

# Aplicación de *Trichoderma harzianum* para el control del cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) del tomate (*Lycopersicon esculentum* mill.) En invernadero

Raquel Guerrero<sup>1</sup>, Cecilia Mónaco<sup>2</sup>, Marina Stocco<sup>2</sup>, Verónica Consolo<sup>2</sup>, Jorgelina Rolleri<sup>2</sup>, y Norma Guerrero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Pecuarias y Facultad de Ciencias Ambientales. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Av. Quito Km. 1 1/2 vía a Santo Domingo de los Tsáchilas. Quevedo, Los Ríos – Ecuador

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. Av. 60 y 115. La Plata, Buenos Aires - Argentina.

rguerrero@uteq.edu.ec

---

## Resumen

A nivel de invernáculo se evaluaron cinco aislamientos de *Trichoderma harzianum* obtenidos de plantaciones de tomate de la zona hortícola de La Plata (Buenos Aires, Argentina) y seleccionados previamente por su capacidad para suprimir el desarrollo *in vitro* de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente causal del cáncer bacteriano del tomate. Los aislamientos de *T. harzianum* fueron aplicados en plántulas de tomate susceptibles al patógeno de quince días de edad mediante dos métodos de aplicación: (1) al suelo durante el trasplante y (2) foliar tres días antes de la inoculación del patógeno. A los diez días después del trasplante, se realizó la inoculación del patógeno atomizando una suspensión bacteriana con una concentración aproximada de  $1 \times 10^7$  UFC/ml. Cinco semanas después del trasplante se evaluó: altura de plantas, número de flores y frutos, encontrándose diferencias estadísticas entre las plantas tratadas con los biocontroladores y los testigos. Las plantas con aplicación foliar presentaron promedios mayores a las con aplicación al suelo. Ocho semanas después del trasplante se evaluó la presencia de la enfermedad en función de la sintomatología. Aproximadamente la mitad de las plantas del testigo del patógeno presentaron síntomas asociados a la enfermedad: bordes de folíolos secos, retraso en el crecimiento y marchitamiento leve generalizado. Los biocontroladores tuvieron un efecto positivo sobre las plantas tratadas que presentaron mejores condiciones sanitarias que los testigos, al igual que mayor desarrollo vegetativo y acumulación de materia seca

**Palabras Claves:** Biocontrol, enfermedad, tomate, *Trichoderma*, cáncer

## Abstract

Five isolates of *Trichoderma harzianum* were evaluated under greenhouse

conditions, these strains were collected from La Plata tomato fields (Buenos Aires, Argentina) and tested *in vitro* against of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, pathogen of the bacterial canker of tomato. The *yt* isolates were inoculated in 15 days seedlings using two methods: (1) soil inoculation during the transplant and (2) leaf sprayed three days before pathogen inoculation. Ten days after the transplant, the pathogen was inoculated by spraying a bacterial suspension with  $1 \times 10^7$  CFU/ml, approximately. Five weeks after the transplant plant height, number of flowers and fruits were evaluated; results showed there were statistical differences between biocontrol treatments and the control. Tomato seedlings with leaves treated had bigger averages than those with soil inoculation. After eight weeks from transplant, disease symptomatology was evaluated. Approximately, 50% of pathogen control plants showed symptoms associated with the pathogen under glasshouse conditions, such as: marginal necrosis of leaflets and generalized slight wilting; the biocontrol strains had a positive effect over treated seedlings which were healthier than control ones, as well as they had better vegetative development and dry mass accumulation.

**Key Words:** Biocontrol, disease, tomato, Trichoderma, canker

## Introducción

El cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es constantemente afectado por enfermedades y plagas que reducen considerablemente su productividad. A nivel mundial la enfermedad conocida como cancro o cáncer bacteriano, causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Davis *et al.*, 1984), es considerada como la patología bacteriana de mayor importancia debido los efectos devastadores que tiene sobre los cultivos de tomate, disminuyendo la cantidad y calidad de los frutos (Borboa *et al.*, 2009) y llegando a causar pérdidas de producción que van desde el 50 al 100%, según EFSA (2014). El patógeno, *C. m.* subsp. *michiganensis*, ha sido reportado resistente a la mayoría de los pesticidas usualmente utilizados para contro-

lar enfermedades bacterianas por lo que en la actualidad su control se basa en la prevención y exclusión debido a que no existen cultivares resistentes (De León *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2010). *Trichoderma* spp. es un microorganismo cuyos aislamientos están siendo usados para el control biológico de enfermedades en muchos cultivos a nivel mundial, tanto en invernáculo como en cultivos a campo abierto (Maketon *et al.*, 2008; Mayo *et al.*, 2015; Ommati & Zaker, 2012). Este género es un habitante común de suelos de donde es frecuentemente aislado (Consolo *et al.*, 2014; García *et al.*, 2012) y ha sido utilizado exitosamente para el control de enfermedades en solanáceas (Maketon *et al.*, 2008; Vitti *et al.*, 2016) e inclusive se ha reportado que puede inducir resistencia frente a ataques de áfidos en tomate (Coppola *et al.*, 2017).

Con la hipótesis de que los aislamientos del género *Trichoderma* spp. pueden tener la capacidad de disminuir las infecciones causadas por *C. m. michiganensis* en el cultivo de tomate; con este antecedente, cinco aislamientos de *T. harzianum* preseleccionados por su capacidad de suprimir el crecimiento de *C. m. subsp. michiganensis* a nivel *in vitro* fueron utilizados para evaluar su control frente al patógeno en plántulas de tomate cultivadas bajo invernáculo con la finalidad de brindar una herramienta de control amigable con el ambiente y más responsable con la salud de los consumidores.

### Materiales y métodos

Tanto los aislamientos de *T. harzianum* (T1, T2, T3, T4 y T5) como el del patógeno, *C. m. subsp. michiganensis*, fueron aislados, seleccionados y conservados previamente en el Centro de Investigaciones en Fitopatología (CIDEFI) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata (Argentina). El experimento se realizó en el invernáculo del CIDEFI, entre los meses de agosto a octubre del 2014 y 2015. Como material vegetal se usaron plántulas de la variedad Elpida, de 15 días de edad y susceptible a la enfermedad (Figura 1.1). La aplicación de los cinco aislamientos de *Trichoderma* spp. se realizó utilizando dos técnicas de inoculación: Técnica 1. Inoculación de la cepa fúngica al suelo una semana antes de la inoculación del patógeno y Técnica

2. Aplicación de la cepa fúngica a la parte aérea de la planta 72 horas antes de la inoculación del patógeno.

Para la técnica 1, se prepararon dos tipos de inóculo: a) Para realizar la técnica 1, se inocularon 100 g de granos de arroz estériles con 1 ml de una suspensión de esporas de *Trichoderma* spp. ( $10^6$  esporas/ml) y se incubó a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) durante 10 días. Al momento del trasplante y una semana antes de la inoculación del patógeno, el inóculo fúngico se incorporó a la tierra de las macetas en una proporción de 1:100 (por cada maceta de 2 kg se utilizaron 20 g de inóculo). b) En cambio para realizar la técnica 2, se realizó una suspensión de esporas de cada aislamiento de *Trichoderma* spp. desarrollados en medio PDA (papa dextrosa agar) de 8 días de crecimiento. Las suspensiones se realizaron en agua estéril con el agregado de Tween 20 (0,01%), se ajustaron a  $1 \times 10^6$  esporas/ml y se atomizaron las plantas tres días antes de la inoculación del patógeno.

La suspensión bacteriana se obtuvo utilizando cultivos de tres días de edad desarrollados en el medio agar nutritivo extracto de levadura (NBY) a partir de los cuales se retiraron las bacterias de la superficie y se suspendieron en agua destilada estéril, la concentración de la suspensión se ajustó a  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias UFC/ml. Antes de la inoculación del patógeno por aspersión, se realizó un pequeño corte en la

base de cada planta con bisturí previamente sumergido en la suspensión bacteriana. Se atomizó cada planta de tomate con la suspensión bacteriana hasta punto de goteo durante las primeras horas del día. Cada planta inoculada fue cubierta con una bolsa plástica durante 24 horas para elevar la humedad y favorecer la infección de la bacteria (Figura 1.3 y 1.4). Para los testigos de la bacteria se inocularon las plantas de tomate con las suspensiones bacterianas sin previa infestación de *Trichoderma* spp. Adicionalmente, se estableció un testigo absoluto sin inoculación del patógeno ni de los biocontroladores.

Las plantas se mantuvieron en el invernáculo a una temperatura entre 22 – 25 °C y humedad relativa entre 60 - 80% durante 8 semanas. La evaluación se realizó de la siguiente manera:

1) A las cinco semanas después del trasplante, se midió la altura (cm) de cada planta (de la base de la planta hasta el ápice) y se contó el número de flores y de frutos de cada planta.

2) Ocho semanas después del trasplante, se evaluó presencia/ausencia de la enfermedad contando el número de plantas que presentaban síntomas asociados a la enfermedad. Las plantas que presentaron síntomas fueron llevadas al laboratorio y mediante el método de dilaceración se realizaron cultivos para verificar la infección del patógeno. Se obtuvieron secciones de hojas con tejido sano y

enfermo, las cuales se desinfectaron con alcohol 70% y luego, con una solución de hipoclorito de sodio al 5%. Los cortes de tejido vegetal (1 cm<sup>2</sup>) se colocaron en tubos de ensayo con 10 ml de agua destilada estéril durante 20 minutos, se agitaron con vórtex durante un minuto y finalmente, se tomó una alícuota de 5 µl y se estrió sobre la superficie de placas de Petri que contenían medio NBY. Las placas se incubaron durante 72 horas a 25±2 °C. La identificación se realizó mediante técnicas convencionales de descripción de características fisiológicas y culturales: reacción de Gram, movilidad, producción de pigmentos en agar, características de las colonias (color, forma, consistencia) (Shaad *et al.* 2001).

3) Para evaluar la colonización de los biocontroladores, en cada tratamiento se retiraron del sustrato cinco plantas y mediante evaluación destructiva se tomaron secciones de raíz y tallo que fueron colocados en medio selectivo para *Trichoderma* TSM (Elad *et al.*, 1981). La superficie de las plántulas, tallos y raíces se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2% por un minuto, seguido por tres enjuagues en agua destilada estéril. Se realizaron cortes de 1 cm para obtener segmentos de raíz, tallos y meristemo apical (cinco secciones de cada uno). Los segmentos obtenidos se transfirieron a placas de Petri conteniendo medio TSM. Las placas se incubaron a una temperatura aproximada de 25 °C en oscuridad durante 15 días. A los 5, 8 y 15 días de incubación se evaluó



la presencia de los biocontroladores usando lupa estereoscópica y microscopio.

4) Para evaluar el peso seco se separaron cinco plantas por cada tratamiento. Se retiró el suelo de las raíces mediante lavado y se colocaron segmentadas en bandejas metálicas dentro de una estufa a 60 °C durante 48 horas (Figura 1.6). Al término de este tiempo, las plantas llegaron a peso constante y se procedió a pesar (g) por separado las raíces y luego la planta entera.

Por cada tratamiento se establecieron seis bloques (seis unidades de observación por cada tratamiento). El diseño experimental utilizado fue bloques al azar. Los resultados se analizaron usando un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias de Tukey al 0,05 de probabilidad.

## Resultados y discusión

Los resultados obtenidos muestran que la presencia de la bacteria puede afectar el desarrollo de las plantas (Figura 2); sin embargo, la aplicación de *Trichoderma* spp. fue efectiva reduciendo el impacto de la enfermedad permitiendo su normal desarrollo, e inclusive elevando los valores de crecimiento de las plantas a niveles superiores a los obtenidos en el testigo absoluto. De manera general, los tratamientos aplicados con método 2 (foliar) presentaron mayores promedios de altura de planta que aquellos

con aplicación al suelo, y ambos métodos fueron superiores al testigo sin aplicación y del patógeno. Las plantas sometidas a aplicación foliar de los tratamientos 2 y 5 obtuvieron los mayores valores de altura con 50,17 y 49,83 cm, respectivamente. Los tratamientos 1, 2 y 3 aplicados al suelo mostraron valores intermedios (36,0, 36,67 y 38,83 cm) al igual que los tratamientos 3 y 4 aplicados al follaje (39,50 y 45,83 cm). Por otra parte, algunos tratamientos presentaron valores que no difirieron estadísticamente con los del testigo absoluto, tales como los tratamientos 4 y 5 aplicados al suelo, y el tratamiento 1 aplicado a las hojas. Las plantas con aplicación de la bacteria patógena y sin aplicación de biocontroladores (testigo del patógeno) fueron considerablemente más pequeñas que las del testigo absoluto y las de los tratamientos con *Trichoderma* spp. presentando una media de 16,83 cm.

Esta respuesta de las plantas de tomate coincide con lo expresado por Hermosa *et al.* (2012), quienes sostienen que este género de biocontroladores pueden inducir el crecimiento de plantas, como un efecto adicional al control de enfermedades (Naseby *et al.*, 2000). Aunque se observó un efecto en el crecimiento en todos los tratamientos con *Trichoderma* spp. los análisis para cada parámetro revelaron diferencias estadísticas entre los aislamientos evaluados y entre los métodos de inoculación utilizados. Lo & Lin (2002) y Tucci *et al.* (2010) encontraron que, inclusive cepas de la

misma especie muestran diferentes grados de acción sobre el crecimiento de cultivos y que también pueden variar de un cultivar a otro. Los autores señalan que esto podría estar influenciado por factores aún desconocidos.

En la Figura 3 puede observarse que la emisión de flores se vio estimulada por la presencia de los biocontroladores en tres de los tratamientos aplicados al follaje (T5 4,5 flores/planta, T2 y T3 con 3,5 flores/planta cada uno). Adicionalmente, se destaca que aquellas plantas del testigo *C. m. subsp. michiganensis* fueron notablemente afectadas por la aplicación del patógeno presentando un promedio de 1,17 flores por planta a las cinco semanas después del trasplante. Los tratamientos con aplicación al suelo no difirieron estadísticamente del testigo absoluto (sin aplicación del patógeno ni *Trichoderma* spp.).

Los valores de números de frutos por planta no presentaron diferencias estadísticas entre sí en los tratamientos con *Trichoderma* spp. pero si difirieron de los testigos, mostrando un incremento de hasta cuatro veces más frutos que el testigo *C. m. subsp. michiganensis* y superando la producción de frutos en plantas del testigo absoluto en un 200% (Figura 4). El número de frutos producidos en plantas aplicadas con el patógeno (sin presencia de los biocontroladores) fue reducido con un promedio de 0,33 frutos/planta a la fecha de la evalua-

ción. El tratamiento con mejor desempeño en cuanto a producción de frutos fue el T5 aplicado a las hojas con un promedio de 1,83 frutos/planta a las cinco semanas después del trasplante. A las 8 semanas después del trasplante se realizó un segundo recuento de número de frutos manteniéndose la relación de frutos entre los tratamientos y los testigos en 3:1.

El análisis de los resultados del número de flores y frutos nos sugiere que la aplicación de *T. harzianum* proporciona la posibilidad de mantener la producción a niveles normales, aunque la bacteria haya estado presente en la población de plantas, capacidad que poseen algunos géneros de biocontroladores y ampliamente demostrada para el caso de *Trichoderma* spp. (Hermosa *et al.* 2012).

Ocho semanas después del trasplante se registró el número de plantas con sintomatología relacionada a infecciones causadas por *C. m. subsp. michiganensis*. Aunque no se presentaron síntomas característicos como el cáncer en tallos o el “ojo de pájaro” en los frutos, se observó en algunas plantas un retraso de crecimiento, los bordes de los foliolos se mostraban secos y curvados junto con un marchitamiento leve generalizado. La ausencia de síntomas típicos de la enfermedad como las manchas “ojo de pájaro” podría deberse al hecho de que esta sintomatología es poco frecuente en cultivos de invernáculo, según lo señalado por EFSA (2014).

No hubo diferencias estadísticas en la interacción "método de inoculación x tratamiento". Sin embargo, si hubo diferencia estadística entre el testigo con el patógeno y los tratamientos con biocontroladores (Figura 5). Los valores de plantas sanas en los tratamientos con *Trichoderma* spp. y el testigo absoluto no difirieron estadísticamente entre sí, sin embargo, si lo hicieron cuando se los comparó con el testigo *C. m. subsp. michiganensis* (50% de plantas sanas). Los tratamientos T1 y T2 (al suelo) y T5 aplicado a las hojas presentaron una disminución del número de plantas sanas (6-11%).

La variabilidad en los síntomas observados al evaluar la enfermedad está condicionada por múltiples factores, tales como, el tipo de infección (sistémica o superficial), lugar de producción (invernáculo o campo), edad de la planta al momento de la infección, prácticas culturales, cultivar, entre otras (EFSA, 2014; OEPP/EPPO, 2013; Lelis, 2013). Al momento de la evaluación, el 50% de las plantas testigos mostraron marchitamiento leve y los bordes de los folíolos secos. Estos síntomas son característicos de la enfermedad (Borboa *et al.*, 2009) y con condiciones favorables provocan la muerte de la planta (OEPP/EPPO, 2013), pero bajo condiciones menos favorables se puede presentar retrasos en el marchitamiento (EFSA, 2014).

Según datos meteorológicos de la Estación Experimental Ing. Agr. J. Hirschhorn (UNLP, 2016), las tempe-

raturas promedio de los meses de septiembre a octubre tanto en el año 2014 como en el 2015 fueron relativamente bajas (13,5°C y 16,5°C, respectivamente) comparadas con las medias históricas de esos meses (19°C y 22°C). Aunque se intentó elevar la temperatura dentro del invernáculo con la ayuda de un radiador (promedio de 21°C), las temperaturas logradas probablemente influyeron en el desarrollo de la enfermedad y la manifestación de sus síntomas. Chang *et al.* (1991), informaron que la temperatura óptima del suelo y del aire para el desarrollo de la enfermedad fue superior a 28°C. Según los mismos autores, el periodo de incubación y la severidad del cáncer estuvieron influenciados por la temperatura, edad de la planta, concentración del inóculo y el cultivar. Agrios (2005) sostiene que el ciclo completo de la enfermedad en el más corto periodo de tiempo usualmente ocurre cuando la temperatura es óptima para el desarrollo del patógeno pero sobre o bajo la temperatura óptima del hospedante y agrega que a temperaturas bajo o sobre el óptimo del patógeno, pero cerca del óptimo del hospedante, la enfermedad se desarrolla lentamente.

En los análisis estadísticos realizados no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos con *Trichoderma* spp. cuando se evaluó el porcentaje de plantas sanas, sin embargo, se pudo observar que todos los tratamientos con los biocontroladores mostraron valores superiores y diferentes estadísticamente del testi-

go. Esto probablemente se debe al hecho de que *Trichoderma* spp. tiene la capacidad de inducir resistencia sistémica y localizada a un rango de enfermedades, incluidas las causadas por bacterias (Nawrocka & Malolepsza, 2013). Los aislamientos de *Trichoderma* spp. pueden inducir diferentes tipos de señales que dan como resultado la activación de genes y la producción de enzimas que están involucradas en la supresión de patógenos y el incremento de barreras bioquímicas y estructurales en la planta (Hermosa *et al.* 2012, Hoitink *et al.* 2006, Nawrocka & Malolepsza 2013). Este efecto sumado al mejoramiento del vigor de las plantas juega un papel importante al momento de desarrollarse la infección y la posterior manifestación de los síntomas.

Los biocontroladores fueron aislados de todos los tratamientos aplicados al suelo y específicamente en los tejidos radiculares, tampoco estuvo presente en los testigos. Todos los aislamientos de *Trichoderma* spp. fueron eficientes colonizadores de las raíces, a pesar de que no se logró aislarlos de otros tejidos. Hermosa *et al.* (2012) indicaron que esta es una característica del género *Trichoderma* especialmente de aquellos aislamientos que inducen el crecimiento de las plantas.

Los valores de peso de raíces y total de las plantas evaluadas mostraron que en los tratamientos con los biocontroladores la respuesta en la producción de materia seca fue supe-

rior a los testigos, presentándose diferencias estadísticas entre los tratamientos y los métodos de inoculación utilizados. Las plantas tratadas con *Trichoderma* spp. presentaron valores de peso seco de raíces y peso total hasta tres veces superiores a los encontrados en el testigo con *C. m.* subsp. *michiganensis* cuyas plantas tuvieron un promedio de 1,0 g de peso de materia seca de raíces. El testigo absoluto presentó un peso seco de raíces de 1,44 g. Los tratamientos 1, 2 y 3 aplicados al suelo o a las hojas incrementaron el desarrollo de las raíces, sin embargo, el efecto de los dos primeros fue estadísticamente superior cuando fueron inoculados al suelo (Figura 6), presentando valores promedios de 3,02 y 2,82 g de materia seca por planta respectivamente. El efecto en el incremento de materia seca de raíces para los tratamientos 4 y 5 fue menor en comparación con los otros tratamientos, aunque superior a los testigos. De manera general, se observó que el incremento de materia seca total por planta fue mayor en los tratamientos con aplicación en el área foliar (Figura 7). El tratamiento 5 presentó el mayor incremento en peso seco con un promedio de 13,59 g por planta, seguido de los tratamientos 2 y 3 quienes difirieron levemente entre sí con 12,99 y 11,85 g respectivamente. Las plantas en las que la aplicación de *Trichoderma* spp. fue en el suelo tuvieron un desempeño similar al presentado por el testigo sin aplicación (8,76 g) aunque superior al testigo *C. m.* subsp. *michiganensis* (4,26 g). Estos resultados de incremento de

hasta 300% superior a los testigos fue similar a los resultados de Windham et al. (1986) quienes adicionaron *Trichoderma* spp. a suelo estéril y encontraron que tanto en plantas de tomates como en tabaco se incrementaron el peso seco de raíces y área vegetativa en 213 - 175% y 259 - 318%, respectivamente. El efecto en el peso seco está directamente relacionado al incremento en el desarrollo de las plantas tratadas con los biocontroladores. Naseby et al. (2000) indican que este es un efecto adicional al control de las enfermedades debido a que encontraron un efecto significativo sobre el crecimiento de las plantas y a la vez redujeron el daño causado por *Phytophthora* spp. en arveja.

Bailey et al. (2011) sostienen que el desarrollo de las raíces tiene el beneficio adicional de elevar la capacidad de soportar condiciones de estrés en las plantas colonizadas, especialmente aquellas asociadas a la captación de agua. Al respecto, Hermosa et al. (2012) y Brotman et al. (2013) coinciden en que las cepas de *Trichoderma* pueden interactuar directamente con las raíces colonizando el apoplasto, incrementando el potencial de crecimiento, la resistencia a enfermedades y la tolerancia a estreses abióticos.

Dado que a pequeña escala *Trichoderma* spp. ha mostrado ser un potencial agente de biocontrol frente a la enfermedad, es necesario continuar con la búsqueda y selección de cepas para el control del cáncer bacteriano

del tomate, a fin de en un futuro poner a disposición de los agricultores una alternativa más acorde con las políticas ambientales. Además, más experimentos de campo, incluyendo un mayor número de genotipos de cultivares de la zona, permitirán obtener resultados más cercanos a las realidades de los productores y acortar la literatura citada

#### Literatura citada

Agrios, G. (2005). Plant Pathology (5 ed.). London: Elsevier Academic Press. p. 251.

Bailey, B., Bae, H., Melnick, R., & Crozier, J. (2011). The endophytic *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b enhances seedling growth and delays the onset of drought stress in *Theobroma cacao*. En M. Pirttila, C. Frank, M. Pirttila, & C. Frank (Edits.), Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications (p.157-172). Netherlands: Springer.

Borboa, J., Rueda, E., Acedo, E., Ponce, J., Cruz, M., Juárez, O., & García, A. (2009). Detection of *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis* in Tomato of the state of Sonora, México. Fitotecnia Mexicana, 32(4), 319-326.

Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, A., Tohge, T., Takayuki, T., Fernie, A., & Willmitzer, L. (2013). *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathogens*, 9(3), 1-15.

- Consolo, V., Mónaco, C., Cordo, C., Salerno, G. (2012). Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28:1389-1398.
- Coppola, M., Cascone, P., Chiusano, M., Colanuoro, C., Lorito, M., Pienannchio, F., Rao, R., Woo, S., Guerrieri, E. (2017) *Trichoderma harzianum* enhances tomato indirect defense against aphids. *Insect science*. En prensa. doi:10.1111/1744-7917.12475
- Davis, M., Graves, A., Vidaver, A., & Harris, R. (1984). *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34, 107-117.
- De León, L., Sivero, F., Lopez, M., & Rodriguez, A. (2011). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seed born tomato pathogen: Healthy seeds are still the goal. *Plant Diseases*, 95(11), 1328-1339.
- EFSA (2014). Scientific opinion on the pest categorisation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. *EFSA Journal*, 12(6), 1-26.
- Elad, Y., Chet, I., & Henis, Y. (1981). A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica*, 9(1), 59-67.
- García, H., Romero, S., González, C., Nava, G., Martínez, R. (2012). Isolation of native strains of *Trichoderma* spp., from horticultural soils of the valley of Toluca, for potential biocontrol of *Sclerotinia*. *Tropical and Subtropical agroecosystems*, 15:357-365.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158(1), 17-25.
- Hoitink, H., Madden, L., & Dorrance, A. (2006). Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp.: interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. *Phytopathology*, 96(2), 186-189.
- Lelis, F. (2013). Colonização de sementes e plantas de tomate cultivadas in vitro por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* transformadas com gfp. Tesis Doctoral de la Universidade Federal de Lavras. 78p.
- Lo, C., & Lin, C. (2002). Screening Strains of *Trichoderma* spp. for plant growth enhancement in Taiwan. *Plant Pathology*, 11, 215-220.
- Maketon, M., Apisitsantikul, J., Siriraweekul, C. (2008). Greenhouse evaluation of *Bacillus subtilis* AP-01 and *Trichoderma harzianum* AP-001 in controlling tobacco diseases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39:296-300.
- Mayo, S., Gutierrez, S., Malmierca, M., Lorenzana, A., Campelo, M., Hermosa, R., Cosquero, P. (2015). Influence of *Rhizotocnia solani* and *Trichoderma* spp. in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. *Frontiers in plant science*, 6:685
- Naseby, D., Pascual, J., & Lynch, J. (2000). Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. *Journal of Applied*



*Microbiology*, 88(1), 161-169.

Nawrocka, J., & Malolepsza, U. (2013). Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological Control*, 67, 149-156.

OEPP/EPPO. (2013). PM 7/42 (2) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. European and Mediterranean Plant Protection Organization/EPPO. *Bulletin EPPO*, 43 p.

Ommati, F. & Zaker, M. (2012). In vitro and greenhouse evaluation of *Trichoderma* isolates for biological control of potato wilt disease (*Fusarium solani*). *Archives of Phytopathology and plant protection*, 45 (13):1715-1723

Shaad, N., Jones, J., & Chun, W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria (3 ed.). APS Press. 398p.

Tucci, M., Roucco, M., De Masi, L., De Palma, M., & Lorito, M. (2010). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology*, 1-14.

UNLP. (2016). Reportes meteorológicos. Boletín Estación Experimental Ing.Agr. J.Hirschhorn. Obtenido de <http://www.agro.unlp.edu.ar/institucional/boletin-estacion-experimental-jh>

Vitti, A., Pellegrini, F., Nali, C., Lovelli, S., Sofo, A., Valerio, M., Scopa, A., Nuzzaci, M.. (2016). *Trichoderma harzianum* T-22 induces systemic resistance in tomato infected by Cucumber mosaic virus. *Frontiers in plant science*, 7:1520.

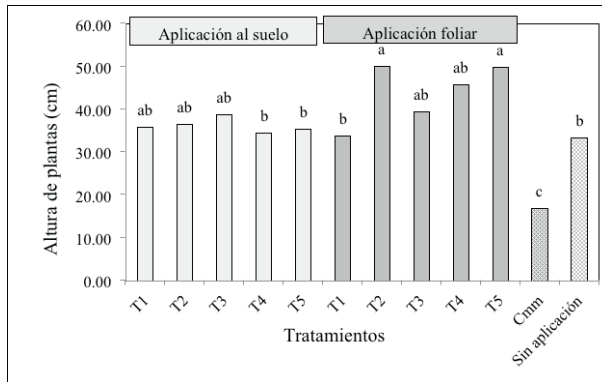
Windham, M., Elad, Y., & Baker, R.

(1986). A mechanism of increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 76(5), 518-521.

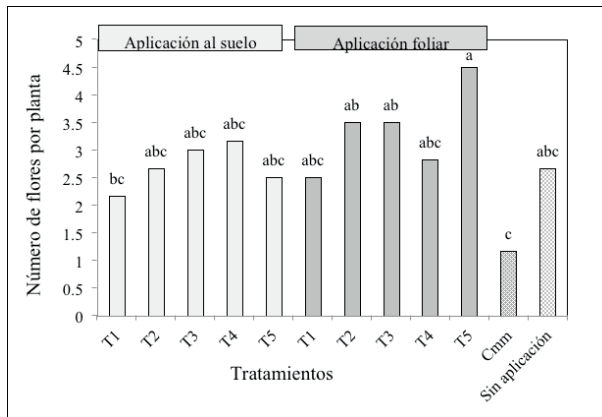
Xu, X., Miller, F., Baysal-Gurel, K., Gartemann, R., Eichenlaub, K., & Rajashekar, G. (2010). Bioluminescence imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection in tomato seeds and plants. *Applied Environmental Microbiology*, 76, 3978-3988.



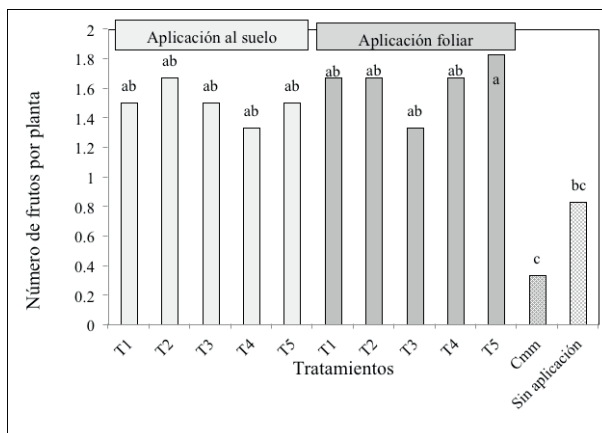
**Figura 1.** 1) Plántulas de tomate de 15 días de edad, 2) Plantas de tomate luego del trasplante, 3) Inoculación del patógeno, 4) Cámaras húmedas, 5) Hoja con bordes necrosados y 6) Plantas en bandejas antes de ingresar a estufa para secado.



**Figura 2.** Promedios de altura de plantas (cm) registrados cinco semanas después del trasplante\*.



**Figura 3.** Promedios de número de flores por planta registrados cinco semanas después del trasplante\*.



**Figura 4.** Número de frutos por planta ocho semanas después del trasplante\*.

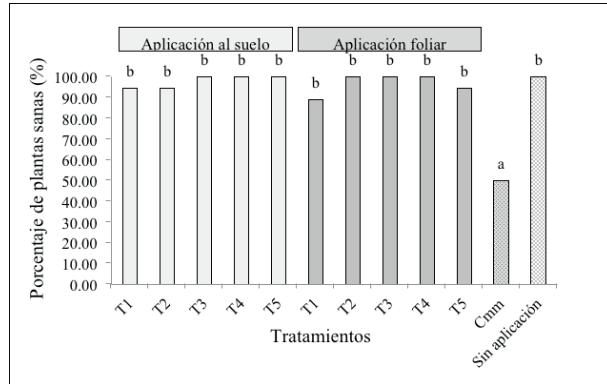


Figura 5. Porcentajes de plantas sanas registrados ocho semanas después del trasplante\*.

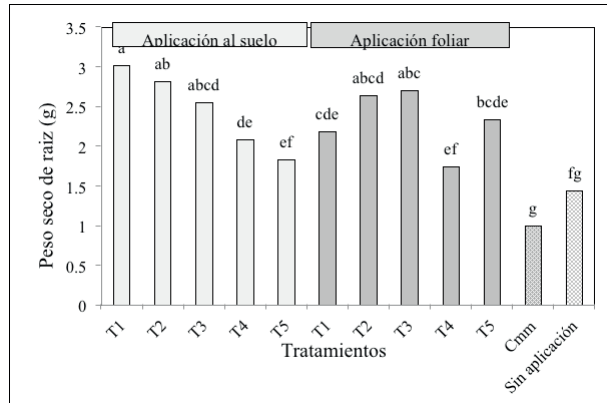


Figura 6. Promedios de peso seco de raíces por planta registrados ocho semanas después del trasplante\*.

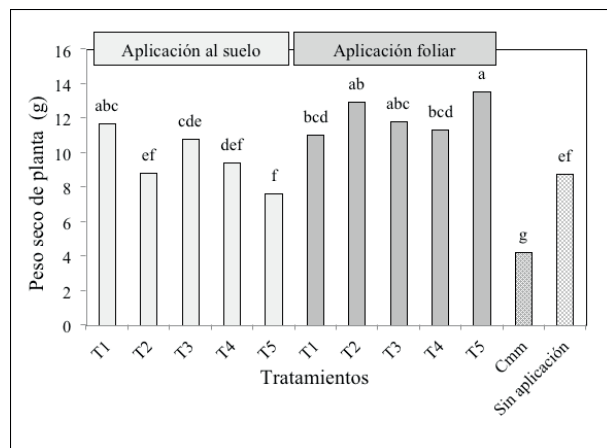


Figura 7. Promedios de peso seco de plantas registrados ocho semanas después del trasplante\*.