



**UNIVERSIDAD NACIONAL
DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE
AGRONOMÍA Y VETERINARIA**

“Trabajo Final presentado para
Optar al Grado de Ingeniero Agrónomo”

Modalidad: Proyecto

*Pseudomonas sp. RC-93 para el control
biológico de Alternaria alternata en cultivo de Solanum
lycopersicum L. variedad UCO 16*

Estudiante: Joaquín Cassidy

DNI: 38.018.622

Director: Dr. Nicolás Pastor

Codirector: Dra. Ing. Agr. Valeria Autrán

2019

Río Cuarto – Córdoba

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: *Pseudomonas sp. RC-93 para el control biológico de Alternaria alternata en cultivo de Solanum lycopersicum L. variedad UCO 16.*

Autor: **Joaquín Cassidy**

DNI: **38.018.622**

Director: Dr. Nicolás Pastor

Codirector: Dra. Ing. Agrónoma Valeria Autrán

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión Evaluadora:

Dr. Nicolás Pastor _____

Dra. Mercedes Ibañez _____

Dra. Lorena Belén Guiñazú _____

Fecha de Presentación: ____/____/____.

Secretaria Académica

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado con todo mi amor y cariño a mi familia, especialmente a mis padres Paola y Marcos por su sacrificio y esfuerzo, a mis abuelos Rosa, Roberto, Angélica y Miguel, a mis tías Natalia y Valeria, que siempre creyeron en mí y estuvieron a mi lado, a mi hermano Tomás, a mi novia Julieta y a mis amigos, que me brindaron su apoyo y amor incondicional en este camino de formación académica y en la vida misma siendo mis pilares fundamentales.

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios, a la Universidad Nacional de Río Cuarto, a la Facultad de Agronomía y Veterinaria por permitirme estudiar esta hermosa carrera, por la formación brindada y por permitirme realizar esta investigación.

Gracias a mi director Dr. Nicolás Pastor y a mi Co directora Dra. Valeria Autrán, por su dedicación, compromiso, paciencia y motivación, desde el primer momento que decidí llevar a cabo esta investigación, por ser mis guías y brindar todo su conocimiento y entusiasmo para lograr este trabajo final. Por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas. Gracias por la confianza ofrecida desde el primer momento.

Gracias a la cátedra de Microbiología Agrícola y a su personal técnico no docente, entre ellos Claudia Basualdo, por su colaboración y ayuda permanente en el proceso.

Gracias a mi familia por su apoyo incondicional durante mi carrera universitaria, y en todas las metas y proyectos que me he propuesto alcanzar. Especialmente a mi madre Paola quien me ha enseñado el amor por el estudio y la dedicación, a mi padre Marcos por transmitirme la pasión por trabajo y haberme mostrado los caminos de esta profesión, a mi tía Valeria quien participó activamente de los ensayos llevados a cabo, con su entusiasmo y predisposición lo que hizo posible finalizar esta investigación de la mejor manera.

A mi novia Julieta quien con sus palabras de aliento me incentivó a seguir para adelante, a ser perseverante y a cumplir con mis ideales.

Gracias a mis amigos de toda la vida, entre ellos, futuros colegas y a los que me regaló esta maravillosa carrera, todos ellos me han apoyado no solo esta investigación, sino que también a lo largo de mi vida como universitario y brindarme su apoyo en todo momento, quienes sin esperar nada a cambio compartieron sus conocimientos, alegrías y tristezas. Ayudándome a finalizar esta etapa de mi vida de una forma maravillosa.

Y, por último, pero no menos importante, muchas gracias a todas aquellas personas que seguramente olvide mencionar en estas pocas palabras, pero fueron parte de mi formación profesional y personal, sin ustedes esto no hubiese sido posible.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Historia del tomate.....	1
Producción de tomate en el mundo y Argentina.....	1
Características del cultivo.....	3
Patógenos de tomate	6
Género <i>Pseudomonas</i>	8
Agentes de control biológico (ACB)	9
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
Hipótesis.....	11
Objetivos.....	11
General	11
Específicos	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Características del ensayo.....	12
Obtención de cepa fúngica de <i>Alternaria alternata</i> y cepa bacteriana <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 (ACB)	12
Conservación de cepa fúngica de <i>Alternaria alternata</i> y cepa bacteriana <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93.	13
Ensayos <i>in vivo</i> en cámara de crecimiento	13
Obtención del inóculo de <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93	13
Obtención de inóculo de <i>Alternaria alternata</i>	14
Desinfección superficial de semillas de tomate (variedad UCO 16).....	15
Ensayo de evaluación de patogenicidad de <i>Alternaria alternata</i> en <i>Solanum lycopersicum</i>	15
Ensayo de antagonismo <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 vs. <i>Alternaria alternata</i>	17
Ensayo de actividad bioantagonista de <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 frente <i>Alternaria alternata</i> en frutos de <i>Solanum lycopersicum</i>	18
Ensayos <i>in vitro</i>	20
Análisis estadístico	21
Ensayo de evaluación de patogenicidad de <i>Alternaria alternata</i> en <i>Solanum lycopersicum</i>	22
Ensayo de antagonismo <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 vs. <i>Alternaria alternata</i>	22
Ensayo de actividad bioantagonista de <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 frente <i>Alternaria alternata</i> en frutos de <i>Solanum lycopersicum</i>	22
Ensayos <i>in vitro</i>	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
Ensayo de evaluación de patogenicidad de <i>Alternaria alternata</i> en <i>Solanum lycopersicum</i>	25
Ensayo de antagonismo <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 vs. <i>Alternaria alternata</i>	32
Ensayo de actividad bioantagonista de <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 frente <i>Alternaria alternata</i> en frutos de <i>Solanum lycopersicum</i>	34
Ensayos <i>in vitro</i>	46
CONCLUSIÓN.....	50
BIBLIOGRAFÍA	51

ANEXO 1	54
ANEXO 2	56
2.1 - Ensayo de evaluación de patogenicidad de <i>Alternaria alternata</i> en <i>Solanum lycopersicum</i>	56
2.2 - Ensayo de actividad bioantagonista de <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 frente <i>Alternaria alternata</i> en frutos de <i>Solanum lycopersicum</i>	58
2.3 - Ensayos <i>in vivo</i>	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Regiones productoras de tomate en Argentina	2
Figura 2: Cultivo de tomate	4
Figura 3: Flor y fruto de tomate	5
Figura 4: <i>Alternaria alternata</i>	8
Figura 5: <i>Pseudomonas fluorescens</i>	9
Figura 6: Ubicación de Universidad Nacional de Río Cuarto	12
Figura 7: <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93	13
Figura 8: <i>Alternaria alternata</i> . Crecimiento en placa de Petri con Agar Agua y conidios vistos al microscopio óptico (40X) en cámara de Neubauer	14
Figura 9: Semillas de tomate	15
Figura 10: Evaluación de patogenicidad de <i>Alternaria alternata</i>	16
Figura 11: Ensayo de antagonismo <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 vs. <i>Alternaria alternata</i>	17
Figura 12: Ensayo de actividad bioantagonista de <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 frente a <i>Alternaria alternata</i> en frutos.	19
Figura 13: Ensayo <i>in vitro</i>	21
Figura 14: Ensayo de patogenicidad de <i>Alternaria alternata</i> : Evolución de las lesiones en el tiempo días desde la inoculación	26
Figura 15: Evaluación de la patogenicidad de <i>Alternaria alternata</i> : porcentaje de infestación de la cepa en tres fechas	28
Figura 16: Evaluación de patogenicidad de <i>Alternaria alternata</i>	29
Figura 17: Ensayo de patogenicidad de <i>Alternaria alternata</i>	30
Figura 18: Patogenicidad de <i>Alternaria alternata</i> : Peso Seco	31
Figura 19: Patogenicidad de <i>Alternaria alternata</i> : comparación del Peso Seco	31
Figura 20: Ensayo en cámara de cría de antagonismo <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 vs. <i>Alternaria alternata</i>	33
Figura 21: Ensayo de actividad bio antagonista de <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 frente a <i>Alternaria alternata</i> en frutos de tomate	35
Figura 22: Ensayo de actividad bioantagonista: Superficie afectada de cada tomate	36
Figura 23: Ensayo de actividad bioantagonista de <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 frente a <i>Alternaria alternata</i> en frutos de tomate: Superficie afectada para las dos fechas	37
Figura 24: Ensayo de actividad bioantagonista de <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 frente <i>Alternaria alternata</i> en frutos: Evolución de las lesiones de los diversos experimentos	39
Figura 25: Ensayo de actividad bioantagonista de <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 frente a <i>Alternaria alternata</i> en frutos de tomate	40

Figura 26: Ensayo de actividad bioantagonista de <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 frente <i>Alternaria alternata</i> en frutos de tomate.....	42
Figura 27: Ensayo de actividad bioantagonista de <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 frente a <i>Alternaria alternata</i> en frutos de tomate.....	43
Figura 28: Ensayo de actividad bioantagonista de <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 frente <i>Alternaria alternata</i> en frutos: Evolución de las lesiones de los diversos experimentos.	44
Figura 29: Ensayo de actividad bioantagonista de <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 frente a <i>Alternaria alternata</i>	45
Figura 30: Ensayo <i>in vitro</i> de biocontrol en siembra simultánea y desfasada de <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 vs. <i>Alternaria alternata</i>	46
Figura 31: Ensayo de biocontrol en siembra simultánea de <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 vs. <i>Alternaria alternata</i>	47
Figura 32: Ensayo de biocontrol en siembra desfasada de <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 vs. <i>Alternaria alternata</i>	48
Figura 33: Ensayo de biocontrol en siembra desfasada y simultáneo de <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 vs. <i>Alternaria alternata</i>	48
Figura 34: Ensayo de biocontrol <i>in vitro</i> en siembra desfasada y simultáneo de <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 vs. <i>Alternaria alternata</i>	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Producción, exportación e importación de tomates en Argentina	3
Tabla 2: Valores nutricionales del tomate cada 100 g.	5
Tabla 3: Resultados ensayo de antagonismo <i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 vs. <i>Alternaria alternata</i> en macetas.	33

RESUMEN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.), es de origen americano y pertenece a la familia *Solanaceae*. Los frutos del tomate son ricos en minerales, vitaminas, aminoácidos esenciales, azúcares y fibras. Es el segundo cultivo hortícola en importancia mundial. Las enfermedades constituyen la principal limitante biológica para la producción y causan la más alta proporción de pérdidas económicas. El tomate es susceptible al hongo *Alternaria alternata*, el cual puede infectar los cultivos a campo o causar importantes daños en post cosecha. El control de la enfermedad se realiza con fungicidas químicos sintéticos, que presentan desventajas, como su alta toxicidad que puede generar contaminación del medio ambiente, producir residuos en productos comestibles y desarrollo de mecanismos de resistencia. Una alternativa eficaz y sustentable es el desarrollo de biocontroladores microbianos. El uso de agentes de control biológico (ACB), como rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas es una de las opciones más prometedoras. Se demostró a lo largo del tiempo que bacterias del género *Pseudomonas* son eficientes en el control de enfermedades producidas por hongos patógenos diversos en diferentes plantas. En este trabajo se evaluó la efectividad de *Pseudomonas* sp. RC-93, en la supresión de enfermedades producidas por *Alternaria alternata* en tomate. Los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* son concluyentes, *Pseudomonas* sp. RC-93 en presencia de *Alternaria alternata* controla eficazmente estos hongos fitopatógenos y puede utilizarse como una técnica de biocontrol. Podemos considerar a la cepa *Pseudomonas* sp. RC-93 como una oportunidad de tener una herramienta prometedora en el control biológico del patógeno y para la formulación de una estrategia eficaz y ecológica para el tratamiento de la enfermedad.

Palabras claves: *Pseudomonas* sp. RC-93, control de enfermedades, tomate, *Alternaria alternata*, *Solanum lycopersicum*.

SUMMARY

***Pseudomonas* sp. RC-93 for the biological control of *Alternaria alternata* in cultivation of *Solanum lycopersicum* L. variety UCO 16**

The tomato (*Solanum lycopersicum* L.), is of American origin and belongs to the *Solanaceae* family. The fruits of the tomato are rich in minerals, vitamins, essential amino acids, sugars and fibers. It is the second horticultural crop in world importance. Diseases are the main biological limitation for production and cause the highest proportion of economic losses. The tomato is susceptible to the fungus *Alternaria alternata*, which can infect crops in the field or cause significant damage in post-harvest. The control of the disease is carried out with synthetic chemical fungicides, which have disadvantages, such as high toxicity that can generate environmental pollution, produce waste in edible products and development of resistance mechanisms. An effective and sustainable alternative is the development of microbial biocontrollers. The use of biological control agents (CBA), such as rhizobacteria that promote growth in plants, is one of the most promising options. It was shown over time that bacteria of the genus *Pseudomonas* are efficient in the control of diseases caused by diverse pathogenic fungi in different plants. In this work, the effectiveness of *Pseudomonas* sp. RC-93 in the suppression of diseases produced by *Alternaria alternata* in tomato was evaluated. The results obtained in vivo and in vitro are conclusive. *Pseudomonas* sp. RC-93 in the presence of *Alternaria alternata* effectively controls these phytopathogenic fungi and can be used as a biocontrol technique. We can consider the strain *Pseudomonas* sp. RC-93 as an opportunity to have a promising tool in the biological control of the pathogen and for the formulation of an effective and ecological strategy for the treatment of the disease.

Keywords: *Pseudomonas* sp. RC-93, disease control, tomato, *Alternaria alternata*, *Solanum lycopersicum*.

INTRODUCCIÓN

Historia del tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.), es una especie originaria de Sudamérica, la cual fue introducida en Europa en el Siglo XVI, previa domesticación en México. El mayor avance en el mejoramiento del tomate se originó como resultado de la aparición y difusión comercial de híbridos, los cuales fueron determinantes para el fuerte desarrollo del cultivo, especialmente en España, en donde las primeras introducciones se producen al inicio de la década de los años 70. Actualmente nuevas técnicas se están llevando a cabo, con el objeto de poner a disposición del agricultor el material vegetal más idóneo y que mejor se adapte a sus condiciones edafoclimáticas (Vergani Gualazzi, 1997).

Producción de tomate en el mundo y Argentina

Solanum lycopersicum es el segundo cultivo hortícola en importancia mundial luego de *Solanum tuberosum* (papa). La producción actual es de cerca de 100 millones de toneladas de frutos frescos a partir de 3,7 millones de hectáreas en todo el planeta (FAO, 2018). Entre los principales países productores del mismo se encuentran China, Estados Unidos, Turquía, India, Italia, España, Brasil y México. Nuestro país se encuentra en el puesto número 47 de exportadores mundiales de tomates frescos o refrigerados. El destino principal de sus exportaciones son los países limítrofes destacándose Paraguay, absorbiendo el 70 % del mercado (Ministerio de Agroindustria, 2017).

Las plantas de tomate son económicamente atractivas debido a su crecimiento relativamente rápido, sus potenciales usos y grandes rendimientos. Tal es así, que en Argentina aproximadamente 14.389 ha (6,34 % de la superficie de Argentina) son usadas para la producción de tomate a campo. Las regiones en nuestro país de mayor producción son: el Noroeste, el Noreste, la región Andina, la región Central, el Litoral y la región Patagónica. Pero cerca del 87 % de la superficie total de producción se distribuye solo entre ocho provincias, dentro de las cuales se destaca Mendoza, con 5.200 ha de producción (Figura 1). Alrededor de 370 mil toneladas de tomates son procesadas cada año en Argentina, además del consumo en fresco, la industria los transforma en tres productos diferentes: puré, pelado natural y extracto (Corvo Dolcet, 2005). Existen cerca de 1.400 ha que son destinadas a la producción de tomates bajo cubierta. Un 87,7 % de la superficie sembrada de Argentina se concentra entre las provincias de Corrientes y Buenos Aires (Ministerio de Agroindustria, 2017). La provincia de Corrientes, con aproximadamente 630

ha, posee la más alta concentración de invernaderos destinados a dicho cultivo. Todos los frutos obtenidos bajo cubierta se destinan para el consumo fresco directo.

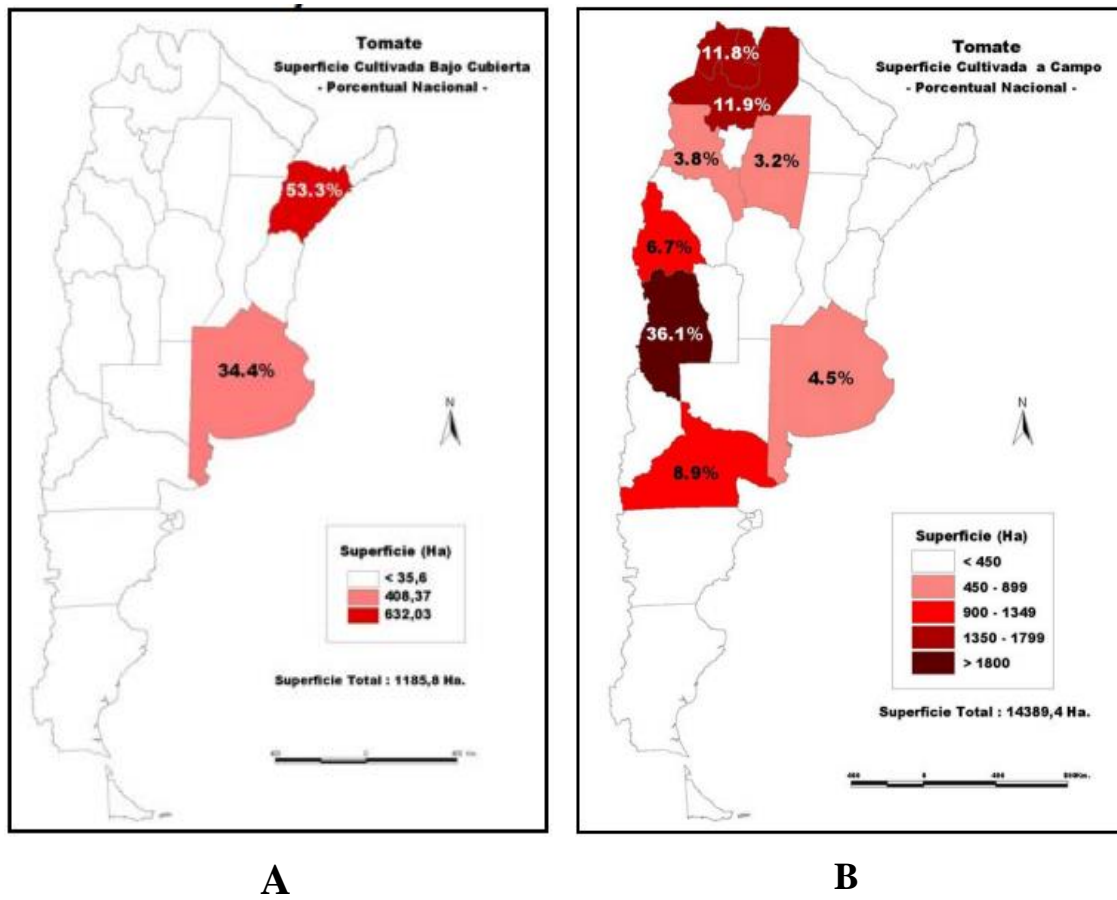


Figura 1: Regiones productoras de tomate en Argentina A: Producción a campo B: Bajo cubierta (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2010).

Según la FAO (2018) la producción local de tomates se elevó año tras año gracias a la implementación de nuevas prácticas de cultivo y tecnologías. Pasando de 294 mil toneladas en el año 1961 a 691 mil toneladas en el año 2013, registrando un pico de producción en el año 2010 de 721 mil toneladas (Tabla 1).

Tabla 1: Producción, exportación e importación de tomates en Argentina (FAO, 2018).

Unidad	1961	1970	1980	1990	2000	2010	2011	2012	2013
Miles de toneladas de exportación	0,00	0,00	1,00	74,00	5,00	33,00	27,00	15,00	16,00
Miles de toneladas de importación	2,00	14,00	45,00	5,00	127,00	53,00	98,00	82,00	89,00
Miles de toneladas de producción	294,00	358,00	546,00	704,00	693,00	721,00	699,00	715,00	691,00

Características del cultivo

El tomate pertenece al reino *Plantae*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, subclase *Asteridae*, orden *Solanales*, familia *Solanaceae*, género *Solanum* y a la especie *lycopersicum*. Como se mencionó anteriormente pertenece a la familia *Solanaceae*, la cual incluye otras especies de interés agronómico tales como *Solanum tuberosum* (papa), *Nicotiana tabacum* (tabaco) y *Capsicum annuum* (pimiento). Se desarrolla de forma rastrera, semierecta o erecta dependiendo del tipo de cultivar. Hay dos formas fundamentales de crecimiento en cuanto a la duración y superposición de la floración con la etapa vegetativa, por un lado, los cultivares determinados, donde la etapa vegetativa culmina al iniciarse la floración y por otro, los indeterminados en donde el crecimiento vegetativo se superpone a la floración y dan frutos de manera escalonada durante más tiempo (Ministerio de Agroindustria, 2017). El sistema radical es alorrido, formado por una raíz principal que puede alcanzar hasta 80 – 100 centímetros (cm) de profundidad, provista de ramificaciones secundarias y acompañado por raíces adventicias que surgen desde la base de los tallos. El tallo es anguloso, cubierto en toda su longitud de epidermis con pelos glandulares visibles, que le confieren a la planta un olor característico. La filotaxis es alterna sobre los tallos, las hojas son compuestas e imparipinnadas, con 7 a 9 folíolos lobulados o dentados (Bianco *et al.*, 2006). La floración se da en racimos simples o ramificados, en cada inflorescencia puede haber entre 3 y 10 flores. La flor es perfecta, su gineceo se dispone por encima de las piezas estériles (súpero), el cáliz tiene 5 o más sépalos soldados entre sí, al igual que los pétalos de la corola que presentan una coloración amarilla. El androceo tiene cinco o más estambres. El fruto es una baya bi o plurilocular, carnoso, con epicarpo liso y endocarpo carnoso muy desarrollado de forma redonda, más o menos globosa o piriforme, de color generalmente rojo en la maduración, aunque algunas variedades pueden presentar otras coloraciones (Figura 2). El

diámetro de los frutos puede variar de 1 a 15 cm (Ministerio de Agroindustria, 2017). Las semillas son de color variable, desde el grisáceo hasta el amarillo de forma oval aplastada. Dentro de los requerimientos climáticos, la temperatura óptima de desarrollo oscila entre 20 y 30 grados centígrados (° C) durante el día y entre 1 y 17° C durante la noche, la humedad óptima varía del 60 al 80 % (Infoagro, 2018).



A



B



C



D

Figura 2: Cultivo de tomate: A: Plantas (FLORES y PLANTAS, 2016); B: Plántula (Imagen Propia); C: Hoja y D: Flor (INTA, 2017).

Los frutos (Figura 3) son ricos en minerales, vitaminas, aminoácidos esenciales, azúcares y fibras. Contienen licopeno, un antioxidante muy potente que previene algunos tipos de cáncer. La fructosa y la glucosa representan cerca del 50 % de la materia seca y más del 95 % de

los azúcares del tomate. Estudios realizados por Nakama y Fernández Lozano (2008), indican que contienen altas concentraciones de hierro (Fe) y fósforo (P). El consumo diario puede proveer entre un 20 y un 40 % del requerimiento de vitaminas A y C en las personas (Tabla 2).

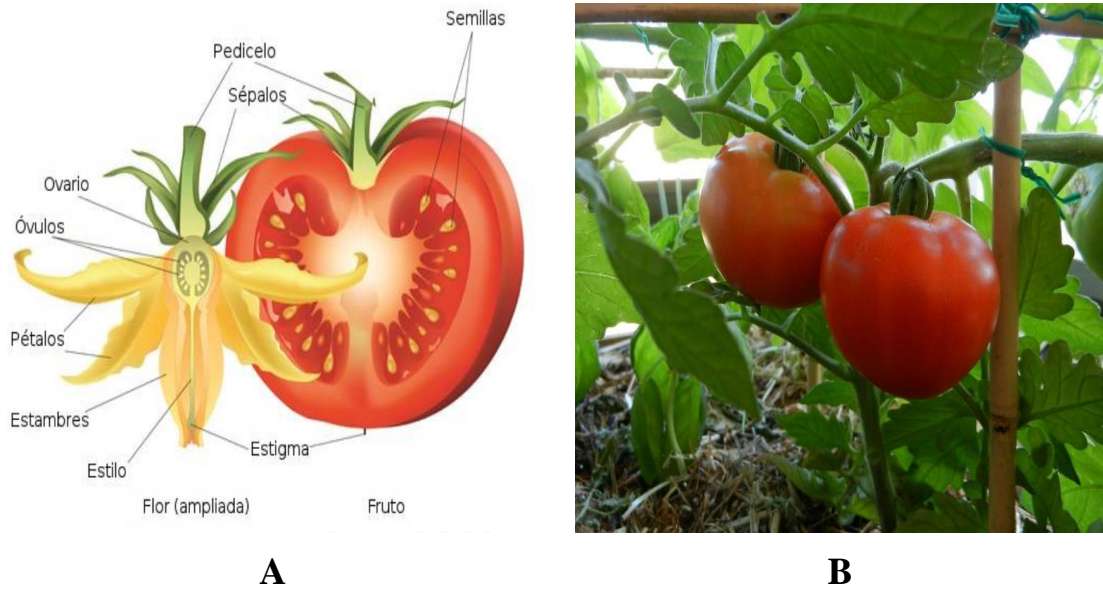


Figura 3: Flor y fruto de tomate: A y B (FLORES y PLANTAS, 2016).

Tabla 2: Valores nutricionales del tomate cada 100 g (FEN, 2019).

Nutriente	Contenido	Nutriente	Contenido
Agua	93,5 %	Riboflavina	0,04 mg
Calorías	20	Niacina	0,6 mg
Colesterol	0	Calcio	12 mg
Proteínas	1	Fósforo	25 mg
Grasas	0,2 g	Hierro	0,5 mg
Carbohidratos	4,3 g	Sodio	3 mg
Fibras	0,47 g	Potasio	222 mg
Vitamina A	820 IU	Ácido Fólico	39 mg
Vitamina C	21 mg	Vitamina E	0,9 mg
Tiamina	0,05 mg	Licopeno	3,1 mg

Patógenos de tomate

Se identificaron más de 200 enfermedades que atacan a la planta de tomate. Estas enfermedades se agrupan de acuerdo al agente que la causa: hongos, bacterias, nematodos, virus y fitoplasmas (Bernal, 2010).

Los hongos poseen estructuras generalmente filamentosas y ramificadas. Tienen paredes celulares y núcleo. Se reproducen sexualmente y asexualmente. Generalmente no son móviles, aunque tienen células reproductoras que sí lo son. Se multiplican a través de las esporas que a su vez sirven para su clasificación al igual que las características morfológicas. En la naturaleza, los hongos pueden vivir como parásitos infectando organismos vivos o como saprobios atacando materia orgánica (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación de Guatemala, 2015).

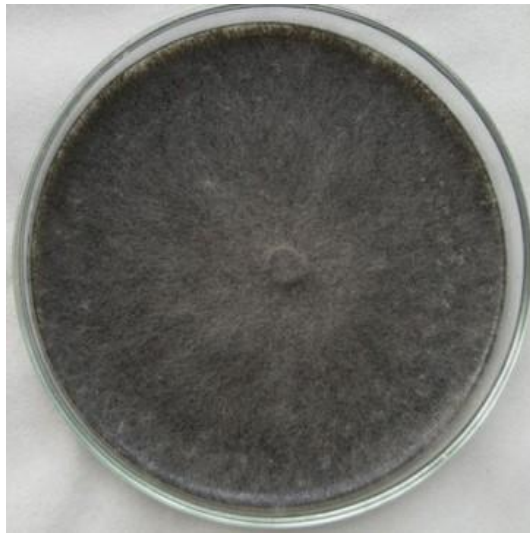
Algunas enfermedades causadas por hongos que afectan al cultivo de tomate son: Moho gris (*Botrytis cinerea*), Mal de los almácigos (*Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp., *Sclerotium* spp.; *Phytophthora* spp.), Moho de la hoja (*Cladosporium fulvum*), Fusariosis (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*), Podredumbre húmeda del tallo (*Sclerotinia sclerotiorum*), Verticillioides (*Verticillium dahliae*), Tizón temprano (*Alternaria* sp.), entre otras (Colombo, 2000).

Las enfermedades constituyen la principal limitante biológica para la producción de cultivos hortícolas y frutales. Siendo las fúngicas uno de los factores más importantes que limitan la producción de los cultivos y que causan la más alta proporción de pérdidas económicas (bacterias, virus y nemátodos con menor impacto). El tomate es susceptible a *Alternaria* spp., los cuales infectan cultivos hortícolas pertenecientes a varias familias y reduce su rendimiento tanto cualitativa como cuantitativamente. El género está ampliamente distribuido en la naturaleza e incluye especies patógenas que pueden infectar tanto en etapa de cultivo o causar importantes daños en post cosecha. Es competitivo por poseer un comportamiento saprófito y ser un patógeno facultativo, favoreciendo su desarrollo por estrés, madurez y senescencia del hospedante. *Alternaria solani* provoca *damping-off* de las plántulas de tomate en la etapa juvenil, produce podredumbre temprana; y en las plantas más viejas podredumbre de cuello, manchas en las hojas, lesiones de tallo y pudrición del fruto. Los síntomas típicos de la enfermedad del tizón temprano son manchas oscuras con anillos concéntricos de esporas rodeado de un halo clorótico. Causa la tercera parte de las pérdidas de origen fitosanitario registradas en el Mercado Central de Buenos Aires. *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*, produce lo que se conoce como Cancro del tallo (*Alternaria Stem Canker*), se caracteriza por oscuros canchales marrones en los tallos y necrosis de tejido de la hoja entre las nervaduras. Además, es importante señalar que dichas especies son capaces de producir micotoxinas y otros metabolitos secundarios (Agrios, 1997).

Alternaria alternata se aísla frecuentemente a partir de plantas de tomate enfermas. Las principales fuentes de inóculo son conidios o micelio sobre semillas (Agrios, 1997). Cuando una planta de tomate es infectada, en general presenta manchas cloróticas circulares, marrones o negras (que más tarde se necrosan) sobre las hojas más bajas de la planta. Estas manchas eventualmente migrarán hacia el tallo e incluso hacia los frutos y con condiciones predisponentes (inóculo, temperatura y humedad) tomar la totalidad de la planta y matarla. La humedad promueve la germinación y dispersión de los conidios de *Alternaria alternata* mientras que la temperatura entre 21 y 30° C favorece la producción de esporas. En el fruto de tomate los conidios germinan y penetran por heridas, la infestación se mantiene latente hasta que el mismo madura y los tejidos se debilitan (Figura 4).

Las especies del género *Alternaria* producen más de 70 metabolitos secundarios tóxicos para las plantas los cuales son denominadas fitotoxinas, pero además algunos de ellos afectan también a personas y animales, por lo que se consideran micotoxinas. La exposición a las mismas se ha relacionado con la aparición de efectos adversos para la salud en personas y animales y se ha demostrado que tienen capacidad genotóxica, mutagénica, carcinogénica y citotóxica. Además, determinadas especies de este hongo están implicadas en infecciones y alergias humanas (Pavón Moreno *et al.*, 2012).

El control de la enfermedad causada por *Alternaria alternata* se realiza con fungicidas químicos sintéticos. Sin embargo, estos pueden ocasionar varios problemas como la toxicidad, el desarrollo de la resistencia en algunas poblaciones del patógeno por el uso continuo de agroquímicos y la contaminación del medio ambiente. Los biocontroladores microbianos (antagonistas) son ambientalmente más seguros y se consideran como una herramienta alternativa eficaz que puede ser utilizada para el control de enfermedades de los cultivos. El uso de rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas como *Pseudomonas* spp. es una de las opciones de los controladores biológicos más prometedoras y sus formulaciones comerciales demuestran ser efectivas contra varias enfermedades de los cultivos.



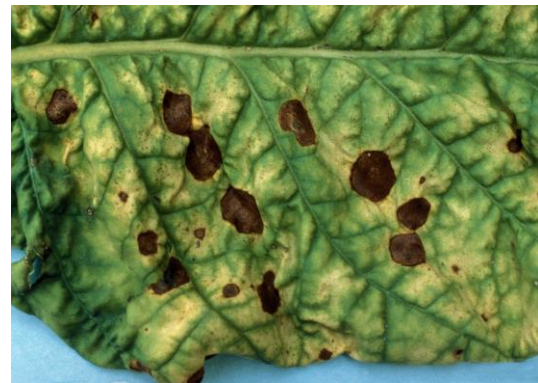
A



B



C



D

Figura 4: *Alternaria alternata*: A: Crecimiento en medio Agar Agua (Imagen Propia); B: Conidios e hifas de vistos al microscopio óptico (40X) en cámara de Neubauer (Imagen propia); C: Cancros producidos en frutos de tomate (JARDINERÍA ON, 2017) y D: Cancros en hojas (JARDINERÍA ON, 2017).

Género *Pseudomonas*

Pseudomonas spp. (Figura 5) son bacterias baciliformes aerobias, Gram-negativas, y saprofitas. Se pueden encontrar tanto en el agua como en el suelo. No forman esporas y las temperaturas más favorables para su desarrollo están entre 25 y 30° C, además puede crecer en un rango de temperatura que se extiende desde los 5 a los 42° C. Requieren de pH neutro y no crecen en condiciones ácidas ($\text{pH} \leq 4,5$). Sus flagelos polares hacen posible su movimiento activo en líquidos.

Estas bacterias se pueden encontrar tanto en la superficie de las hojas como en raíces, especialmente en la rizósfera, donde se lleva a cabo la colonización. La producción de antibióticos,

la producción de quelatos de hierro y enzimas hidrolíticas, así como la competencia por sitios nutricionalmente favorables hacen a su relevancia como microorganismo benéfico (Gakegne *et al.*, 2017).

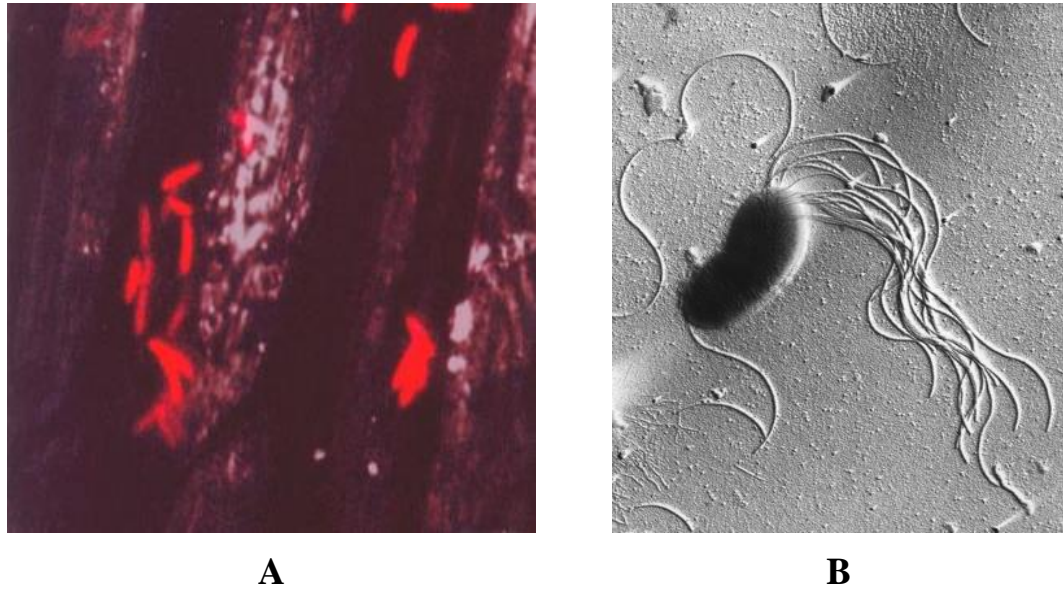


Figura 5: *Pseudomonas fluorescens*. A: Foto de microscopio electrónico (Bloemberg *et al.*, 2000) y B: Foto de barrido de microscopio electrónico (Brittan *et al.*, 2014).

Agentes de control biológico (ACB)

Uno de los métodos más utilizados para contrarrestar las pérdidas en cultivos agrícolas por organismos o plagas causantes de enfermedades, es el uso de pesticidas. Estas son sustancias químicas que producen innumerables efectos indeseados sobre el ecosistema, entre ellos se encuentran la inducción a la generación de organismos resistentes, la persistencia ambiental de residuos tóxicos, la contaminación de suelos y recursos hídricos, lo que en su conjunto produce una alteración del equilibrio ecológico. Conociéndose los efectos adversos que causan los agroquímicos, actualmente la tendencia en el área agroindustrial, se inclina cada vez más a la disminución tanto de costos en la producción como de la presencia de residuos de pesticidas en los productos agrícolas y en el medio ambiente, situando así al control biológico como una estrategia dentro del manejo de plagas.

En el mundo, el uso de ACB se muestra como una alternativa ambientalmente segura para el control de enfermedades de cultivos. Varios agentes biológicos poseen efectos antagonistas contra patógenos de varias especies vegetales, entre ellos cepas del género *Pseudomonas*, demostraron en diversos estudios ser eficaz y se ha considerado como una solución a largo plazo en el manejo de cultivos. La simbiosis que existe entre plantas con distintos microorganismos, como hongos y rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPR) que son aplicados a la

semilla o al suelo, los cuales logran colonizar la raíz y/o la rizósfera, promoviendo así la asimilación de nutrientes pudiendo ser utilizados como biofertilizantes. En los últimos años se observó un aumento en el uso y desarrollo de biofertilizantes que logran un aumento en la productividad y calidad de los cultivos (Rodríguez y Ortuño, 2007). *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Bacillus* entre otros son los géneros más estudiados como PGPR. Los ACB representan una alternativa sustentable, compatible con otros mecanismos para el manejo y control de enfermedades en las plantas (efecto primario), pero además pueden estimular el crecimiento vegetal (efecto secundario). Los beneficios de la inoculación con microorganismos beneficiosos pueden reducir el efecto de microorganismos perjudiciales, mejorar la eficiencia en el uso de fertilizantes y resistencia a estrés abiótico como sequía, deficiencia mineral y salinidad. Aislamientos rizosféricos del género *Pseudomonas* de plantas de tomate, han demostrado capacidad antifúngica y promotora del crecimiento vegetal (Rovera *et al.*, 2008), además presentan un efecto supresor sobre las enfermedades a través de la colonización de la rizósfera, antibiosis, producción de sideróforos y resistencia sistémica inducida (ISR) (Andrés *et al.*, 2012). Los inóculos microbianos o sus productos derivados representan una potencial estrategia para el manejo de enfermedades fúngicas, disminuir la severidad y bajar la tasa de propagación de la enfermedad, puede ser integrado con otros enfoques de manejo cultural y biológico en el marco de una agricultura sustentable.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La inoculación con *Pseudomonas* sp. RC-93 reduce la severidad de las enfermedades en el cultivo de *Solanum lycopersicum*.

Objetivos

General

Evaluar la efectividad de *Pseudomonas* sp. RC-93 en la supresión de enfermedades producidas por *Alternaria alternata* en *Solanum lycopersicum*.

Específicos

Determinar la capacidad patogénica de *Alternaria alternata* en plantas de *Solanum lycopersicum*.

Evaluar la capacidad bioantagonista *in vitro* de *Pseudomonas* sp. RC-93 frente a *Alternaria alternata*.

Establecer la actividad bioantagonista de *Pseudomonas* sp. RC-93 frente a *Alternaria alternata* en postcosecha en frutos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características del ensayo

Los ensayos de este estudio se llevaron a cabo en la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC), en el laboratorio y cámara de crecimiento pertenecientes a la cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Agronomía y Veterinaria (Figura 6). Los mismos comenzaron a realizarse en el año 2017 y finalizaron en 2018.



Figura 6: Ubicación de Universidad Nacional de Río Cuarto. Latitud: 33° 6'35.64"S Longitud: 64°18'2.33"O (Google Earth).

Obtención de cepa fúngica de *Alternaria alternata* y cepa bacteriana *Pseudomonas* sp. RC-93 (ACB)

Pseudomonas sp. RC-93 (ACB) fue aislada de la rizósfera de tomate y parcialmente caracterizadas, con capacidad antifúngica y promotoras del crecimiento en tomate.

Alternaria alternata fue aislada de frutos de tomate infectados, con signos característicos de la enfermedad avanzada.

Conservación de cepa fúngica de *Alternaria alternata* y cepa bacteriana *Pseudomonas* sp. RC-93.

Para la criopreservación del hongo patógeno, se dispensó 1 mililitro (mL) de solución estéril (121° C, 20 min) cuya composición v/v fue glicerol al 10 % y agua destilada, en eppendorf estériles. Las esporas del hongo, obtenidas por crecimiento en medio Agar Papa Dextrosa (PDA) (Anexo 1), se suspendieron en la solución estéril, a continuación, se sometió la solución a un proceso de congelación gradual y se almacenó a una temperatura de -80° C.

Mientras que en *Pseudomonas* sp. RC-93 la criopreservación se realizó dispensando 1 mL de Caldo Tripteína Soya (TSB) (Anexo 1) estéril, a la que se le agrego 10 % v/v de glicerol en eppendorf estériles. Dicha solución se sometió a un proceso de congelación gradual y se almacenó a una temperatura de -80° C.

Ensayos *in vivo* en cámara de crecimiento

Obtención del inóculo de *Pseudomonas* sp. RC-93

La suspensión de la cepa bacteriana se preparó en un Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 250 mL de TSB, el cual es un medio líquido para enriquecimiento de uso general (Anexo 1). Dicho medio fue inoculado con 1 mL de cultivo bacteriano “overnight”. Posterior incubación en agitación durante 24 h a 28° C, se centrifugó y, por último, las bacterias se resuspendieron en agua destilada estéril (7×10^6 unidades formadoras de colonia (UFC)/mL).

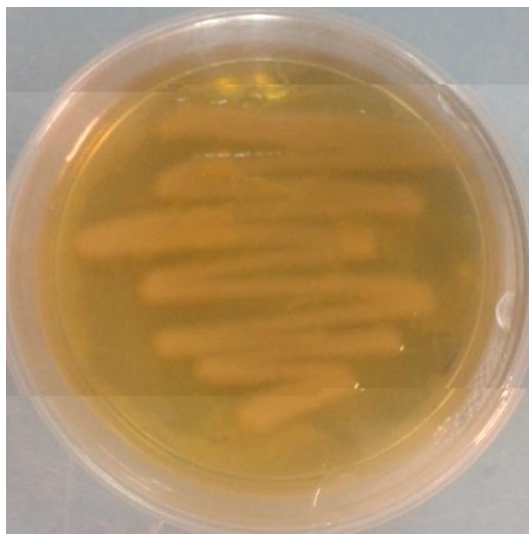


Figura 7: *Pseudomonas* sp. RC-93 (Imagen Propia).

Obtención de inóculo de *Alternaria alternata*

La cepa utilizada fue aislada de frutos de tomate naturalmente infectadas y se mantiene liofilizada en el cepario del laboratorio de Micología (UNRC). Inicialmente se cultivó en medio Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA) (Anexo 1) y se incubó durante 7 a 10 días a 25° C bajo ciclos de luz blanca/negra de 12 h (Leslie y Summerell, 2006) a fin de permitir una alta esporulación del cultivo. Se recolectaron las esporas por el agregado de agua destilada (10 mL) sobre la superficie del cultivo; la suspensión de esporas se filtró a través de gasas estériles con el fin de retener talo y/o partes vegetativas y el líquido se trasvasó a un frasco Erlenmeyer de 125 mL. Finalmente fue realizado el recuento de los conidios en cámara de Neubauer (cámara de recuento adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases), en donde se esperó determinar la existencia de 1×10^4 conidios/mL. Pero dicha cantidad de conidios necesarios para llevar a cabo el ensayo, fue escasa con esta técnica obteniéndose un valor mucho menor. Por lo que posteriormente se llevó a cabo el cultivo de *Alternaria alternata* en medio Agar Agua (Anexo 1) (Figura 8) para obtener una mayor esporulación y se incubó durante 7 a 10 días a 25° C. Luego se realizó la recolección de las esporas por el agregado de agua destilada estéril (10 mL) sobre la superficie del cultivo, la suspensión de esporas que se obtuvo se filtró a través de gasas y el líquido resultante se trasvasó a un frasco Erlenmeyer de 125 mL. Por último, se realizó el recuento de los conidios en cámara de Neubauer, en donde se determinó la existencia de 1×10^4 conidios/mL.

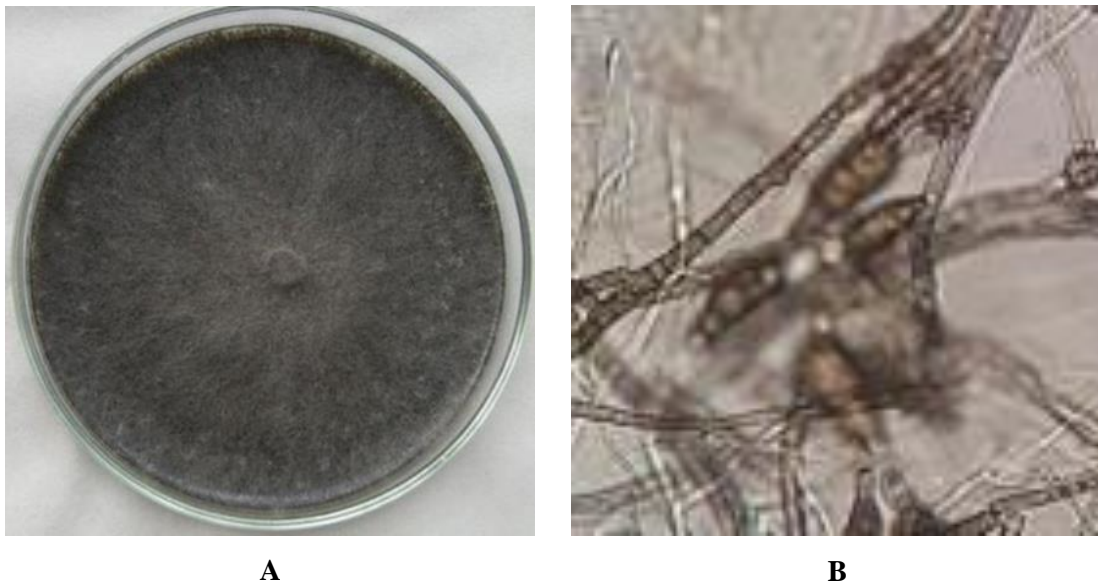


Figura 8: *Alternaria alternata*. A: Crecimiento de *Alternaria alternata* en Agar Agua y B: Conidios de *Alternaria alternata* vistos al microscopio óptico (40X) en cámara de Neubauer (Imágenes propias).

Desinfección superficial de semillas de tomate (variedad UCO 16)

Para la desinfección superficial de las semillas de tomate (UCO 16) se agitaron a las mismas en una solución de etanol al 70 % durante un minuto, en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1,5 % durante 3 minutos y finalmente, se lavaron 10 veces con agua destilada estéril, en agitación a 200 revoluciones por minuto (rpm).

Las semillas se sembraron en macetas de plástico de 5 litros (L), conteniendo una mezcla de tierra y arena en una proporción de 2 a 1. Dicha mezcla fue esterilizada en estufa a 160° C por 3 días. Luego las mismas se mantuvieron bajo condiciones de cámara de cría, con aproximadamente 25-30° C durante el día y 10-15° C durante la noche y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.



Figura 9: Semillas de tomate (FLORES y PLANTAS, 2016).

Ensayo de evaluación de patogenicidad de *Alternaria alternata* en *Solanum lycopersicum*

Las semillas desinfectadas se sembraron 5 en macetas de plástico de 5 L, conteniendo una mezcla de tierra y arena en una proporción de 2:1. Las plántulas en sus primeros estadios se regaron con agua estéril, y luego con una solución nutritiva de Hoagland (Anexo 1). Una vez germinadas las semillas y con la plántula de tomate desarrollada, se raleó dejando solo 2 plantas en la maceta. El ensayo estaba constituido por 36 macetas de las cuales 18 pertenecían al control negativo y 18 al control positivo, con sus lesiones inoculadas con el patógeno *Alternaria alternata*.

A los 25 días post emergencia cuando la planta de tomate contaba con tres o cuatro hojas verdaderas completamente desplegadas, las mismas se inocularon con el patógeno fúngico con la

técnica de microlesiones (Figura 10), en la cual se inocula cada hoja en 8 puntos con 10 microlitros (μL) de una suspensión de 1×10^4 conidios/mL, el mismo se llamó control positivo, y un control negativo, inoculado con la misma técnica, pero con agua estéril.

Los resultados se registraron mediante la determinación del porcentaje de lesiones afectadas por hojas y peso seco aéreo.



A



B



C

Figura 10: Evaluación de patogenicidad de *Alternaria alternata*. A: Planta joven de tomate; B: Hoja de tomate con microlesiones control y C: Plantas de tomate.

Ensayo de antagonismo *Pseudomonas* sp. RC-93 vs. *Alternaria alternata*

Se empleó la misma metodología para la desinfección de semillas, producción de inóculo bacteriano y fúngico como en el punto anterior. Luego de la obtención de plántulas a los 30 días desde la siembra en cámara de germinación (Figura 11), se llevó a cabo la coinoculación de las raíces de estas y el trasplante a maceta. A fin de evaluar la efectividad del agente de control biológico como antagonista frente a *Alternaria alternata*.



A



B



C

Figura 11: Ensayo de antagonismo *Pseudomonas* sp. RC-93 vs. *Alternaria alternata*. A: Preparación de plántulas previo a la realización del trasplante; B: Coinoculación de las raíces de plántulas de tomate y C: Trasplante de plántulas de tomate a macetas previa inoculación de sus raíces.

Ensayo de actividad bioantagonista de *Pseudomonas* sp. RC-93 frente *Alternaria alternata* en frutos de *Solanum lycopersicum*

Para establecer la actividad bioantagonista de *Pseudomonas* sp. RC-93 frente a *Alternaria alternata* se utilizaron frutos de tomate (Figura 12) que se mantuvieron en almacenamiento a 4° C durante una semana antes del ensayo para descartar posibles afecciones precedentes con otros patógenos.

Los mismos se esterilizaron superficialmente por inmersión en una suspensión de Hipoclorito de Sodio al 2 % durante 2 minutos, se enjuagaron con agua destilada estéril y luego se secaron bajo cámara de flujo laminar. Sobre los frutos de tomate preparados de este modo se efectuaron heridas de 3 mm de profundidad y 3 mm de diámetro sobre la región ecuatorial con una punta de tip estéril. Inmediatamente después sobre cada una de las heridas se aplicó 20 µl de una dilución de *Pseudomonas* sp. RC-93 a diferentes concentraciones, 10⁹, 10⁷ y 10⁵ UFC/mL. Tres horas más tarde se aplicaron 15 µl de una suspensión 10⁴ de conidios/mL de *Alternaria alternata* en cada herida. Inmediatamente después fueron secados bajo flujo laminar nuevamente. El ensayo contó con dos tipos de controles, uno sin infestación el cual fue inoculado solo con agua destilada estéril denominado control negativo y otro inoculado únicamente con *Alternaria alternata* llamado control positivo.

Los frutos se colocaron en recipientes plásticos protegidos con papel film con la finalidad de mantener la humedad al 95 %. El ensayo se realizó durante 7 días a 20° C en una cámara de crecimiento. El síntoma evaluado fue: diámetro de lesión. El diseño fue completamente aleatorizado y se formó por tres repeticiones. Con los resultados del primer ensayo se decidió poner a punto la técnica, y se optó por realizar un segundo ensayo de postcosecha para evaluar la actividad bioantagonista de *Pseudomonas* sp. RC-93 frente *Alternaria alternata* nuevamente. En el mismo se utilizó sólo la dilución de *Pseudomonas* sp. RC-93 de 10⁵ UFC/mL.



A



B



C

Figura 12: Ensayo de actividad bioantagonista de *Pseudomonas* sp. RC-93 frente a *Alternaria alternata* en frutos. A: Frutos de tomate utilizados en el ensayo; B: Heridas realizadas sobre la región ecuatorial del fruto y C: Frutos de tomate colocados en los recipientes plásticos correspondientes a cada experimento.

Ensayos *in vitro*

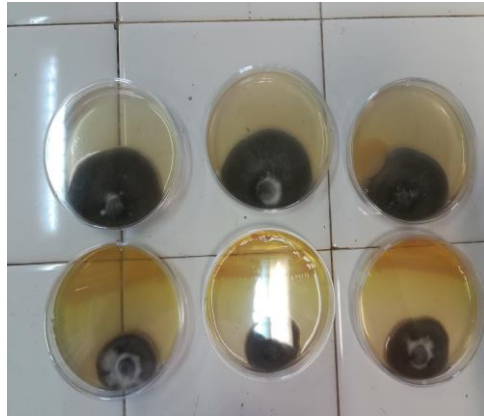
La actividad antifúngica de *Pseudomonas* sp. RC-93 frente a *Alternaria alternata* se evaluó mediante la técnica de cultivo dual en placa (Figura 13). Para ello, se sembró con un ansa en forma de estrías la cepa bacteriana hasta ocupar 1/3 de la superficie de la placa de Petri conteniendo medio PDA. En el extremo opuesto y a 2 cm del borde, se colocó un disco fúngico de *Alternaria alternata* en activo crecimiento con un diámetro de 0,6 cm. Las placas fueron incubadas a 28° C durante 7-10 días, para posteriormente medir la zona de inhibición que el controlador biológico logró frente al patógeno.

El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Alternaria alternata* se determinó con la siguiente fórmula:

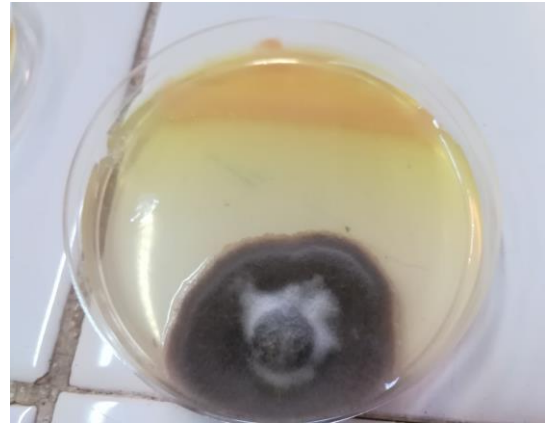
$$\% \text{ de inhibición micelial} = [(DCA - DCB) / DCA] * 100]$$

donde:

- DCA= diámetro de la colonia de *Alternaria alternata* en cajas de Petri con Agar Agua sin *Pseudomonas* sp. RC-93.
- DCB= diámetro de la colonia de *Alternaria alternata* creciendo en cajas de Petri con Agar Agua en presencia de *Pseudomonas* sp. RC-93.



A



B



C

Figura 13: Ensayo *in vitro*. A: Cultivo dual en placa de Petri con Agar Agua con *Pseudomonas* sp. RC-93 y *Alternaria alternata* y tratamiento Control; B: Tratamiento de *Pseudomonas* sp. RC-93 y *Alternaria alternata* y C: Tratamiento Control.

Análisis estadístico

Para verificar la validez de los supuestos del análisis de varianza (ANAVA), los cuales son normalidad y homogeneidad de varianzas, se aplicaron las pruebas estadísticas de Shapiro-Wilks (modificado) y Levene, respectivamente. Comprobados dichos supuestos, se procedió a realizar los ANAVA correspondientes de cada ensayo. Las variables que presentaron diferencias, se analizaron mediante comparaciones múltiples de medias con la prueba de LSD Fisher (nivel de significación $\leq 0,05$). Para todos los procedimientos estadísticos se utilizó los programas InfoStat versión 2018 (Di Rienzo *et al.*, 2018) y Excel (Microsoft, 2016).

Ensayo de evaluación de patogenicidad de *Alternaria alternata* en *Solanum lycopersicum*

El ensayo conto con 18 repeticiones, por lo que en total se utilizaron 36 macetas de plástico de 5 L con dos plantas de tomate cada una, donde cada maceta represento una repetición. El diseño estadístico del ensayo fue completamente aleatorizado. Del total de macetas, 18 pertenecían al control negativo cuyas microlesiones fueron inoculadas con agua estéril, y las 18 restantes formaron parte del control positivo, inoculadas con el patógeno *Alternaria alternata*. Las variables medidas y analizadas fueron porcentaje de lesiones afectadas por hoja y peso seco aéreo. Para la primera variable (porcentaje de lesiones afectadas por hoja) se realizó el análisis de la varianza correspondiente a un diseño completamente aleatorizado (DCA) con arreglo factorial, y se compararon las medias con la prueba de LSD Fisher, con un nivel de significación del 0,05. El análisis incluyó tres niveles, microorganismo inoculado, fecha y microorganismo inoculado * fecha. Mientras que, para la segunda variable (peso seco aéreo), se realizó un análisis de varianza para conocer si hubo diferencias estadísticas significativas entre las medias del control negativo y control positivo infestado con *Alternaria alternata* con respecto al peso seco obtenido en el ensayo.

Por último, se realizó un análisis regresión lineal para ver si existe relación entre porcentaje de lesiones afectadas por hojas y fecha.

Ensayo de antagonismo *Pseudomonas* sp. RC-93 vs. *Alternaria alternata*

Este ensayo se llevó a cabo con el fin de evaluar la efectividad del agente de control biológico como antagonista frente a *Alternaria alternata*. El diseño estadístico de este fue completamente aleatorizado.

El ensayo tuvo 8 repeticiones, cada una representada por una maceta con dos plantas. Por lo que en 8 de ellas las raíces desnudas de las plantas de tomate fueron tratadas simultáneamente con *Alternaria alternata* y *Pseudomonas* sp. RC-93, mientras que las plantas de las 8 macetas restantes pertenecían al correspondiente experimento control cuyas raíces fueron inoculadas solo con agua estéril.

Ensayo de actividad bioantagonista de *Pseudomonas* sp. RC-93 frente *Alternaria alternata* en frutos de *Solanum lycopersicum*

En dicho ensayo, sobre las lesiones realizadas en la región ecuatorial de los frutos de tomate se aplicó una dilución de *Pseudomonas* sp. RC-93 a diferentes concentraciones. Las

diluciones de microorganismos con la cual fueron inoculadas dichas lesiones fueron *Pseudomonas* sp. RC-93 10^9 , 10^7 y 10^5 UFC/mL. Además, otras tres diluciones estuvieron compuestas por *Pseudomonas* sp. RC-93 con las mismas concentraciones mencionadas con anterioridad, a los cuales se aplicó conjuntamente tres horas más tarde una suspensión de conidios de *Alternaria alternata* en cada herida. Asimismo, el ensayo conto con dos tipos de controles, uno sin infestación, en donde a la herida realizada en los tomates se le coloco agua destilada estéril, denominado control negativo y otro inoculado únicamente con *Alternaria alternata* llamado control positivo.

La variable evaluada fue el diámetro de las lesiones. El diseño estadístico del ensayo fue completamente aleatorizado, con tres repeticiones, donde cada repetición fue representada por tres tomates colocados en un recipiente plástico.

En el segundo ensayo de postcosecha se utilizó sólo la dilución de *Pseudomonas* sp. RC-93 de 10^5 UFC/mL para realizar las pertinentes inoculaciones. Por lo que hubo solo tres diluciones, en la primera sobre las lesiones de los frutos de tomate solo se aplicó *Pseudomonas* sp. RC-93, en la segunda además de *Pseudomonas* sp. RC-93 de 10^5 UFC/mL, se administro una suspensión de *Alternaria alternata* en cada herida, y por último el control en el cual se aplicó agua estéril en cada una de las lesiones de los frutos de tomate.

La variable evaluada, el diseño experimental, el número de repeticiones fueron iguales a los utilizados en el primer ensayo.

Los datos obtenidos en los dos ensayos realizados se procesaron mediante un análisis de la varianza para poder determinar si existió diferencias estadísticas significativas entre las medias en cuanto al diámetro de las lesiones, utilizando como comparación a LSD Fisher con un nivel de significación del 0,05. El mismo conto con tres niveles, entre ellos microorganismo inoculado, fecha y microorganismo inoculado * fecha.

Además, se realizó un análisis de regresión lineal para conocer si hay relación entre las variables diámetro de las lesiones y fecha.

Ensayos *in vitro*

El mismo se realizó en 3 tratamientos, el primero correspondiente al control en el que cada placa de Petri contuvo solo un disco fúngico de *Alternaria alternata* en activo crecimiento. En el segundo llamado simultaneo, se sembró 1/3 de la superficie de cada placa de Petri en forma de estrías con la cepa bacteriana y se colocó un disco fúngico de *Alternaria alternata* en forma inmediata en el extremo opuesto, y por último el tratamiento desfasado, en el cual en un primer momento se sembró la placa de Petri con *Pseudomonas* sp. RC-93 y luego 48 horas más tarde se colocó el disco fúngico de *Alternaria alternata*.

Cada tratamiento conto con 5 repeticiones, donde cada una se representó por una placa de Petri. El diseño estadístico del ensayo al igual que en los anteriores fue completamente aleatorizado.

Los resultados se registraron mediante la determinación del crecimiento fúngico de cada placa de Petri en centímetros y mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Alternaria alternata* por parte del ACB.

Por otro lado, se llevó a cabo un análisis de la varianza para poder determinar si hay diferencias estadísticas significativas en las medias entre los diferentes tratamientos en cuanto crecimiento fúngico y el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo patógeno, utilizando como metodología de comparación a LSD Fisher con un nivel de significación del 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos *in vivo* en cámara de crecimiento

Ensayo de evaluación de patogenicidad de *Alternaria alternata* en *Solanum lycopersicum*

En los ensayos *in vivo* realizados se midió el porcentaje de infestación del patógeno en plantas de tomate mediante la metodología de lesión e inoculación tanto en el experimento *Alternaria alternata* y control.

La sintomatología del patógeno en las hojas de las plantas se presentó progresivamente en el tiempo. Esto se produce principalmente por la forma de propagación de la infestación en la planta huésped realizada por el hongo *Alternaria alternata* en la cual, desde la infestación y multiplicación de sus estructuras generó una progresiva destrucción de los tejidos del mesófilo de la hoja a través de la reducción del potencial fotosintético en un proceso relativamente lento, donde una infestación condujo a la formación de lesiones necróticas, en la que el hongo reside en el centro de la lesión, rodeado por un halo clorótico no invadido. Esta zona es creada por la difusión de metabolitos fúngicos como se observa en la figura 14 (Thomma, 2003).



A



B



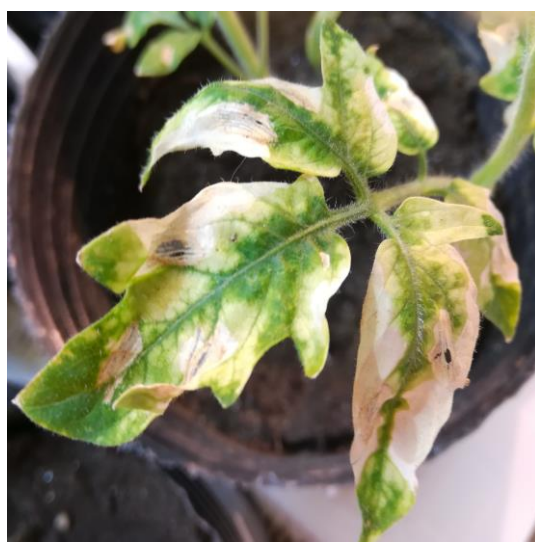
C



D



E



F

Figura 14: Ensayo de patogenicidad de *Alternaria alternata*: Evolución de las lesiones en el tiempo días desde la inoculación (DDI). A: Control 7 DDI; B: Planta inoculada con *Alternaria alternata* 7 DDI; C: Control 17 DDI; D: Planta inoculada con *Alternaria alternata* 17 DDI; E: Control 27 DDI y F: Planta inoculada con *Alternaria alternata* 27 DDI.

Esto permitió mediante el análisis de la varianza, observar en primer lugar las diferencias estadísticas existente entre las medias en el porcentaje de infestación entre las plantas cuyas lesiones fueron inoculadas con el microorganismo *Alternaria alternata* (control positivo) y control negativo sin infestar para cada una de las fechas donde se tomaron los datos. El porcentaje de lesiones infestadas que presentaron sintomatología de la enfermedad en el control positivo en las diferentes lecturas (que se realizaron en tres fechas diferentes) fue progresivamente mayor en el tiempo y junto a esto, mayor la diferencia observada frente al comparado con el control negativo

sin inocular (Figura 15). En la primera medición, la cual se llevó a cabo el día 01/09/2017 se obtuvo una media de 43,38 % de lesiones infestadas, en aquellas plantas que fueron inoculadas con el microorganismo *Alternaria alternata*, mientras que solo un 4,14 % en el control negativo; para la segunda, realizada el 11/09/2017 un 79,94 % de las lesiones resultaron afectadas en el control positivo mientras que solo un 5,6 % en el control negativo; y por último se obtuvo una media del 97,59 % de lesiones infestadas en el control positivo y solo un 8,2 % en el control negativo para la tercera toma de datos llevada a cabo el 18/09/2017 (Anexo 2.1).

Por otra parte, en cuanto a la diferencia entre las medias en el porcentaje de infestación de las lesiones que fueron inoculadas con el microorganismo y el control negativo en las diferentes fechas en las que se registraron los datos, se observa que, para el control negativo, no existe diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes fechas. Mientras que para las lesiones que fueron infestado con *Alternaria alternata* si hubo diferencias estadísticas significativas entre las medias (Figura 15, anexo 2.1).

El aumento que se produjo en el porcentaje de infestación en las diferentes lecturas puede estar asociado a la aparición más diferenciada de los síntomas a través del tiempo y la capacidad de observarlos efectivamente en el momento de toma de datos del ensayo. Un aspecto a tener en cuenta es que las lesiones afectadas por el patógeno en el control negativo podrían asociarse tanto al error experimental como a la infestación cruzada por contacto entre plantas de diferentes macetas o, por la producida por inóculo secundario.

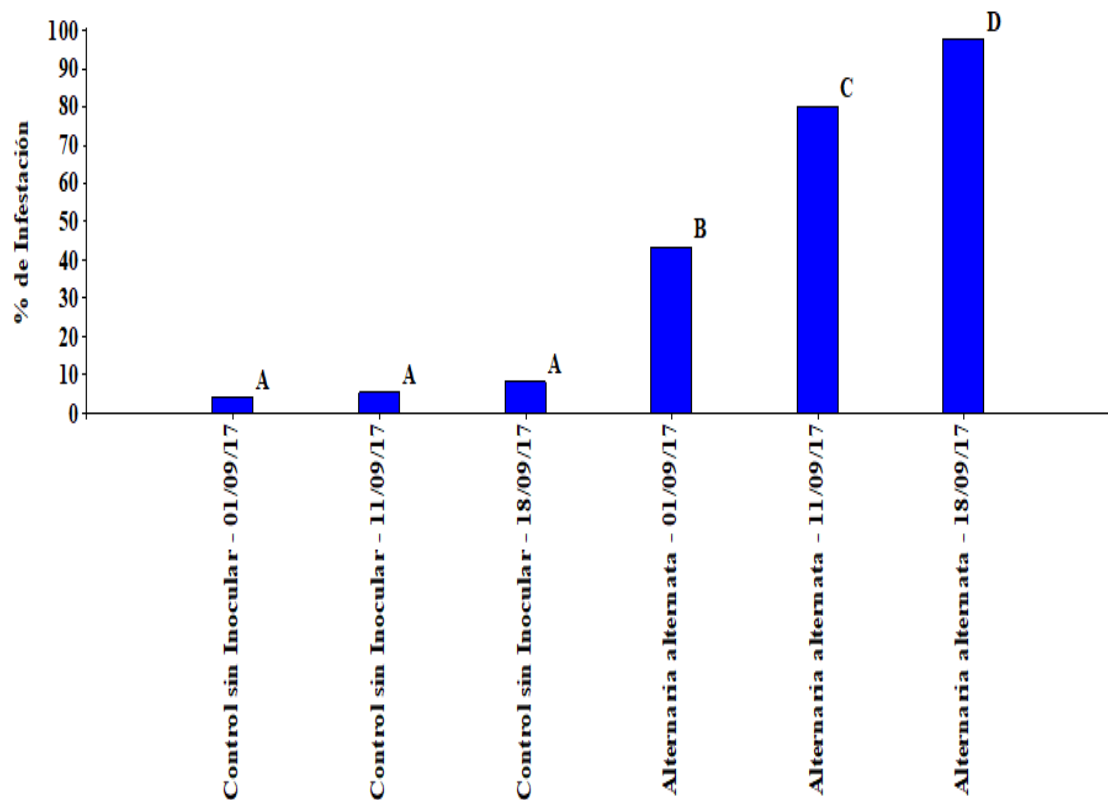


Figura 15: Evaluación de la patogenicidad de *Alternaria alternata*: porcentaje de infestación de la cepa en tres fechas diferentes.

Además, en el análisis de varianza se logró observar las diferencias estadísticas existente entre las medias en el porcentaje de infestación entre el control positivo cuyas lesiones fueron infestadas con *Alternaria alternata* y el control negativo para el conjunto de los datos (tres fechas) que se obtuvieron a lo largo del ensayo (Anexo 2.1). En este caso, las diferencias entre ambos controles, fueron estadísticamente significativas obteniéndose un p-value <0,0001.

Los resultados demuestran que la cepa microbiana utilizada es efectiva en el desarrollo de la enfermedad del cultivo y existen diferencias significativas en el porcentaje de infestación entre los mismos (Figura 16). Coincidiendo con Blancard (2012) quien describe la importancia del patógeno en el cultivo de tomate y la importancia del manejo cultural de la misma coordinando metodologías biotecnológicas eco amigables.

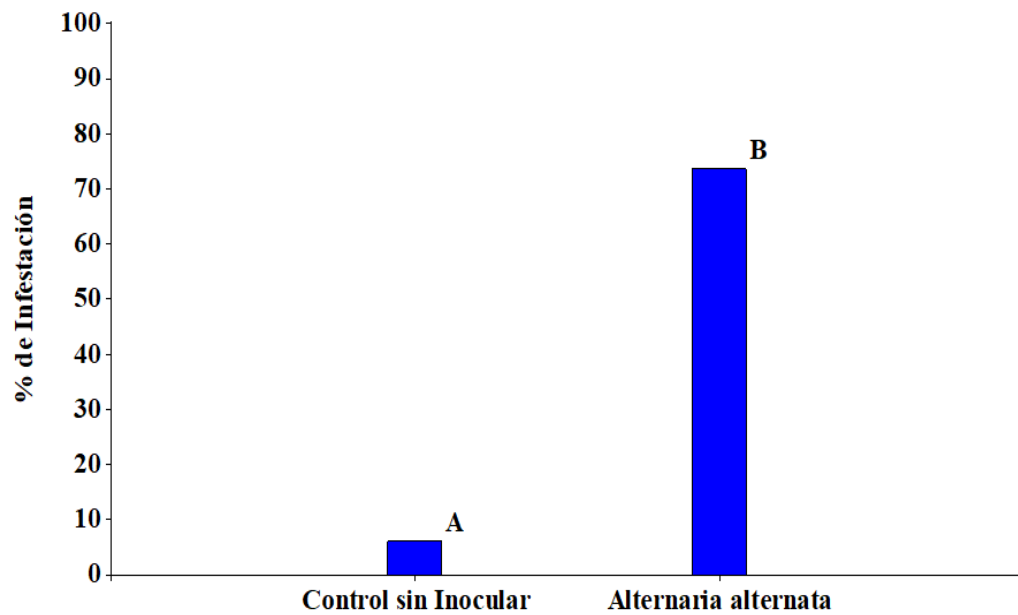


Figura 16: Evaluación de la patogenicidad de *Alternaria alternata*.

Por otra parte, mediante un análisis de regresión lineal, se observó que, el número de lesiones infestadas con *Alternaria alternata* que presentaron sintomatología de la enfermedad aumentaron con el tiempo (Figura 17). Y se obtuvo para el control positivo infestado con el patógeno la ecuación lineal que describió su comportamiento en el ensayo, la cual fue $y = 3,2205x - 138369$.

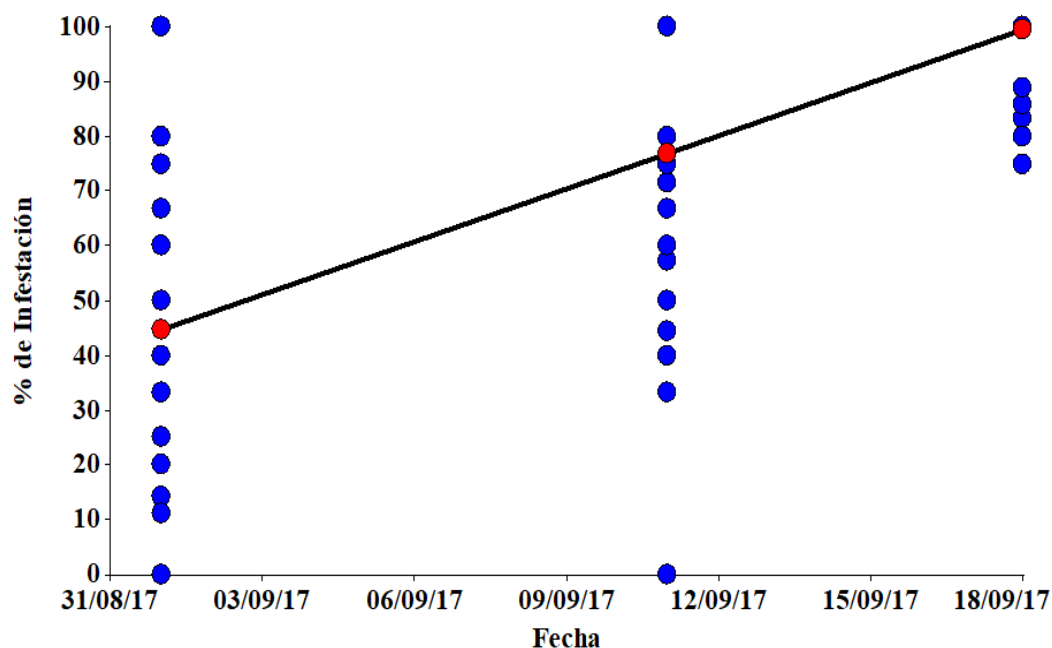


Figura 17: Ensayo de patogenicidad de *Alternaria alternata*: porcentaje de infestación con *Alternaria alternata* en el control positivo.

Por último, mediante un análisis de varianza se determinó que las plantas cuyas lesiones fueron inoculadas con *Alternaria alternata* y las del control negativo, no presentaron diferencias estadísticas entre las medias del peso seco, esto se podría explicar debido a que se utilizó plantas muy uniformes en el estadio fenológico, y además fueron consideradas para su cálculo las hojas enfermas que se presentaban. Por lo tanto, como se menciona con anterioridad no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los experimentos como se observa en la Figura 18.

En la Figura 19 se puede apreciar de modo complementario el dato de peso seco total medido en gramo y en porcentaje para cada experimento.

Este estudio debería convalidarse con nuevos ensayos para lograr conclusiones apreciables, además sería necesario ajustar el método utilizado y profundizarlo con estudios complementarios.

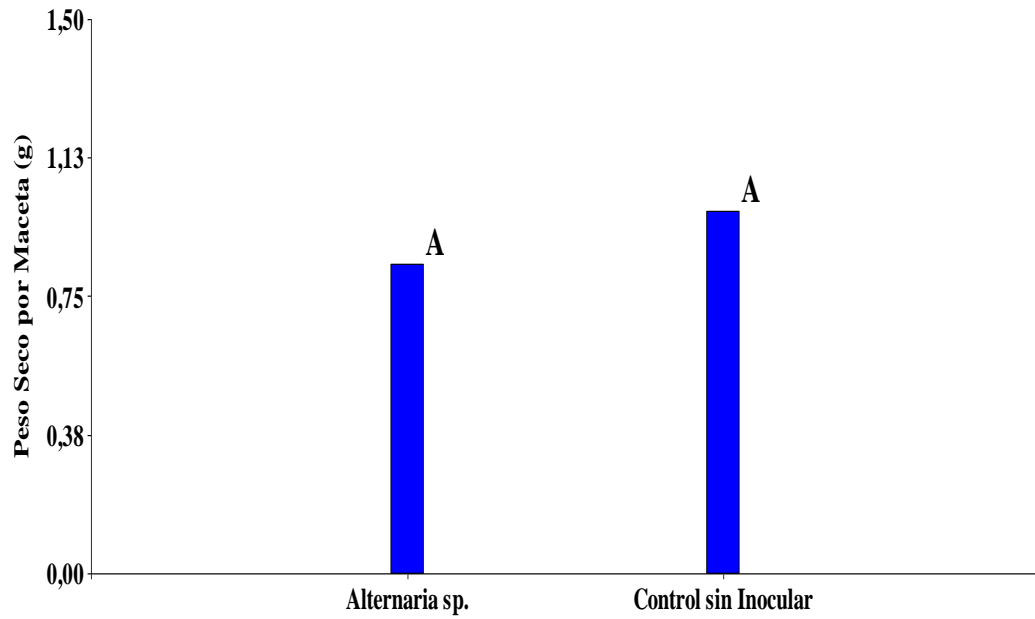


Figura 18: Patogenicidad de *Alternaria alternata*: Peso Seco medido en gramos (g) para los experimentos de Control negativo y *Alternaria alternata*.

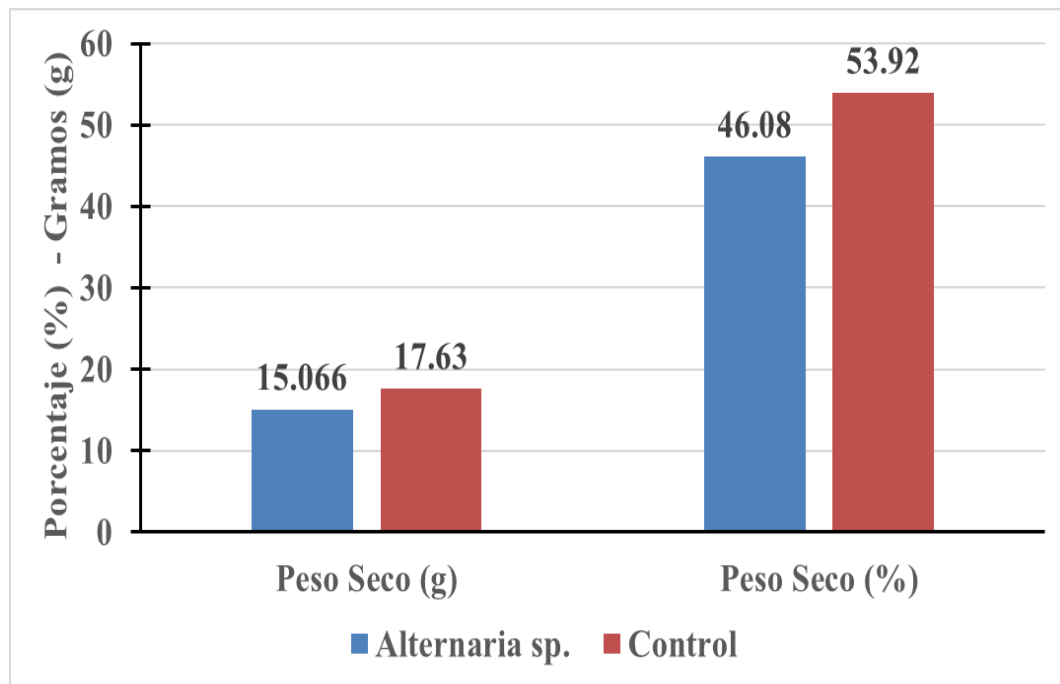


Figura 19: Patogenicidad de *Alternaria alternata*: comparación del Peso Seco medido en gramos (g) y medido en porcentaje (%).

Ensayo de antagonismo *Pseudomonas* sp. RC-93 vs. *Alternaria alternata*

En este ensayo las raíces desnudas de las plantas fueron inoculadas con *Pseudomonas* sp. RC-93 y en forma simultanea sus las hojas se inocularon con *Alternaria alternata* mediante la técnica de microlesiones descrita con anterioridad, junto con sus respectivos controles. Los resultados obtenidos en primera instancia no fueron los esperados, posiblemente debido las condiciones ambientales de la cámara de crecimiento. La intensidad lumínica no habría sido la necesaria para el crecimiento de las plantas, ya que en un primer intento se diagnosticó que las mismas sufrieron una carencia de luz de espectro rojo. En el segundo ensayo esta dificultad fue salvada, tras el agregado de luz del espectro rojo, pero no se pudo controlar la temperatura de la cámara, la cual resultaba muy elevada, ya que el climatizador no cumplía con los requerimientos por su antigüedad (Figura 20); por lo tanto, nuevamente fue fallido (Tabla 3), se cree que sería necesario ajustar el método utilizado y profundizarlo con otros estudios complementarios que se realizarán durante el año 2019.



A



B



C



D

Figura 20: Ensayo en cámara de cría de antagonismo *Pseudomonas* sp. RC-93 vs. *Alternaria alternata*: A: Inoculación de las raíces; B: Trasplante a maceta; C: Primer ensayo y D: Segundo ensayo con agregado de luz de espectro rojo.

Tabla 3: Resultados ensayo de antagonismo *Pseudomonas* sp. RC-93 vs. *Alternaria alternata* en macetas. Referencias: V: planta viva; M: planta muerta; S: planta senescente.

Maceta / Experimento	<i>Pseudomonas</i> sp. RC-93 10 ⁵ UFC/mL	Control
1	M	M
2	V	M
3	V	V
4	M	M
5	S	M
6	S	M
7	V	V
8	M	S

Ensayo de actividad bioantagonista de *Pseudomonas* sp. RC-93 frente *Alternaria alternata* en frutos de *Solanum lycopersicum*

En postcosecha se realizó dos ensayos con frutos de tomate. En el primero se llevó a cabo 6 inoculaciones distintas con microorganismos, y se realizaron los correspondientes controles (Ver materiales y métodos).

Al analizar las medias en una primera instancia mediante un gráfico de barras (Figura 21), se pudo observar el similar comportamiento de las medias del área infestada del Control, y las diluciones de microorganismos *Pseudomonas* sp. RC-93 10^5 UFC/mL, *Pseudomonas* sp. RC-93 10^7 UFC/mL y *Pseudomonas* sp. RC-93 10^9 UFC/mL en las dos fechas (02/05/2018 y 08/05/2018). Otro grupo que tuvo un comportamiento similar fue el de aquellos tomates que fueron inoculados con los microorganismos *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^9 UFC/mL, *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^7 UFC/mL y *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^5 UFC/mL, con la salvedad de que este último tuvo menor área de infestación en la primera toma de datos y, por último, se observó que las lesiones de los frutos que fueron infestadas solo con *Alternaria alternata* tuvo mayor media de área de infestación en las dos tomas de datos dado que el patógeno creció sin limitantes.

Demostrándose en esta menor media de área infestada de los frutos que fueron inoculados tanto con PGPR como con el patógeno, la importancia de *Pseudomonas* sp. RC-93 como biocontrolador. Esta observación coincide con los resultados obtenidos por Guerra *et al.* (2011) quienes demostraron que inoculaciones con *Pseudomonas* spp. disminuyen la incidencia de hongos patógenos en los frutos de otro cultivo, debido a que se logra disminuir presión ejercida por mismos, mediante la producción de uno o más metabolitos, dentro de los que se encuentran sideróforos, antibióticos, cianuro y enzimas líticas.

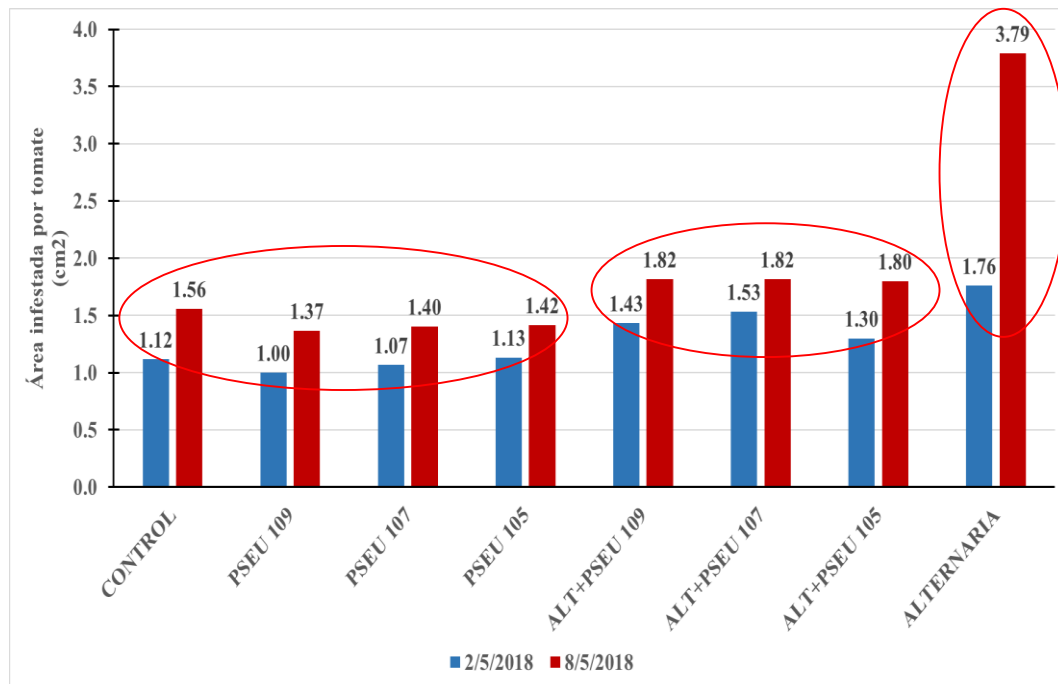


Figura 21: Ensayo de actividad bioantagonista de *Pseudomonas* sp. RC-93 frente a *Alternaria alternata* en frutos de tomate.

En base a lo descrito con anterioridad se realizó un análisis de varianza en el cual en primer lugar se observó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las medias de la superficie afectada de cada tomate medida en centímetros cuadrados a lo largo del ensayo entre aquellos que fueron inoculados con el microorganismo *Alternaria alternata* y los demás (Control, *Pseudomonas* sp. RC-93 10^5 UFC/mL, *Pseudomonas* sp. RC-93 10^7 UFC/mL, *Pseudomonas* sp. RC-93 10^9 UFC/mL, *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^9 UFC/mL, *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^7 UFC/mL y *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^5 UFC/mL) (Figura 22, anexo 2.2), coincidiendo con Trujillo *et al.* (2007), quien concluyó que *Pseudomonas* sp. ejerce un efecto antagónico e inhibitorio en diversos hongos entre ellos *Alternaria alternata*.

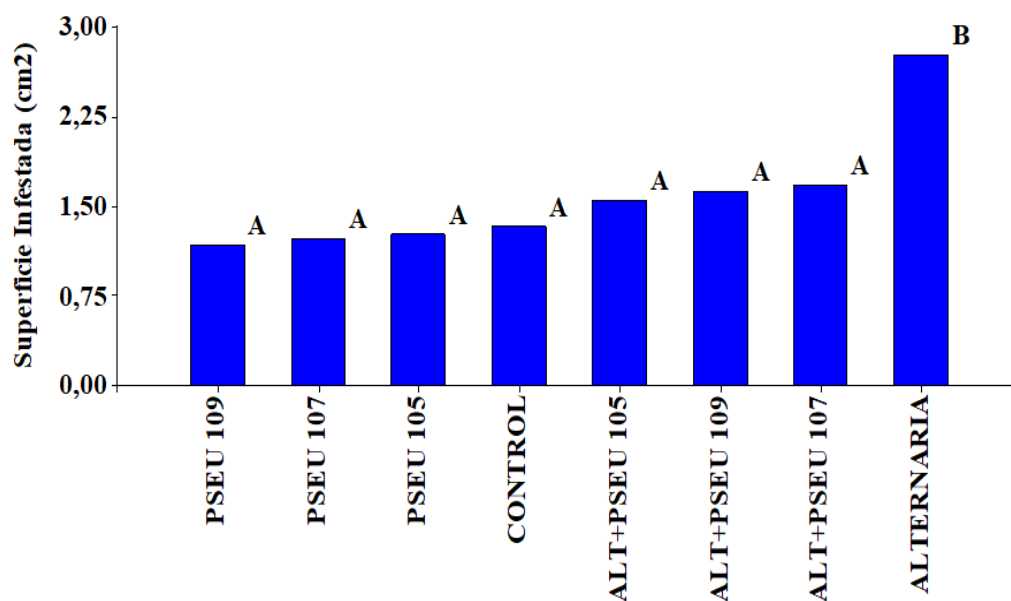


Figura 22: Ensayo de actividad bioantagonista: Superficie afectada de cada tomate.

Al analizar el comportamiento de las diversas inoculaciones que se realizaron en las dos fechas en las que se efectuaron las correspondientes tomas de datos, se observó que en la primera de ellas (02/05/2018) no hubo diferencias estadísticas significativas entre las medias de la superficie infestada de los tomates de las inoculaciones realizadas (*Pseudomonas* sp. RC-93 10^9 UFC/mL, *Pseudomonas* sp. RC-93 10^7 UFC/mL, *Pseudomonas* sp. RC-93 10^5 UFC/mL, *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^9 UFC/mL, *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^7 UFC/mL, *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^5 UFC/mL, *Alternaria alternata* y Control) (Figura 23 y 24, anexo 2.2).

Del análisis anteriormente realizado, se destacó la falta de diferencias estadísticas significativas entre las medias de las diversas inoculaciones realizadas en el ensayo con las medias de los tomates que fueron inoculados solo con *Alternaria alternata*, esto puede deberse a que al inicio la enfermedad se propaga más lentamente hasta que se establece, coincidiendo con lo observado en el ensayo de evaluación de la patogenicidad de *Alternaria alternata* donde se produjo una aparición más diferenciada de los síntomas a través del tiempo al inicio mucho más lenta debido a la forma de propagación característica del hongo *Alternaria alternata*.

En la segunda fecha (08/05/2018) por su parte, se observó la existencia de diferencias estadísticas significativas entre las medias de la superficie infestada de los tomates inoculados solo con el patógeno *Alternaria alternata* y las demás inoculaciones (*Pseudomonas* sp. RC-93 10^9 UFC/mL, *Pseudomonas* sp. RC-93 10^7 UFC/mL, *Pseudomonas* sp. RC-93 10^5 UFC/mL, *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^9 UFC/mL, *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^7 UFC/mL, *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^5

UFC/mL y Control), lo que manifestaría la efectividad del PGPR (*Pseudomonas* sp. RC-93), demostrando su efecto biocontrolador sobre el patógeno *Alternaria alternata* (Figura 23 y 24, anexo 2.2). Coincidiendo con los resultados que obtuvieron Gakegne *et al.* (2017) al demostrar el efecto inhibitorio, fungicida y fungistático de *Pseudomonas* sp. frente *Alternaria* spp. en un cultivo diferente (papa).

Como se mencionó anteriormente los tomates que fueron inoculados con *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^9 UFC/mL, *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^7 UFC/mL y *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^5 UFC/mL no presentaron diferencias estadísticas significativas en las medias en ninguna de las dos fechas de evaluación (02/05/2018 y 08/05/2018), por lo que el control del avance del patógeno fue efectivo y similar en todas las diluciones del PGPR utilizadas. Cabe destacar que al lograrse un control equivalente de *Alternaria alternata* con una menor concentración bacteriana (*Pseudomonas* sp. RC-93 10^5 UFC/mL) al inocular el fruto de tomate es muy importante, ya que se coloca menor concentración de un agente externo a la planta para el control del hongo patógeno. Lo que sería muy beneficioso no solo desde el punto de vista económico, sino que también desde el punto de vista ecológico y sustentable.

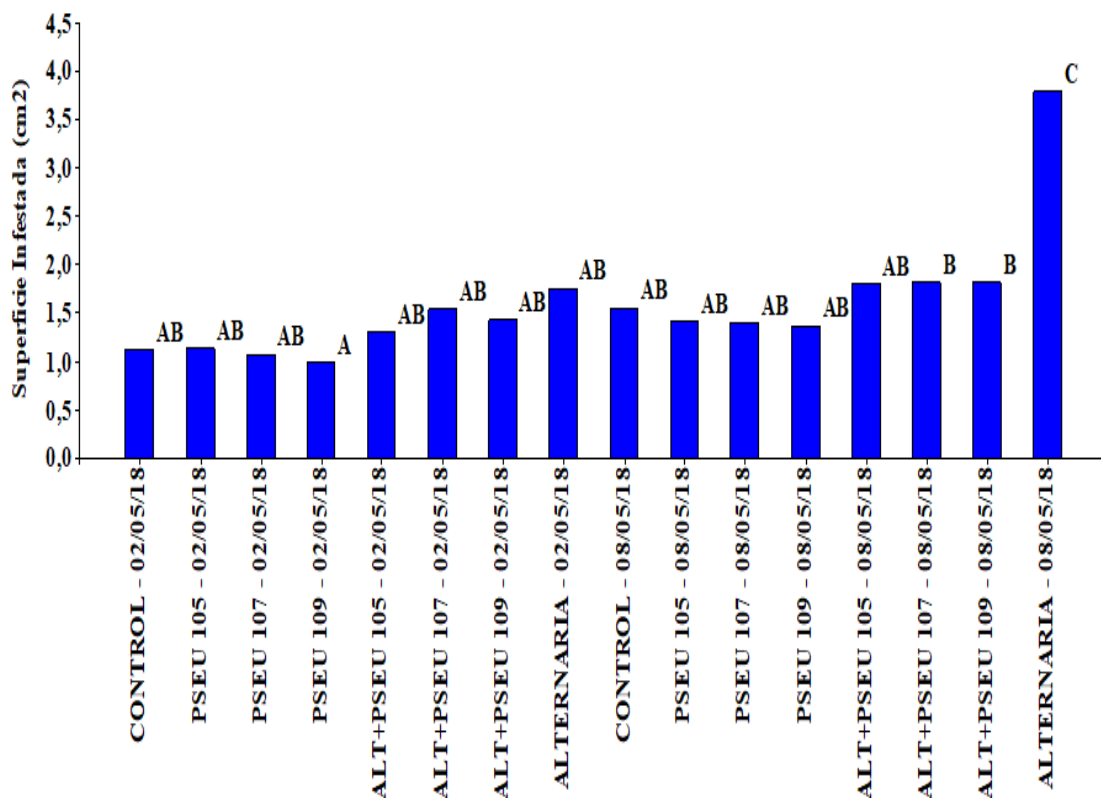


Figura 23: Ensayo de actividad bioantagonista de *Pseudomonas* sp. RC-93 frente a *Alternaria alternata* en frutos de tomate: Superficie afectada de cada tomate en cada inoculación para las dos fechas.



A



B



C



D



E



F



G



H

Figura 24: Ensayo de actividad bioantagonista de *Pseudomonas* sp. RC-93 frente *Alternaria alternata* en frutos: Evolución de las lesiones en las diversas inoculaciones. A: Control; B: *Alternaria alternata* 10^4 conidios/mL; C: *Pseudomonas* sp. RC-93 10^9 UFC/mL; D: *Pseudomonas* sp. RC-93 10^7 UFC/mL; E: *Pseudomonas* sp. RC-93 10^5 UFC/mL; F: *Alternaria alternata* 10^4 conidios/mL + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^9 UFC/mL; G: *Alternaria alternata* 10^4 conidios/mL + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^7 UFC/mL y H: *Alternaria alternata* 10^4 conidios/mL + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^5 UFC/mL.

Teniendo en cuenta lo analizado anteriormente se llevó a cabo un segundo ensayo de postcosecha en frutos de tomate, los cuales fueron inoculándolos solo con *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^5 UFC/mL además de los correspondientes controles.

En este, se observó a modo introductorio en un primer análisis realizado en base a un gráfico, que la media del área infestada tanto de los frutos que fueron inoculados con los microorganismos como de los controles, fue similar en las tomas de datos de los días 20/05/2018 y 21/05/2018, dado que al inicio la enfermedad se propaga más lentamente hasta que se establece. Mientras que en las siguientes tomas de datos de los días 27/05/2018, 01/06/2018 y 04/06/2018 los tomates del Control y los infestados con *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^5 UFC/mL tuvieron un menor incremento del área afectada en el tiempo con respecto a los infestados solo con *Alternaria alternata*. Lo que manifestaría la efectividad de la cepa de *Pseudomonas* sp. RC-93, demostrando su efecto biocontrolador sobre el patógeno (Figura 25). Similares resultados obtuvieron Gakegne *et al.* (2017) al demostrar el efecto inhibitorio, fungicida y fungistático de *Pseudomonas* sp. frente *Alternaria* spp. en un cultivo diferente (papa).

Además, los resultados obtenidos coincidieron con lo observado en el ensayo de evaluación de la patogenicidad de *Alternaria alternata* y en el primer ensayo de postcosecha en frutos de tomate, donde se produjo una aparición más diferenciada de los síntomas a través del

tiempo. Al inicio, la manifestación de la actividad del patógeno en el hospedante fue mucho más lenta debido a la forma de propagación característica del hongo *Alternaria alternata* (Figura 25), en concordancia con lo descrito por Thomma (2003).

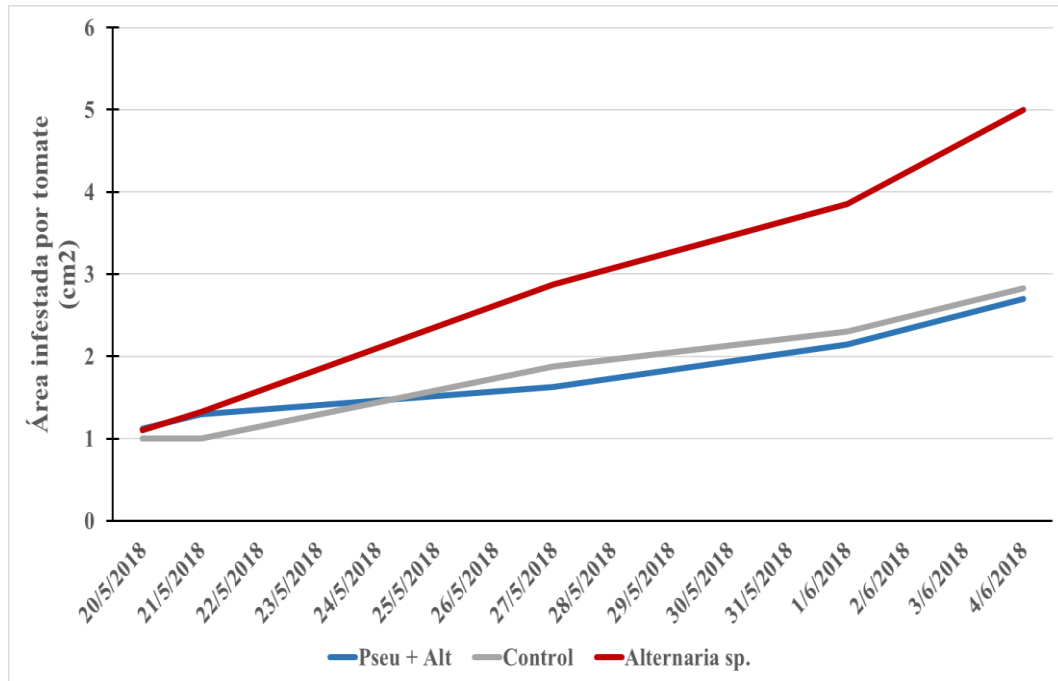
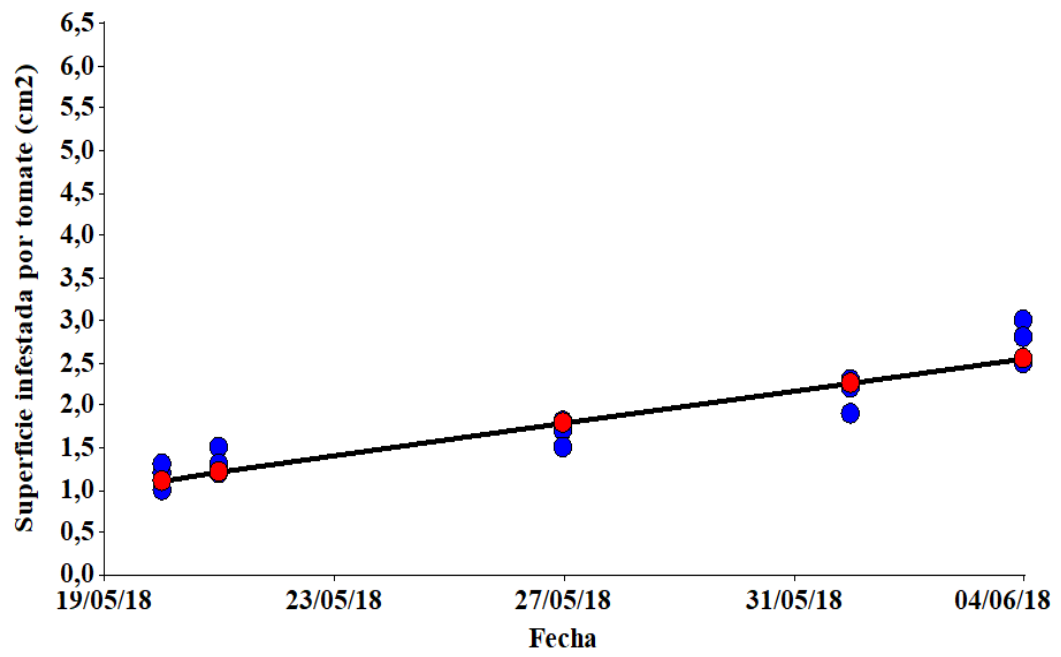
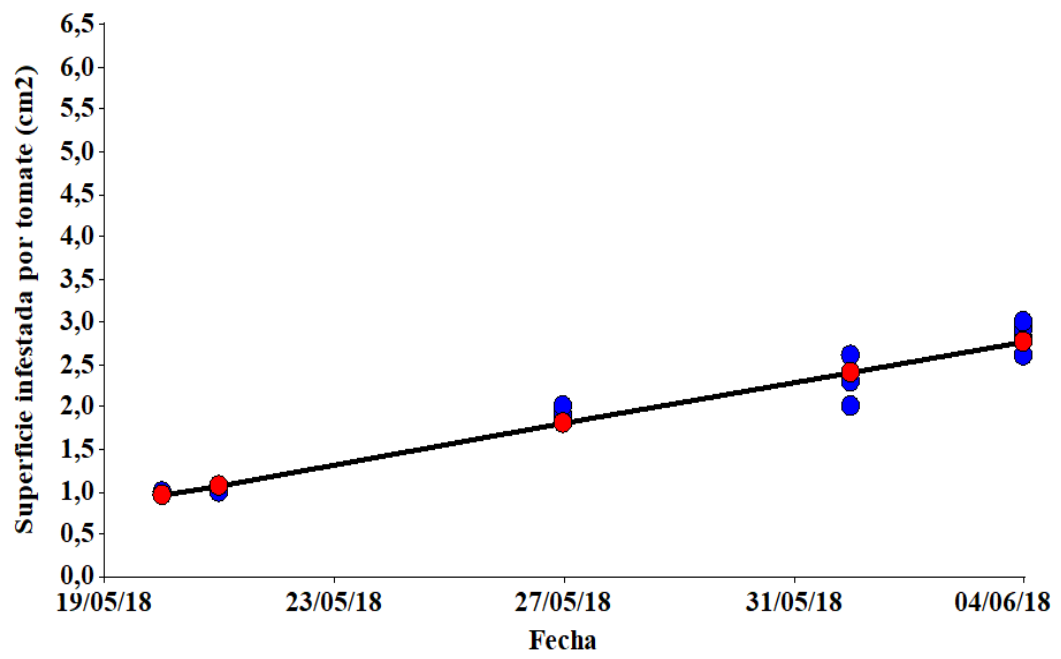


Figura 25: Ensayo de actividad bioantagonista de *Pseudomonas* sp. RC-93 frente a *Alternaria alternata* en frutos de tomate.

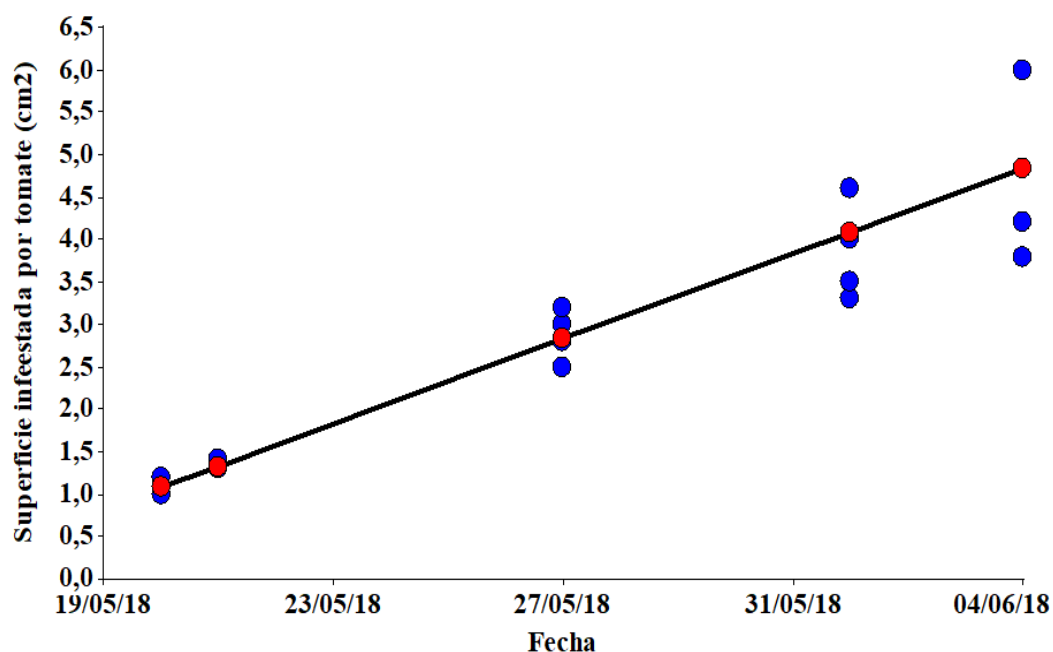
Los centímetros cuadrados de infestación de los tomates de las distintas inoculaciones efectuadas, se evaluaron a lo largo de cada una de las fechas de toma de datos, y a través de un análisis de regresión lineal se obtuvieron las siguientes ecuaciones lineales $y = 0,0958x - 4142,7$ con un $r^2 = 0,896$ la cual describe el comportamiento del área infestada a lo largo del ensayo de los tomates inoculados con *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^5 UFC/mL a lo largo del ensayo. Para el área de los tomates cuyas lesiones fueron infestadas solo con *Alternaria alternata* la ecuación lineal que se obtuvo fue $y = 0,2506x - 10834$ con un $r^2 = 0,88$. Por otro lado, la correspondiente al Control fue $y = 0,1213x - 5242,5$ con un $r^2 = 0,96$ (Figura 26).



A



B



C

Figura 26: Ensayo de actividad bioantagonista de *Pseudomonas* sp. RC-93 frente *Alternaria alternata* en frutos de tomate. A: *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^5 UFC/mL; B: Control y C: *Alternaria alternata*.

En el análisis de varianza se demostró que existen diferencias estadísticas significativas en las medias de la superficie afectada de cada tomate entre el control infestado con el patógeno y los infestados con *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^5 UFC/mL, a lo largo del ensayo (Figura 27, anexo 2.2), con un p-valúe $< 0,0001$.

Cabe aclarar que, entre los frutos inoculados con *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^5 UFC/mL, y Control sin afectar no hubo diferencia significativa, sin embargo, ambos se diferenciaron con el Control infestado con *Alternaria alternata* (Figura 28). Lo que demostraría una gran eficiencia de *Pseudomonas* sp. RC-93 en el control del patógeno.

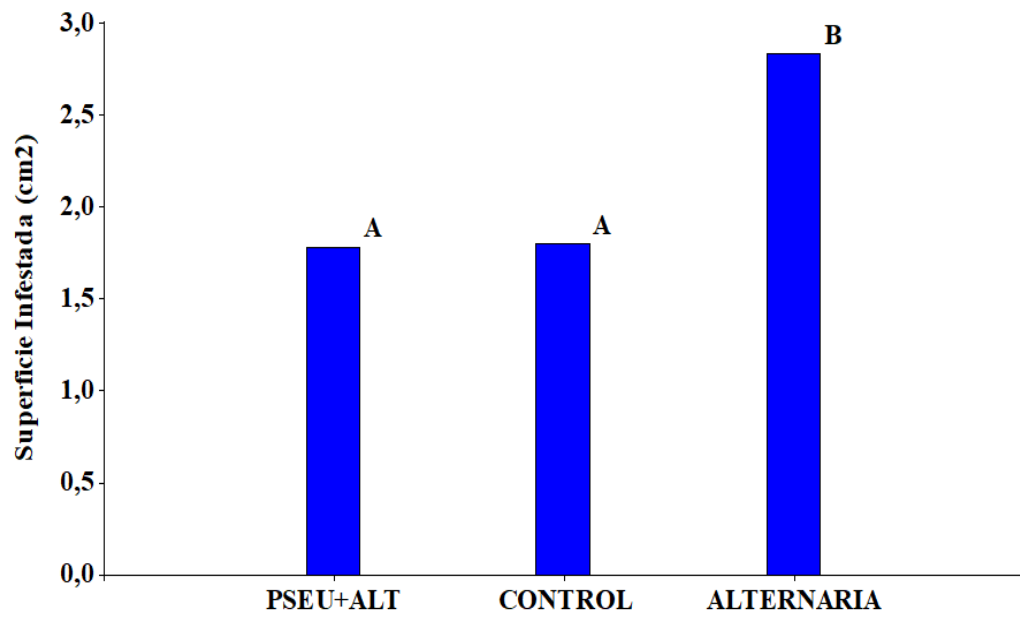


Figura 27: Ensayo de actividad bioantagonista de *Pseudomonas* sp. RC-93 frente a *Alternaria alternata* en frutos de tomate.



A



B



C

Figura 28: Ensayo de actividad bioantagonista de *Pseudomonas* sp. RC-93 frente *Alternaria alternata* en frutos: Evolución de las lesiones de las diversas inoculaciones. A: Control; B: *Alternaria alternata* 10^4 conidios/mL y C: *Alternaria alternata* 10^4 conidios/mL + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^5 UFC/mL.

Además, en el análisis estadístico se observó las diferencias estadísticas existente entre las medias de la superficie afectada en las diversas fechas en las que se realizó la recolección de datos entre los experimentos.

Para la primera y segunda fecha de toma de datos no se observan diferencias estadísticas significativas entre las suspensiones. Esto puede deberse a que dichas tomas de datos se realizaron en una fecha próxima al inicio del ensayo, en la que el patógeno no tuvo suficiente tiempo para colonizar la lesión debido a las características de su proceso de infestación como se mencionó con anterioridad. En la tercer fecha correspondiente al día 27/05/2018, comienza a observarse diferencias estadísticas significativas entre las medias del área infestada de los tomates inoculados con *Alternaria alternata* + *Pseudomonas* sp. RC-93 10^5 UFC/mL y Control sin infectar comparados a los infestados con *Alternaria alternata*, lo mismo sucede en las fechas subsiguientes (01/06/2018 y 04/06/2018). Lo que demostraría nuevamente la gran eficiencia de *Pseudomonas* sp. RC-93 en el control del hongo patógeno *Alternaria alternata* en frutos de tomate (Figura 29, anexo 2.2).

Por otra parte, se observó un aumento de las medias de la superficie infestada en el control sin inocular, el factor que explicaría esto, que además afecta a la velocidad de avance del patógeno en los demás frutos inoculados con microorganismos es la maduración del fruto. Debido a que con el avance de la misma se producen cambios fisiológicos como la pérdida de peso causada por la transpiración del vapor de agua y de los compuestos volátiles, además de las pérdidas de compuestos producidas por la respiración del fruto en la cual se utilizan principalmente azúcares

simples. Esto produce un notable deterioro en la epidermis y es un factor causal del ablandamiento de los frutos. Además, se observa un aumento de los sólidos solubles totales (SST) debido a la hidrólisis del almidón, en disacáridos y monosacáridos como sacarosa, fructuosa y glucosa, lo cual es utilizado por los diversos patógenos a los que está expuesto el fruto como fuente de energía. En la textura del fruto se produce una disminución de la firmeza, por la hidrólisis de componentes pépticos, celulosa y hemicelulosa. Esto se puede evidenciar además en los cambios de la microestructura de los tejidos internos, ya que en etapas no avanzadas de maduras se observan las paredes celulares bien definidas, mientras que adelantada la misma el interior de las células tiene apariencia dendrítica, por el pasaje de líquido celular a espacios intercelulares (Marquéz *et al.*, 2007). Todo esto favorece el ataque de patógenos, ya que se benefician de la debilidad estructural del fruto y de la mayor disponibilidad de nutrientes disponibles para su crecimiento. Esto explicaría el aumento en la media del área infestada de los tomates del control cuyas lesiones fueron inoculadas con agua destilada estéril y la mayor infestación observada en los tomates tratados con *Alternaria alternata*, ya que el patógeno tendría mayor disponibilidad de nutrientes para acelerar su crecimiento, y además según Thomma (2003) los tejidos debilitados, son más susceptibles a la infestación por *Alternaria alternata*.

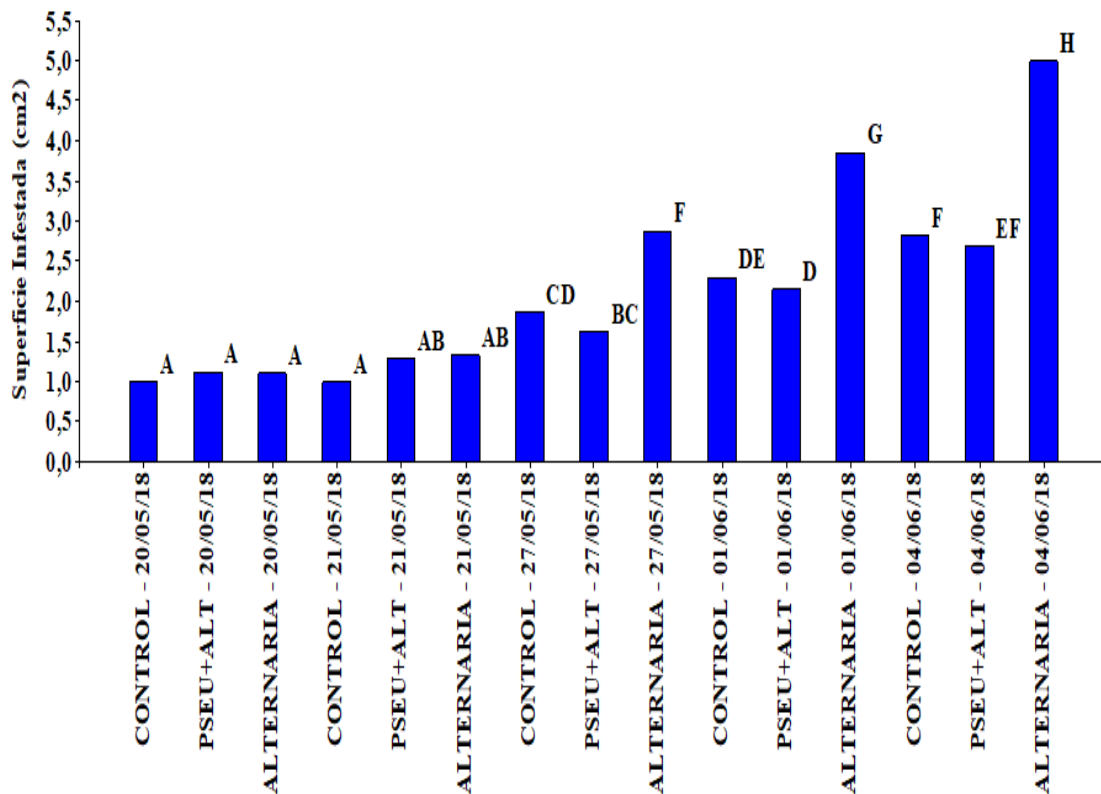


Figura 29: Ensayo de actividad bioantagonista de *Pseudomonas* sp. RC-93 frente a *Alternaria alternata*.

Ensayos *in vitro*

En los ensayos *in vitro* de *Pseudomonas* sp. RC-93 vs. *Alternaria alternata* se observó que la bacteria produjo el efecto antagonista esperado en el desarrollo del patógeno. Esto se reflejó en el análisis estadístico de la varianza, donde se analizó la diferencia estadística entre las medias existente en el crecimiento fúngico del hongo *Alternaria alternata* entre los tratamientos del ensayo. En el mismo se obtuvo un p-valúe $< 0,0001$, mostrando, que hubo diferencias estadísticas significativas entre el control y los tratamientos en los cuales estuvo presente *Pseudomonas* sp. RC-93 (Desfasado y simultáneo) (Figura 30, anexo 2.3). Esta reducción en el crecimiento del patógeno demostraría el efecto biocontrolador de la cepa bacteriana, coincidiendo con los resultados observados por Trujillo *et al.* (2007) y Gakegne *et al.* (2017), quienes demostraron el efecto inhibitorio del crecimiento de *Pseudomonas* sp. frente al hongo patógeno *Alternaria* spp. en los cultivos de maíz y papa, respectivamente. Además, mencionan que los posibles mecanismos involucrados en la inhibición pueden ser la producción de antibióticos, de quelatos de hierro y enzimas hidrolíticas, así como también la competencia por sitios nutricionalmente favorables.

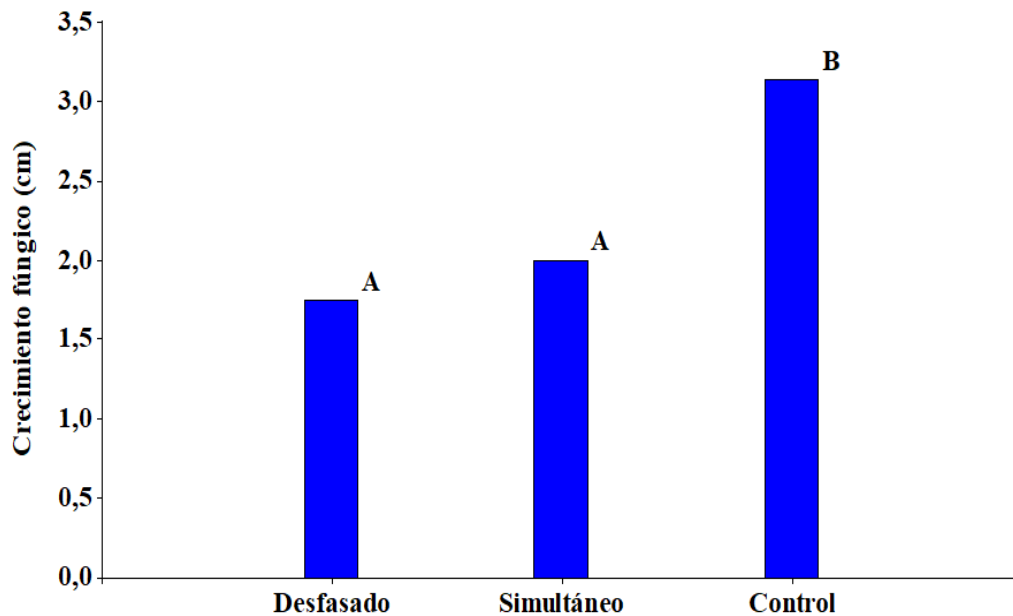


Figura 30: Ensayo *in vitro* de biocontrol en siembra simultánea y desfasada de *Pseudomonas* sp. RC-93 vs. *Alternaria alternata*.

En el método de siembra desfasada y simultánea, se observó cómo se mencionó anteriormente un menor desarrollo del patógeno en presencia del biocontrolador, en el cual el porcentaje de inhibición de crecimiento del patógeno fue en el tratamiento desfasado aproximadamente del 46,68 % (Figura 31). Mientras que el porcentaje de inhibición de

crecimiento en el tratamiento en el cual se colocó en forma simultánea a *Alternaria alternata* y *Pseudomonas* sp. RC-93 fue menor, aproximadamente del 33,27 % (Figura 32). Si bien el análisis de la varianza mostró que no existe diferencia estadística entre estos dos tratamientos (Figura 34), esta tendencia en la cual se produce un menor crecimiento del hongo patógeno en el tratamiento desfasado se explicaría por la ventaja competitiva dado por el mayor tiempo de crecimiento de *Pseudomonas* sp. RC-93 en ausencia del *Alternaria alternata* lo que permitió la producción de metabolitos secundarios capaces de inhibir el crecimiento del hongo, pero esto debería convalidarse con nuevos ensayos y profundizarlo con estudios complementarios.

Similar resultado obtuvo Villa *et al.* (2005) quien indicó que *Pseudomonas* sp. es capaz de producir una inhibición del crecimiento micelial de entre un 60 y 90 %, por la excreción de los metabolitos sideróforos y metabolitos antimicrobianos, siendo muy importante en el control biológico de una gran variedad de patógenos de plantas.

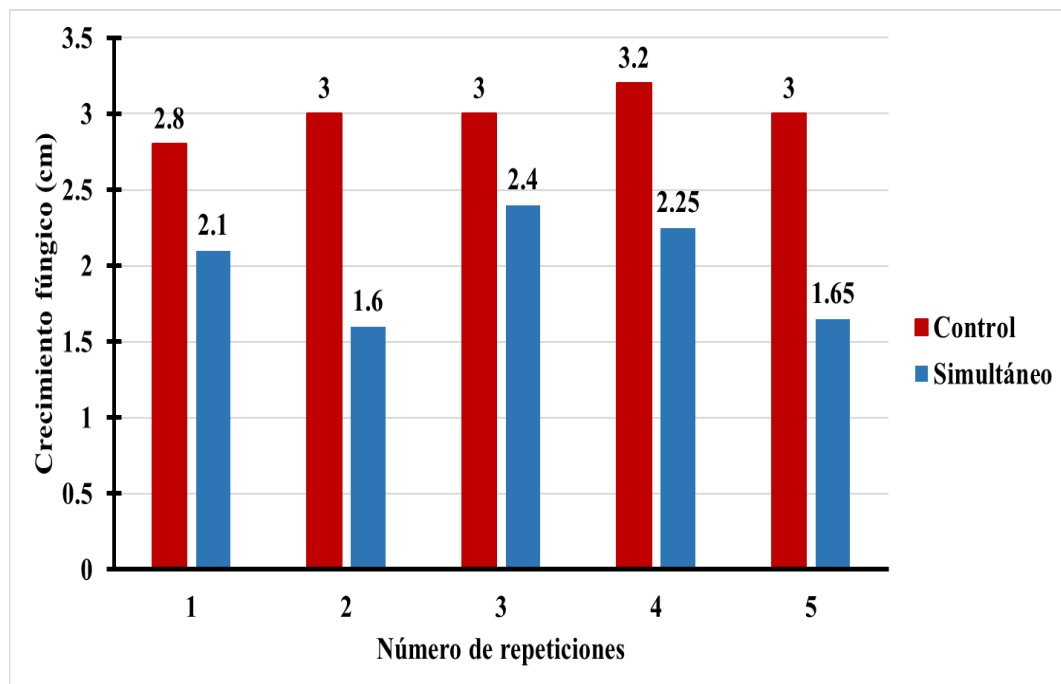


Figura 31: Ensayo de biocontrol en siembra simultánea de *Pseudomonas* sp. RC-93 vs. *Alternaria alternata*.

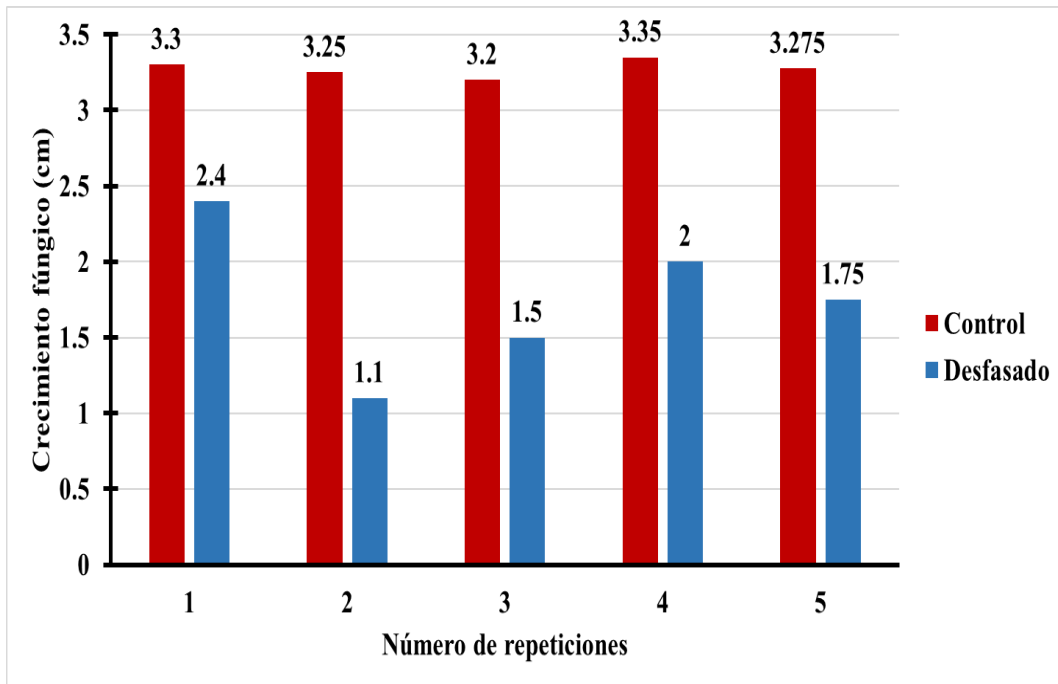


Figura 32: Ensayo de biocontrol en siembra desfasada de *Pseudomonas* sp. RC-93 vs. *Alternaria alternata*.

Lo anteriormente descrito se observa al comparar en un gráfico de líneas el comportamiento que tuvieron los dos tratamientos en el porcentaje de inhibición de crecimiento de *Alternaria alternata* en cada una de las repeticiones (Figura 33).

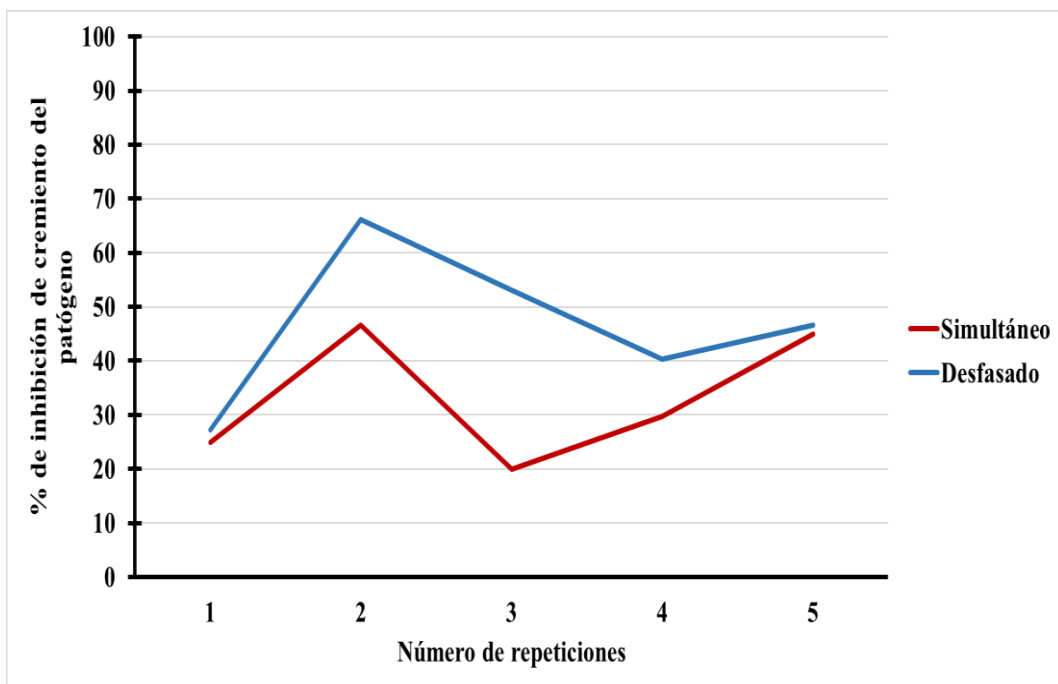


Figura 33: Ensayo de biocontrol en siembra desfasada y simultáneo de *Pseudomonas* sp. RC-93 vs. *Alternaria alternata*.

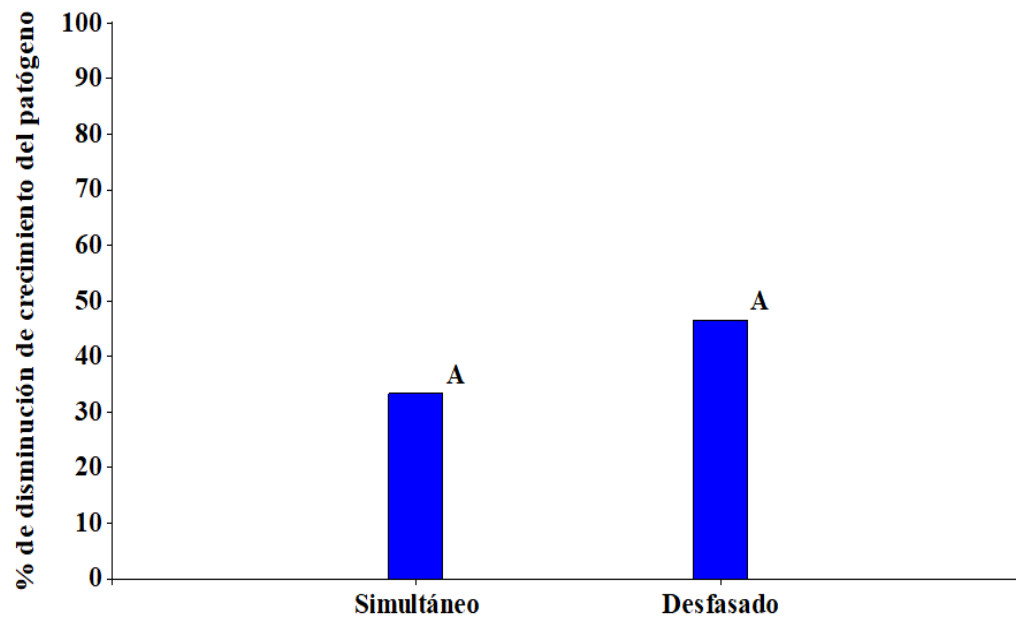


Figura 34: Ensayo de biocontrol *in vitro* en siembra desfasada y simultáneo de *Pseudomonas* sp. RC-93 vs. *Alternaria alternata*.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos *in vivo* muestran la efectividad de la cepa de *Alternaria alternata* en la infestación producida en el cultivo de tomate. En los ensayos *in vitro* de siembra simultánea y desfasada del patógeno y el agente de control biológico (ACB), pudo demostrarse la capacidad antagonista de la cepa de *Pseudomonas* sp. RC-93 frente al desarrollo del patógeno. Con respecto a la inoculación conjunta de raíces y hojas en plántulas aún debe ajustarse la técnica; sería necesario continuar con los estudios para determinar si es factible o no la metodología. En los ensayos postcosecha en frutos de tomates, se pudo comprobar la capacidad del ACB para disminuir el tamaño de las lesiones producidas por *Alternaria alternata*. Los hallazgos del presente estudio podrían generar una oportunidad prometedora en el control biológico del patógeno *Alternaria alternata* en el cultivo de tomate, y utilizarse para la formulación de una estrategia eficaz y ecológica en el tratamiento de la enfermedad en reemplazo a pesticidas químicos.

BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G. N. 1997. Control of Plant Diseases. En: *Plant Pathology*, 4th Edition, Academic Press, San Diego, 200-216. Cap. 6: 212-219 p. Consultado: 24/07/2018.
- ANDRÉS, J., M. ROVERA, L. GUIÑAZÚ, N. PASTOR y S. ROSAS. 2012. Role of *Pseudomonas aurantica* in Crop Improvement. En: *Bacteria in Agrobiolology: Plant Growth Response*. Dinesh K. Maheshwari. Cap. 5: 105-122. Consultado: 17/05/2018.
- BERNAL, R. 2010. *Enfermedades de Tomate (Lycopersicon esculentum) en invernadero en las zonas de Salto y Bella Unión*. Primera ed. Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología de INIA, Montevideo, Uruguay. 71 p. Consultado: 17/05/2018.
- BIANCO, C., T. KRAUS y C. NÚÑEZ. 2006. *Botánica agrícola*. 2da.Ed. UNRC. Argentina. 377 p. Consultado: 11/02/2019.
- BLANCARD, D. 2012. *Tomato Diseases*. 2^{da} ed. Ed. Manson Publusing, Londres, Inglaterra. 212 p. En: <https://bit.ly/2B5lh42>. Consultado: 4/12/2017.
- BLOEMBERG, G. V., A. WIJFJES, G. LAMERS, N. STUURMAN y B. J. LUGTENBERG. 2000. *Pseudomonas*. Simultaneous Imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 Populations Expressing Three Different Autofluorescent Proteins in the Rhizosphere: New Perspectives for Studying Microbial Communities. Institute of Molecular Plant Sciences Leiden University, Leiden, Holanda. 13 Ed., Cap 11. p: 1170–1176. En: <https://bit.ly/2O9i9KD>. Consultado: 17/05/2018.
- BRITTAN, S. S., R. P. DICKSON, J. J. LIPUMA y G. B. HUFFNAGLE. 2014. *Pseudomonas*. Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan, Estados Unidos. Cap. 4. p: 927–948. En: <https://bit.ly/2HBEOxO>. Consultado: 16/03/2019.
- COLOMBO, M. H. 2000. *Enfermedades del tomate bajo cubierta plástica*. En: <https://bit.ly/2Qa4TcJ>. Consultado: 4/12/2017.
- CORVO DOLCET, S. 2005. SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, PESCA y ALIMENTOS. Subsecretaría de Agricultura, Ganadería y Forestación. Dirección de agricultura zonas de producción del cultivo el tomate en la Argentina. En: <https://bit.ly/2AK3ZJu>. Consultado: 15/09/2016.
- DI RIENZO, J. A., F. CASANOVES, M. G. BALZARINI, L. GONZÁLEZ, M. TABLADA y C. W. ROBLEDO. 2018. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>. Consultado: 11/02/2019.
- FAO. 2018. En: <https://bit.ly/2GQaTzp> Consultado: 4/12/2017.
- FEN. 2019. Tomate. En: <https://bit.ly/2nsv1jc>. Consultado: 23/03/2019.

- FLORES y PLANTAS. 2016. Cultivo del tomate. En: <https://bit.ly/2EiGQIA>. Consultado: 4/12/2017.
- GAKEGNE, E. R., M. PLASENCIA., A. HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ y B. C. MARTÍNEZ. 2017. Actividad antagonica de *Pseudomonas spp.* fluorescentes ante *Alternaria solani* Sorauer, patógeno de la papa (*Solanum tuberosum* L.). Rev. Protección Veg. En: <https://bit.ly/2TA0C44>. Consultado: 10/3/2018.
- GOOGLE EARTH. 2018 En: <https://www.google.com/intl/es/earth/>. Consultado: 19/3/2019.
- GUERRA, G.A., C.A. BETANCOURTH y C.E. SALAZAR. 2011. Antagonismo de *Pseudomonas fluorescens*, frente a *Fusarium oxysporum* fsp. en arveja *Pisum sativum* L. En: <https://bit.ly/2HztLGj>. Consultado: 9/02/2019.
- INFOAGRO. 2018. En: <https://bit.ly/2zyj8w2>. Consultado: 4/12/2017.
- INTA. 2017. Manual técnico del cultivo de tomate *Solanum lycopersicum*. San José, Costa Rica.
- JARDINERÍA ON. 2017. La *Alternaria* del tomate, qué es y de qué manera se controla. En: <https://bit.ly/2SG3eZa>. Consultado: 15/03/2019.
- LESLIE, J. F. y B. A SUMMERELL. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Ed. Blackwell Publishing, Iowa, EE.UU. 388 p. Consultado: 27/04/2018.
- MARQUÉZ, C., C. E. OTERO y R. M. CORTÉS. 2007. Cambios fisiológicos, texturales, fisicoquímicos y microestructurales del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) en poscosecha. *Vitae*; 14 (2), 9-16. En: <https://bit.ly/2HVi1Np>. Consultado: 16/02/2019.
- MICROSOFT EXCEL. 2016. En: <https://bit.ly/2JBFztt>. Consultado: 23/03/2019.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA y ALIMENTACIÓN de GUATEMALA. 2015. *Plan de Manejo Integrado de Enfermedades del Tomate en Guatemala (Solanum lycopersicum L.)*. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Guatemala. Primera ed. p: 5. Consultado: 25/03/2019.
- MINISTERIO DE AGROINDUSTRIA. 2017. Subsecretaría de Mercados Agropecuarios. República Argentina. Mercado Externo del Tomate. En: <https://bit.ly/2PBRITL>. Consultado: 28/11/2018.
- NAKAMA, M. y J. FERNÁNDEZ LOZANO. 2008. Tomate y lechuga: producción, comercialización y consumo. INTA. En: <https://bit.ly/2FYHJS9>. Consultado: 3/09/2017.
- PAVÓN MORENO, M. Á., I. GONZÁLEZ ALONSO, R. MARTÍN DE SANTOS y T. GARCÍA LACARRA. 2012. Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nut. Hosp.* 27: 1772-1781. En: <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6017>. Consultado: 11/2/2019.
- RODRÍGUEZ, K. y N. ORTUÑO. 2007. Evaluación de micorrizas arbusculares en interacción con abonos orgánicos como coadyuvantes del crecimiento en la producción hortícola del Valle Alto de Cochabamba-Bolivia. *Rev. Acta Nova*; 3(4):31-7. Consultado: 21/03/2019.

- ROVERA, M., J. ANDRES, E. CARLIER, C. PASLUOSTA y S. ROSAS. 2008. *Pseudomonas aurantiaca*: Plant growth promoting traits, secondary metabolites and inoculation response. En: *Plant-Bacteria Interactions. Strategies and Techniques to promote plant growth*. WILEY-VCH Verlag. Alemania. 2^{da} Edición Cap. 8. P: 255-264. Consultado: 15/03/2019.
- THOMMA, B. P. 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Path.* Cap. 4, pp. 225-236. En: <https://bit.ly/2uhBsIq>. Consultado: 19/03/2019.
- TRUJILLO, I, A. DÍAZ, A. HERNÁNDEZ y M. HEYDRICH. 2007. Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y el maíz. *Rev. Prot. Veg;* 22(1), 41-46. En: <https://bit.ly/2FysY4M>. Consultado: 14/03/2019.
- VERGANI GUALAZZI, R. 1997. "*Lycopersicum esculentum*" una breve historia del tomate. *Alquibla.* Cap. 3: 105-111. En: <https://bit.ly/2E5iZob>. Consultado: 11/5/2019.
- VILLA, P., A. FRÍAS y G. GONZÁLEZ. 2005. Evaluación de cepas de *Pseudomonas sp.* para el control de hongos fitopatógenos que afectan cultivos de interés económico. *ICIDCA.* Cap. 3, pp. 40-44. En: <https://bit.ly/2FjX0t0>. Consultado: 22/03/2019.

ANEXO 1

Agar Papa Dextrosa (PDA)

- Papa 300 g.
- Dextrosa 20 g.
- Agar 20 g.
- Agua c. s. p. 1000 mL.

Para la preparación del medio utilizaron papas las cuales se pelaron, cortaron y luego se hirvieron. Luego se exprimieron en tres capas de gasa, colocando el producto obtenido un matraz. Luego se le agrego al mismo añada la dextrosa y el agar, y se aforo a un litro. Por último, se esterilizo el medio por 20 minutos a 15 libras de presión. Ya con el medio este casi frío se vertió en las cajas de Petri.

Agar Tripteína Soya (TSB)

- Tripteína 17,0 g.
- Peptona de soya 3,0 g.
- Cloruro de sodio 5,0 g.
- Fosfato dipotásico 2,5 g.
- Glucosa 2,5 g.
- Agar 15 g.
- Agua c. s. p. 1000 mL.
- pH final 7,3.

Agar Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA)

- Fosfato monopotásico 1g.
- Nitrato de potasio 1 g.
- Sulfato de magnesio 0.5g.
- Cloruro de potasio 0.5g.
- Glucosa 0.2g.
- Sucrosa 0.2g.
- Agar 20g.
- Agua c. s. p. 1000 mL.

Agar Agua 3%

- Agar 30 g.
- Agua c. s. p. 1000 mL.

Solución nutritiva de Hoagland

- 2M KNO₃ 202 g/L
- 1M Ca(NO₃)₂·4H₂O 236 g/0.5L
- Hierro 15 g/L
- 2M MgSO₄·7H₂O 493 g/L
- 1M NH₄NO₃ 80 g/L
- H₃BO₃ 2.86 g/L
- MnCl₂·4H₂O 1.81 g/L
- ZnSO₄·7H₂O 0.22 g/L
- CuSO₄·5H₂O 0.051 g/L
- H₃MoO₄·H₂O 0.09 g/L
- Na₂MoO₄·2H₂O 0.12 g/L
- 1M KH₂PO₄ 136 g/L

ANEXO 2

2.1 - Ensayo de evaluación de patogenicidad de *Alternaria alternata* en *Solanum lycopersicum*

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% de Infección	621	0,71	0,71	57,80

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	876767,03	5	175353,41	298,53	<0,0001
Microorganismo inoculado	707795,47	1	707795,47	1204,97	<0,0001
fecha	90204,71	2	45102,35	76,78	<0,0001
Microorganismo inoculado *fecha	68258,15	2	34129,08	58,10	<0,0001
Error	361247,66	615	587,39		
Total	1238014,69	620			

Microorganismo inoculado	Medias	n	E.E.	
Control sin inocular	5,98	291	1,42	A
Alternaria	73,64	330	1,33	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,92443

Error: 587,3946 gl: 615

fecha	Medias	n	E.E.	
01/09/2017	23,76	207	1,69	A
11/09/2017	42,77	207	1,69	B
18/09/2017	52,89	207	1,69	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=5,55547

Error: 587,3946 gl: 615

Microorganismo inoculado	fecha	Medias	n	E.E.	
Control sin inocular	01/09/2017	4,14	97	2,46	A
Control sin inocular	11/09/2017	5,60	97	2,46	A
Control sin inocular	18/09/2017	8,20	97	2,46	A
Alternaria	01/09/2017	43,38	110	2,31	B
Alternaria	11/09/2017	79,94	110	2,31	C
Alternaria	18/09/2017	97,59	110	2,31	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PesoSecoxMaceta	36	0,03	0,00	48,68

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,18	1	0,18	0,93	0,3414
Microorganismo inoculado	0,18	1	0,18	0,93	0,3414
Error	6,65	34	0,20		
Total	6,83	35			

Microorganismo inoculado	Medias	n	E.E.
Alternaria	0,84	18	0,10
Control	0,98	18	0,10

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

2.2 - Ensayo de actividad bioantagonista de *Pseudomonas* sp. RC-93 frente *Alternaria alternata* en frutos de *Solanum lycopersicum*

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SUP INF	58	0,66	0,54	36,28

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	29,17	15	1,94	5,50	<0,0001
Microorganismo inoculado	17,07	7	2,44	6,90	<0,0001
Fecha	4,52	1	4,52	12,78	0,0009
Microorganismo inoculado*Fecha	5,70	7	0,81	2,30	0,0442
Error	14,85	42	0,35		
Total	44,02	57			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,53554

Error: 0,3535 gl: 42

Microorganismo inoculado	Medias	n	E.E.	
PSEU 109	1,18	6	0,24	A
PSEU 107	1,24	6	0,24	A
PSEU 105	1,28	6	0,24	A
CONTROL	1,34	12	0,17	A
ALT+PSEU 105	1,55	6	0,24	A
ALT+PSEU 109	1,63	6	0,24	A
ALT+PSEU 107	1,68	6	0,24	A
ALTERNARIA	2,78	10	0,19	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

FECHA	Medias	n	E.E.	
02/05/2018	1,29	29	0,11	A
08/05/2018	1,87	29	0,11	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,75737

Error: 0,3535 gl: 42

Microorganismo inoculado	FECHA	Medias	n	E.E.		
PSEU 109	02/05/2018	1,00	3	0,34	A	
PSEU 107	02/05/2018	1,07	3	0,34	A	B
CONTROL	02/05/2018	1,12	6	0,24	A	B
PSEU 105	02/05/2018	1,13	3	0,34	A	B
ALT+PSEU 105	02/05/2018	1,30	3	0,34	A	B
PSEU 109	08/05/2018	1,37	3	0,34	A	B
PSEU 107	08/05/2018	1,40	3	0,34	A	B
PSEU 105	08/05/2018	1,42	3	0,34	A	B
ALT+PSEU 109	02/05/2018	1,43	3	0,34	A	B
ALT+PSEU 107	02/05/2018	1,53	3	0,34	A	B
CONTROL	08/05/2018	1,56	6	0,24	A	B
ALTERNARIA	02/05/2018	1,76	5	0,27	A	B
ALT+PSEU 105	08/05/2018	1,80	3	0,34	A	B
ALT+PSEU 107	08/05/2018	1,82	3	0,34		B
ALT+PSEU 109	08/05/2018	1,82	3	0,34		B
ALTERNARIA	08/05/2018	3,79	5	0,27		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SUP INF	60	0,92	0,90	17,32

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	75,47	14	5,39	39,35	<0,0001
Microorganismo inoculado	14,43	2	7,21	52,65	<0,0001
Fecha	51,21	4	12,80	93,45	<0,0001
Microorganismo inoculado*Fecha	9,84	8	1,23	8,98	<0,0001
Error	6,17	45	0,14		
Total	81,64	59			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,19657

Error: 0,1370 gl: 45

Microorganismo inoculado	Medias	n	E.E.	
PSEU+ALT	1,78	20	0,08	A
CONTROL	1,80	20	0,08	A
ALTERNARIA	2,83	20	0,08	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,25377

Error: 0,1370 gl: 45

FECHA	Medias	n	E.E.	
20/05/2018	1,08	12	0,11	A
21/05/2018	1,21	12	0,11	A
27/05/2018	2,13	12	0,11	B
01/06/2018	2,77	12	0,11	C
04/06/2018	3,51	12	0,11	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,43955

Error: 0,1370 gl: 45

Microorganismo inoculado	FECHA	Medias	n	E.E.	
CONTROL	20/05/2018	1,00	4	0,19	A
CONTROL	21/05/2018	1,00	4	0,19	A
ALTERNARIA	20/05/2018	1,10	4	0,19	A
PSEU+ALT	20/05/2018	1,13	4	0,19	A
PSEU+ALT	21/05/2018	1,30	4	0,19	A B
ALTERNARIA	21/05/2018	1,33	4	0,19	A B
PSEU+ALT	27/05/2018	1,63	4	0,19	B C
CONTROL	27/05/2018	1,88	4	0,19	C D
PSEU+ALT	01/06/2018	2,15	4	0,19	D
CONTROL	01/06/2018	2,30	4	0,19	D E
PSEU+ALT	04/06/2018	2,70	4	0,19	E F
CONTROL	04/06/2018	2,83	4	0,19	F
ALTERNARIA	27/05/2018	2,88	4	0,19	F
ALTERNARIA	01/06/2018	3,85	4	0,19	G
ALTERNARIA	04/06/2018	5,00	4	0,19	H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

2.3 - Ensayos *in vivo*

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Crecimiento fúngico	20	0,82	0,80	12,86

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8,13	2	4,06	39,10	<0,0001
Tratamiento	8,13	2	4,06	39,10	<0,0001
Error	1,77	17	0,10		
Total	9,89	19			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,31597

Error: 0,1039 gl: 17

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Desfasado	1,75	5	0,14	A
Simultaneo	2,00	5	0,14	A
Control	3,14	10	0,10	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% de disminución de crec	10	0,24	0,15	33,24

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	449,57	1	449,57	2,55	0,1492
Tratamiento	449,57	1	449,57	2,55	0,1492
Error	1412,61	8	176,58		
Total	1862,18	9			

Tratamiento	Medias	n	E.E.
Simultaneo	33,27	5	5,94
Desfasado	46,68	5	5,94

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)