caso de la papa y la remolacha se trata de productos exportables que hospedan a *N. aberrans* en sus tejidos.

1.2 NEMATODOS AGALLADORES EN EL CINTURÓN HORTÍCOLA PLATENSE.

Analizando la incidencia de los nematodos endoparásitos sedentarios en el Cinturón Hortícola de La Plata (CHLP) es interesante destacar el marcado predominio de *Nacobbus aberrans* sobre *Meloidogyne spp* en la actualidad (Nico, 2014). Reportes de los años '60 (Moreno, 1961) hacen suponer que *Meloidogyne spp.* estaba presente en la región antes que *N. aberrans* y que durante un largo período fue el nematodo fitoparásito con mayor incidencia. Sin embargo, las muestras analizadas durante los últimos años indican que *Nacobbus aberrans* es responsable de más del 80 % de los síntomas de agallamiento observados en plantas hortícolas de la región. Su presencia en el CHLP se ha reportado en repetidas oportunidades sobre una amplia variedad de cultivos (Chaves y Sisler, 1980; Cap *et al.*, 1981; Cap *et al.*, 1983; Silvestri *et al.*, 1985) y desde hace unos años es la principal adversidad fitosanitaria presente en el CHLP (Nico, 2014).

1.3 DAÑOS Y PÉRDIDAS PROVOCADAS POR *Nacobbus aberrans*

Inicialmente el ataque de este tipo de nematodos comienza en “manchones” o sectores aleatorios donde las plantas presentan menor crecimiento. En la medida en que la población aumenta y se disemina, los daños pueden presentarse en la totalidad de los lotes. De un modo general los síntomas en la parte aérea incluyen una reducción y retraso del crecimiento apical, clorosis, enrollado de los márgenes foliares y marchitez, y menor tamaño de frutos (Doucet y Lax, 2015) (Fig. 1.1).

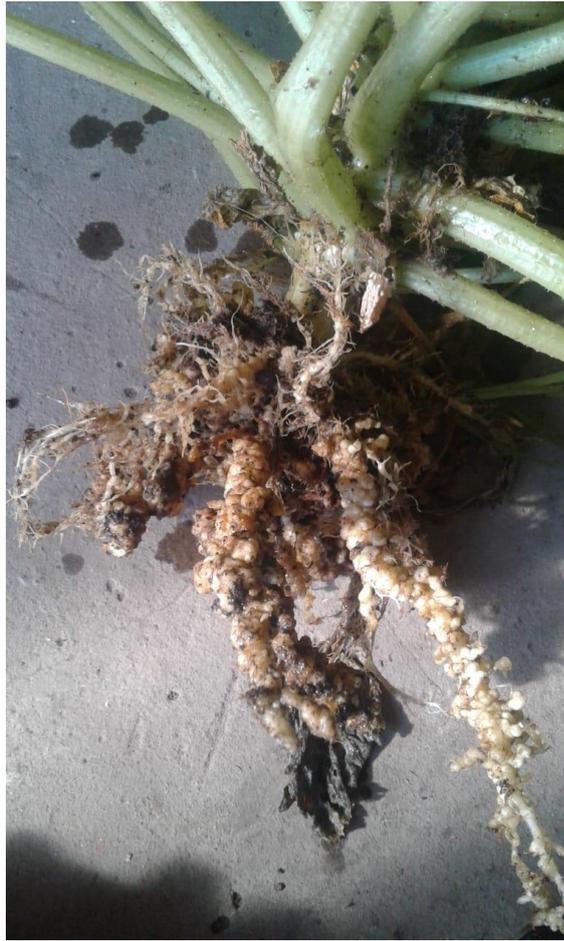
Figura 1.1. Síntomas en la parte aérea de plantas de tomate causados por *Nacobbus aberrans*.



A: planta sana por tratamiento fitosanitario en el lomo. B: planta afectada sin tratamiento fitosanitario en el suelo.

En las raíces el principal síntoma visible es la presencia de agallas y alteraciones en el crecimiento de las ramificaciones secundarias y terciarias. En ocasiones las raíces pueden quedar totalmente atrofiadas o bien, necrosadas por la combinación del ataque del nematodo con otros microorganismos de suelo (Schuster *et al.*, 1965) (Fig. 1.2).

Figura 1.2. Agallamiento del sistema radicular de *Cucurbita maxima* var. zapallito por *Nacobbus aberrans*.



No hay disponibles en Argentina, evaluaciones que permitan estimar las reducciones en el rendimiento y las consecuentes pérdidas económicas producidas por esta especie. En una revisión de la importancia de este nematodo en América Latina, Manzanilla López *et al.* (2008) indican que las pérdidas en el cultivo de tomate pueden ser de entre el 50 % y el 90%. Doucet y Lax (2005) señalan que, en algunas localidades argentinas, como Lules (Provincia de Tucumán), Rosario (Provincia de Santa Fe), Tunuyán (Provincia de Mendoza) y zona de influencia de La Plata (Provincia de Buenos Aires) la presencia del nematodo condiciona no sólo los rendimientos, sino la supervivencia de los cultivos. Jones *et al.* (2013) incluyeron a *N. aberrans* en la lista de las 10 especies de nematodos con mayor importancia a nivel global, debido al daño económico que causan y por las investigaciones en torno a ellas.

Como fue mencionado anteriormente, algunas décadas atrás este fitoparásito no era un problema relevante en la horticultura platense. Cabe preguntarse, cuáles fueron los acontecimientos que hicieron que esta situación se haya modificado.

El bromuro de metilo fue el fumigante de suelo tradicionalmente utilizado en la producción hortícola del CHLP (Hang *et al.*, 2009). Su acción biocida, que “resolvía” los problemas de malezas, hongos y nematodos hicieron de su uso una práctica habitual, y era aplicado incluso sin tener conocimiento certero de los patógenos presentes en el suelo (Biaggi *et al.*, 2011). A partir de la adhesión de Argentina al Protocolo de Montreal, se inició un proceso de reducción gradual de uso que establecía su prohibición total en el año 2015 (MBTOC, 1994). A medida que la fumigación de suelos fue disminuyendo, adversidades bióticas hasta entonces silenciadas, tomaron relevancia en un período de tiempo relativamente corto. Esto explica en parte, la presencia de *N. aberrans* como un problema fitosanitario de gran magnitud en nuestra zona.

Además, a partir de finales de la década del '80, tuvieron gran difusión en la zona, los tomates híbridos (Garat, 2002), portadores del gen de resistencia Mi. Este gen confiere resistencia a algunas especies del género *Meloidogyne* (Rich y Olson, 1999), pero no así al género *Nacobbus*. Esta presión de selección ejercida por el uso continuo de estos cultivares, hacen suponer que es la principal causa del predominio que actualmente posee *N. aberrans* por sobre *Meloidogyne spp.*

1.4 SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS

A partir de la década del '90, el CHLP sufrió profundas transformaciones tecnológicas que continúan hasta hoy. La producción bajo cubierta, la mecanización, la aplicación de agroquímicos, el uso de híbridos, el riego localizado y la fertirrigación, son algunas de las características sobresalientes de este proceso. Estos cambios tuvieron repercusiones favorables en los rendimientos y en la “calidad” de la producción, pero provocaron también un aumento en la demanda y dependencia de insumos (Vega, 1999). Algunos aspectos de este proceso de intensificación de la producción tales como la ausencia de bajas temperaturas debido a la cobertura plástica, el monocultivo de Solanáceas en los invernaderos (hospederos de ciclo largo y en los que el nematodo se reproduce muy bien) y períodos cortos de barbecho contribuyeron a crear un ambiente

aún más propicio para *N. aberrans*. Sumado a esto, en los últimos años ha tenido gran difusión el cultivo de tomate injertado como una posible opción de cultivo en suelos con alta carga de nematodos. Los pies de injerto producen un sistema radicular profundo y de gran desarrollo, que logra compensar los daños provocados por los nematodos y otorga vigor a la copa. Las plantas consiguen tener rendimientos económicamente viables, pero al finalizar el cultivo la población de nematodos aumenta significativamente, siendo una solución a corto plazo que no hace más, que agravar el problema fitosanitario a futuro (Garita *et al.*, 2018).

Actualmente se encuentran disponibles en el mercado algunos productos fumigantes de acción biocida (Agrocelhone[®], FMC Argentina, Strike[®], Brometán SRL, Argentina), que son de alta toxicidad para los operarios y tienen un elevado costo económico, difícil de afrontar por la mayoría de los productores. Más allá del precio de los productos, luego de la “experiencia del bromuro de metilo” carece de sentido pensar que la solución real al problema de los nematodos, está en encontrar un fumigante de bajo costo y de fácil aplicación.

Entre las herramientas de control alternativas al bromuro de metilo que vienen poniéndose a prueba a distintas escalas en el CHLP, se encuentran: la biofumigación, la inoculación con hongos nematófagos, bacterias promotoras del crecimiento y hongos micorrícicos arbusculares, la aplicación de formulados fitoquímicos y químicos de síntesis (1,3-dicloropropeno, abamectina) y el empleo de portainjertos resistentes.

La mayoría de los resultados son aún experimentales, y su análisis permite anticipar que ninguna herramienta de control aplicada en forma aislada puede conferir, por sí sola, niveles satisfactorios de control en parcelas con infestaciones moderadamente altas de *N. aberrans*. De allí, la necesidad de implementar una estrategia múltiple donde se integren armónicamente prácticas que reduzcan el inóculo en preplantación, prácticas que aumenten la tolerancia de las plantas y prácticas que reduzcan la reproducción del nematodo.

1.5 HIPOTESIS, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1.5.1 Hipotesis

- Por tratarse de un fitoparásito obligado, *N. aberrans* no provoca necrosis significativas en los tejidos.
- El establecimiento de la simbiosis con hongos formadores de micorrizas arbusculares reduce el efecto perjudicial de los nematodos noduladores en las plantas hortícolas.
- Los nematodos noduladores modifican la actividad de los hongos formadores de micorrizas arbusculares.
- El uso combinado y estratégico de herramientas biológicas de prevención y control reducen significativamente la población de *N. aberrans* en plantas de tomate platense.

1.5.2 Objetivo general

Evaluar de forma conjunta prácticas de prevención y control de nematodos noduladores en el Cinturón Hortícola Platense, a fin de generar herramientas que favorezcan el diseño de un plan de manejo integrado de bajo impacto ambiental.

1.5.3 Objetivos específicos

- Estudiar la respuesta fisiológica de plantas de tomate platense a *N. aberrans* y a las herramientas biológicas de control
- Seleccionar hongos formadores de micorrizas arbusculares que sean eficientes en el control de *N. aberrans* en tomate.
- Aislar y seleccionar hongos nematófagos que sean eficientes en el control de *N. aberrans* en las condiciones climáticas del CHLP.
- Evaluar la compatibilidad de la Biofumigación con la inoculación de hongos usados en el control de nematodos.
- Incorporar los conocimientos de nematología en el diseño de un plan estratégico de manejo de esta plaga.

- Determinar la eficacia de diferentes programas que combinen estrategias de prevención y control de *N. aberrans* a fin de evaluar su impacto sobre el crecimiento y la producción de tomate.

1.6 REFERENCIAS

Anthoine, G.; Mugniéry, D. 2005. Variability of the ITS rDNA and identification of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae) by rDNA amplification. *Nematology*, v. 7, n. 4, p. 503-516.

Biaggi, C.; Mondzak, F.; Valerio, A. 2011. Problemas ambientales, oportunidades de desarrollo: la experiencia del Proyecto INTA Prozono. 1a ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina, 118 p.

Cap, G.; Fatlhauser, P.; Castellano, S.; Grondona, M. 1981. Control de nematodes en un cultivo de tomate y su expresión en los rendimientos. IV Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Córdoba, p. 55-56.

Cap, G.; Larroque, O. B.; Brandanini, M. L.; Grondona, M. 1983. Control químico del "falso nematode del nudo radicular" *Nacobbus aberrans* en un cultivo de tomate. V Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Rosario, Argentina, p. 43.

Castiblanco, O.; Franco, J.; Montecinos, R. 1998. Razas y gama de hospedantes en diferentes poblaciones del nematodo *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935), Thorne & Allen 1944. *Revista Latinoamericana de la Papa*, v. 11, p. 85- 96.

Chaves, E. 1984. Observations on plant parasitic nematodes from Argentina. Thesis of State University of Ghent, Belgium, 106pp

Chaves, E.; Torres, M. 1993. Nematodes parásitos de la papa del sudeste bonaerense. *Boletín Técnico N°115*, Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Argentina, 21 pp.

Chaves, E. J.; Sisler, G. M. 1980. Presencia de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen 1944 (Nematoidea: Nacobbidae) en cultivos hortícolas de las provincias de Buenos Aires y Santa Fe asociados con otros nematodos. *IDIA*, p. 13-15.

Costilla, M. A. 1985. El falso nematode del nudo *Nacobbus aberrans* (Thome, 1935) Thome & Allen, 1944 y su relación con el cultivo de papa en el noroeste argentino. *Revista industrial y Agrícola de Tucumánv.* 62, p. 79-97.

Costilla, M. A.; De Ojeda, S. G.; De Gómez, T. 1977. Contribución al estudio del "falso nematodo del nudo *Nacobbus aberrans*. *Nematropica*, v. 7, n. 2, p. 7-8.

Del Toro, S.; Castellanos, S.; Larriqueta, J.; Moyano, E.; Bustamante, C.; Debandi, S. E. G.; Vega, E. 2004. Falso nematodo del nudo. En: Una fuente de recursos genéticos de extraordinaria utilidad para la ciencia. Los Andes on line: http://www.losandes.com.ar/2004/0531/Suplementos/Campo/notai90383_1.htm.

Doucet, M. E.; Gardenal, C. N. 1992. The genus *Nacobbus* in Argentina. Preliminary comparison of populations of *N. aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 by means of isoenzyme phenotypes. *Nematropica*, v. 22, p. 243-246.

Doucet, M. E.; Lax, P. 2005. El Género *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 en la Argentina. 6. La especie *N. aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Tylenchida) y su relación con la agricultura. *Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*. Buenos Aires. Tomo LIX, p. 5-14.

EPPO. 2019. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). <https://gd.eppo.int/taxon/NACOBBA/categorization>

Garat, J. 2002. El tomate platense en La Plata, Argentina. *Biodiversidad*, v. 34, p. 19-31.

Garita, S.; De Almeida Guimaraes, M.; Arango, M.C.; De Jesús, J.; Ruscitti, M. 2018. Performance of tomato rootstocks in False Root-knot Nematode infested soil. *Australian Journal of Crop Science*, v. 12, n. 11, p. 1725-1731.

Hang, G. M.; Larrañaga, G. F.; Seibane, C. I.; Bravo, M. L.; Ferraris, G.; Kebat, C. A.; Blanco, V.; Otaño, M. 2009. Caracterización de los sistemas de producción hortícola en el municipio de La Plata – Argentina. *Análisis dinámico desde una perspectiva cualitativa*. *Agronomía*, v. 17, n. 2, p. 59 - 67.

Hunt, D.; Manzanilla-López, R.; Reid, A. 2003. *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae); a nascent species complex revealed by RFLP analysis and sequencing of the ITS-rDNA region. *Nematology*, v. 5, n.3, p. 441-451.

Ibrahim, S. K.; Baldwin, J. G.; Rolerts, P. A.; Hyman, B. C. 1997. Genetic variation in *Nacobbus aberrans*, an approach toward taxonomic resolution. *Journal of Nematology*, v. 29, p. 241-249.

ITIS, Interagency Taxonomic Information System, 2019. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=63649#null

Jones, J. T.; Haegeman, A.; Danchin, E. G. J.; Gaur, H. S.; Helder, J.; Jones, M. G. K.; Manzanilla-López, R.; Palomares-Rius, J.; Wesemael, W.; Perry, R. N. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, v. 14, n. 9, p. 946–961.

Manzanilla-López, R. 2010. Speciation within *Nacobbus*: consilience or controversy? *Nematology*, v. 12, n. 3, p. 321-334.

Manzanilla-López, R. H., Quénéhervé, P., Brito, J. A., Giblin-Davis, R., Franco, J., Román, J., Inserra, R. N. 2008. Contributions by Latin American nematologists to the study of nematode plant disorders and related impact on crop production. Pp. 191-218 in J. M. Webster, K. B. Eriksson, and D. G. McNamara (eds.). *An Anecdotal History of Nematology*. Pensoft, Sofia-Moscow,

Manzanilla-López, R.H.; Costilla, M.A.; Doucet, M.; Franco, J.M.; Inserra, R.N.M Lehman, P.S.; Cid del Prado-Vera, I.; Souza, R.M.; Evans, K. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, distribution, biology and management. *Nematropica*, v. 32, p. 149-227.

MBTOC (Methyl Bromide Technical Options Comite). 1994. Report of the methyl bromide technical options committee. Montreal protocol on substances that deplet the ozone layer, UNEP, Kenya, 304 pp.

Moreno, A. F. 1961. Nematodos que perjudican cultivos de interés económico. *Informativo de Investigación Agropecuaria*, n. 163, p. 30-32.

Muruaga de L'Argentier, S.; Doucet, M.; Lax, P.; Gallardo, C.; Serrano, M.; Bautista, R.; Vilte, H.; Quintana de Quinteros, S.; Alcoba, N. 2005. La importancia de los nematodos fitófagos en la elección de una semillera de papa andina. Libro de Resúmenes del XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología, p. 494.

Nico, A. I. Nematodos patógenos de las plantas en el área del cinturón hortícola de la Plata: Situación actual y esfuerzos por abordar el problema desde una perspectiva sustentable. Congreso Argentino de Fitopatología, Tucumán, Argentina. 2014.

Rich, J. R; Olson, S. M. 1999. Utilidad del gen de resistencia Mi en el tomate para gestionar *Meloidogyne javanica* en el norte de Florida. *Revista de Nematología*, v. 31, p. 715-18.

Schuster, M. L.; Sandstedt, R.; Estes, W. 1965. Host-parasite relations of *Nacobbus batatiformis* and the sugar beet and other hosts. *Journal of the American Society of Sugar Beet Technology*, v. 6, p. 523-537.

Silvestri, L.; Sisler, G. M.; Roan, J. 1985. Identification of plant parasitic nematodes on horticultural crops in La Plata (Argentina). *International Nematology Network Newsletter*, n. 22, p. 407.

Vega, M. 1999. Integración vertical y productos diferenciados. *Boletín Hortícola de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales*, n. 23. p. 33-35.

Vovlas, N.; Nico, A. I.; De Luca, F.; De Giorgi, C.; Castillo, P. 2007. Diagnosis and molecular variability of an Argentinean population of *Nacobbus aberrans* with some observations on histopathology in tomato. *Journal of Nematology*, v. 39, n. 2, p. 17.

CAPITULO 2

*Alteraciones morfo-fisiológicas causadas
por Nacobbus aberrans*

2.1 INTRODUCCIÓN

Si bien los agroecosistemas son ambientes relativamente simplificados en comparación con los hábitats naturales, continúan siendo entornos complejos en los que las plantas interactúan con una gran diversidad de organismos y situaciones. Desde el punto de vista de los cultivos las relaciones con otros organismos pueden ser benéficas - como es el caso de la simbiosis con hongos micorrícicos arbusculares, los insectos polinizadores o las bacterias fijadoras de nitrógeno- o bien pueden ser perjudiciales. Dentro de este último grupo se incluyen a los organismos herbívoros, los patógenos y los parásitos (Taiz *et al.*, 2016). En respuesta a estos últimos, las plantas desplegaron complejos mecanismos de defensa y a su vez estos organismos han desarrollado mecanismos opuestos para superar tales defensas. Esta coevolución es la responsable de las interacciones complejas que ocurren entre las plantas y sus patógenos o parásitos.

Nacobbus aberrans es un nematodo que inicialmente actúa como fitoparásito biotrofo alimentándose del citoplasma de células radicales vivas y, dependiendo de la severidad del ataque, puede convertirse en patógeno. Por lo tanto, todos los mecanismos que utiliza para infectar una planta y vivir a expensas de ella, están vinculados a su carácter de parásito (Ferraz y Brown, 2016).

Cada planta tiene una serie de condiciones ambientales que le son ideales (disponibilidad de agua y de nutrientes, temperaturas, irradiancia, etc.) para que su crecimiento y desarrollo sean óptimos; cuando esto ocurre la planta se encuentra en una situación de “estrés cero”. A medida que los diferentes factores se alejan de la situación ideal, alguna función de la planta se altera circunstancialmente (Blum, 2016). La homeostasis es la capacidad que poseen los organismos de mantener sus funciones dentro de valores normales cuando una alteración moderada trata de modificarlos (Niu *et al.*, 1995). Las plantas poseen mecanismos homeostáticos que tienden a minimizar esos cambios. Una situación que supere la capacidad homeostática del individuo, produce un efecto negativo: la planta está estresada (Larcher, 1987).

Este capítulo pretende relacionar el ciclo de vida del nematodo *N. aberrans* y sus mecanismos de parasitismo, con las alteraciones morfofisiológicas que provoca en las plantas infectadas.

2.1.1 *Nacobbus aberrans*, Thorne 1935, Thorne & Aleen 1944

Comenzaremos este capítulo recabando información vinculada al nombre científico del nematodo protagonista de esta tesis. Actualmente se acompaña a *Nacobbus aberrans* junto al nombre de los investigadores que lo describieron y clasificaron taxonomicamente: Thorne 1935, Thorne & Aleen 1944.

En 1935 Gerald Thorne realizó una descripción de los nematodos que afectaban a la remolacha azucarera en Utah, Estados Unidos y en esa ocasión describe como nueva especie a *Anguillulina aberrans*. Posteriormente, en 1944 Gerald Thorne y Merlin Allen basándose en algunas características como el dimorfismo sexual, la formación de agallas y la superposición de las glándulas esofágicas con el intestino, proponen la designación un nuevo género: *Nacobbus*, proponiendo como especie tipo a *N. dorsalis*. Éstos mismos investigadores sugieren que en el año 1918 Nathan Cobb ya había ilustrado un macho y juveniles del género *Nacobbus*, pero errónamente fueron considerados como *Heterodera schachtii*. Por esta razón, y en honor al distinguido nematólogo, N. A. Cobb, deciden denominar *Nacobbus* al nuevo género.

2.1.2 Morfología de *Nacobbus aberrans*

Thorne (1935) describe a *Anguillulina aberrans* (Act. *Nacobbus aberrans*) de la siguiente manera:

- Los huevos de esta especie tienen un tamaño de 42 μm x 80 μm y se encuentran rodeados por una masa gelatinosa producida por la hembra.
- Las larvas tienen una longitud de 0,4 a 0,48 mm, un ancho de 20 μm a 24 μm , y un estilete de 14 μm de largo. El esófago ocupa 1/5 de la longitud del cuerpo y el intestino es granular. La longitud de la cola generalmente es del doble del diámetro del cuerpo en la sección anal y disminuye terminando de forma redondeada.
- Los machos tienen una longitud de 0,7 a 0,9 mm y un ancho 25 μm a 33 μm . El cuerpo casi cilíndrico entre el esófago y el ano, y se estrecha hacia la región del labio sin separarse. La cola es ligeramente más larga que el diámetro del cuerpo en la región anal y está completamente envuelta por una bursa. Presentan tres campos laterales, marcados por cuatro líneas refractivas, la zona que ocupan es

un cuarto del ancho del cuerpo. Los labios son seis, de forma plana y oscuros, vistos de forma lateral tienen el aspecto de finos discos agrupados. La lanza del estilete mide entre 21 y 25 μm y en la base remata con grandes bulbos basales. El tamaño del bulbo medio del esófago equivale a la mitad del ancho del cuello; el bulbo basal es oscuro y se superpone al intestino. El poro excretor se ubica a 1 o 2 anchos de cuerpo, detrás del bulbo medio. Poseen un solo testículo de forma alargada. La espícula es ligeramente curva y se ahúsa en sus 2/3 distales. El gubernáculo es delgado, plano y ligeramente arqueado. Los fasmidios tienen forma de costilla y se ubican en la mitad de la bursa.

- Las hembras inmaduras tienen una longitud de 0.7 a 0.9 mm y un ancho de 30 μm a 35 μm . Cuerpo es prácticamente cilíndrico desde el esófago hasta la vulva, la cual se ubica al 91-93 %. La cola es convexa-conoide a de punta amplia y redondeada, su longitud es igual al diámetro del cuerpo en la región anal. Cutícula anillada notoriamente. Tres campos laterales, marcados por cuatro líneas limitando áreas que ocupan alrededor de un cuarto del ancho del cuerpo. Ovario inmaduro. Rama uterina posterior ausente.
- La hembra adulta tiene una longitud de 0,8 a 1,2 mm y entre 132 μm y 345 μm de ancho. La lanza del estilete mide entre 20 μm y 24 μm y el cuerpo distorsionado de forma variable. El cuello y parte posterior del cuerpo conservan ligeramente la forma original. El bulbo medio es casi esférico con músculos radiales fuertes y el bulbo terminal se fusiona con los intestinos. Cuerpo densamente granular, ovario único, enrollado y oscurecido. Vulva ancha, a modo de hendidura transversal. Ano inconspicuo.

2.1.3 Ciclo de vida de *Nacobbus aberrans*

Diversos autores han realizado aportes significativos al conocimiento del ciclo de vida de este nematodo. Basado en estos reportes, se describen los aspectos más importantes del ciclo vida de *Nacobbus aberrans*.

El ciclo de vida de *N. aberrans* está formado por: un estadio de huevo, seguido por 4 estadios larvales o juveniles y un estadio adulto. Los huevos son depositados por las hembras dentro de una matriz gelatinosa. En el interior del huevo se forma el primer

estado juvenil (de aspecto vermiforme) y la primera muda ocurre en el interior del huevo para dar lugar al juvenil de segundo estadio (J2) (Clark, 1967) (Figura 2.1).

Figura 2.1. Huevos de *Nacobbus aberrans* en 3 momentos del desarrollo del Juvenil del primer estadio.



La duración de esta etapa está fuertemente influenciada por la temperatura, pudiendo durar desde una hora hasta varios días (Prasad y Webster 1967). En condiciones adecuadas el J2 emergerá al suelo y a partir de este momento, el nematodo parece tener dos posibles mecanismos para continuar su ciclo de vida:

- entrar en la raíz de un hospedero y salir repetidas veces, mientras transcurren las mudas hasta llegar al estadio adulto;
- entrar a la raíz y que las sucesivas mudas hasta alcanzar la etapa adulta ocurran allí dentro. (Manzanilla-López *et al*, 2002)

Para ingresar, las larvas se mueven sobre la superficie de la raíz, presionando con sus labios la pared celular y efectuando esporádicas punciones con su estilete, a modo de búsqueda del lugar preciso para ingresar. En determinada localización el nematodo se fija y comienza a punzar continuamente, acompañando con movimientos de la cabeza para aumentar el tamaño del orificio. Cuando la abertura es suficiente procede a ingresar. Es frecuente observar varias larvas de segundo estadio aglutinadas en la superficie de la raíz, y en ocasiones varias ingresan por el mismo orificio. Dentro de la raíz las larvas se alimentan del contenido celular utilizando su estilete y se mueven intracelularmente por el parénquima cortical ocasionando lesiones a medida que se avanzan en el tejido. Según Eves-Van Den Akker *et al.* (2014) *Nacobbus* es el único caso conocido que reúne en su ciclo de vida los mecanismos típicos de los nematodos endoparásitos migradores y de los nematodos endoparásitos sedentarios. En efecto, el nombre vulgar de este nematodo (“falso nematodo nodulador”) alude a que, si bien

presenta la particularidad de formar agallas, hasta llegar a los sitios permanentes de alimentación, muestra el hábito migratorio intracelular que corresponde a los miembros de la familia *Pratylenchidae*. Los J2 de *N. aberrans* son los que presentan mayor movilidad tanto en el suelo como en la raíz.

El juvenil de tercer estadio (J3) inicialmente se parece al J2 pero al alimentarse su cuerpo aumenta de tamaño y tiende a adoptar una forma de "C" (Manzanilla-López *et al*, 2002). Interiormente la longitud del esófago se reduce y pueden visualizarse primordios de gónadas. Los juveniles de cuarto estadio (J4) también adoptan una forma enrollada y en el caso de las futuras hembras el primordio genital crece desde la región de la vulva hacia el lado anterior (la vulva se observa como una región clara en el interior oscuro y granular del cuerpo). En el caso de los machos el alargamiento de la gónada ocurre en dirección terminal y se visualiza la bursa.

La muda de J4 a adulto puede tener lugar en el suelo o en la raíz. Los machos adultos son vermiformes y pueden encontrarse dentro de las raíces o libres en el suelo; se presume que se mueven hacia la rizósfera en busca de hembras. La hembra inmadura se fija en la proximidad del cilindro central donde induce la formación de su sitio de alimentación denominado *sincitio*. Estas hembras pierden su forma filiforme y se tornan voluminosas por el desarrollo de los huevos en su interior (Manzanilla-López, 1997). El crecimiento en volumen de la hembra, y la formación del sincitio dan como resultado la formación de agallas, que constituyen el síntoma visible más característico de los nematodos noduladores (Fig. 2.2).

Figura 2.2. Agallas de *Nacobbus aberrans* en raíces de tomate platense.



Como fue mencionado anteriormente, los huevos son liberados a la superficie de la raíz inmersos en una masa gelatinosa a través de un pequeño canal, siendo que algunos permanecen dentro de la agalla sin emerger al exterior. Dentro de una agalla

pueden encontrarse entre 1 y 5 hembras, y cada “masa de huevos” puede contener entre 37 y 833 huevos (Costilla, 1985; Inserra *et al.*, 1985), (Fig. 2.3 a y b)

Figura 2.3. a) Agallas de inducidas por *Nacobbus aberrans* en tomate platense, donde se observan las masas de huevos (teñidas por fucsina ácida) adheridas a la superficie de la agalla b) Hembra de *N. aberrans* con masa de huevos adherida a su cuerpo.



2.1.4 Factores que inciden en el ciclo de vida de *N. aberrans*

El amplio número de lugares, hospedantes y condiciones ambientales donde *N. aberrans* fue reportado, demuestra que se trata de un microorganismo con gran capacidad de adaptación y es por ello que su control es dificultoso.

El ciclo de vida es fuertemente influenciado por la temperatura. Un ensayo utilizando raíces de tomate demostró que a 25° C el tiempo transcurrido entre la inoculación con huevos y la aparición de agallas fue de 19 días. A 20°C el tiempo transcurrido fue de 36 días; a 15 °C, 71 días y a 30°C, 29 días. También se observó que en todas las temperaturas ensayadas hubo penetración de J2 en las raíces de tomate (Prasad y Webster, 1967).

Las masas de huevos tienen la capacidad de resistir condiciones adversas como bajas temperaturas (hasta -13°C) y períodos de sequía prolongados (González y Franco, 1997). Según Cristóbal *et al.* (2001) los J3 y J4 pueden permanecer viables en el suelo bajo condiciones de extrema humedad, temperatura y ausencia de hospederos susceptibles durante un año.

En cuanto a las características del suelo, *N. aberrans* se muestra más agresivo en suelos con bajos contenidos de materia orgánica y no parece verse afectado por variaciones en la clase textural del suelo (Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2014).

2.1.5 El sitio de alimentación

Las formas móviles utilizan su estilete para perforar la pared celular e inyectar secreciones de las glándulas esofágicas que digieren parcialmente el contenido citoplasmático. Posteriormente haciendo uso del aparato valvular del bulbo medio succionan el citoplasma “pre-procesado” el que continúa a través del aparato digestivo del nematodo.

Ya en la etapa sedentaria, las hembras seleccionan una célula del periciclo, la endodermis o el tejido cortical y comienzan a inyectar secreciones esofágicas que provocarán tanto modificaciones específicas en esa célula como la disolución de la pared celular. La disolución de la pared celular de células vecinas, con la consecuente fusión de los protoplastos, da lugar a la aparición de células multinucleadas, de gran tamaño, con pared celular engrosada, escasas vacuolas, núcleos hipertrofiados y apariencia granulosa (Doucet y Lax, 2005). Este tejido que rodea al nematodo sedentario recibe el nombre de “sincitio” o “síncito” y constituye su sitio de alimentación. La manifestación externa del síncito es la agalla, síntoma visible típico de este tipo de fitoparásitos. Las modificaciones celulares conducen a cambios en el ordenamiento de los tejidos de conducción causando alteraciones en el flujo normal de agua y nutrientes (Manzanilla-López, 1997).

Para que el sitio de alimentación se desarrolle, el nematodo debe reprimir la expresión de ciertos genes y activar otros para poder permanecer allí y alimentarse. Ésta es otra evidencia de la larga y compleja evolución entre plantas y parásitos. La manutención del sincitio está condicionada al estímulo permanente que ejerce el nematodo, la eliminación del estímulo conduce a su atrofia (Jatala, 1985).

2.2 ENSAYO EXPERIMENTAL

2.2.1 Objetivos

- Aislar y mantener una población de *N. aberrans* para la realización de los ensayos de esta tesis.
- Describir características morfológicas de la población aislada.
- Describir el daño morfológico que provoca *N. aberrans* en los tejidos de la raíz, y cuantificar sus consecuencias en el desempeño fisiológico de plantas de tomate platense.
- Cuantificar mediante determinaciones bioquímicas el estrés que provoca *N. aberrans* en ausencia de otros microorganismos patógenos.

2.2.2 Materiales y métodos

Se indica a continuación la secuencia de actividades y determinaciones realizadas a lo largo del experimento, y posteriormente se describe en detalle las técnicas realizadas.

- 1) Aislamiento de una población de *N. aberrans*
- 2) Multiplicación de *N. aberrans* para ser utilizado como inóculo en ensayos.
- 3) Siembra de tomate platense, trasplante e inoculación con *N. aberrans*.
- 4) Variables analizadas a los 21 días postrasplante:
 - Altura de plantas, y diámetro del tallo medido en la mitad de la planta.
 - Fotosíntesis Neta (FN)
 - Conductancia estomática (CEs).
 - Rendimiento cuántico del fotosistema II (PSII).
 - Contenido total de clorofilas y carotenos
 - Contenido de proteínas solubles en tejido foliar
 - Contenido de prolina en tejido foliar
 - Contenido de malonildialdehído, en tejido foliar
 - Contenido de compuestos fenólicos totales en tejido foliar
 - Contenido de azúcares reductores y totales en tejido foliar
 - Conductividad relativa de tejidos foliar.
- 5) Durante el transcurso del ensayo fueron cosechándose los frutos de cada planta y a los 120 días de la inoculación, con las plantas en pie se realizaron mediciones de: diámetro del tallo, índice de verdor con Spad, FN, CEs, y rendimiento cuántico del FSII.

Al finalizar las mediciones de tomaron muestras de tejido foliar, y se procedió a descalzar las plantas para efectuar el muestreo de las raíces. Se evaluó

- Contenido total de clorofilas y carotenos
- Contenido de proteínas solubles en tejido foliar y radicular
- Contenido de prolina en tejido foliar y radicular
- Contenido de malonildialdehído, en tejido foliar y radicular
- Contenido de compuestos fenólicos totales en tejido foliar y radicular
- Contenido de azúcares reductores y totales en tejido foliar y radicular
- Conductividad relativa de tejidos foliar y radicular
- Cortes histológicos y tinciones de raíces para caracterizar las modificaciones histopatológicas del tejido radicular.
- Número de huevos alojados en las raíces, número de juveniles en suelo, y población final del nematodo.

Diseño experimental y análisis estadístico

El ensayo tuvo un diseño completamente aleatorizado con dos tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento. Cada planta correspondía a una repetición. Los tratamientos consistieron en “Plantas no inoculadas” y “plantas inoculadas con *N. aberrans*”. El análisis de los resultados se realizó a través de un análisis de varianza de un solo factor, y la comparación de medias por el test de LSD de Fisher utilizando el programa estadístico InfoStat.

Detalle de las Prácticas y técnicas realizadas

*Aislamiento de una población de *N. aberrans**

El establecimiento de un cultivo monoxénico del nematodo a partir del cual obtener posteriormente el material para las inoculaciones artificiales se estableció de acuerdo a la técnica descrita por Jensen (1987) para *Meloidogyne spp.* La población se inició a partir de una única masa de huevos proveniente de una hembra de *N. aberrans* aislada de una planta de tomate procedente de una finca situada en Olmos, partido de La Plata. Para la obtención del inóculo la mencionada masa de huevos se inoculó sobre una maceta conteniendo 2 plantas de tomate cultivadas en suelo estéril. Esa maceta se mantuvo en invernadero bajo condiciones semicontroladas y temperatura constante a 24 ± 2 °C. A los cincuenta días una de las plantas fue extraída y se le realizó la extracción de huevos.

Extracción de huevos y juveniles para su utilización como inóculo

La suspensión de huevos y juveniles empleada como inóculo se obtuvo recurriendo a la técnica de agitación de las raíces en solución de NaClO al 0,5 % (Hussey y Barker, 1973) con posterior depuración y concentración por la técnica de

centrifugación-flotación (Coolen, 1979). Cabe aclarar que si bien se extraen huevos disolviendo la masa gelatinosa que los aglutina, en la suspensión final suelen aparecer juveniles (en cantidad despreciable), provenientes de huevos que se encontraban próximos a eclosionar o bien por encontrarse adheridos a las raíces. Es por ello que se utiliza la expresión “Huevos y Juveniles”. La técnica se describe en párrafos posteriores.

Producción de plantines

Para producir los plantines se desinfestaron semillas de *Solanum lycopersicum* Var. platense que posteriormente fueron sembradas en speedlings de 72 celdas. La mezcla utilizada para completar las celdas estaba formada por una mezcla perlita:vermiculita 1:1 v/v. Las bandejas fueron mantenidas durante 40 días en cámara de cultivo, la provisión de nutrientes se realizó utilizando una solución nutritiva completa de Hoagland.

Trasplante e inoculación

A fin de evaluar el efecto del parasitismo de *N. aberrans* sobre parámetros bioquímicos del estrés se dispuso un ensayo en condiciones semicontroladas bajo invernadero con inoculación artificial sobre plantas de tomate.

Fueron trasplantados 20 plantines a macetas de 15 L. de capacidad que contenían como sustrato el horizonte superficial de un suelo argiudol previamente tinalizado (mediante tres ciclos de calentamiento de una hora a 100°C en días consecutivos) para eliminar posibles microorganismos patógenos y evaluar solo el efecto del nematodo. El día siguiente al trasplante la mitad de las plantas fueron inoculadas con 5000 huevos + juveniles de *N. aberrans* quedando consignados los dos tratamientos: plantas control sin inocular; y plantas inoculadas. Las plantas fueron mantenidas en invernadero con iluminación natural, y ventilación forzada por ventiladores a través de radiadores.

Fotosíntesis Neta (FN) conductancia estomática (Ce) y transpiración (T).

Las mediciones fueron hechas en la segunda hoja completamente expandida de cada planta usando un analizador de gases infrarrojos portátil IRGA (modelo CIRAS-2®, PP Systems). Se utilizó una cubeta estándar (LI 6400-02), entre las 09:00 horas y

las 13:00 horas a través de una secuencia mixta de los tratamientos para reducir el sesgo debido a la sincronización. Al momento de la medición, la temperatura promedio de la hoja fue de 25 °C, la concentración de CO₂ de 360 ppm y la densidad de flujo de fotones 1500 μmol.m⁻²s⁻¹.

Rendimiento cuántico del fotosistema II (PSII).

Fue determinado utilizando un detector de fluorescencia Hansatech Instruments, UK, type FM52; analizando los resultados según Genty *et al.* (1989).

Contenido total de clorofilas y carotenos, de acuerdo al método de Wellburn (1994).

El contenido de clorofila y carotenoides se determinó sobre un disco de hoja de 1 cm de diámetro por planta, utilizando N-Dimetilformamida como solvente de extracción. Se midieron las absorbancias de la solución a las longitudes de onda 646,8, 663,8 y 480 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160 A.

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g cm}^{-2}) = 12 \times \text{Ab } 663.8 - 3.11 \times \text{Ab } 646.8$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g cm}^{-2}) = 20.78 \times \text{Ab } 646,8 - 4.88 \times \text{Ab } 663.8$$

$$\text{Clorofila total a+b } (\mu\text{g cm}^{-2}) = 17.67 \times \text{Ab } 646.8 + 7.12 \times \text{Ab } 663.8$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g cm}^{-2}) = (1000 \times \text{Ab } 480 - 1.12 \text{ Ca} - 34.07 \text{ Cb}) / 245$$

Contenido de proteínas solubles, de acuerdo al método de Bradford (1976).

El contenido de proteínas solubles se determinó a partir de 200 mg de la última hoja expandida o igual peso de raíz, de acuerdo al método de Bradford (1976). Los tejidos se homogeneizaron en un mortero con 1 ml del buffer de extracción (TRIS 50 mM, EDTA 1mM, PVPP insoluble 1%, MeSH 0,1% a pH 7,5) a 4°C. El homogeneizado resultante se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C. Se tomaron 100 μl del sobrenadante y se le agregó 5 ml del reactivo Azul Brillante de Coomassie, se agitó en vortex y se leyó la absorbancia a 595 nm. El cálculo de la concentración de proteínas se efectuó empleando una curva patrón preparada con distintas concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA, SiFMa Chemical Co).

Contenido de prolina en tejido foliar y radicular, de acuerdo al método de Bates et al. (1973)

Para la determinación de prolina se homogeneizaron 100 mg de material fresco de hoja y de raíz con 2 ml de una solución en agua al 3% de ácido sulfosalicílico. El

homogeneizado se centrifugó a 12000 g por 15 minutos y se tomó 1 ml del extracto obtenido. Se lo hizo reaccionar con 1 ml del reactivo Ninhydrina ácida y 1 ml de ácido acético glacial en un tubo de 15 ml, en baño maría a 100 °C durante una hora. Al cabo de ese lapso la reacción se interrumpió enfriando el tubo rápidamente. A la mezcla reaccionante anterior se le agregaron 2 ml de tolueno y se agitó durante 15 a 20 segundos en vórtex. Se dejaron separar las fases y se tomó la fase acuosa conteniendo el cromóforo tolueno-prolina. Se leyó la absorbancia a 520 nm usando tolueno como blanco.

El contenido de prolina por unidad de peso fresco se calculó según:
 $\mu\text{mol prolina.g}^{-1} \text{ PF} = [(\mu\text{g prolina/ml} \times \text{ml tolueno})/115,5 \mu\text{g}/\mu\text{moles}]/[(\text{g PF})/5]$

Contenido de malonildialdehído en tejido foliar y radicular, de acuerdo al método método de Heath y Packer (1968).

Se tomaron 200 mg de material fresco de hoja y/o raíz, y se maceraron con 1 mL de ácido tricloroacético al 0,1%, luego se centrifugaron. El sobrenadante se lo hizo reaccionar con 1 mL del reactivo TCA-BHT-TBA (TCA 20%, ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,37% y butilhidroxitolueno (BHT) 0,01 g) seguidamente, los tubos se incubaron durante 30 minutos a 95°C. Pasado este período, se introdujeron en un baño de hielo para enfriarlos y detener la reacción y luego se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos. Finalmente, se separó el sobrenadante y se leyó la absorbancia a 532 y 600 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160 UV/V. La concentración de MDA se calculó usando un coeficiente de extinción de 155mM⁻¹ cm⁻¹:

$$\text{Equivalentes de MDA (nmol.ml}^{-1}\text{)} = [(A_{532} - A_{600}) / 155000]$$

Contenido de compuestos fenólicos totales, de acuerdo al método de Singleton y Rossi (1965), con modificaciones.

El contenido de compuestos fenólicos totales se cuantificó mediante el método colorimétrico basado en el empleo del reactivo Folin-Ciocalteu. Se homogeneizaron 500 mg de tejido foliar fresco en etanol. La mezcla se agitó se centrifugó a 10.000 x g durante 15 min a 4 °C. Se tomó una alícuota de la muestra y se mezclaron con agua destilada, y el reactivo de Folin 1 N. Luego de 3 min a 25 °C se agregó la solución de Na₂CO₃ 2 % (p/v) en NaOH 0,1 N. Se incubó durante 90 minutos a 25 °C y se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro. Se realizó una curva patrón en base a

distintas concentraciones de ácido gálico. Las lecturas de absorbancia se efectuaron a 760 nm y los resultados finales se expresaron como $\mu\text{g. mg}^{-1}$ de tejido fresco.

Contenido de azúcares reductores y totales, de acuerdo al método de Somogy (Cronin y Smith 1979).

Conductividad relativa de tejidos foliar y radicular (Lutts et al. 1996)

Se pesaron 200 mg de hojas y/o raíces y se lavaron tres veces con agua bidestilada durante 15 segundos, para eliminar los electrolitos adheridos a la superficie y aquellos liberados por las heridas producidas por el corte. Posteriormente, cada muestra se sumergió en un tubo con 10 ml de agua bidestilada donde permanecieron durante cuatro horas a temperatura ambiente, seguidamente se determinó la conductividad eléctrica (dS.m^{-1}) empleando un conductímetro Jenco modelo 3173. Luego, los tubos se taparon y se llevaron a autoclave donde se mantuvieron por 20 minutos a una presión de una atmósfera y $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, con el objetivo de afectar totalmente la integridad de las membranas. Finalmente, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se volvió a medir la conductividad eléctrica del medio. En base a los datos obtenidos, se estimó la conductividad relativa de las membranas celulares a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{CR (\%)} = (\text{L1} / \text{L2}) \times 100$$

Donde, L1 y L2 son las lecturas de conductividad eléctrica antes y después del autoclavado respectivamente.

Cortes histológicos de tejido radicular. (Zarlavsky, 2014; Gurr, 1971)

Se realizaron cortes transversales a mano alzada de las raíces. Los cortes fueron decolorados con hipoclorito de sodio (50%), lavados con agua destilada y se practicó doble coloración con azul de Alcian 1% y safranina alcohólica 80% (Luque et al., 1996). Se realizaron técnicas histoquímicas para identificar almidón con solución acuosa de Lugol (yodo-iodurado de potasio) (Zarlavsky, 2014) y para sustancias lipofílicas se empleó una solución alcohólica saturada de Red Oil "O" (Gurr, 1971). La presencia de lípidos quedó indicada por el color rojo (paredes impregnadas con suberina, cutina). Las observaciones se realizaron con un microscopio óptico Ceti Topic

T y la captura de imágenes con un microscopio Gemalux XSZ-H equipado con cámara Motic 1000 y software Motic Image Plus 2.0.

Extracción de nematodos de muestras de suelo (Cobb, 1918).

La extracción de vermiformes se realizó a partir de una muestra de 100 cm³ de suelo que se colocó en una jarra junto con 5 L de agua. Se agitó vigorosamente durante 2 minutos para separar los nematodos de las partículas del suelo, y luego se dejó decantar 30 segundos para que las partículas grandes de suelo sedimenten. A continuación, se pasó toda la suspensión lentamente por una batería de tamices de 350, 175, 100 y 38 µm colocados uno sobre otro. Luego se agregó nuevamente agua a la jarra con la muestra de suelo remanente y se repitió el mismo procedimiento dos veces más. Los nematodos quedaron retenidos en el último tamiz y fueron recolectados a medida que se enjuagaba el mismo, en vasos de precipitados de 100 mL. Esta técnica se combinó con la de técnica de centrifugación – flotación de Coolen (1979) para clarificar la suspensión y facilitar el recuento en microscopio óptico.

Extracción de huevos de nematodos de las raíces (Hussey, R. S. y Barker, K. R. 1973).

El objetivo de esta técnica es extraer y disolver las masas de huevos que se encuentran en las raíces. Para ello los sistemas radiculares se cortaron con tijera en segmentos de 10 cm de largo y se los colocó en una licuadora. Se agregó una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% hasta cubrir la totalidad de las raíces y se licuó a la velocidad máxima durante un minuto. Se vertió la suspensión sobre dos tamices superpuestos, colocando en la parte superior el tamiz de 150 µm de apertura de malla y en la inferior, el de 37µm. Se enjuagó el tamiz inferior y se recolectó el material donde se encontraban los huevos. Esta técnica se combinó con la de técnica de centrifugación – flotación de Coolen (1979) para clarificar la suspensión y facilitar el recuento en microscopio óptico.

Método de centrifugación flotación para la separación y purificación de nematodos (Coolen, 1979).

Para poder facilitar el conteo de huevos obtenidos de raíces por la técnica de Hussey y Barker (1973) y de vermiformes en el suelo obtenido por la técnica de Cobb (1918) se aplicó sobre las suspensiones de nematodos la técnica de centrifugación-flotación descrita por Coolen (1979). A la suspensión de nematodos, se le adicionó 5

cm³ de caolín por cada 50 cm³ de suspensión. Se agitó hasta lograr una mezcla homogénea y se distribuyó en tubos de centrifuga. Se realizó una primera centrifugación durante 5 minutos a 1000g. Finalizada la centrifugación el sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido con una solución de sacarosa con densidad 1,18 gr/L (484 gr de azúcar comercial en un litro de agua). Con ayuda de columna de vidrio, se mezcló la sacarosa con el pellet hasta lograr una mezcla homogénea. Luego se procedió a realizar una segunda centrifugación a 1000g durante 2 minutos. Finalmente se vertió el sobrenadante sobre un tamiz de 37 µm debajo del grifo para “lavar” los nematodos y retirar la sacarosa. El contenido del tamiz fue colocado en vasos de precipitado para posterior recuento sobre placa de conteo en microscopio óptico.

Población final de nematodo y Factor de reproducción (Oostenbrink, 1966).

La población final del nematodo se calculó por la suma del número de huevos extraídos de la raíz y el número aproximado de vermiformes en el suelo. Para obtener este último valor, se extrapolan los resultados obtenidos de analizar 100 mL de suelo al volumen total de la maceta.

El Factor de reproducción se calculó por: población final x Población inicial⁻¹.

La población inicial corresponde al número de huevos que se inoculan.

2. 2.3 Resultados y discusión

En los parámetros de crecimiento, bioquímicos y fisiológicos evaluados a los 21 días no se observaron diferencias significativas entre las plantas control y las plantas inoculadas ($p \geq 0,05$) (Tabla 2.1).

Si bien, el tiempo transcurrido fue suficiente para que *N. aberrans* realice al menos un ciclo completo, se estima que el aumento en la población no fue suficiente para ejercer un efecto perjudicial en la planta.

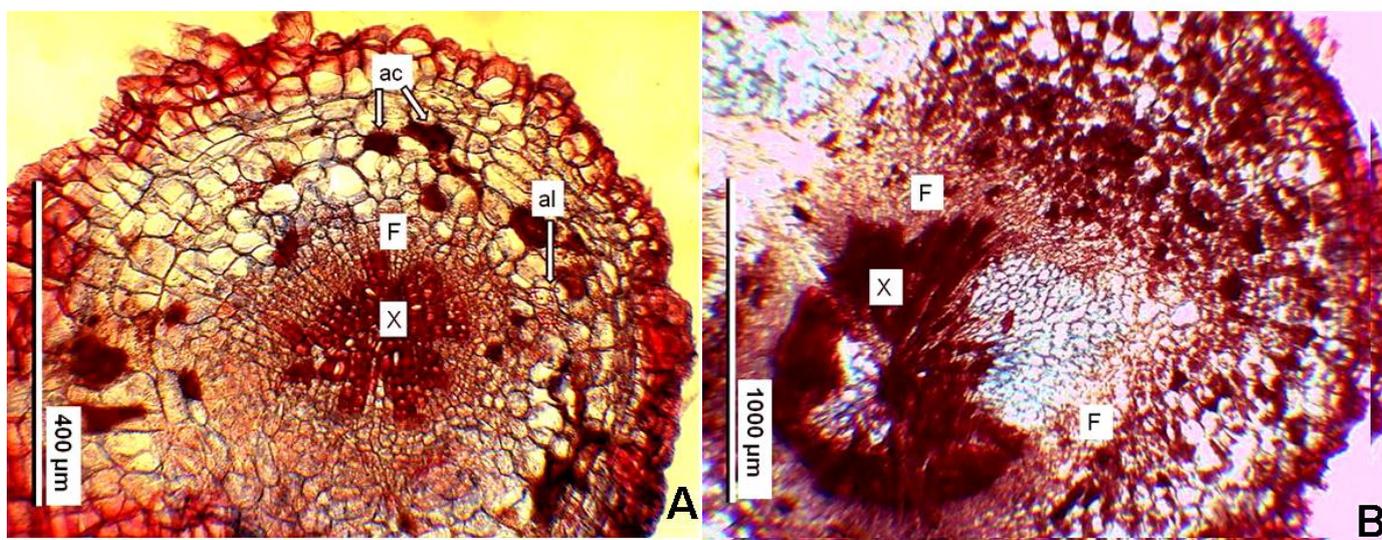
Tabla 2.1 Análisis de varianza, valores medios y desvío estándar de parámetros de crecimiento, bioquímicos y fisiológicos medidos a los 21 días, de plantas de tomate platense parasitadas y no parasitadas (testigo) con *Nacobbus aberrans*.

Parámetro	CV	p-valor	F	Testigo	Inoculado
Altura de plantas (cm)	11,95 %	0,79	0,07	29,7 ± 2,8	30,1 ± 3,11
Diámetro de tallo (cm)	17,7 %	0,15	2,42	0,58 ± 0,1	0,62 ± 0,1
Conductancia estomática (mmol.m ⁻² s ⁻¹)	17,67 %	0,72	0,13	62,48 ± 7,2	64,73 ± 8,4
Eficiencia del FSII (Fv/Fm)	14,11 %	0,96	0,002	0,34 ± 0,05	0,33 ± 0,04
Clorofila total (µg.cm ⁻²)	9,68 %	0,11	2,94	35,17 ± 2,8	38,71 ± 2,7
Carotenos totales (µg.cm ⁻²)	13,38 %	0,09	12,02	5,19 ± 0,49	6,79 ± 1,02
Proteínas solubles (µg.mg PF ⁻¹)	17,8 %	0,77	0,09	3,7 ± 0,51	3,59 ± 0,77
Conductividad relativa (%)	4,81 %	0,80	0,07	97,42 ± 6,16	98,12 ± 2,51
Fenoles (µg. mg PF ⁻¹)	12,58 %	0,91	0,01	1,06 ± 0,1	0,97 ± 0,09
Malonildialdehído (nmoles.gr PF ⁻¹)	20,2 %	0,35	0,93	12,79 ± 2,94	11,42 ± 3,09
Prolina (µmoles.g PF ⁻¹)	14,39 %	0,53	0,41	317,11 ± 68,7	300,75 ± 70,7
Azúcares totales (µg. g PF ⁻¹)	26,6 %	0,32	1,09	403,2 ± 98,08	473,6 ± 133,2

CV: coeficiente de variación; p-valor: probabilidad; F: F calculado.

Al lavar las raíces, se pudo observar la presencia de numerosas agallas en el tratamiento inoculado con *N. aberrans* confirmando que la inoculación fue efectiva. La extracción y cuantificación de huevos indicó un valor promedio de 90.060 huevos por planta.

Al realizar los cortes histológicos de raíces parasitadas se observó que la estructura secundaria del tejido vascular estaba alterada respecto a la estructura de las raíces sanas (Fig. 2.4). El anillo de floema secundario estaba deformado, al igual que el xilema secundario. Se observó la presencia de parénquima entre el floema y el xilema y en el propio xilema. En la corteza se manifestó un desorden celular y un incremento de capas de parénquima. En el parénquima cortical se observaron abundantes granos de almidón y perforaciones que se suponen fueron producidas por el nematodo. Las manchas oscuras corresponden a arenas cristalinas propias de la familia Solanácea.

Figura 2.4. Corte transversal de a) raíz sin agallas; b) raíz a nivel de una agalla.

Referencias. ac: arena cristalina, al: almidón, F: anillo de floema secundario, X: xilema secundario.

El parasitismo de *N. aberrans* modificó el flujo normal de agua tanto por la muerte de células radicales como por las alteraciones estructurales en los tejidos de conducción. Esta afirmación se basa en lo observado en los cortes histológicos, como en las mediciones de la conductancia estomática, donde los valores medidos en las plantas parasitadas fueron significativamente menores que en las plantas testigo (Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Conductancia estomática de plantas de tomate platense parasitadas y no parasitadas (testigo) con *Nacobbus aberrans*.

	CV	Testigo	Inoculado
Conductancia estomática ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	26,4 %	160,2 \pm 53,5 A	94,4 \pm 17,7 B

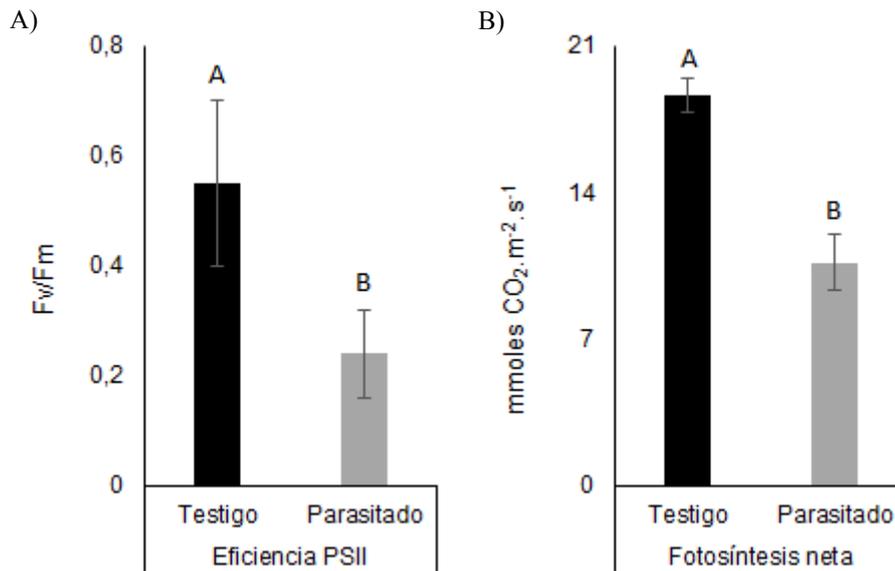
Medias y ds seguidos por letras distintas indican diferencias significativas según el test de LSD de Fisher ($p\leq 0,01$).

La conductancia estomática es una estimación del intercambio gaseoso que ocurre en las hojas, es decir pérdida de agua por transpiración y consumo de CO_2 en el proceso de fotosíntesis. Una de las respuestas más rápidas y comunes de las plantas para limitar la pérdida de vapor de agua por transpiración es el cierre parcial o total de estomas. En consecuencia, el intercambio de gases que ocurre en la hoja se reduce;

disminuye la pérdida de agua, pero también lo hace el flujo de CO₂ en dirección al mesófilo y por lo tanto la fotosíntesis (Bosco *et al.*, 2009).

La energía que absorben de la luz las clorofilas y los carotenos para realizar el proceso fotosintético, se transfiere principalmente como energía de excitación al centro de reacción para ser utilizado como energía química. Sin embargo, parte de la energía absorbida por los pigmentos es disipada en forma de calor y otra parte es reemitida como energía luminosa (fluorescencia). Estos tres eventos (energía absorbida para fotosíntesis y energía disipada en forma de calor o de fluorescencia) ocurren en forma simultánea, por lo tanto, conociendo el valor de la energía que se emite por fluorescencia se puede inferir la eficiencia del sistema. De un modo general se estima que la energía que continúa al centro de reacción representa un 97% de la energía disponible, mientras que un 2,5 % se disipa en forma de calor y 0,5 % es reemitida como fluorescencia. De las clorofilas que forman parte del sistema fotosintético las que contribuyen significativamente en la emisión de fluorescencia son las del fotosistema dos (FSII) siendo que la participación de las del fotosistema uno es mínima (González Moreno *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos indican que el parasitismo de *N. aberrans* provocó una reducción significativa en la eficiencia o rendimiento cuántico del FSII (Figura 2.5 A). Como se demostró a través de la conductancia estomática, la transpiración de las plantas parasitadas es menor debido a una reducción en la apertura estomática. La transpiración es el principal mecanismo de disipación de energía calórica de las hojas por lo que si esta vía de regulación se encuentra afectada o disminuida la planta se ve obligada a emitir mayor energía por fluorescencia. Existe consenso en que la cuantificación de la fluorescencia puede ser considerada como un indicador de estrés en las plantas (Baker, 2008; Oukarroum *et al.*, 2009).

Figura 2.5. Eficiencia del fotosistema II (A.) y fotosíntesis neta (B.), de plantas de tomate platense parasitadas y no parasitadas (testigo) con *Nacobbus aberrans*.

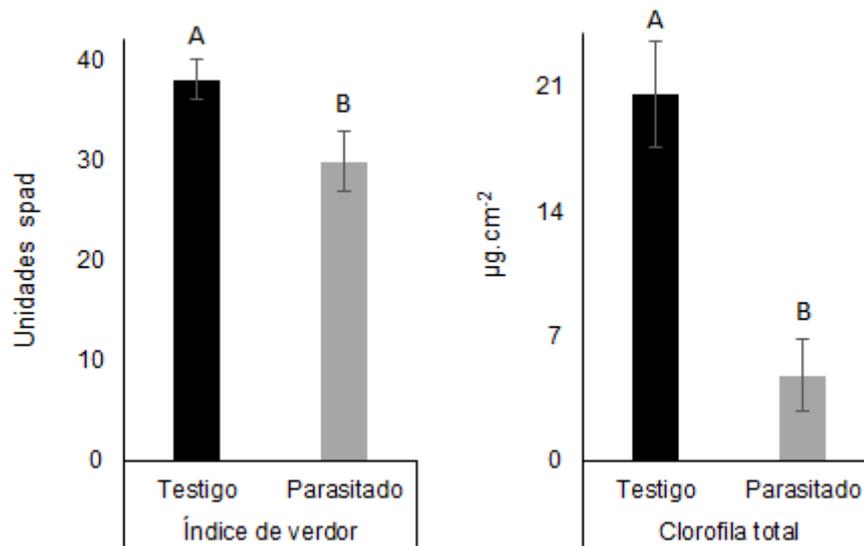


Columnas acompañadas por letras distintas indican diferencias significativas según el test de LSD de Fisher ($P \leq 0,01$).

En concordancia con lo ocurrido con la disminución de la conductancia estomática y la disminución de eficiencia del FSII, la fijación de CO₂ (fotosíntesis neta) mostró valores significativamente más bajos en las plantas parasitadas ($P \leq 0,01$) (Figura 2.5 B). El cierre estomático causa una reducción en la difusión de dióxido de carbono hacia el cloroplasto y, además, cuando la irradiancia es normal o elevada, puede provocar una excitación de los fotorreceptores que da lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan el fotosistema (Ghobadi *et al.*, 2013).

Las determinaciones realizadas con Spad para medir el índice de verdor de las hojas mostraron diferencias significativas ($p \leq 0,01$, CV: 11,77%) entre las plantas no inoculadas e inoculadas con *N. aberrans*. Asimismo, la determinación de clorofila total por espectrofotometría lo confirmó con diferencias significativas entre las concentraciones medidas para los dos tratamientos ($p \leq 0,01$, Cv: 10,31%) (Figura 2.6).

Figura 2.6. Índice de verdor y contenido total de clorofilas en plantas de tomate platense parasitadas y no parasitadas (testigo) con *Nacobbus aberrans*.

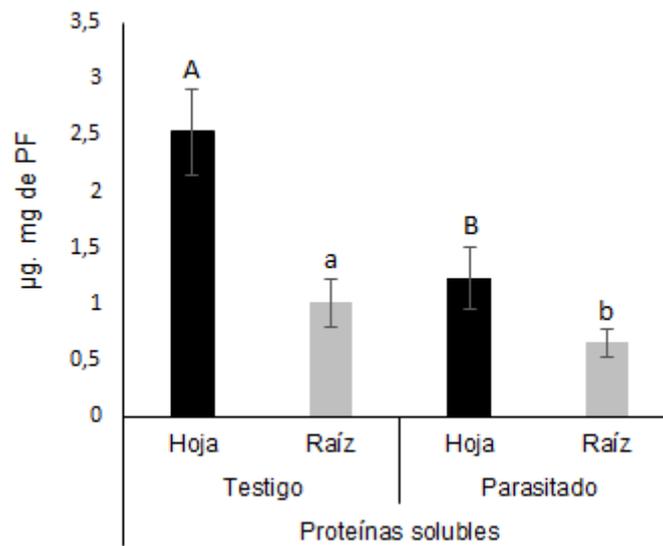


Columnas acompañadas por letras distintas indican diferencias significativas según el test de LSD de Fisher ($P \leq 0,05$).

Estos resultados demuestran que las diferencias observadas en la fotosíntesis neta, no se debieron solamente al cierre estomático, sino que el potencial fotosintético de las plantas testigo era superior, debido a un mayor contenido de pigmentos fotosintéticos.

La determinación del contenido de proteínas solubles por el método de Bradford (1976), también mostró diferencias significativas entre los tratamientos, tanto en las hojas como en las raíces (Figura 2.7). Algunos autores citan que una respuesta común de las plantas que sufren daño en sus raíces es una reducción rápida en la concentración de proteínas (Bray 1997; Zhu *et al.*, 2002). Esa reducción se debe a un mecanismo de proteólisis que ocurre para elevar la concentración de solutos (aminoácidos) en el citosol y disminuir el potencial osmótico, aumentando así la posibilidad de absorción de agua y nutrientes, por medio del ajuste osmótico (Javot, 2002).

Figura 2.7 Contenido de proteínas solubles en tejido foliar y radicular de plantas de tomate platense parasitadas y no parasitadas (testigo) con *Nacobbus aberrans*.



Letras mayúsculas comparan hojas, letras minúsculas comparan raíces. Columnas acompañadas por letras distintas indican diferencias significativas según el test de LSD de Fisher ($P \leq 0,01$).

Durante el transcurso del ensayo se realizaron 5 mediciones quincenales de altura que no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (datos no mostrados). Sin embargo, hubo diferencias significativas en el diámetro de los tallos medido en la altura media de las plantas (Tabla 2.3).

En cuanto a los frutos cosechados no se registraron diferencias significativas en el rendimiento total, ni en el peso promedio de los mismos. Sin embargo, existieron diferencias significativas en la calidad de los frutos. Las plantas parasitadas por *N. aberrans* tuvieron un mayor número de frutos con rajaduras o “cracking” y frutos deformados (Tabla 2.3) (Figura 2.8)

Tabla 2.3 Diámetro del tallo y frutos cosechados de plantas de tomate platense parasitadas y no parasitadas (testigo) con *Nacobbus aberrans*

Parámetro	CV	Testigo	Parasitado
Diámetro del tallo (Cm)	14,71 %	1,00 ± 0,1A	0,70 ± 0,11 B
Peso de frutos cosechados (g)	18,49 %	1044 ± 241 A	1131 ± 149 A
Peso medio de frutos (g)	24,55 %	133,8 ± 32,6 A	134,5 ± 33,2 A
Porcentajes de frutos defectuosos (%) *	16,2 %	8,2 ± 4,1 B	38,4 ± 7,3 A

* Para el análisis estadístico se realizó una transformación de los valores por arcoseno. Medias seguidas por letras distintas indican diferencias significativas según el test de LSD de Fisher ($P \leq 0,01$).

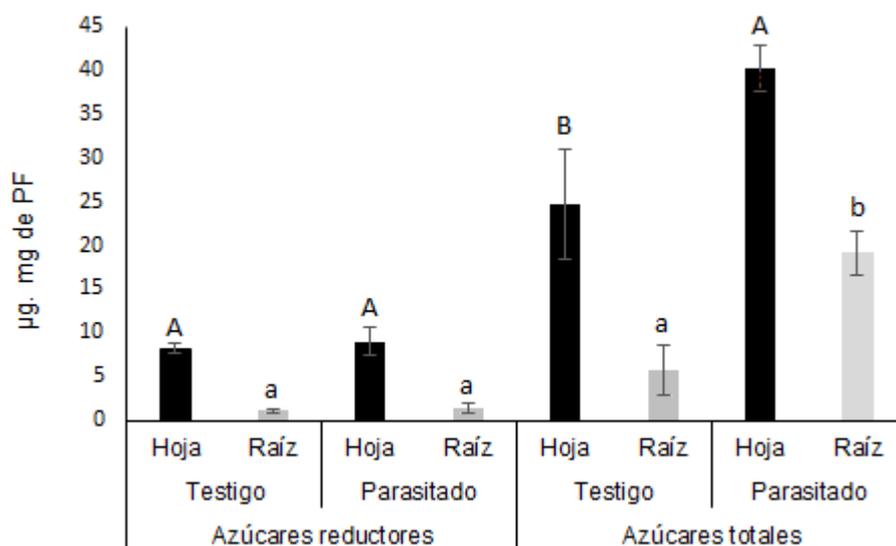
Figura 2.8 Fruto normal; agrietado y deformado de tomate platense.



El rajado de frutos es una alteración fisiológica en que la epidermis se agrieta con distinta profundidad (Pascual *et al.*, 1998). Entre los factores que inciden en el cracking se encuentran componentes genéticos de predisposición de cada cultivar, elevada radiación solar y podas (Dorais *et al.*, 2004). En este caso por tratarse de plantas del mismo cultivar, expuestas a las mismas prácticas culturales y radiación, el agrietamiento debió estar asociado a desórdenes en el balance hídrico (Osvald y Osvald, 1991), mayor temperatura de la planta consecuencias del estrés hídrico y dificultades en la absorción de calcio que altera la flexibilidad de las membranas (Peet, 1992).

Las determinaciones de azúcares reductores en muestras de tejido foliar y radicular no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 2.9), mientras que la concentración de azúcares totales en hojas y raíces fueron significativamente más elevadas en las plantas parasitadas (Figura 2.9).

Figura 2.9. Contenido de azúcares reductores y totales en tejido foliar y radicular de plantas de tomate platense parasitadas y no parasitadas (testigo) con *Nacobbus aberrans*



Letras mayúsculas comparan hojas, letras minúsculas comparan raíces. Columnas acompañadas por letras distintas indican diferencias significativas según el test de LSD de Fisher ($P \leq 0,05$).

El contenido de prolina en el tejido foliar no mostró diferencias entre los tratamientos, pero en el caso de las raíces, las plantas afectadas por *N. aberrans* tuvieron un contenido significativamente mayor (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Contenido de prolina en tejido foliar y radicular de plantas de tomate platense parasitadas y no parasitadas (testigo) con *Nacobbus aberrans*.

Parámetro	CV	Testigo	Parasitado
µmoles de prolina.gPF ⁻¹ tejido foliar	18,02 %	740,8 ± 180,7 A	777,3 ± 68,9 A
µmoles de prolina.gPF ⁻¹ tejido radicular	11,4 %	379,5 ± 54 b	1188,8 ± 115,1 a

Letras mayúsculas comparan hojas, letras minúsculas comparan raíces. Medias seguidas por letras distintas indican diferencias significativas según el test de LSD de Fisher ($P \leq 0,01$).

Solutos como la prolina y los azúcares de bajo peso molecular se acumulan en los tejidos en respuesta a déficits hídricos, para disminuir el potencial osmótico de las células y así favorecer la absorción y el movimiento del agua en la planta. Este fenómeno es bien conocido y documentado, y recibe el nombre de ajuste osmótico. El tipo de solutos a acumular no debe alterar la funcionalidad de otras biomoléculas como enzimas, ni la funcionalidad de la célula, por lo que deben ser solutos osmocompatibles (Ledent, 2002). Según los resultados obtenidos los azúcares no reductores son los que cumplirían un rol más importante en el ajuste osmótico. Además de esta función, los azúcares solubles están asociados al anabolismo y al catabolismo de ROS, y participan

en la producción de NADPH que implica la eliminación de ROS (en la vía oxidativa de las pentosas fosfato) (Hu *et al.*, 2012).

En numerosos trabajos se destaca la participación de la prolina como osmoprotector. Sin embargo, este metabolito cumple otras importantes funciones tanto a nivel celular como a nivel ontogénico. La prolina actúa como bloqueador de ROS, participa en el pasaje del estado vegetativo al estado reproductivo, interviene en la maduración del polen y de las semillas, aumenta la atracción de polinizadores y es una importante fuente de energía cuando se degrada después de su acumulación (Bertazzini *et al.* 2010). La transcripción de los genes que participan en la biosíntesis y en la degradación de prolina son fuertemente influenciados por situaciones de estrés, como por la ontogenia natural de las plantas. En algunos casos el aumento en la concentración de este aminoácido se debe no solo a aumentos en su síntesis, sino a una disminución en su catabolismo (Szekely *et al.*, 2008). Tanto el ácido abscísico como algunos microRNAs (nat-siRNAs, "natural antisense transcript siRNAs") participan en la regulación de las enzimas de la biosíntesis (Kesari *et al.* 2012, Zhang *et al.*, 2013). Diversos autores concuerdan en que la prolina cumple un rol importante en el mantenimiento del rendimiento de diversos cultivos. Claussen (2005) sugiere que, en el caso del tomate, el contenido de prolina en el polen es un indicador del rendimiento posterior del cultivo y que puede considerarse un indicador o umbral de estrés o daño. El contenido de prolina en la flor de tomate es aproximadamente 60 veces mayor que en cualquier otro tejido de la planta y representa más del 70% del total de aminoácidos libres contenidos en el grano de polen (Fujita *et al.*, 1998; Schwacke *et al.*, 1999). Por el rol destacado que la prolina tiene en el funcionamiento de las plantas, y en particular en el tomate, es importante ampliar los estudios de como los nematodos fitoparásitos impactan en su equilibrio de síntesis y degradación.

La cuantificación de fenoles en el tejido foliar no mostró diferencias entre las plantas testigo y las plantas parasitadas, sin embargo, en el tejido radicular las diferencias fueron significativas ($p \leq 0,01$, Cv: 15,04%) (Tabla 2.5).

Tabla 2.5 Contenido de fenoles en tejido foliar y radicular de plantas de tomate platense parasitadas y no parasitadas (testigo) con *Nacobbus aberrans*.

Parámetro	CV	Testigo	Parasitado
Fenoles tejido foliar	19,22 %	1,36 ± 0,29 A	1,40 ± 0,23 A
Fenoles tejido radicular	15,04 %	0,21 ± 0,03 b	0,99 ± 0,13 a

Medias seguidas por letras distintas indican diferencias significativas según el test de LSD de Fisher ($P \leq 0,01$).

Los compuestos fenólicos son un grupo muy amplio de moléculas, y en este análisis solo se han cuantificado valores totales sin conocer en detalle cuál es el tipo de fenólicos predominantes. Sin embargo, se puede afirmar que son compuestos post-infeccionales que se incrementaron a partir del ataque del nematodo. La relación antagónica de compuestos fenólicos y nematodos ha sido documentada de distintas maneras. Cultivares que tienen mayor tolerancia o resistencia a nematodos presentan elevados contenidos de fenoles en sus raíces (Hung y Rohde, 1973). Enmiendas orgánicas ricas en fenoles, polifenoles y taninos aumentan el contenido de este tipo de compuestos en los tejidos radiculares y disminuye la población de nematodos noduladores (Sitaramaiah y Singh, 1978; Mian y Rodríguez-Kábana, 1982). Soluciones de compuestos fenólicos inhiben la eclosión de huevos de nematodos y tienen efecto nematicida sobre formas juveniles (Mahajan *et al.*, 1992).

La producción de radicales libres es un proceso que ocurre naturalmente y que cumple importantes funciones biológicas. Esos radicales actúan como mediadores en la transferencia de electrones de muchas reacciones, posibilitan la síntesis de ATP, actúan como señalizadores para la activación de genes y participan de mecanismos de defensa vegetal. Las principales especies reactivas de oxígeno (ROS) son el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los radicales hidroxilos (OH^\cdot) y el oxígeno singlete ($^1s O_2$). En condiciones normales la producción de ROS es baja y se encuentra bajo un estricto equilibrio homeostático, de producción, utilización y neutralización. Cuando las plantas son expuestas a distintas situaciones de estrés, los niveles de ROS aumentan significativamente produciendo muerte celular y estrés oxidativo (Rivera-

Cabera *et al.*, 2008). Los ácidos grasos de las membranas plasmáticas son susceptibles a la peroxidación alterando las funciones de las membranas y modificando la división celular (Bonorden y Pariza, 1994; Halliwell y Whiteman, 2004).

El daño causado por el nematodo comienza con la ruptura de las células con el estilete, la disolución de la pared y la introducción de enzimas que modifican la fisiología celular (Sijmons, 1993). Posteriormente, y como se demostró con los cortes histológicos hay alteraciones a nivel de tejido que suman al daño celular e inducen estrés hídrico. Los radicales hidroperóxidos (HO_2^-) que se originan por la protonación del radical superóxido pueden atravesar membranas biológicas y sustraer átomos de hidrógeno de ácidos grasos poliinsaturados iniciando la peroxidación lipídica (Neill *et al.*, 2002). El malonildialdehído (MDA) es el principal producto de la peroxidación y su aumento es considerado indicador de estrés oxidativo y de daño en las membranas plasmáticas. La cuantificación de MDA en las hojas no presentó diferencias significativas entre los tratamientos. En el tejido radicular hubo un incremento significativo ($P \leq 0,05$; CV: 15,61%) del MDA en el tratamiento parasitado (Tabla 2.6).

Cuando las membranas celulares son alteradas por algún factor interno o externo, pierden parcial o totalmente, una de sus principales funciones: la permeabilidad selectiva. La conductividad eléctrica medida en el agua donde permanecen sumergidas las muestras de tejido, es un indicador de la estabilidad de las membranas y su capacidad para retener electrolitos. Las mediciones de conductividad relativa (CR) no presentaron diferencias significativas en el tejido foliar, pero si en el tejido radicular ($p \leq 0,05$; CV: 13%) (Tabla 2.6).

Tabla 2.6 Contenido de malonildialdehído y conductividad eléctrica relativa, en tejido foliar y radicular de plantas de tomate platense parasitadas y no parasitadas (testigo) con *Nacobbus aberrans*

Parámetro	CV	Testigo	Parasitado
nmoles de MDA.gr PF^{-1} de tejido foliar	22,3 %	1,2 \pm 0,26 A	1,61 \pm 0,36 A
nmoles de MDA.gr PF^{-1} de tejido radicular	15,61 %	6,44 \pm 1,1 B	10,42 \pm 1,5 A
Conductividad relativa en tejido foliar (%)	28,3 %	23,75 \pm 5,1A	35,22 \pm 9,7 A
Conductividad relativa en tejido radicular (%)	13,79 %	6,44 \pm 1,3B	10,42 \pm 1,8 A

Medias seguidas por letras diferentes indican diferencias significativas según el test de LSD de Fisher ($P \leq 0,05$).

Si bien los resultados indicaron diferencias, los valores no indican una peroxidación de lípidos tan alta como la documentada en estreses severos de distinto tipo (Sharma y Sharma, 2017). Posiblemente, por su condición biotrófica la laceración que provoca el nematodo en el tejido está limitada a su movimiento de ingreso y egreso de la raíz. Las restantes alteraciones de la raíz modificaron la funcionalidad sin provocar estrés oxidativo. Por tratarse de un sustrato tinalizado, el daño observado en las raíces es el efectuado exclusivamente por *N. aberrans* y no por otros microorganismos que, en condiciones reales de producción forman un complejo nematodo-hongo que en conjunto afectan con mayor agresividad a las plantas.

La conductividad eléctrica de una solución en la que permaneció sumergido un tejido estresado de raíz fue mayor que la proveniente de un tejido no estresado. Sin embargo, los valores alcanzados no indican una afectación importante del sistema radicular, ya que, para sistemas radiculares sometidos a estreses severos, la CR debe estar por encima del 60% (Arango *et al.*, 2014).

2.3 CONSIDERACIONES FINALES

Teniendo en cuenta el ciclo de vida del nematodo, es fácil comprender que las formas juveniles, ingresando y saliendo de la raíz, en repetidas oportunidades producen un grave daño a las mismas que además representa una vía de entrada para otros microorganismos patógenos. El crecimiento de la hembra dentro de la raíz y la formación del sincito contribuyen también al daño estructural observado en los cortes histológicos realizados. Como consecuencia del daño a nivel morfológico, algunas funciones fisiológicas se vieron alteradas, de forma directa e indirecta, debido a la dificultad de las plantas para absorber agua y nutrientes.

El crecimiento de las plantas y los parámetros fisiológicos determinados en este ensayo, como la conductancia estomática, la fotosíntesis neta, el rendimiento cuántico del fotosistema II, la conductividad relativa de las membranas celulares, mostraron evidencias del daño ya mencionado. También los indicadores de estrés como la prolina, el MDA, los compuestos fenólicos y los azúcares.

Según los resultados obtenidos, el cultivo de tomate afectado por *N. aberrans* se condice con una planta sometida a estrés hídrico y estrés nutricional, con las

alteraciones que esto conlleva. Es necesario tener en cuenta que en un sistema de producción hay otras variables que acentúan estas respuestas como la elevada temperatura de los invernáculos que contribuyen al estrés hídrico.

Todas estas consideraciones son importantes al momento de elegir las herramientas a implementar tanto para el control del nematodo como para el óptimo crecimiento de la planta.

2.4 REFERENCIAS

Arango, M. C.; Ruscitti, M.; Beltrano, J. 2014 Efectos de concentraciones crecientes de Cu sobre cultivares comerciales de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) inoculados con *Glomus mosseae*. Respuesta en el crecimiento y la integridad de las membranas celulares. XXXVII Congreso Argentino de Horticultura. Mendoza, Argentina,

Baker, N. R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. Annual Review of Plant Biology, v. 59, p. 89-113.

Bates, L.S.; Waldren, R.P.; Tease, I.D. 1973. Rapid determination of the proline for stress studies. Plant Soil, v. 85, p.107-129.

Bertazzini, M.; Medrzycki, P.; Bortolotti, L.; Maistrello, L.; Forlani, G. 2010. Amino acid content and nectar choice by forager honeybees (*Apis mellifera* L.). Amino Acids, v. 39, p. 315–318.

Blum, A. 2016. Stress, strain, signaling, and adaptation—not just a matter of definition. Journal of Experimental Botany, v. 67, p. 562–565.

Bonorden, W.R.; Pariza, M.W. 1994. Antioxidant nutrients and protection from free radicals, en Kotsonis, F. N, Nutrition toxicology, Raven Press, p. 19-48.

Bosco, M. R. O.; Oliveira, A. B.; Hernandez, F. F. F.; Lacerda, C. F. 2009. Efeito do NaCl sobre o crescimento, fotossíntese e relações hídricas de plantas de berinjela. Revista Ceres, v. 56, p. 296-302.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254.

Bray, E. A. 1997. Plant responses to water deficit. Trends Plant Science, v. 2, p. 48-54

Cabrera-Hidalgo, A.; Valdovinos-Ponce, G.; Mora-Aguilera, G.; Rebollar-Alviter, A.; Mendoza, N. 2014. Occurrence of *Nacobbus aberrans* in horticultural crops in northwestern Michoacan, Mexico. Nematropica, v. 44, p. 107-117.

- Clark, S. A. 1967. The development and life history of the false root-knot nematode, *Nacobbus serendipiticus*. *Nematologica*, v. 13, p. 91-101.
- Claussen W. 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Science*, v. 168, p. 241–248.
- Coolen, W. A. 1979. Methods for the extraction of *Meloidogyne spp.* and other nematodes from roots and soil. En: Lamberti, F.; Taylor, C. E. Root knot nematodes (*Meloidogyne* species) systematics, biology and control. London: Academic Press, 317-329.
- Costilla, M. A. 1985. El falso nematode del nudo *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 y su relación con el cultivo de papa en el Noroeste argentino. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, v. 62, p. 79-97.
- Cristóbal, A. J.; Cid del Prado, I.; Marbán-Mendoza, N.; Sánchez, G. P.; Mora-Aguilera, G.; Manzanilla-López, R. H. 2001. Sobrevivencia de estadios biológicos de *Nacobbus aberrans* en condiciones de campo. *Nematropica*, v. 31, p. 229-235.
- Cronin, D.; Smith, S. 1979. A simple and rapid procedure for the analysis of reducing, total and individual sugars in potato. *Potato Research*, v. 22, p. 99-105.
- Dorais, M.; Demers, D. A.; Papadopoulos, A. P.; Van Ieperen, W. 2004. Greenhouse tomato fruit cuticle cracking. *Horticultural Review*, v. 30, p. 163-184.
- Doucet, M. E.; Lax, P. 2005. El Género *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 en la Argentina. 6. La especie *N. aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Tylenchida) y su relación con la agricultura. *Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*. Buenos Aires. Tomo LIX, p. 5-14.
- Eves-van den Akker, S.; Lilley, C. J.; Danchin, E.G. J.; Rancurel, C.; Cock, P. J. A. 2014. The Transcriptome of *Nacobbus aberrans* reveals Insights into the Evolution of Sedentary Endoparasitism in Plant-Parasitic Nematodes. *Genome Biology and Evolution*, v. 6, n. 9, p. 2181-2194.
- Ferraz, L. C.; Brown, D. J. 2016. *Nematología de plantas: Fundamentos e importancia*. Ed. Norma, Brasil, 251 p.
- Fujita, T.; Maggio, A.; Garcia-Rios, M.; Bressan, R. A.; Csonka, L. N. 1998. Comparative analysis of the regulation of expression and structures of two evolutionarily divergent genes for delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase from tomato. *Plant Physiology*, v. 118, p. 661–674.
- Genty, B.; Briantais, J. M.; Baker, N. R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta*, v. 990, n. 1, p. 87-92

Ghobadi, M.; Taherabadi, S.; Ghobadi, M. E.; Mohammadi, G. R.; Jalali-Honarmand, S. 2013. Antioxidant capacity, photosynthetic characteristics and water relations of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars in response to drought stress. *Industrial Crops and Products*, v. 50, p. 29-38.

González, A.; Franco, J. 1997. Los nematodos en la producción de semilla de papa. En: *Producción de tubérculos-semillas de papa: manual de capacitación*. Centro Internacional de la Papa (CIP). Fascículo 3.9, 13 pp.

González Moreno, S.; Perales Vela, H.; Salcedo Alvarez, M.O. 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*, v. 27, n. 4, p. 119-129.

Gurr, E. 1971. *Synthetic dyes in biology, medicine and chemistry*. 1st. edition. Academic Press, London, 814 p.

Halliwell, B.; Whiteman, M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology*, v. 142, n. 2, p. 231-55.

Heath, R. L.; Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, v. 125, p.189-198.

Hu, M.; Shi, Z.; Zhang, Z.; Zhang, Y.; Li, H. 2012. Effects of exogenous glucose on seed germination and antioxidant capacity in wheat seedlings under salt stress. *Plant growth regulators*, v. 68, p. 177-188.

Hung, C. L.; Rohde, R. A. 1973. Phenol Accumulation Related to Resistance in Tomato to Infection by Root-Knot and Lesion Nematodes. *Journal of Nematology*, v. 5, n. 4, p. 253-258.

Hussey, R. S.; Barker, K. R. 1973 A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Report*, v. 57, p. 1025-1028.

Inserra, R. N.; Griffin, G. D.; Anderson, J. L. 1985. The false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. Utah Agricultural Experiment Station. Logan, Utah., USA. *Research bulletin*, n. 510, 14p.

Jatala, P. 1985 El nematodo falso nodulador de la raíz: *Nacobbus aberrans*. En: *Fitonematología Avanzada* I. M. N. Marbán; J. I. Thomason, eds. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México, México, p. 47-55.

Javot, H. 2002. The role of osmolites such as proline, aminoacids and ion content in root water uptake and salinity tolerance. *Annals of Botany*, v. 90, p. 301-313.

Jensen, P. 1987. Differences in microhabitat, abundance, biomass and body size between oxybiotic and thiobiotic free-living marine nematodes. *Oecologia*, v. 71, n. 4, p. 564-567.

Kesari, R.; Lasky, J. R.; Villamor, J. G.; Marais, D. L. D.; Chen, Y. J. C.; Liu, T. W.; Lin, W.; Juenger, T. E.; Verslues, P. E. 2012. Intron-mediated alternative splicing of *Arabidopsis* P5CS1 and its association with natural variation in proline and climate adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.109, p. 9197–9202.

Larcher, W. 1987. Stress bei Pflanzen. *Naturwissenschaften*, v. 74, n. 4, p. 158-163.

Ledent, F. 2002 Déficit hídrico y crecimiento de las plantas: respuestas al déficit hídrico. Comportamiento morfofisiológico. Fundación PROINPA.

Lutts, S.; Kinet, J. M.; Bouharmont, J. 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany* v. 78, p. 389-398.

Mahajan, R.; Kaur, D. J.; Bajaj, K. L. 1992. Nematicidal activity of phenolic compounds against *Meloidogyne incognita*. *Nematologia mediterránea*, v. 20, n.2, p. 217-219.

Manzanilla-López, R. H. 1997. Studies on the characterisation and bionomics of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae). Ph. D. Thesis. University of Reading, U.K. 395 p.

Manzanilla-López, R. H.; Costilla, M. A.; Doucet, M.; Franco, J. M.; Inserra, R. N. M Lehman, P. S.; Cid del Prado-Vera, I.; Souza, R.M.; Evans, K. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, distribution, biology and management. *Nematropica*, v.32, p. 149-227.

Mian, I. H.; Rodriguez-Kábana, R. 1982. Enmiendas orgánicas con alto contenido de taninos y fenoles para combatir *Meloidogyne arenaria* en un suelo infestado. *Nematropica*, v. 12, p. 221-234.

Neill, S.; Desikan, R.; Clarke, A.; Hurst, R.; Hancock, J. 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 53, p. 1237-1247.

Niu, X.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M.; Pardo, J. M. 1995. Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. *Plant Physiology*. v. 109, n. 3, p.735–742.

- Osvald, J.; Osvald, M. 1991. Consequences due to water stress for the development and yield of maize, sorghum, cabbage and tomato plants. *Bioloski Vestnik*, v. 39, n.1-2, p. 129-135.
- Oukarroum, A.; Schansker, G.; Strasser, R. J. 2009. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chla fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. *Plant Physiology*, v. 137, p. 188-199.
- Pascual, B.; Bardisi, A.; Lopez-Galarza, S.; Alagarda, J.; Maroto, J. V. 1998. Influencia del riego y del potencial matricial en el rendimiento y en el rajado del tomate. *Investigación agraria. Producción y protección vegetal.*, v. 13, n.1-2, p. 5-19.
- Peet, M. M. 1992. Fruit cracking in tomato. *HortTechnology*, v. 2, p. 216-223.
- Prasad, S. K.; Webster, J. M. 1967. Effect of temperature on the rate of development of *Nacobbus serendipiticus* in excised tomato roots. *Nematologica*, v.13, p. 85-90.
- Rivera-Cabrera F.; Buentello Volante, B.; Díaz de León Sánchez, F.; Pérez-Flores, L. J. 2008 Las especies reactivas de oxígeno en plantas, En: Konigsberg-Fainstein, M. "Radicales libres y estrés oxidativo en la salud y en la enfermedad". Ed. Manual Moderno, México, p. 501-524.
- Schwacke, R.; Grallath, S.; Breitzkreuz, K. E.; Stransky, E.; Stransky, H.; Frommer, W. B.; Rentsch, D. 1999. LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and gamma-amino butyric acid in tomato pollen. *The Plant Cell*, v. 11, p. 377-392.
- Sharma, I. P.; Sharma, A. K. 2017. Co-inoculation of tomato with an arbuscular mycorrhizal fungus improves plant immunity and reduces root-knot nematode infection. *Rhizosphere*, v. 4, p. 25-28.
- Sijmons, P. C. 1993. Plant-nematode interactions. *Plant Molecular Biology* v. 23, p. 917-931.
- Singleton, V. L.; Rossi, J. A. J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 16, p. 144-158.
- Sitaramaiah, K.; Singh, R.S.1978. Effect of organic amendment on phenolic content of soil and plant and response of *Meloidogyne javanica* and its host to related compounds. *Plant Soil*, v. 50, p. 671-679.
- Szekely, G.; Abraham, E.; Cselo, A. 2008. Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *The Plant Journal*, v. 53, p. 11-28.

Taiz, L.; Zeiger, E.; Moller, I. M.; Murphy, A. 2015. Plant Physiology and Development. 6th Edition, Sinauer Associates, Sunderland, CT.761 p.

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, v. 144, p. 307-313.

Zarlavsky, G. 2014 Histología vegetal: Técnicas simples y complejas. Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires.

Zhang, C. Y.; Wang, N. N.; Zhang, Y. H.; Feng, Q. Z.; Yang, C. W.; Liu, B. 2013. DNA methylation involved in proline accumulation in response to osmotic stress in rice (*Oryza sativa*). Genetics and Molecular Research, v.12, p. 1269–1277.

Zhu, J. K.; Schumaker, K. S.; Xiong, L. 2002. Cell signalling during cold, drought, and salt stress. Plant Cell, v.14, p.165-183.

CAPITULO 3

*Simbiosis micorrízico arbuscular para
reducir la población de *Nacobbus aberrans**

3.1 INTRODUCCIÓN

Como fue descrito en el capítulo anterior, el estrés que provoca *Nacobbus aberrans* en las plantas es complejo ya que son alteradas distintas funciones fisiológicas, hídricas, nutricionales, de transporte, equilibrio hormonal. La herramienta de prevención y control en la que se centra este capítulo es la simbiosis micorrícica. Esta simbiosis, que se produce entre hongos y las raíces de las plantas, reporta una serie amplia de beneficios para ambos simbiosites. Por lo tanto, ya sea por acción directa en el control del nematodo o por la mejora de ciertas funciones fisiológicas de la planta, como la absorción y transporte de agua y de nutrientes, los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) constituyen una interesante herramienta a ser estudiada y utilizada en suelos infestados con *N. aberrans*.

3.1.1 Tipos de micorrizas

Las micorrizas (Mykes =hongos y Rhiza = raíz) se definen como una simbiosis formada por la asociación de hongos del suelo del *phylum* Glomeromycota con la mayoría de las raíces de las plantas superiores (Shubler *et al.*, 2001). La relación entre los HMA y sus hospederos es ancestral. Evidencias fósiles indican que las primeras plantas terrestres ya estaban colonizadas por hongos con estructuras similares a los de los hongos formadores de micorrizas. Esta larga co-evolución se manifiesta hoy por el elevado grado de mutualismo y dependencia entre los simbiosites (Barea *et al.*, 2016).

En esa asociación la planta le proporciona al hongo microhábitat, y le provee hidratos de carbono para que éste pueda completar su ciclo de vida; mientras que el hongo permite a la planta una mayor absorción de agua y nutrientes minerales (especialmente los de baja movilidad), así como otros beneficios que serán comentados más adelante.

Existen seis diferentes tipos de micorrizas: arbusculares, arbutoides, ericoides, orquidoides, monotropoides y ectomicorrizas que, difieren en la morfología, la fisiología y la forma de colonización (Barea, 1990). Desde el punto de vista agrícola, las más relevantes son las micorrizas arbusculares (endomycorrizas) y las ectomicorrizas.

Las ectomicorrizas producen hifas que penetran en los espacios intercelulares de la raíz, y forman una "red" que sale de la raíz, denominada red de Hartig. Externamente,

la raíz está rodeada por capas de hifas que forman un manto. La morfología de la raíz se modifica de manera significativa y puede ser vista a simple vista. Se estima que más de 2000 especies de plantas presentan este tipo de simbiosis. Dentro de estas especies en la mayoría de los casos se trata de plantas leñosas (Taylor y Alexander, 2005).

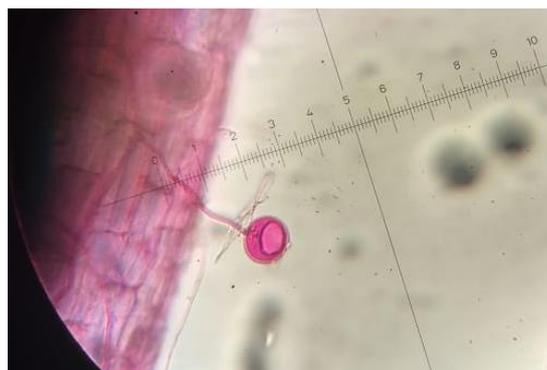
En las micorrizas arbusculares (MA), que son las que serán analizadas en este capítulo, las hifas crecen inter e intracelularmente. Entre la pared celular y la membrana plasmática, forman sus típicas estructuras de ramificación e intercambio denominadas arbusculos. Se estima que el 80% de las plantas terrestres son compatibles con este tipo de simbiosis, la cual no provoca cambios visibles en la raíz por lo que su presencia solo se observa con tinciones y uso de microscopio óptico (Smith y Read, 2008).

3.1.2 Proceso de colonización por micorrizas arbusculares

Los hongos formadores de micorrizas son simbioses obligados, por lo que el proceso de colonización de las raíces es fundamental para su sobrevivencia. Para que se inicie el proceso de colonización y que posteriormente se establezca la *simbiosis micorrícica*, es necesario que los propágulos tales como esporas, fragmentos de micelio libre, micelio dentro de raíces o vesículas, germinen en el suelo (Bolan y Abbot, 1983).

La germinación requiere de ciertas condiciones de humedad y temperatura, y se ha comprobado que, si bien la presencia de un huésped no es un requisito para la germinación, la proximidad con la raíz de un hospedero genera un estímulo que favorece el crecimiento de las nuevas hifas (Hause *et al.*, 2007) (Figura 3.1).

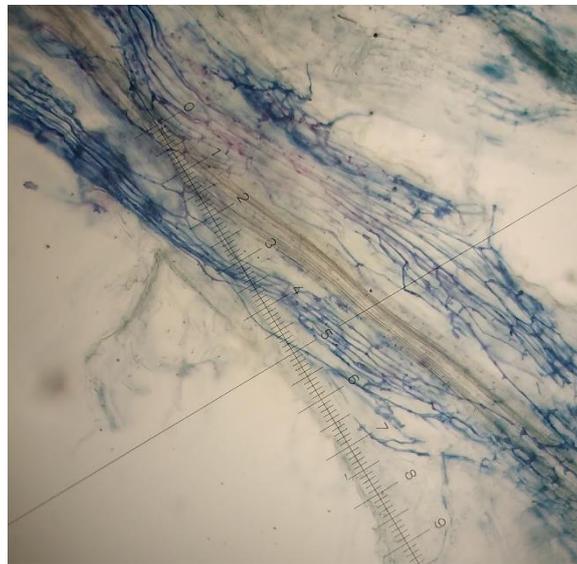
Figura 3.1. Espora de *Funneliformis mosseae* germinando *in vitro*, bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura. (100x).



Diversos compuestos presentes en la rizósfera, como isoflavonoides, quercitina, y flavonas como hepertina, naringenina y apigenina actúan como señales que estimulan el crecimiento de las hifas (Sharma y Johri, 2002). Luego del contacto entre la hifa y la raíz ocurre la formación de un apresorio en el punto de contacto entre ambos, a partir del cual se desarrollan ramificaciones que penetran la epidermis. La formación y ramificación del apresorio requiere señales bioquímicas específicas. Previo al ingreso de las hifas se suceden una serie de modificaciones: remodelación de la pared celular, modificación en las respuestas de defensa de las células y una reestructuración del protoplasto (Genre *et. al.* 2008).

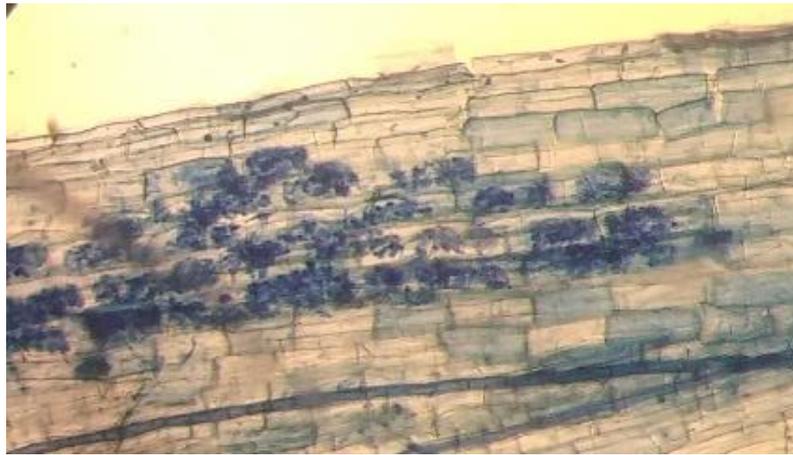
Las hifas crecen y se expanden en la corteza y en determinadas células penetran la pared celular y se dividen profusamente para formar un arbúsculo (Figura 3.2).

Figura 3.2. Hifas del hongo *Rhizophagus intraradices* en el interior de una raíz de tomate (100x).



El arbúsculo se mantiene en contacto íntimo con la membrana celular (sin atravesarla) y constituye la estructura principal de intercambio bidireccional de señales, nutrientes, agua y compuestos orgánicos entre los dos simbioses (Figura 3.3).

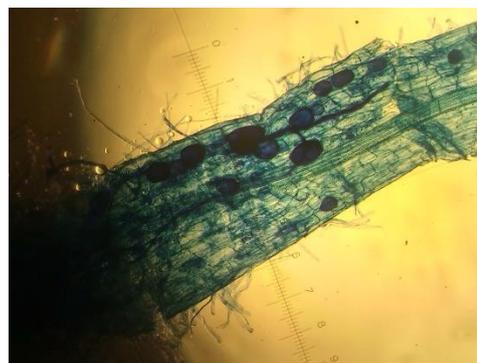
Figura 3.3. Arbúsculos del hongo *Rhizophagus intraradices* en el interior de una raíz de tomate (100x).



Además del crecimiento intraradicular, las hifas se extienden en el suelo varias decenas de centímetros ampliando así la profundidad y extensión de exploración de la raíz. Además, las hifas tienen un diámetro aproximado de 2 μm , que es significativamente más pequeño que el diámetro de los pelos radiculares, pudiendo explorar lugares que para la planta son inaccesibles (Linderman, 1991; Berbara *et al*, 2006).

Las hifas pueden sufrir otro tipo de modificación para dar lugar a la formación de vesículas intercelulares que actúan como reservorio de nutrientes, principalmente lípidos (Bowen, 1987) (Figura 3.4).

Figura 3.4. Vesícula de reserva de *Funneliformis mosseae* en el interior de una raíz de tomate platense (100x).



3.1.3 Beneficios de la simbiosis micorrícica

Los beneficios más conocidos de esta asociación simbiótica entre el hongo y la planta están relacionados a la actuación de las hifas extraradiculares como complemento de la raíz en la absorción de agua y nutrientes. El aumento en el volumen de suelo explorado por las hifas y la mayor tasa de absorción por unidad de superficie coloca a las plantas micorrizadas en ventaja por sobre las no micorrizadas.

Si bien tanto raíces como hifas absorben fósforo de la misma manera, éstas últimas poseen transportadores más eficientes y además pueden transformarlo y acumularlo en forma de polifosfatos. De esta manera actúan como reservorio sin modificar el potencial electroquímico de este elemento. Cuando el elemento es requerido, los complejos de fósforo son hidrolizados por enzimas fosfatasas liberando fósforo en forma iónica por los arbusculos para que las plantas puedan absorberlo (Marschner y Dell, 1994).

Si bien los HMA no son capaces de fijar N_2 atmosférico, aumenta su absorción a través de efectos indirectos, ya que las hifas son capaces de tomar el nitrógeno del suelo en varias formas y transferirlo a las plantas con la mediación de los arbusculos (Siqueira y Franco, 1988). Las plantas micorrizadas absorben los iones amonio (NH_4^+) y por vía del complejo enzimático de la glutamina - sintetasa, lo transforman en glutamina. Además, se ha señalado también la absorción bajo la forma de nitrato (Strullu *et al.*, 1991). Está estudiado, también, que los micronutrientes como zinc, cobre, azufre, boro y molibdeno, son tomados y transportados a través de las hifas hacia las plantas (Bolan *et al.*, 1987).

El micelio externo exuda glicoproteínas hidrofóbicas llamadas glomalinas. Estos compuestos ricos en carbono son altamente estables y provocan aumentos drásticos en la actividad biológica de los suelos y en la estabilización de los agregados (Rillig, 2004; Lovelock *et al.*, 2004). Tanto por el carbono exudado al suelo como el contenido en el gran volumen miceliar los HMA cumplen un importante rol en la dinámica del carbono atmosférico.

Si bien la micorrización no provoca modificaciones visibles en la estructura de la raíz, ocurren modificaciones metabólicas que cambian su relación con el entorno. Se modifica la síntesis de enzimas hidrolíticas, como quitinasa y β -1,3-glucanasa (El-

Khallal, 2007), y de enzimas asociadas a la síntesis de compuestos fenólicos (Guillon *et al.*, 2002).

Lo expuesto sobre la simbiosis micorrícica permite explicar la existencia de innumerables investigaciones interesadas en evaluar cómo plantas de tomate micorrizadas pueden tolerar o superar con mayor facilidad distintas situaciones de estrés: bajas temperaturas, inundación, sequía (Ruscittiet *al.*, 2015); salinidad (Abdel Latef y Chaoxing, 2011); toxicidad de metales pesados (Cavagnaro *et al.*, 2009.); y temperaturas extremas (Morales Guevara *et al.*, 2018). También ha sido documentado el beneficio frente a patógenos fúngicos (Pérez Ortega *et al.*, 2015); bacterianos (Abo-Elyours *et al.*, 2014; Tahat *et al.*, 2012)); insectos masticadores (Song *et al.*, 2013); y nematodos (Garita *et al.*, 2019)

3.2 PRIMER ENSAYO EXPERIMENTAL

3.2.1 Objetivo

Evaluar el efecto de la micorrización de plantas de tomate con HMA del género *Glomus*, sobre la población de *N. aberrans*, y del estrés que el nematodo provoca en las plantas parasitadas, tanto micorrizadas como no micorrizadas.

3.2.2 Materiales y métodos

Se desinfectaron semillas de tomate Cv. Platense mediante inmersión en solución de HOCl al 0,5 % durante un minuto y se sembraron en speedling de 72 celdas utilizando como sustrato una mezcla de perlita-vermiculita 1:1 (v/v), esterilizada en autoclave. Como inóculo se empleó formulación comercial de Aegis Gránulo® (Giten Argentina) (Formulación en microgránulos, conteniendo 100 propágulos.gr⁻¹, pH 6,5-7,5, peso específico 0,65 kg.L⁻¹). Las bandejas fueron mantenidas en condiciones ambientales controladas bajo un fotoperíodo de 12 hs, y temperaturas de 24 ± 4 °C.

Pasados 35 días de la inoculación, se retiraron algunos plantines de la bandeja, se lavaron las raíces y se realizó la tinción de las mismas siguiendo la técnica propuesta por Phillips y Hayman (1970). Fragmentos de raíces teñidas, de aproximadamente 1cm de longitud, se montaron en portaobjetos añadiendo gotas de ácido láctico y se

cubrieron con un cubreobjeto observándose al microscopio óptico. Se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento, cada una de 10 fragmentos de raíz. De cada muestra se observó la presencia de campos negativos (sin presencia de estructuras fúngicas) y positivos (con presencia de estructuras fúngicas). En los campos positivos se tuvo en cuenta el tipo de estructuras (arbusculos, vesículas, hifas) presente dentro de la raíz. El porcentaje de micorrización (M%) se calculó como la proporción de raíces infectadas sobre el número total de fragmentos de raíz observados, siguiendo las recomendaciones de Trouvelot *et al.*, (1986).

Tinción de raíces para observación de hongos micorrícicos (Phillips y Hayman, 1970).

Las raíces se aclararon con KOH al 10% (p/v) (10 min., 100 °C). Luego se lavaron tres veces con agua destilada y se aplicó una solución de HCl 0,1N (5 min. a T° ambiente). Finalmente se tiñeron con azul de tripán (5 min. a 95°C). El colorante tiñe de color azul las estructuras del hongo que contienen quitina, principal componente de las paredes celulares de los HMA. Luego las raíces se conservaron en una solución de lacto-glicerol.

Porcentaje de micorrización o colonización micorrícica (Trouvelot *et al.*, 1986)

Fragmentos de raíces teñidas, de aproximadamente 1cm de longitud, se montaron en portaobjetos añadiendo gotas de ácido láctico y se cubrieron con un cubreobjeto observándose al microscopio óptico. Se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento, analizando 30 fragmentos de raíces cada planta.

De cada muestra se observó la presencia de campos negativos (sin presencia de estructuras fúngicas) y positivos (con presencia de estructuras fúngicas). En los campos positivos se tuvo en cuenta el tipo de estructuras (arbusculos, vesículas, hifas) presente dentro de la raíz. El porcentaje de micorrización (M%) se calculó como la proporción de raíces infectadas sobre el número total de fragmentos de raíz analizados, calculando también el porcentaje de arbusculos (% Ar) y vesículas (%V).

Viabilidad de las estructuras fúngicas (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1990)

La determinación de la viabilidad de las estructuras fúngicas se determinó evaluando la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (% SDH), basada en el

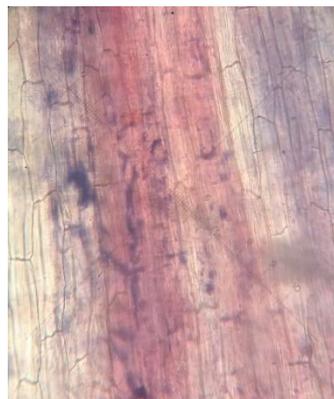
porcentaje de micorrización. Fragmentos de raíces se colocaron durante 18 hs en una solución 0,2 M de Tris-HCL, pH 7; 2,5M de succinato de sodio.6H₂O; 5 mM de MgCl₂ y 4 mg/mL de nitroblue tetrazolium. Pasado ese tiempo, se aclararon con una solución de hidrato de cloral al 75%. Por último se colocaron en una solución de fuccina-ácida al 0,01% en ácido láctico durante 8 min a 90 °C.

Los fragmentos de raíces teñidos con fuccina ácida, se dispusieron en portaobjetos de la misma manera que aquellos teñidos con azul de tripán, y se cuantificó el % de raíces que presentaban actividad observándose las estructuras del hongo coloreadas de azul.

3.2.3 Resultados

La observación al microscopio de los preparados, determinó que los mismos no se encontraban micorrizados. Los plantines inoculados tenían mayor tamaño y mayor verdor (Comprobado por mediciones con SPAD, datos no presentados), pero no había estructuras fúngicas en el interior de las raíces (Figura 3.5).

Figura 3.5. Raíz teñida con azul de Tripan sin presencia de estructuras fúngicas en su interior (100x).



3.2.4 Consideraciones finales del ensayo

En función de lo ocurrido y ante la carencia de inóculos de hongos micorrícicos certificados, se decidió producir el propio inóculo de hongos formadores de micorrizas para la realización de los ensayos. Se describe en la siguiente sección el procedimiento realizado para tales fines.

3.3 PRODUCCIÓN DE INÓCULO MICORRÍCICO

3.3.1 Objetivo

Utilizando cepas aisladas e identificadas de hongos formadores de micorrizas, producir inóculo viable en cantidad suficiente para su uso en los ensayos de esta tesis.

3.3.2 Materiales y métodos

No existe un único protocolo para la multiplicación de hongos formadores de micorrizas. Siguiendo las recomendaciones de algunos autores (Cabello 2008; Sieverding 1989), se diseñó una secuencia de actividades factible de realizar teniendo en cuenta las posibilidades de infraestructura del Instituto de Fisiología Vegetal.

Material de propagación

El material de propagación inicial consistió de esporas de cuatro cepas de hongos formadores de micorrizas conservadas en un sustrato inerte, cedidas por dos instituciones de investigación:

Funneliformis mosseae (T.H. Nicolson & Gerd.)
(Cedida por el Instituto de Botánica C. Spegazzini, FCNyM-UNLP)

Rhizophagus intraradices A2 (N.C. Schenck & G.S. Sm.)
(Cedida por el Banco de *Glomeromycota in vitro*, Universidad de Buenos Aires)

Rhizophagus intraradices A4
(Cedida por el Banco de *Glomeromycota in vitro*, Universidad de Buenos Aires)

Rhizophagus intraradices B1
(Cedida por el Banco de *Glomeromycota in vitro*, Universidad de Buenos Aires)

Como el tamaño del inóculo recibido era heterogéneo y no se contaba con detalles de la composición de los mismos, se procedió a tamizarlos para extraer bajo la lupa 500 esporas de cada una de las cepas (los detalles de la técnica se encuentran en el apéndice). De esta forma se comenzaría la multiplicación partiendo de cantidades homogéneas lo que permitiría comparar los futuros resultados.

Cultivo de “plantas trampa”

Por tratarse de microorganismos biotrofos obligados es necesario utilizar un hospedero o “planta trampa” para su multiplicación. En este caso la especie utilizada fue el trébol blanco, *Trifolium repens* L.

Se preparó un sustrato formado por una mezcla esterilizada en autoclave de perlita-vermiculita 1:1 con el que se llenaron 20 vasos de 500 mL de capacidad. En cada uno de ellos se realizó la siembra de 50 semillas desinfestadas de trébol blanco junto con 100 esporas de la cepa correspondiente. Un aspecto importante durante todo el proceso fue mantener la sanidad de las plantas, ya que la aparición de cualquier problema fitosanitario, podría ser trasladado al cultivo en el que se aplique.

Las plantas fueron mantenidas en una cámara de cultivo con luz artificial y temperatura controlada por aire acondicionado. La provisión de nutrientes se realizó con una solución nutritiva formulada especialmente para favorecer el proceso de inoculación (Cabello, 2008). La formulación está destinada a disminuir los niveles de fósforo y nitrógeno y así estimular la micorrización.

Pasados 60 días, se suspendieron los riegos, a fin de que las plantas pasen por un proceso de estrés hídrico hasta secarse por completo. Luego del secado, la parte aérea de las plantas fue removida y las raíces trituradas. De esta forma quedó constituida una primera mezcla de inóculo formada por el sustrato de los vasos más, las porciones de raíces. Utilizando este inóculo se repitió el procedimiento, utilizando el contenido de los vasos para inocular macetas de mayor tamaño. Se utilizó el mismo sustrato esterilizado en autoclave y las plantas fueron cultivadas de la misma manera.

Luego de 90 días de la siembra se suspendieron los riegos y se dejaron secar las plantas. Una vez secas, se eliminó la parte aérea y se picaron las raíces, quedando conformado el inóculo por una mezcla de sustrato conteniendo hifas, esporas, y trozos de raíces de trébol micorrizadas (Figura 3.6).

Figura 3.6. Cámara de cultivo con luz artificial y temperatura controlada para la multiplicación de hongos micorrícicos arbusculares.



3.3.3 Resultados

Se aplicó la técnica de tamizado y se clasificó la concentración de los mismos según el n° de esporas.g⁻¹. De las cuatro cepas que se multiplicaron, *Rhizophagus intraradices* A4, mostró una menor capacidad de colonización. El porcentaje de micorrización (%M) estuvo por debajo del 40% y en el conteo final de esporas la concentración fue inferior a las 15 esporas.g⁻¹. Por esta razón esta cepa fue descartada. En las restantes cepas, el %M osciló entre el 80 y 90 %, y el número de esporas por gramo entre 48 y 63.

El inóculo obtenido de los distintos hongos se utilizó para repetir el ciclo y continuar con su multiplicación y para la realización del segundo ensayo.

3.4 SEGUNDO ENSAYO EXPERIMENTAL

3.4.1 Objetivos

- Analizar el impacto de la simbiosis micorrícica en el estrés que provoca *N. aberrans* en las plantas de tomate.
- Evaluar el efecto de la micorrización sobre la población de *N. aberrans*.

- Evaluar el efecto del parasitismo de *N. aberrans* sobre los hongos micorrícicos arbusculares.
- Seleccionar entre tres cepas de estos hongos la que presenta mayores beneficios en plantas de tomate parasitadas por *Nacobbus aberrans*.

3.4.2 Materiales y métodos

Material vegetal

Para producir los plantines del ensayo se desinfestaron semillas de tomate platense y fueron sembradas en speedlings de 72 celdas. La mezcla utilizada para completar las celdas estaba formada por:

- 1/3 de perlita
- 1/3 de vermiculita
- 1/3 de inóculo de micorrizas

Fue preparada una bandeja con inóculo del hongo *Funneliformis mosseae* (Fm), otra con *Rhizophagus intraradices* B1 (Ri-B1), otra con *Rhizophagus intraradices* A2 (Ri-A2), y otra con inóculo autoclavado para ser utilizado en el tratamiento control y equiparar las condiciones. La provisión de nutrientes se realizó utilizando una solución nutritiva completa de Hoagland. Pasados 35 días de la siembra se retiraron 5 plantines de tomate de cada bandeja, se lavaron las raíces y se aplicó la técnica descrita por Phillips y Hayman (1970) para teñir las raíces. Luego se montaron preparados con las raíces para confirmar y cuantificar el nivel de micorrización (Trouvelot *et al.*, 1986).

Trasplante

A los 40 días de la siembra y habiendo comprobado la correcta inoculación de las plantas, se procedió a realizar el trasplante a macetas de 10 L, utilizando suelo tinalizado como sustrato. La tinalización se realizó para eliminar el efecto positivo o negativo de cualquier otro microorganismo de suelo y visualizar exclusivamente la acción de las micorrizas frente a *N. aberrans*. Las plantas fueron colocadas en un invernáculo con ventilación forzada para evitar el estrés térmico.

*Inoculación con *N. aberrans**

El día siguiente al trasplante la mitad de las plantas fueron inoculadas con 5000 huevos y Juveniles de *Nacobbus aberrans*, quedando definidos los distintos tratamientos.

- Plantas no micorrizadas (Control) sin *N. aberrans*
- Plantas no micorrizadas (Control) con *N. aberrans*
- Plantas micorrizadas con *Funneliformis moseeae*, sin *N. aberrans*
- Plantas micorrizadas con *Funneliformis moseeae* con *N. aberrans*
- Plantas micorrizadas con *Rhizophagus intraradices* A2 sin *N. aberrans*
- Plantas micorrizadas con *Rhizophagus intraradices* A2 con *N. aberrans*
- Plantas micorrizadas con *Rhizophagus intraradices* B1 sin *N. aberrans*
- Plantas micorrizadas con *Rhizophagus intraradices* B1 con *N. aberrans*

Diseño experimental

El ensayo tuvo un diseño experimental completamente aleatorizado, y los tratamientos un arreglo factorial, siendo dos factores: Micorrización e infestación, con 4 y 2 niveles respectivamente. Cada uno de los 8 tratamientos estuvo formado por 8 plantas, constituyendo cada una de ellas una repetición. Los datos fueron analizados por ANOVA, y el test de comparación de medias se realizó por el test de LSD de Fisher utilizando el programa SISVAR. Para el análisis estadístico de variables cuyos resultados estaban expresados en porcentaje, estos fueron transformados previamente por la función arcoseno.

Variables analizadas

Entre los 80 y 90 días se procedió a realizar determinaciones fisiológicas con las plantas en pie: Fotosíntesis neta (IRGA: modelo CIRAS-2®, PP Systems), Conductancia estomática y las mediciones del diámetro de tallo.

A los 100 días se tomaron las muestras de tejido aéreo para luego descalzar las plantas y tomar las muestras de raíces y suelo. Se colectó material para realizar las siguientes determinaciones:

- Peso fresco radicular y peso seco aéreo

- Clorofila total (Wellburn, 1994)
- Proteínas solubles en tejido foliar y radicular (Bradford, 1976).
- Número de huevos alojados en las raíces (Hussey y Barker, 1973; Coolen, 1979) y número de formas móviles en suelo (Coolen, 1979).
- Población final del nematodo: Huevos alojados en la raíz + Vermiformes en suelo y Factor de reproducción: Población Final/Población inicial (Oostenbrink, 1966).
- Contenido de malonildialdehído (MDA) en tejido foliar y radicular (Heath y Packer, 1968)
- Contenido de prolina en tejido foliar y radicular (Bates *et al.*, 1973)
- Contenido de fenoles totales en tejido foliar y radicular (Singleton y Rossi, 1965)
- Conductividad relativa de tejido foliar y radicular (Lutts *et al.* 1996)
- Porcentaje de micorrización (Phillips y Hayman, 1970).
- Viabilidad de las estructuras fúngicas (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1990)

3.4.3 Resultados y discusión

Para facilitar el análisis de los resultados, éstos fueron organizados en 4 grupos: variables que describen lo ocurrido con los HMA; indicadores que analizan la población del nematodo; parámetros de crecimiento y desempeño fisiológico e indicadores de estrés en las plantas.

Primeramente, se presentan los resultados relacionados a los HMA y la población de *N. aberrans*, ya que éstos son los factores principales que podrían afectar al resto de las variables. Es decir, sería erróneo analizar y sacar conclusiones de lo ocurrido con el crecimiento y el estrés de las plantas sin verificar y evaluar previamente la micorrización y el parasitismo.

Comportamiento de los hongos formadores de micorrizas arbusculares

La tinción de raíces y la cuantificación del porcentaje de micorrización realizadas previo al trasplante, confirmaron que la inoculación fue efectiva para las tres cepas utilizadas. El % de micorrización fue de 85%, 76% y 72 % para Fm, Ri-B1 y Ri-A2, respectivamente.

La tinción de muestras de raíces al finalizar el ensayo, indicó que el parasitismo

de *N. aberrans* provocó en Ri-A2 una reducción promedio de 19 puntos en el porcentaje de micorrización. A su vez, comparando los distintos HMA en presencia del nematodo, Ri-A2 fue la cepa que presentó la menor micorrización (Tabla 3.1.a).

En cuanto a la viabilidad de las estructuras fúngicas Ri-A2 y Fm mantuvieron valores sin diferencias significativas en presencia y ausencia del nematodo, mientras que Ri-B1 tuvo una reducción de 17,8 puntos que representa un 44,4% cuando el nematodo estuvo presente. En los tratamientos parasitados, Ri-B1 fue la cepa que presentó valores significativamente más bajos de viabilidad fúngica (Tabla 3.1.b).

Tabla: 3.1 a) Porcentaje de micorrización y b) viabilidad de las estructuras fúngicas de tres hongos formadores de micorriza en plantas de tomate cultivadas en presencia y ausencia de *Nacobbus aberrans*.

a)			b)		
Trat.	Sin <i>N. aberrans</i>	Con <i>N. aberrans</i>	Trat.	Sin <i>N. aberrans</i>	Con <i>N. aberrans</i>
Control	0± 0 Ab	0± Ac	Control	0 ±0 Ac	0 ± 0 Ac
Ri-A2	49,79 ± 5,9 Aa	30,27 ± 9,1 Bb	Ri-A2	31,18 ± 8,2 Aa	37,8 ± 12,6 Aa
Ri-B1	45,63± 9,2 Aa	55,78 ± 8,8 Aa	Ri-B1	40,16 ± 7,7 A ab	22,3 ± 10,02 Bb
Fm	62,95 ± 14,3 Aa	46,71± 5,4 Aa	Fm	43,16 ±6,7 Ab	43,7 ± 5,73 Aa

Letras mayúsculas en la línea comparan una misma condición micorrízica en ausencia y presencia del nematodo.

Letras minúsculas en la columna comparan los distintos HMA bajo la misma condición nematológica.

Medias acompañadas por letras distintas, indica diferencias significativas según el test de LSD de Fisher ($p \leq 0,05$)

La mayoría de las investigaciones que involucran HMA y nematodos parásitos de plantas ponen el foco en control del parásito, sin estudiar en detalle lo que ocurre con los hongos. Algunos trabajos han documentado que el porcentaje de micorrización se ve afectado y hay algunas hipótesis al respecto, pero la forma de demostrarlo aún es limitada. Jung *et al.* (2012) y Vos *et al.*, (2014) sugieren que los fotoasimilados son un recurso escaso y existe una competencia por ellos entre ambas poblaciones, que repercute en el desarrollo óptimo de ambos. Como fue documentado en el capítulo anterior mediante cortes histológicos, y en este capítulo con la tinción de raíces, los sincitos de *N. aberrans* y los arbusculos de los HMA se desarrollan en el periciclo radicular por lo que es posible que exista una competición por el espacio físico además de lo hipotetizado respecto de los fotoasimilados.

La simbiosis micorrícica es una interacción dinámica entre el hongo y la planta que sufre alteraciones por la influencia de diversos factores. En un test donde se comparan cepas, el test de la viabilidad es de suma importancia, ya que la técnica de tinción con azul de Tripán no diferencia entre estructuras activas y no activas. En ensayos donde se han realizado co-inoculaciones de micorrizas y nematodos agalladores se observa que no todas las cepas se ven afectadas de la misma manera e incluso algunas parecieran verse estimuladas por la presencia del nematodo (Pinochet *et al.*, 1998; Cofcewicz *et al.*, 2001).

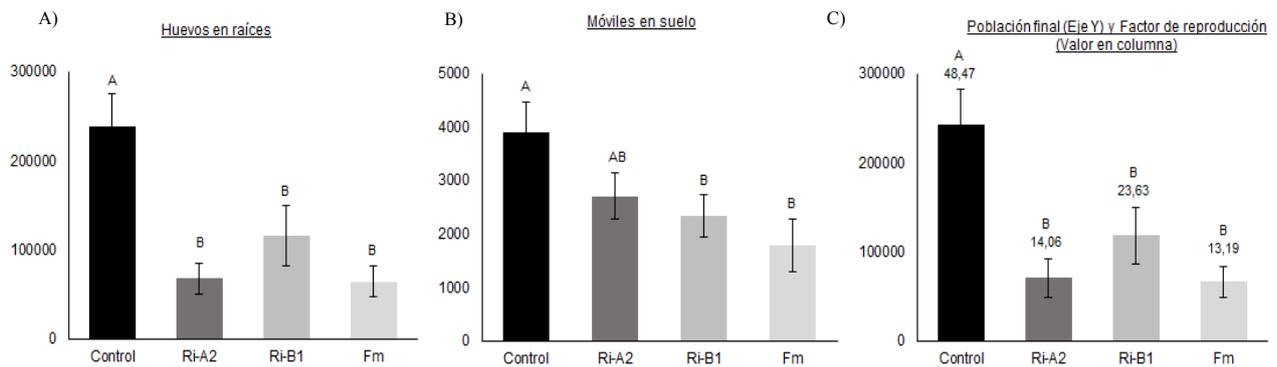
Variables vinculadas a la población de N. aberrans

Al finalizar el ensayo y lavarse las raíces, se observó la presencia de agallas en los tratamientos inoculados con el nematodo confirmando la efectividad de la inoculación. Utilizando la escala de agallamiento propuesta por Bridge y Page (1980) el tratamiento control (sin micorrizas) presentaba un nivel 5 de agallamiento y los tratamientos micorrizados un nivel 4.

La cuantificación de huevos alojados en las raíces indicó que la micorrización provocó una reducción significativa de los mismos, no habiendo diferencias significativas entre las 3 cepas de hongos (Figura 3.7.a).

En el conteo de las formas móviles extraídas de 100 mL de suelo el tratamiento no micorrizado presentó el mayor número de individuos (Figura 3.7 b). La micorrización provocó reducciones entre el 45% y 74% respecto del testigo sin inocular. Si bien los valores poblacionales de nematodos registrados en los tratamientos Ri-A2 y Fm son menores que los de Ri-B1, tales diferencias no fueron significativas ($p \geq 0.05$) (Figura 3.7 c).

Figura 3.7. Número de huevos en raíces, número de formas móviles extraídas del suelo, población final y factor de reproducción de plantas de tomate platense inoculadas con tres hongos micorrícicos arbusculares.



Ri-A2: *Rhizophagus intraradices* A2; Ri-B1: *Rhizophagus intraradices* B1; Fm: *Funneliformis mosseae*
Medias acompañadas por letras distintas, indica diferencias significativas según el test de LSD de Fisher ($p \leq 0,05$).

Los resultados no permiten diferenciar si la reducción en la población del nematodo se debe a un efecto del HMA sobre los nematodos que se encuentran en el suelo; a un efecto protector en la raíz; o una reducción en el número de huevos por masa, pero sí permiten confirmar un efecto antagonista de estas cepas sobre *N. aberrans*.

Para este ensayo podemos descartar al menos, una de las explicaciones sugeridas por Barea *et al.* (2002) que incluyen la posibilidad de que el efecto protector provenga del desarrollo de microorganismos antagonistas que crezcan estimulados por las hifas en la rizósfera, ya que el sustrato utilizado en el ensayo fue previamente esterilizado por tinalización.

Entre las posibles justificaciones de porque las plantas micorrizadas provocan una disminución en la población de nematodos fitoparasitos se pueden considerar:

- Una *mejora del estado nutricional de la planta huésped*. La asociación de micorrizas permite una mayor absorción de nutrientes tales como P, N, K, Ca, Mg, Fe y Mn lo que resulta en plantas más vigorosas y más tolerantes a patógenos (Gianinazzi *et al.*, 2010).
- *Cambios en el sistema radicular*: después de la colonización, el hongo micorrícico provoca cambios morfológicos y fisiológicos en la raíz, que

dificultan la entrada de otros microorganismos o en el caso de nematodos endoparásitos, se forman sincitios de menor número de células (Fassuliotis, 1970; Pozo *et al.*, 2013).

- *Modificaciones en los exudados radiculares:* El establecimiento de la simbiosis genera cambios cualitativos y cuantitativos en los exudados de las raíces. Esto da lugar a la aparición de sustancias que ejercen un efecto directo sobre microorganismos perjudiciales o bien, alteran la señalización planta / patógeno, disminuyendo el ingreso de juveniles a la raíz. (Sikora y Fernández, 2005).
- *Síntesis de compuestos:* La micorriza puede estimular la producción de sustancias que intervienen en el sistema de defensa de la planta, tales como fitoalexinas, compuestos fenólicos, enzimas (peroxidasas, beta-glucanasas, amonioliasas fenilalanina, quitinasas, polifenol oxidasas) y otras proteínas (Solorzano *et al.*, 2001; Vos *et al.*, 2012).
- *Control biológico clásico:* algunos hongos micorrícicos se comportan en ciertas circunstancias como parásitos débiles de los huevos de algunos nematodos (Francl y Dropkin, 1985; Tribe, 1977) y este fenómeno podría estar contribuyendo en cierta medida a explicar el mecanismo de inhibición.

Parámetros vinculados al crecimiento y la fisiología de las plantas

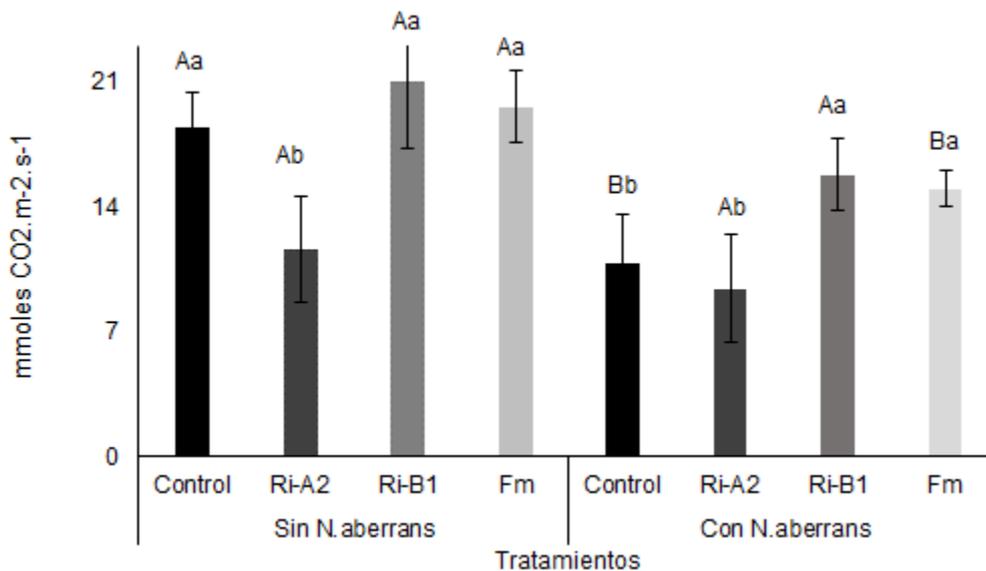
Previo a la conclusión del ensayo, con las plantas aún en pie, se procedió a medir la conductancia estomática (CEs) y la fotosíntesis neta (FN). El análisis de la varianza de la CEs no mostró una interacción significativa entre los factores micorrización e infestación con el nematodo ($p=0,32$), sin embargo, hubo diferencias significativas entre los niveles de estos factores principales. El intercambio gaseoso de las plantas inoculadas con Ri-B1 y Fm fue mayor que el de las plantas control y las inoculadas con Ri-A2. Las plantas parasitadas por *N. aberrans* tuvieron una CEs menor que las plantas no parasitadas (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Conductancia estomática de plantas de tomate platense: a) inoculadas con distintos hongos micorrícicos arbusculares, b) inoculadas y no inoculadas con *Nacobbus aberrans*

Tratamiento	Medias	Tratamiento	Medias
Control	90.4 ± 17,9 b	Sin <i>N.aberrans</i>	116,0 ± 23,8 a
Ri-A2	92.3 ± 16,2 b	Con <i>N.aberrans</i>	92,4 ± 16,6 b
Fm	113.2 ± 13,2 a		
Ri-B1	120.9 ± 29,2 a		

Ri-A2: *Rhizophagus intraradices* A2; Ri-B1: *Rhizophagus intraradices* B1; Fm: *Funneliformis moseeae*
Medias acompañadas por letras distintas, indica diferencias significativas según el test LSD de Fisher ($p \leq 0,05$)

En ausencia del nematodo la FN más baja se registró en Ri-A2. Comparando plantas parasitadas y no parasitadas, las plantas control tuvieron una reducción significativa en la fijación de CO₂; Ri-A2 y Ri-B1, no manifestaron cambios y, Fm si bien tuvo una reducción mantuvo valores significativamente superiores al testigo sin micorrizar (Figura 3.8).

Figura 3.8. Fotosíntesis neta en plantas de tomate platense micorrizadas con 3 hongos micorrícicos arbusculares, en presencia y ausencia de *Nacobbus aberrans*.

Ri-A2: *Rhizophagus intraradices* A2; Ri-B1: *Rhizophagus intraradices* B1; Fm: *Funneliformis moseeae*
Letras mayúsculas comparan una misma condición micorrícica en ausencia y presencia del nematodo.
Letras minúsculas comparan las distintas micorrizas dentro de la misma condición nematológica.
Medias acompañadas por letras distintas, indica diferencias significativas según el test LSD de Fisher ($p \leq 0,05$)

Algunos parámetros vinculados al crecimiento tales como el peso seco aéreo y el diámetro de los tallos en la parte media de las plantas no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. En el caso del peso fresco radicular en ausencia del nematodo las plantas micorrizadas con Ri-A2 tuvieron un peso menor al resto de los tratamientos, pero en presencia del nematodo el peso se mantuvo sin verse afectado. En las plantas control el ataque del nematodo redujo el PF radicular (Tabla 3.3).

Una tendencia similar al peso radicular presentó la concentración de clorofila total en las hojas, donde Ri-A2 tuvo el valor más bajo en ausencia del nematodo, pero consiguió mantenerlo estable en el tratamiento parasitado. Comparando plantas parasitadas y no parasitadas, las plantas control y Fm tuvieron una reducción en el contenido de clorofila consecuencia del parasitismo, mientras que las plantas Ri-B1 no presentaron diferencias significativas (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Parámetros vinculados al crecimiento de plantas de tomate platense micorrizadas con 3 hongos formadores de micorriza, en presencia y ausencia de *Nacobbus aberrans*.

	Sin <i>Nacobbus aberrans</i>				Con <i>Nacobbus aberrans</i>			
	Control	Ri-A2	Ri-B1	Fm	Control	Ri-A2	Ri-B1	Fm
Peso fresco radicular (g)	163,7 A a	132,2 A ab	135,2 A ab	111 A b	130,7 B a	108,2 A a	143,8 A a	124,7 A a
Peso seco aéreo (g)	60,04 A a	58,18 A a	62,02 A a	57,16 A a	60,58 A a	61,3 A a	62,0 A a	58,44 A a
Clorofila Total ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	10,28 A a	7,23 A b	9,93 A a	11,9 A a	7,3 B b	7,42 Ab	10,1 Aa	10,2 B a
Diámetro del tallo (cm)	1,2 A a	1,2 A a	1,16 Aa	1,21 A a	1,06 A a	1,1 A a	1,19 A a	1,1 A a

Ri-A2: *Rhizophagus intraradices* A2; Ri-B1: *Rhizophagus intraradices* B1; Fm: *Funnelformis moseeae*

Letras mayúsculas comparan una misma condición micorrícica en ausencia y presencia del nematodo.

Letras minúsculas comparan las distintas micorrizas dentro de la misma condición nematológica.

Medias acompañadas por letras distintas, indica diferencias significativas según el test LSD de Fisher ($p \leq 0,05$)

En ausencia del nematodo, no se observaron ventajas en el crecimiento y en los procesos fisiológicos de las plantas micorrizadas por sobre las no micorrizadas. El PF radicular de los tres tratamientos micorrizados fue menor que el de los controles. Es sabido que la proliferación de hifas cumpliendo funciones de absorción, hizo que las plantas destinen menos recursos al crecimiento radicular (Pereira *et al.*, 2001).

En presencia del nematodo, se observa para las plantas control una reducción en la FN, en la clorofila total y en el PF radicular; mermas que no ocurren en las plantas

micorrizadas. Comparando las 3 cepas de micorriza, RI-A2 presentó valores de FN, y clorofila total significativamente más bajos que RI-B1 y Fm.

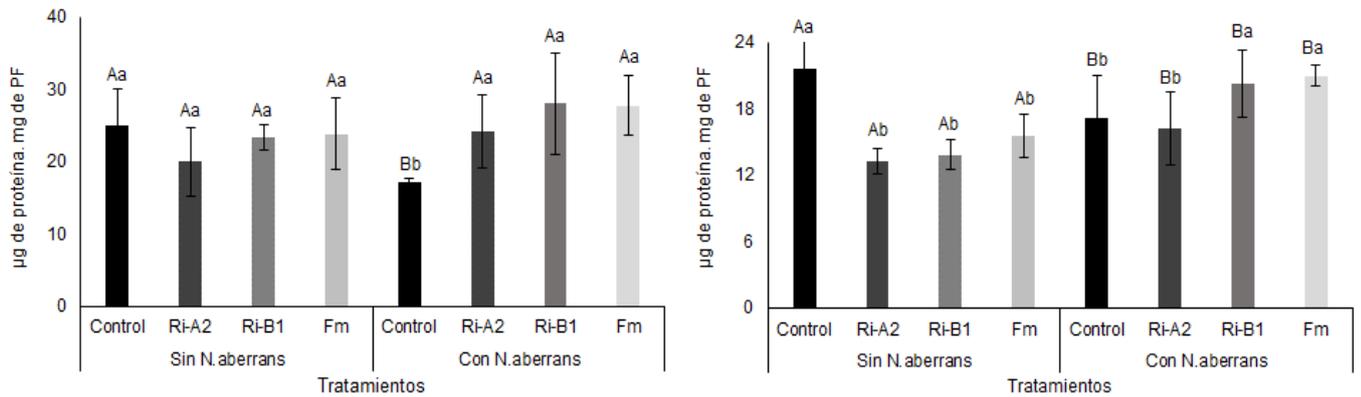
En condiciones controladas, en ausencia de factores de estrés, la micorrización puede no presentar beneficios productivos cuantificables. El hongo micorrícico puede convertirse en un destino importante de fotoasimilados que provoca en la planta una reducción del crecimiento. Por otro lado, el crecimiento extenso de las hifas en el sustrato que es uno de los principales beneficios que el hongo le otorga a la planta pudo verse impedido por tratarse de un ensayo en maceta

La simbiosis micorrícica, además de realizar aportes significativos al hospedero, cumple importantes funciones ecológicas. El carbono suministrado por la planta al HMA no es exclusivamente para su consumo, sino que a través de las hifas se establece un flujo de carbono desde la atmósfera al suelo que provoca aumentos significativos en la actividad biológica (Finlay y Söderström, 1992). No todas las cepas manifiestan la misma eficiencia para realizar esta tarea. Podría esperarse que para casos donde lo que se busca es remediar un suelo degradado o contaminado este tipo de cepas serían las más beneficiosas, no así en trabajos donde la prioridad está puesta en la productividad del hospedero.

El contenido de proteínas solubles en el tejido foliar de las plantas micorrizadas osciló entre los 19,9 y 28,03 μg de proteína. mg^{-1} del PF, tanto en ausencia como en presencia del nematodo, sin que hubiera diferencias significativas entre las distintas cepas. Las plantas del tratamiento control + *N. aberrans* tuvieron un contenido de proteínas significativamente menor que los controles sin nematodo, y menor que los micorrizados con nematodo (Figura 3.9 a).

Las proteínas solubles del tejido radicular, presentaron un comportamiento diferente. En ausencia del nematodo las plantas micorrizadas tuvieron una reducción significativa respecto del tratamiento control. En presencia del nematodo las plantas micorrizadas con Ri-B1 y Fm incrementaron significativamente el contenido de proteínas, en comparación con el control y con las plantas micorrizadas con Ri-A2. En los tratamientos controles sin micorrizar el parasitismo provocó una reducción significativa del parámetro (Figura 3.9 b).

Figura 3.9. Contenido de proteínas solubles en a) tejido foliar y b) tejido radicular de plantas de tomate platense micorrizadas con 3 hongos micorrícicos arbusculares, en presencia y ausencia de *Nacobbus aberrans*.



Ri-A2: *Rhizophagus intraradices* A2; Ri-B1: *Rhizophagus intraradices* B1; Fm: *Funneliformis moseeae*

Letras mayúsculas comparan una misma condición micorrícica en ausencia y presencia del nematodo.

Letras minúsculas comparan las distintas micorrizas dentro de la misma condición nematológica.

Columnas acompañadas por letras diferentes indican diferencias significativas en el test de LSD de Fisher ($p \leq 0,05$).

El contenido de proteínas en el tejido aéreo refleja lo observado en otros parámetros de crecimiento. Las plantas control se ven afectadas por el nematodo y las plantas micorrizadas en mayor o menor medida consiguen atenuar el impacto negativo del parasitismo. En el caso de la raíz los resultados no son tan claros y otro tipo de estudios deberían realizarse para conocer cómo se modifica el patrón de proteínas en cada caso. Las modificaciones que ocurren en la raíz por la presencia de un simbiote, requieren de cambios importantes en las membranas plasmáticas y vacuolares que alteran la expresión de genes que codifican proteínas (Krajinski, *et al.*, 2000). Resta por estudiar con mayor profundidad, como se modifica el metabolismo proteico de la raíz ante la presencia de un simbiote y un patógeno.

Indicadores de estrés en plantas

En ausencia de *N. aberrans* el contenido de fenoles de las raíces micorrizadas fue significativamente mayor que el de las no micorrizadas. En presencia del nematodo el contenido de fenoles de las raíces micorrizadas se mantuvo sin diferencias, mientras que en las plantas control hubo un incremento significativo (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Contenido de fenoles totales expresado en $\mu\text{g.mg}$ de peso fresco, de tejido radicular de plantas de tomate micorrizadas con 3 hongos micorrícicos arbusculares, en presencia y ausencia de *Nacobbus aberrans*.

Tratamientos	Sin	Con
	<i>N. aberrans</i>	<i>N. aberrans</i>
Control	3,41 \pm 1,3 Bc	5,42 \pm 0,68 Aa
Ri-A2	5,74 \pm 0,46 Aa	4,90 \pm 1,2 Aa
Ri-B1	5,27 \pm 0,58 Aab	4,78 \pm 0,28 Aa
Fm	4,75 \pm 0,37 Ab	5,27 \pm 0,34 Aa

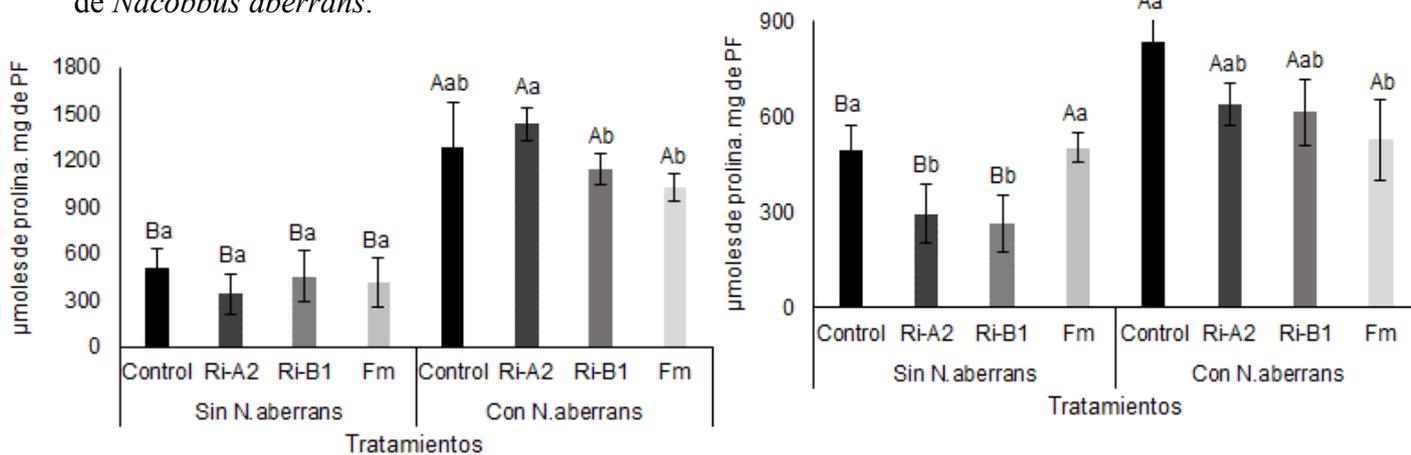
Letras mayúsculas en la línea comparan una misma condición micorrícica en ausencia y presencia del nematodo.

Letras minúsculas en la columna comparan los distintos HMA bajo la misma condición nematológica.

Medias acompañadas por letras distintas, indica diferencias significativas según el test de LSD de Fisher ($p \leq 0,05$)

La concentración de prolina en hojas se incrementó en todos los tratamientos parasitados en comparación a los no parasitados (Figura 3.5a). El mismo incremento se observó en las raíces control, RI-A2 y RI-B1, no así en las inoculadas con Fm donde la presencia del nematodo no provocó modificaciones en los niveles de prolina. En presencia del nematodo, todos los tratamientos micorrizados tuvieron niveles de prolina inferiores al del control (Figura 3.5.b).

Figura 3.10. Concentración de prolina en a) tejido foliar b) tejido radicular de plantas de tomate micorrizadas con 3 hongos micorrícicos arbusculares, en presencia y ausencia de *Nacobbus aberrans*.



Letras mayúsculas comparan una misma condición micorrícica en ausencia y presencia del nematodo.

Letras minúsculas comparan las distintas micorrizas dentro de la misma condición nematológica.

Columnas acompañadas por letras distintas, indica diferencias significativas según el test de LSD de Fisher ($p \leq 0,05$)

El contenido de MDA y la CR de las hojas no se modificó por el parasitismo del nematodo. Tanto en ausencia como en presencia del nematodo las hojas de Ri-A2 presentaron valores más altos que el control (Tabla 3.5).

En el tejido radicular, *N. aberrans* provocó en las plantas no micorrizadas un aumento en el contenido de MDA y en el % CR. No así en las plantas micorrizadas, cuyos valores no se vieron alterados, indicando una mejor condición de las membranas celulares. Comparando los distintos HMA con el control, en presencia del nematodo, es Fm quien presenta el mejor desempeño para estas variables.

Tabla 3.5 Contenido de malonildialdehido y conductividad relativa de tejidos, foliar y radicular, de plantas de tomate micorrizadas con 3 hongos micorrícicos arbusculares, en presencia y ausencia de *Nacobbus aberrans*.

	CV	Sin <i>Nacobbus aberrans</i>				Con <i>Nacobbus aberrans</i>			
		Control	Ri-A2	Ri-B1	Fm	Control	Ri-A2	Ri-B1	Fm
MDA foliar (nmoles.gr PF ⁻¹)	22 %	7,75 Ab	11,94 Aa	10,4 Aab	8,46 Ab	7,24 Ab	11,4 Aa	9,26 Aab	9,45 Aab
MDA radicular (nmoles.gr PF ⁻¹)	15,1%	2,01 Ba	2,36 Aa	2,20 Aa	2,22 Aa	3,05 Aa	2,31 Ab	2,06 Ab	2,21 Ab
CR foliar (%)	23 %	16,98 Aa	16,22 Aa	19,57 Aa	18,10 Aa	19,14 Aa	14,85 Aa	19,14 Aa	21,19 Aa
CR Radicular (%)	26,3 %	23,77 Ba	20,35 Aa	22,88 Aa	23,71 Aa	32,01 Aa	25,33 Aab	27,49 Aab	23,22 Ab

Letras mayúsculas en la línea comparan una misma condición micorrícica en ausencia y presencia del nematodo.

Letras minúsculas en la columna comparan los distintos HMA bajo la misma condición nematológica.

Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de comparación de medias LSD de Fisher ($p \leq 0,05$)

El parasitismo de *N. aberrans* provoca daño en las membranas y desórdenes en la provisión de agua y nutrientes que desencadenan principalmente un estrés hídrico y nutricional. En esta sección, se observa como la simbiosis micorrícica actúa atenuando al menos parcialmente, tales daños.

En este trabajo, la micorrización provocó un aumento significativo en el contenido de compuestos fenólicos del tejido radicular, hecho que también fue documentado por otros autores (Soares *et al.*, 2005). La funcionalidad de los compuestos fenólicos en la defensa vegetal es amplia y muchas veces difícil de determinar. Algunos compuestos como el ácido clorogénico y los ácidos hidroxycinámicos pueden ser, en sí mismos, tóxicos para los patógenos; otros pueden convertirse rápidamente en especies reactivas de oxígeno que actúan en respuesta al ataque (Hartleb *et al.*, 1997). El mayor contenido de fenoles de las raíces micorrizadas en ausencia del nematodo sugiere algún tipo de inducción de resistencia o priming. Esto no se puede afirmar, ya que para poder hacerlo es necesario comprobar que alguna ruta

metabólica, vinculada a la defensa vegetal, ha sido estimulada o que algún grupo de genes se está sobreexpresando (Madriz Ordeñana, 2002).

La exploración del sustrato por parte de las hifas facilitando la absorción de agua, explica los menores niveles de prolina en situaciones donde como consecuencia del parasitismo la funcionalidad de la raíz se ve afectada. Además, algunos autores indican que la micorrización estimula en la raíz la expresión de genes que codifican acuaporinas (proteínas de membrana que participan en la absorción de agua) (Ruiz-Sánchez *et al.*, 2011).

El menor daño en las membranas de las plantas micorrizadas puede deberse a que en estas el ataque del nematodo fue menor, o bien a una mayor actividad antioxidante. Varios autores coinciden que la micorrización estimula la actividad de algunas enzimas como superóxido dismutasa, peroxidasa y catalasa (Lambais *et al.*, 2003). Borde *et al.* (2011) sugiere también que la simbiosis estimula la producción de enzimas antioxidantes que permiten a las plantas una mayor habilidad para responder y neutralizar moléculas reactivas de oxígeno.

3.5 CONSIDERACIONES FINALES

La asociación micorrícica resulta beneficiosa en condiciones donde los fotoasimilados “invertidos” son utilizados para revertir o compensar alguna situación de estrés. Los cultivos, a diferencia de las condiciones dadas en este ensayo, se encuentran continuamente expuestos a diversas situaciones adversas, de distinta magnitud. La posibilidad de que la micorriza se convierta un simbiote que no compense “los costos con sus beneficios es poco probable”

Cuando *N. aberrans* y los hongos micorrícicos arbusculares se encuentran conviviendo en el mismo huésped existe entre ellos una interacción, ya sea de forma directa o indirecta, que provoca modificaciones en sus respectivas poblaciones. Las tres cepas aquí utilizadas consiguieron reducir la población de *N. aberrans* en las plantas de tomate. Sin embargo, analizando los resultados del crecimiento y la sobrevivencia fúngica, del crecimiento de las plantas y la atenuación del estrés que provoca el nematodo, es *Funneliformis moseeae* la cepa que mostró un mejor desempeño.

El inóculo de las micorrizas arbusculares que se elaboró para la realización de este trabajo no presenta dificultades para su manejo, conservación y aplicación en las plantas. De acuerdo a los resultados obtenidos es recomendable que la inoculación se realice a la siembra para que la simbiosis se establezca de forma temprana, previo a que las plantas se expongan a las situaciones de estrés. El uso de esta tecnología no implica modificaciones significativas en las tareas habituales del productor, quien preparando plantines colonizados previos al trasplante se anticiparía en tiempo al nematodo mejorando su competencia.

3.6 REFERENCIAS

Abdel Latef, A. A. H.; Chaoxing, H. 2011. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Scientia Horticulturae*, v. 127, n. 3, p. 228–233.

Abo-Elyousr, K. A.; Seleim, M. A.; Abd-El-Moneem, K. M.; Saeed, F. A. 2014. Integrated effect of *Glomus mosseae* and selected plant oils on the control of bacterial wilt disease of tomato. *Crop Protection*, v. 66, p. 67-71.

Barea, J. M. 1990. Micorrizas vesículo arbusculares. En: *Microbiología*. Univ. de Sevilla, p. 271-278.

Barea, J. M.; Azcón, R.; Azcón-Aguilar, C. 2002. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 81, n. 2, p. 343-351.

Barea, J. M.; Pozo, M. J.; Azcón-Aguilar, C. 2016. Significado y aplicación de las micorrizas en Agricultura. *Agricultura*, p. 746-751.

Bates, L.S.; Waldren, R. P.; Tease, I.D. 1973. Rapid determination of the proline for stress studies. *Plant Soil*, v. 85, p.107-129.

Berbara, R. L. L.; Souza, F. A.; Fonseca, H. 2006. Fungos Micorrízicos Arbusculares: Muito Além da Nutrição. En: Fernandes, M. S. Ed.- *Nutrição Mineral de Plantas*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 432 p.

Bolan, N. S.; Abbott, L. K. 1983. Seasonal Variation in Infectivity of Vesicular Arbuscular Micorrhizal Fungi in Relation to Plant Response to Applied Phosphorus. *Australian Journal of Soil Research*.. v. 21, n. 2, p. 207-210.

Bolan, N. S.; Robson, A. D.; Barrow, N. J. 1987. Effects of VAM on the availability of iron phosphates to plants. *Plant Soil*, v. 22, p. 401-410.

Borde, M.; Duhrane, M.; Jite, P. 2011. Growth photosynthetic activity and antioxidant responses of mycorrhizal and nonmycorrhizal bajra (*Pennisetum glaucum*) crop under salinity stress condition. *Crop Protection*, v. 30, p. 265-271.

Bowen, G. D. 1987. *The Biology and Physiology of Infection and its Development*. En: Safir, G. R. (Ed.). *Ecophysiology of V- A Mycorrhizal Plants*. CRC. Press Inc., Boca raton, Florida, USA, 224 p.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254.

Bridge, J.; Page, S. 1980. Estimation of Root-Knot Nematode Infestation Levels on Roots Using a Rating Chart. *International Journal of Pest Management*, v. 26, p. 296-298.

Cabello, M. 2008. *Curso de hongos formadores de micorrizas arbusculares*. Instituto Spegazzini, Univ. Nac. de La Plata, Argentina.

Cavagnaro, T. R.; Dickson, S.; Smith, F. A. 2009. Arbuscular mycorrhizas modify plant responses to soil zinc addition. *Plant and Soil*, v. 329, n. 1-2, p. 307–313.

Cofcewicz, E. T.; Medeiros, C. A.; Carneiro, R. M.; Pierobom, C. R. 2001. Interação dos fungos micorrízicos arbusculares *Glomus etunicatum* e *Gigaspora margarita* e o nematóide das galhas *Meloidogyne javanica* em tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, n.1, p. 65-70.

Coolen, W. A. 1979. Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. and other nematodes from roots and soil. En: Lamberti, F.; Taylor, C. E. *Root knot nematodes (Meloidogyne species) systematics, biology and control*. London: Academic Press, p. 317-329.

El-Khallal, S.M. 2007. Induction and modulation of resistance in tomato plants against *Fusarium* wilt disease by bioagent fungi (arbuscular mycorrhiza) and/or hormonal elicitors (jasmonic acid and salicylic acid): 2-changes in the antioxidant enzymes, phenolic compounds and pathogen related-proteins. *Australian Journal of Basic Applied Science*, v. 1, n. 4, p. 717-732.

Fassuliotis, G. 1970. Resistance in *Cucumis spp.* to rootknot nematode *Meloidogyne incognita* acrita. *Journal of Nematology.*, v 2, p. 174.

Finlay, R.; Söderström, B. 1992. Mycorrhiza and carbon flow to the soil. En: Allen, M. F. *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process*. Chapman & Hall, New York, p. 134–160.

Francl, L. J.; Dropkin, V. H. 1985. *Glomus fasciculatum*, a weak pathogen of *Heterodera glycines*. Journal of Nematology, v. 17, p. 470–475.

Garita, S.; Bernardo, V.; De Almeida Guimaraes, M.; Arango, M.C.; Ruscitti, M. 2019. Micorrização e enxertia melhoram o crescimento de tomateiro e diminuem a população de *Nacobbus aberrans*. Revista Ciência Agronômica, v. 50, n. 4, p. 609-615.

Genre, A.; Chabaud, M.; Faccio, A.; Barker, D. G.; Bonfante, P. 2008. Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. Plant Cell, v. 20, n. 5, p.1407-1420.

Gianinazzi, S.; Gollotte, A.; Binet, M.; van Tuinen, D.; Redecker, D.; Wipf, D. 2010. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. Mycorrhiza, v. 20, n. 8, p. 519-530.

Guillon, C.; St-Arnaud, M.; Hamel, C.; Jabaji-Hare S. 2002. Differential and systemic alteration of defence-related gene transcript levels in mycorrhizal bean plants infected with *Rhizoctonia solani*. Canadian Journal of Botany, v. 80, n. 3, p. 305-315.

Hartleb, H.; Heitefuss, R.; Hoppe, H. 1997. Resistance of crop plants against fungi. Stuttgart: G. Fischer, 544 p.

Hause, B.; Mrosk, C.; Isayenkov, S.; Strack, D. 2007. Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. Phytochemistry, v. 68, p. 101-110.

Heath, R. L.; Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives in Biochemistry and Biophysics, v. 125, p. 189-198.

Hussey, R. S.; Barker, K. R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease Report, v. 57, p. 1025-1028.

Jung, S. C.; Martinez-Medina, A.; Lopez-Raez, J.A.; Pozo, M. J. 2012. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. Journal of Chemical Ecology. v. 38, n. 6, p. 651-664.

Krajinski, F.; Biela, A.; Schubert, D.; Gianinazzi-Pearson, V.; Kaldenhoff, R.; Franken P. 2000. Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of *Mtaqp1* encoding a mercury-insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. Planta, v. 211, p. 85-90.

Lambais, M. R.; Ríos-Ruiz, W. F.; Andrade, R. M. 2003. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist, v. 160, p. 421-428.

Linderman, R. G. 1991. Effect of microbial interactions in the mycorrhizosphere on plant growth and health. En: Keister, D. L.; Cregan, P. B. (eds) *The Rhizosphere and Plant Growth*. Beltsville Symposia in Agricultural Research, Springer, Dordrecht, p. 343-348.

Lovelock, C.E.; Wright, S. F.; Clark, D. A.; Ruess, R. W. 2004. Soil stocks of glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi across a tropical rain forest landscape. *Journal of Ecology*, v. 92, n. 278–287.

Lutts, S.; Kinet, J. M.; Bouharmont, J. 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany.*, v. 78, p. 389-398.

Madriz Ordeñana, K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas*, v. 63, p. 22-32.

Marschner, H.; B. Dell. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil*, v. 159, p. 89-102.

Morales-Guevara, D.; Rodríguez-Larramendi, L.; Dell'Amico-Rodríguez, J.; Jerez-Mompie, E.; Estrada-Prado, W. 2018. Efecto de dos bioestimulantes y hongos micorrízicos en plantas de tomate sembradas a altas temperaturas. *Cultivos Tropicales*, v. 39, n. 3, p. 41-48.

Oostenbrink, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mededelingen Van de Landbouwhogeschool te Wageningen*, v. 66, n. 4, p. 1-46.

Pereira, G.; Sánchez, M.; Ríos, D.; Herrera, M. A. 2001. Micorriza vesículo arbusculares y su incidencia en el crecimiento de plántulas de *Eucalyptus camadulensis* Dehnn. *Bosque*, v. 22, n. 2, p. 39-44.

Pérez Ortega, E.; de la Noval, B. M.; Martínez Coca, B.; Torres de la Noval, W.; Medina Carmona, A.; Hernández, A.; León, O. 2015. Inducción de mecanismos de defensa en plantas de tomate (*Solanum lycopersicon* L.) micorrizadas frente al ataque de *Oidiopsis taurica* (Lev.) Salm. *Cultivos Tropicales*, v. 36, n. 1, p. 98-106.

Phillips, J. M.; Hayman, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 55, n. 1, p. 158-163.

Pinochet, J.; Camprubí, C.; Calvet, C.; Fernandez, C. 1998. Inducing tolerance to the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* by early mycorrhizal inoculation of micropropagated Myrobalan 29 plum rootstock. *Journal of American Society of Horticultural Science*, v. 123, 342-347.

Pozo, M. J.; Jung, S. C.; Martínez-Medina, A.; López-Ráez, J. A.; Azcón-Aguilar, C.; Barea, J. M. 2013. Root allies: Arbuscular mycorrhizal fungi help plants to cope with

biotic stresses in: *Symbiotic Endophytes* (Ed: R. Aroca). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 289-307.

Ruiz Sánchez, M.; Ruiz - Lozano, J.; Muñoz Hernández, Y. 2011. Las acuaporinas, su relación con los hongos micorrícicos arbusculares y el transporte de agua en las plantas. *Cultivos Tropicales*, v. 32, n. 3, 18-26.

Rillig, M. C. 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science* , v. 84, p. 355- 363.

Ruscitti, M.; Garita, S.; Arango, C.; Beltrano, J. 2015. Inoculación con aislamientos seleccionados de hongos vesículoarbusculares como alternativa para moderar el estrés hídrico en plantas de tomate platense bajo condiciones de invernáculo. *Revista de la Facultad de Agronomía*, v. 114, n. 2, p. 219-229.

Schübler, A.; Scharzott, D.; Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, v. 105, p. 1413-1421.

Sharma, A. K.; Johri, B. N. 2002. Physiology of nutrient uptake by arbuscular mycorrhizal fungi. En: Sharma, A. K.; Johri, B. N (eds.) *Arbuscular Mycorrhiza: Interactions in Plant, Rhizosphere and Soils*. Science Publishers, Inc., Enfield (NH), USA p. 279- 308.

Sieverding, E. 1989. Ecology of VAM fungi in tropical agrosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment.*, v. 29, p. 369- 390.

Sikora, R. A.; Fernández, E. 2005. Nematode parasites of vegetables. En: Luc, M.; Sikora, R. A.; Bridge, J. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. 2. ed. Wallingford: CABI. p. 319-392.

Singleton, V. L.; Rossi, J. A. J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture.*, v. 16, p. 144-158.

Siqueira, J. O.; Franco, A. A. 1988. *Biotecnología do solo. Fundamentos e Perspectiva*. MEC-ESAL-FAEPE-ABEAS. Brasilia, D. F. 235 p.

Smith, S. E.; Gianinazzi-Pearson, V. 1990. Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L.: effects of photon irradiance and phosphate nutrition. *Functional Plant Biology*, v. 17, n. 2, p. 177-188.

Smith, S.; Read, D. 2008. *Colonization of roots and anatomy of arbuscular mycorrhiza*. London: Academic Press. *Mycorrhizal Symbiosis*, p. 42-90.

Soares, A. C. F.; Martins, M. A.; Mathias, L.; Freitas, M. S. M. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi and the occurrence of flavonoids in roots of passion fruit seedlings. *Scientia Agricola*, v. 62, n. 4, p. 331-336.

Solórzano E.; Meneses A.; Rodríguez Y.; Pérez E.; Fernández A.; Peteira B; León O. 2001. Inducción de cinco sistemas enzimáticos en la simbiosis tomate-micorriza arbuscular. *Revista de Protección Vegetal*, v. 16, n. 1, p. 30-39.

Song, Y. Y.; Ye, M.; Li, C. Y.; Wang, R. L.; Wei, X. C.; Luo, S. M.; Zeng, R. S. 2013. Priming of anti-herbivore defense in tomato by arbuscular mycorrhizal fungus and involvement of the jasmonate pathway. *Journal of Chemical Ecology*, v. 39, n. 7, p. 1036-1044.

Strullu, D. G.; Perrin, R.; Plenchette, C.; Garbaye, J. 1991. Les mycorrhizes des arbres et plantes cultivées. *Technique et Documentation*. Lavoisier. Paris. 249 p.

Tahat, M. M.; Sijam, K.; Othman, R. 2012. The potential of endomycorrhizal fungi in controlling tomato bacterial wilt *Ralstonia solanacearum* under glasshouse conditions. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 67, p. 13085-13094.

Taylor, A. F.; Alexander, I. A. N. 2005. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist*, v. 19, n. 3, p. 102-112.

Tribe, H.T. 1977. Pathology of cyst-nematodes. *Biological Review*, n. 52, p. 477-507.

Trouvelot, A.; Kough, J. L.; Gianinazzi-Pearson, V. 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. En: 'Physiological and genetical aspects of mycorrhizae'. INRA, Paris, 101-109.

Vos, C.; Claerhout, S.; Mkandawire, R.; Panis, B.; De Waele, D.; Elsen, A. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi reduce root-knot nematode penetrations through altered root exudation of their host. *Plant Soil*, v. 354, p. 335-345.

Vos, C. M.; Yang, Y.; De Coninck, B.; Cammue, B. P. A. 2014. Fungal (-like) biocontrol organisms in tomato disease control. *Biological Control* v. 74, p. 65-81.

Wellburn, R. W. 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*, v. 144, n. 3, p. 307-313.

CAPITULO 4

Biofumigación con Brassica oleracea para reducir la población de Nacobbus aberrans

4.1 INTRODUCCIÓN

La incorporación de materia orgánica al suelo es una práctica antigua que, sustentada en la observación de los resultados obtenidos se fue repitiendo y perfeccionando con el correr de los siglos. Los primeros registros de esta práctica se encuentran en libros de la Dinastía Chou, 1134-247 A.C. (Pieters, 1927). Inicialmente el objetivo era recuperar la fertilidad de los suelos, y mejorar sus características físico-químicas, pero posteriormente se fueron persiguiendo otros objetivos. Ya en 1923, Millard relataba que la incorporación de materia orgánica en el suelo provocaba importantes cambios en el pH y que esto disminuía la incidencia de Actinomycetes en papa. Gerald Thorne, autor mencionado en el primer capítulo, en el año 1926 decía: ...”Cuando un cultivo voluminoso de trébol se pica e incorpora al suelo, el calor y los gases de su descomposición matan gran cantidad de nematodos, incluyendo aquellos que forman cistos marrones”. Si bien, en muchas publicaciones referidas a la temática, se destacan que en 1993 Kirkegaard utilizó por primera vez el término “Biological fumigation” al describir la supresión de patógenos de suelo por la incorporación de Brassicáceas mediante labranzas (Srivastava y Ghatak, 2017; Clarkson *et al.*, 2015; Kiran Kumar *et al.*, 2018), muchos años antes ya se investigaba y publicaban trabajos sobre el tema. Grindrat (1979) escribía un capítulo de libro titulado: “BIOLOGICAL SOIL DISINFESTATION” donde relata las distintas formas de desinfectar el suelo utilizando material biológico, ya sean microorganismos antagónicos o la incorporación de enmiendas orgánicas. Por lo tanto, si bien en los últimos años esta práctica ha tenido una mayor difusión entre investigadores y productores, es una herramienta conocida y utilizada hace muchos años.

Distintas definiciones han sido publicadas respecto de la biofumigación:

...“ La biofumigación es el uso de ciertos cultivos de cobertura, implantados para cubrir el suelo y ser incorporados al mismo antes del cultivo. Producen gran cantidad de biomasa, especialmente en las raíces, y además de los beneficios tradicionales de los abonos verdes liberan compuestos que pueden suprimir las plagas, enfermedades y malezas” (Srivastava y Ghatak, 2017).

...“ El uso de plantas biológicamente activas como abonos verdes, cultivos de cobertura o cultivos de rotación para la supresión de plagas y enfermedades...” (Matthiessen y Kirkegaard, 2000).

... “ una variante de las enmiendas de suelo con material orgánico es la biofumigación. Una técnica que se basa en la acción fumigante de compuestos volátiles liberados durante la descomposición para el control de patógenos de plantas ”... (García Álvarez *et al.*, 2004).

De las distintas definiciones que aparecen en la bibliografía el denominador común es que el objetivo de la práctica es la supresión de alguna plaga o enfermedad por la incorporación de material vegetal al suelo. Además, la acción de supresión debe ser directa, es decir la incorporación de materia orgánica que estimula la actividad biológica de los suelos, y en consecuencia una reducción de plagas y enfermedades, no es considerada biofumigación. Entre las diferencias encontradas en las definiciones, algunos autores restringen el accionar a compuestos de tipo volátil; otros mencionan que el material vegetal debe pertenecer a la familia Brassicaceae; otros hablan de plantas/cultivos y otros de material orgánico en general, incluyendo desechos de la producción animal.

Si bien ésta práctica puede ser realizada con distintos materiales vegetales, la más difundida, y es en la que nos centraremos en este capítulo, es la realizada con Brassicáceas. De toda la información disponible se hará hincapié en aquellos aspectos relevantes al objetivo general de esta tesis.

4.1.1 Biofumigación con brasicáceas

Las plantas de la familia *Brassicaceae* sintetizan glucosinolatos, glicósidos azufrados pertenecientes al metabolismo secundario, los cuales, por acción de enzimas específicas, dan lugar a productos con actividad biocida: isotiocianatos, tiocianatos y nitrilos, productos volátiles y de olor fuerte e irritante. Ya han sido descritos más de 200 tipos de glucosinolatos en especies de la familia *Brassicaceae* (Ishida *et al.*, 2014), los cuales se pueden encontrar en todos los órganos de la planta y su contenido varía según la especie, el órgano, el clima y las condiciones de cultivo. Las condiciones del medio en que ocurra la hidrólisis (pH, y presencia de iones ferrosos) y las características

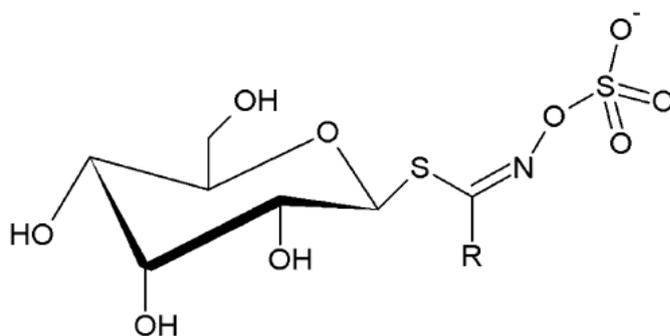
propias del glucosinolato que se hidroliza serán determinantes en el producto final de reacción (Manici *et al.*, 1997; Jahangir *et al.*, 2009; Vig *et al.*, 2009).

Fumigantes como el Dazomet y el metam sodio, tienen su efecto biocida por la liberación de metil-isotiocianato (Johnson y Feldmesser, 1987). Sin embargo, en algunos casos las concentraciones de isotiocianatos liberados al suelo después de la incorporación de estos materiales, han sido iguales o mayores a las aplicadas utilizando fumigantes sintéticos (1500 nmoles/g suelo) (Smolinska *et al.*, 2003). A diferencia de los fumigantes sintéticos, la incorporación de brasicáceas tiene como ventajas: favorecer la estructura del suelo, aumentar el contenido de materia orgánica (Pung *et al.*, 2008), evitar el riesgo de derivas o escurrimiento de producto, y no representar un riesgo para los agricultores.

4.1.2 Síntesis e hidrólisis de glucosinolatos

Los glucosinolatos son productos del metabolismo secundario y el modelo más aceptado para su biosíntesis implica 3 fases: El reclutamiento de los aminoácidos precursores y crecimiento de la cadena lateral, la formación de la estructura central, y la modificación de la cadena lateral (Sønderby *et al.*, 2010; Fahey *et al.*, 2001) (Figura 4.1).

Figura 4.1. Estructura general de glucosinolatos.

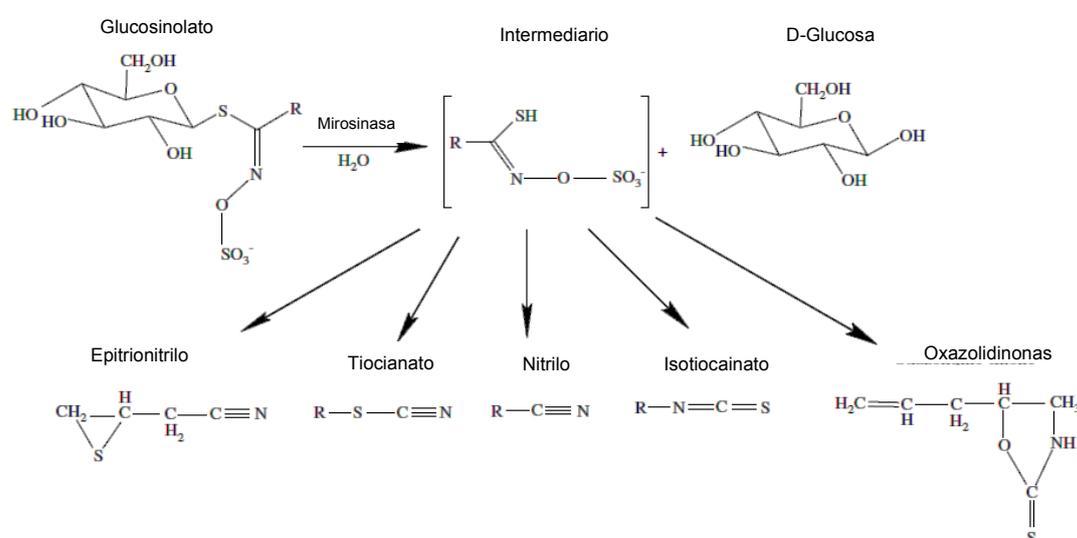


Arora, 2017

En función del aminoácido que participa como precursor biosintético, los glucosinolatos son clasificados en: alifáticos (derivados de Ala, Leu, Ile, Val y Met), arilalifáticos (derivados de Phe o Tyr) e indolil-glucosinolatos (derivados de Trp) (Fahey *et al.*, 2001).

La hidrólisis de glucosinolatos implica la acción de una enzima del tipo β -tioglucósido-glucohidrolasa, a este tipo de enzimas se las conoce con el nombre de mirosinasas. Las enzimas mirosinasas se encuentran en el citoplasma de células especializadas dispersas en el tejido vegetal, como así también en otras células, separada, físicamente de los glucosinolatos, que se almacenan en las vacuolas. Dichos compuestos se hidrolizan rápidamente al ponerse en contacto con la enzima, lo que implica la ruptura del enlace tioglucósido para producir D-glucosa, y una aglicona inestable que por la pérdida del ion sulfato, se reorganiza de forma no enzimática para formar cualquiera de varios productos (Vig *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009) (Figura 4.2).

Figura 4.2. Esquema general de hidrólisis de glucosinolatos y sus posibles productos de reacción.



Adaptado de Vig *et al.*, 2009

En la biofumigación la hidrólisis de los glucosinolatos se produce cuando el tejido del vegetal se rompe y se incorpora mecánicamente al suelo, permitiendo que las enzimas mirosinasas se pongan en contacto con el sustrato, es decir, los glucosinolatos. Esta disrupción celular se ve favorecida por la adición de agua y altas temperaturas en el suelo.

4.1.3 La acción biocida

La gran diversidad de productos que surgen por la hidrólisis de glucosinolatos han sido estudiados con diversos fines. En cuanto a la acción biocida se han descubierto algunos mecanismos de acción:

- Alquilación irreversible de grupos tiol y grupos aminos de enzimas vitales. (Avato *et al.*, 2013)
- Alquilación de grupos nucleofílicos de biopolímeros
- Daño oxidativo en moléculas de ADN (Murata *et al.*, 2000).
- Desacoplamientos en el proceso respiratorio. En este caso no se afecta la cadena transportadora de electrones, sino que desacoplan las vías del proceso resultando en la no producción de ATP (Tsao *et al.*, 2002).

4.2 PRIMER ENSAYO

El primer experimento consistió en un ensayo en macetas donde se incorporaron dos dosis o cantidades de repollo al sustrato al momento del trasplante y se evaluó su efectividad en el control de *N. aberrans* y los efectos en las plantas.

4.2.1 Objetivos:

- Evaluar el crecimiento de plantas de tomate en respuesta a la incorporación de repollo y a la infestación con *N. aberrans*
- Cuantificar el impacto de la incorporación de dos diferentes cantidades de repollo en la población de nematodos.

4.2.3 Materiales y métodos

Material Vegetal

Previo al inicio del ensayo se obtuvieron plantines de tomate del Cv. Platense de manera similar a la descrita previamente en los capítulos anteriores.

Biofumigación y trasplante

El sustrato utilizado fue el horizonte superficial de un suelo Argiudol típico proveniente de un lote del Cinturón Hortícola Platense al que se le incorporó cogollo de repollo, *Brassica oleracea* Var. *Capitata*, de color blanco. Utilizando una maquina chipeadora de cuchillas se picó el material en fragmentos de 1 cm². Inmediatamente luego de picado el material, se elaboraron 3 mezclas con distinta cantidad de repollo: 0 gr, 140 gr, y 280 gr.kg⁻¹ de suelo. Con cada una de estas mezclas fueron llenadas 16

macetas de 10 L de capacidad y se efectuó el trasplante del tomate regando las macetas hasta capacidad de campo.

Las plantas fueron mantenidas durante todo el ensayo dentro de un invernáculo con iluminación natural y temperatura controlada entre 20 y 28 °C.

*Inoculación con *N. aberrans**

El día siguiente al trasplante se realizó la inoculación con una suspensión acuosa conteniendo 5000 huevos y juveniles de *N. aberrans*, en 8 de las 16 macetas que habían sido llenadas con una misma mezcla quedando distinguidos los tratamientos del ensayo.

Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento tuvo un diseño factorial 2x3 completamente aleatorizado con 8 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos aplicados resultan de la combinación de los siguientes factores con sus correspondientes niveles:

- Incorporación de *B. oleracea* en el sustrato: 0 gr, 140 gr, y 280 gr.kg⁻¹ de sustrato.
- Infestación con nematodos: 0 Huevos y juveniles/planta y 5000 huevos y juveniles/planta

Los resultados de las variables evaluadas fueron sometidos al test de análisis de varianza, y el test de comparación de medias, cuando así correspondiere, se realizó por el método de LSD de Fisher ($p \leq 0,05$)

Variables analizadas

A Los 70 días de la inoculación se obtuvieron las muestras de tejido aéreo para luego descalzar las plantas y tomar las muestras de raíces y suelo. Se colectó material para realizar las siguientes determinaciones:

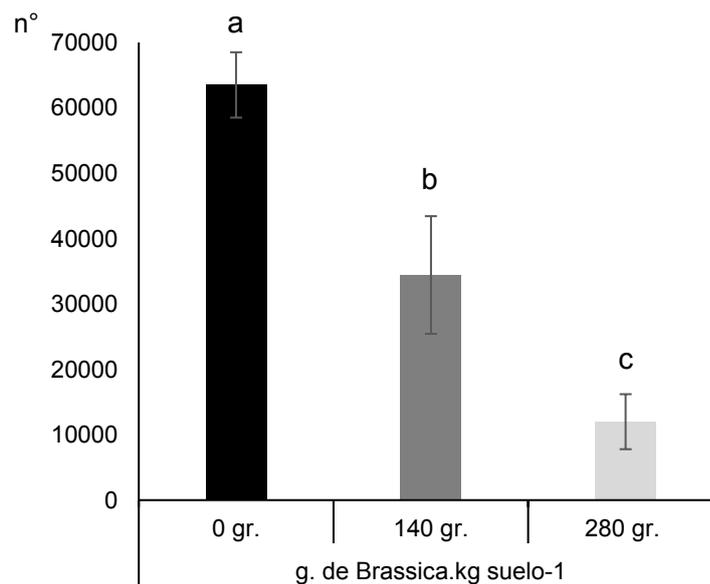
- Peso fresco aéreo, peso fresco radicular, peso fresco de frutos y peso seco aéreo.
- Clorofila total (Wellburn, 1994).
- Proteínas solubles en tejido foliar (Bradford, 1976).
- Número de huevos alojados en las raíces (Hussey y Barker, 1973; Coolen, 1979) y número de formas móviles en suelo (Coolen, 1979).

- Población final del nematodo: huevos alojados en la raíz + vermiformes en suelo y factor de reproducción: Población Final/Población inicial (Oostenbrink, 1966).
- Contenido de malonildialdehído (MDA) en tejido radicular (Heath y Packer, 1968)
- Contenido de prolina en tejido radicular (Bates *et al.*, 1973)

4.4 Resultados y discusión

La biofumigación provocó una reducción significativa en la población de *N. aberrans*. A su vez la reducción provocada con la mayor dosis resultó significativamente superior a la provocada por la menor dosis ($p \geq 0,05$). En el tratamiento con 140 g de repollo.kg⁻¹ suelo, la reducción en el número de huevos fue de 45,6 % y en el tratamiento con 280 g. de repollo.kg⁻¹ de suelo de 81,12% en comparación al testigo sin biofumigar (Figura 4.3).

Figura 4.3. Número de huevos por planta de *Nacobbus aberrans* en plantas de tomate platense con diferentes incorporaciones de *Brassica* sp. al sustrato.



Columnas acompañadas por letras distintas, indican diferencias significativas según el test LSD de Fisher ($p < 0,0001$). CV: 17%. Las barras indican los desvíos standard.

Los valores del factor de reproducción fueron 12,8; 7,09 y 2,49 para el testigo sin biofumigar, el biofumigado con 140 g y 280 g de repollo respectivamente; presentando las mismas diferencias estadísticas que fueron observadas en el número de huevos en el test de LSD de Fisher ($p < 0,01$).

Si bien en distintos congresos de horticultura y fitopatología se presentan resúmenes de trabajos de biofumigación, no son muchas las experiencias nacionales publicadas en revistas científicas donde se incorporen brasicas al suelo para el manejo de *N. aberrans*. Mitidieri *et al.* (2009) tuvieron resultados satisfactorios incorporando 14 Kg m⁻² de rastrojo de brócoli, mientras que Bongiorno *et al.*, (2009) obtuvieron resultados positivos incorporando entre 0,5 y 4 Kg. de brasicas por metro lineal de surco. Es difícil establecer con precisión cual o cuales fueron los compuestos que ejercieron el control para poder recomendar un tipo de particular de *Brassica sp.* y una dosis. Kierkegaard y Sarwar (1998) realizaron un estudio exhaustivo entre 76 cultivares correspondientes a 21 especies y variedades botánicas de brasicáceas cultivadas (hortícolas, forrajeras y oleaginosas) y espontáneas en busca de las características que predijeran más acertadamente su potencial biofumigante. En el mismo exploraron la producción de biomasa aérea y subterránea de cada accesión, su contenido total de glucosinolatos, el perfil de los mismos (contenido relativo de alifáticos, aromáticos e indólicos), la liberación total de isotiocianatos por parte de los mismos y propusieron una fórmula de cálculo de potencial biofumigante que considerara todos esos factores. En el estudio mencionado el repollo, junto con la col cresta, kale o berza (*B.oleracea* var. *acephala*), resultaron las brasicáceas hortícolas con mayor potencial de liberación de isotiocianatos. El repollo, introducido a una dosis de 1589 g.m⁻² de biomasa aérea, en el trabajo de los autores mencionados liberó aproximadamente una cantidad de isotiocianatos de 82,1 nmol/g⁻¹ de suelo. Esto resulta bastante inferior al mínimo del rango recomendado en la aplicación de precursores sintéticos del metil-isotiocianato (517 nmol/g⁻¹ de suelo). Sin embargo, asumiendo una densidad aparente de 1,4 kg.dm⁻³ y una profundidad de acción de 10 cm las dosis empleadas en nuestro ensayo resulta superior a la evaluada por Kierkegaard y Sarwar (1998) (1960 g.m⁻² y 3920 g.m⁻², para las dosis más baja y más alta, respectivamente). Podría pensarse que el contenido de glucosinolatos es un factor importante en los cálculos de dosis a utilizar, sin embargo, varios experimentos de bioensayos en tejidos de brasicas han demostrado que la relación de conversión real de glucosinolatos en isotiocianatos puede ser muy baja y variable, y que es difícil establecer una relación directa entre el contenido de glucosinolatos de estos tejidos y su efecto supresor de plagas en general (Kołodziejcki *et al.*, 2019; Van Dam *et al.*, 2009). En función de la cantidad de isotiocianatos potencialmente liberables, el empleo de brasicáceas distintas de las hortícolas, tales como *Brassica carinata* A.

Braun, *Brassica nigra* (L.) W. D. J. Koch y *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC., permitiría alcanzar un efecto biocida mucho más pronunciado sobre los parásitos blanco (Kierkegaard y Sarwar, 1998).

El hecho de que las brasicas son susceptibles a *N. aberrans* es un indicador de que la sola presencia de este tipo de compuestos no es lo que ejerce el control, sino que están involucrados otros mecanismos e interacciones. El parasitismo ejercido por los nematodos, mediado a través de la penetración de los estiletes, probablemente no interrumpa la compartimentalización que mantiene separados a la mirosinasa y a sus sustratos, tal como sí ocurre efectivamente con insectos masticadores (Winde y Wittstock, 2011). Si bien los isotiocianatos son los compuestos de mayor interés en la biofumigación con brasicas, su descomposición libera otros compuestos de interés como metil-sulfóxido, dimetil-sulfóxido, Metanetiol y carbon disulfóxido (Lord *et al.*, 2011).

Al aplicar el análisis de varianza a los parámetros de crecimiento de las plantas, se observó una marcada influencia de la incorporación del repollo al sustrato. En el peso fresco aéreo y radicular; el peso seco aéreo y el peso de los frutos no hubo efecto significativo del factor “dosis de inoculación con nematodos” ni de la interacción entre dos factores. Sin embargo, en todos los casos, sí hubo efecto significativo del factor incorporación de repollo (Tabla 4.1). Para todos los parámetros mencionados, las plantas sin biofumigar tuvieron valores significativamente menores que la dosis de 140 g., y a su vez la dosis de 280 g. presentó valores significativamente mayores que la de 140 g.

Tabla 4.1. Análisis de varianza y valores medios de parámetros de crecimiento de plantas de tomate platense cultivadas con diferentes cantidades de *Brassica oleracea* en el sustrato, inoculadas y no inoculadas con *Nacobbus aberrans*.

	Peso fresco radicular			Peso fresco aéreo			Peso seco aéreo			Peso fruto		
	Qm	Fc	p	Qm	Fc	p	Qm	Fc	p	Qm	Fc	p
Incorp. de repollo (R)	34607,4	72,4	0,0001*	185693,7	109,4	0,00001*	3616,9	81,1	0,00001*	25401240,9	59,9	0,00001*
Nematodo (N)	358,3	0,75	0,39	4254,2	2,5	0,12	82,16	1,8	0,18	183727,8	0,434	0,51
N x R	1396,9	2,92	0,07	5292,1	1,5	0,23	29,7	0,66	0,52	138768	0,328	0,72
error	477,4			39035			44,57			4234,83		
CV		20,3 %			21,24 %			24,3 %			24,6 %	

Qm: Cuadrados medios; Fc: F calculado; CV: Coeficiente de variación P: probabilidad de ocurrencia del estadístico "F"

	Sin nematodo			Con nematodo		
	0 g	140 g	280 g	0 g	140 g	280 g
Peso fresco radicular (g)	35,6 ± 16,6	104,1 ± 14,4	171,2 ± 21,3	53,13± 12	128,3 ± 17,7	150,4 ± 42,5
Peso fresco aéreo (g)	62 ± 11,5	157,5 ± 18,4	320 ± 72,02	56 ± 8,2	218 ± 34,9	343 ± 51,8
Peso seco aéreo (g)	8,16 ± 1,3	24,0 ± 4,2	44,6 ± 9,8	8,18 ± 1,3	31,3 ± 5,5	47,7 ± 10,5
Peso de frutos (g)	801 ± 145	3912 ± 548,2	3240 ± 561,6	860 ± 181,6	3690 ± 1012,6	3610 ± 902

El análisis de varianza de parámetros bioquímicos vinculados al crecimiento vegetal como el contenido de proteínas solubles y clorofilas en las hojas no mostró interacción entre los factores, ni diferencias entre las plantas parasitadas y no parasitadas. En ambas variables hubo diferencias significativas entre plantas biofumigadas y no biofumigadas (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Contenido de proteínas solubles y contenido de total de clorofila de hojas de tomate platense cultivado con diferentes cantidades de *Brassica oleracea* en el sustrato, inoculados y no inoculados con *Nacobbus aberrans*.

	CV	0 gr.kg ⁻¹	140 gr.kg ⁻¹	280 gr.kg ⁻¹
Proteínas de hoja (µg.mg ⁻¹ PF)	29%	14,4 ± 6,4 B	30,09 ± 8,2 A	37,4 ± 13,3 A
Clorofila (µg.cm ⁻²)	15,4 %	5,1 ± 1,06 B	6,98 ± 0,81 A	7,7 ± 1,21A

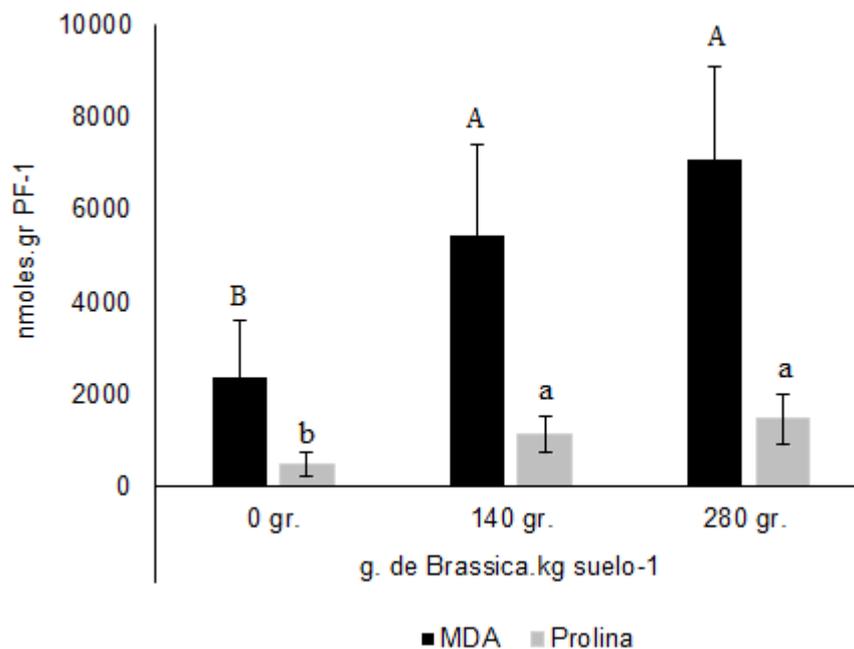
Medias acompañadas por distintas letras, indican diferencias significativas según el test LSD de Fisher (p<0,05)

Cuando se procedió a levantar el ensayo, ya no eran distinguibles los residuos de repollo en el sustrato. La rápida descomposición de la enmienda puso a disposición nutrientes que tuvieron un impacto favorable en el crecimiento de las plantas. Además de este efecto químico, la incorporación de materia orgánica en el suelo trae aparejados otros beneficios ampliamente validados como: un aumento en la capacidad de intercambio catiónico, favorecer la respiración celular, una mayor solubilización mineral por el CO₂ desprendido, activación de la rizogénesis y una reducción de la evaporación. Estos beneficios físicos, químicos y biológicos, explican las significativas diferencias de crecimiento entre las plantas biofumigadas y no biofumigadas.

Al analizar dos variables vinculadas al estrés, se observa un aumento significativo en la concentración de prolina y MDA del tejido radicular en las plantas biofumigadas. Si bien las plantas donde se incorporó repollo tuvieron un crecimiento mayor, estos resultados podrían ser indicio de algún tipo de fitotoxicidad (Figura 4.4). Mojtahedi *et al.*, (1991) observaron un efecto fitotóxico en plantas de tomate que fueron colocadas en macetas donde previamente había sido incorporado material verde de colza. Este trabajo reportó muerte de plantas, y menor crecimiento radicular, atribuyendo estos resultados a algún tipo de sustancia producida durante la descomposición de la brásica. Mian y Rodríguez-Kábana (1982) indican una relación directa entre el contenido de nitrógeno de la enmienda y su actividad nematicida

ejercida por la liberación de amonio. Estos autores indican que, si bien en términos de control nematológico altos contenidos de N son deseables, un exceso de amonio puede tener efectos fitotóxicos. No es posible mencionar valores absolutos, pero según la información de distintos trabajos, la actividad nematicida ocurre con relaciones C/N inferiores a 20, y la fitotoxicidad se presenta con C/N por debajo de 11 (Stirling, 1991).

Figura 4.4 Contenido de prolina y MDA en tejido radicular de plantas de tomate con diferentes incorporaciones de *Brassica sp.* al sustrato: 0, 140 y 280 g.



Columnas acompañadas por letras distintas indican diferencias significativas según el test de LSD de fisher ($p < 0,05$).

4.2.5 Consideraciones finales del ensayo

- La biofumigación con 140 g. y 280 g.kg⁻¹ de sustrato fue efectiva para reducir la población de *N. aberrans*.
- El agregado de repollo al sustrato actuó como biofumigante y como biofertilizante. Su descomposición provocó un aumento significativo del crecimiento de las plantas, manifestado no solo en el incremento del peso de los diferentes órganos sino también en los parámetros bioquímicos determinados.
- La incorporación de al menos 140 g. de repollo al momento del trasplante manifestó tener algún tipo toxicidad en las plantas, por lo que se deberían evaluar dosis más bajas o distintos momentos de aplicación.

4.3 SEGUNDO ENSAYO

Se desarrolló un segundo ensayo en el que a la práctica de la biofumigación se añadió la de micorrización, con el fin de evaluar como compatibilizan estas dos prácticas, que como se ha visto, ambas ejercen control sobre *N. aberrans*. Fue utilizada una dosis única de brasica pero aplicada en diferentes fechas previas al trasplante. En virtud de los resultados del primer ensayo, se trató de compensar el fuerte efecto de la biofertilización incorporando una enmienda no biofumigante en el tratamiento “sin biofumigar”.

4.3.1 Objetivos

- Analizar si existe sinergismo o antagonismo entre las prácticas de biofumigación y la micorrización en el control de *N. aberrans*.
- Evaluar si la biofumigación afecta el crecimiento y viabilidad de los hongos micorrícicos.
- Analizar si la biofumigación modifica el tipo de estructuras fúngicas predominante en la micorrización.

4.3.2 Materiales y métodos

Diseño experimental

El experimento tuvo un diseño factorial 2x2x4 completamente aleatorizado con 6 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos aplicados resultan de la combinación de los siguientes factores con sus correspondientes niveles:

- **Incorporación de brasica en el sustrato:**

Sin incorporación

Incorporación 30 días previos al trasplante

Incorporación 15 días previos al trasplante

Incorporación en el momento del trasplante

- **Infestación con nematodos:**

Sustrato no inoculado con *N. aberrans*.

Sustrato inoculado con *N. aberrans*.

- **Micorrización:**

Plantas no micorrizadas

Plantas micorrizadas con *F. mosseae*

Los resultados obtenidos de los distintos análisis y determinaciones fueron sometidos al análisis de la varianza utilizando el programa Sisvar, aplicándose el test de LSD de Fisher para los test de comparación de medias ($p \leq 0,05$).

Preparación de plantines

Se prepararon plantines de tomate platense como fuera descrito en el capítulo anterior. Fue preparada una bandeja con inóculo autoclavado (Control) y otra inoculada con *Funneliformis mosseae*, que fue la cepa seleccionada por su mejor desempeño en el control de *N. aberrans*.

Biofumigación e inoculación con N. aberrans

Treinta días antes de la fecha prevista de trasplante 96 macetas de 10 L. de capacidad de fueron llenadas con 6 kg. de suelo argiudol típico. Ese mismo día la mitad de las macetas fueron inoculadas con 5000 huevos y juveniles de *N. aberrans*. El día posterior a la preparación de las macetas comenzaron las incorporaciones de repollo utilizando una dosis de 140 g.kg suelo⁻¹. Inicialmente se incorporó el repollo en 24 macetas (tratamiento de biofumigación 30 días antes el trasplante), pasados 15 días se le incorporó repollo a otras 24 macetas (tratamiento de biofumigación 15 días antes del trasplante), y pasados otros 15 días se le incorporó repollo a otras 24 macetas (tratamiento de biofumigación al trasplante). Al tratamiento control sin biofumigación se le incorporó 140 g. kg suelo⁻¹ de pencas de acelga (especie no biofumigante). Una vez realizadas todas las enmiendas se procedió al trasplante, de las plantas micorrizadas y no micorrizadas. De esta forma quedaron definidos los 16 tratamientos que se indican a continuación

Micorrización	Infestación con <i>N. aberrans</i>	Biofumigación
No micorrizado	Sin <i>N. aberrans</i>	Sin biofumigar
No micorrizado	Sin <i>N. aberrans</i>	30 días antes del trasplante
No micorrizado	Sin <i>N. aberrans</i>	15 días antes del trasplante

No micorrizado	Sin <i>N. aberrans</i>	Al trasplante
No micorrizado	Con <i>N. aberrans</i>	Sin biofumigar
No micorrizado	Con <i>N. aberrans</i>	30 días antes del trasplante
No micorrizado	Con <i>N. aberrans</i>	15 días antes del trasplante
No micorrizado	Con <i>N. aberrans</i>	Al trasplante
Micorrizado	Sin <i>N. aberrans</i>	Sin biofumigar
Micorrizado	Sin <i>N. aberrans</i>	30 días antes del trasplante
Micorrizado	Sin <i>N. aberrans</i>	15 días antes del trasplante
Micorrizado	Sin <i>N. aberrans</i>	Al trasplante
Micorrizado	Con <i>N. aberrans</i>	Sin biofumigar
Micorrizado	Con <i>N. aberrans</i>	30 días antes del trasplante
Micorrizado	Con <i>N. aberrans</i>	15 días antes del trasplante
Micorrizado	Con <i>N. aberrans</i>	Al trasplante

Variables a analizar

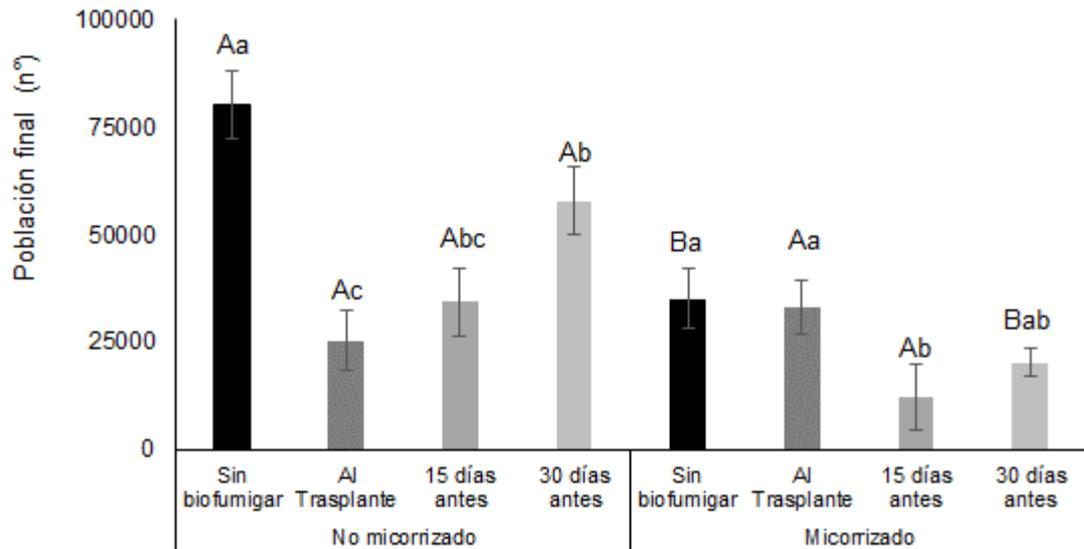
A los 70 días de la inoculación fueron retiradas las plantas y se evaluó: la población final y el factor de reproducción (Oostenbrink, 1966) extrayendo huevos alojados en las raíces y vermiformes en suelo por las técnicas de Hussey y Barker (1973) y Coolen (1979); el porcentaje de micorrización (Phillips y Hayman, 1970) y la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa sobre las estructuras fúngicas (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1990).

4.4 Resultados y discusión

El análisis de varianza de la población del nematodo al finalizar el ensayo mostró una interacción significativa entre los factores biofumigación y micorrización ($p \leq 0,05$). En la figura 4.5 se grafican los valores medios de población final de cada tratamiento indicando las diferencias entre tratamientos mediante letras. El tratamiento control, que no incluía micorrizas ni biofumigación fue el que presentó la población más elevada del nematodo. Todos los tratamientos aplicados, ya sea de forma simple o de forma combinada provocaron reducciones significativas en la población de *N. aberrans*

En ausencia de micorrización, la biofumigación más efectiva fue que la que se realizó al trasplante y la menos efectiva fue la que se realizó 30 días antes del mismo. Entre los tratamientos micorrizados, la población más baja fue en el tratamiento biofumigado 15 días previos al trasplante, sin diferenciarse significativamente del tratamiento biofumigado 30 días antes, pero sí de los restantes tratamientos micorrizados.

Figura 4.5. Población final de *N. aberrans* en plantas de tomate platense micorrizadas con *Funeliformis mosseae* y biofumigadas con *Brassica oleracea* en distintos momentos.



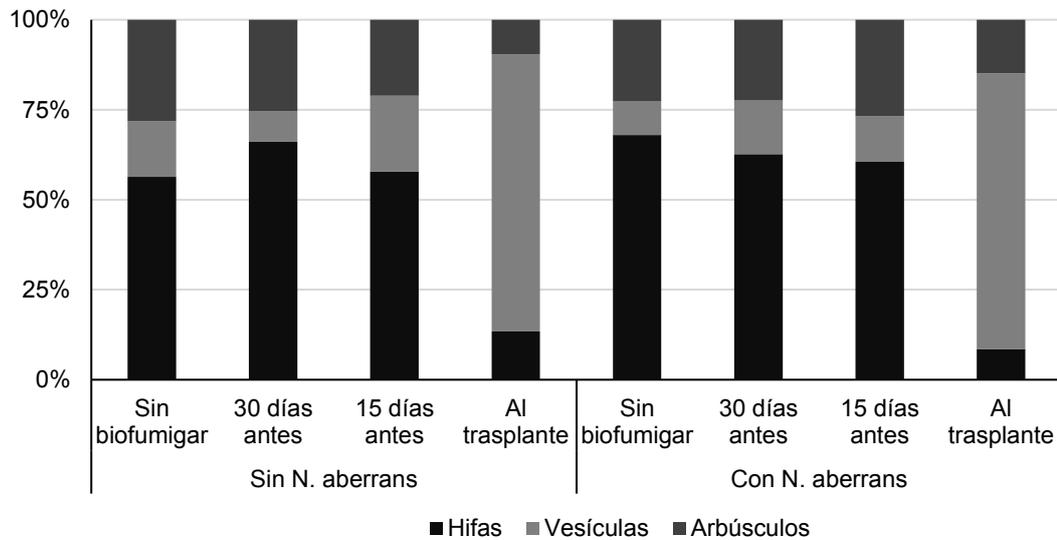
Letras mayúsculas comparan una misma condición de biofumigación en ausencia y presencia de micorrización. Letras minúsculas comparan una misma condición de micorrización expuesta a diferentes momentos de biofumigación. Letras distintas indican diferencias significativas según el test de LSD de Fisher ($p \leq 0,01$).

Tabla 4.5 Porcentaje de micorrización y actividad de la enzima succinato deshidrogenasa en preparados de raíces de tomate platense parasitadas por *N.aberrans* y expuestas a biofumigación con *Brassica oleracea*.

Tratamiento		% M	% SDH
Sin <i>N. aberrans</i>	Sin biofumigar	49,4 Aa	38,2 Aa
	30 días antes	55,1 Aa	36,4 Aa
	15 días antes	43,4 Aa	34,2 Aa
	Al trasplante	8,02 Ab	4,02 Ab
Con <i>N. aberrans</i>	Sin biofumigar	52,3 Aa	14,4 Bab
	30 días antes	47,3 Aa	28,4 Aa
	15 días antes	41,7 Aa	39,0 Aa
	Al trasplante	12,2 Ab	7,3 Ab

Letras mayúsculas comparan una misma condición de biofumigación en ausencia y presencia del nematodo. Letras minúsculas comparan una misma condición de infestación expuesta a diferentes momentos de biofumigación. Letras distintas indican diferencias significativas según el test de LSD de Fisher ($p \leq 0,01$).

Figura 4.6. Porcentaje de hifas, arbuscúlos y vesículas de *Funeliformis mosseae* en preparados de raíces de tomate platense parasitadas por *N. aberrans* y expuestas a biofumigación con *Brassica oleracea*.



Los compuestos liberados por la descomposición de la brassica al trasplante, tuvo efectos tóxicos sobre las micorrizas lo que provocó una disminución en el porcentaje de micorrización respecto a los tratamientos biofumigados 30 y 15 días previos al trasplante.

Se registró un mayor porcentaje de vesículas en el tratamiento biofumigado al trasplante lo que indicaría que el hongo destinó más recursos a la formación de vesículas, estructuras de reserva. Esto también se ha observado en ambientes con baja limitación nutricional, donde el hongo no necesita invertir carbono para la formación de hifas y arbuscúlos (Hart y Reader, 2005).

4.5 Consideraciones finales

La biofumigación provocó una reducción significativa en la población de *N. aberrans* que fue directamente proporcional a la dosis incorporada. Paralelamente se observó una marcada influencia de la incorporación del repollo en los parámetros relacionados con el crecimiento de las plantas de tomate. Para el peso fresco aéreo y radicular; el peso seco aéreo y el peso de los frutos las plantas sin biofumigar tuvieron valores significativamente menores que las plantas con aplicación de brassica. Respecto a las variables vinculadas al estrés, se observó un aumento significativo en la concentración de prolina y MDA del tejido radicular en las plantas biofumigadas. Si

bien las plantas donde se incorporó repollo tuvieron un crecimiento mayor, estos resultados podrían ser indicio de algún tipo de fitotoxicidad en las condiciones del ensayo.

Cuando se realizaron las prácticas de biofumigación y micorrización en forma conjunta, se evaluaron también diferentes tiempos de aplicación respecto a la fecha de trasplante. En ausencia de micorrización, la biofumigación más efectiva fue que la que se realizó al trasplante y la menos efectiva fue la que se realizó 30 días antes del mismo. Sin embargo, entre los tratamientos micorrizados, la población de nematodos más baja fue en el tratamiento biofumigado 15 días previos al trasplante. Esta respuesta está relacionada con la toxicidad que los compuestos liberados durante el proceso de biofumigación ejercen sobre los hongos micorrícicos arbusculares y sobre el proceso de micorrización.

Todos estos aspectos mencionados tienen una importancia relevante al momento de tomar decisiones de manejo del cultivo, pensando en un sistema integrado por varios componentes, con requerimientos específicos para cada uno.

4.4 REFERENCIAS

Avato, P.; D'Addabbo, T.; Leonetti, P.; Argentieri, M. P. 2013. Nematicidal potential of Brassicaceae. *Phytochemistry Reviews*, v. 12, p. 791-802.

Arora, R.; Bhushan, S.; Arora, S. 2017. Changing Trends in the Methodologies of Extraction and Analysis of Hydrolytic Products of Glucosinolates: A Review. In: *Glucosinolates*, p.383-405.

Bates, L. S.; Waldren, R.P.; Tease, I.D. 1973. Rapid determination of the proline for stress studies. *Plant Soil*, v. 85, p. 107-129.

Bongiorno, M.; Larrosa, C.; Maidana, A.; Arenas, M.; Cruz, Y. López, R.; Gianuzzi, L.; Cap, G. 2009. Biofumigación con recursos locales: el caso de la producción hortícola de los quinteros del Parque Pereyra Iraola. *Leisa*, v.25, n.4, p.25-28.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254.

Clarkson, J.P.; Michel, V.L.; Neilson, R. 2015. Biofumigation for the control of soil-borne diseases. *EIP-AGRI*, n.1, p.1-7.

Coolen, W.A. 1979. Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. and other nematodes from roots and soil. pp. 317-329. En: Root knot nematodes (*Meloidogyne* species) Systematics, Biology and Control. (Lamberti, F.y Taylor, C. E., eds.) Academic Press, London.

Fahey, J.; Zalcman, A.; Talalay, P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, v. 56, p.5–51.

García Álvarez, A.; Díez-Rojo, M.A.; López-Pérez, J.A.; Bello, A. 2004. Materia orgánica, biofumigación y manejo de organismos del suelo patógenos de vegetales. En: Labrador, J. (Ed.), Conocimientos, técnicas y productos para la agricultura y la ganadería ecológica. SEAE, Valencia, 354p.

Grindrat, D. 1979. Biological soil desinfestation. En: Soil desinfestation, Mulder, D. 369 p.

Hart M.M.; Reader R.J. 2005. The role of the external mycelium in early colonization for three arbuscular mycorrhizal fungal species with different colonization strategies. *Pedobiologia*, v. 49, n. 3, p. 269-279.

Heath, R. L.; Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, v. 125, p.189-198.

Hussey, R. S.; Barker, K. R. 1973. A comparison of nematodes of collecting inocula for *Meloidogyne* spp., including a new technique *Plant Disease Report*, v. 61, p. 328-331.

Ishida, M.; Hara, M.; Fukino, N.; Kakizaki, T.; Morimitsu, Y. 2014. Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breeding Science*, v. 64, p.48-59.

Jahangir, M.; Abdel-Farid, I. B.; Kim, H. K.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. 2009. Healthy and unhealthy plants: The effect of stress on the metabolism of Brassicaceae. *Environmental and Experimental Botany*, v. 67, n.1, p. 23-33.

Johnson, A. W.; Feldmesser, J. 1987. Nematicides—a historical review. En: *Vistas on Nematology*, ed. Veech, J.A; Dickson, D. W.; Hyattsville, M. D. Society of Nematologist, p. 448–454.

Kiran Kumar, G.N.; Jayasudha, S. M.; Kirankumar, K. C. 2018. Disease management by Biofumigation in organic farming system. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 7, n. 4, p. 676-679.

Kirkegaard, J. A.; Sarwar, M. 1998. Biofumigation potential of brassicas. *Plant and Soil*, v. 201, n. 1, p. 71-89.

Kirkegaard, J. A.; Gardner, P. A.; Desmarchelier, J. M.; Angus, J. F. 1993. Biofumigation: using Brassica species to control pests and diseases in horticulture and agriculture. Proceedings of the 9th Australian Research Assembly on Brassicas, p. 77-82.

Kołodziejewski, D.; Piekarska, A.; Hanschen, F.S. 2019. Relationship between conversion rate of glucosinolates to isothiocyanates/indoles and genotoxicity of individual parts of Brassica vegetables. European Food Research and Technology, n. 245, p.383-400.

Lord, J. S.; Lazzeri, L.; Atkinson, H. J.; Urwin, P. E. 2011. Biofumigation for control of pale potato cyst nematodes: activity of Brassica leaf extracts and green manures on *Globodera pallida* in vitro and in soil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 59, p. 7882-7890.

Manici, L. M.; Lazzeri, L.; Palmieri, S. 1997. In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 45, p. 2768-73.

Matthiessen, J.; Kirkegaard, J. 2000. Biofumigation: bioactive Brassica rotations for IPM of soil-borne pests and diseases. Ed. Hort. Research and Devel. Corporation, 96 p.

Mian, I. H.; Rodríguez-Kábana, R. 1982. Survey of the nematicidal properties of some organic materials available in Alabama as amendments to soil for control of *M. arenaria*. Nematologica, v. 12, n. 2, p. 235-246.

Millard, W. A. 1923. Common scab of potatoes. Annals of Applied Biology, v. 10, n. 1, p. 70–88.

Mitidieri, M.; Brambilla, V.; Saliva, V.; Piris, E.; Piris, M.; Celié, R.; Pereyra, C.; Del Pardo, K.; Chaves, E.; González, J. 2009. Efecto de distintas secuencias de tratamientos de biofumigación sobre parámetros fisicoquímicos y biológicos del suelo, el rendimiento y la salinidad de cultivos de tomate y lechuga bajo cubierta. Horticultura Argentina, v. 28, n. 67, p. 1-13.

Mojtahedi, H.; Santo, G. S.; Hang, A. N.; Wilson, J. H. 1991. Suppression of Root-knot Nematode Populations with Selected Rapeseed Cultivars as Green Manure. Journal of Nematology, v. 23, n. 2, p. 170–174.

Murata, M.; Yamashita, N.; Inoue, S.; Kawanishi, S. 2000. Mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic allyl isothiocyanate Free Radical Biology and Medicine, v. 28, p. 797-805.

Oostenbrink, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Mededelingen Van De landbouwhogeschool Te Wageningen, Nederland, v. 66, n. 4, p. 1-46.

- Pieters, A. Organic Principles and Practices: Green Manuring. 267 pp. 1927.
- Phillips, J. M.; Hayman, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society, v. 55, n. 1, p. 158-163.
- Pung, H.; Cross, S.; Patten, D. 2008. The use of biofumigant green manure crops for soil-borne disease management in Tasmania. Proceedings of Third International Biofumigation Symposium. Canberra, Australia. p. 26.
- Smith, S. E.; Gianinazzi-Pearson, V. 1990. Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L.: effects of photon irradiance and phosphate nutrition. Functional Plant Biology, v. 17, n. 2, p. 177-188.
- Smolinska, U.; Morra, M. J.; Knudsen, G. R.; James, R. L. 2003. Isothiocyanates produced by Brassicaceae species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. Plant Disease, v. 87, p. 407-412.
- Sønderby, I. E.; Geu-Flores, F.; Halkier, B. A. 2010. Biosynthesis of glucosinolates – gene discovery and beyond. Trends in Plant Science, v. 15, n. 5, p. 283–290.
- Srivastava, J. N.; Ghatak, A. 2017. Biofumigation: A control method for the soil-borne diseases. Journal of Plant Protection Research, v. 10, n. 2, p. 453-460.
- Stirling, G. R. Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects. Wallingford: CAB International, 282 p. 1991.
- Tsao, R.; Peterson, C. J.; Coats, J. R. 2002. Glucosinolate breakdown products as insect fumigants and their effect on carbon dioxide emission of insects. BMC Ecology, v. 2, n. 5, p.1-12.
- Thorne, G. 1926. U.S. Department of Agr. Farmers Bulletin, n.1514, 21 p.
- Van Dam, N. M.; Tytgat, T.O.G.; Kirkegaard, J.A. 2009. Root and shoot glucosinolates: a comparison of their diversity, function and interactions in natural and managed ecosystems. Phytochemistry Reviews, n. 8, p. 171-186.
- Vig, A.P.; Rampal G.; Singh, T.S; Arora S. 2009. Bioprotective effects of glucosinolates, A review. LWT Food Science and Technology, v. 42, p. 1561-1572.
- 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, n. 144, p. 307-313.
- Wu, X.; Zhou, Q.; Xu, K.; 2009. Are isothiocyanates potential anti-cancer drugs? Acta Pharmacologica Sinica, v. 30, p. 501–512.

Winde, I.; Wittstock, U. 2011. Insect herbivore counteradaptations to the plant glucosinolate–myrosinase system. *Phytochemistry*, v. 72, n. 13, p. 1566–1575.

CAPITULO 5

*Control biológico de *Nacobbus aberrans* con *Purpureocillum lilacinum* y *Pleurotus ostreatus**

5.1 INTRODUCCIÓN

Durante su ciclo de vida, *Nacobbus aberrans* permanece gran parte del tiempo en el suelo o en sectores superficiales de la raíz de su hospedante, donde es expuesto a factores físicos (como textura, temperatura, humedad), factores químicos (como pH, compuestos liberados por el hospedero, productos fitosanitarios) y factores biológicos (interacción con otros microorganismos) que inciden de alguna manera en su comportamiento y reproducción. En los ecosistemas naturales ocurren incalculables interacciones biológicas que, a través de mecanismos de competencia, parasitismo, predación, y producción de compuestos, mantienen en equilibrio las poblaciones. En los agroecosistemas, el hombre en pos de mantener los altos rendimientos del cultivo, debe invertir tiempo, dinero y esfuerzos para mantener las poblaciones de fitófagos y fitoparásitos, por debajo de los umbrales de daño económico. Imitando esas interacciones naturales entre poblaciones es que surge el control biológico.

Al igual que en el caso de la biofumigación existen distintas definiciones de control biológico. Eilenberg *et al.* (2001) definen al control biológico como el uso de organismos vivos para suprimir la densidad de población o el impacto de un organismo específico, es decir haciéndolo menos abundante o menos dañino". La definición es amplia pues la población a suprimir puede tratarse de organismos vegetales, algas, hongos, vertebrados, virus y bacterias, del mismo modo que el organismo controlador puede pertenecer a cualquiera de estos grupos. Sin embargo 3 aspectos importantes pueden destacarse de esta definición: la inclusión del término *población*, que le otorga un sentido más amplio, ecológico, ya que las características de la población pueden diferir de las de un organismo aislado; la utilización de *organismos vivos* que excluye al uso de metabolitos producidos por microorganismos o por la descomposición de ellos; y el hecho de que la muerte de los organismos no es un requisito para que exista control biológico. Es decir, que se puede ejercer un control biológico atenuando la agresividad de una población sin que, en términos cuantitativos, haya una reducción en el número de individuos.

Los registros del control biológico de nematodos son tan antiguos como la nematología. En 1876, Sorokin y en 1884 Zopf, publicaron comunicados respecto de hongos que parasitaban nematodos, o los atrapaban utilizando estructuras especializadas. Nathan Cobb, en 1917, documentó la ocurrencia de predación entre

nematodos. Si bien han pasado más de 100 años, el control biológico de nematodos no ha tenido un gran desarrollo, como si ha ocurrido en el control de plagas insectiles.

Existen estrategias que pueden adoptarse para la aplicación de control biológico. En el caso de que se realice la liberación de un organismo agente de control, éste puede ser *exótico* o *nativo* del ambiente en cuestión (Vänninen, 2005). Además del origen, un factor a considerar es si este organismo puede ser multiplicado en condiciones artificiales, o si simplemente debe ser extraído del ambiente en que se encuentra y colocado en el sistema de interés (Eilenberg *et al.*, 2001).

La liberación del agente de control puede realizarse por *inoculación* o por *inundación*. En el primer caso se espera que el organismo por sus propios medios pueda alcanzar los niveles poblacionales necesarios para efectuar el control. En el segundo caso, la liberación debe realizarse en forma masal para poder alcanzar el objetivo deseado (Van Lenteren *et al.*, 2003).

Otra estrategia consiste en la multiplicación *in-situ* del agente de control, realizando prácticas que propicien un significativo aumento de la población, sin necesidad de incorporar organismos externos (Akhtara y Malikb, 2000).

De un modo general, *Nacobbus aberrans* ha sido foco de atención en cultivos intensivos y semi-intensivos donde, hasta hace pocos años, el uso de fumigantes biocidas era una práctica habitual. Esto generó un retraso en el avance del conocimiento, la información y la generación de productos de control biológico; cabe pensar también, que el aumento en la incidencia de los nematodos noduladores, puede estar asociada a la eliminación constante y permanente de sus enemigos naturales.

Si bien cualquier tipo de microorganismo es factible de ser utilizado como agente de control de *N. aberrans*, las investigaciones documentadas incluyen principalmente el uso de:

- Hongos:

- Arthrobotrys* spp (Gives *et al.*, 1994)

- Pochonia chlamydosporia* (Flores-Camacho *et al.*, 2007)

- (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2011)

- Purpureocillium lilacinum* (Gortari y Hours, 2016)

- Bacterias:

- Pseudomonas protegens*: (Lax *et al.*, 2013)

- Photorhabdus*; *Xenorhabdus* (Caccia *et al.*, 2018)

- Nematodos:

Steinernema rarum y *Heterorhabditis bacteriophora* (Caccia *et al.*, 2013)

Todos estos trabajos fueron efectuados *in vitro*, o en condiciones controladas, en ocasiones con resultados no satisfactorios, o variables debido a diferencias en la efectividad de las distintas cepas o poblaciones testeadas.

En la búsqueda de organismos que puedan ser utilizados en la producción agropecuaria como agentes de biocontrol de nematodos deben tenerse en cuenta algunas consideraciones. En primer lugar, (a) cumplir con la premisa del control biológico de reducir la población del nematodo o suprimir su accionar; (b) no ser patógeno para el cultivo, las personas u otros animales; (c) sobrevivir a las condiciones ambientales del agroecosistema incluso en ausencia del hospedero; (d) que su multiplicación sea simple y económica; (e) ser compatible con las prácticas y productos fitosanitarios de uso frecuente; (f) no modificar de forma significativa las prácticas que el productor realiza habitualmente.

Es difícil encontrar un organismo que cumpla con todas esas características, e incluso es necesario reflexionar en que muchas de las prácticas que son habituales en la producción hortícola deben ser cambiadas para que el control biológico sea compatible. Sin embargo, el cumplimiento de los atributos mencionados, promoverá la aceptación y difusión de este tipo de técnicas, contribuyendo en la transición hacia sistemas agroecológicos.

5.1.1 Utilización de hongos para el control de nematodos fitoparásitos

Los hongos nematófagos están presentes en la naturaleza en los más diversos ambientes. Dentro de este grupo, que incluye a aquellos hongos que parasitan o afectan nematodos en uno o varios de sus estadios de vida, han sido relevadas más de 700 especies (Yu *et al.*, 2014). En su mayoría se trata de saprófitos que habitan el suelo y cuentan con una gran capacidad de adaptación, por lo que despiertan un gran interés entre los investigadores por su potencial uso como agentes de control biológico.

Se estima que el hábito nematófago es una evolución de su comportamiento celulolítico y lignolítico, permitiendo a estos taxones ampliar sus fuentes de aportes de nutrientes (Barron, 1992).

A partir de las experiencias exitosas en las que hongos lograron ejercer algún tipo de control sobre nematodos fitoparásitos, es posible clasificarlos en cuatro grupos de acuerdo a su modo de acción.

1) *Hongos atrapadores de nematodos*

Son hongos que desarrollan estructuras específicas que les permiten atrapar formas móviles de nematodos. Las trampas pueden ser hifas adhesivas, esporas y nódulos adhesivos, redes tridimensionales de hifas adhesivas, anillos constrictores, y anillos no constrictores. Los anillos constrictores están formados por hifas que cuando son atravesados por los vermiformes se contraen rápidamente. Los anillos no constrictores tienen su superficie interna en forma de bisel y por el movimiento del nematodo el anillo se traba en las partes anchas del cuerpo (Stirling, 1991; Viaene *et al.*, 2006).

Independientemente de cuál sea la “trampa” que esté siendo utilizada, luego de la captura, el hongo invade y degrada al nematodo a través de una lisis enzimática (Nordbring-Hertz, *et al.*, 2006).

2) *Hongos productores de toxinas*

Son hongos que secretan toxinas que inmovilizan o matan a los nematodos para el posterior ingreso de las hifas y digestión de los mismos. Si bien la mayoría de la información disponible es en torno a los géneros *Pleurotus* y *Coprinus*, (Kwok, *et al.*, 1992; Luo, *et al.*, 2004) se estima que este modo de acción se repite en otros taxones de Basidiomicota (López-Lorca *et al.*, 2008).

3) *Hongos parásitos de huevos y hembras*

Este grupo de hongos utiliza apresorios o zoosporas para ingresar a nematodos que se encuentren en estado sedentario, no atacando a formas móviles (Chen *et al.*, 2004). Los nematodos endoparásitos de los géneros *Meloidogyne* y *Nacobbus*, poseen dos estadios de gran quietud (hembra adulta y huevo) que los convierte en presa fácil de estos hongos.

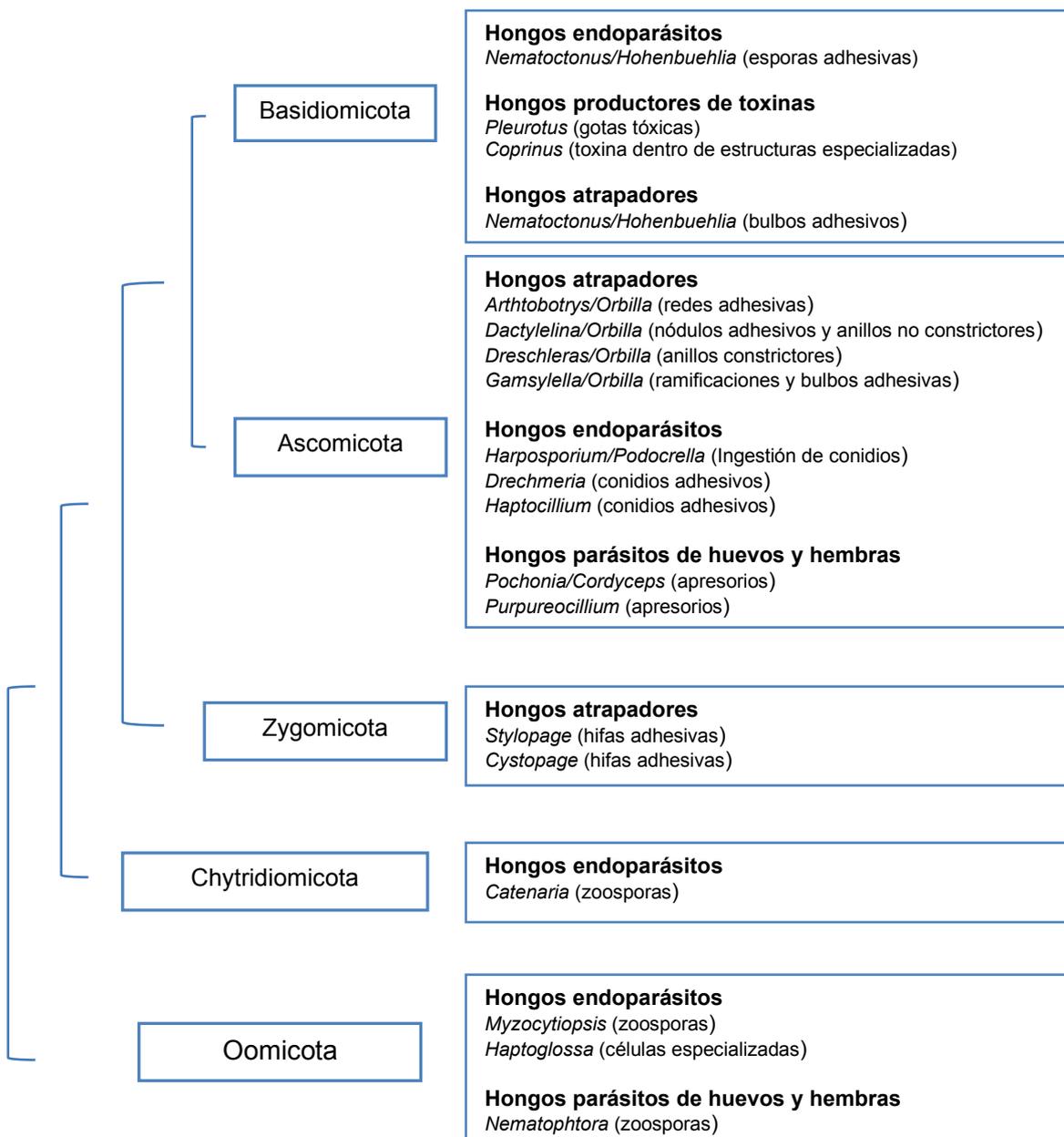
4) *Hongos parásitos de vermiformes*

Estos hongos producen esporas móviles que se adhieren a la cutícula de los nematodos hospederos. Estas esporas germinan y emiten hifas que penetran la cubierta y se nutren del contenido pseudocelomático del nematodo. Los taxones de

este grupo tienen un crecimiento limitado en medios de cultivo y tienen baja sobrevivencia en estado saprofito (Siddiqui y Mahmood, 1996).

La siguiente figura (Figura 5.1) es una adaptación de una revisión realizada López-Llorca *et al.* (2008) donde se mencionan los principales géneros de hongos nematófagos ubicándolos taxonómicamente e indicando su modo de acción en el control de nematodos.

Figura 5.1. Ubicación taxonómica de los principales hongos nematófagos.



El primero de los nombres corresponde a la forma anamorfa, y el segundo a la forma teleomorfa.
Adaptado de López-Llorca *et al.* (2008)

5.1.2 *Purpureocillium lilacinum*

Purpureocillium lilacinum Luangsa-ard, 2011 (= *Paecilomyces lilacinus* Samsons 1974) es un hongo perteneciente al orden Hypocreales de la división Ascomycota. Forma colonias planas, de aspecto aterciopelado que inicialmente son de color blanco, pero paulatinamente se tornan rosadas o violáceas por la formación de conidióforos, fíalides y conidios. Sus hifas son septadas y hialinas; los conidios unicelulares, son de forma globosa u oblonga y se agrupan formando largas cadenas (Luangsa-ard *et al.*, 2011).

Se trata de un hongo saprofítico, productor de diversas enzimas líticas, que crece rápidamente colonizando distintos sustratos orgánicos presentes en el suelo. Cuando el micelio crece en torno a la masa de huevos de nematodos, la colonización de los huevos, ocurre por la penetración de hifas individuales que accionan de forma mecánica y enzimática sobre la cutícula. Algunas cepas de *P. lilacinum* son resistentes a la actividad antimicrobiana que ejerce la matriz gelatinosa de la masa de huevos, sugiriendo que sus posibilidades de parasitismo dependen de esta resistencia (Orion y Kritzman, 1991).

Su efectividad en el control de nematodos agalladores ha hecho que en algunos países llegue a convertirse en un producto comercial. Sin embargo, la posibilidad de que algunas cepas causen lesiones oculares y daños en la piel de humanos, ha limitado en muchas ocasiones su registro como producto (Stirling, 1991).

Figura 5.2 Microscopía electrónica de conidióforos, fíalidas y conidios de *P. lilacinum*

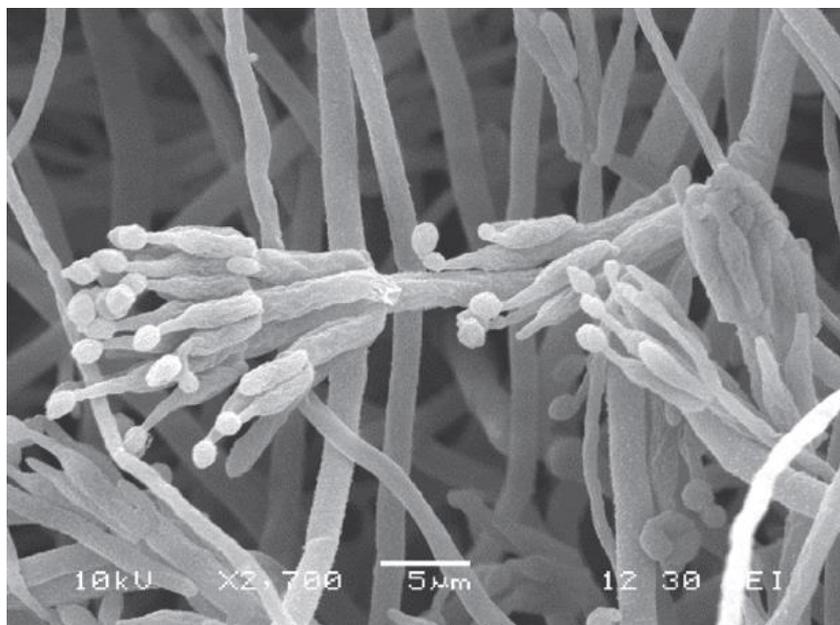


Imagen Xingjie *et al.*, 2017

5.1.3 *Pleurotus spp.*

Los hongos del género *Pleurotus* pertenecen al orden Agaricales de la división Basidiomycota. Son hongos lignocelulolíticos que en ambientes naturales son encontrados creciendo en raíces, ramas y troncos, ya sean vivos o muertos, por lo que son considerados saprófitos o parásitos débiles (Yildiz *et al.*, 2002; Martínez *et al.* 2005). Estos hongos son conocidos con el nombre de girgolas y tienen gran difusión por su uso culinario.

El nombre del género deriva de la unión de la palabra griega *Pleura* que significa “costado o lateral” y *Otus* que en latín significa oreja. Estos términos hacen referencia a la morfología del cuerpo fructífero donde el estípite se ubica en posición excéntrica al píloro (sombrero) (Figura 5.3).

Figura 5.3. Fructificaciones de *Pleurotus ostreatus*.



Las especies de este género crecen en un rango de temperaturas entre 15 y 31 °C y pueden colonizar sustratos como papel, cartón, residuos de la industria maderera, pajas y bagazos. Para la etapa de crecimiento micelial requieren oscuridad y para la

etapa de fructificación requieren iluminación con longitudes de onda corta (Sánchez, 1994). Las basidiosporas producidas por los cuerpos fructíferos son haploides y dan lugar a micelios con células uninucleadas denominado micelio primario. Por plasmogamia entre hifas de distinta polaridad dan lugar a células binucleadas a partir de la cual se desarrolla el micelio secundario que es el que tiene la capacidad de generar fructificaciones (Rajaratnam *et al.*, 1987).

Mas allá de la relevancia ecológica por su capacidad de degradar materiales orgánicos, y su importancia culinaria por su alto valor nutricional, *Pleurotus spp.* produce importantes biomoléculas como lectinas, proteínas, enzimas y ácidos orgánicos, que resultan de interés por su actividad biológica (Papaspyridi *et al.*, 2011). El interés en esta tesis está vinculado a la producción de proteínas con actividad nematotóxica.

5. 2 PRODUCCIÓN DE INÓCULO FÚNGICO

No existen en el mercado nacional inóculos comerciales de *Purpureocillium lilacinum*, ni de *Pleurotus spp.*, razón por la cual se requiere la producción de inóculo propio para realizar los distintos ensayos. Cabe aclarar, que en el caso de *P. ostreatus*, por ser el hongo utilizado para la producción de gírgolas existen diversos circuitos comerciales de producción de “semilla” o inóculo para los productores. Sin embargo, para poder asegurar la utilización de una misma cepa en sucesivos ensayos se procedió a producir el inóculo en las instalaciones del Instituto de Fisiología Vegetal.

El Dr. Mario Saparrat cedió para este trabajo 4 cepas del género *Pleurotus* identificadas como: *P. cornucopiae* var. *Citrinopileatus*; *P. djamor*; *P. ostreatus* procedencia M; y *P. ostreatus*, procedencia C.

La cepa *P. lilacinum* #952 fue cedida por el Instituto Carlos Spegazzini, y cinco cepas más, identificadas como *P. lilacinum* #876; #C1; #C2; #C3 y #C4 procedían del Centro de Investigaciones en Fermentaciones Industriales.

5.2.1 Objetivos

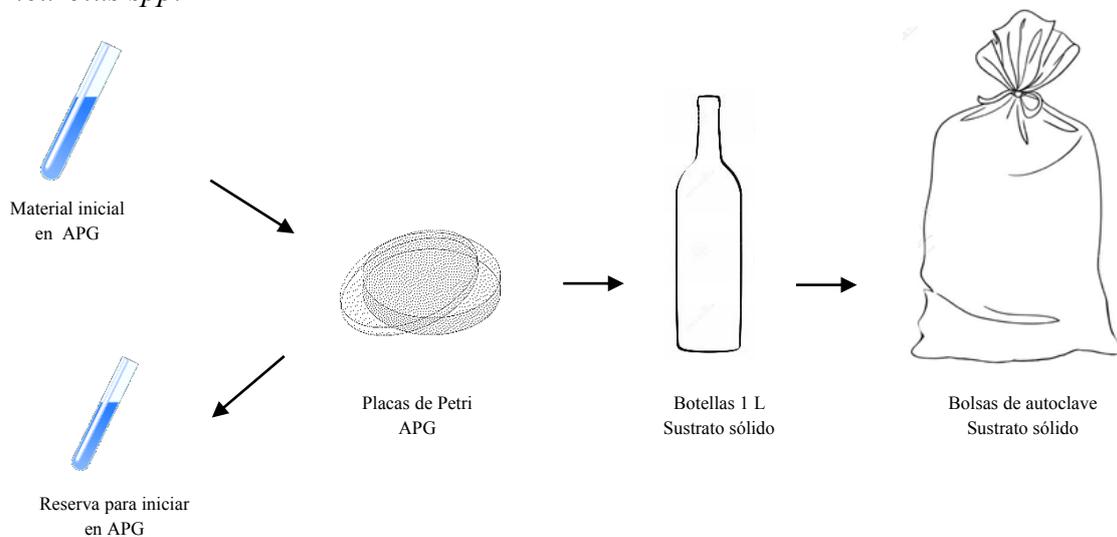
- Seleccionar una cepa de *Pleurotus spp.*, y una cepa de *Purpureocillium lilacinum* cuya multiplicación sea factible de realizar en el Instituto de Fisiología Vegetal.

- Producir inóculo en medio sólido de *Pleurotus* spp. y *Purpureocillium lilacinum* en cantidad suficiente para la realización de diversos ensayos a escala de invernadero.

5.2.2 Metodología

Las 4 poblaciones de *Pleurotus* spp, y las 6 poblaciones de *P. lilacinum* fueron recibidas en tubos de ensayos conteniendo medio de cultivo agar papa glucosado (APG) colonizado por los hongos. A partir del material recibido, se estableció una secuencia de multiplicación, que consistía en el repique del material desde los tubos a cajas de Petri con medio APG, de éstos a botellas con medio sólido (granos de avena), y finalmente el pasaje desde las botellas a bolsas de autoclave con el mismo sustrato sólido (Figura 5.3).

Figura 5.4. Esquema del procedimiento para la multiplicación de *P. lilacinum* y *Pleurotus* spp.



Existen en la literatura diversos protocolos con recomendaciones para la multiplicación de *Pleurotus* spp. (Albertó, 2008; López-Rodríguez *et al.*, 2008) y *P. lilacinum* (Brand *et al.*, 2010; Gao y Liu, 2010; Gortari y Hours, 2016). En este trabajo se diseñó una secuencia de trabajo y de condiciones, que pueda ser utilizado para las dos especies de interés.

Repiques de material

A partir del material inicial, se realizaron bajo el flujo laminar, repiques a placas de Petri conteniendo medio de cultivo agar papa glucosado (APG) 1,5%, pH 6. Luego

de la incubación, una vez que la placa se encontraba totalmente colonizada, se procedió a retirar discos de 0,5 cm de diámetro, para realizar la siembra. Para la siembra destinada a la reserva de material, se colocó 1 disco por tubo de ensayo con medio APG y para la multiplicación se colocaron 10 discos en cada botella de sustrato sólido.

Una vez que las botellas estaban totalmente colonizadas se utilizaban para sembrar las bolsas con sustrato sólido, y de esta forma aumentar el volumen de inóculo. Con 250 mL de inóculo de las botellas se sembraba una bolsa de 7 L. de capacidad. Una vez que las bolsas estaban totalmente colonizadas estaban listas para ser utilizadas.

Condiciones de incubación

Para incubar el material, ya sean, tubos, placas, botellas o bolsas, se calefaccionó un cuarto oscuro con temperatura controlada en 25 ± 3 °C en el que se colocaron estanterías para dividir y organizar el material.

Una vez finalizado el proceso, las bolsas totalmente colonizadas eran guardadas en heladera para su posterior uso.

Sustratos

En este trabajo se escogió como sustrato sólido granos de avena, por ser un material disponible en la zona, de fácil de manipulación y almacenamiento. Previo a su utilización, la avena era sumergida durante 18 Hs. en agua a temperatura ambiente para su hidratación, luego era escurrida y colocada dentro de las botellas de vidrio o de las bolsas, para ser autoclavadas durante 20 min, a 121° C.

5.2.3 Resultados

Los repiques realizados a partir del material inicial a placas de Petri de *Pleurotus cornucopiae* var. *Citrinopileatus*, *Pleurotus ostreatus* procedencia M, y las cepas #C1 y #C4 de *P. lilacinum* no prosperaron. Durante la incubación el micelio no creció y terminaron contaminándose.

Con las restantes cepas se realizaron sucesivas multiplicaciones y no todas crecían de la misma manera en las condiciones dadas. *P. ostreatus* procedencia C y *P. lilacinum* #876 colonizaban las placas en un lapso de 10 días, las botellas en 20 días y las bolsas en un mes.

Pleurotus djamor y las cepas #952; #C2 y #C3 de *P. lilacinum* colonizaban las placas de APG en un período de 10 días, pero en el sustrato sólido lo hacían de forma lenta, lo que daba lugar a contaminaciones o bien requerían del doble de tiempo que otras cepas para colonizar totalmente el sustrato (Figura 5.5).

Figura 5.5. Proceso de multiplicación de *Purpureocillium lilacinum* y *Pleurotus spp.*



- a) Placa colonizada por *P.lilacinum*, b) Material inicial de *Pleurotus ostreatus*, c) *P.ostreatus* colonizando sustrato sólido en botellas, a los 15 días (izq) y a los 30 días (der), d) Bolsa de sustrato solido colonizada por *P.lilacinum* el crecimiento se produce desde arriba hacia abajo, e) Bolsa contaminada, f) Imagen mostrando la relación Tubo/botella

5.2.4 Consideraciones finales

El proceso utilizado para la multiplicación de los hongos fue efectivo para algunas de las cepas, lográndose el objetivo inicialmente planteado de producir inóculo para la realización de ensayos.

En función del desempeño de las distintas cepas fueron seleccionadas *Pleurotus ostreatus* procedencia c y *Purpureocillium lilacinum* #876 para la realización de los posteriores ensayos con *N. aberrans* en invernadero. En las siguientes secciones de este capítulo estas cepas serán mencionadas como *Pleurotus ostreatus* y *Purpureocillium lilacinum*.

5.3 ENSAYOS DE CONTROL DE *NACOBBUS ABERRANS* A PARTIR DE LA INOCULACIÓN DEL SUSTRATO CON *PURPUREOCILLIUM LILACINUM* Y *PLEUROTUS OSTREATUS*

5.3.1 Objetivos

Evaluar la incidencia de la inoculación del sustrato con *P. ostreatus* y *P. lilacinum* sobre la población de *Nacobbus aberrans* y sobre el crecimiento de las plantas de tomate platense.

5.3.2 Materiales y métodos

Para producir los plantines que se utilizaron en el ensayo, se desinfectaron semillas de tomate platense que posteriormente fueron sembradas en bandejas de 72 celdas. El sustrato utilizado en las celdas estaba constituido por la siguiente mezcla:

- 1/3 de perlita
- 1/3 de vermiculita
- 1/3 de inóculo de hongos

Se preparó una bandeja con inóculo del hongo *P. ostreatus*, otra con *P. lilacinum* y otra con avena autoclavada (sustrato utilizado para la multiplicación de los hongos) para ser utilizada en el tratamiento control y homogeneizar las condiciones. La provisión de nutrientes durante el crecimiento de las plantas se realizó utilizando una solución nutritiva completa de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950).

Pasados 37 días de la siembra se realizó el trasplante a macetas de 10 L, utilizando como sustrato suelo tindalizado para evitar la influencia de otros microorganismos del

suelo. Las plantas fueron colocadas en un invernáculo con iluminación natural y temperatura controlada mediante ventiladores y radiadores para evitar el estrés térmico. El día siguiente al trasplante la mitad de las plantas fueron inoculadas con 5000 huevos de *N. aberrans*, quedando así definidos los distintos tratamientos.

El ensayo se realizó con un diseño experimental completamente aleatorizado y los tratamientos con un arreglo factorial, siendo los factores: inoculación fúngica e infestación con nematodos, con 3 y 2 niveles respectivamente:

- Sustrato no inoculado con hongos (Control) sin *N. aberrans*
- Sustrato no inoculado con hongos (Control) con *N. aberrans*
- Sustrato inoculado con *P. lilacinum* sin *N. aberrans*
- Sustrato inoculado con *P. lilacinum* con *N. aberrans*
- Sustrato inoculado con *P. ostreatus* sin *N. aberrans*
- Sustrato inoculado con *P. ostreatus* con *N. aberrans*

A los 80 días del trasplante se procedió a realizar las mediciones de conductancia estomática y diámetro del tallo, y luego se procedió a tomar las muestras de tejido aéreo. Por último, se descalzaron las raíces, se tomaron las muestras de suelo y de tejido radicular. Se indican a continuación las determinaciones realizadas con las muestras de material:

- Peso fresco radicular y peso seco aéreo.
- Clorofila total (Wellburn, 1994).
- Proteínas solubles en tejido foliar y radicular (Bradford, 1976).
- Número de huevos alojados en las raíces y número de formas móviles en suelo (Coolen, 1979).
- Población final del nematodo e Índice de reproducción (Oostenbrink, 1966).
- Contenido de malonildialdehído (MDA) en tejido foliar y radicular (Heath y Packer, 1968).
- Contenido de prolina en tejido foliar y radicular (Bates *et al.*, 1973).
- Contenido de fenoles totales en tejido foliar y radicular (Singleton y Rossi, 1965).

5.3.3 Resultados y discusión

El análisis nematológico de las raíces y del sustrato mostró diferencias significativas entre el tratamiento control, y los tratamientos con ambos hongos. Para las variables número de huevos en la raíz, número de vermiformes en el sustrato, y población final, el tratamiento inoculado con *P. ostreatus* presentó valores significativamente inferiores al control. A su vez, el tratamiento inoculado con *P. lilacinum* presentó valores significativamente menores a los restantes tratamientos.

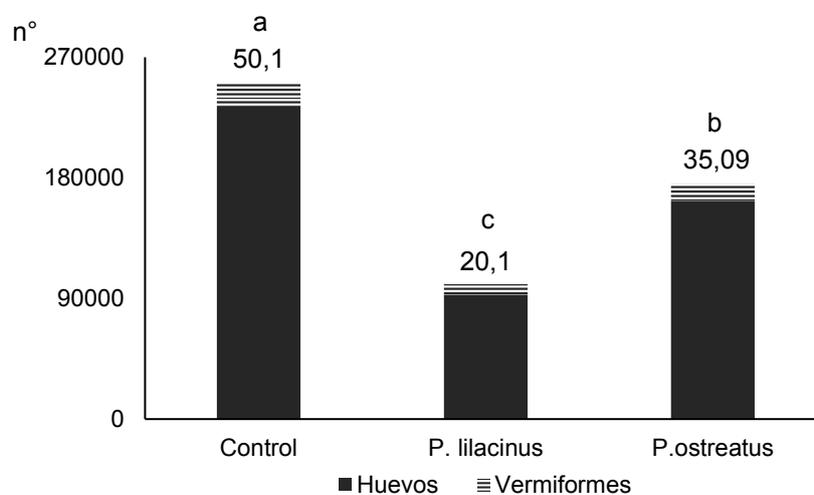
En la tabla 5.1 se resumen los resultados del análisis de varianza de estas variables, y en la Figura 5.6 se presentan los valores medios de población del nematodo con el correspondiente factor de reproducción.

Tabla 5.1 Análisis de varianza de las variables vinculadas a la población de *N. aberrans* en plantas de tomate cultivadas en sustrato inoculado con los hongos nematófagos *Purpureocillium lilacinum* y *Pleurotus ostreatus*.

	Huevos	Vermiformes	Población final
Qm tratamiento.	24743566679,27	113739496,87	28212070063,2
Qm error	790449782,60	18915054,6	835836067,30
CV	17,24 %	34,7 %	16,46%
P	0,0001	0,0155	0,0001

Qm: Cuadrado medio; CV: Coeficiente de variación

Figura 5.6. Población de *Nacobbus aberrans* y su correspondiente factor de reproducción en plantas de tomate platense cultivadas en sustrato inoculado con los hongos nematófagos *Purpureocillium lilacinum* y *Pleurotus ostreatus*.



El valor en el eje corresponde a población final. El fr se indica sobre la columna. Columnas acompañadas por letras distintas indican diferencias significativas en la población final, según el test de LSD de Fisher ($p \leq 0,01$)

Distintos trabajos documentan la actividad parasítica de *P. lilacinum* en nematodos, tanto en estadio de huevo (Gortari y Hours, 2016), como en estadios móviles (Singh y Mathur, 2010; Perraza-Padilla *et al.*, 2014), como hembras sedentarias (Khan *et al.*, 2006). La mayoría de ellos son realizados *in vitro* e indican que no todas las cepas del hongo muestran la misma eficiencia como biocontroladoras. En este sentido, un aspecto importante es la producción de enzimas por parte del hongo que le permiten degradar las cubiertas de sus hospederos y consumir los sustratos que hay en ellos.

P. lilacinum produce quitinasas, β -1,3-glucanase y quimi tripsina (una serina proteasa) que le confieren la capacidad de penetrar a sus hospederos (Gupta *et al.*, 1993). Khan *et al.*, (2004) describen detalladamente como se degradan la cubierta lipoproteica y la membrana vitelina de huevos de *Meloidogyne spp.* por la acción de este conjunto de enzimas. Este hongo, produce además leucinostatinas A y B (Wang *et al.*, 2016), compuestos antibióticos que tienen la capacidad de inhibir la síntesis de ATP en las mitocondrias y en otras vías de fosforilación (Fukuyima *et al.*, 1983).

Kobayashi *et al.* (2003), aislaron y purificaron un enzima transglucosidasa con capacidad para hidrolizar maltosa, nigerosa, kojibiosa y almidón, y luego sintetizar oligosacáridos con uniones para α -1,3 y α -1,2.

Un trabajo publicado recientemente por Gortari y Hours (2019) documenta la colonización de huevos de *N. aberrans* por *P. lilacinum*. Es interesante destacar que una de las cepas utilizadas en ese trabajo, la #876, es la misma que se utilizó en este ensayo, respaldando la reducción en el factor de reproducción aquí documentada (Imagen 5.4).

Figura 5.7. Huevos de *Nacobbus aberrans* colonizados por *Purpureocillium lilacinum* #876.

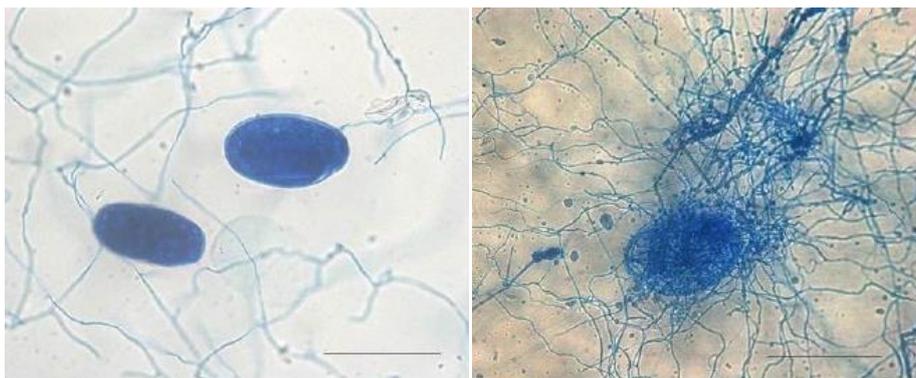


Imagen: Gortari y Hours 2019

Izq. Imagen tomada luego de 24 hs. de incubación. Der. Imagen tomada luego de 120 hs. de Incubación

En el caso de *P. ostreatus* las investigaciones, respecto de su potencialidad en el control de nematodos, no son tan numerosas. Este Basidiomicete, a diferencia de *P. lilacinum*, no produce estructuras mecánicas que le permitan atrapar nematodos, sin embargo, produce una potente toxina que los inmoviliza (Frangež *et al.*, 2017) para luego digerirlos (Barron, 1992). En investigaciones donde se extrajo la toxina del micelio para ser aplicada *in vitro* sobre formas móviles de los nematodos, se reportaron efectos como constricciones de cuello y cabeza (Satou *et al.*, 2008) inmovilidad y mortalidad (Heydari *et al.*, 2006). Similares efectos se observaron *in vitro* cuando se inocularon de forma conjunta en placas de Petri nematodos y el hongo (Palizi *et al.*, 2009) aunque en ocasiones solo ocurre parálisis sin haber colonización. Truong *et al.* (2007) sugieren que la colonización y digestión de nematodos por *Pleurotus* está determinada por la riqueza del medio de cultivo. No hay antecedentes en la bibliografía de trabajos que incluyan en forma simultánea cultivos, nematodos y *P. ostreatus*.

Los resultados obtenidos en este trabajo no permiten dilucidar si el efecto fue nematocida o nematostático, pero confirman una reducción en el factor de reproducción. Cabe destacar, que en este ensayo se cumplió uno de los requerimientos del control biológico que implica la utilización de organismos vivos a diferencia de otros trabajos antes mencionados que utilizaron los metabolitos que el hongo produce. Al momento del trasplante, se observaron en algunos plantines la presencia de fructificaciones (girgolas). Del mismo modo, entre las semanas 2 y 4 posteriores al trasplante fueron observadas fructificaciones en las macetas, indicando que, al menos hasta ese momento, el hongo se encontraba activo (Figura 5.8).

Figura 5.8. Fructificaciones de *Pleurotus ostreatus* en plantín de tomate (izquierda) y maceta con tomate platense luego del trasplante (derecha).



En este ensayo, el análisis de variancia mostró que la interacción entre los factores “Inoculación con hongos” e “inoculación con el nematodo” no afectó significativamente el crecimiento de las plantas, sin embargo, hubo diferencias significativas entre los distintos niveles de estos factores principales. El peso fresco radicular, el peso seco aéreo, y el contenido de clorofila, se redujo en las plantas parasitadas por *N. aberrans*, respecto de aquellas no parasitadas. El contenido de clorofila y el peso radicular de las plantas inoculadas con *P. lilacinum* y con *P. ostreatus* fueron mayores y menores que el de las plantas control respectivamente. En el caso del peso seco aéreo no hubo diferencias entre las inoculaciones con hongos. (Tabla 5.2).

Tabla 5.2 Análisis de varianza y comparación de medias de peso fresco de raíz, peso seco aéreo y contenido de clorofila de plantas de tomate cultivadas en sustrato inoculado con los hongos nematófagos *Purpureocillium lilacinum* y *Pleurotus ostreatus* y con *Nacobbus aberrans*.

Peso fresco raíz							
Análisis de Varianza				Valores medios			
Fv	Qm	Fc	p				
Hongos (H)	2279,07	23,7	0,00001**	Control: 101,7	b	Sin <i>N.aberrans</i> : 107,12	a
Nematodo (N)	515,8	5,3	0,029*	<i>P.lilacinum</i> : 118,6	a	Con <i>N.aberrans</i> 98,8	b
HxN	265,4	2,7	0,08	<i>P.ostreatus</i> : 88,5	c		
Error	96,1						

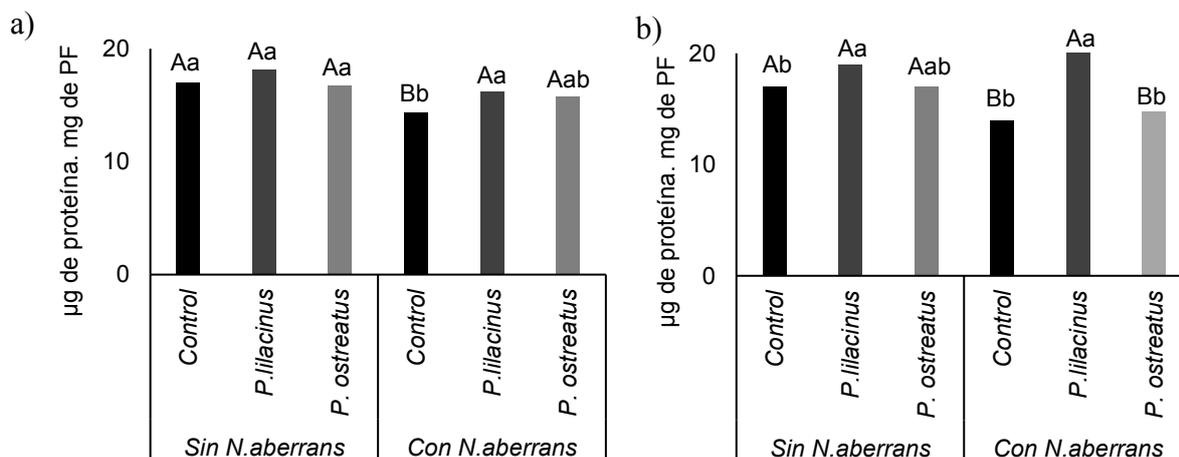
CV: 9,5 %

Peso seco aéreo						
Análisis de Varianza				Valores medios		
Fv	Qm	Fc	p			
Hongos (H)	86,2	2,76	0,08	Control: 59,3 <i>P.lilacinum</i> : 60,7 <i>P.ostreatus</i> : 55	Sin <i>N.aberrans</i> : 63,8	a
Nematodo (N)	913,0	29,3	0,00001**		Con <i>N.aberrans</i> 52,8	b
HxN	9,86	0,31	0,73			
Error	31,14					
CV: 10 %						
Clorofila $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$						
Análisis de Varianza				Valores medios		
Fv	Qm	Fc	P			
Hongos (H)	30,6	24,1	0,00001**	Control: 9,6 b <i>P.lilacinum</i> : 11,04 a <i>P.ostreatus</i> : 7,5 c	Sin <i>N.aberrans</i> : 10,02	a
Nematodo (N)	11,3	8,9	0,006**		Con <i>N.aberrans</i> 8,79	b
HxN	3,00	2,3	0,11			
Error	1,2					
CV: 12 %						

Medias acompañadas por letras distintas, indican diferencias significativas según el test de LSD de Fisher *($p \leq 0,05$) **($p \leq 0,01$).

El contenido de proteínas en las hojas no presentó diferencias entre los tratamientos en ausencia del nematodo. Comparando estos valores con los tratamientos parasitados, las plantas control tuvieron una reducción significativa en el contenido de proteínas (Figura 5.3a). En el caso de las raíces, tanto en la ausencia como en presencia del nematodo, las plantas inoculadas con *P. lilacinum* tuvieron un mayor contenido de proteínas. Comparando plantas parasitadas y no parasitadas, aquellas inoculadas con *P. ostreatus* y las plantas control, tuvieron una reducción significativa en la concentración de proteínas (Figura 5.3.b).

Figura 5.3 Contenido de proteínas en a) tejido foliar y en b) tejido radicular de plantas de tomate cultivadas en sustrato inoculado con los hongos nematófagos *Purpureocillium lilacinum* y *Pleurotus ostreatus* y con *Nacobbus aberrans*.



Letras mayúsculas comparan una misma condición fúngica en ausencia y presencia del nematodo. Letras minúsculas comparan los distintos hongos dentro de la misma condición nematológica.

Columnas acompañadas por letras distintas indican diferencias significativas según el test de LSD de Fisher ($p \leq 0,01$)

En las mediciones de conductancia estomática de las plantas sin inoculación con hongos nematófagos, se observó una reducción significativa en el flujo de vapor de las hojas al ser parasitadas por el nematodo. En los tratamientos inoculados con los hongos, la presencia o ausencia de *Nacobbus* no provocó diferencias significativas (Tabla 5.3).

Comparando el calibre de los tallos de las plantas no parasitadas, se observa que las inoculadas con *P. lilacinum* tuvieron un mayor diámetro, sin embargo, entre las plantas parasitadas no ocurre esta diferencia (Tabla 5.3).

En ausencia del nematodo las plantas control y las inoculadas con *P. lilacinum* tuvieron un mayor rendimiento que las del tratamiento con *P.ostreatus*. En presencia del nematodo, los controles tuvieron una reducción significativa en el peso de frutos cosechados, pero los tratamientos con hongos consiguieron mantener sus valores sin diferencias (Tabla 5.3).

Tabla 5.3 Conductancia estomática, calibre del tallo y peso de plantas de tomate platense cultivadas en sustrato inoculado con los hongos nematófagos *Purpureocillium lilacinum* y *Pleurotus ostreatus* y con *Nacobbus aberrans*.

	Sin <i>Nacobbus aberrans</i>			Con <i>Nacobbus aberrans</i>		
	Control	<i>P.lilacinum</i>	<i>P.ostreatus</i>	Control	<i>P.lilacinum</i>	<i>P.ostreatus</i>
Conductancia (mmol.m⁻²s⁻¹) CV: 24,2 %	52,2 Aa	47,3 Aa	51,9 Aa	37,7 Ba	36,5 Aa	40,02 Aa
Calibre (cm) CV: 11,26%	0,86 Ab	1,06 Aa	0,84 Ab	0,76 Aa	0,78 Ba	0,81 Aa
Rendimiento (g) CV: 22,8 %	711 Aa	714 Aa	573 Ab	596 Bab	678 Aa	552 Ab

Letras mayúsculas comparan una misma condición fúngica en ausencia y presencia del nematodo.

Letras minúsculas comparan los distintos hongos dentro de la misma condición nematológica.

Medias acompañadas por letras distintas, indican diferencias significativas según el test de LSD de Fisher ($p \leq 0,05$)

Al evaluar el crecimiento de las plantas se observó el efecto negativo del parasitismo del nematodo el cual ya fue discutido en capítulos anteriores. En algunas variables se observó mayor crecimiento en las plantas inoculadas con *P. lilacinum* y menor crecimiento en las inoculadas con *P. ostreatus*. Hernandez-Leal *et al.* (2011) describieron la capacidad que tiene *P. lilacinum* para solubilizar fosfatos de hierro y fosfatos de calcio. Cavello *et al.* (2015) indican que este hongo produce ácido indol acético (AIA) y libera amonio a partir de la degradación de compuestos proteicos del suelo. Es decir, que además de su potencial como agente de biocontrol, es un organismo

considerado promotor del crecimiento vegetal. En el caso de *Pleurotus* puede hipotetizarse que existe algún tipo de competencia o inmovilización de nutrientes por parte del micelio activo, ya que creció y fructificó en simultáneo con las plantas. Las fructificaciones de *P. ostreatus* contienen 90% de agua y son consideradas un alimento rico en proteínas, calcio, fósforo, y vitaminas (tiamina, riboflavina, piridoxina, cobalamina) (Breene, 1990); elementos que elabora y almacena a partir del sustrato, en este caso el suelo de la maceta.

Al analizar en el tejido foliar, los parámetros vinculados al estrés, tales como conductividad relativa de membranas celulares, contenido de malonildialdehído, de fenoles y de prolina, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 5.4).

El contenido de compuestos fenólicos en las raíces, que fueron comentados en capítulos anteriores por su participación en la defensa vegetal, se incrementó significativamente en respuesta a *N. aberrans*, tanto en las plantas control como en las inoculadas con los hongos (Tabla 5.4).

Como consecuencia del daño provocado por el nematodo, la conductividad relativa en el tejido radicular se incrementó en todos los tratamientos parasitados; siendo que aquellos inoculados con hongos, presentaron valores inferiores al de las plantas control. Algo similar se observó en la peroxidación de lípidos, donde las raíces parasitadas tuvieron un mayor contenido de MDA, sin haber diferencias entre las plantas control y las inoculadas con hongos.

En respuesta al estrés, la acumulación de prolina aumentó significativamente en las plantas controles, mientras que las inoculadas con hongos no mostraron diferencias.

Tabla 5.4 Indicadores de estrés en plantas de tomate platense, cultivadas en sustrato inoculado con los hongos nematófagos *Purpureocillium lilacinum* y *Pleurotus ostreatus* y con *Nacobbus aberrans*.

	Sin <i>Nacobbus aberrans</i>			Con <i>Nacobbus aberrans</i>		
	Control	<i>P.lilacinum</i>	<i>P.ostreatus</i>	Control	<i>P.lilacinum</i>	<i>P.ostreatus</i>
CR hoja (%)	11,8 Aa	11,1 Aa	11,3 Aa	13,14 Aa	13,1 Aa	11,3 Aa
CV: 14,3 %						
CR raíz (%)	13,3 Ba	12,1 Ba	12,4 Ba	29,8 Aa	23,2 Ab	24,3 Ab
CV: 19,9 %						
MDA Hoja (nmoles.grPF ⁻¹)	7,2 Aa	5,86 Aa	6,8 Aa	6,65 Aa	5,58 Aa	5,07 Aa
CV: 19,2 %						
MDA Raíz (nmoles.grPF ⁻¹)	2,01 Ba	1,9 Ba	1,8 Ba	3,99 Aa	3,78 Aa	3,28 Aa
CV: 17,8 %						
Fenoles Hoja (µg.mgPF ⁻¹)	10,6 Aa	12 Aa	10,9 Aa	10,9 Aa	13,1 Aa	10,6 Aa
CV: 19%						
Fenoles Raíz (µg.mgPF ⁻¹)	5,4 Ba	4,7 Ba	5,4 Ba	6,6 Aa	6,2 Aa	7 Aa
CV: 14,4 %						
Prolina Hoja (µmoles.g PF ⁻¹)	13,6 Aa	11,05 Aa	11,5 Aa	13,3 Aa	14,09 Aa	10,7 Aa
CV: 23%						
Prolina Raíz (µmoles.g PF ⁻¹)	529 Ba	463 Aa	561 Aa	843,8 Aa	458 Ac	667,2 Ab
CV: 15,3 %						

Letras mayúsculas comparan una misma condición fúngica en ausencia y presencia del nematodo.

Letras minúsculas comparan los distintos hongos dentro de la misma condición nematológica.

Medias acompañadas por letras distintas, indican diferencias significativas según el test de LSD de Fisher ($p \leq 0,05$)

En los parámetros vinculados al estrés, solo se observaron aumentos significativos en aquellos relacionados al parasitismo de *N. aberrans*, no registrándose indicios de que los hongos nematófagos inoculados en el sustrato tengan algún efecto negativo sobre las plantas.

5.5 ENSAYO EXPERIMENTAL COMBINANDO HONGOS NEMATÓFAGOS Y HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES

Se inoculó a la siembra con el hongo micorrízico *Funeliformis mosseae*, y al trasplante los hongos nematófagos, *P. lilacinum* y *P. ostreatus*.

5.5.1 Objetivos

- Evaluar si la inoculación *P. lilacinum* y *P. ostreatus* es compatible con la simbiosis micorrízica de *F. mosseae* en plantas de tomate platense.

5.5.2 Metodología

Material vegetal

La preparación de los plantines inoculados *F. mosseae* se realizó como fuera descrito en el capítulo 3.

Trasplante e inoculación

Se llenaron 24 macetas de 10 L. de capacidad con suelo argiudol tinalizado que fueron colocados en invernáculo con iluminación natural y temperatura controlada entre 20 y 28°C. Al momento del trasplante a 12 plantines se les adicionaron 25 mL. de sustrato sólido inoculado con *P. lilacinum* y 25 mL. de sustrato sólido inoculado con *P. ostreatus*.

El día siguiente al trasplante se realizó la inoculación con 5000 huevos y juveniles de *N. aberrans* quedando definidos los 4 tratamientos:

- Plantas micorrizadas (Control)
- Plantas micorrizadas + hongos nematófagos (Combinado)
- Plantas micorrizadas + *N. aberrans* (Control + N.)
- Plantas micorrizadas + hongos nematófagos + *N.aberrans* (Combinado + N)

Diseño experimental y análisis de resultados

El ensayo se realizó con un diseño experimental completamente aleatorizado y los tratamientos con un arreglo factorial, siendo los factores: inoculación con nematófagos e infestación con nematodos con dos niveles cada uno. La micorrización no constituye una fuente de variación porque todas las plantas estaban micorrizadas.

Variables analizadas

A los 70 días de la inoculación se descalzaron las plantas, y se determinó: el peso fresco radicular, el porcentaje de micorrización (%M), la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa, y el número de huevos del nematodo.

5.5.3 Resultados y discusión

El análisis de varianza del peso fresco radicular no indicó un efecto significativo de la interacción entre los dos factores principales ($p \geq 0,05$), pero sí entre las plantas inoculadas con la combinación de hongos (peso fresco medio: 48 gr) y las no inoculadas (peso fresco promedio: 37 gr.) ($p \leq 0,05$).

En el caso del porcentaje de micorrización no hubo interacción entre los factores, pero las plantas que recibieron el tratamiento combinado de hongos tuvieron un mayor crecimiento fúngico en el interior de las raíces. (Tabla 5.5 a).

La actividad de la enzima succinato deshidrogenasa en ausencia del nematodo no presentó diferencias en las plantas inoculadas y no inoculadas con los hongos. Cuando el nematodo estuvo presente las plantas control presentaron un menor % SDH. (Tabla 5.5 b).

Tabla 5.5 a) Porcentaje de micorrización (%M) y b) Porcentaje de actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (%SDH) en raíces de tomate platense inoculadas con *F.mosseae* y co-inoculadas con hongos nematófagos y el nematodo *Nacobbus aberrans*.

a)

Tratamiento	%M	
Control	47	A
Control + N	42	
Combinado	74	B
Combinado + N	65	

b)

Tratamiento	% SDH	
	Sin <i>N. aberrans</i>	Con <i>N. aberrans</i>
Control	42,2 Aa	29,6 Bb
Combinado	64,8 Aa	51,2 Aa

Algunos autores han documentado

que el hongo *P. lilacinum* libera a su entorno amonio y ácido indolacético (Cavello *et al.*, 2015) lo que podría explicar el mayor crecimiento radicular de las plantas que recibieron el tratamiento combinado de hongos.

Las auxinas son compuestos que tienen una participación clave en la interacción entre los hongos micorrícicos y la raíz durante el proceso de colonización (Etemadi *et al.*, 2014). Ha sido demostrado también que su presencia estimula el crecimiento de las hifas en la rizósfera (Ludwig-Muller, 2002).

La comparación de la población final de *N. aberrans* entre el tratamiento control (solo micorriza) y el tratamiento inoculado con la combinación de hongos no presentó diferencias significativas ($p \geq 0,05$). El valor promedio para el primer caso fue de 43.200 individuos y de 36.520 para el segundo.

5.4 CONSIDERACIONES FINALES DE ESTE CAPÍTULO

Las dos cepas de hongos puestas a prueba en este capítulo tuvieron un efecto supresor de la población de *N. aberrans* en las condiciones de trabajo aquí presentadas. Si bien el control que ejerció *P. lilacinum* fue mayor que el de *P. ostreatus*, se trata de organismos con características distintivas, con potencial particular, para seguir siendo estudiadas en experimentos a mayor escala.

El efecto promotor de crecimiento de *P. lilacinum* sobre las plantas, sumado al control ejercido sobre el nematodo, lo convierten en un potencial bioinsumo para ser utilizado durante el ciclo del cultivo. Sus características biológicas de reproducción (producción de conidios) amplían las posibilidades de producción de inóculo.

P. ostreatus presenta gran capacidad para degradar materiales lignocelulósicos. Esto le confiere la posibilidad de ser considerado en procesos fertilización a través de enmiendas orgánicas. Uno de los problemas que enfrentan los productores de girgolas es el descarte de los sustratos al finalizar las cosechas. Si bien se descarta porque la productividad disminuye, son materiales ricos en inóculo fúngico que pueden ser utilizados en la producción hortícola. No existen en nuestro país antecedentes de producción de girgolas en suelo, posibilidad que debe ser estudiada por la potencialidad de ser una producción remediadora de suelos.

En el ensayo de coinoculación, no se observó ningún tipo de incompatibilidad de estos hongos con las micorrizas arbusculares, por el contrario, hubo un incremento de la colonización micorrícica.

Si bien la producción de este tipo de inóculo requiere de determinadas condiciones de humedad, oscuridad y temperatura, no exige sofisticadas instalaciones y se utilizan insumos de bajo costo. Esto aumenta las posibilidades de que estos hongos continúen estudiándose y se conviertan en un bioinsumo para el sector hortícola.

5.5 REFERENCIAS

Akhtara, M.; Malikb, A. 2000. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. Biosource Technology, v. 74, n. 1, p. 35-47.

Albertó, E. Cultivo intensivo de los Hongos Comestibles "Como cultivar Champiñones, Gírgolas, Siitake y otras especies". Editorial hemisferio Sur, Argentina, 265 p. 2008.

Barron, G. L. 1992. Lignolytic and cellulolytic fungi as predators and parasites. En: Carroll, G. C.; Wicklow, D. T. (eds) The fungal community, its organization and role in the ecosystems. Marcel Dekker, New York.

Bates, L.S.; Waldren, R.P.; Tease, I.D. 1973. Rapid determination of the proline for stress studies. Plant Soil, v. 85, p.107-129.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254.

Brand, D.; Soccol, C. R.; Sabu, A.; Roussos, S. 2010. Production of fungal biological control agents through solid state fermentation: a case study on *Paecilomyces lilacinus* against root-knot nematodes. Micología Aplicada Internacional, v. 22, n. 1, p. 31-48.

Breene, W. M. 1990. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. Journal of Food Protection, v. 10, n. 53, p. 883-894.

Caccia, M.; Lax, P.; Doucet, M. E. 2013. Effect of entomopathogenic nematodes on the plant-parasitic nematode *Nacobbus aberrans*. Biology and Fertility of Soils, n. 49, p. 105-109.

Caccia, M.; Marro, N; Rondan, J.; Doucet, M. E.; Lax, P. 2018. Effect of the entomopathogenic nematode-bacterial symbiont complex on *Meloidogyne hapla* and *Nacobbus aberrans* in short-term greenhouse trials. Crop Protection, v. 114, p. 162-166.

Cavello, I.; Crespo, J. M.; García, S.; Zapiola, J.; Luna, M.; Cavalitto, S. 2015. Plant growth promotion activity of keratinolytic fungi growing on a recalcitrant waste known as Hair Waste. Biotechnology Research International, Art. ID 952921, 10 p.

Chen, Z.; Chen, S.; Dickson, D. Nematology: advances and perspectives, management and utilization. Tsingua: U. Press, CABI publishing, 637 p. 2004.

Cobb, N. A. 1917. The *Mononchs*, a genus of free-living predatory nematodes. Contributions to a Science of Nematology. Soil Science, v. 3, p. 431-486.

Coolen, W. A. Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. and other nematodes from roots and soil. En: Lamberti, F.; Taylor, C. E. Root knot nematodes (*Meloidogyne* species) systematics, biology and control. London: Academic Press, p. 317-329. 1979.

Eilenberg, J.; Hajek, A.; Lomer, C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. BioControl, v. 46, p. 387-400.

Etemadi, M.; Gutjahr, C.; Couzigou, J. M.; Zouine, M.; LAuressergues, D.; Timmers, A.; Audran, C.; Bouzayen, M. Becard, G.; Combier, J. P. 2014. Auxin perception is required for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology*, v. 166, p. 281-292.

Flores-Camacho, R.; Manzanilla-López, R.; Cid del Prado-Vera, I.; Martínez-Garza, A. 2007. Control de *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen con *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare. *Revista Mexicana de Fitopatología.*, v. 25, n. 1, p. 26-34.

Frangež, R.; Šuput, D.; Molgó, J.; Benoit, E. 2017. Ostreolysin A/Pleurotolysin B and Equinatoxins: Structure, Function and Pathophysiological Effects of These Pore-Forming Proteins. *Toxins*, v. 9, n. 4, p. 128.

Fukushima, K.; Arai, T.; Mori, Y.; Tsuboi, M.; Suzuki, M. 1983. Studies on peptide antibiotics, leucinostatins. Separation, physico-chemical properties and biological activities of leucinostatins A and B. *The Journal of Antibiotics*. v. 36, n. 12, p. 1606–1612.

Gao, L.; Liu, X. 2010. Nutritional requirements of mycelia growth and sporulation of several biocontrol fungi in submerged and on solid culture. *Microbiology (Moscow)*, v. 79, n. 5, p. 622-629.

Gives, P.; Zavaleta-Mejia, E.; Herrera-Rodriguez, D.; Quiróz-Romero, H. 1994. In vitro trapping capability of *Arthrobotrys* spp. on infective larvae of *Haemonchus contortus* and *Nacobbus aberrans*. *Journal of Helminthology*, v. 68, n. 3, p. 223-229.

Gortari, M. C.; Hours, R. 2019. In vitro antagonistic activity of Argentinean isolates of *Purpureocillium lilacinum* on *Nacobbus aberrans* eggs. *Current Research in Environmental & Applied Mycology (Journal of Fungal Biology)*, v. 9, n. 1, p. 164–174.

Gortari, M. C.; Hours, R. 2016. *Purpureocillium lilacinum* LPSC # 876: producción de conidias en cultivos sobre sustratos sólidos y evaluación de su actividad sobre *Nacobbus aberrans* en plantas de tomate. *Revista de la Facultad de Agronomía*, v. 115, n. 2. p. 239-249.

Gupta, S. C.; Leathers, T. D.; Wicklow, D. T. 1993. Hydrolytic enzymes secreted by *Paecilomyces lilacinus* cultured on sclerotia of *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 39, n. 1, p. 99-103.

Heath, R. L.; Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, v. 125, p. 189-198.

- Hernández-Leal, T.; Carrión, G.; Heredia, G. 2011. Solubilización in vitro de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia*, v. 45, n. 8, p. 881-892.
- Heydari, R.; Pourjam, E.; Goltapeh, E. M. 2006. Antagonistic effect of some species of *Pleurotus* on the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in vitro. *Plant Pathology Journal*, v. 5, p. 173-177.
- Hoagland, DR; Arnold, DI. 1950. The water culture method for growing plants without soil. California Agriculture Experiment Station Circular 347.
- Khan, A.; Williams, K. L.; Nevalainen, H. K. M. 2004. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. *Biological Control*, v. 31, n. 3, p. 346–352.
- Khan, A.; Williams, K. L.; Nevalainen, H. K. M. 2006. Infection of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum*. *Biocontrol*, v. 51, n. 5, p. 659–678.
- Kobayashi, I.; Tokuda, M.; Hashimoto, H.; Konda, T.; Nakano, H.; Kitahata, S. 2003. Purification and Characterization of a New Type of a α -Glucosidase from *Paecilomyces lilacinus* that has Transglucosylation Activity to produce α -1,3-and α -1,2- linked Oligosaccharides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.67, p. 29-35.
- Kwok, O.; Plattner, R.; Weisleder, D.; Wicklow, D. 1992. A nematocidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. *Journal of Chemical Ecology*, v. 18, p.127–136.
- Lax, P.; Marro, N.; Agaras, B.; Valverde, C.; Doucet, M. E.; Becerra, A. 2013. Biological control of the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* by *Pseudomonas protegens* under controlled conditions. *Crop Protection*, v. 52, p. 97–102.
- López-Llorca, L.V.; Macia-Vicente, J. G.; Jansson, H. Mode of action and interactions of nematophagous fungi. En: Ciancio, A.; Mukerji, K.G. (eds) *Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes*. Springer, Dordrecht, 356 p. 2008.
- López-Rodríguez, C.; Hernández-Corredor, R.; Suárez-Franco, C.; Borrero, M. 2008. Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. *Scientiarum*, v. 7, p. 43-82.
- Luo, H.; Mo, M.; Huang, X.; Li, X.; Zhang, K. 2004. *Coprinus comatus*: a basidiomycete fungus forms novel spiny structures and infects nematodes. *Mycologia*, v. 96, p. 1218–1225.

Luangsa-ard, J.; Houbraken, J.; van Doorn, T.; Hong, S.-B.; Borman, A. M.; Hywel-Jones, N. L.; Samson, R. A. 2011. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. FEMS Microbiology Letters, v. 321, n. 2, p. 141–149.

Ludwig-Muller, J. 2002. Hormonal balance in plants during colonization fungi. En: Kapulnik, K.; Douds, D. D. Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and function. Kluwer Academic Publishers, Holanda, p. 263-285.

Martínez, A.; Speranza, M.; Ruiz-Dueñas, F.; Ferreira, P.; Camarero, S.; Guillén, F.; Martínez, M.; Gutiérrez, A.; del Río, J. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology, v. 8, p. 195-204.

Nordbring-Hertz, B.; Jansson, H.; Tunlid, A. Nematophagous fungi. En: Encyclopedia of life sciences, Wiley ed., p.1-12. 2006.

Oostenbrink, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Mededelingen Van de Landbouwhogeschool te Wageningen, v. 66, n. 4, p. 1-46, 1966.

Orion, D.; Kritzman, G. 1991. Antimicrobial activity of *Meloidogyne javanica* gelatinous matrix. Revue de Nematologie, v. 14, p. 481–483.

Palizi, P.; Goltapeh, E. M.; Pourjam, E.; Safaie, N. 2009. Potential of oyster mushrooms for the biocontrol of sugar beet nematode (*Heterodera schachtii*). Journal of Plant Protection Research, v. 49, n.1, p. 27-33.

Papaspyridi, L. M.; Aligiannis, N.; Christakopoulos, P.; Skaltsounis, L.; Fokialakis, N. 2011. Production of bioactive metabolites with pharmaceutical and nutraceutical interest by submerged fermentation of *Pleurotus ostreatus* in a batch stirred tank bioreactor. Procedia Food Science, v. 1, p. 1746–1752

Pérez-Rodríguez, I.; Franco-Navarro, F.; Cid del Prado-Vera, I.; Zavaleta-Mejía, E. 2011. Control de *Nacobbus aberrans* en chile ancho (*Capsicum annuum* L.) mediante el uso combinado de enmiendas orgánicas, hongos nematófagos y nematicidas. Nematologica, v. 41, p. 122-129.

Perraza-Padilla, W.; Orozco Aceves, M.; Esquivel Hernández, A. 2014. Evaluación in-vitro de hongos nematófagos en zonas arroceras de Costa Rica contra el nematodo agallador *Meloidogyne javanica*. Agronomía Costarricense, v. 38, n. 2, p. 19-32.

Rajarathnam, S.; Bano, Z.; Miles, P. G. 1987. Pleurotus mushrooms. Part I A. morphology, life cycle, taxonomy, breeding, and cultivation. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 26, n. 2, p.157–223.

Sánchez, E. Producción de hongos. México. Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste, p. 28-60. 1994

Satou, T.; Kaneko, K.; Li, W.; Koike, K. 2008. The Toxin Produced by *Pleurotus ostreatus* reduces the head size of nematodes. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 31, n. 4, p. 574-576.

Siddiqui, Z. A.; Mahmood, I. 1996. Biological control of plant parasitic nematodos by fungi: a review. *Bioresource Technology*, v. 58, p. 229-239.

Singh, S.; Mathur, N. 2010. In vitro studies of antagonistic fungi against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, *Biocontrol Science and Technology*, v. 20, n. 3, p. 275-282,

Singleton, V. L.; Rossi, J. A. J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture.*, v. 16, p. 144-158.

Sorokin, N. 1876. *Ann. d. Sci. Nut. Bot.*, Ser. v. 6, n. 4, p. 62-71.

Stirling, G. R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and perspets. Wallingford: CAB International, 282 p.

Truong, B.; Okazaki, K.; Fukiharu, T.; Takeuchi, Y.; Futai, K.; Le, X.; Suzuki, A. 2007. Characterization of the nematocidal toxocyst in *Pleurotus* subgen. *Coremiopleurotus*. *Mycoscience*, v. 48, p. 222-230.

Van Lenteren, J.; Babendreier, D.; Bigler, F.; Burgio, G.; Hokkanen, H.; Kuske, S.; Loomans, A.; Menzler-Hokkanen, I.; Van Rijn, P.; Thomas, M.; Tommasini, M.; Zeng, Q. 2003. Environmental risk assessment of exotic natural enemies used in inundative biological control. *BioControl*, v. 48, n.1, p. 3-38.

Vänninen, I. 2005. Alternatives to pesticides in fruit and vegetable cultivation. En: Jongen, W. *Improving the Safety of Fresh Fruit and Vegetables*, Woodhead Publishing, 656 p.

Viaene, N.; Coyne, D. L.; Kerry, B. R. Biological and cultural management. En: Perry, R. N.; Moens, M. (eds), *Plant Nematology*. CABI, Wallingford, 533 p. 2006.

Wang, G.; Liu, Z.; Lin, R.; Li, E.; Mao, Z.; Ling, J.; Xie, B. 2016. Biosynthesis of antibiotic leucinostatins in bio-control fungus *Purpureocillium lilacinum* and their inhibition on *Phytophthora* revealed by genome mining. *PLOS Pathogens*, v. 12, n. 7, p. 1-30.

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*, v. 144, n. 3, p. 307-313.

Xingjie, L.; Zhang, J.; Zong, Z.; Ma, Q.; Wang, Y. 2017. Evaluation of the Biocontrol Potential of *Purpureocillium lilacinum* QLP12 against *Verticillium dahliae* in Eggplant. *BioMed Research International*, Article ID 4101357, 8 p.

Yildiz, S.; Yildiz, U. C.; Gezer, E. D.; Temiz, A. 2002. Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. *Process Biochemistry*, v. 3, n. 38, p. 301-306.

Yu, Z-F.; Mo, M-H.; Zhang, Y.; Zhang, K-Q. 2014. Taxonomy of nematode-trapping fungi from *Orbiliaceae*, *Ascomycota*. En: Zhang, K-Q.; Hyde, K. D. editors. *Nematode-trapping fungi*. Dordrecht, Springer, p. 41-209.

Zopf, W. 1884. *Nova Acta Escl. hop.-Carol. Deutschen Akad. Naturforscher*, v. 47, n. 4, p. 167-168.

CAPITULO 6

*Consideraciones finales:
Integración de técnicas para el manejo de
Nacobbus aberrans*

6.1 INTRODUCCIÓN

Antes de analizar la integración de técnicas para el manejo de *Nacobbus aberrans*, cabe mencionar algunos conceptos preliminares que ayudarán a darle el marco teórico correspondiente a este capítulo.

En los ecosistemas naturales, sin perturbaciones por la actividad humana, existen nematodos de los más diversos grupos tróficos incluyendo aquellos parásitos de plantas. En tales sistemas, las poblaciones de macro y microorganismos se mantienen en un equilibrio tal, que no da lugar a la aparición de ataques severos o invasiones de un determinado taxón. Ya en los agroecosistemas, ese equilibrio se rompe y permite que en períodos cortos de tiempo una o varias especies alcancen densidades de población lo suficientemente altas como para adquirir el status de “plaga” o “problema fitosanitario”.

Los altos niveles poblacionales de *N. aberrans* son un desequilibrio que surge como consecuencia de un conjunto de prácticas, o de formas de producir que se han llevado adelante en la horticultura de la región. Estos sencillos conceptos son de gran importancia a la hora de evaluar, diseñar o rediseñar cualquier plan de manejo hortícola.

La producción de alimentos inevitablemente conlleva disturbios que conducen a una “batalla constante” entre el hombre y las plagas y enfermedades de los cultivos. El desafío consiste en diseñar sistemas de producción, robustos, estables, que disminuyan la posibilidad de que un determinado organismo ponga en riesgo rentabilidad de la producción.

El crecimiento poblacional de la Ciudad de La Plata y el desarrollo inmobiliario en el cinturón hortícola está provocando un desplazamiento de los quinteros hacia territorios que anteriormente eran dedicados a la producción ganadera. Es de esperar que, si sobre estos “nuevos territorios” se repiten las mismas equivocaciones, los nematodos parásitos de plantas también se conviertan en un problema fitosanitario.

El retiro del bromuro de metilo del mercado ha dejado en evidencia que las soluciones o respuestas al manejo de *N. aberrans* no deben girar en torno a la búsqueda de sustancias biocidas o fumigantes de suelo. A juzgar por la situación actual no son la solución a este tipo de adversidades bióticas o al menos no lo son en este sistema de producción.

Las experiencias puestas a prueba en esta tesis, y las desarrolladas por investigadores, técnicos y productores, son alentadoras indicando que existen una serie

de herramientas y prácticas, que en mayor o menor medida contribuyen a reducir la población de este nematodo.

6.2 CONOCIMIENTOS DEL CICLO DE VIDA COMO HERRAMIENTA EN EL DISEÑO DE UN PLAN DE MANEJO

La correcta identificación de la especie, el conocimiento de su ciclo de vida y la forma en que éste es influenciado por las condiciones ambientales, son aspectos claves en el diseño de estrategias de manejo.

Como fue mencionado en el Capítulo 1, *N. aberrans sensu lato*, no se reproduce de la misma manera en todos los hospederos. Un trabajo publicado por Lax *et al.* (2011), muestra el comportamiento de una población de *N. aberrans* proveniente de Lisandro Olmos, en distintos hospederos. Los factores de reproducción fueron: 23.9 en tomate, 30.8 en pimiento, 4.8 en remolacha y 0.0 en papa. Si bien, el cultivo de papa no es una opción en nuestra zona, si lo es la remolacha. Más allá de los resultados puntuales de esa evaluación, lo importante es destacar que, aunque se trate de una especie polífaga, es necesario contar con trabajos que evalúen un amplio rango de especies y cultivares. Esta información es de utilidad tanto para escoger los “malos hospedadores” (cuando hubiere más de una opción disponible) como para diseñar una secuencia de rotación que se integre con las prácticas de prevención y control. En este sentido, el uso de porta injertos resistentes o en los que el nematodo presente bajos factores de reproducción, amplía las posibilidades de elección de cultivos. Si bien los pies de injerto comerciales más difundidos en la zona tienen altos factores de reproducción y agravan el problema fitosanitario, existen resultados promisorios utilizando *Solanum sisymbriifolium* como pie de injerto (Garita *et al.*, 2018).

El ciclo de vida del nematodo y su relación con el cultivo es otro de los aspectos que deben ser considerados. Como se detalló en el Capítulo 2, el ciclo comprende un estadio de huevo, cuatro estadios juveniles y la etapa adulta con un marcado dimorfismo sexual. La cubierta de los huevos está formada por tres capas: vitelina, quitinosa, y lipídica. En el caso de contar con microorganismos quitinolíticos o sustancias que degraden quitina, deberá procurarse el momento en que mayor número de huevos se encuentre presente. Como fue descrito en el Capítulo 4, *P. lilacinum* tiene la capacidad de parasitar huevos, por lo que constituye una de las herramientas factibles de ser utilizadas en esta etapa.

En los estadios juveniles y adultos, no hay presencia de quitina en la cubierta. El cuerpo está rodeado por una epidermis que es la encargada de producir la cutícula (cubierta más externa) cuya composición es principalmente proteica con predominancia de colágeno (Bird y Bird, 1991). El uso de hongos productores de toxinas como *Pleurotus ostreatus* tiene potencial uso frente a formas móviles del nematodo por lo que su utilización o presencia debe considerarse de utilidad en períodos donde éstas formas se encuentren presentes. Otras formas de control, no evaluadas en esta tesis, que incluyen los hongos que atrapan nematodos en movimiento (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2011) o bacterias que parasitan juveniles (Caccia *et al.*, 2018), deben utilizarse en este período.

Si bien los juveniles de tercer y cuarto estadio, permanecen como fuentes de inóculo remanente, lo hacen en un estado de inmovilidad y baja actividad metabólica (Cristóbal *et al.*, 2001).

La biofumigación, que en esta tesis y en otros trabajos, ha resultado efectiva para reducir la población de *N. aberrans*, es una de las herramientas que debe llevarse a cabo en ausencia del cultivo. Si bien la incorporación de materia orgánica, supone un posterior aumento en la actividad biológica del suelo, su acción biocida inicial no es selectiva. Por esta razón esta práctica debe ser realizada teniendo en cuenta su impacto sobre otras herramientas biológicas. Tradicionalmente los productores preparan los lomos, luego se lleva adelante la fumigación (ya sea biológica o química) y al finalizar este proceso se implanta el cultivo. El corto período de tiempo que transcurre entre tratamiento y trasplante no permite una adecuada restauración de la actividad biológica del suelo. Una alternativa a esta situación es realizar la biofumigación al finalizar los cultivos estivales, momento en que aún los nematodos se encuentran metabólicamente activos y por lo tanto más sensibles a cualquier tratamiento. Esto permitirá, además, que la materia orgánica continúe descomponiéndose hasta la llegada del siguiente cultivo, e incluso pueden agregarse otras enmiendas que contribuyan a aumentar la actividad biológica del suelo. Esta propuesta es válida cuando el material que se incorpora es proveniente de otros lotes o bien, podría sugerirse la implantación de brasicas cuando el ciclo del cultivo de tomate, por ejemplo, aún no ha finalizado. Del mismo modo que en el Capítulo 4 fueron indicadas incompatibilidades entre la biofumigación y la simbiosis micorrícica, Pérez-Rodríguez *et al.* (2011) encontraron incompatibilidades entre la incorporación de brasicas y la inoculación con *Arthrobotrys* spp.

Considerando los resultados obtenidos en el Cinturón Hortícola de La Plata (CHLP) luego del uso continuado de fumigantes de suelo (bromuro de metilo, agrocelhone®, strike®) se sugiere que el uso de herramientas de amplio espectro de acción sobre la biota del suelo, no sean una práctica de rutina. Su utilización debe efectuarse en los casos en que se considere que las poblaciones de nematodos son lo suficientemente altas como para no ser controladas por otros métodos.

Entre las herramientas que deben ser aplicadas durante el período del cultivo, por tratarse de simbiontes obligados, se encuentran las micorrizas arbusculares. La inoculación de estos simbiontes obligados debe realizarse preferentemente a la siembra. La menor rigidez de los tejidos radiculares durante la germinación y las condiciones térmicas que se les brinda a los plantines en crecimiento, facilitará el proceso de colonización. Además, en términos de “competencia por el espacio” el hongo micorrízico contará con ventaja frente a microorganismos patógenos que se encuentran en campo. Debe mencionarse que la aplicación de fungicidas sistémicos puede afectar la micorrización. En orden de prioridades, se recomienda el uso de fungicidas de contacto, y de ser necesario el uso de fungicidas sistémicos, hay trabajos donde se documenta que no todos afectan con la misma intensidad al hongo micorrízico (Cabello, 1994; Valle *et al.*, 2011).

Un aspecto relevante para reducir la población de *N. aberrans* es el manejo de las raíces una vez finalizado el ciclo del cultivo. El análisis de la población final en los distintos capítulos formada para la sumatoria de los análisis de suelo y raíz, indica que el mayor número de individuos se encuentra en las raíces. Retirando y quemando las raíces se estará eliminando un incalculable número de huevos que de otra manera serían fuente de inóculo para el siguiente hospedador. Es importante que el arrancado se realice en la última cosecha ya que posteriormente, las raíces se degradan y al arrancar las plantas la mayor parte queda retenida en el suelo.

6.3 CONSIDERACIONES FINALES

No es posible diseñar programas o proponer “recetas” estrictas que consigan disminuir la densidad de población de *N. aberrans* en el CHLP; dicho de otra manera, existen tantos diseños como establecimientos productivos.

Hay una gran diversidad de herramientas y prácticas efectivas para ser aplicadas en este proceso, pero para ello resulta indispensable que: - se encuentren a disposición en cantidad y calidad para su utilización por parte de los productores; - se acompañe con información y asesoramiento para que su uso sea parte de un real plan estratégico y no meros esfuerzos aislados. Sin lugar a dudas que esto solo será posible con la participación, el compromiso y el trabajo articulado de todos los actores vinculados al sector: estado, productores, técnicos y empresas.

6.4 REFERENCIAS

- Bird, A.; Bird, J. 1991. The Structure of Nematodes. Academic Press, 317 p.
- Cabello, M. 1994. Efecto de la aplicación secuencial de fungicidas sobre hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares en condiciones de campo. Boletín Micológico, v. 9, n. 1-2, p. 1-7.
- Caccia, M.; Marro, N.; Rondan, J.; Doucet, M. E.; Lax, P. 2018. Effect of the entomopathogenic nematode-bacterial symbiont complex on *Meloidogyne hapla* and *Nacobbus aberrans* in short-term greenhouse trials. Crop Protection, v. 114, p. 162-166.
- Cristóbal, A. J.; Cid del Prado, I.; Marbán-Mendoza, N.; Sánchez, G. P.; Mora-Aguilera, G.; Manzanilla-López, R. H. 2001. Sobrevivencia de estadios biológicos de *Nacobbus aberrans* en condiciones de campo. Nematopica, v. 31, p. 229-235.
- Garita S.; Bernardo V.; Ripodas J.; Arango C.; Ruscitti M. 2018. Comportamiento de *Solanum sisymbriifolium* como portainjerto de tomate en suelos infestados con *Nacobbus aberrans*. Libro de Resúmenes 40º Congreso Argentino de Horticultura, p.310.
- Lax, P.; Rondan Dueñas, J. C.; Coronel, N. B.; Gardenal, C. N.; Bima, P.; Doucet, M. E. 2011. Host range study of Argentine *Nacobbus aberrans* sensu Sher populations and comments on the differential host test. Crop Protection, n. 30, v.11, p. 1414–1420.
- Pérez-Rodríguez, I.; Franco-Navarro, F.; Cid del Prado-Vera, I.; Zavaleta-Mejía. E. 2011. Control de *Nacobbus aberrans* en chile ancho (*Capsicum annuum* L.) mediante el uso combinado de enmiendas orgánicas, hongos nematófagos y nematicidas. Nematopica, v. 41, p. 122-129.
- Valle, R. F.; Rubio, M. M. V.; Rivero, Y. R. 2011. Compatibilidad entre nuevos plaguicidas químicos sistémicos y el hongo micorrizógeno *Glomus intraradices* Shenk y Smith. Fitosanidad, v. 15, n. 2, p. 99-105.