



## **Posgrado en Biotecnología**

# **Selección y caracterización de aislamientos de *Metarhizium* spp. para el desarrollo de un bioinsumo agrícola que mejore la sanidad del cultivo de soja inoculada con rizobios**

Tesis para la obtención del título de: Maestría en Biotecnología

Lic. en Bioquímica Iberia Iglesias

**Tutor: Federico Rivas Franco**

**Co-tutor: Elena Beyhaut**

**Tribunal: Dra. Patricia Vaz, Dra. Silvina Stewart, Dr. Carlos Perez Rodríguez**

**Programa de Producción y Sustentabilidad Ambiental**

**Bioinsumos**

**Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA)**

**Estación Experimental Wilson Ferreira Aldunate - Las Brujas**

**2025**

***Dedicatoria:***

*A mis padres, quienes, aunque ya no estén, siempre creyeron en mi capacidad para seguir formándome. Su ejemplo me inculcó la fuerza para enfrentar cada desafío, incluso en los momentos más difíciles. Su amor y apoyo siguen siendo la base de mi motivación y de cada paso que doy en este camino.*

*A mi hijo, con la esperanza de que, al igual que yo, nunca deje de luchar por sus sueños y encuentre en su interior la fortaleza para alcanzarlos.*

## *Agradecimientos*

*Agradezco sinceramente al Área de Recursos Naturales, Producción y Ambiente del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Las Brujas, Canelones (ex Programa de Producción y Sustentabilidad Ambiental), por la beca de posgrado que me permitió llevar adelante esta investigación. Agradezco especialmente al director regional de INIA Santiago Cayota por esta oportunidad. También, extendiendo mi gratitud a la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, por permitirme la realización de este posgrado.*

*Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis tutores, Federico Rivas y Elena Beyhaut, quienes me apoyaron en todo momento a lo largo de este proyecto. De ellos aprendí mucho, y siempre estuvieron presentes cuando percibían que decaía, brindándome el ánimo y la fuerza para continuar. Su trato conmigo fue siempre desde el respeto y el afecto, demostrando una gran paciencia y dedicación en cada etapa de mi formación. Gracias a su guía y apoyo, logré superarme académicamente y alcanzar nuevos niveles en mi desarrollo personal y profesional. Además, fueron críticos con mi trabajo de manera constructiva, siempre buscando mi superación y motivándome a alcanzar lo mejor de mí.*

*Un especial agradecimiento a Beatriz Dini, cuya colaboración en el trabajo de laboratorio fue fundamental. Su profesionalismo, dedicación y compromiso marcaron la diferencia en cada etapa de este proyecto. También quiero expresar mi gratitud a Natalia Mattos, cuya contribución y apoyo fueron también valiosos para el éxito del trabajo en el laboratorio.*

*No puedo dejar de agradecer al equipo del laboratorio de Microbiología de Suelo: Valeria López, Mariana Mortalena y Claudia Barlocco, quienes me enseñaron la importancia del trabajo en equipo en una investigación. Con su ejemplo aprendí que cada miembro del equipo tiene un rol crucial y que la responsabilidad individual es esencial para lograr resultados de calidad en la ciencia.*

*Es imprescindible agradecerle a Akira Saito por su invaluable asistencia técnica y por proporcionarme el equipo necesario para finalizar esta tesis. También agradezco a*

*Adriana Reggio, cuyo apoyo, junto con el de su equipo, permitió completar las tareas de riego y autoclavado de grandes volúmenes de sustrato. Asimismo, agradezco a Marcela Díaz, de la Unidad de Bioimagenología Avanzada del Instituto Pasteur de Montevideo, y a su equipo, por su asistencia técnica con el microscopio de fluorescencia confocal.*

*Quiero hacer una mención especial a Nora Altier, Katherine Rodríguez, Eduardo Abreo, Andrés Villar y Lucía Sessa, a mis compañeros becarios Magdalena Olivera y Salvador Ruiz y todo el personal de INIA Las Brujas, quienes, de diversas maneras, contribuyeron al desarrollo exitoso de este trabajo. Reconozco que resulta difícil expresar agradecimiento a todas las personas involucradas, y siempre queda el temor de olvidar a alguien. Sin embargo, quiero que sepan que cada uno de ustedes ha sido una pieza fundamental en este proyecto. ¡Gracias de corazón a todos por su apoyo y colaboración!*

*Finalmente, agradezco a María Noel Cabrera por haber aceptado desempeñarse como mi Directora Académica, y a Astrid Agorio por su valiosa evaluación y aportes.*

*Extiendo también mi agradecimiento al tribunal de defensa de tesis, integrado por Patricia Vaz, Silvina Stewart y Carlos Pérez Rodríguez, por sus valiosos aportes y devoluciones, que resultaron sumamente enriquecedoras y satisfactorias.*

## RESUMEN

Estudios recientes muestran que *Metarhizium spp.*, un hongo entomopatógeno, se asocia con gran variedad de plantas, aportándoles beneficios más allá del control de insectos. Su capacidad como biocontrolador de enfermedades fúngicas es un campo reciente y el presente trabajo contribuye a su estudio. En este contexto, se caracterizaron 13 cepas de *Metarhizium spp.* con el objetivo de desarrollar un bioinsumo agrícola para el control de enfermedades de implantación en *Glycine max*. Para ello se evaluó su capacidad de antagonizar *in vitro* a fitopatógenos fúngicos, así como su eficacia para controlarlos y mitigar su impacto sobre la emergencia de la soja. Además, se estudió su capacidad de asociarse con las raíces, su compatibilidad con *Bradyrhizobium elkanii* y su no interferencia en el proceso de nodulación de la raíz de soja. Con respecto a la compatibilidad, los experimentos de inoculación de semillas con *Metarhizium spp.* y rizobios, verificaron que las cepas evaluadas no inhibieron la nodulación mediada por *B. elkanii*. Además, los estudios de crecimiento de *Metarhizium spp.* en exudados de raíz de soja (*G. max N5909*), revelaron que las cepas aprovecharon eficazmente los nutrientes de los exudados, destacándose *Metarhizium robertsii* ILB167 y *Metarhizium flavoviride* ILB184. Aunque *M. robertsii* mostró tener capacidad de asociación con las raíces de soja, no se evidenció endofitismo en las plantas cosechadas a los 39 días tras la siembra de semillas inoculadas. En cultivos duales *M. robertsii* ILB167 e ILB440 fueron las únicas cepas capaces de antagonizar a los cuatro fitopatógenos probados, inhibiendo el crecimiento de *Fusarium graminearum* ILB332 en un 36 %, *Pythium ultimum* ILB317 en un 53 %, *Pythium sylvaticum* ILB323 en un 45 % y *Rhizoctonia oryzae* ILB428 en un 27 %. De manera adicional, el recubrimiento de semillas de soja con un biopolímero a base de *M. robertsii* ILB440, permitió un control de *F. graminearum* ILB332, evidenciado por una emergencia de las plántulas de soja del 53 %, que fue significativamente superior al 21 % del control sin recubrimiento con *Metarhizium*. Un resultado similar se obtuvo frente a *R. oryzae* ILB428, donde el recubrimiento de semillas con *M. robertsii* ILB440 logró una emergencia del 55 % frente al 28 % del control. No se observaron mejoras significativas en emergencia de soja inoculada con *M. robertsii*, frente a *P. ultimum* ni *P. sylvaticum*. En síntesis *M. robertsii* ILB440 demostró tener potencial para el desarrollo de un bioinsumo agrícola con capacidad de biocontrolar enfermedades de implantación provocadas por *F. graminearum* y *R. oryzae*.

# ÍNDICE PRINCIPAL

RESUMEN.....	5
LISTADO ACTUALIZADO DE ABREVIATURAS Y SIGLAS .....	10
Índice de tablas.....	11
lista de Figuras .....	12
CAPÍTULO 1. Introducción.....	15
1.1    LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS .....	16
1.1.1 CLASIFICACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS .....	17
1.1.2 FORMAS DE VIDA DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.....	18
1.2 EL GÉNERO <i>Metarhizium</i> .....	19
1.2.1 CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>Metarhizium</i> .....	19
1.2.2 <i>Metarhizium</i> COMO COLONIZADORES DE RIZOSFERA Y ENDOFITOS.....	22
1.2.3 <i>Metarhizium</i> COMO SIMBIONTE DE LAS PLANTAS.....	23
1.2.4 <i>Metarhizium</i> COMO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS ..	24
1.2.5 <i>Metarhizium</i> COMO INDUCTOR DE RESISTENCIA AL ESTRÉS, PROMOTOR DE DEFENSA DE LAS PLANTAS Y DEL AUMENTO DE DISPONIBILIDAD DE Fe .....	24
1.2.6 SINERGISMO DE <i>Metarhizium</i> CON OTROS MICROORGANISMOS BENÉFICOS DE LAS PLANTAS .....	25
1.2.7 <i>Metarhizium</i> COMO BIOCONTROLADOR DE HONGOS FITOPATÓGENOS.	25
1.2.8 BIOINSUMOS AGRÍCOLAS A BASE DE <i>Metarhizium</i> .....	27
1.3 CULTIVO DE LA SOJA .....	31
1.3.1 Características del cultivo de soja en Uruguay .....	31
1.3.2 LA IMPORTANCIA DE LA SIMBIOSIS CON RIZOBIOS .....	32
1.3.3 ENFERMEDADES DE IMPLANTACIÓN CAUSADAS POR FITOPATÓGENOS .....	34
1.3.3.1 <i>Fusarium</i> spp. ....	36
1.3.3.2 <i>Rhizoctonia</i> spp.....	37
1.3.3.3 <i>Pythium</i> spp. ....	37
1.4 <i>Metarhizium</i> EN SOJA.....	37
1.5 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	38
CAPÍTULO 2. Materiales y Métodos .....	40
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....	41
2.1.1 Cultivo en placas de agar-papa-dextrosa .....	42

2.1.2 Preparación de suspensión de células de <i>B. elkanii</i> .....	43
2.1.3 Cultivo líquido de fitopatógenos.....	43
2.1.4 Fermentación en sustrato sólido.....	44
2.2 COMPATIBILIDAD DE <i>Metarhizium</i> spp. CON RIZOBIOS .....	46
2.2.1 ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD DE <i>Metarhizium</i> spp. Y <i>Bradyrhizobium</i> <i>elkanii</i> EN CULTIVOS DUALES.....	46
2.2.2 COMPATIBILIDAD IN PLANTA DE <i>Metarhizium</i> spp. Y <i>Bradyrhizobium elkanii</i> .....	47
2.2.2.1 Recubrimiento de semillas.....	47
2.2.2.2 Crecimiento de las plantas con <i>Metarhizium</i> y rizobios .....	48
2.3 COMPATIBILIDAD Y ASOCIACIÓN CON LA PLANTA DE SOJA.....	49
2.3.1 Recubrimiento de semillas con adherente comercial con conidios.....	49
2.3.2 DETERMINACIÓN DE PRESENCIA DE <i>Metarhizium</i> EN RIZOSFERA.....	49
2.3.3 CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE <i>Metarhizium</i> spp. EN EXUDADOS DE RAÍZ DE SOJA .....	50
2.3.3.1 Producción de exudado de raíz .....	50
2.3.3.2 Determinación del crecimiento fúngico por espectrofotometría.....	51
2.3.3.3 Cálculos de parámetros que definen el crecimiento.....	51
2.3.4 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ENDOFÍTICA DE <i>Metarhizium</i> sp. A PARTIR DEL CULTIVO DE FRAGMENTOS DE RAÍZ EN MEDIO SELECTIVO ...	53
2.3.5 DETERMINACIÓN DE ENDOFITISMO DE <i>Metarhizium</i> sp. EN RAÍZ DE SOJA, POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CONFOCAL.....	54
2.3.5.1 Estudio de raíces por microscopía de fluorescencia confocal.....	54
2.4 ANTAGONISMO Y CONTROL DE FITOPATÓGENOS .....	55
2.4.1 DETERMINACIÓN DE ANTAGONISMO DE <i>Metarhizium</i> spp. FRENTE A CUATRO FITOPATÓGENOS, CULTIVOS DUALES .....	55
2.4.2 GERMINACIÓN Y EMERGENCIA DE SOJA INOCULADA CON <i>Metarhizium</i> spp., EN SUELO CON ALTO ÍNDICE DE PATOGENICIDAD .....	56
2.4.2.1 Obtención de suelo con alto índice de patogenicidad.....	56
2.4.2.2 ESTUDIO DE GERMINACIÓN EN PAPEL DE SEMILLAS INOCULADAS CON <i>Metarhizium</i> spp. EN SUELO PATOGENICO .....	58
2.4.2.3 ESTUDIO DE CONTROL DE PATÓGENOS EN SUELO PATOGENICO	59
2.4.3 CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS <i>IN PLANTA</i> .....	60
2.4.3.1 DETERMINACIÓN DE BIOCONTROL DE FITOPATÓGENOS <i>IN PLANTA</i> EXPERIMENTO EN INVERNÁCULO .....	60
2.4.3.2 EXPERIMENTO DE BIOCONTROL EN CÁMARA DE CRECIMIENTO. 62	
2.4.3.2.1 Coating de semillas con biopolímero.....	62

2.4.3.2.2 Diseño del experimento de biocontrol en cámara.....	64
2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	65
CAPÍTULO 3. Resultados.....	66
3.1 PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE <i>Metarhizium</i> spp. POR FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO .....	67
3.2 COMPATIBILIDAD DE <i>Metarhizium</i> spp. CON CEPAS COMERCIALES DE RIZOBIOS RECOMENDADAS PARA EL CULTIVO DE SOJA .....	68
3.2.1 COMPATIBILIDAD <i>IN VITRO</i> ENTRE <i>Metarhizium</i> spp. Y <i>Bradyrhizobium elkanii</i> EN CULTIVOS DUALES.....	68
3.2.2 COMPATIBILIDAD <i>IN PLANTA</i> ENTRE <i>Metarhizium</i> spp. Y <i>Bradyrhizobium elkanii</i> .....	69
3.3 COMPATIBILIDAD Y ASOCIACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>Metarhizium</i> CON DOS VARIEDADES DE SOJA .....	71
3.3.1 CRECIMIENTO DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>Metarhizium</i> spp. EN EXUDADOS DE RAÍZ DE SOJA Y EN CALDO PAPA-DEXTROSA .....	71
3.3.1.1 Cinética del crecimiento de <i>Metarhizium</i> spp. en exudados de raíz y en caldo papa dextrosa .....	74
3.3.1.2 Tiempo de latencia o fase Lag .....	75
3.3.1.3 Tasa de crecimiento o velocidad máxima.....	76
3.3.1.4 Densidad óptica máxima y producción de biomasa fúngica.....	78
3.3.1.5 Crecimiento y Adaptación de <i>Metarhizium</i> spp. en Medios PDB y ER: Variabilidad Intraespecífica y Correlaciones de Parámetros Cinéticos .....	80
3.3.1.6 Correlación entre los parámetros de crecimiento.....	81
3.3.2 CAPACIDAD DE <i>Metarhizium</i> sp. DE COLONIZAR LA RIZOSFERA.....	84
3.3.3 CAPACIDAD ENDOFÍTICA EN RAÍCES DE SOJA DE <i>Metarhizium</i> sp.....	85
3.3.4 COLONIZACIÓN DE RAÍCES DE SOJA POR <i>M. robertsii</i> , MEDIANTE MICROSCOPIA LASER CONFOCAL DE FLUORESCENCIA .....	866
3.3.4.1 Efectividad de la adherencia de los conidios a las semillas de soja.....	888
3.4 ANTAGONISMO Y CONTROL DE FITOPATÓGENOS .....	88
3.4.1 <i>Metarhizium</i> spp. COMO ANTAGONISTA DE CUATRO FITOPATÓGENOS DE SOJA .....	88
3.4.1.1 Antagonismo de <i>Metarhizium</i> contra <i>Fusarium graminearum</i> ILB332 .....	90
3.4.1.2 Antagonismo de <i>Metarhizium</i> contra <i>Rhizoctonia oryzae</i> ILB428.....	91
3.4.1.3 Antagonismo de <i>Metarhizium</i> contra <i>Pythium ultimum</i> ILB317 .....	92
3.4.1.4 Antagonismo de <i>Metarhizium</i> contra <i>Pythium sylvaticum</i> ILB323 .....	92
3.4.2. GERMINACIÓN Y EMERGENCIA EN SOJA INOCULADA CON <i>Metarhizium</i> spp., EN PRESENCIA DE SUELO CON ALTO ÍNDICE DE PATOGENICIDAD .....	97

3.4.2.1 GERMINACIÓN DE SEMILLAS POR LA TÉCNICA EN PAPEL EN PRESENCIA DE SUELO PATOGENICO .....	97
3.4.2.2 EMERGENCIA EN MACETAS CON SUELO CON ALTO ÍNDICE DE PATOGENICIDAD.....	99
3.4.2.2.1 Efecto del tratamiento con <i>Metarhizium</i> en la nodulación y peso seco de plantas de soja en suelo patogénico .....	100
3.4.3 CAPACIDAD BIOCONTROLADORA DE <i>Metarhizium</i> spp. DE FITOPATÓGENOS QUE AFECTAN LA EMERGENCIA DE LA SOJA.....	101
3.4.3.1 CONTROL DE FITOPATÓGENOS MEDIANTE INOCULACIÓN CON SUSPENSIÓN DE CONIDIOS DE <i>Metarhizium</i> EN INVERNÁCULO .....	101
3.4.3.1.1 Capacidad para controlar a <i>F. graminearum</i> , experimento de invernáculo.....	101
3.4.3.1.2 Capacidad para controlar a <i>R. oryzae</i> experimento de invernáculo.....	102
3.4.3.1.3 Capacidad para controlar a <i>P. ultimum</i> ILB317 y a <i>P. sylvaticum</i> ILB323 en invernáculo.....	103
3.4.3.2 CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS MEDIANTE COBERTURA DE SEMILLAS CON <i>Metarhizium</i> EN CÁMARA DE CRECIMIENTO .....	105
3.4.3.2.1 Control de <i>Fusarium graminearum</i> ILB332: Experimento en Cámara de Crecimiento .....	106
3.4.3.2.2 Control de <i>Rhizoctonia oryzae</i> ILB428, experimento de cámara de crecimiento .....	107
3.4.3.2.3 Control de <i>Pythium ultimum</i> ILB317, experimento en cámara de crecimiento .....	108
3.4.3.2.4 Control de <i>Pythium sylvaticum</i> ILB323, experimento en cámara de crecimiento .....	109
Capítulo 4. Discusión y Conclusiones.....	111
4.1 Discusión.....	112
4.2 Conclusiones .....	116
4.3 Perspectivas y Futuras Direcciones de Investigación .....	118
Bibliografía .....	119
ANEXO.....	130

## LISTADO ACTUALIZADO DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

- ConA-AF633: Concanavalina A conjugada con Alexa Fluor 633
- CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)
- EMA: Medio de Extracto de Levadura y Manitol (Yeast Extract Mannitol Agar)
- ER: Exudados de Raíz
- FBN: Fijación Biológica de Nitrógeno
- INIA: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
- MGAP: Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca
- MSM: Medio Semi-selectivo de *Metarhizium*
- OD: Densidad Óptica (Optical Density)
- PBS: Solución Tampón Fosfato Salino
- PDA: Agar Papa Dextrosa (Potato Dextrose Agar)
- PDB: Caldo Papa Dextrosa (Potato Dextrose Broth)
- WGA-AF488: Aglutinina de germen de trigo conjugada con Alexa Fluor 488
- % p/p: porcentaje peso a peso

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. 1. Características generales de Entomophthorales e Hyphomycetes.....	18
Tabla 1. 2. Colonización endofítica de distintas plantas con diferentes especies de <i>Metarhizium</i> .....	23
Tabla 1. 3. Productos comerciales a base de HE utilizados para control biológico. ....	30
Tabla 1. 4. Fuentes de inóculo de fitopatógenos del cultivo de soja. ....	36
Tabla 1. 5. Objetivos específicos y las actividades relacionadas. ....	39
Tabla 2. 1. Lista de material biológico utilizado en el presente trabajo .....	41
Tabla 2. 2 Promedios de temperaturas y humedad relativa en el invernáculo y los patógenos que se ensayaron de acuerdo con cada mes .....	61
Tabla 3. 1. Producción y tiempo de cosecha de conidios de <i>Metarhizium</i> spp. a partir de su fermentación en arroz .....	67
Tabla 3. 2. Compatibilidad de <i>Metarhizium</i> spp. con <i>B. elkanii</i> U1301 <i>in planta</i> , cultivo de dos meses en condiciones de invernáculo a 26°C. ....	70
Tabla 3. 3. Valores de correlación entre las variables seleccionadas del crecimiento fúngico en exudados de raíz y caldo papa dextrosa. ....	82
Tabla 3. 4. Capacidad de <i>M. robertsii</i> ILB167 e ILB440 de colonizar la rizosfera de dos variedades de soja (N5909 y G5602). ....	85
Tabla 3. 5. Control del recubrimiento de semillas de soja con <i>M. robertsii</i> ILB167 e ILB440.....	88
Tabla 3. 6. Crecimiento de las colonias de <i>Metarhizium</i> en PDA a los 10 días de la siembra. ....	94
Tabla 3. 7. Emergencia en suelo patogénico .....	99
Tabla 3. 8. Número de nódulos y peso seco de nódulos, parte aérea y raíz, a los 31 días de la siembra en suelo patogénico como sustrato único.....	101
Tabla 3. 9. Emergencia en plantas de soja sembradas en sustrato con diferentes concentraciones de <i>Fusarium graminearum</i> ILB332 y <i>Rhizoctonia oryzae</i> ILB428 en ambiente semi-controlado de invernáculo. ....	102
Tabla 3. 10. Emergencia en plantas de soja sembradas en sustrato con diferentes concentraciones de <i>Pythium sylvaticum</i> ILB323 y <i>Pythium ultimum</i> ILB317 en ambiente semi-controlado de invernáculo.....	104

## LISTA DE FIGURAS

	Pg.
Figura 1. 1. Esquema del proceso de infección de un hongo entomopatógeno.....	17
Figura 1. 2. Morfología de las colonias de dos especies de <i>Metarhizium</i> : <i>M. lepidiotae</i> ILB225 y <i>M. robertsii</i> ILB167 crecidas en placas de PDA. ....	20
Figura 1. 3. Gusano <i>Tenebrio molitor</i> infectado por <i>Metarhizium</i> spp.....	21
Figura 1. 4. Fotomicrografía de microesclerocios melanizados de <i>Metarhizium anisopliae</i> producidos en fermentación en cultivo líquido .....	21
Figura 1. 5. Mecanismos involucrados en el control biológico de patógenos.....	27
Figura 1. 6. Área sembrada de soja (miles de hectáreas), producción (toneladas) y rendimiento de grano seco (kg/h) en función del año, período 2009-2021.....	31
Figura 1. 7. Sistema nodular de la raíz de soja. <a href="https://asb.com.ar/cultivos/soja/raices-nodulos/">https://asb.com.ar/cultivos/soja/raices-nodulos/</a> .....	32
Figura 1. 8. Reducción de la densidad y pérdida de área sembrada, debido a enfermedades de implantación. ....	35
Figura 2. 1. Cultivo líquidos de hongos fitopatógenos. De izquierda a derecha: <i>R. orizae</i> ILB428; <i>Fusarium</i> sp. ILB332; <i>P. ultimum</i> ILB317 y <i>P. sylvaticum</i> ILB323. ....	44
Figura 2. 2. Producción de conidios por fermentación en sustrato sólido. ....	45
Figura 2. 3. Cosecha de conidios del arroz con solución de Triton X-100. ....	46
Figura 2. 4. Placa de Petri de cultivo dual de <i>B. elkanii</i> U1301 y dos colonias de <i>Metarhizium</i> ILB440. ....	47
Figura 2. 5. Curva de crecimiento microbiano típica.. ....	52
Figura 2. 6. Curva de variación de Ln(DO) vs. tiempo, correspondiente al crecimiento de <i>M. robertsii</i> ILB167 en PDB.....	53
Figura 2. 7. Estudio de antagonismo entre <i>M. robertsii</i> ILB167 y <i>R. orizae</i> ILB428. ...	56
Figura 2. 8. Esquema de germinación de semillas en hileras de suelo patogénico en papel.. ....	58
Figura 2. 9. Criterio de selección de plántulas emergentes. ....	61
Figura 2. 10. Esquema del proceso de recubrimiento de semillas de soja con el biopolímero .....	63
Figura 2. 11. Figura 2.10 Esquema de distribución del sustrato en los vasos de espuma de 1L. ....	64

Figura 3. 1. Compatibilidad de diferentes aislamientos del género <i>Metarhizium</i> spp. con las cepas de <i>B. elkanii</i> U1301 y U1302. Medias de los halos de inhibición del crecimiento de los rizobios (7 días de cultivo).....	69
Figura 3. 2. Representación gráfica del crecimiento de <i>Metarhizium</i> spp. en caldo de papa-dextrosa (arriba) y en exudado de raíz de soja G. max N5909 (abajo). ..	72
Figura 3. 3. Curvas de crecimiento típicas de cuatro <i>Metarhizium</i> spp. en exudados de raíz de G. max N5909.....	73
Figura 3. 4 Curvas de crecimiento atípicas de cuatro <i>Metarhizium</i> spp. en exudados de raíz de soja Nidera 5909. ....	74
Figura 3. 5. Fase Lag media de los diez aislamientos crecidos en exudados de raíz (ER) y en caldo de papa dextrosa (PDB).. ....	75
Figura 3. 6. Tasa máxima de crecimiento de diez aislamientos en exudados de raíz (ER) y en caldo de papa dextrosa (PDB). Las barras indican el error estándar (n=6). ....	77
Figura 3. 7. Biomasa máxima alcanzada de los diez aislamientos crecidos en exudados de raíz (ER) y en caldo de papa dextrosa (PDB).. ....	79
Figura 3. 8. Capacidad de <i>Metarhizium</i> de crecimiento en ER según la fase Lag y la tasa de crecimiento máxima.. ....	83
Figura 3. 9. Presencia de <i>M. robertsii</i> ILB167 en suelo rizosférico a 39 días de su inoculación en las semillas de <i>G. max</i> G5602.. ....	84
Figura 3. 10. Colonización de nódulos y raíz en plantas de soja G5602 a partir de semillas tratadas con <i>M. robertsii</i> ILB167 e ILB440 observadas por MLCF. ....	86
Figura 3. 11. Colonización de raíz en plantas de soja N5909 a partir de semillas tratadas con <i>M. robertsii</i> ILB167 e ILB440 por MLCF. ....	87
Figura 3. 12. Espacio de interacción entre <i>Metarhizium</i> y cuatro fitopatógenos fúngicos en cultivos duales. ....	89
Figura 3. 13. Porcentaje de inhibición de fitopatógenos fúngicos en cultivos duales....	90
Figura 3. 14. Capacidad antagonista de trece aislamientos de <i>Metarhizium</i> spp. frente a <i>P. ultimum</i> ILB317 .....	95
Figura 3. 15. Capacidad antagonista de cinco aislamientos de <i>Metarhizium</i> spp. frente a <i>Fusarium graminearum</i> . ILB332. ....	96
Figura 3. 16. Efecto de <i>Metarhizium</i> sobre la germinación de soja N5909 en presencia de suelo patogénico. ....	97

Figura 3. 17. Efecto protector de <i>M. robertsii</i> ILB167 y <i>M. frigidum</i> ILB182 sobre las semillas sembradas en suelo patogénico. ....	98
Figura 3. 18. Control de <i>Fusarium graminearum</i> ILB332 al 1,0 % en soja tratada con tres aislamientos de <i>Metarhizium</i> . ....	107
Figura 3. 19. Control de <i>Rhizoctonia oryzae</i> ILB428 al 12 % (p/p) en soja tratada con tres aislamientos de <i>Metarhizium</i> .....	108
Figura 3. 20. Control de <i>Pythium ultimum</i> ILB317 al 0,5 % (p/p) en soja tratada con cuatro aislamientos de <i>Metarhizium</i> .....	109
Figura 3. 21. Control de <i>Pythium sylvaticum</i> ILB323 al 1,0 % (p/p) en soja tratada con cuatro aislamientos de <i>Metarhizium</i> .....	110

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Los hongos entomopatógenos son un grupo de microorganismos filogenéticamente diverso, heterótrofos, eucariontes, unicelulares o hifales (filamentosos), que presentan reproducción por esporas sexuales, asexuales o ambas (Araujo & De Albuquerque, 2008). El término hongo entomopatógeno (HE), se aplica a aquellos hongos capaces de infectar y matar insectos. También se los define como parásitos obligados o facultativos de insectos, con alta capacidad de esporulación y sobrevivencia; sus mayores ventajas están en la manipulación y adaptación a diferentes ambientes, especificidad y capacidad de penetración directa a través del tegumento (García et al., 2011). El primer HE descrito fue *Cordyceps militaris*, por Theodor Holmskjöld (1731-1793), un botánico danés. Luego, Anton de Bary describió los detalles de la infección de orugas por ascosporas de *C. militaris* y la subsecuente historia de vida del parásito (Espinel Correal et al., 2018).

La infección natural del insecto comienza cuando las unidades infectivas de los HE (llamadas conidios), se adhieren a la superficie de la cutícula del insecto, debido a la presencia de proteínas ricas en cisteínas llamadas hidrofobinas. Los factores que determinan el éxito en la germinación de los conidios en la cutícula son: el contenido de agua, iones, ácidos grasos y nutrientes en la superficie de esta, así como su estado fisiológico (Shahid, Rao, Bakhsh, & Husnain, 2012). A continuación, el tubo germinal empieza a crecer sobre la cutícula del insecto y penetra a través de orificios naturales, como partes bucales, membranas intersegmentales, espiráculos o sitios donde existe una alta humedad. Esta penetración de la cutícula se da por la producción de enzimas y presión física de un extremo de hifa del hongo, llamado “apresorio”. En la degradación de la cutícula intervienen enzimas como proteinasas, quitinasas, lipasas y esterases (Ferron, 1978) (figura 1.1).

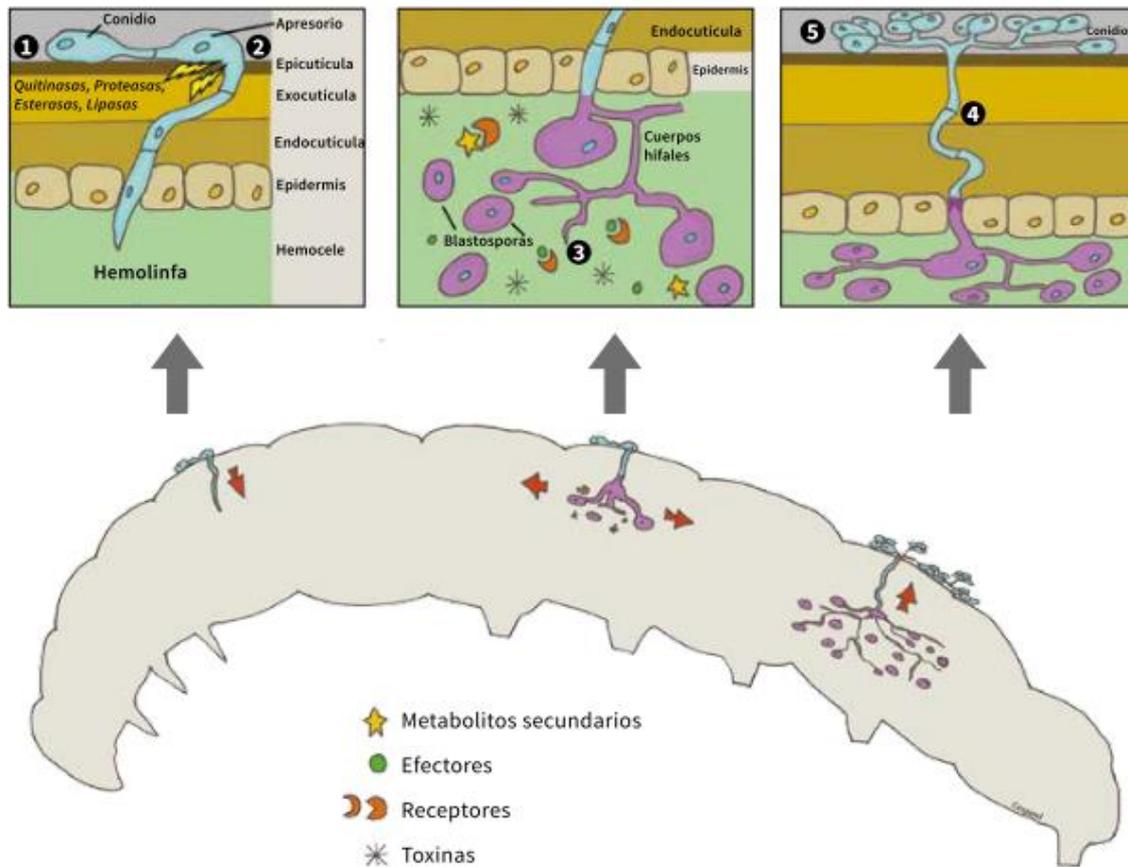


Figura 1. 1. Esquema del proceso de infección de un hongo entomopatógeno (Espinel Correal et al., 2018)

### 1.1.1 CLASIFICACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATOÓGENOS

Los HE pertenecen al reino Fungi, ubicados en las divisiones: Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, y comprenden un total de 100 géneros de los cuales se conocen aproximadamente 750 especies (Hernández et al., 2019). Frecuentemente causan epizootias en sus hospedantes. Se dividen en dos grandes grupos: los generalistas y los especialistas, ambos definidos y caracterizados según su amplio o estrecho rango de huéspedes. Dentro de los especialistas el grupo más importante pertenece al orden Entomophthorales (Zygomycota: Zygomycetes) incluye unas 200 especies patógenas de insectos y ácaros (Lopez & Scorsetti, 2007), afectando principalmente a especies incluidas en los órdenes Hemiptera, Lepidoptera, Orthoptera y Diptera.

Los hongos Entomophthorales son difíciles de cultivar por lo que no se utilizan como biocontroladores en la agricultura (Araujo & De Albuquerque 2008). El segundo grupo,

los HE generalistas, pertenecen a la clase Hyphomycetes y son los que se han desarrollado como agentes de biocontrol de plagas en la agricultura. Entre los géneros más comunes de hongos Hyphomycetes se encuentran: *Aspergillus*, *Beauveria*, *Culicinomyces*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces* y *Tolipocladium* (Araujo & De Albuquerque 2008). La tabla 1.1 muestra las características generales de ambos grupos de HE, Entomophthorales e Hyphomycetes.

**Tabla 1. 1. Características generales de Entomophthorales e Hyphomycetes**

Característica	Entomophthorales	Hyphomycetes
<b>Tamaño y número de conidias por cadáver</b>	> 10 µm de largo, pequeño número de conidias/cadáver	< 10 µm de largo, gran número de conidias/cadáver
<b>Liberación de conidias</b>	Activa, con algunas excepciones	No activa
<b>Preformación de muco en las conidias</b>	Presente	Ausente, con excepciones: <i>Verticillium</i> spp., <i>Hirsutella</i> spp., <i>Aschersonia</i> spp
<b>Rhizoides</b>	Presente en muchas especies	Ausente
<b>Habilidad de modificar el comportamiento del hospedante</b>	Puede modificar el comportamiento como por ejemplo <i>Entomophaga grilli</i> , <i>Entomophora muscae</i>	No modifican el comportamiento con excepción de <i>Sorospora</i> spp.
<b>Muerte del hospedante antes de la esporulación</b>	Presente en algunas especies: <i>Entomophthora thripidum</i> , <i>Strongwellsea castrans</i> y <i>Massospora</i> spp.	Presente en <i>Verticillium lecanii</i>
<b>Epizootias</b>	Más común en insectos foliares	Más común en insectos del suelo
<b>Rango de hospedantes</b>	Estrecho	Amplio, con excepción de <i>V. lecanii</i> , <i>Hirsutella thomsoni</i>
<b>Producción de toxinas</b>	Desconocida	Observada en muchas especies
<b>Crecimiento saprofito</b>	Ausente con excepción de <i>Conidiobolus</i> spp.	Presente en muchas especies
<b>Esporos de reposo</b>	Presente en muchas especies	Ausente, con excepción de los clamidosporos en <i>Sorospora</i>
<b>Virulencia</b>	Requiere pocas conidias para infección	Requiere muchas conidias para infección, excepto <i>V. lecanii</i>
<b>Tasa de esporulación y germinación</b>	Rápida	Lenta
<b>Conidio de orden superior</b>	En todas las especies	Solamente en <i>Aschersonia</i>

Tabla reproducida de Pell et al., 2001

### 1.1.2 FORMAS DE VIDA DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Las formas de vida de los HE son muy variadas, ellos pueden vivir como saprótrofos colonizando la rizosfera, la filósfera y la endosfera (endófitos), hemibiótrofos,

necrótrofos de plantas, entomopatógenos y micoparásitos. Algunos de estos hongos sobreviven con más de un modo econutricional (Ownley et al., 2010). Recientemente se ha descubierto funciones adicionales en la naturaleza, como la de ser antagonistas de fitopatógenos asociados a la rizosfera, y posiblemente incluso agentes promotores del crecimiento de las plantas (Vega et al., 2009). La rizósfera es la capa de suelo que rodea de manera inmediata a la raíz, y constituye una interfaz clave donde ocurren numerosas interacciones entre las plantas y otros organismos (Bais et al., 2006). El término endófito, se refiere a aquellos microorganismos que infectan los tejidos internos de las plantas sin causar síntomas aparentes (Quesada et al., 2019). La colonización endofítica puede desencadenar respuestas en la planta que reducen o alivian las enfermedades de las plantas (Ownley et al., 2010). En este contexto, *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (*Ascomycota: Hypocreales*) y *Lecanicillium* spp. (*Ascomycota: Hypocreales*), tienen una participación en interacciones planta-hongo (Vega et al. 2008), ambos suprimen eficazmente las enfermedades de las plantas (Goettel et al. 2008; Ownley et al. 2008). La asociación con las plantas parece ser de las principales características de los HE, junto con el parasitismo en insectos, por lo que hoy se habla de *hongos entomopatógenos endofíticos* (Hu & Bidochka, 2021).

*Metarhizium* es otro género de HE que está siendo estudiado por su potencial para colonizar las raíces como endófito y para contribuir al control de fitopatógenos en la rizósfera. Detalles sobre sus principales características y capacidades se presentan en la siguiente sección.

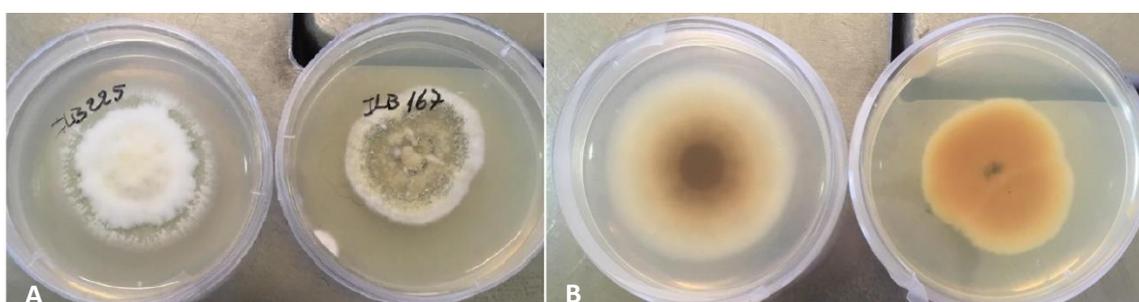
## **1.2 EL GÉNERO *Metarhizium***

### **1.2.1 CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Metarhizium***

Los HE de género *Metarhizium* (*Hypocreales: Clavicipitaceae*) fueron descubiertos por Metchnikoff en 1878, quien los aisló a partir de larvas de *Anisoplia austriaca* con la enfermedad conocida como muscardina verde. Metschnikoff propuso inicialmente nombrarlos como *Entomophthora anisopliae* y posteriormente fue denominado *Isaria destructor*. Estudios más detallados de la taxonomía del género, concluyeron en clasificarlo como *Metarhizium sorokin*. Actualmente se considera la

especie *Metarhizium anisopliae*, nombrada por Metschnikoff, como el organismo representativo del género *Metarhizium* (Steinhaus, 1956). Estos hongos se utilizan como agentes de biocontrol de insectos plaga en todo el mundo (Espinel et al., 2018).

La taxonomía clásica se basa en las características morfológicas de las colonias y de los conidios. Las colonias de *Metarhizium* spp. en agar-papa-dextrosa (PDA) inicialmente son blancas, y al producir conidios, se tornan de color verde con conidióforos simples o agregados y fiálides en forma de botella (Valle-Ramírez et al., 2022). Según la madurez, la colonia cambia de color: de olivo a amarillo verdoso o verde oscuro, según la especie. En el reverso de la placa, se observa color miel o amarillo pálido, y en algunas especies, un pigmento amarillo se difunde en el medio (Figura 1.2).



**Figura 1. 2. Morfología de las colonias de dos especies de *Metarhizium*: *M. lepidiotae* ILB225 y *M. robertsii* ILB167 crecidas en placas de PDA. A) Colonia vista desde arriba, de varios colores producto de los distintos estados de maduración de los conidios y de la especie: amarillo, verde oliva o verde oscuro. B) Colonias vistas desde abajo donde se observa colores amarillo miel y marrón, pigmentación típica. Fuente: elaboración propia**

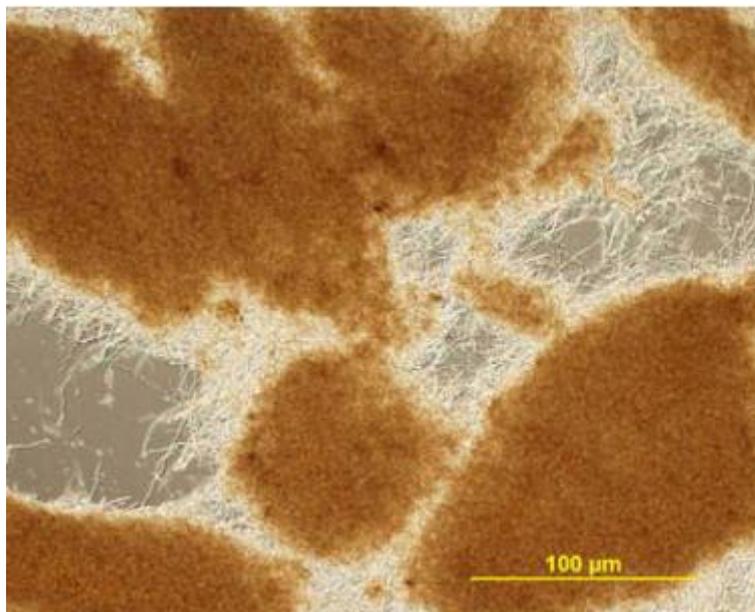
*Metarhizium anisopliae* se caracteriza por ser mesófilo, con una temperatura óptima para germinación y crecimiento de 25 a 30°C, una máxima de 32 a 35°C y una mínima de 10 a 12°C (Padilla-Melo et al., 2000) .

La figura 1.3 muestra el aspecto del hongo de género *Metarhizium* en la superficie de un gusano de la harina infectado, *Tenebrio molitor*, Se aprecia el moteado característico del borde blanco algodonoso y centro verde oliva correspondiente a los cúmulos de conidios pigmentados.



**Figura 1. 3. Gusano *Tenebrio molitor* infectado por *Metarhizium* spp. Foto:**  
*Elaboración propia.*

Además de los conidios, estos hongos producen otras estructuras de resistencia llamadas microesclerocios. Los microesclerocios son agregaciones pseudoparenquimatosas de hifas que se melanizan durante su desarrollo, alcanzando diámetros entre 50 y 300  $\mu\text{m}$  (Jackson & Jaronski, 2009), ver figura 1.4. Estas estructuras son altamente resistentes a la desecación y contienen una gran cantidad de reserva de nutrientes.



**Figura 1. 4. Fotomicrografía de microesclerocios melanizados de *Metarhizium anisopliae* producidos en fermentación en cultivo líquido (Jackson et al., 2010)**

## 1.2.2 *Metarhizium* COMO COLONIZADORES DE RIZOSFERA Y ENDOFITOS

Además de infectar insectos, los hongos de género *Metarhizium*, pueden existir como colonizadores de la rizosfera, saprófitos y como endófitos, brindando múltiples beneficios en los agroecosistemas. Estudios realizados por Sasan & Bidochka (2012) sobre la distribución de estos microorganismos en el suelo, determinaron que *Metarhizium robertsii* no se distribuye aleatoriamente en los suelos, sino que se asocia preferentemente con la rizosfera de las plantas cuando se aplica en entornos agrícolas. Varias especies de *Metarhizium* son capaces de colonizar las raíces de plantas dicotiledóneas como el tomate (*Solanum lycopersicum*), alubias (*Phaseolus vulgaris*), soja (*Glycine max*); así como también monocotiledóneas: pasto varilla (*Panicum virgatum*) y trigo (*Triticumaestivum*) (García, 2011; Behie et al., 2012).

Hoy se cuenta con varios estudios que comprueban la vida endofítica de varias especies del género *Metarhizium*. En un experimento sobre canola, *M. anisopliae* colonizó endofíticamente el 80% de las plantas a las cuatro semanas luego de haber sido inoculadas foliarmente con el hongo (Batta, 2013). *M. robertsii* o *M. anisopliae* establecieron una colonización endofítica en: tomate (García et al., 2011; Dutta et al., 2015; Hernández et al., 2019), raíz de alubia (Behie et al., 2012), raíz de coliflor (Razinger et al., 2014), sorgo bicolor (Mantzoukas, 2015), , té (Kaushik, 2016), , pasto varilla, raíz de mandioca (Greenfield et al., 2016), soja (Clifton et al., 2018), raíz de maíz (Rivas-Franco, Hampton, Altier, et al., 2020) y coco (Gaviria et al., 2020). Según Ahmad et al. (2020), *M. robertsii* es un endófito generalista capaz de establecer diversos grados de colonización endofítica en múltiples tejidos a lo largo de una amplia gama de plantas hospedantes que incluye muchas familias de plantas y rasgos funcionales. Asimismo, en un estudio en plantas de papa inoculadas con *M. brunneum*, Krell et al. (2018), demuestran que el endofitismo de los entomopatógenos puede mejorarse mediante la acción enzimática de celulasas.

La tabla 1.2, modificada de Quesada et al (2019), presenta algunas de las especies de plantas colonizadas endofíticamente por *Metarhizium* por inoculación en laboratorio y otras halladas en la naturaleza. La capacidad endofítica de estos hongos presenta a *Metarhizium* spp. como un potencial simbiote de una gran variedad de cultivos.

**Tabla 1. 2. Colonización endofítica de distintas plantas con diferentes especies de *Metarhizium*.**

Especie fúngica	Inoculación	Plantas hospedantes
<i>Metarhizium brunneum</i>	Natural	<i>Schizachne purpurascens</i>
	Por inducción en el laboratorio	<i>Helianthus annuus, Sorghum bicolor, Zea mays, Cucumis melo. Vicia faba, Solanum tuberosum, Glycine max</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Natural	<i>Cynodon dactylon</i>
	Por inducción en el laboratorio	<i>Solanum lycopersicum, Manihot esculenta, Cocos nucifera, Camelia sinensis</i>
<i>Metarhizium robertsii</i>	Natural	<i>Aster vimineus, Hieracium pratense, Solidago altissima</i>
	Por inducción en el laboratorio	<i>Panicum virgatum, Phaseolus vulgaris, Sorghum bicolor, Vigna unguiculata, Cucumis sativus</i>
<i>Metarhizium guizhouense</i>	Natural	<i>Solidago altissima</i>
<i>Metarhizium acridum</i>	Por inducción en el laboratorio	<i>Vigna unguiculata, Cucumis sativus</i>

Tabla adaptada de Quesada et al (2019 p. 158-159).

### 1.2.3 *Metarhizium* COMO SIMBIONTE DE LAS PLANTAS

A partir del estudio en los genes relacionados con la adhesión de los hongos del género *Metarhizium* a plantas e insectos, Wyrebek & Bidochka (2013) demostraron que *Metarhizium* tiene un ancestro asociado a las plantas. Los autores sugieren que las interacciones con las plantas han tenido un papel importante en la evolución de este género fúngico y su selección del insecto huésped. Los análisis del genoma completo también han sugerido que el género *Metarhizium* evolucionó a partir de endófitos o patógenos de plantas (Gao, 2011).

Otra evidencia de su potencial como simbiote de plantas, es su capacidad de translocar nitrógeno a cambio de fotosintatos. Behie et al. (2012), demostraron dicha translocación, mediante el rastreo de un isótopo de nitrógeno. El isótopo fue inyectado inicialmente en insectos que posteriormente fueron infectados y consumidos por *M. robertsii*. Luego se encontró el isótopo de nitrógeno en los aminoácidos de las plantas: frijol blanco (*Phaseolus vulgaris*) y pasto varilla (*Panicum virgatum*). Subsiguientes estudios realizados, por estos mismos autores, con *M. robertsii*, *M. brunneum*, *M. guizhouense* (especies de amplio rango de insectos huésped); *M. acridum* y *M. flavoviride* (rango estrecho de insectos huésped) en alubias (*Phaseolus vulgaris*), soja (*Glycine max*), pasto varilla (*Panicum virgatum*) y trigo (*Triticum aestivum*) también mostraron capacidad de traslocación de nitrógeno del hongo a la planta. Seguidamente Behie et al. (2017),

mediante el rastreo del isótopo de carbono, obtuvieron la evidencia de que la planta huésped proporcionaba fotosintatos a *M. robertsii*, probablemente a cambio de nitrógeno derivado de insectos infectados por *Metarhizium* en una interacción tripartita y simbiótica.

#### **1.2.4 *Metarhizium* COMO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS**

Estudios realizados por Liao et al. (2014) en maíz con especies de *M. brunneum*, *M. anisopliae* y *M. robertsii* incrementaron un aumento significativo de la formación del cuello de la hoja, la longitud del tallo, la biomasa del tallo, el follaje y el promedio de la mazorca de maíz. Su mayor impacto en el rendimiento del maíz, fue durante el crecimiento vegetativo temprano al permitir que las plantas se establecieran antes y, por lo tanto, superar potencialmente los factores ambientales de estrés biótico y abiótico. La colonización sistémica de pepino por *M. anisopliae*, luego de 28 días de inoculado, tuvo un efecto positivo en el crecimiento y desarrollo de la planta (Shalan et al., 2021). El crecimiento de dos variedades de arroz fue promovido significativamente por *Metarhizium anisopliae* LHL07, en un estudio realizado por Khan et al. (2012). Según Jaber & Enkerli (2016) *M. brunneum* puede colonizar sistémicamente diferentes partes de la planta de habas (*Vicia faba*) y mejorar su crecimiento, cuando se aplica como tratamiento de semillas. De igual manera, *M. brunneum* colonizó plantas de repollo (Dara et al., 2017) cuando se lo agrega de forma líquida. Otro estudio demostró que las raíces de pasto varilla (*Panicum virgatum*) y frijoles blancos (*Phaseolus vulgaris*), tratadas con *M. robertsii* crecieron más rápido y aumentaron la densidad de pelos radicales en comparación con el control (Sasan & Bidochka, 2012).

#### **1.2.5 *Metarhizium* COMO INDUCTOR DE RESISTENCIA AL ESTRÉS, PROMOTOR DE DEFENSA DE LAS PLANTAS Y DEL AUMENTO DE DISPONIBILIDAD DE Fe**

Algunos hongos del género *Metarhizium* pueden inducir resistencia al estrés salino en plantas, mediante la mitigación del estrés oxidativo. Ejemplo de esto es la detección de contenido elevado de isoflavonoides (IF), de prolina, reducción de superóxido dismutasa

y malondialdehído en plantas de soja inoculadas con *M. anisopliae* LHL07 bajo estrés por salinidad (Khan et al., 2012).

La reducción de ácido salicílico y aumento de ácido jasmónico en plantas inoculadas con *M. anisopliae* ((Rivas-Franco, Hampton, Narciso, et al., 2020), sugiere que estos hongos también podrían actuar como inductores de la defensa de las plantas.

Otro de los beneficios de estos hongos es el aumento de la disponibilidad Fe para las plantas. Según un estudio realizado por (Raya-Díaz et al., 2017) con tres géneros distintos de HE (*Metarhizium*, *Beauveria* e *Isaria*), *M. brunneum* fue el hongo más efectivo en el aumento de la disponibilidad de Fe para el sorgo. El mecanismo para aumentar la absorción de Fe en sorgo, consistió en la disminución del pH de los medios calcáreos a partir de los de ácidos orgánicos liberados por el hongo (Raya-Díaz et al., 2017).

### **1.2.6 SINERGISMO DE *Metarhizium* CON OTROS MICROORGANISMOS BENÉFICOS DE LAS PLANTAS**

Por otra parte, existen evidencias de la compatibilidad de los HE con otros microorganismos. En estudios para controlar larvas de suelo, Glare (1994) determinó que se podían utilizar en forma conjunta suspensiones líquidas de conidios de *M. anisopliae* con bacterias del género *Serratia entomophila*, existiendo sinergismo entre ambos microorganismos. Usando la secuenciación de Illumina, Barelli et al. (2020) demostraron un aumento de los microorganismos rizosféricos promotores de crecimiento (*Bradyrhizobium* spp., *Flavobacterium* spp., *Chaetomium* spp., *Trichoderma* spp.) en frijol *Phaseolus vulgaris*, después de la inoculación con conidios de *M. robertsii*, en presencia y ausencia de un insecto huésped.

### **1.2.7 *Metarhizium* COMO BIOCONTROLADOR DE HONGOS FITOPATÓGENOS**

Dentro de las nuevas capacidades de *Metarhizium* descubiertas en esta última década, es de interés, la habilidad de ser antagonistas de hongos fitopatógenos. El término antagonismo se refiere a un mecanismo generalizado por el cual un microorganismo reduce la supervivencia o la actividad de un patógeno causante de enfermedad. De esta manera, hongos antagonistas de fitopatógenos se podrían utilizar como biofungicidas en

cultivos donde el rendimiento esté afectado por las enfermedades provocadas por hongos patógenos. Evidencia de ello, es la acción antagonista frente a *Fusarium solani* que presentó *M. robertsii* inoculado en plantas de frijoles en un estudio realizado por Sasan & Bidochka (2013). *M. guizhouense* y *M. novozealandicum* inoculados en planta de maíz, presentaron acción antagonista frente a *Fusarium graminearum* (Rivas-Franco, Hampton, Altier, et al., 2020). Otro estudio, realizado por Jaber y Ownley, demuestra el potencial de biocontrol de *M. brunneum* contra varias especies de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. culmorum* y *F. moniliforme*) causantes de una de las enfermedades más extendidas y económicamente importantes llamada *Pudrición de la raíz y la corona por Fusarium* (Jaber & Ownley, 2018).

También hay evidencia de antagonismo de *M. robertsii* frente al fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, en cultivos duales y en condiciones de campo mediante la disminución de la enfermedad producida por el mismo en los tubérculos de papa en Siberia occidental (Tomilova et al., 2020)

El control de un patógeno por parte de un microorganismo antagonista se puede dar mediante varios mecanismos de acción, interactuando con el huésped o directamente con el patógeno. Según Silvana Vero (2006): “En la mayoría de los casos la protección dada por un antagonista involucra más de un mecanismo”. Baker (1991), define varios mecanismos posibles de acción entre los que se encuentran: la producción de antibióticos, la competencia por nutrientes o espacio, el parasitismo y la inducción de resistencia del huésped. Baker clasifica estos mecanismos según actúen directamente con el patógeno o con la planta hospedera. Vero (2006) le agrega a esta clasificación el término *amensalismo* que involucra la producción por parte del antagonista, antibióticos y otro tipo de sustancias que afecten directamente la viabilidad o la capacidad de crecimiento del patógeno. La Figura 1.5, muestra el esquema de los mecanismos de control adaptado de Baker y modificado por Vero.

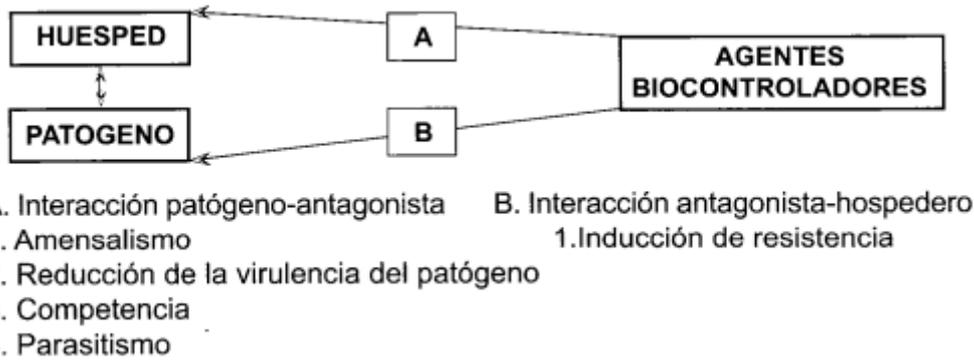


Figura 1. 5. Mecanismos involucrados en el control biológico de patógenos. (Vero, 2006)

Varios son los mecanismos por los cuales estos hongos pudieran actuar como agentes de biocontrol de hongos fitopatógenos. Uno de ellos es la producción de *compuestos orgánicos volátiles* (COV) que actúan como biopesticidas para controlar plagas y patógenos de cultivos. A partir de la detección de actividad antimicrobiana de COVs de tres cepas de *M. brunneum*, se determinó que el oomiceto *Pythium ultimum* y los hongos ascomicetos *Fusarium graminearum* y *Botrytis cinerea*, fueron sensibles a una gama amplia de COV (Hummadi et al., 2022). La capacidad de alterar el perfil de COV en respuesta a señales de su entorno puede ayudar a *M. brunneum* a sobrevivir entre las raíces de una amplia gama de especies de plantas y a protegerlas de fitopatógenos (Hummadi et al., 2022).

### 1.2.8 BIOINSUMOS AGRÍCOLAS A BASE DE *Metarhizium*

Los bioinsumos son formulaciones que contienen microorganismos (bacterias, hongos, virus) o compuestos bioactivos microbianos, los cuales son utilizados para mejorar la productividad, la calidad y la salud de las plantas, o las características biológicas del suelo (Altier et al., 2012). Los bioinsumos en general tienen nulo o bajo impacto en los agroecosistemas (Mamani & Filippone, 2018). Estos pueden clasificarse en dos grandes grupos: *bioestimulantes* y *biocontroladores* (Starobinsky et al., 2021)

La utilización de hongos entomopatógenos (HE) como bioinsumos aplicados a los cultivos ha aumentado en las últimas décadas (Motta & Murcia, 2011). A modo de ejemplo la Tabla 1.3, extraída del artículo de Motta & Murcia, muestra algunos productos a base de HE utilizados para el control biológico de plagas.

*Beauveria bassiana* es el hongo entomopatógeno con mayor espectro de uso y del que se tiene un mayor número de productos comerciales a nivel mundial (Faria, & Wraight,

2007). Se han desarrollado más de 170 productos basados en al menos 12 especies de hongos (Faria & Wright 2007). La mayoría de los hongos producidos comercialmente son especies de *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* e *Isaria*.

Metschnikoff fue el primero en visualizar a *Metarhizium* como biocontrolador de plagas en cultivos (Steinhaus, 1956). Al parecer, fue el primero en darse cuenta de la importancia de la producción masiva de los HE por medios “artificiales”. En 1884 dejó que su joven aprendiz Isaak Krassilschik liderara y organizara una pequeña planta de producción en Smela. Después de cuatro meses de producción, obtuvieron 55 kg de esporas de *Metarhizium*, que se mezclaron con arena fina y se esparcieron en parcelas cercanas a Kiev. Entre 10 y 15 días después de la diseminación de esporas de *Metarhizium* en las parcelas, entre el 55 % y el 80 % de las larvas de *Cleonus* (*Conorrhynchus mendicus*) murieron por la enfermedad muscardina verde producida por el hongo (Steinhaus, 1956).

Existe una gran variedad de bioinsumos comerciales en todo el mundo cuyo componente principal en su mayoría es de *M. anisopliae*. Este puede estar como único microorganismo biocontrolador o acompañado de otros HE o de bacterias (Espinel et al., 2018; Faria & Wraight, 2007). Los productos basados en *Metarhizium* desarrollados por empresas e instituciones sudamericanas, representan el 42,7 % de todos los productos (comerciales) listados, seguidos de América del Norte (20,5 %), Europa y Asia (12,3 % cada una), América Central (7,0 %), África (2,9 %), y Oceanía (2,3%) (Faria & Wraight, 2007). Los datos sugieren que el mayor programa que utiliza estos hongos, se basa en aplicación de *M. anisopliae* para el control del salivazo, *Mahanarva andigena Jacobi* (Homóptera, Cercopidae), en campos de caña de azúcar y pastizales de América del Sur y Central (Faria & Wraight, 2007).

Los principios activos de los bioinsumos a base de *Metarhizium* sp., son principalmente conidios o una mezcla de conidios con hifas (micelio del hongo) que se cuantifican en términos de unidades formadoras de colonias (ufc). La formulación de un bioinsumo es el proceso por el cual se combina la cepa microbiana con otros ingredientes que garantizan su estabilidad y viabilidad (Altier et al., 2012). El material soporte o material matriz del bioinsumo juega un rol fundamental. Este debiera preservar al microorganismo hasta su momento de desarrollo y acción en el suelo, evitando la deshidratación o el contacto con productos químicos (agroquímicos) perjudiciales.

Los materiales de origen lignocelulósico, en desarrollo, como los hidrogeles y films (Musa et al., 2018) derivados de las combinaciones de hemicelulosas, ligninas y celulosa, son una de las opciones a tener en cuenta en Uruguay, donde se producen diariamente debido a la industria maderera, toneladas de residuos forestales y residuos de la industria de la celulosa.

En la revisión de Faria & Wraight (2007) las formulaciones conteniendo *Metarhizium* utilizadas hasta el 2007, fueron:

-Polvo mojable. Polvo para ser aplicado como una suspensión después de la dispersión en agua.

-Granulado. Una formulación sólida de gránulos definidos de un rango de tamaño variable, listo para usar

-Cebo (listo para usar). Formulación diseñada para atraer y ser consumida por las plagas objetivo.

-Gránulo dispersable en agua. Formulación consistente en gránulos para ser aplicado después de la disgregación y dispersión en agua.

-Concentrado técnico. Un ingrediente activo aislado (en la medida de lo posible) a partir de las materias primas, disolventes, etc., utilizados para producirlo. Los materiales de partida suelen ser los sustratos de cultivo líquidos o sólidos.

-Concentrado fluido miscible en aceite. Una suspensión estable de ingrediente(s) activo(s) en un fluido destinado a diluirse en un líquido orgánico antes de su uso.

-Dispersión de aceite. Una suspensión estable de ingredientes activos en un fluido inmisible en agua, que puede contener otros ingredientes activos disueltos, destinados a la dilución en agua antes de su uso. En la práctica, las dispersiones de aceite contienen emulsionantes para hacer la mezcla miscible en agua para pulverizar.

El recubrimiento de semillas con biopolímeros conteniendo conidios, o también con microesclerocios de *Metarhizium* (Lira et al., 2020; Rivas et al., 2019) es otra de las opciones de formulado con grandes perspectivas de uso agrícola.

Con respecto a las investigaciones sobre la seguridad de utilización de productos a base de estos hongos, Zimmermann (2007) realiza una revisión y concluye que *M. anisopliae*

se considera seguro con riesgos mínimos para los vertebrados, seres humanos y el medio ambiente.

Tabla 1. 3. Productos comerciales a base de HE utilizados para control biológico.

Producto	Hongo	País
<b>Botanigard®</b>	<i>B. bassiana</i>	<b>Chile</b>
<b>Aseronjia®</b>	<i>A. aleyrodis</i>	<b>Rusia</b>
<b>Biotrol® FBB</b>	<i>B. bassiana</i>	<b>USA</b>
<b>Boverin®</b>	<i>B. bassiana</i>	<b>Rusia</b>
<b>ABG-6178®</b>	<i>B. bassiana</i>	<b>USA</b>
<b>Mycar®</b>	<i>H. thompsoni</i>	<b>USA</b>
<b>Biotrol® FMA</b>	<i>M. anisopliae</i>	<b>USA</b>
<b>Green guard®</b>	<i>M. anisopliae</i>	<b>Australia</b>
<b>Metaquino®</b>	<i>M. anisopliae</i>	<b>Brasil</b>
<b>Vertalec®</b>	<i>V. lecanii</i>	<b>Inglaterra</b>
<b>Mycotol®</b>	<i>V. lecanii</i>	<b>Inglaterra</b>
<b>Mycotal®</b>	<i>V. lecanii</i>	<b>Holanda</b>
<b>Mycotrol® WP</b>	<i>B. bassiana</i>	<b>USA</b>
<b>Preferal®</b>	<i>P. fumosoroseus</i>	<b>Bélgica</b>
<b>Bea-SIN®</b>	<i>B. bassiana</i>	<b>México</b>
<b>Pae-SIN®</b>	<i>P. fumosoroseus</i>	<b>México</b>
<b>Micobiol® HE</b>	<i>B. bassiana</i> <i>M. anisopliae</i> <i>L. lecanii</i> <i>H. thompsonii</i>	<b>Colombia</b>
<b>Vertisol®</b>	<i>Verticillium spp</i>	<b>Colombia</b>
<b>Couch®</b>	<i>L. giganteum</i>	<b>USA</b>

Tabla reproducida de Motta & Murcia, (2011).

## 1.3 CULTIVO DE LA SOJA

### 1.3.1 Características del cultivo de soja en Uruguay

El cultivo de soja (*Glycine max*), es el principal cultivo de secano en el Uruguay (Couto et al., 2021) y ocupa actualmente un promedio de 908.000 hectáreas. Este cultivo enfrenta el desafío de mantener los rendimientos de producción, a los efectos de abastecer el alto potencial de demanda internacional existente. El rendimiento medio del cultivo de soja a nivel nacional de la zafra 2020/21, fue estimado en 1.881 kilogramos por hectárea un 13 % menos que en la zafra anterior cuando se alcanzó un rendimiento de 2.171 kg/ha sembrada. Si observamos los resultados de las últimas 12 zafras (figura 1.6), este rendimiento es uno de los más bajos junto con las campañas 2010/11 y 2017/18 (Couto et al., 2021).



Fuente: MGAP-DIEA Encuesta Agrícola

Figura 1. 6. Área sembrada de soja (miles de hectáreas), producción (toneladas) y rendimiento de grano seco (kg/h) en función del año, período 2009-2021 (DIEA, Couto et al., 2021).

Las causas de esta variabilidad en el rendimiento pueden responder a factores abióticos como los climáticos, así como a factores bióticos debido a la presencia de enfermedades e insectos plaga, que afectan tanto durante la implantación como en los diferentes estadios de desarrollo del cultivo. Flores y Balbi (2014) determinaron que el desarrollo de

ciertas enfermedades estaba favorecido por el método de la siembra directa. La falta de remoción de rastrojos y su acumulación, característicos del método, provocan el incremento de la humedad en la superficie de los suelos favoreciendo el desarrollo de hongos fitopatógenos, que afectan la salud de las plantas. Las principales fuentes de inóculo de estos hongos fitopatógenos son: el ya mencionado rastrojo, las propias semillas contaminadas, y el suelo. Esporas del aire provenientes de otros cultivos y/o malezas pueden también ser fuentes de inóculo de estos hongos.

### 1.3.2 LA IMPORTANCIA DE LA SIMBIOSIS CON RIZOBIOS

El cultivo de soja cubre sus requerimientos de nitrógeno a través del aporte del suelo y fijación biológica del nitrógeno atmosférico (FBN). La FBN se realiza a partir de la asociación simbiótica de las leguminosas y un grupo de bacterias diazótropas llamadas “rizobios”. La asociación simbiótica se manifiesta en la raíz con estructuras especializadas llamadas nódulos donde ocurre la FBN (ver Figura 1.7)



Figura 1. 7. Sistema nodular de la raíz de soja.

<https://asb.com.ar/cultivos/soja/raices-nodulos/>

A los efectos de utilizar todo el potencial de la relación simbiótica entre los rizobios y las leguminosas, es que se han aislado, seleccionado y desarrollado inoculantes con cepas de rizobios eficientes en la FBN, específicas para cada tipo de leguminosa de interés agrícola. Uruguay implementó en la década de 1960 una política pública denominada

“Programa de Fijación Biológica del Nitrógeno” del Departamento de Microbiología de Suelos, con el objetivo de estudiar la importancia de la inoculación con rizobios en los establecimientos agropecuarios, así como su impacto en la productividad y persistencia de las leguminosas forrajeras en el país (Labandera, 2005). Aunque este programa ya no está vigente, Uruguay cuenta actualmente con un Sistema de Control de Calidad de Inoculantes y un listado oficial de inoculantes autorizados por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). Las únicas cepas autorizadas comercialmente para la inoculación en soja son *Bradyrhizobium elkanii* U1301 y U1302.

Según Salvagiotti et al. (2008), el cultivo de soja requiere, en promedio, aproximadamente 80 kg de nitrógeno (N) para producir una tonelada de grano, con un rango que varía entre 53 y 156 kg de N por tonelada. Estas variaciones dependen de factores como las condiciones del suelo, prácticas de manejo y eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno. En chacras sin historia previa de soja, la respuesta a la inoculación con rizobios es significativa, con incrementos en el rendimiento cercanos a 900 kg/ha. Estos aumentos se acompañan de un mayor peso de los granos y un incremento en los porcentajes de proteína tanto en las hojas como en los granos. Es importante destacar que, en cultivos continuos de soja, la respuesta a la inoculación es menor, pero se sigue recomendando esta práctica (Labandera, 2003). Actualmente, la inoculación con rizobios autorizados es una práctica ampliamente extendida en Uruguay, respaldada por el Sistema de Control de Calidad de Inoculantes del MGAP.

El proceso de acumulación de nitrógeno en el cultivo de soja es lento durante las primeras etapas de desarrollo, pero se acelera significativamente desde el inicio de la floración hasta la finalización del llenado de granos. La fijación biológica de nitrógeno (FBN) puede dividirse en tres etapas principales. En la primera etapa, que abarca desde la emergencia hasta aproximadamente los 30 días, el aporte de la FBN es mínimo debido al desarrollo inicial de los nódulos, los cuales aún tienen una funcionalidad limitada. Durante este período, la mayor parte del nitrógeno proviene del suelo. En la segunda etapa, que comienza después de los 30 días, el sistema nodular alcanza su máxima actividad, lo que permite la mayor acumulación de nitrógeno en el cultivo. Esta etapa es crucial para satisfacer las necesidades de nitrógeno durante las fases más demandantes del desarrollo de la planta (Salvagiotti et al., 2009). La tercera etapa de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en el cultivo de soja se inicia con el comienzo del llenado de granos, correspondiente al estadio fenológico R5. Durante esta fase, los granos se

convierten en el principal destino del carbono y los nutrientes dentro de la planta, relegando a los nódulos a un papel secundario (Salvagiotti et al., 2009).

Los inoculantes rizobianos han experimentado más de seis décadas de desarrollo y optimización, sin embargo, el proceso de aplicación a las semillas continúa enfrentando limitaciones que afectan la viabilidad de los rizobios (Labandera, 2005). Dentro de las causas se encuentran: a) el tiempo entre la inoculación y la siembra, siendo necesario inocular las semillas pocos días previos a la siembra, proceso que no siempre se cumple debido a razones logísticas y operativas como la escasez de mano de obra entre otras b) la preparación del inoculante con agua de mala calidad y la falta de constancia en el uso de antidesecantes (Deaker et al., 2012, Deaker et al., 2007). c) el tratamiento de las semillas con fitosanitarios (*curasemillas*) para evitar las plagas de implantación, (Beyhaut & Sicardi, 2012). Cualquier bioinsumo diseñado para soja debe considerar la compatibilidad con los rizobios autorizados para el cultivo y no intervenir en el proceso de nodulación del cultivo.

### **1.3.3 ENFERMEDADES DE IMPLANTACIÓN CAUSADAS POR FITOPATÓGENOS**

El rendimiento del cultivo se ve afectado por factores bióticos y abióticos. Dentro de los factores bióticos se encuentran las enfermedades de implantación. Según Gally (2006), las enfermedades del cultivo de soja son responsables en gran parte de la reducción del rendimiento (kg de grano/ área sembrada), de la pérdida de la producción, así como también afectan la calidad del producto. Este efecto es explicado por la acción de hongos, bacterias, virus y nematodos fitopatógenos (Sorhouet & Souza, 2019). Las enfermedades de implantación causan: reducción de la densidad en el establecimiento y defectos en la distribución de las plantas o pérdida de área (Figura 1.8).

Las plántulas a menudo no crecen o mueren poco después de haber emergido del suelo. Las semillas pueden pudrirse antes de germinar, los brotes pueden descomponerse antes de emerger o los tallos de las plántulas pueden ser atacados cerca de la línea del suelo, causando el colapso de las plantas jóvenes. Estas enfermedades a menudo se denominan colectivamente “*damping-off*” y pueden ser causadas por una serie de patógenos que habitan en el suelo y/o acompañan a la semilla. A nivel mundial las pérdidas ocasionadas por estos oscilan entre el 10 y el 15% (Ivancovich, 2013; Arrua et al., 2021).



**Figura 1. 8. Reducción de la densidad y pérdida de área sembrada, debido a enfermedades de implantación. (Perez, 2015)**

Dentro de los patógenos responsables de las enfermedades “*damping-off*” (Tabla 3) se encuentran las especies *Pythium* spp., *Phytophthora sojae*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp. entre otros (Stewart & Rodríguez, 2016). Estos pueden actuar de manera individual o en forma conjunta como un complejo, lo que hace muy difícil su control (Urrea et al., 2013). Estudios realizados por Rizvi & Yang, (1996) en Iowa, reportan las especies de *Pythium* spp., *Phytophthora sojae*, y *Rhizoctonia solani* como principales causas de las enfermedades de las plántulas de soja. Así mismo recientemente, *Fusarium graminearum* se identificó como un patógeno de soja (Ellis et al., 2011).

En estudios realizados por Wall, (1983), a nivel de laboratorio, simulando condiciones de humedad y temperatura, con semillas dañadas mecánicamente, se demostró que la colonización por especies de hongos de *Pythium* y *Fusarium* fue elevada, con temperaturas superiores a 15 °C, más aún con un rango de entre 20 a 25 °C. Al igual que niveles superiores al 20% de humedad en el suelo, hasta 35, no tuvieron diferencias en la colonización de los patógenos. Los curasemillas con los principios activos metalaxil y mefenoxam se usan para el control de *Pythium* y *Phytophthora* y los bencimidazoles para *Fusarium*.

Tabla 1. 4. Fuentes de inóculo de fitopatógenos del cultivo de soja.

<i>Fuente de inóculo</i>	<i>Patógenos</i>	<i>Referencia</i>
<b><i>Semilla</i></b>	<i>Fusarium spp.</i> <i>Diaporthe/Phomopsis</i> <i>Colletotrichum truncatum</i> <i>Cercospora kikuchii/sojina Cladosporium spp.</i> <i>Alternaria spp.</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Pseudomonas savastanoi pv. Glycinea</i> <i>Xanthomonas axonopodis pv. Glycines</i> <i>Otros</i>	<i>Gally 2006</i>
<b><i>Condiciones de almacenamiento</i></b>	<i>Penicillium spp.</i> <i>Aspergillus spp.</i>	<i>Gally 2006</i>
<b><i>Suelo</i></b>	<i>Pythium spp.</i> <i>Phytophthora sojae</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Fusarium spp.</i>	<i>Stewart y Rodriguez 2016</i>
<b><i>Rastrojo</i></b>	<i>F. graminearum</i> <i>Cercospora kikuchii/sojina Cladosporium spp.</i> <i>Pseudomonas savastanoi pv. Glycinea</i> <i>Xanthomonas axonopodis pv. Glycines</i> <i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Sorhouet 2019</i> <i>Stewart y Rodriguez 2016</i>

La Tabla 1.4 muestra la fuente de inóculo de fitopatógenos responsables de las enfermedades de implantación.

A continuación, se presenta una breve descripción de los signos de enfermedad y condiciones óptimas de desarrollo de tres de los géneros de microorganismos fitopatógenos responsables de “Damping off” en soja.

### 1.3.3.1 *Fusarium spp.*

Varias especies de *Fusarium* son responsables de las enfermedades de implantación; *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. pallidoroseum*, *F. rigidiusculum*, *F. solani*, *F. sporotrichioides*, y *F. tricinctum*. Las semillas infectadas pueden presentar coloraciones rojizas, la germinación se ve demorada y reducida. Las condiciones predisponentes para que este hongo afecte la germinación, dependen de la especie en cuestión, pero en general prefiere las temperaturas cálidas de más de 25° C y alta humedad. (Stewart 2013).

### **1.3.3.2 *Rhizoctonia* spp.**

Las plántulas afectadas con *Rhizoctonia*, presentan una lesión rojiza en el hipocótilo a la altura de la línea del suelo y puede abarcar todo el diámetro del tallo de la planta de soja. Las temperaturas óptimas para la infección de *Rhizoctonia* son entre 26 y 32°C. La población en el suelo de este patógeno se reduce en condiciones de anegamiento prolongado o bajo riego. Suelos arenosos y aireados favorecen la enfermedad (Stewart & Rodríguez, 2013).

### **1.3.3.3 *Pythium* spp.**

Cuando el agente causal es *Pythium*, las especies involucradas son generalmente *P. ultimum*, *P. debaryanum*, *P. irregulare* y *P. aphanidermatum*. Los cotiledones pueden mostrarse engrosados y malformados. Las plántulas al llegar al estado V2 (primera hoja trifoliada desarrollada) se vuelven resistentes a la infección, pues se comienza a formar tejido leñoso, pero igual pueden morir si la infección fue previa y no desarrollaron raíces secundarias. Suelos anegados favorecen la infección de *Pythium*, mientras que las temperaturas óptimas dependen de la especie en cuestión. Las primeras dos especies arriba mencionadas tienen su óptimo entre 10 y 15°C, *P. irregulare* entre 20 y 30°C, y la última entre 30 y 36°C (Stewart & Rodríguez, 2013).

## **1.4 *Metarhizium* EN SOJA**

Existen estudios que demuestran que *Metarhizium* podría utilizarse como organismo benéfico para el cultivo de soja. Prueba de ello es el trabajo sobre resistencia a estrés salino realizado por Khan et al. (2012). En el mismo se registró un aumento de la longitud, la biomasa fresca y seca de los brotes, del contenido de clorofila, de la tasa de transpiración, de la tasa fotosintética y del área foliar de las plantas de soja inoculadas con *Metarhizium* bajo condiciones de estrés. Los autores encuentran que las interacciones de los hongos endófitos con la soja pueden ser beneficiosas para mejorar la calidad y cantidad de la soja bajo sistemas agrícolas afectados por la sal. Esto lo demostraron mediante la detección de contenidos reducidos de ácido abscísico y elevados de ácido jasmónico en las plantas de soja inoculadas con *M. anisopliae* bajo estrés por salinidad. También se encontró contenidos de isoflavonoides (IF) significativamente más altos en plantas de soja inoculadas con *M. anisopliae*.

Kepler et al. (2015) encontraron un mayor número de ufc de *Metarhizium* en parcelas de campo con cultivo de soja en comparación con el maíz o la alfalfa, y la mayoría de los aislamientos utilizados en su estudio filogenético fueron identificados como *M. robertsii*. Lo que podría sugerir que *M. robertsii* podría ser compatible con el cultivo de soja e incluso tener algún tipo de asociación simbiótica.

*M. anisopliae* no es la única especie de *Metarhizium* capaz de vivir como endófito en la planta de soja. En un estudio de Clifton et al. (2018), se demostró que *M. brunneum* colonizó endofíticamente el tallo de soja. Sin embargo, en ese estudio las plantas de soja inoculadas con *M. brunneum* presentaron un aumento de susceptibilidad al pulgón de la soja (*Aphis glycines* Matsumura).

## 1.5 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

**Hipótesis:** Existe al menos una cepa de *Metarhizium spp.* que ejerce una acción biocontroladora frente a fitopatógenos responsables de enfermedades de implantación en soja y que, al asociarse con la planta, no interfiere en la simbiosis rizobiana con *B. elkanii*.

**Objetivo General:** Caracterizar y seleccionar cepas de *Metarhizium spp.* compatibles con *B. elkanii*, con capacidad biocontroladora frente a fitopatógenos responsables de enfermedades de implantación en soja, para contribuir al desarrollo de un bioinsumo que mejore el estado fitosanitario del cultivo.

Este objetivo general puede traducirse en dos **objetivos específicos (OE 1 y OE 2)**

**OE 1:** Caracterizar los aislamientos de *Metarhizium spp.* según su compatibilidad con *B. elkanii*, su capacidad de asociación con la planta de soja y su eficiencia en la bioproducción de conidios mediante procesos de fermentación en sustrato sólido.

**OE 2:** Evaluar y seleccionar cepas de *Metarhizium spp.* según su eficacia en el biocontrol de fitopatógenos responsables de enfermedades de implantación en soja, garantizando que no interfieran con la nodulación mediada por *B. elkanii*.

La Tabla 1.5 resume los objetivos específicos del presente trabajo junto con las actividades experimentales realizadas para alcanzarlos.

**Tabla 1. 5. Objetivos específicos y las actividades relacionadas.**

<i>Objetivos específicos</i>	<i>ACTIVIDADES</i>
<b>OE 1</b> <i>Estudio de Compatibilidad y Asociación</i>	<p><i>Producción de Metarhizium spp. conidios por fermentación en sustrato Rizocompatibilidad. Capacidad de Metarhizium de adaptarse al medio: exudado de raíz de soja.</i></p> <p><i>Determinación de endofitismo fúngico por microscopía de fluorescencia confocal</i></p> <p><i>Determinación de la capacidad endofítica de Metarhizium a partir del cultivo de fragmentos de raíz en medio selectivo.</i></p> <p><i>Determinación de presencia de Metarhizium en rizosfera.</i></p> <p><i>Compatibilidad in vitro de Metarhizium spp. &amp; Bradyrhizobium elkanii. Cultivos duales.</i></p> <p><i>Compatibilidad in planta de Metarhizium spp. &amp; Bradyrhizobium elkanii</i></p>
<b>OE 2</b> <i>Estudio de Biocontrol</i>	<p><i>Antagonismo de Metarhizium spp. frente a patógenos, cultivos duales.</i></p> <p><i>Germinación y emergencia de soja inoculada con Metarhizium spp., en suelo con alto índice de patogenicidad.</i></p> <p><i>Biocontrol de hongos fitopatógenos in planta.</i></p>

## **CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Los microorganismos utilizados en este trabajo incluyen: trece aislamientos de *Metarhizium* spp., cuatro fitopatógenos de la colección de Bioinsumos de INIA Las Brujas y dos cepas de rizobios habilitadas por el MGAP para biofertilización del cultivo de soja. En la tabla 2.1. se muestra las especies, su número de colección asignado, cepa y origen de los microorganismos. Las cepas de hongos entomopatógenos de esta colección fueron obtenidas a partir de insectos y larvas de *Diloboderus abderus* (12 cepas) y *Cydia pomonella* (la cepa restante), todas ellas recolectadas de los departamentos de Colonia y Canelones de Uruguay (tabla 2.1).

Tabla 2. 1. Lista de material biológico utilizado en el presente trabajo

Identificación	Especie	Origen	Lugar geográfico
ILB167	<i>Metarhizium robertsii</i>	<i>D. abderus</i> (isoca)	Ruta 3 Km 188
ILB173	<i>Metarhizium lepidiotae</i>	<i>D. abderus</i> (isoca)	Ovinos (Colonia)
ILB179	<i>Metarhizium lepidiotae</i>	<i>D. abderus</i> (isoca)	Ovinos (Colonia)
ILB182	<i>Metarhizium frigidum</i>	<i>D. abderus</i> (isoca)	Ovinos (Colonia)
ILB184	<i>Metarhizium flavoviride</i>	<i>D. abderus</i> (isoca)	Ovinos (Colonia)
ILB185	<i>Metarhizium frigidum</i>	<i>D. abderus</i> (isoca)	Ovinos (Colonia)
ILB189	<i>Metarhizium flavoviride</i>	<i>D. abderus</i> (isoca)	Ovinos (Colonia)
ILB221	<i>Metarhizium lepidiotae</i>	<i>D. abderus</i> (isoca)	Ovinos (Colonia)
ILB222	<i>Metarhizium lepidiotae</i>	<i>D. abderus</i> (isoca)	Ovinos (Colonia)
ILB223	<i>Metarhizium lepidiotae</i>	<i>D. abderus</i> (isoca)	Ovinos (Colonia)
ILB225	<i>Metarhizium lepidiotae</i>	<i>D. abderus</i> (isoca)	Ovinos (Colonia)
ILB232	<i>Metarhizium lepidiotae</i>	<i>Cydia pomonella</i>	Canelones
ILB440	<i>Metarhizium robertsii</i>	<i>D. abderus</i> (isoca)	Canelones
ILB317	<i>Pythium ultimum</i>	<i>G. max</i> N5909	Colonia +
ILB323	<i>Pythium sylvaticum</i>	<i>G. max</i> N5909	Colonia +
ILB332	<i>Fusarium graminearum</i>	trigo	Treinta y Tres **
ILB428	<i>Rhizoctonia oryzae</i>	-	Colonia +
U1301*	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>G. max</i>	Brasil
U1302*	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>G. max</i>	Brasil

ILB: aislamientos de hongos de la colección del laboratorio de Bioinsumos de INIA Las Brujas.

(\*) Cepas de rizobios recomendadas por el MGAP de la colección del Laboratorio de Suelos de INIA Las Brujas. (+) INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay. (\*\*) INIA Treinta y Tres, Uruguay.

Las cepas *Pythium ultimum* y *Pythium sylvaticum* (tabla 2.1) fueron provistas por la Dra. Silvina Stewart de INIA La Estanzuela (Abreo et al., 2017). conservadas en la colección de INIA Las Brujas (*P. ultimum* ILB317 y *P. sylvaticum* LB323). Las cepas de *Rhizoctonia oryzae* y *Fusarium graminearum* (tabla 2.1) fueron provistas por el Dr. Sebastián Martínez (INIA Treinta y Tres) y la Dra. Silvia Pereyra (INIA La Estanzuela) respectivamente, ambas conservadas en la colección INIA Las Brujas (ILB428 e ILB332) (Olivera Alegre, 2023).

En los distintos experimentos se utilizaron variedades comerciales de soja *Glycine max* Nidera 5909 y Génesis 5602.

Los diferentes experimentos realizados requirieron de suspensiones de conidios de concentraciones conocidas de los trece aislamientos de *Metarhizium* spp., inóculos líquidos y sólidos de cuatro fitopatógenos e inóculos de rizobios. A continuación, se describirán todas las técnicas de cultivo utilizadas.

### **2.1.1 Cultivo en placas de agar-papa-dextrosa**

Se cultivaron en placas de Petri de 9,0 cm de diámetro con agar-papa-dextrosa (PDA) los trece aislamientos de *Metarhizium* de la tabla 2.1., mediante la siguiente técnica: Primeramente, con un ansa y de forma aséptica se retiraron fragmentos de los aislamientos con gran presencia de conidios y masa fúngica de los tubos de pico de flauta de la colección, y se suspendieron en 1mL de Tritón X-100 0,01% estéril en un tubo eppendorf. Luego de agitar el tubo con vórtex, se procedió a sembrar por extensión la placa en cámara de flujo laminar, distribuyendo 100 µL de la suspensión con rastrillo en la superficie del PDA. Se sembraron para cada aislamiento de 5 a 6 placas, y se guardaron a 24 °C en incubadora luz:oscuridad (12:12 h).

El tiempo de incubación varió desde 14 a 21 días, dependiendo de la tasa de crecimiento de las colonias y la maduración de los conidios de cada aislamiento. Para determinar el momento de cosecha de conidios se tuvo en cuenta el color verde oliva y verde oscuro como indicadores de madurez y la observación al microscopio de estos. La cosecha de conidios se realizó con una varilla de vidrio y se suspendieron en 3 a 5 mL de Triton X-100 0,01% estéril en cámara de flujo laminar.

Cada suspensión de conidios obtenida mediante la técnica descrita se guardó en tubo Falcon estéril de 15 mL, con cinco perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro, a 4 °C hasta

su utilización. Tiempo de almacenamiento de 10 a 21 días. La concentración de conidios se determinó utilizando una cámara de Neubauer mejorada, y una vez determinada se ajustó según el diseño de cada experimento.

La siembra en placas de Petri con PDA de los cuatro fitopatógenos se realizó a partir de fragmentos de las colonias guardadas en picos de flautas con PDA de la colección de INIA. Se incubaron a 26 °C en un período de tiempo de cultivo de dos días para *P. ultimum* ILB317 y *P. sylvaticum* ILB323, y cinco días para *Fusarium* sp. ILB332 y *R. orizae* ILB428, tiempo requerido para que la colonia ocupe toda la placa. Las mismas se guardaron en heladera a 4 °C. A partir de estas placas guardadas sembraron nuevas antes de cada experimento. Para ello se extrajo una porción de micelio con un sacabocados (de 0,5 cm de diámetro) del borde de la colonia y se sembró en el centro de una nueva placa de PDA y se cultivó en las mismas condiciones.

### **2.1.2 Preparación de suspensión de células de *B. elkanii***

Las dos cepas de *B. elkanii* (Tabla 2.1), se cultivaron en un medio líquido de enriquecimiento Triptofano-extracto de levadura (TY, Anexo A) a 27 °C en agitación constante de 180 rpm. El cultivo se dejó incubando 2 a 3 días hasta llegar a una densidad óptica de 0,6 aproximadamente, correspondiente a una concentración cercana a  $10^{10}$  células de rizobios/mL (medida por espectrofotómetro). Luego se realizaron cuatro diluciones seriadas de 1/10 con solución salina al 0.85 %. La dilución menor,  $10^6$  células de rizobios/mL, es la que se utilizó para el experimento de cultivos duales en placa.

### **2.1.3 Cultivo líquido de fitopatógenos**

El cultivo líquido de fitopatógenos se hizo inoculando matraces baffled conteniendo caldo de papa-dextrosa (PDB), con diez porciones de micelio de *Fusarium* provenientes de placas de PDA. Los mismos se incubaron en oscuridad a 24 °C en agitación 180 rpm durante 10 días. La producción de *Pythium* y *Rhizoctonia* se realizó en PDB y glucosa, incubándose a 22 °C en oscuridad en agitación 200 rpm. El tiempo de incubación fue de 7 días para *Rhizoctonia* y 5 días para *Pythium*. La figura 2.1 muestra la producción en cultivo líquido resultado de esta metodología.



**Figura 2. 1. Cultivo líquidos de hongos fitopatógenos.** De izquierda a derecha: *R. orizae* ILB428; *Fusarium* sp. ILB332; *P. ultimum* ILB317 y *P. sylvaticum* ILB323. Foto: Elaboración propia.

#### 2.1.4 Fermentación en sustrato sólido

La producción en masa de hongos entomopatógenos se realizó en el sustrato: arroz parboiled hidratado variación de la metodología presentada por Alcantara-Vargas et al. (2020). Se colocó 60g de arroz en bolsas de autoclavables con un anillo de metal en la boca de la bolsa sujetado con cinta. Se le agregó 60 mL de agua tibia destilada y se dejó en reposo por unos 20 - 30 minutos, con el objetivo de hidratar el grano de arroz. Luego se taparon las bolsas con un tapón de algodón envuelto en gaza y capuchón de aluminio, y se esterilizaron a 121 °C en autoclave por 15 minutos. Las bolsas de arroz se inocularon con 6 mL de suspensión  $1 \times 10^6$  conidios/mL de Tritón X-100 al 0,01 % de cada uno de los trece aislamientos de *Metarhizium*. Las bolsas inoculadas se dejaron incubando a 25 °C. A partir de las 48 h. se procedió a disgregar los granos de arroz para aumentar la superficie de contacto del grano con el inóculo. El proceso de producción se consideró finalizado, cuando el arroz quedó homogéneamente cubierto por el color típico de los conidios de cada aislamiento de *Metarhizium*, un color verde oliva o verde oscuro/café según la especie (ver Figura 2.2).



**Figura 2. 2. Producción de conidios por fermentación en sustrato sólido.** Se puede observar bolsas de arroz con micelio blanco de *Metarhizium* con poco desarrollo de conidios a la izquierda, y bolsas a la derecha con el color verde oliva característico de los conidios maduros.

Los fitopatógenos también fueron sembrados en arroz, utilizando 10 mL de inóculo líquido de fitopatógenos, para inocular bolsas con 300 g de arroz y 300 g de agua previamente autoclavadas. Las bolsas se mantuvieron en cámara a 26 °C en oscuridad, siguiendo la técnica utilizada para la producción de *Metarhizium*. El tiempo de incubación dependió del patógeno: 10 días para *Fusarium*, 8 días para *Rhizoctonia* y 6 días para *Pythium*. Una vez que la bolsa quedó cubierta completamente por el micelio del hongo se guardó en heladera a 4°C.

Para la cosecha de conidios de *Metarhizium* fermentado en arroz, se colocó el contenido de cada bolsa en matraz de 250 mL estéril, y se agregó 120 mL de Tritón X-100 0,01 % (ver Figura 2.3), procedimiento realizado en cámara de flujo laminar. Los matraces tapados, se colocaron en agitación a 200 rpm a 4 °C durante una hora. Posteriormente se filtró la suspensión de conidios con una gasa estéril, obteniéndose un volumen de 60 a 70 mL de suspensión. Las suspensiones se almacenaron en tubos Falcon de 50 mL en heladera a 4 °C. Los conidios de las suspensiones se cuantificaron al microscopio en cámara de Neubauer.



**Figura 2. 3. Cosecha de conidios del arroz con solución de Triton X-100.**  
Se muestra los matraces con las suspensiones de arroz cubiertos de conidios en Tritón X-100 0,01 %, antes del filtrado. Foto: *Elaboración propia*

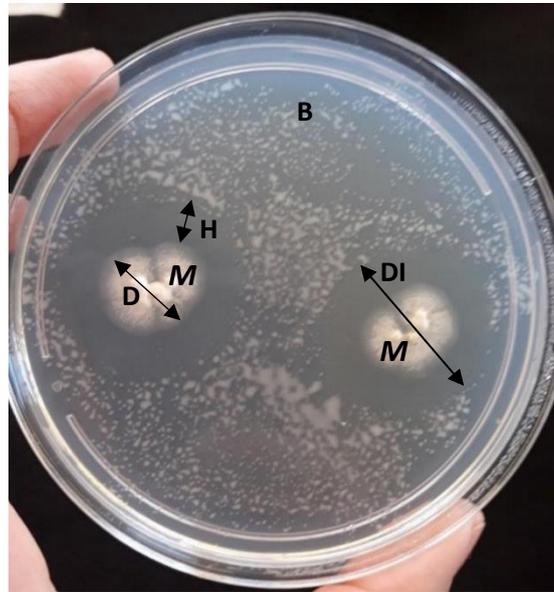
## 2.2 COMPATIBILIDAD DE *Metarhizium* spp. CON RIZOBIOS

### 2.2.1 ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD DE *Metarhizium* spp. Y *Bradyrhizobium elkanii* EN CULTIVOS DUALES

Se siembra por extensión en placas en un medio sólido de extracto de levadura y manitol (EMA, Anexo A), 100  $\mu\text{L}$  de  $10^6$  células de rizobios/mL de cada cepa de *B. elkanii* (U1301 y U1302), cultivadas como se indica en la sección 2.2.2. Las placas inoculadas, se dejaron en reposo por cuatro horas en cámara de flujo laminar, para fijar las células de los rizobios a la superficie del medio sólido. Posteriormente, se sembraron 5  $\mu\text{L}$  de suspensión de conidios de  $1 \times 10^4$  conidios/mL de uno de los aislamientos de *Metarhizium*, en dos puntos de la placa ubicados a 2,3 cm del centro. Se inocularon tres placas de cultivos duales, por cada uno de los trece aislamientos de *Metarhizium*. Se hicieron controles por triplicado de las cepas de rizobios y de cada uno de los trece aislamientos de *Metarhizium*. Todas las placas se incubaron por 7 días a 27 °C. La Figura 2.4 muestra una placa de cultivo dual donde se puede observar dos colonias grandes de un aislamiento de *Metarhizium* ILB440 rodeadas por una zona translúcida sin crecimiento de rizobios (correspondientes a las colonias pequeñas blancas de *B. elkanii* distribuidas en toda la placa). El experimento completo se repitió tres veces.

Una vez cumplido el tiempo de incubación se determinó el tamaño de la colonia de *Metarhizium* a partir de la medida de su diámetro (D). La medida D, es un promedio de los diámetros de las dos colonias de *Metarhizium* por placa (Figura 2.4). Luego se mide el espacio de inhibición de crecimiento de las colonias de los rizobios, correspondiente al espacio translúcido alrededor de cada colonia de *Metarhizium* por placa, es decir el halo de inhibición (H). La obtención del valor H se realiza a partir de la diferencia del diámetro

máximo de la zona de inhibición de rizobios (DI) y D (Figura 2.4.) de cada placa (unidad experimental).



**Figura 2. 4.** Placa de Petri de cultivo dual de *B. elkanii* U1301 y dos colonias de *Metarhizium* ILB440. (B)- *B. elkanii* U1301 colonias. (M)- Colonia de *Metarhizium robertsii* ILB440. (D)- Diámetro de la colonia de *Metarhizium*. (DI)- Diámetro de inhibición. (H)- Halo de inhibición (doble flecha). Foto: Elaboración propia.

## **2.2.2 COMPATIBILIDAD IN PLANTA DE *Metarhizium* spp. Y *Bradyrhizobium elkanii***

El estudio de compatibilidad *in planta* se realizó a partir de la siembra en macetas, con arena fina y gruesa estéril, de semillas de soja recubiertas con conidios de cuatro aislamientos de *Metarhizium* spp. e inóculo de *B. elkanii*.

### **2.2.2.1 Recubrimiento de semillas**

El recubrimiento de semillas de soja se efectuó con un adherente comercial en polvo, una suspensión de conidios de uno de cuatro aislamientos de *Metarhizium* seleccionados

(ILB167, ILB173, ILB184 e ILB223) y un inoculante líquido comercial de rizobios. El procedimiento consistió en dos etapas:

- 1) Preparación del adherente con inóculo, en la proporción: 0.117 g del adherente en polvo (según indicaciones del fabricante) y 5 mL de suspensión de conidios de  $1,4 \times 10^8$  conidios/mL de no más de 10 días de cosecha. Se preparó, además, adherente disuelto en 5 mL de agua destilada estéril sin *Metarhizium* (control).
- 2) Recubrimiento de semillas con el adherente y el inóculo. Para ello se colocaron 100 g de semillas en bolsas de polipropileno, a las que se les añadió 300  $\mu$ L de adherente e inmediatamente 300  $\mu$ L de inoculante líquido de *B. elkanii* lote 1301 (09/2019) conteniendo  $1,3 \times 10^{10}$  ufc/mL. Se mezcló todo en forma manual vigorosamente por aproximadamente 4 min.

El control de inoculación se realizó según protocolo de MGAP para semillas preinoculadas. Para ello se sembraron 100  $\mu$ L de las diluciones: (-3) y (-2) en medio para rizobios de extracto de levadura-manitol-agar (EMA) y diluciones: (0) y (-1) en medio PDA para *Metarhizium*. Las placas de EMA se dejaron en incubación a 28°C por 7 días y las de PDA a 26 °C por 5 días. El medio de PDA se preparó con cloranfenicol esterilizado por filtrado (0.1 g de cloranfenicol para 200 mL de medio autoclavado). Las semillas fueron almacenadas en heladera a 4 °C y se repitió control de calidad a las 72 h. Se realizó otro control de inoculación en PDA a los 6 días. Con este mismo medio selectivo se realizó un control de las suspensiones iniciales o suspensiones madre. Los resultados del control de inoculación se pueden ver en el Anexo 1.

#### **2.2.2.2 Crecimiento de las plantas con *Metarhizium* y rizobios**

El experimento contó con cinco tratamientos de las semillas: 1-*M. robertsii* ILB167. 2-*M. lepidiotae* ILB173. 3- *M. frigidum* ILB184 4- *M. lepidiotae* ILB223 y 5- un control sin *Metarhizium*. Todos los tratamientos contenían inóculo de *B. elkanii* U1301. Se sembraron cuatro semillas de tratamiento por vaso de 250 mL conteniendo arena fina y gruesa estéril en la proporción 1:1. Se destinaron cuatro vasos para cada tratamiento. Los vasos fueron distribuidos de forma aleatoria en una mesa en invernáculo a 26 °C, y se dejaron crecer durante dos meses. Luego se realizó un conteo de nódulos por planta, y se midió el peso seco de nódulos, de raíz y parte aérea. El mismo día se realizó un control de inoculación según protocolo de MGAP (ver resultados en la sección 3.2).

## **2.3 COMPATIBILIDAD Y ASOCIACIÓN CON LA PLANTA DE SOJA**

Varios de los experimentos de compatibilidad y de asociación con la planta de soja, se realizaron con semillas recubiertas con la siguiente metodología:

### **2.3.1 Recubrimiento de semillas con adherente comercial con conidios**

El recubrimiento se realizó en 100 g de semillas esterilizadas superficialmente de marca comercial Nidera 5909 y 100 g de Génesis 5602. Estas fueron recubiertas con una mezcla de 3.5 mL de una solución de adherente comercial utilizado para rizobios (Bioprotector Add-it) y 500 µL de suspensión cercana a  $1 \times 10^8$  conidios/mL de dos aislamientos de *Metarhizium robertsii* ILB167 e ILB440.

Se realizó un control del recubrimiento mediante el recuento de unidades formadoras de colonia (ufc) de las suspensiones de conidios antes y después del recubrimiento: 1) se pusieron 90 semillas en 90 mL de solución 0,85 % y Tween 0,02 % se agitó por una hora, 2) Se sembraron en placas de PDA las diluciones (-1), (-2) y (-3) por triplicado, 3) Se cuentan las colonias a los 3 días y se compara con el recuento de la solución antes de recubrir las semillas.

### **2.3.2 DETERMINACIÓN DE PRESENCIA DE *Metarhizium* EN RIZOSFERA**

Seis semillas recubiertas (ver sección 2.2.2.1) se sembraron en macetas de 1 Kg con turba y arena en la proporción 1: 3, en invernáculo a 21 °C (mínimo 14 °C y máximo 28 °C). Se prepararon seis tratamientos por duplicado: i) semillas N5909 con *Metarhizium robertsii* ILB167; ii) semillas G5602 con *M. robertsii* ILB167; iii) semillas N5909 con *M. robertsii* ILB440; iv) semillas G5602 con *M. robertsii* ILB440; v) Control de N5909; y vi) Control de G5602.

Las macetas se distribuyeron de forma aleatoria en el invernáculo y se regaron con agua de lluvia. Cada maceta se inoculó con 6 mL de una solución de 1/10 en solución salina al 0,85 % de inoculante rizobiano de  $1,5 \times 10^{10}$  rizobios/mL de las cepas comerciales autorizadas. A los 10 días se comenzó con el agregado de 50 mL de solución nutritiva por maceta por semana, y se dejaron cuatro plántulas por maceta, las cuales se cosecharon a los 39 días. De cada maceta se utilizaron: a) dos raíces para la búsqueda de *Metarhizium*

en la rizosfera; b) y esas mismas dos raíces para la localización de *Metarhizium* en raíz por el método de microscopía confocal de fluorescencia, y finalmente: c) dos raíces para la búsqueda de endofitismo por el método de fragmentos de raíz en placa con un medio selectivo de *Metarhizium*.

Las raíces de las plantas cultivadas fueron raspadas cuidadosamente con un bisturí para extraer la rizosfera. Esta se pesó y luego se suspendió en Tritón-100x al 0,01 % y Cloranfenicol (0,5 g/L). Luego de la agitación en vortex se hicieron diluciones: (-1), (-2) y (-3). Se sembraron 100 µL de cada dilución en placas de MSM por triplicado. Las placas se dejaron en incubadora a 25 °C durante siete días. Cumplido el plazo se hizo el recuento de colonias similares a *Metarhizium robertsii* ILB167 e ILB440.

### **2.3.3 CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Metarhizium* spp. EN EXUDADOS DE RAÍZ DE SOJA**

El crecimiento de *Metarhizium* en exudados de raíz fue medido mediante un método espectrofotométrico. Los materiales para este experimento fueron: suspensión de conidios de los trece aislamientos, exudados de raíz de soja estéril, caldo de papa-dextrosa estéril (PDB por sus siglas en inglés) y espectrofotómetro (BioTek, modelo: Synergy H1 Multi-Mode Reader). La composición de los medios de cultivo utilizados detalla en Anexo A.

#### **2.3.3.1 Producción de exudado de raíz**

Las semillas de soja N5909 fueron primeramente esterilizadas superficialmente utilizando el procedimiento de Martinez & Wang (2009) con algunas modificaciones. Se colocaron aproximadamente 100 g de semillas de soja en un vaso de precipitados de 500 mL junto con una barra de agitación. Luego se añadió etanol (95 %) en agitación velocidad media 30 segundos. Se dejó decantar el alcohol y las semillas se lavaron con agua estéril. Después del primer lavado, se añadió HClO<sub>4</sub> (3 %) en agitación a velocidad media por dos minutos y se enjuagó cinco veces con agua destilada estéril. Finalmente se dejaron secar en toallas de papel estériles en cámara de flujo laminar.

Los exudados radiculares se obtuvieron siguiendo la metodología descrita por Wyrebek et al. (2011) con modificaciones menores: cinco semillas de soja esterilizadas superficialmente se transfirieron a un matraz Erlenmeyer (250 mL) que contenía 50 mL de agua estéril. El matraz se cerró con tapones de algodón estériles para evitar la

contaminación y permitir la transferencia de gases. Los matraces se mantuvieron en un agitador orbital a 140 rpm a temperatura ambiente. Una vez que el 90 % de las semillas fueron fisiológicamente germinadas (protrusión de la radícula), los matraces se mantuvieron en el agitador a 25 °C durante unos tres días adicionales (en total aproximadamente seis días). Los exudados de las raíces se recogieron mediante filtración al vacío a través de una serie de filtros para reducir la obstrucción. Los filtros utilizados fueron: Whatman filtro de celulosa (grado 2, 8 µm), luego a través de filtro Millipore de 0,8 µm y finalmente filtro Millipore de 0,2 µm.

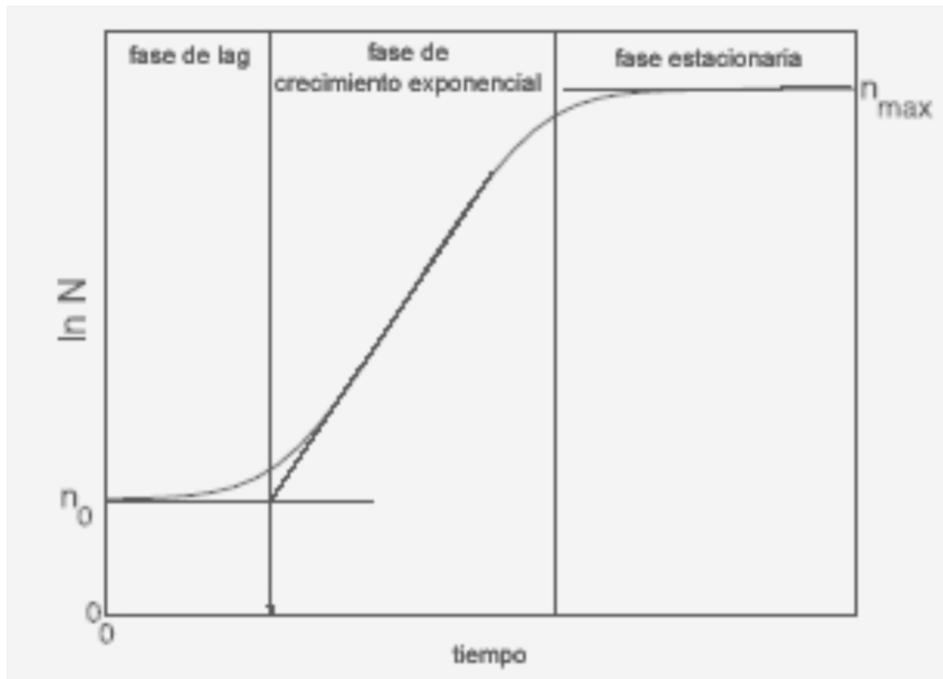
### **2.3.3.2 Determinación del crecimiento fúngico por espectrofotometría**

El crecimiento fúngico se determinó utilizando el método espectrofotométrico descrito por Rivas (2019) que es una modificación del utilizado por Meletiadis et al (2001).

Las concentraciones de conidios en los medios a prueba se obtuvieron en dos etapas a partir de suspensiones de conidios de cada uno de los trece aislamientos de *Metarhizium*: Primero, la suspensión fue ajustada a  $1 \times 10^5$  conidios/ml en Tritón X-100 al 0,01 %, y luego a  $1 \times 10^4$  conidios/mL usando el medio de prueba del crecimiento de hongos, PDB o exudados de raíces de soja Nidera (ERN) como diluyente. Se tomaron 220 µL de la suspensión de conidios resultante ( $1 \times 10^4$  conidios/mL) en 50 % REN o PDB, y se transfirieron a un pocillo de una placa de 96 pocillos. Cada aislamiento se probó por duplicado y el experimento se repitió tres veces. El espectrofotómetro se fijó a 25 °C, 200 rpm y a 405 nm. La placa se sometió a 10 segundos de agitación orbital antes de medir la densidad óptica (DO) cada 15 minutos.

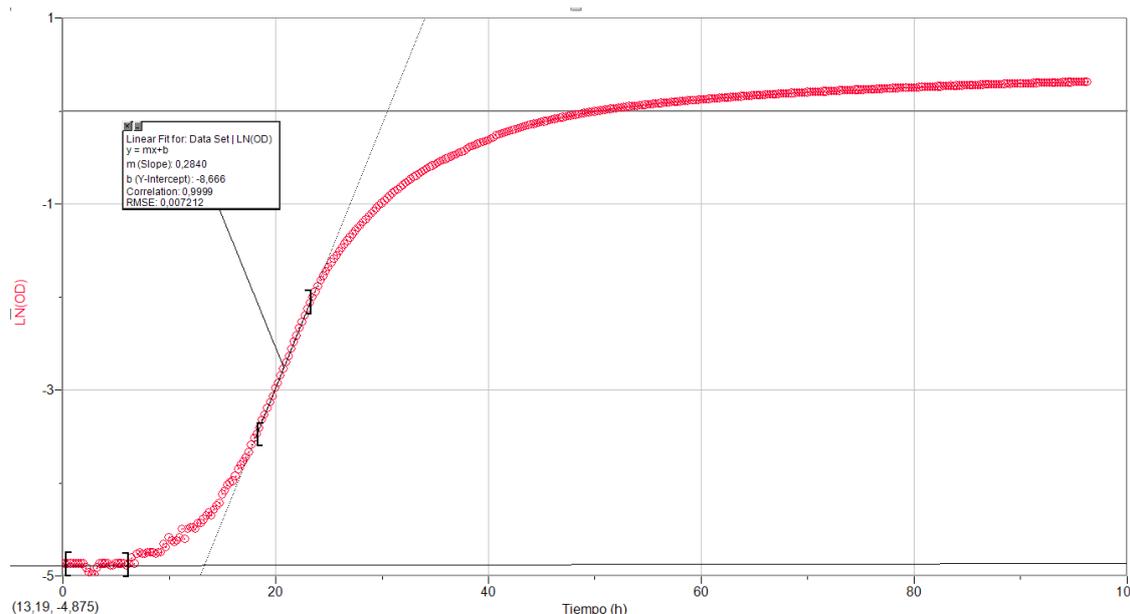
### **2.3.3.3 Cálculos de parámetros que definen el crecimiento**

Se realizaron las curvas de crecimiento de cada aislamiento, a partir de medidas de densidad óptica (DO) corregida con el blanco en función del tiempo. Luego se construyeron curvas del  $\ln(DO_{\text{medida}} - DO_{\text{blanco}})$  vs. tiempo y se hallaron los parámetros cinéticos mediante el uso del programa LoggerPro 3.16.2. La Figura 2.5 muestra el procedimiento de determinación de los parámetros cinéticos (Cattaneo et al., 2008) para una curva típica de crecimiento de microorganismos.



**Figura 2. 5. Curva de crecimiento microbiano típica.** En esta figura de logaritmo neperiano del número de individuos  $N$  vs. el tiempo, se representan las tres fases de crecimiento. (Cattaneo et al., 2008)

- Tasa máxima de crecimiento  $\mu_{max}$  (DO(405nm)/h o unidad de absorbancia por hora UA/h, calculada a partir de la pendiente máxima de la curva  $\ln(\text{DO}_{\text{corregida}})$  vs. tiempo (h), Figura 2.6 (Arana et al., 2016).
- Fase de retardo de crecimiento o fase Lag, se determina mediante la intersección de la recta  $\mu_{max}$  y la recta correspondiente a la porción inicial de la curva donde la DO es mínima, ver Figura 2.5 y 2.6.
- También se comparan las DO máximas, correspondientes a la máxima densidad óptica corregida con el valor del DO del medio solo o blanco.



**Figura 2. 6.** Curva de variación de Ln(OD) vs. tiempo, correspondiente al crecimiento de *M. robertsii* ILB167 en PDB. En ella se muestra a modo de ejemplo cómo se hallaron los parámetros cinéticos. Fuente: elaboración propia

### 2.3.4 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ENDOFÍTICA DE *Metarhizium* sp. A PARTIR DEL CULTIVO DE FRAGMENTOS DE RAÍZ EN MEDIO SELECTIVO

Las raíces de las plantas, cultivadas como indica la sección 2.3.2., fueron esterilizadas superficialmente. Esta esterilización superficial se realizó en tres pasos: 1) sumergiendo las raíces en una solución de etanol al 70 % por 5 segundos; 2) en una solución de hipoclorito al 4 % (p/v) por 90 segundos; y finalmente 3) se enjuagaron con agua destilada estéril. Todo el proceso se realizó en cámara de flujo laminar y las raíces se dejaron secando en papel absorbente estéril.

Luego la determinación de la capacidad endofítica se realizó mediante dos técnicas:

- a) A partir de siembra de fragmentos en un medio selectivo para *Metarhizium*:  
Luego de la esterilización superficial, las raíces se cortaron en fragmentos de 0,3 a 0,5 mm y se sembraron en cuatro placas con medio semiselectivo para *Metarhizium* (MSM), de 25 fragmentos por placa. Las placas fueron incubadas en una conservadora a 25 °C durante 7 días.
- b) Por proceso de homogenizado de raíces por sonicación y posterior siembra en MSM: Con un bisturí se separó media raíz esterilizada superficialmente y

se trozó en fragmentos de 0,5 cm. Los fragmentos se pesaron y luego fueron sumergidos en 10 mL de agua estéril en tubos falcon de 50 mL. La suspensión se sonificó durante 1 minuto a 180 W a pulso continuo. El sonificado se diluyó dos veces, 100  $\mu$ L de las diluciones (0), (-1) y (-2) fueron sembradas por rastrillado en MSM.

### **2.3.5 DETERMINACIÓN DE ENDOFITISMO DE *Metarhizium* sp. EN RAÍZ DE SOJA, POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CONFOCAL**

En la determinación de endofitismo por fluorescencia confocal, se utilizaron muestras de raíces de plantas de semillas de *Glycine max* Nidera 5909 y Génesis 5602, previamente recubiertas con conidios (principio de la sección 2.3), sembradas en macetas cultivadas en invernáculo (ver sección 2.3.2). Luego las raíces se tiñeron con los fluoróforos (ver procedimiento en el Anexo A).

#### **2.3.5.1 Estudio de raíces por microscopía de fluorescencia confocal**

Las muestras de raíces fueron analizadas para detectar la presencia de estructuras fúngicas en la superficie de los tejidos vegetales e internamente como endófitos utilizando microscopía fluorescente confocal (filtros: GFP;Rodamina). Se usó aglutinina de germen de trigo conjugada con Alexa Fluor (WGA-AF488; Molecular Probes, Eugene, OR, EE. UU.) para teñir la quitina presente en las hifas fúngicas (Ramonell et al. 2005). La zona de adhesión de las hifas se visualizó con la lectina de unión a carbohidratos concanavalina-A conjugada con Alexa Fluor 633 (ConA-AF633, Molecular Probes, Karlsruhe, Alemania). ConA se usó para visualizar glicoproteínas debido a su la capacidad de unión a residuos de azúcar como  $\alpha$ -anopiranosilo y  $\alpha$ -glucopiranosilo que se encuentran en glicoproteínas y glicolípidos (Zúcaro et al., 2011). Las células vegetales se visualizaron con yoduro de propidio y rojo Congo como contratinción (Deshmukh et al., 2006). Ver protocolo de tinción en el anexo A.

## 2.4 ANTAGONISMO Y CONTROL DE FITOPATÓGENOS

### 2.4.1 DETERMINACIÓN DE ANTAGONISMO DE *Metarhizium* spp. FRENTE A CUATRO FITOPATÓGENOS, CULTIVOS DUALES

Se sembraron 5 µL de  $1 \times 10^4$  conidios/mL de cada uno de los trece aislamientos de *Metarhizium* en placas de Petri con PDA. Las mismas se dejaron en incubadora durante una semana a 27 °C en oscuridad. Luego de pasado este tiempo se sembró una porción de micelio de uno de los cuatro hongos fitopatógenos de la Tabla 2.1, a 4,6 cm de distancia del sitio de siembra de *Metarhizium*. La porción de micelio fue extraída con un sacabocados (de 0,5 cm de diámetro) del borde de la colonia crecida en placa de PDA incubada previamente a 26 °C durante 2-5 días (según el fitopatógeno como se describe en la sección 2.1.). Cada unidad experimental consistió en una placa de cultivo dual de una colonia de uno de los aislamientos enfrentada a una colonia de fitopatógeno.

Luego de pasadas 29 h de la siembra de *P. ultimum* ILB317 y *P. sylvaticum* ILB323, se midió con una regla milimetrada el espacio sin crecimiento fúngico entre las colonias de *Metarhizium* y *Pythium*, correspondiente al espacio de interacción en cada placa. También se midió el radio de la colonia del patógeno (ver Figura 2.7), para evaluar una posible inhibición del crecimiento provocada por la presencia de *Metarhizium*.

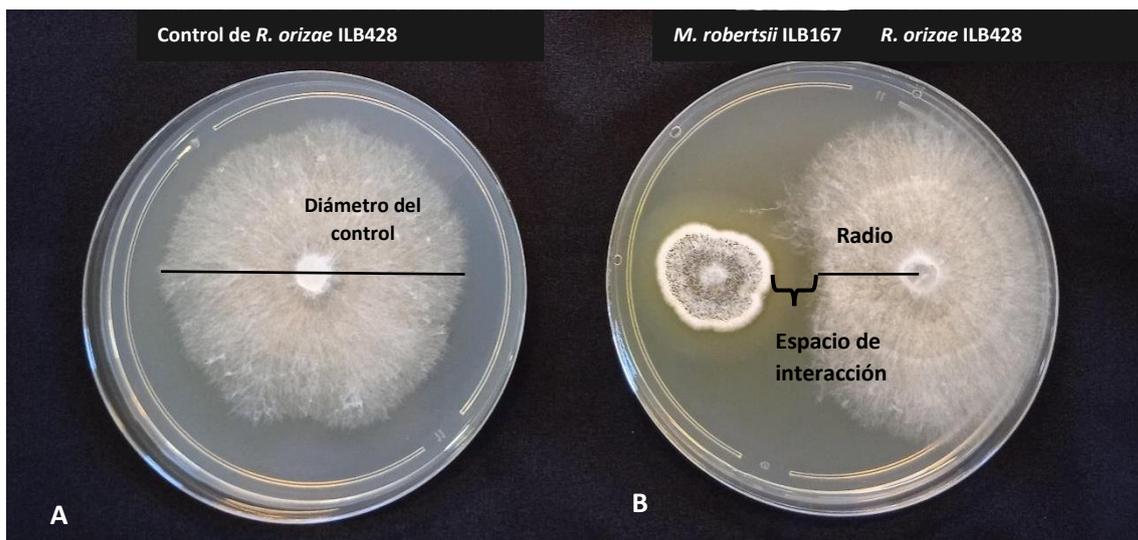
Las mismas variables se midieron para los cultivos duales con *Fusarium graminearum* ILB332 y *Rhizoctonia oryzae* ILB428, pero con un tiempo de espera de 54 h luego de la siembra del hongo fitopatógeno.

A partir del radio del patógeno se calculó el porcentaje de inhibición (% inh) según la siguiente ecuación planteada por Tariq (2010):

$$\% \text{ inh} = (1 - 2 \times R/DPC) \times 100$$

R: Radio del patógeno enfrentado a *Metarhizium* spp. (ver figura 2.7B)

DPC: Diámetro del Patógeno Control (ver figura 2.7A)



**Figura 2. 7. Estudio de antagonismo entre *M. robertsii* ILB167 y *R. oryzae* ILB428. A-**Placa control del patógeno *Rhizoctonia oryzae* ILB428. **B-** Placas de PDA con cultivo dual de *R. oryzae* ILB428 a la derecha y *M. robertsii* ILB167 a la izquierda. Foto: elaboración propia

## 2.4.2 GERMINACIÓN Y EMERGENCIA DE SOJA INOCULADA CON *Metarhizium* spp., EN SUELO CON ALTO ÍNDICE DE PATOGENICIDAD

### 2.4.2.1 Obtención de suelo con alto índice de patogenicidad

El índice de patogenicidad (IP) fue introducido por Skipp et al. (1997) y la metodología ajustada por Altier (2003), sirve para determinar el riesgo de la ocurrencia de enfermedades de implantación del suelo de una chacra determinada, las cuales condicionan el establecimiento de un cultivo.

Se utilizó un suelo con alto IP, para mediante bioexperimentos, identificar aquellos aislamientos de *Metarhizium* sp. que mejoren la capacidad de las semillas de germinar en condiciones presión sanitaria, es decir en condiciones de pérdida de implantación asociada al factor biótico patógenos de implantación. El suelo que se utilizó perteneció al predio de INIA.

El suelo seleccionado no tenía historia de siembra de soja y poseía una alta carga de microorganismos perjudiciales para soja. Este último dato se recaudó a partir de experimentos anteriores en laboratorio de INIA. El procedimiento de muestreo consistió en la extracción de suelo de una chacra del predio de INIA, compuesto de 10-12 tomas al

azar tomadas con calador a 10 cm de profundidad (óptimo aprox. 2 kg). Luego este suelo se aireó y se tamizó en malla de 0,7 mm.

Se calculó el IP utilizando el protocolo modificado de Altier (2003). La muestra de suelo se dividió en dos bolsas conteniendo 1 kg de este. Una bolsa se pasó por microondas 5 min máxima potencia, luego se mezcló el contenido dentro de la bolsa y se puso en microondas 5 min más, de esta manera se logró reducir al máximo la carga microbiana del suelo. La otra bolsa se dejó sin esterilizar con el suelo no tratado o natural. El suelo irradiado y el suelo “patogénico” natural se colocaron en toallas de papel de germinación, en un sistema de columnas de un cm de grosor (ver Figura 2.8) para realizar un bioexperimento con semillas de soja. Las semillas fueron previamente desinfectadas superficialmente durante 30 segundos en alcohol 70% y enjuagadas.

Para cada tratamiento se prepararon 4 toallas de papel humedecido de 50 semillas cada una (para completar 200 semillas por tratamiento). Antes de colocar las hileras de suelo se humedeció el papel con 10 mL agua destilada estéril. Luego de colocadas las semillas se agregaron 20 mL más de agua. Posteriormente se enrollaron las toallas de papel en el sentido que muestra la figura, y se colocaron de forma vertical en cámaras de crecimiento a 24 °C en oscuridad durante 8 días. Al día 8 se registra el número de plantas germinadas.

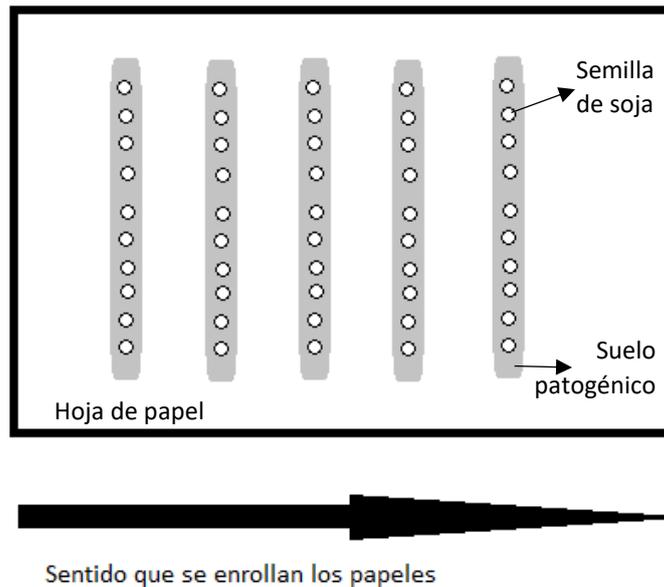
El IP del suelo se calculó con la siguiente ecuación:

$$IP = 1 - \left( \frac{N^{\circ} \text{plantas suelo sin tratar}}{N^{\circ} \text{plantas suelo con Microondas}} \right)$$

IP cercano a 0 = suelo con potencial de infección bajo

IP cercano a 1 = suelo con potencial de infección alto

Este valor IP multiplicado por 100 se expresó en porcentaje (%) donde su valor mínimo siguió siendo 0% y su valor máximo es 100% correspondiente a un suelo con potencial alto de infección. El IP para el suelo utilizado en el experimento correspondió a un  $28 \pm 2$  % de potencial patogénico para soja N5909.



**Figura 2. 8. Esquema de germinación de semillas en hileras de suelo patogénico en papel.** La flecha indica el sentido que se enrolla el papel. Una vez enrollado se incubó en posición vertical.

#### **2.4.2.2 ESTUDIO DE GERMINACIÓN EN PAPEL DE SEMILLAS INOCULADAS CON *Metarhizium* spp. EN SUELO PATOGENICO**

La germinación en papel de semillas se realizó con la misma metodología descrita en la sección anterior, con la diferencia de que cada semilla fue inoculada con 100  $\mu\text{L}$  de suspensión de conidios de diez aislamientos en dos concentraciones: alta de  $1 \times 10^8$  conidios/mL y baja de  $1 \times 10^6$  conidios/mL. Los aislamientos utilizados fueron: *M. robertsii* ILB167, *M. lepidiotae* ILB173, *M. lepidiotae* ILB179, *M. frigidum* ILB182, *M. flavoviride* ILB184, *M. lepidiotae* ILB221, *M. lepidiotae* ILB222, *M. lepidiotae* ILB232 e *M. robertsii* ILB440. A estos se agregó *M. lepidiotae* ILB225 en las concentraciones: alta de  $1 \times 10^6$  conidios/mL y baja de  $1 \times 10^4$  conidios/mL. Considerando que las semillas se inocularon dos concentraciones por aislamientos se contó con un total de 22 tratamientos, más un control de suelo natural y un control de suelo irradiado con microondas.

Luego de pasados 8 días se registraron las semillas de soja germinadas en cada papel. Con estos datos se calculó el porcentaje de germinación (% Germ) por tratamiento para cada papel con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Germ} = \frac{N^{\circ} \text{ semillas germinadas}}{50} \times 100$$

Con los valores de % Germ se hizo un cálculo del incremento de la germinación de cada tratamiento con respecto al valor promedio de germinación de semillas sin inocular sembradas en suelo patogénico (Control). La ecuación del índice de germinación es la siguiente:

$$\text{Índice de Germ. (\%)} = 100 \times \frac{\% \text{Germ. de un tratamiento}}{\text{promedio de \%Germ. del suelo patogénico}} - 100$$

### 2.4.2.3 ESTUDIO DE CONTROL DE PATÓGENOS EN SUELO PATOGÉNICO

El control de patógeno en suelo patogénico se evaluó a partir de la emergencia de las plántulas de semillas tratadas tres aislamientos diferentes seleccionados de *Metarhizium*, sembradas en suelo patogénico. El diseño del experimento consistió en la siembra de 10 semillas por maceta y cada semilla se inoculó, al momento de la siembra, con 100 µL de  $1 \times 10^8$  conidios/mL de uno de los siguientes aislamientos: *M. robertsii* ILB167, *M. frigidum* ILB182 o *M. robertsii* ILB440. Los criterios de selección de los aislamientos se expondrán en la discusión y están basados en los resultados de las pruebas anteriores. Las macetas se distribuyeron aleatoriamente, y se regaron todos los días para mantener la humedad del suelo. En el primer día de siembra se agregó inoculante líquido de rizobios comerciales para soja (*B. elkanii* U1301 y U1302), 10 mL por maceta. La temperatura media del invernáculo fue de  $25,6 \pm 5,5$  °C (Temperatura media  $\pm$  DE) y humedad  $53,0 \pm 15,0$  %HR (Humedad media  $\pm$  DE). Al séptimo día de siembra, se midió la cantidad de plántulas emergidas. En el día diez se hace un raleo de tal manera que queden dos plantas por maceta, y se deja con riego diario hasta la cosecha realizada a los 31 días de la fecha de siembra. Una vez cosechadas las plantas se midieron número de nódulos, peso de nódulos, peso de raíz y parte aérea.

### 2.4.3 CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS *IN PLANTA*

Se realizaron dos tipos de experimentos para evaluar la actividad de biocontrol de los aislamientos de *Metarhizium* sobre hongos fitopatógenos: 1) en invernáculo en macetas con un sustrato con un porcentaje de fitopatógenos crecidos en arroz y 2) en cámara de crecimiento con vasos de espuma y un porcentaje de masa fúngica de fitopatógenos crecidos en medio líquido.

#### 2.4.3.1 DETERMINACIÓN DE BIOCONTROL DE FITOPATÓGENOS *IN PLANTA* EXPERIMENTO EN INVERNÁCULO

La capacidad de *Metarhizium* sp. de controlar fitopatógenos, se determinó por la emergencia de semillas de soja (*G. max* N5909) sembradas en macetas en un experimento de diseño completamente aleatorio (DCA) en invernáculo. El tiempo de duración de los experimentos fue de diez días y se realizaron en cuatro meses diferentes del año donde las temperaturas y la humedad fueron registradas, la siguiente tabla muestra los meses, los valores de temperatura y los patógenos ensayados:

Para la evaluación de biocontrol de *Fusarium* se probaron:

- Tres concentraciones de micelio de *Fusarium* sp. ILB332 cultivado en arroz: 0, 10 % y 20 % peso a peso (p/p) en T: V: A (turba, vermiculita y arena) en las proporciones 1: 2: 3.
- Cuatro tratamientos de inoculación de semillas de 100  $\mu$ L/semilla de una suspensión de conidios  $10^8$  conidios/mL, pertenecientes a cuatro aislamientos: *M. robertsii* ILB167, *M. frigidum* ILB182, *M. lepidiotae* ILB232 y *M. robertsii* ILB440. A los que se les suma un control de 100  $\mu$ L/semilla de Tritón X-100 0.01 %.

La unidad experimental consistió en una maceta de 300 g de sustrato con 10 semillas de soja sembradas e inoculadas.

Nº de macetas = 3 (concentraciones de *Fusarium*) x 5 (tratamientos)x4 (macetas)

Nº de macetas = 60 macetas

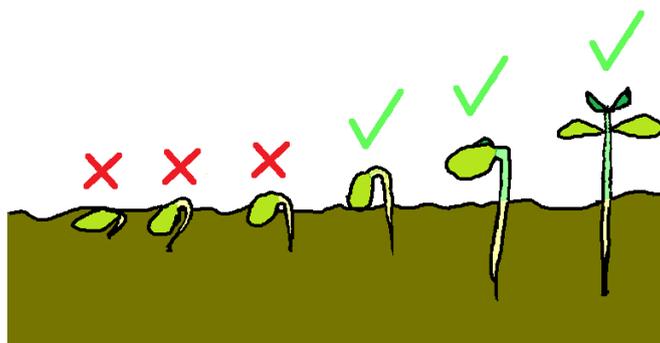
Se agregaron 8 macetas más: cuatro con arroz al 10 % p/p en sustrato T: V: A sin *Metarhizium* y cuatro con arroz al 20 % sin *Metarhizium* para observar el efecto del arroz.

**Tabla 2. 2 Promedios de temperaturas y humedad relativa en el invernáculo y los patógenos que se ensayaron de acuerdo con cada mes**

mes	Temp. ± D.E.(°C)	Humedad±D.E. (%HR)	Fitopatógeno
<b>febrero</b>	22,1 ± 3.9	73,8 ± 20,3	<i>Fusarium</i> sp. ILB332
<b>marzo</b>	22.4 ± 4.5	71,9 ± 13,4	<i>Fusarium</i> sp. ILB332
<b>julio</b>	17,0 ± 4.5	69,8 ± 10,2	<i>Fusarium</i> sp. ILB332 <i>P. ultimum</i> ILB317 <i>P. sylvaticum</i> ILB323
<b>agosto</b>	19.8 ± 4.3	65,2 ± 5,8	<i>Rhizoctonia orizae</i> ILB428 <i>Fusarium</i> sp. ILB332 <i>P. sylvaticum</i> ILB323 <i>Rhizoctonia orizae</i> ILB428

Se registró emergencia de las plántulas a los 7 días de la siembra. El criterio utilizado para el conteo de emergencia estuvo basado en manuales INSTA (ver Figura 2.9) El porcentaje de fitopatógeno a agregar al sustrato se determinó previamente, probando tres concentraciones para seleccionar aquella donde la emergencia promedio correspondiera al 50 %.

Para evaluar control de *P. ultimum* ILB317, *P. sylvaticum* ILB323 y *Rhizoctonia orizae* ILB428, se realizaron experimentos iguales al descrito para *Fusarium* sp, pero con concentraciones de fitopágenos diferentes: 10% de *P. ultimum*, 5 y 10 % de *P. sylvaticum* y para el caso de *Rhizoctonia orizae* 3,25 y 7,5 %.



**Figura 2. 9. Criterio de selección de plántulas emergentes.**

Las figuras con tilde verde son las que se cuantificaron como plántulas emergentes. Fuente: elaboración propia

### 2.4.3.2 EXPERIMENTO DE BIOCONTROL EN CÁMARA DE CRECIMIENTO

Se realizó otro estudio para el control de hongos fitopatógenos *in planta*, el cual se diferencia con el realizado en el invernáculo en los siguientes puntos:

- 1) Mejor control de la temperatura: Las plantas crecieron en cámara de crecimiento donde se puede obtener una disminución de la variabilidad de la temperatura en comparación con el invernáculo.
- 2) No se utilizaron fitopatógenos crecidos en arroz para evitar el efecto negativo del mismo en la emergencia. Se utilizó entonces, masa fúngica de fitopatógeno cultivado en medio líquido (ver sección 2.2.3) que posteriormente se filtró y se agregó en cierta proporción al sustrato T: V: A.
- 3) El agregado de *Metarhizium* spp. se hizo a partir del recubrimiento o “coating” de semillas de soja (*G. max* N5909) con biopolímero conteniendo los conidios (proceso descrito más adelante), con el interés de mejorar el contacto del hongo con la semilla.
- 4) En vez de macetas se utilizaron vasos térmicos de espuma plast de 1kg en los que se distribuye el sustrato como muestra la figura 2.10.

#### 2.4.3.2.1 Coating de semillas con biopolímero

Se hizo un recubrimiento de las semillas a base de un biopolímero “Los biopolímeros son compuestos provenientes de recursos renovables (plantas, microorganismos o animales) capaces de ser degradados en moléculas que no representan un peligro para el ambiente” (Valero-Valdivieso, 2013). El recubrimiento con biopolímero, llamado “coating”, debido a que no modifica significativamente la forma, tamaño o peso de las semillas, se realizó con la siguiente metodología modificada de Rivas (2019):

Primeramente, las semillas fueron recubiertas con un hidrocoloide preparado con carboximetilcelulosa (CMC) al 1% (p/p) en agua destilada, en un proceso de pre-recubrimiento en un rotor y posterior secado en cámara de flujo laminar toda la noche.

Este hidrocoloide actúa como aglutinante, adhesivo del biopolímero (Afzal et al, 2020), permite que este se adhiera de forma homogénea.

Al día siguiente se realizó el “coating” de semillas con biopolímero en cuatro fases (ver Figura 2.10):

Fase 1 - Preparación del biopolímero a partir de una mezcla de 10 mL de suspensión de conidios (de cada uno de los cuatro aislamientos seleccionados) de  $1 \times 10^8$  conidios/mL de Tritón X-100 al 0,01 %, 0.1 g de goma xantano (aglutinante) y 0,1 g de aceite de almendras.

Fase 2 - Agregado del biopolímero a la semilla. Para esto se mezcló en agitación constante, 7,8 g de biopolímero con 90 g de semillas pre-recubiertas con CMC.

Fase 3 – Fijación del biopolímero a la semilla: agregado del “relleno” el cual se mezcla con el aglutinante y produce una textura de superficie de revestimiento uniforme que no impide la aparición de la radícula (Afzal et al, 2020). El relleno utilizado fue 7,8 g de bentonita el cual se agregó en agitación constante.

Fase 4 – Secado del recubrimiento con 7,8 g de talco agregados en agitación. De esta manera las semillas quedaron bien separadas unas de otras lo que facilitó el manejo de estas.

Antes de cada experimento de control de patógenos, se hizo un control del recubrimiento mediante la metodología descrita en la sección 2.3.

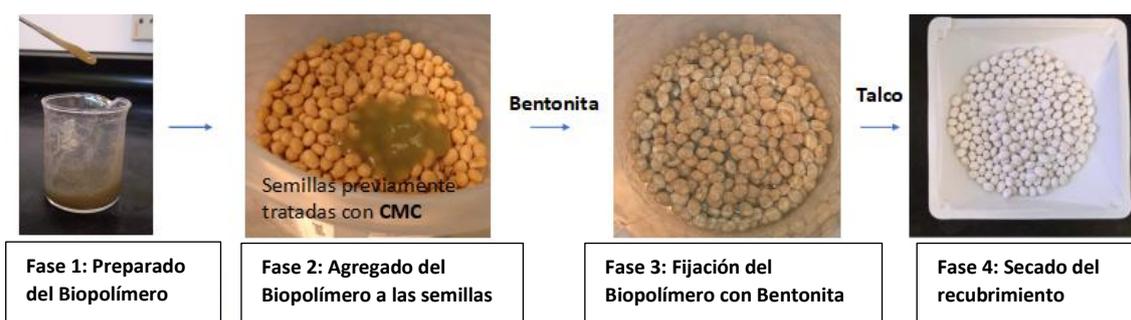


Figura 2. 10. Esquema del proceso de recubrimiento de semillas de soja con el biopolímero. Fuente: elaboración propia

### 2.4.3.2.2 Diseño del experimento de biocontrol en cámara

La concentración de cada uno de los cuatro patógenos se determinó a partir de una prueba de tres concentraciones distintas en sustrato de T: V: A. Se eligió la concentración que disminuía en 50 % la emergencia de las plántulas de soja. Por lo cual los valores de porcentaje en sustrato elegidos fueron: 1,0 % (p/p) de biomasa de *F. graminearum* ILB332 en sustrato T: V: A, 12 % (p/p) de *R. orizae* ILB 428, 0,5 % (p/p) de *P. ultimum* y 1,0 % (p/p) de *P. sylvaticum* ILB323.

La distribución del sustrato en el vaso de espuma consistió en mitad inferior sustrato de T: V: A sin patógeno y mitad superior T: V: A con el porcentaje de patógeno (ver Figura 2.11). Las semillas se sembraron a 1,5 cm de la superficie en contacto con la mitad con patógeno. En cada vaso se sembraron diez semillas. La distribución de los vasos de espuma en las mesas siguieron un diseño experimental DCA, y se incubaron a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  en ciclo de luz:oscuridad 12:12 h.



**Figura 2.11. Esquema de distribución del sustrato en los vasos de espuma de 1L.** En la parte superior de la figura se siembran las semillas recubiertas a 1,5 cm de la superficie. *Fuente: elaboración propia*

Cada experimento constó de cuatro tratamientos de semillas, correspondientes a cuatro recubrimientos con biopolímero conteniendo *M. robertsii* ILB167; *M. lepidiotae* ILB232, *M. brunneum* ILB429 y *M. robertsii* ILB440 y un recubrimiento sin *Metarhizium* (solo Tritón X-100). Se agregó un control sin patógeno y semillas recubiertas con biopolímero sin *Metarhizium*.

Cada combinación recubrimiento y porcentaje de patógenos se hizo por cuadruplicado, esto es cuatro vasos por combinación.

Total de vasos = 5 (tratamientos) x 4 vasos + 1 control x 4 vasos= 24 vasos

La variable que se midió para determinar el biocontrol fue la emergencia a los 10 días de sembradas las semillas. Cada experimento completo se repitió tres veces.

## 2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos resultantes de los experimentos de las secciones 2.2.1; 2.3.3; 2.4.1 y 2.4.3, se realizaron mediante Modelos Lineales Generalizados Mixtos en InfoStat (MLGM). En ellos la variable a comparar se indicó como variable dependiente, y los distintos aislamientos se pusieron como efecto fijo. El número de experimento como el efecto aleatorio. Se usó familia Normal y función de enlace identidad para el análisis de los datos. El método comparativo fue LSD de Fisher con  $p=0.05$ .

Los resultados de los experimentos de las secciones 2.1.4, 2.2.2 y 2.4.2 se analizaron en InfoStat mediante modelos estadísticos de ANAVA (análisis de varianza). Para cada unidad experimental el valor medido de la variable  $\Psi_{ij}$  se plantea mediante el modelo lineal:

$$\Psi_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Donde  $\mu$  es la media general,  $\alpha_i$  el efecto de cada tratamiento (número de tratamientos  $i = 1, 2, \dots, i$ ), según el experimento, y  $\epsilon_{ij}$  el error aleatorio correspondiente al número de repeticiones ( $j = 1, \dots, j$ ) y número de tratamientos  $i$ . El método comparativo utilizado es la prueba de Fisher, con un  $p$  valor de 0,05 de significancia.

## **CAPÍTULO 3. RESULTADOS**

### 3.1 PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE *Metarhizium* spp. POR FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO

El potencial de los aislamientos de *Metarhizium* de producir conidios a nivel industrial fue evaluado mediante la fermentación en sustrato sólido en granos de arroz. Los aislamientos *M. robertsii* ILB167 e ILB440 alcanzaron valores de producción de conidios en el orden de  $10^9$  conidios/g de arroz (Tabla 3.1). El resto de los aislamientos alcanzaron valores en el orden de  $10^8$  conidios/g de arroz, con excepción de *M. lepidiotae* ILB225 y *M. frigidum* ILB185. *M. lepidiotae* ILB225 obtuvo concentraciones en el orden de  $10^7$  conidios/g de arroz y *M. frigidum* ILB185 no produjo conidios maduros.

Tabla 3. 1. Producción y tiempo de cosecha de conidios de *Metarhizium* spp. a por fermentación en arroz

Aislamiento	Producción de conidios ± E.E. (x $10^8$ conidios/g de arroz)	Cosecha (días)
<i>M. robertsii</i> ILB167	20 ± 4 a	10
<i>M. lepidiotae</i> ILB173	6,2 ± 1,4 b	10
<i>M. lepidiotae</i> ILB179	1,9 ± 0,6 b	10
<i>M. frigidum</i> ILB182	6,2 ± 1,4 b	17
<i>M. flavoviride</i> ILB184	6,4 ± 5,1 b	17
<i>M. frigidum</i> ILB185	0	-
<i>M. flavoviride</i> ILB189	5,2 ± 0,8 b	17
<i>M. lepidiotae</i> ILB221	4,1 ± 0,8 b	10
<i>M. lepidiotae</i> ILB222	6,4 ± 0,9 b	10
<i>M. lepidiotae</i> ILB223	5,3 ± 2,5 b	10
<i>M. lepidiotae</i> ILB225	0,18 ± 0,02 b	10
<i>M. lepidiotae</i> ILB232	6,5 ± 0,1 b	10
<i>M. robertsii</i> ILB440	17 ± 1 a	10

E.E. error estándar ( $n = 2$ ). Las letras diferentes representan diferencias significativas según test de Fisher con  $p < 0.05$

En cuanto al tiempo de cosecha, se observó que los aislamientos de las especies *M. frigidum* ILB182 e ILB184, y *M. flavoviride* ILB189, requirieron de al menos 17 días

para producir conidios mientras que el resto de los aislamientos a los 10 días ya estaban prontos para cosechar.

### **3.2 COMPATIBILIDAD DE *Metarhizium* spp. CON CEPAS COMERCIALES DE RIZOBIOS RECOMENDADAS PARA EL CULTIVO DE SOJA**

#### **3.2.1 COMPATIBILIDAD *IN VITRO* ENTRE *Metarhizium* spp. Y *Bradyrhizobium elkanii* EN CULTIVOS DUALES**

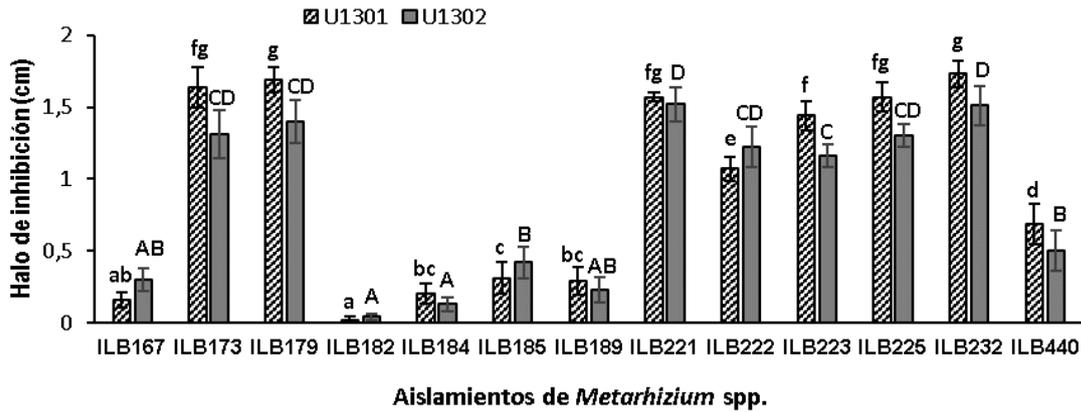
La interacción entre diferentes especies de *Metarhizium* y las dos cepas comerciales de *Bradyrhizobium elkanii* (U1301 y U1302) recomendados para el cultivo de soja, se midió mediante los halos de inhibición causados por *Metarhizium*.

Los aislamientos de *Metarhizium* spp. fueron clasificados en tres categorías de compatibilidad con rizobios, basándose en los resultados del análisis estadístico de los halos de inhibición de crecimiento de *B. elkanii*, con una prueba de significancia de Fisher con un valor p de 0,05 (Figura 3.1): a) compatibles, con halos de inhibición de hasta 0,5 cm, b) baja compatibilidad, con halos de 0,6 a 1,0 cm y c) incompatibles, con halos de inhibición mayores a 1,0 cm.

En la categoría de compatibles, se incluyen *M. robertsii* ILB167, *M. flavoviride* ILB184 e ILB189, y *M. frigidum* ILB182 e ILB185, cuyos halos de inhibición promedio para ambas cepas de rizobios, fueron menores a 0,5 cm. Dentro de este grupo se destaca el aislamiento de *M. frigidum* ILB182, con tendencia a ser altamente compatible para ambos rizobios, debido a que el halo de inhibición promedio no superó el medio milímetro (error estándar de 0,02 cm). Por otra parte, *M. robertsii* ILB440, tuvo valores estadísticamente distintos en función de la cepa de *B. elkanii*, por lo que se la clasificó en esta categoría de compatible únicamente para la interacción con *B. elkanii* U1302.

Entre los aislamientos con baja compatibilidad se ubicó solamente *M. robertsii* ILB440 en interacción con *B. elkanii* U1301. Este aislamiento obtuvo un halo de inhibición de  $0,7 \pm 0,1$  cm, valor intermedio y estadísticamente distinto a las otras dos categorías ( $p \leq 0,05$ ).

Por su parte, en la categoría de incompatibles se ubicaron todos los aislamientos *M. lepidiotae* con halos de inhibición de ambas cepas de rizobios de 1,1 a 1,7 cm, tres veces más elevados que los valores de la primera categoría (Figura 3.1).



**Figura 3. 1. Compatibilidad de diferentes aislamientos del género *Metarhizium* spp. con las cepas de *B. elkanii* U1301 y U1302. Medias de los halos de inhibición del crecimiento de los rizobios (7 días de cultivo). U1301 - cultivos duales en EMA (27°C) de *Bradyrhizobium elkanii* U1301 con los distintos aislamientos de *Metarhizium* spp. U1302 - cultivos duales en EMA (27°C) de *Bradyrhizobium elkanii* U1302 con los distintos aislamientos de *Metarhizium* spp. Las barras indican el error estándar (n = 9). Letras distintas indican medias significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) para cada cepa de rizobios, letras minúsculas para cultivos duales con *B. elkanii* U1301, y mayúsculas para *B. elkanii* U1302. Los números en el eje horizontal corresponden a los 13 aislamientos de *Metarhizium* de la colección: ILB167 e ILB 440 (*M. robertsii*); ILB173, ILB179, ILB221, ILB222, ILB223, ILB225 e ILB232 (*M. lepidiotae*); ILB182 e ILB185 (*M. frigidum*); y ILB184 e ILB189 (*M. flavoviride*)**

Estos resultados indican que dentro de cada categoría de compatibilidad los distintos aislamientos de *Metarhizium* presentaron un comportamiento similar frente a ambas cepas de *B. elkanii* (Figura 3.1). Además, todos los aislamientos pertenecientes a la especie de *M. lepidiotae* exhibieron una notoria incompatibilidad con *B. elkanii in vitro*, como lo demuestran sus halos de inhibición mayores a 1,0 cm. El aislamiento perteneciente a la especie *M. frigidum* ILB182 parece tener alta compatibilidad con rizobios, con halos de inhibición prácticamente nulos.

### 3.2.2 COMPATIBILIDAD IN PLANTA ENTRE *Metarhizium* spp. Y *Bradyrhizobium elkanii*

Los estudios de compatibilidad entre *Metarhizium* y las cepas comerciales de rizobios *in planta*, no presentaron las diferencias esperadas según las categorías definidas en los estudios en cultivos duales. En este experimento, se utilizaron dos aislamientos previamente categorizados como compatibles con los rizobios, *M. robertsii* ILB167 y *M.*

*flavoviride* ILB184, y otros dos identificados como incompatibles pertenecientes a la especie *M. lepidiotae*, ILB173 e ILB223 (ver sección 3.2.1.).

La eficiencia entre la simbiosis de *Glycine max* N5909 y su simbiote *B. elkanii* U1301 no se vio afectada por la presencia de ninguno de los cuatro aislamientos de *Metarhizium*, como lo muestran sus valores de peso seco de los nódulos (PSN) y el número de nódulos (NN) en comparación con el control (Tabla 3.2). Además, los aislamientos tampoco ejercieron un impacto significativo en parámetros relacionados con la biomasa de las plantas y el crecimiento vegetal, como son el peso seco de la parte aérea (PSA) y el peso seco de las raíces (PSR). Estos resultados demuestran que la presencia de *Metarhizium* spp. no afecta el crecimiento de las plantas.

**Tabla 3. 2. Compatibilidad de *Metarhizium* spp. con *B. elkanii* U1301 in planta, cultivo de dos meses en condiciones de invernáculo a 26°C.**

Tratamiento	NN ±E.E. (n)	PSN ±E.E. (g)	PSR ±E.E. (g)	PSA ±E.E. (g)
<b>Control</b>	110 ±13 a	0,63 ±0,04 a	1,17 ±0,15 a	4,3±0,3 a
<i>M. robertsii</i> ILB167	142 ±22 a	0,62 ±0,03 a	1,09 ±0,03 a	4,2 ±0,4 a
<i>M. lepidiotae</i> ILB173	128 ±24 a	0,49 ±0,10 a	1,18 ±0,19 a	3.0 ±0,6 a
<i>M. flavoviride</i> ILB184	195 ±16 a	0,56 ±0,12 a	1,19 ±0,16 a	3,5 ±0,5 a
<i>M. lepidiotae</i> ILB223	160 ±40 a	0,61 ±0,05 a	1,15 ±0,13 a	4,5 ±0,5 a

NN: número de nódulos. PSN: peso seco nodular. PSR: peso seco de raíz. PSA: peso seco parte aérea. Letras iguales en cada columna no son significativamente diferentes ( $p \geq 0,05$ ) para cada tratamiento. E.E. error estándar (n = 3). Los valores corresponden a valores promedios por planta.

De este estudio se deduce que la inoculación de los aislamientos de *Metarhizium* directamente sobre las semillas de soja, no tuvo un efecto negativo sobre la capacidad de la cepa de *B. elkanii* U1301 para establecer la simbiosis planta-rizobio ( $p \geq 0.05$ ) con *G. max* N5909.

### **3.3 COMPATIBILIDAD Y ASOCIACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE *Metarhizium* CON DOS VARIEDADES DE SOJA**

#### **3.3.1 CRECIMIENTO DE LOS AISLAMIENTOS DE *Metarhizium* spp. EN EXUDADOS DE RAÍZ DE SOJA Y EN CALDO PAPA-DEXTROSA**

Con un total de 60.372 datos de medidas de absorbancia en función del tiempo, se generaron 156 curvas. Estas se distribuyen en 12 curvas por aislamiento de *Metarhizium* spp., de las cuales seis corresponden al crecimiento en caldo de cultivo de papa dextrosa (PDB) y las otras seis al crecimiento en exudados de raíz (ER). Se excluyeron las curvas con un alto porcentaje de puntos dispersos y con fluctuaciones pronunciadas para el cálculo de los parámetros de crecimiento (ver Figura 3.2). Debido a esto, no fue posible analizar el crecimiento de *M. lepidiotae* ILB221, ILB223 y ILB232 en el medio de cultivo ER. La presencia de puntos dispersos en las gráficas de absorbancia vs. el tiempo de estos aislamientos se atribuye a la formación de agregados miceliales con alta densidad celular y áreas sin células, lo que generó lecturas de absorbancia inconsistentes con una curva de crecimiento (Figura 3.2).

Las curvas de crecimiento en PDB de los trece aislamientos, exhibieron formas típicas comparables a las del modelo matemático para el crecimiento microbiano expuesto por Widdel (2007) (Figura 3.2). En ellas se pudo distinguir la primera fase de latencia o fase Lag, luego un corto período de transición de aumento rápido del crecimiento fúngico (aumento rápido de la densidad óptica), seguido de una zona de pendiente máxima correspondiente a la fase exponencial y finalmente una segunda fase de transición que tiende a una fase estacionaria. Las formas de las curvas de crecimiento en ER no siguen todas el mismo patrón, presentando diferencias en sus fases que se aprecian a simple vista comparando las gráficas en uno y otro medio (figura 3.2).

## Características de las curvas de crecimiento fúngico

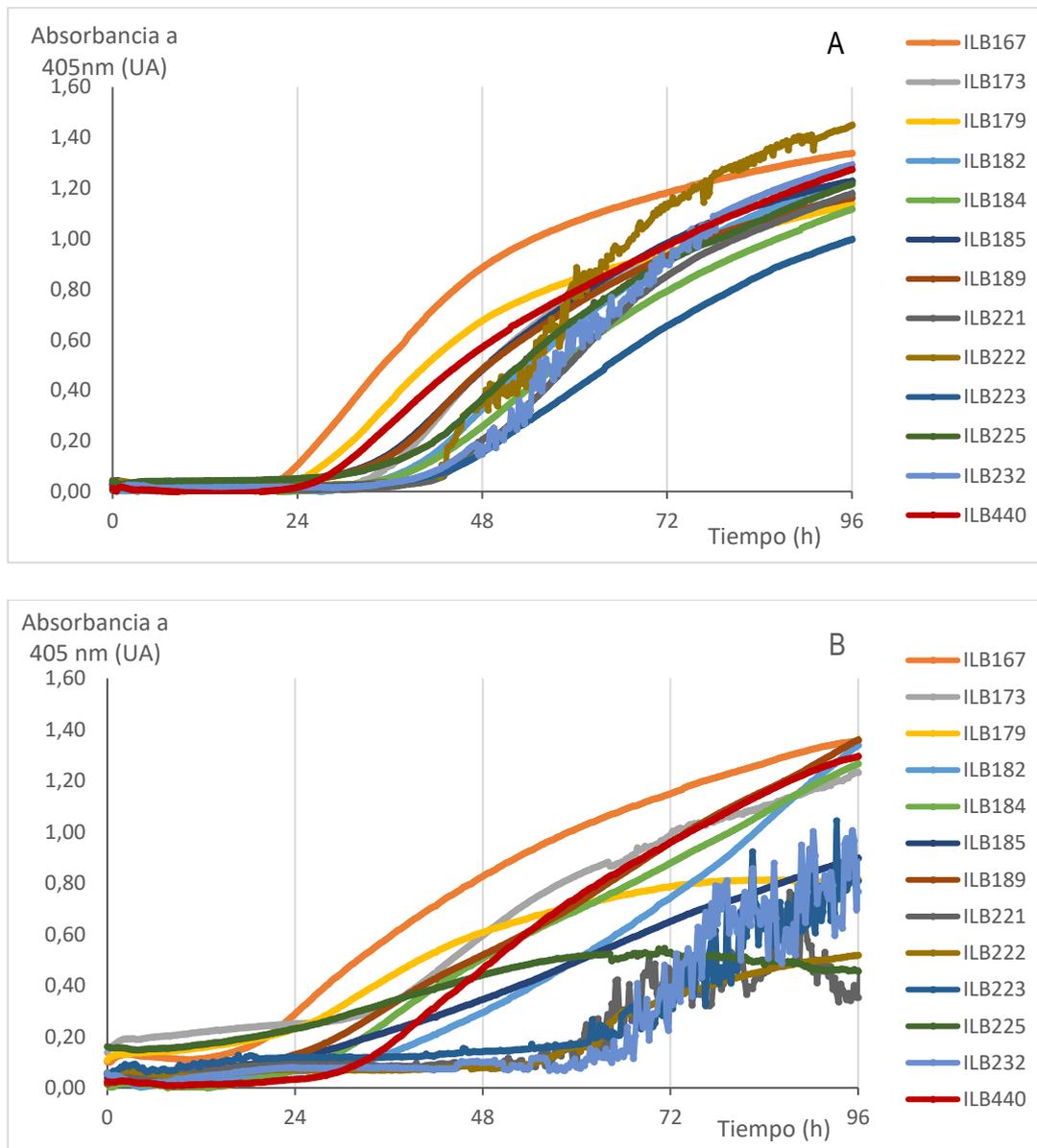
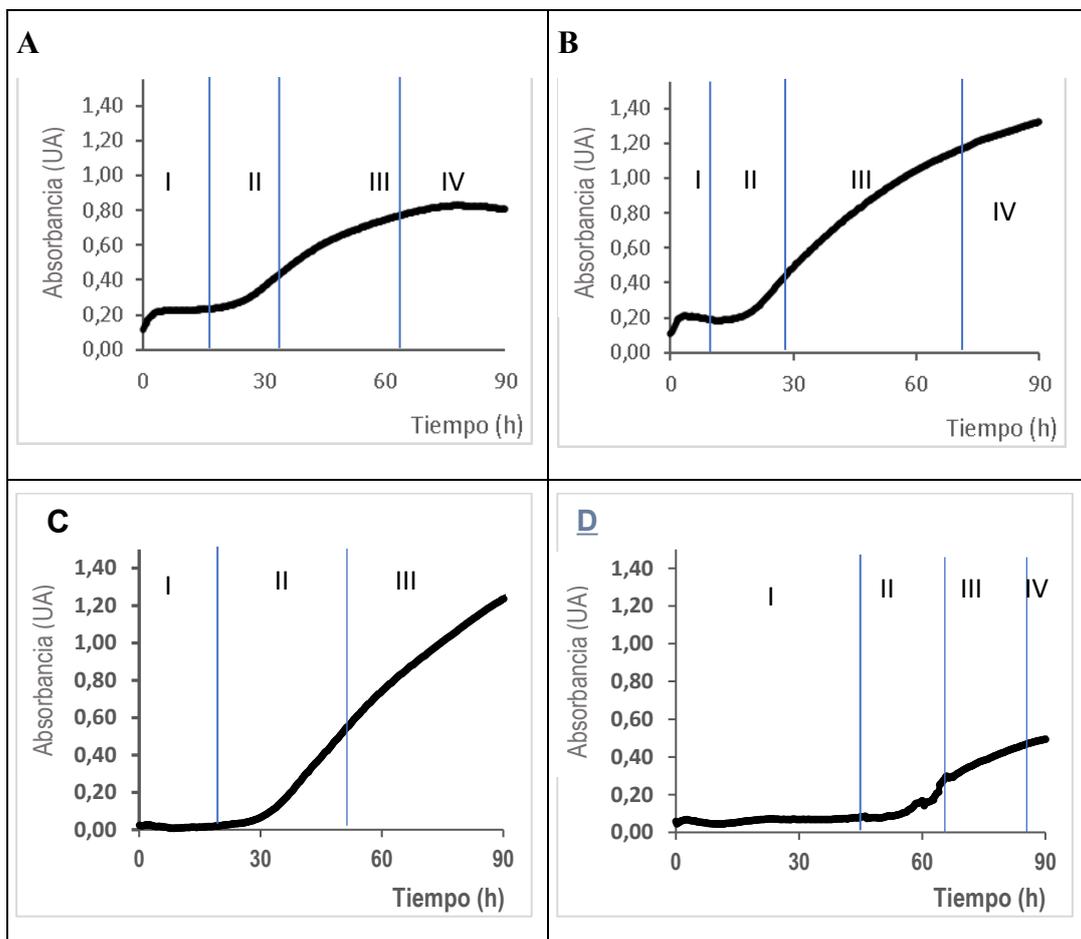
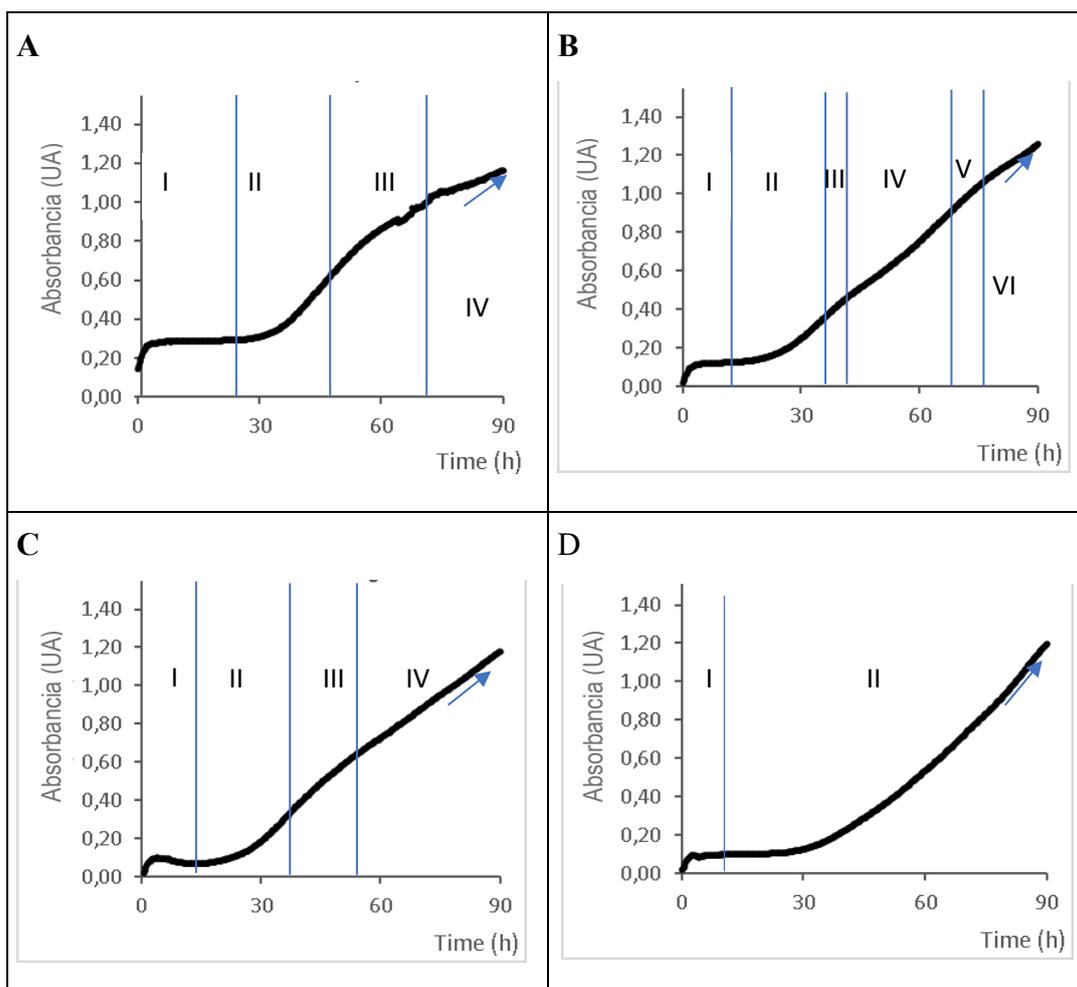


Figura 3. 2. Representación gráfica del crecimiento de *Metarhizium* spp. en caldo de papa-dextrosa (arriba) y en exudado de raíz de soja G. max N5909 (abajo). Cambios de densidad óptica (UA) en función del tiempo en horas (h) de cada uno de los trece aislamientos de *Metarhizium* spp.,. Cada curva es resultado del promedio de seis curvas de crecimiento de cada aislamiento en cada uno de los dos medios ensayados, caldo de papa-dextrosa y en exudado de raíz de soja G. max N5909. A Crecimiento de *Metarhizium* spp. en caldo papa-dextrosa, B Crecimiento de *Metarhizium* spp. en Exudado de G. max N5909. Los números a la derecha corresponden a los 13 aislamientos de *Metarhizium* de la colección: ILB167 e ILB 440 (*M. robertsii*); ILB173, ILB179, ILB221, ILB222, ILB223, ILB225 e ILB232 (*M. lepidiotae*); ILB182 e ILB185 (*M. frigidum*); y ILB184 e ILB189 (*M. flavoviride*)

Las curvas de crecimiento en ER de *M. robertsii* ILB167 e ILB440, y de *M. lepidiotae* ILB179, ILB222 e ILB225, presentaron claramente una fase de retardo o fase Lag, seguida de una fase exponencial y, finalmente, una fase estacionaria en desarrollo (Figura 3.3). Mientras que las curvas de crecimiento del resto de los aislamientos en ER, en cambio, no presentaron el patrón de fases planteado anteriormente (Figura 3.4).



**Figura 3. 3.** Curvas de crecimiento típicas de cuatro *Metarhizium* spp. en exudados de raíz de *G. max* N5909. **A-** *M. lepidiotae* ILB179. **B-** *M. robertsii* ILB167. **C-** *M. robertsii* ILB440. **D-** *M. lepidiotae* ILB222 Cambio de DO (405 nm) del cultivo de cada aislamiento vs el tiempo (h). I- fase Lag, II- fase exponencial, III transición (también denominada desaceleración), IV - estacionaria.



**Figura 3. 4** Curvas de crecimiento atípicas de cuatro *Metarhizium* spp. en exudados de raíz de soja Nidera 5909. **A-** *M. lepidiotae* ILB173. **B-** *M. flavoviride* ILB189. **C-** *M. frigidum* ILB184. **D-** *M. frigidum* ILB182. Cambio de DO (405 nm) del cultivo de cada aislamiento vs el tiempo (h). I- fase Lag, II- fase exponencial, III- fase de transición, IV- fase de crecimiento. En la curva abajo a la izquierda la fase IV es una recta de crecimiento constante.

El aislamiento *M. lepidiotae* ILB221 no presentó aumento de la DO en el medio ER en el tiempo del experimento.

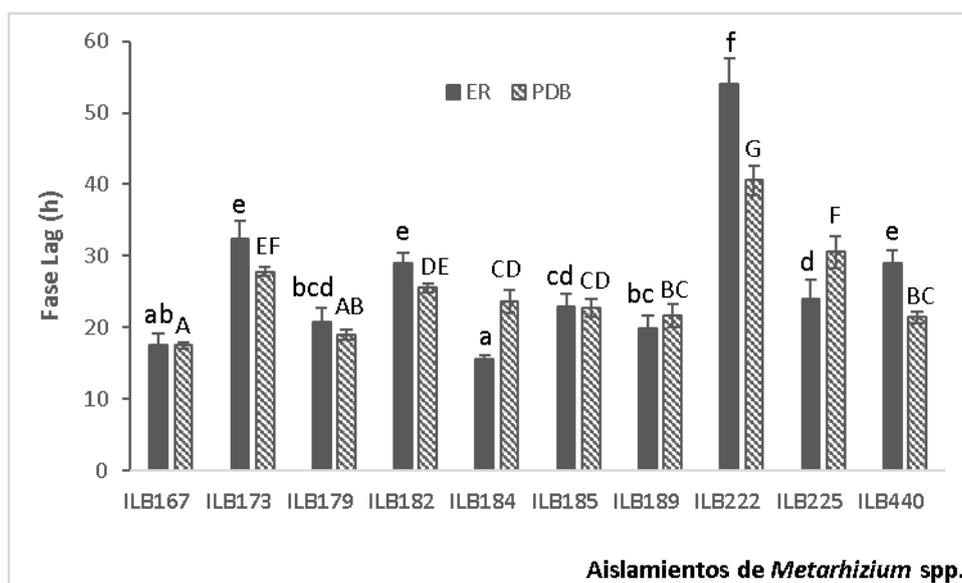
### 3.3.1.1 Cinética del crecimiento de *Metarhizium* spp. en exudados de raíz y en caldo papa dextrosa

A los efectos de caracterizar el crecimiento de *Metarhizium* spp. en los medios ER y PDB se seleccionaron los siguientes parámetros que permiten describir el crecimiento como lo

son: la tasa de crecimiento máxima o velocidad ( $\mu_{\max}$ ), la duración de la fase Lag, y la producción de biomasa determinada por la densidad óptica máxima (DO<sub>max</sub>).

### 3.3.1.2 Tiempo de latencia o fase Lag

El estudio estadístico del tiempo de latencia o fase Lag, demostró que este parámetro depende más de la especie de *Metarhizium* involucrada que del medio. En orden creciente, los aislamientos de la especie *M. flavoviride* obtuvieron valores menores,  $20,2 \pm 1,7$  h, estadísticamente distintos a los aislamientos pertenecientes a las especies *M. frigidum* y *M. lepidiotae* ( $p < 0.05$ ). Luego le siguen los aislamientos pertenecientes a la especie *M. robertsii* con un valor promedio de 21,4 h estadísticamente distinto a los aislamientos pertenecientes a la especie *M. lepidiotae*. Le sigue *M. frigidum*, el tercero en el orden con un valor de 25,0 h y finalmente estadísticamente distinto a los anteriores *M. lepidiotae* ( $p < 0.05$ ) con un valor promedio de 29,7 h.



**Figura 3. 5. Fase Lag media de los diez aislamientos crecidos en exudados de raíz (ER) y en caldo de papa dextrosa (PDB).** Barras indican error estándar (n=6). Letras minúsculas distintas indican medias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) para el medio de ER, y mayúsculas para el medio PDB. Los números en el eje horizontal corresponden a 10 aislamientos de *Metarhizium* de la colección: ILB167 e ILB 440 (*M. robertsii*); ILB173, ILB179, ILB222 e ILB225 (*M. lepidiotae*); ILB182 e ILB185 (*M. frigidum*); y ILB184 e ILB189 (*M. flavoviride*)

Al comparar la fase Lag según aislamiento y medio de cultivo, se encontró que, en ER los aislamientos *M. flavoviride* ILB184 e ILB189 y *M. lepidiotae* ILB225 presentaron una reducción de la fase Lag del 40%, 28% y 38% respectivamente, en comparación con los valores obtenidos en esta variable en PDB ( $p < 0.05$ ).

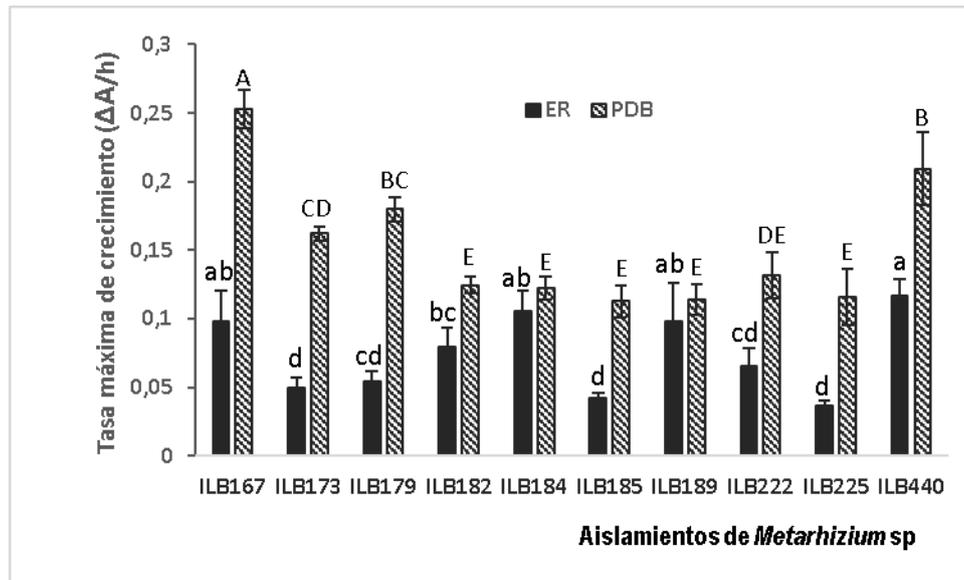
Del análisis de fase Lag de cada uno de los diez aislamientos para cada medio, se obtuvieron los siguientes resultados.

En PDB, los tiempos de fase lag estuvieron entre 17,5 y 40,6 h. El aislamiento *M. robertsii* ILB167, presentó el menor tiempo promedio de  $17,5 \pm 0,4$  horas, significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) a ocho de los nueve aislamientos restantes. El siguiente valor de fase Lag corresponde al aislamiento de *M. lepidiotae* ILB179. Los aislamientos correspondientes a *M. robertsii* ILB440, *M. flavoviride* ILB189, *M. frigidum* ILB185 y *M. flavoviride* ILB184 no se diferenciaron estadísticamente ( $p \geq 0,05$ ), y sus valores promedios estuvieron entre 19,0 a 23,7 h. El resto de los aislamientos tuvieron un período de adaptación de al menos un día, siendo *M. lepidiotae* ILB222 el que mostró una fase de lag mayor a 40 h.

En ER, la comparación de los tiempos de fase Lag entre los aislamientos de *Metarhizium* permitió posicionar en primer lugar a *M. flavoviride* ILB184 y *M. robertsii* ILB167, con un tiempo promedio de  $16,6 \pm 1,3$  horas, seguidos por *M. lepidiotae* ILB179, *M. frigidum* ILB185, *M. flavoviride* ILB189, y *M. lepidiotae* ILB225 con valores promedios entre 19,9 y 23,9 h. El resto de los aislamientos obtuvieron valores promedios mayores a 28.9 h (ver Figura 3.5).

### 3.3.1.3 Tasa de crecimiento o velocidad máxima

En PDB, el conjunto de *Metarhizium* exhibieron  $\mu_{\max}$  mayores que en ER. La media de la tasa de crecimiento medida en cambio de absorbancia en el tiempo a 405 nm en PDB, fue de  $0,153 \pm 0,007 \Delta A/h$ , este valor representa el doble de la media de la  $\mu_{\max}$  en ER con  $0,075 \pm 0,007 \Delta A/h$ . Este resultado es esperable considerando que el PDB es un sustrato rico en dextrosa en una concentración en exceso para el tiempo de cultivo, por lo que el crecimiento fúngico es mayor (Figura 3.6).



**Figura 3. 6. Tasa máxima de crecimiento de diez aislamientos en exudados de raíz (ER) y en caldo de papa dextrosa (PDB).** Las barras indican el error estándar (n=6). Letras minúsculas distintas indican medias significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) para el crecimiento fúngico en medio ER, y mayúsculas para el crecimiento en medio PDB.  $\Delta A/h$  – cambio de absorbancia a 405 nm en el tiempo. Los números en el eje horizontal corresponden a 10 aislamientos de *Metarhizium* de la colección: ILB167 e ILB 440 (*M. robertsii*); ILB173, ILB179, ILB222 e ILB225 (*M. lepidiotae*); ILB182 e ILB185 (*M. frigidum*); y ILB184 e ILB189 (*M. flavoviride*)

Con respecto a la tasa de crecimiento en ambos medios en función de la especie de *Metarhizium*, los dos aislamientos de *M. robertsii* obtuvieron valores de tasas mayores, y los dos aislamientos de *M. frigidum* menores. los dos aislamientos de *M. flavoviride* no obtuvieron diferencias en los valores promedio de  $\mu_{max}$  de ambos medios ( $\mu_{max} = 0,11 \Delta A/h$ ) indicando que tiene igual capacidad de adaptación, pero se ubicó en primer lugar de mayor tasa en el medio ER junto con los dos aislamientos de *M. robertsii* y último lugar en PDB. los cuatro aislamientos de *M. lepidiotae* en cambio tiene una diferencia pronunciada en  $\mu_{max}$  dependiendo del medio, siendo el segundo con mayor tasa en PDB ( $\mu_{max} = 0,15 \Delta A/h$ ) y ubicándose en el último lugar junto con los dos aislamientos de *M. frigidum* en ER ( $\mu_{max} = 0,05 \Delta A/h$ ). A continuación, se detallan los valores según cada medio y por aislamiento.

En PDB, el aislamiento con mayor  $\mu_{max}$  fue *M. robertsii* ILB167 con valores  $0,25 \pm 0,01 \Delta A/h$  significativamente diferente al resto ( $p < 0,05$ ). Le sigue *M. robertsii* ILB440 con

un promedio de  $\mu_{\max}$  de  $0,21 \pm 0,01 \Delta A/h$ . *M. lepidiotae* ILB173 e ILB179 son siguientes aislamientos en tener los valores más altos con un promedio de  $0,17 \pm 0,01 \Delta A/h$ . El resto de los aislamientos obtuvieron valores menores o iguales a  $0,13 \Delta A/h$ .

En ER, los aislamientos con mayor tasa de crecimiento máxima ( $\mu_{\max}$ ) corresponden a *M. robertsii* (ILB167 e ILB440) y *M. flavoviride* (ILB184 e ILB189) con un promedio de  $0,10 \pm 0,01 \Delta A/h$ , el doble de  $\mu_{\max}$  de *M. lepidiotae* (ILB173, ILB179, ILB222 e ILB225) y de *M. frigidum* ILB185 con valor promedio de  $0,050 \pm 0,007 \Delta A/h$ . *M. frigidum* ILB182 obtuvo un valor intermedio, no diferenciándose de forma significativa del resto.

#### 3.3.1.4 Densidad óptica máxima y producción de biomasa fúngica

La determinación de  $DO_{\max}$  permite estimar la concentración de biomasa fúngica producida por los aislamientos crecidos en condiciones líquidas en presencia de ER de soja o en un medio estándar para el cultivo de hongos como el PDB.

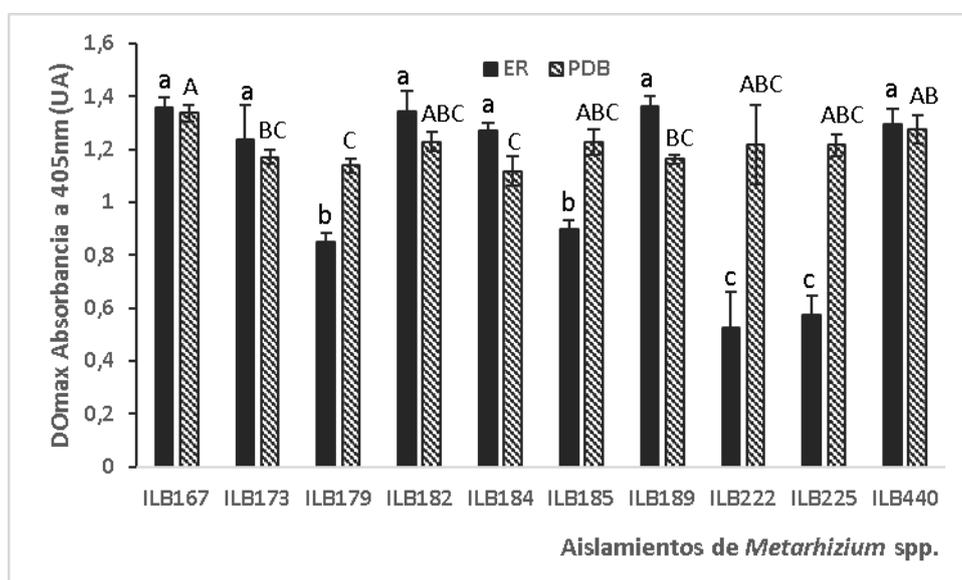
Existen diferencias en la producción de biomasa entre algunas especies. Los valores de  $DO_{\max}$  fueron similares en ambos medios para los aislamientos pertenecientes a las especies de *M. robertsii* y *M. frigidum*. Sin embargo, los aislamientos pertenecientes a las especies *M. flavoviride* y *M. lepidiotae*, no respondieron de igual forma a ambos medios. Los dos aislamientos pertenecientes a *M. flavoviride* producen más biomasa cuando crecen en ER que en PDB, en cambio ocurre a la inversa para los cuatro aislamientos de *M. lepidiotae*. Incluso se encontraron diferencias entre aislamientos dentro de una misma especie. A continuación, se presentan los resultados en función de los aislamientos y los medios.

La producción de biomasa en ambos medios fue similar para los aislamientos *M. robertsii* ILB167, *M. lepidiotae* ILB173 y *M. frigidum* ILB182 ( $p > 0.05$ ). En cambio, los aislamientos *M. flavoviride* ILB184 y ILB189 tuvieron una producción de biomasa un 13 % y un 18 % mayor en ER que en PDB, respectivamente.

En PDB, el rango de  $DO_{\max}$  entre 1,12 y 1,34 unidades de absorbancia a 405 nm (UA) en 96 horas. El aislamiento *M. robertsii* ILB167 fue el que obtuvo mayor producción de biomasa con  $DO_{\max}$  de 1,34 UA. En orden decreciente de producción de biomasa, se encuentran *M. robertsii* ILB440, *M. frigidum* ILB182, *M. frigidum* ILB185, *M. lepidiotae* ILB222 e ILB225. Finalmente, los aislamientos de menor crecimiento en PDB fueron *M.*

*lepidiotae* ILB173, *M. flavoviride* ILB189, *M. lepidiotae* ILB179 y *M. flavoviride* ILB184 se ubicaron en el rango de 1,12 a 1,17 UA a las 96 horas.

En ER, seis de los 11 aislamientos (*M. robertsii* ILB167 e ILB440, *M. flavoviride* ILB184 e ILB189, *M. frigidum* ILB182, *M. lepidiotae* ILB179) tuvieron una producción de biomasa DO máx en el rango de 1,24 y 1,36 UA (Figura 3.7), significativamente diferente al resto de los aislamientos ( $p < 0,05$ ). El promedio de producción de biomasa en ER de estos seis aislamientos supera en un 46 % el valor promedio del resto de los aislamientos. Los aislamientos de menor crecimiento se ubicaron en el rango de DO máx de 0,52 y 0,90 UA.



**Figura 3. 7. Biomasa máxima alcanzada de los diez aislamientos crecidos en exudados de raíz (ER) y en caldo de papa dextrosa (PDB).** Barras indican error estándar (n=6). Letras minúsculas distintas indican medias significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) para el medio de ER, y mayúsculas para el medio PDB. Los números en el eje horizontal corresponden a 10 aislamientos de *Metarhizium* de la colección: ILB167 e ILB 440 (*M. robertsii*); ILB173, ILB179, ILB222 e ILB225 (*M. lepidiotae*); ILB182 e ILB185 (*M. frigidum*); y ILB184 e ILB189 (*M. flavoviride*)

### 3.3.1.5 Crecimiento y Adaptación de *Metarhizium spp.* en Medios PDB y ER: Variabilidad Intraespecífica y Correlaciones de Parámetros Cinéticos

Al comparar los parámetros seleccionados (fase Lag,  $\mu_{\max}$  y DO<sub>max</sub>) que caracterizan el crecimiento en PDB dentro de cada especie de *Metarhizium*, se determinó que los aislamientos de *M. flavoviride* ILB184 e ILB189 no presentaron diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) en ninguno de los tres parámetros. Lo mismo ocurrió con los aislamientos de la especie *M. frigidum*, ILB182 e ILB184.

En PDB, los cuatro aislamientos de *M. lepidiotae* (ILB173, ILB179, ILB222 e ILB225), no presentaron diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) con respecto a la DO<sub>max</sub>, mientras que se encontraron diferencias significativas en los valores tasa de crecimiento, y fase Lag. Dentro de ellos se destaca *M. lepidiotae* ILB179, con el valor más alto de tasa de crecimiento y el más bajo tiempo de latencia o fase Lag.

Por otra parte, *M. robertsii* ILB167 e ILB440, se comportaron en forma similar en PDB, ya que no presentaron diferencias significativas ni en la tasa máxima de crecimiento, ni en DO<sub>max</sub> ( $p \geq 0,05$ ). Sin embargo, sí fue diferente el tiempo de adaptación al medio en donde presentaron diferencias significativas en la duración de la fase Lag ( $p < 0,05$ ).

Con respecto a la caracterización del crecimiento en ER según los parámetros seleccionados (fase Lag,  $\mu_{\max}$  y DO<sub>max</sub>) dentro de cada especie de *Metarhizium*, se determinó que los aislamientos de *M. flavoviride* ILB184 e ILB189 se comportaron en forma similar y no presentaron diferencias significativas ni en la tasa máxima de crecimiento, ni en DO<sub>máx</sub> ( $p \geq 0,05$ ). Sin embargo, sí fue diferente el tiempo de adaptación al medio en donde presentaron diferencias significativas en la duración de la fase Lag ( $p < 0,05$ ).

*M. frigidum* ILB182 e ILB185, mostraron diferencias significativas entre ambos en los tres parámetros de crecimiento. Lo que indica que a pesar de pertenecer a la misma especie son fenotípicamente muy distintos en su capacidad de adaptación al ER.

Por su parte, los cuatro aislamientos no descartados de *M. lepidiotae* (ILB173, ILB179, ILB222 e ILB225), no presentaron diferencias significativas con respecto a la tasa de crecimiento, mientras que se encontraron diferencias significativas en los valores de DO máx y fase Lag.

Finalmente, *M. robertsii* ILB167 e ILB440, se comportaron de forma similar y no presentaron diferencias significativas ni en la tasa máxima de crecimiento, ni en  $DO_{max}$  ( $p \geq 0,05$ ). Sin embargo, sí fue diferente el tiempo de adaptación al medio en donde presentaron diferencias significativas en la duración de la fase Lag ( $p < 0,05$ ). Estas diferencias en la fase Lag posicionan a *M. robertsii* ILB167 con mayor capacidad de adaptarse al medio ER que *M. robertsii* ILB440.

### 3.3.1.6 Correlación entre los parámetros de crecimiento

Se realizó un estudio de correlación de variables de Pearson, a partir del cual se determinaron los coeficientes de correlación. El coeficiente de correlación permite identificar el grado de asociación de las variables para cada medio, es una medida de dependencia lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas. El coeficiente va de -1 a 1. Cuánto más cerca del valor absoluto de uno “1” es el coeficiente, más alta es la dependencia lineal entre las variables. Si es cercano a cero, las variables son independientes una de otra.

Cuando dos parámetros son independientes, pueden contribuir de manera independiente y positiva a la caracterización de una cepa, lo que significa que cada parámetro proporciona información única y valiosa sobre la cepa sin verse influenciado por el otro parámetro. Esto permite una evaluación más completa y precisa de las características de la cepa, ya que ambos parámetros pueden ser evaluados individualmente sin interferencias o sesgos debido a su relación entre sí. Dicho esto, se presentan los resultados de las correlaciones entre los parámetros de crecimiento según cada medio.

En PDB, la variable  $\mu_{max}$  de los aislamientos de *Metarhizium* tiene una correlación media positiva con  $DO_{máx}$  y una correlación media negativa con la fase Lag ( $p < 0,05$ ). Fase Lag y  $DO_{máx}$  no se correlacionan en los aislamientos de *Metarhizium* crecidos en el medio PDB.

En el medio ER se determinó que la  $\mu_{max}$  y la fase Lag de los aislamientos de *Metarhizium*, no están correlacionadas ( $p > 0,05$ ). En cambio, las variables  $DO_{máx}$  y la fase Lag presentan una correlación negativa media ( $p < 0,05$ ). Por su parte,  $DO_{máx}$  y  $\mu_{max}$  tienen una correlación positiva media ( $p < 0,05$ ), ver tabla 3.3.

Considerando la independencia de las variables,  $\mu_{\max}$  y de fase Lag en ER, se utilizaron los valores obtenidos de estos parámetros en cada aislamiento de *Metarhizium* como un par de coordenadas, que permita identificar gráficamente el desempeño de los aislamientos en este medio (Figura 3.8). El gráfico se separó en cuadrantes de acuerdo con el análisis estadístico, el cual permitió agrupar a los aislamientos de *Metarhizium* en tres categorías, alto, medio y bajo desempeño. El cuadrante superior izquierdo (Figura 3.8 - cuadrante I) corresponde a aquellos aislamientos de *Metarhizium* que estadísticamente obtuvieron los valores más altos en ambas variables (Figura 3.8.).

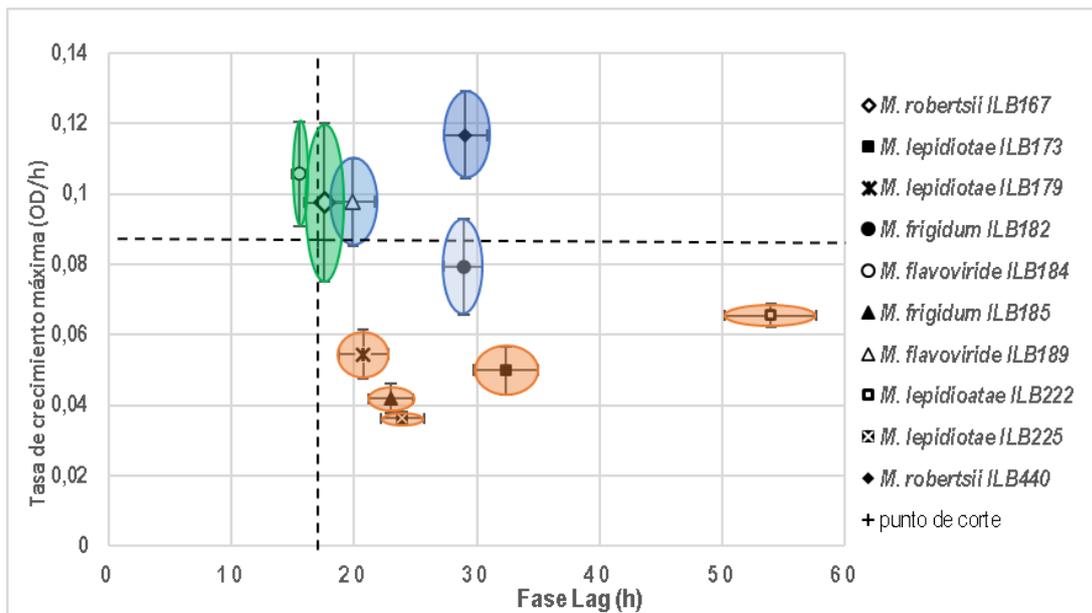
**Tabla 3. 3. Valores de correlación entre las variables seleccionadas del crecimiento fúngico en exudados de raíz y caldo papa dextrosa.**

Variable (1)	Variable (2)	n	Coefficiente de Pearson	p-valor
<b>Medio: PDB</b>				
$\mu_{\max}$	DO máx.	58	0,37	0,0038*
$\mu_{\max}$	Fase Lag	58	-0,44	0,0005*
DO máx.	Fase Lag	58	-0,01	0,9522
<b>Medio: ER</b>				
$\mu_{\max}$	DO máx.	58	0,49	0,0001*
$\mu_{\max}$	Fase Lag	58	-0,15	0,2703
DO máx.	Fase Lag	58	-0,47	0,0002*

Coefficientes de correlación de Pearson para los tres parámetros seleccionados que caracterizan el crecimiento fúngico, obtenidos a partir de las curvas de crecimiento de *Metarhizium* spp. en exudados de raíz (ER) y caldo papa dextrosa (PDB). Tasa de crecimiento máxima ( $\mu_{\max}$ ). Fase de retardo (Fase Lag). Densidad óptica máxima (DO máx). \* indica que hay correlación entre la variable (1) y la variable (2).

En resumen: Los aislamientos *M. robertsii* ILB167 y *M. flavoviride* ILB184 presentaron una rápida adaptación al medio ER, con valores de fase Lag menores a 17,1 h, y un uso eficiente de los nutrientes proporcionado por los exudados y reflejado en  $\mu_{\max} \geq 8,7 \times 10^{-2} \Delta A/h$  (estos se muestran en celeste en la Figura 3.8.). Además, presentaron valores máximos de biomasa a las 96 horas de crecimiento en ER comparables con la biomasa

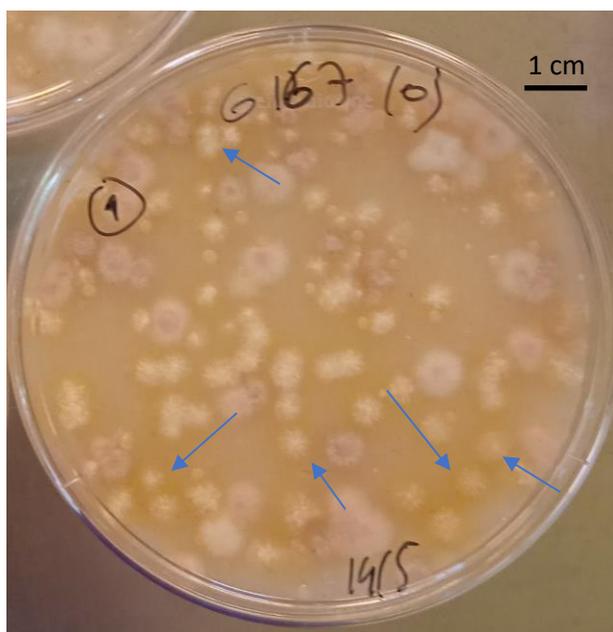
producida en el medio sintético PDB (Figura 3.7). Estos aislamientos se muestran en verde en el cuadrante superior izquierdo de la Figura 3.8. Luego con un tiempo de adaptación al medio más lento, fase Lag > 17.1 h, pero con alta velocidad de crecimiento ( $\mu_{\max} \geq 8,7 \times 10^{-2} \Delta A/h$ ) y altos valores de producción de biomasa se hallan los aislamientos: *M. frigidum* ILB182, *M. flavoviride* ILB189 y *M. robertsii* ILB440 en color azul. Los cuatro aislamientos pertenecientes a la especie *M. lepidiotae* (ILB173, ILB179, ILB222 e ILB225) presentaron valores de fase Lag superiores a 17.1 h y  $\mu_{\max} \geq 8,7 \times 10^{-2} \Delta A/h$ . Salvo *M. lepidiotae* ILB173, el resto obtuvieron baja producción de biomasa al final del experimento, con valores menores a 0,88 DO<sub>máx</sub>. Los aislamientos de *M. lepidiotae* se encuentran en color rojo en el cuadrante inferior derecho de la Figura 3.8 junto con *M. frigidum* ILB185.



**Figura 3. 8. Capacidad de *Metarhizium* de crecimiento en ER según la fase Lag y la tasa de crecimiento máxima.** Los aislamientos se graficaron según los valores obtenidos de la fase Lag y de la tasa de crecimiento máxima ( $\mu_{\max}$ ). En color verde se indican aquellos aislamientos que obtuvieron los mejores valores en los dos parámetros de crecimiento en azul aquellos que tienen un solo parámetro en la primera categoría, y finalmente en rojo aquellos aislamientos que no cumplen con ninguna de las condiciones anteriores. Las barras indican error estándar para cada parámetro. La línea punteada horizontal indica el límite de la primera categoría para la tasa de crecimiento máxima ( $\mu_{\max} \geq 8,7 \times 10^{-2} \Delta A/h$ ) y la línea punteada vertical el límite de la primera categoría de fase Lag (tiempo  $\leq 17,1$  h).

### 3.3.2 CAPACIDAD DE *Metarhizium* sp. DE COLONIZAR LA RIZOSFERA

El suelo rizosférico de *Glycine max* N5909 y *Glycine max* G5602 tratadas con *M. robertsii* ILB167 e ILB440 mostró un gran número de colonias con características macroscópicas similares a *M. robertsii* (Figura 3.9), las cuales no se encontraron en el suelo rizosférico del control sin tratar. En medio sólido MSM, las colonias de *M. robertsii* presentan inicialmente una forma radial filamentosa, color blanco y un pigmento amarillo circundante como se ve en la Figura 3.9 (flechas azules). Algunas placas con colonias aisladas se dejaron crecer 7 días más, observándose un cambio de color del blanco al amarillo y finalmente al verde oscuro-amarronado, característico de los conidios maduros. La forma elipsoidal de los conidios y la presencia de conidióforos fueron confirmadas mediante microscopía óptica.



**Figura 3. 9. Presencia de *M. robertsii* ILB167 en suelo rizosférico a 39 días de su inoculación en las semillas de *G. max* G5602.** Placa de Petri con medio semi-selectivo de Metarhizium, con suspensión de suelo rizosférico de plantas de 39 días (*G. max* G5602) tratadas con conidios de *M. robertsii* ILB167. Cultivo de 7 días a 25°C. Las flechas azules indican colonias radiales filamentosas blancas, rodeadas de pigmento amarillo, similares a *M. robertsii*.

El recuento de ufc de *M. robertsii* ILB167 por gramo de suelo rizosférico de la variedad de *G. max* N5909, fue más de cuatro veces el recuento del suelo rizosférico de *G. max* G5206. En cambio, el recuento de ufc de *M. robertsii* ILB440 por gramo de suelo rizosférico de la variedad de *G. max* N5909, fue 20 veces menor que el recuento del suelo rizosférico de *G. max* G5206. Por lo cual, *M. robertsii* ILB167 parece tener mayor capacidad de colonizar el suelo rizosférico de la variedad *G. max* N5909 y *M. robertsii* ILB440 el de la variedad *G. max* G5602 (Tabla 3.4).

Tabla 3. 4. Capacidad de *M. robertsii* ILB167 e ILB440 de colonizar la rizosfera de dos variedades de soja (N5909 y G5602).

Tratamiento	<i>Glycine max</i> N5909 (ufc/g de suelo rizosférico ± E.E.)	<i>Glycine max</i> G5602 (ufc/g de rizosférico ± E.E.)
<i>M. robertsii</i> ILB167	1900 ± 700	490 ± 110
<i>M. robertsii</i> ILB440	190 ± 17	3800 ± 1700
Control	0	0

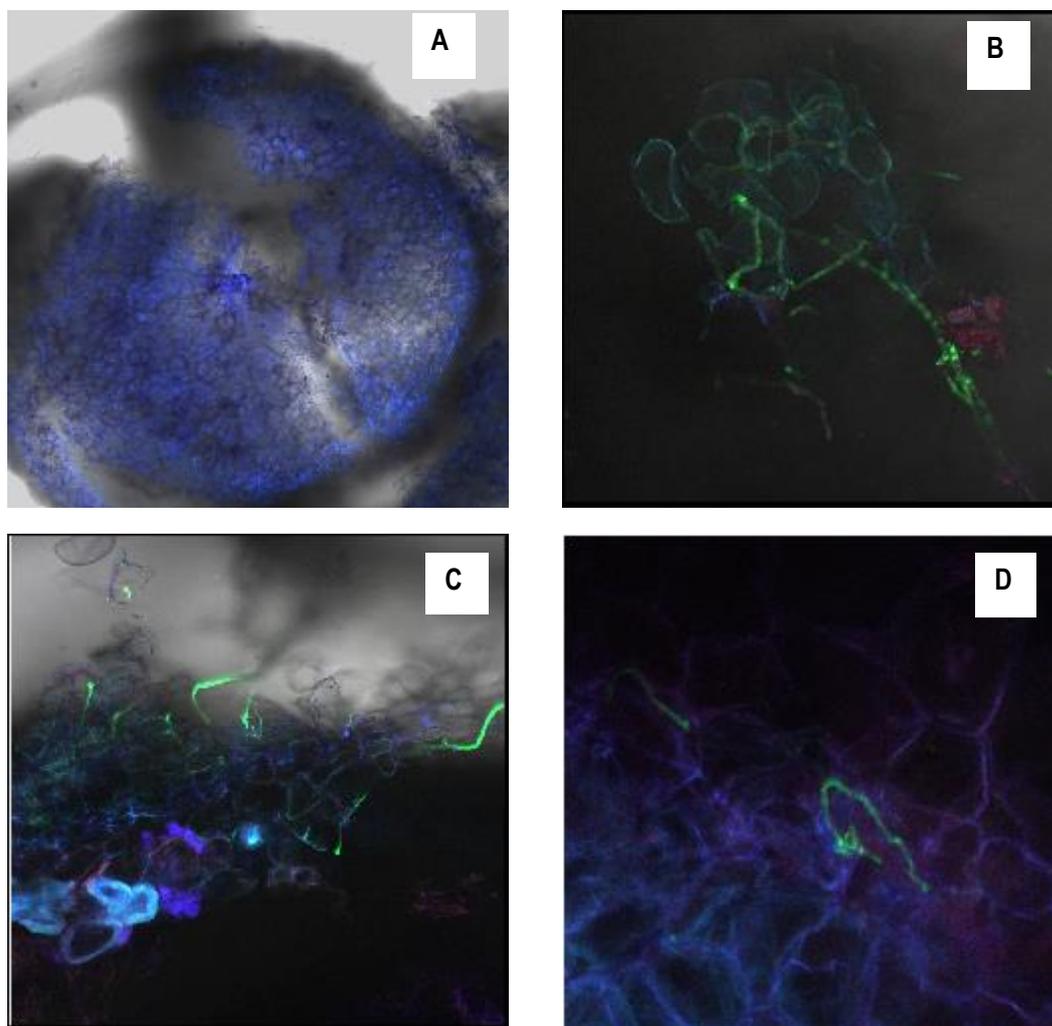
El suelo rizosférico de plantas cosechadas a los 39 días de la siembra. E.E. Error estándar (n = 3).

### 3.3.3 CAPACIDAD ENDOFÍTICA EN RAÍCES DE SOJA DE *Metarhizium* sp.

La capacidad de *M. robertsii* ILB167 e ILB440 para establecerse como endófitos en las raíces de las variedades *Glycine max* N5909 y G5602 no pudo ser confirmada mediante ninguna de las dos metodologías empleadas. En primer lugar, la siembra directa de fragmentos de raíces en medio selectivo no resultó en la aparición de colonias características de *Metarhizium* en ningún fragmento de las raíces de las plantas inoculadas cosechadas a los 39 días de la siembra. En segundo lugar, la metodología de homogenizado de raíces y posterior cultivo en medio selectivo tampoco permitió la detección de *M. robertsii* ILB167 o ILB440, debido a la ausencia de colonias características de *Metarhizium* en todos los homogenizados de las raíces de las plantas inoculadas.

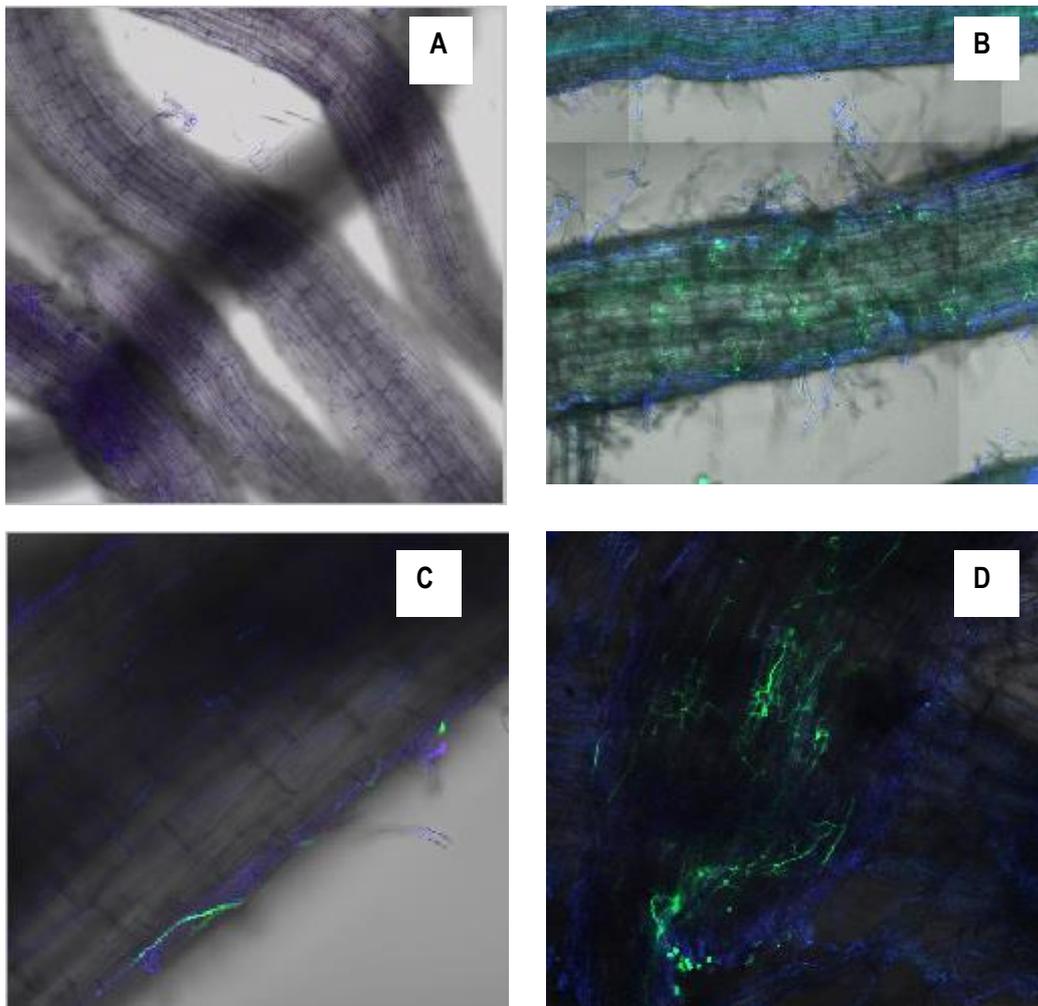
### 3.3.4 COLONIZACIÓN DE RAÍCES DE SOJA POR *M. robertsii*, MEDIANTE MICROSCOPIA LASER CONFOCAL DE FLUORESCENCIA

Mediante microscopía laser confocal de fluorescencia fue posible observar las hifas de *M. robertsii* (ILB167 e ILB440) en nódulos (Figura 3.10) y en fragmentos de raíz (Figura 3.11) de *Glycine max* N5909 y G5602. Esta técnica confirma la capacidad de *M. robertsii* (ILB167 e ILB440) de asociarse con la raíz y por tanto de aprovechar los recursos nutritivos que esta le brinda lo que posibilita la supervivencia en el sistema radicular.



**Figura 3. 10.** Colonización de nódulos y raíz en plantas de soja G5602 a partir de semillas tratadas con *M. robertsii* ILB167 e ILB440 observadas por MLCF. En verde - estructuras hifales marcadas con WGA-AF488. En azul - Tejidos vegetales marcados con Ioduro de Propidio. A – Nódulo control sin tratamiento de *Metarhizium* (10x). B – Nódulo de soja N5909 tratada con *M. robertsii* ILB167 (10x). C – Corte superficial de nódulo de soja N5909 tratada con *M. robertsii* ILB440 (20x). D – Corte de nódulo de soja G5602 tratada con *M. robertsii* ILB440 (20x).

Por otra parte, en las raíces y nódulos tratados con *M. robertsii* (ILB167 e ILB440), no se observaron zonas de penetración del tejido vegetal por parte de las hifas del hongo. Esto se evidenció por la ausencia en todas las muestras del marcador de penetración tisular, el fluoróforo ConA-AF633, el cual, de haber estado presente, se habría observado en las imágenes como puntos rojos definidos.



**Figura 3. 11. Colonización de raíz en plantas de soja N5909 a partir de semillas tratadas con *M. robertsii* ILB167 e ILB440 por MLCF. En verde - estructuras hifales marcadas con WGA-AF488. En azul - Tejidos vegetales marcados con Ioduro de Propidio. A – Raíz control sin tratamiento de Metarhizium. B – Raíz de soja N5909 tratada con *M. robertsii* ILB167. C – Raíz de soja *G. max* G5602 tratada con *M. robertsii* ILB440 (10x). D – Raíz de soja *G. max* N5909 tratada con *M. robertsii* ILB440 (20x).**

### 3.3.4.1 Efectividad de la adherencia de los conidios a las semillas de soja

Cabe destacar que la adherencia de los conidios a la cutícula de las semillas de soja utilizadas en los experimentos de las secciones anteriores resultó en un rango de entre  $1,17 \times 10^4$  a  $2,83 \times 10^4$  ufc/ semilla (ver tabla 3.5). Las semillas de la variedad G. max G5602 exhibieron una cantidad más alta de ufc/semilla en comparación con la variedad G. max N5909. Esta disparidad podría atribuirse al mayor tamaño de las semillas de la primera variedad, lo que resultaría en una superficie de semilla mayor en comparación con la segunda.

Tabla 3. 5. Control del recubrimiento de semillas de soja con *M. robertsii* ILB167 e ILB440

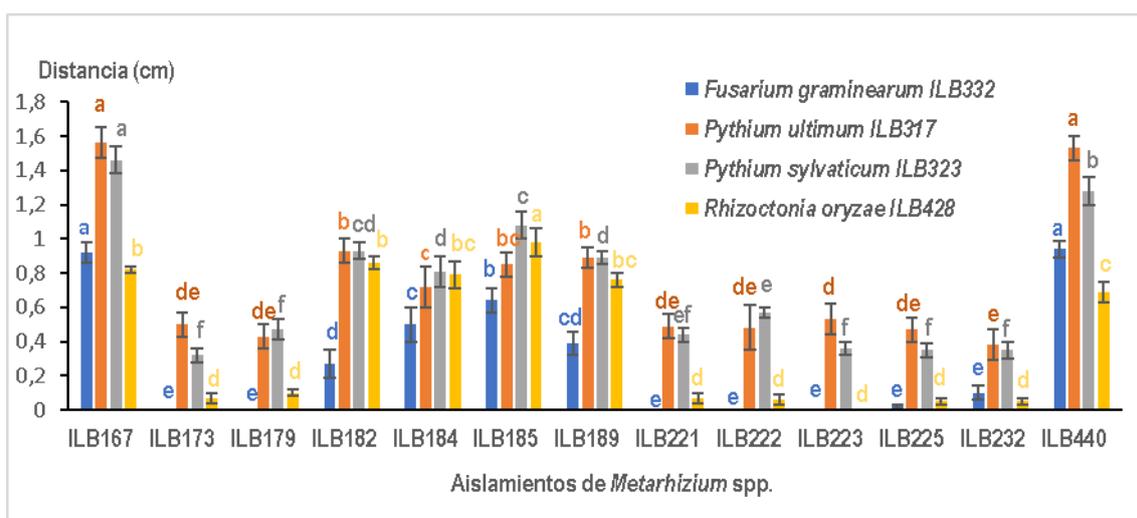
Aislamiento	Variedad de soja	Suspensión inicial (ufc/mL)	Carga por semilla (ufc/semilla)
<i>M. robertsii</i> ILB167	N5909	9,68 E+07	1,17 E+04
<i>M. robertsii</i> ILB167-	G5602	1,04 E+08	2,83 E+04
<i>M. robertsii</i> ILB440	N5909	7,50 E+07	1,35 E+04
<i>M. robertsii</i> ILB440	G5602	7,50 E+07	1,76 E+04

## 3.4 ANTAGONISMO Y CONTROL DE FITOPATÓGENOS

### 3.4.1 *Metarhizium* spp. COMO ANTAGONISTA DE CUATRO FITOPATÓGENOS DE SOJA

Se determinaron los efectos antagonistas de varias especies de *Metarhizium* contra los fitopatógenos, revelando diferencias significativas tanto en los porcentajes de inhibición del fitopatógeno, como en la distancia de los espacios de interacción para ejercer el efecto antifúngico entre las especies (valor de  $p \leq 0,01$ ). Los dos aislamientos de la especie *M. robertsii* exhibieron el mayor porcentaje de inhibición, con un valor promedio del 40,2%, lo que señala una destacada actividad antifúngica contra los fitopatógenos ensayados. Los aislamientos de *M. robertsii* fueron seguidos por los aislamientos de *M. frigidum* y *M. lepidiotae*, que mostraron un porcentaje de inhibición antifúngica moderado de aproximadamente el 20%. Finalmente, los dos aislamientos de *M. flavoviride* exhibieron los porcentajes de inhibición más bajos con un promedio de 14,5% (Figura 3.12). En cuanto a la distancia del espacio de interacción, los dos aislamientos de *M. robertsii*

mostraron distancias mayores con un promedio de 1,2 cm, sugiriendo una actividad antifúngica efectiva sobre un área más grande (Figura 3.13). Por el contrario, los aislamientos de las especies *M. flavoviride* y *M. frigidum* mostraron distancias más cortas de 0,7 cm y 0,8 cm, respectivamente, mientras que los aislamientos de la especie *M. lepidiotae* exhibieron las distancias más cortas de 0,2 cm. El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre las especies de *Metarhizium* tanto en los porcentajes de inhibición como en las distancias para ejercer el efecto antagonista.



**Figura 3. 12. Espacio de interacción entre *Metarhizium* y cuatro fitopatógenos fúngicos en cultivos duales. Las Barras corresponden al error estándar (n=9). Letras distintas en cada patógeno (correspondiente a un color distinto) son significativamente diferentes con test de Fisher ( $p$ -valor $\leq$ 0.05). . Los números en el eje horizontal corresponden a los 13 aislamientos de *Metarhizium* de la colección: ILB167 e ILB 440 (*M. robertsii*); ILB173, ILB179, ILB221, ILB222, ILB223, ILB225 e ILB232 (*M. lepidiotae*); ILB182 e ILB185 (*M. frigidum*); y ILB184 e ILB189 (*M. flavoviride*)**

El porcentaje de inhibición indica la efectividad de *Metarhizium* en suprimir el crecimiento del fitopatógeno ensayado. Además, la medición de la distancia del espacio de interacción revela la relación espacial entre *Metarhizium* sp. y el fitopatógeno correspondiente, indicando la proximidad o distancia requerida para que ocurra la inhibición. Esta información permitió evaluar no solo el potencial inhibitorio de las especies o aislamientos de *Metarhizium*, sino también la dinámica espacial de su interacción con el fitopatógeno específico, proporcionando conocimientos sobre su eficacia de control biológico. A continuación, se presentan los resultados de estos dos parámetros, en función de cada uno de los fitopatógenos evaluados por separado.

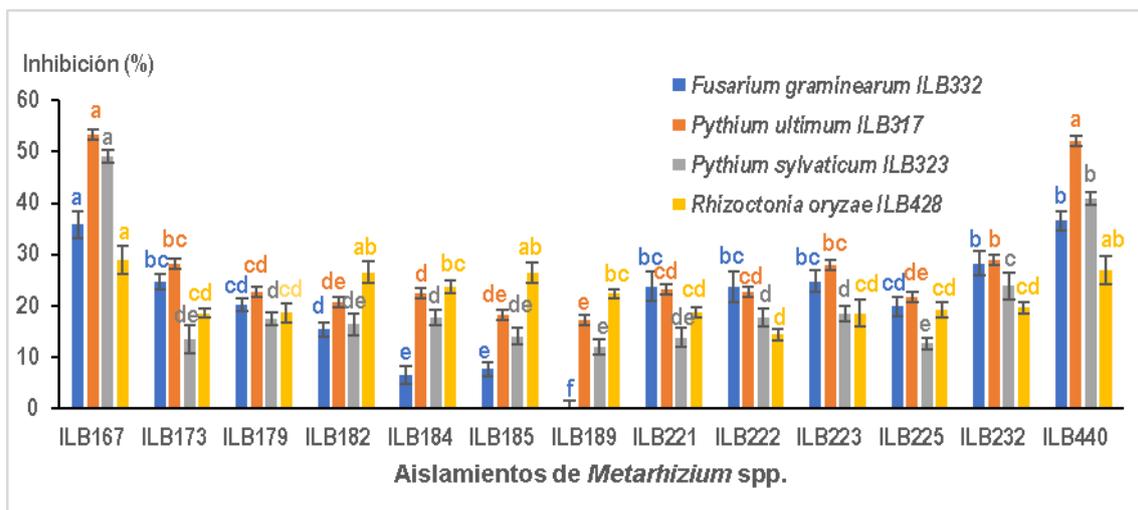


Figura 3. 13. Porcentaje de inhibición de fitopatógenos fúngicos en cultivos duales. Barras corresponden al error estándar (n=9). Letras distintas en cada patógeno (correspondiente a un color distinto) son significativamente diferentes con test de Fisher ( $p\text{-valor} \leq 0.05$ ). Los números en el eje horizontal corresponden a los 13 aislamientos de *Metarhizium* de la colección: ILB167 e ILB 440 (*M. robertsii*); ILB173, ILB179, ILB221, ILB222, ILB223, ILB225 e ILB232 (*M. lepidiotae*); ILB182 e ILB185 (*M. frigidum*); y ILB184 e ILB189 (*M. flavoviride*)

### 3.4.1.1 Antagonismo de *Metarhizium* contra *Fusarium graminearum* ILB332

En cuanto al espacio de interacción entre *Metarhizium* y *F. graminearum* ILB332, todos los aislamientos con excepción de los pertenecientes a la especie *M. lepidiotae*, tuvieron valores distintos de cero entre 0,30 a 0,90 cm (figura 3.12). Se consideró un valor de 0,45 cm que corresponde a un 50% del espacio de interacción máxima y que sitúa a los aislamientos *M. robertsii* ILB167, *M. flavoviride* ILB184, *M. frigidum* ILB185 y *M. robertsii* ILB440 por encima de dicho valor. El resto de los aislamientos se ubicaron por debajo de los 0,45 cm y con rangos de espacios de interacción de 0 a 0,39 cm.

Con respecto al índice de inhibición, la mayoría de los aislamientos fueron capaces de inhibir entre un 8 y 37 % a *F. graminearum* ILB332 (Figura 3.13). Se consideró un valor de 18 % correspondiente a un 50% de la inhibición máxima, que sitúa a todos los aislamientos pertenecientes a las especies de *M. robertsii* y *M. lepidiotae* por encima de dicho valor. El resto de los aislamientos pertenecientes a las especies *M. frigidum* y *M.*

*flavoviride* se ubicaron por debajo de 18% de inhibición de *F. graminearum* ILB332, con rangos de inhibición del 0 a 15%.

En lo particular, se destacan los aislamientos correspondientes a *M. robertsii* ILB167 e ILB440, los cuales exhibieron un espacio de interacción de aproximadamente 1,0 cm, significativamente mayor al resto de los 11 aislamientos de *Metarhizium* spp. ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 3.12). Este valor de espacio de interacción de *M. robertsii* es casi 1,5 veces superior al registrado para *M. frigidum* ILB185, que les sigue en la secuencia de valores de espacio de interacción (Figura 3.11), y es casi el doble de *M. flavoviride* ILB184 e ILB189, así como de *M. frigidum* ILB182. Además, *M. robertsii* ILB167 e ILB440 presentaron el porcentaje de inhibición más alto, con  $36 \pm 2 \%$ , 1,3 veces mayor al siguiente valor correspondiente a *M. lepidiotae* ILB232, y 1,6 veces mayor que el resto de los a *M. lepidiotae* (Figura 3.13). No obstante, todos los aislamientos de *M. lepidiotae* presentaron un espacio de interacción prácticamente nulo con *F. graminearum* ILB332 (Figura 3.12)

#### **3.4.1.2 Antagonismo de *Metarhizium* contra *Rhizoctonia oryzae* ILB428**

En general, los espacios de interacción de la mitad de los aislamientos de *Metarhizium* y *R. oryzae* ILB428 estuvieron entre 0,7 a 1,0 cm. La otra mitad de los aislamientos, todos ellos pertenecientes a la especie de *M. lepidiotae*, presentaron un espacio de interacción prácticamente nulo.

Con respecto al porcentaje de inhibición de *R. oryzae* ILB428, los aislamientos de *Metarhizium* lograron inhibir entre el 14 y 29 %.

En particular, en cuanto al espacio de interacción, se destacan *M. frigidum* ILB185 con valores de  $1,0 \pm 0,1$  cm, seguido por *M. robertsii* ILB167, *M. frigidum* ILB182, *M. flavoviride* ILB184, *M. flavoviride* ILB189 y *M. robertsii* ILB440, con valores promedio entre 0,7 y 0,9 cm (Figura 3.12). Por último, los aislamientos correspondientes a *M. lepidiotae* presentaron un espacio de interacción prácticamente nulo, con valores que no superaron los 0,1 cm.

Los aislamientos que se destacaron en lo referente al índice de inhibición de *Rhizoctonia oryzae* ILB428, fueron en primer lugar *M. robertsii* ILB167 luego le siguen en valores *M. robertsii* ILB440, *M. frigidum* ILB182 e ILB185, con valores de inhibición que oscilan

entre 26 y 29 % (Figura 3.13), estadísticamente sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), con un promedio de  $27 \pm 1$  %. Cercanos a estos se encuentran *M. flavoviride* ILB184 e ILB189 con valores de  $23 \pm 2$ %. Todos los aislamientos correspondientes a *M. lepidiotae* exhibieron porcentajes de inhibición inferiores, con valores entre 14 y 20 %, en algunos casos la mitad de los valores alcanzados por el grupo destacado.

#### 3.4.1.3 Antagonismo de *Metarhizium* contra *Pythium ultimum* ILB317

Los espacios de interacción entre *Metarhizium* spp. y *P. ultimum* ILB317, estuvieron entre 0,4 y 1,6 cm. Se consideró un valor de 0,8 cm que corresponde a un 50% del espacio de interacción máxima y que sitúa a los aislamientos *M. robertsii* ILB167, *M. frigidum* ILB182, *M. flavoviride* ILB184, *M. frigidum* ILB185 y *M. robertsii* ILB440 por encima de dicho valor. El resto de los aislamientos se ubicaron por debajo de los 0,8 cm y con rangos de espacios de interacción de 0,4 a 0,7 cm.

En cuanto al índice de inhibición de *P. ultimum* ILB317, se obtuvieron valores entre el 17 y 53 % de inhibición. Todos los aislamientos de *Metarhizium* fueron capaces de inhibir el crecimiento de *P. ultimum* ILB317 *in vitro*. Tomando en cuenta que 26,5 % es la mitad del valor máximo, los aislamientos con porcentaje de inhibición mayores fueron *M. robertsii* ILB167 e ILB440 con un promedio de  $53 \pm 1$  % y tres aislamientos de la especie *M. lepidiotae* ILB173, ILB223 e ILB232 promedio de  $28 \pm 1$ %. El resto de los aislamientos alcanzaron una inhibición del 17 al 23 %.

Nuevamente los valores de inhibición significativamente más altos ( $p < 0,05$ ) correspondieron a *M. robertsii* ILB167 e ILB440 (ver Figura 3.12), donde el espacio de interacción fue de  $1,6 \pm 0,2$  cm, y el porcentaje de inhibición  $53 \pm 3$  % superando casi el doble los valores de *M. frigidum* (ILB182 e ILB185), *M. flavoviride* (ILB184 e ILB89) y *M. lepidiotae* (ILB173, ILB179, ILB221, ILB222, ILB223, ILB225 e ILB232).

#### 3.4.1.4 Antagonismo de *Metarhizium* contra *Pythium sylvaticum* ILB323

El patrón de inhibición de *Metarhizium* spp. sobre *P. sylvaticum* ILB323, fue similar al observado en *P. ultimum* ILB317 en donde se observó que los espacios de interacción estuvieron entre 0,3 y 1,5 cm. Se consideró un valor de 0,7 cm que corresponde a un 50% del espacio de interacción máxima y que sitúa a los aislamientos *M. robertsii* ILB167, *M.*

*frigidum* ILB182, *M. flavoviride* ILB184, *M. frigidum* ILB185, *M. flavoviride* ILB189 y *M. robertsii* ILB440 por encima de dicho valor. El resto de los aislamientos, todos pertenecientes a la especie de *M. lepidiotae*, se ubicaron por debajo de los 0,7 cm y con rangos de espacios de interacción de 0,3 a 0,6 cm (Figura 3.12).

En cuanto al índice de inhibición de *P. sylvaticum*, se obtuvieron valores entre el 12 y 49 % de inhibición. Tomando en cuenta que 25 % es la mitad del valor máximo, los aislamientos con porcentaje de inhibición mayores fueron *M. robertsii* ILB167 e ILB440 con un promedio de  $45 \pm 1$  %. El resto de los aislamientos alcanzaron una inhibición de 12 a 19%.

En lo particular, nuevamente los aislamientos que se destacaron y presentaron diferencias significativas al resto ( $p < 0,05$ ) fueron en primer lugar *M. robertsii* ILB167 con valores espacios de interacción casi el doble del valor promedio de los aislamientos correspondientes a las especies *M. frigidum* y *M. flavoviride*. En segundo lugar *M. robertsii* ILB440 con valores de  $1,3 \pm 0,1$  cm, 1,4 veces el valor promedio de los aislamientos de crecimiento lento que le siguen en valores de espacio de interacción. *M. robertsii* ILB167 también obtuvo el mayor porcentaje de inhibición, siendo 1,2 veces el valor de *M. robertsii* ILB440, más del doble del valor de *M. lepidiotae* ILB232, tres veces mayor que los aislamientos *M. frigidum* ILB182 e ILB185, *M. flavoviride* ILB184, *M. lepidiotae* ILB173, ILB179, ILB221, ILB222 e ILB223 y cuatro veces mayor que *M. lepidiotae* ILB225 y *M. flavoviride* ILB189 (Figura 3.13).

Adicionalmente se observó que las colonias de los distintos aislamientos de *Metarhizium* alcanzaron diferentes diámetros al final del experimento, por lo que se hizo un estudio comparativo de las mismas (Tabla 3.6).

El análisis comparativo del diámetro de *Metarhizium* spp. registrado al final del estudio de antagonismo determinó que no había diferencias significativas con los controles ( $p > 0,05$ ). Esto indicaría que en el tiempo que duró el experimento los patógenos no inhibieron el crecimiento de ninguno de los aislamientos de *Metarhizium* evaluados. En cambio, sí se encontraron diferencias significativas entre los aislamientos ( $p < 0,05$ ), lo que estaría sugiriendo que los aislamientos tienen velocidades de crecimiento en PDA diferentes.

Utilizando los valores de diámetros de las colonias fúngicas, se calcularon las velocidades de crecimiento de *Metarhizium* al cabo de 10 días (Tabla 3.6). Las velocidades de crecimiento se encontraron en un rango de 0,17 a 0,35 cm/día.

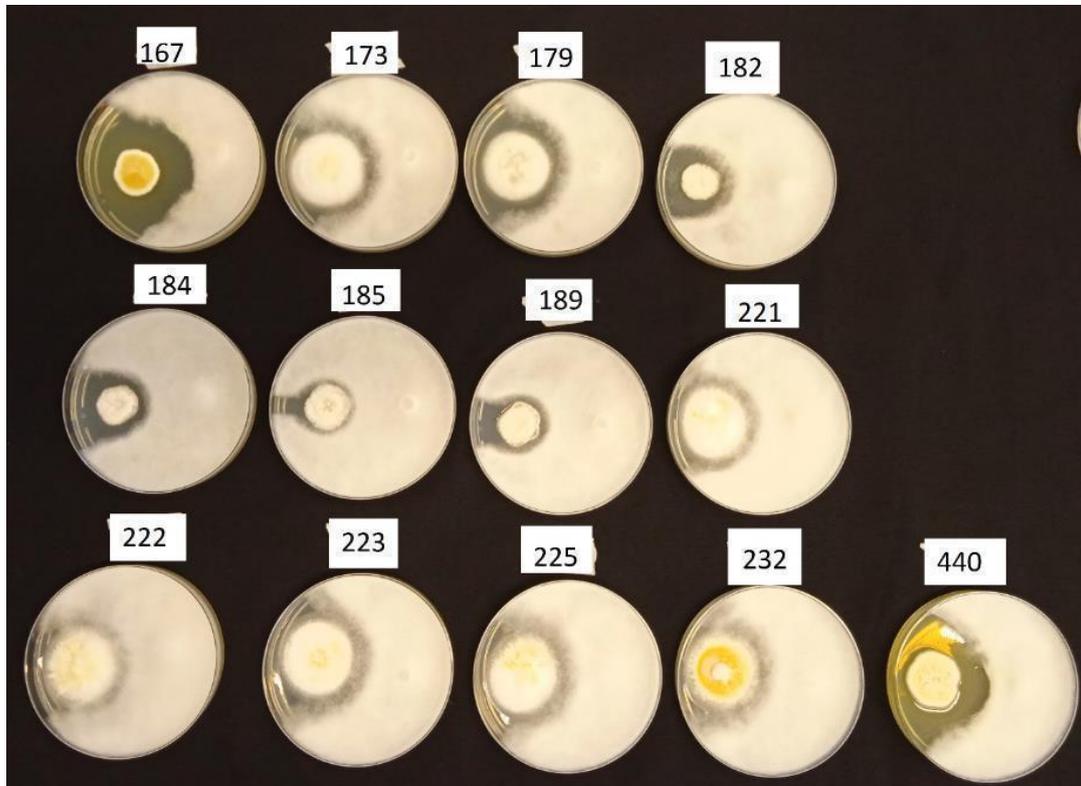
Tabla 3. 6. Crecimiento de las colonias de *Metarhizium* en PDA a los 10 días de la siembra.

Aislamiento	Diámetro (cm) ± E.E.	Velocidad (cm/día)
<i>M. robertsii</i> ILB167	2,10 ± 0,03 e	0,210 ± 0,003 e
<i>M. lepidiotae</i> ILB173	3,06 ± 0,08 c	0,306 ± 0,008 c
<i>M. lepidiotae</i> ILB179	2,89 ± 0,1 d	0,29 ± 0,01 d
<i>M. frigidum</i> ILB182	1,76 ± 0,04 f	0,176 ± 0,004 f
<i>M. flavoviride</i> ILB184	1,73 ± 0,05 f	0,173 ± 0,005 f
<i>M. frigidum</i> ILB185	1,69 ± 0,04 f	0,169 ± 0,004 f
<i>M. flavoviride</i> ILB189	1,65 ± 0,03 f	0,165 ± 0,003 f
<i>M. lepidiotae</i> ILB221	3,02 ± 0,05 cd	0,302 ± 0,005 cd
<i>M. lepidiotae</i> ILB222	3,12 ± 0,04 c	0,312 ± 0,004 c
<i>M. lepidiotae</i> ILB223	3,47 ± 0,04 a	0,347 ± 0,004 a
<i>M. lepidiotae</i> ILB225	3,14 ± 0,04 c	0,314 ± 0,004 c
<i>M. lepidiotae</i> ILB232	3,32 ± 0,03 b	0,332 ± 0,003 b
<i>M. robertsii</i> ILB440	2,21 ± 0,04 e	0,221 ± 0,004 e

E.E. error estándar (n=9). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Los resultados revelaron que los aislamientos de la especie *M. lepidiotae* (ILB173, ILB179, ILB221, ILB222, ILB223, ILB225, ILB232) exhibieron las velocidades de crecimiento más elevadas, con valores que oscilaron entre 0,29 y 0,35 cm/día (Tabla 3.6). Dentro de estos se destacan con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), en primer lugar *M. lepidiotae* ILB223 con una velocidad de 0,35 cm/día, luego *M. lepidiotae* ILB232 con un crecimiento de 0,33 cm/día, y en tercer y cuarto lugar *M. lepidiotae* ILB173, ILB221 e ILB179 con un rango de 0,29 a 0,31 cm/día. En quinto lugar, se encontraron los aislamientos correspondientes a *M. robertsii* (ILB167 e ILB440) con tasas de crecimiento de 0,22 cm/día estadísticamente distintas al resto ( $p < 0,05$ ). Por último, *M. frigidum* ILB182, *M. flavoviride* ILB184, *M. frigidum* ILB185 y *M. flavoviride* ILB189 mostraron

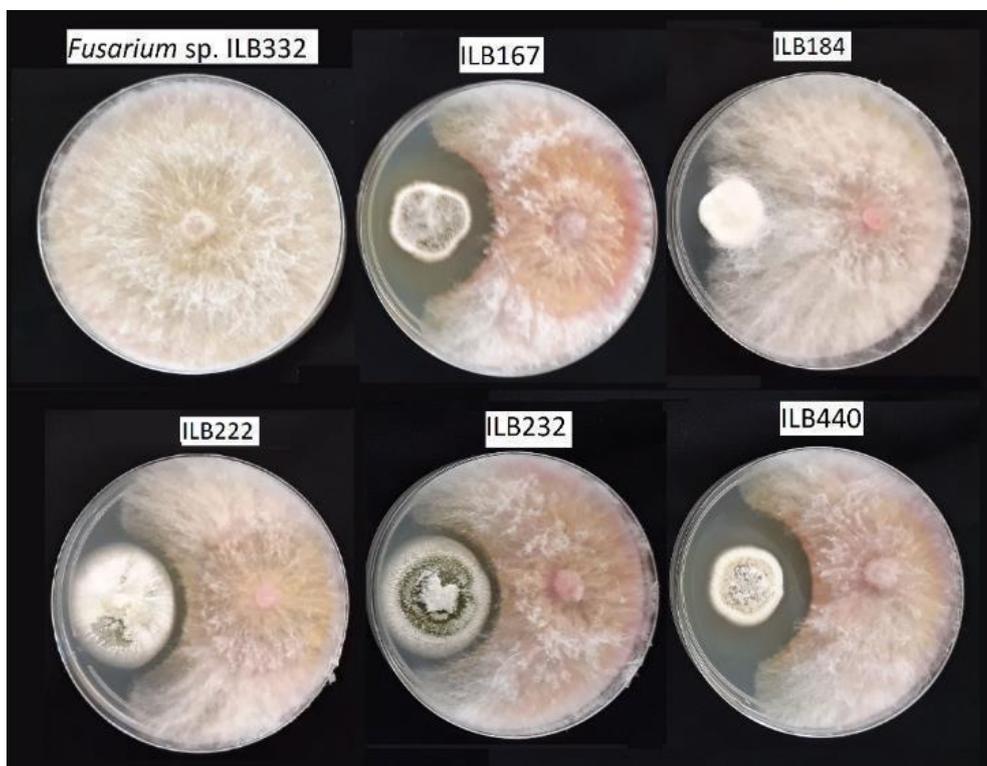
tasas de crecimiento más bajas, en el rango de 0,17 y 0,18 cm/día. La heterogeneidad en la velocidad de crecimiento de *Metarhizium*, se tuvo en cuenta para el análisis de los resultados del estudio de antagonismo.



**Figura 3. 14. Capacidad antagonista de trece aislamientos de *Metarhizium* spp. frente a *P. ultimum* ILB317.** Placas de cultivos duales dos días después de la lectura de los parámetros de inhibición. La colonia ubicada a la izquierda dentro de cada placa corresponde a *Metarhizium* y la colonia más grande a la derecha corresponde a *P. ultimum* ILB317. Los números corresponden a los 13 aislamientos de *Metarhizium* de la colección: ILB167 e ILB 440 (*M. robertsii*); ILB173, ILB179, ILB221, ILB222, ILB223, ILB225 e ILB232 (*M. lepidiotae*); ILB182 e ILB185 (*M. frigidum*); y ILB184 e ILB189 (*M. flavoviride*)

Finalmente cabe resaltar que *M. robertsii* ILB167 e ILB440 inhibieron eficazmente a los cuatro patógenos en ambos parámetros evaluados (Figura 3.11 y 3.12), y además obtuvieron los valores más altos. Asimismo, se observó una persistencia de la inhibición incluso un tiempo después de las mediciones, cuando la colonia del patógeno ocupaba toda la placa. Esta capacidad de mantener la inhibición constante en el tiempo puede apreciarse en las Figuras 3.14 y 3.15. La figura 3.14 representa cultivos duales de los trece aislamientos de *Metarhizium* spp. (ILB167, ILB173, ILB179, ILB182, ILB184, ILB185, ILB189, ILB221, ILB222, ILB223, ILB225, ILB232 e ILB440) enfrentados a *P. ultimum*

ILB317. En la figura 3.13 se muestra como los aislamientos de *M. robertsii* ILB167 e ILB440 presentan la mayor inhibición de *P. ultimum*, pese a que su tamaño es intermedio en comparación con el resto de los aislamientos. La figura 3.15 representa cinco cultivos duales de *Metarhizium* spp. (ILB167, ILB184, ILB222, ILB232 e ILB440) enfrentados a *F. graminearum* ILB332 y el control de este último. En esta figura se puede apreciar nuevamente la mantención del espacio de inhibición por parte de *M. robertsii* ILB167 e ILB440 a pesar de que el tamaño de la colonia de *M. robertsii* es intermedio en comparación al resto.

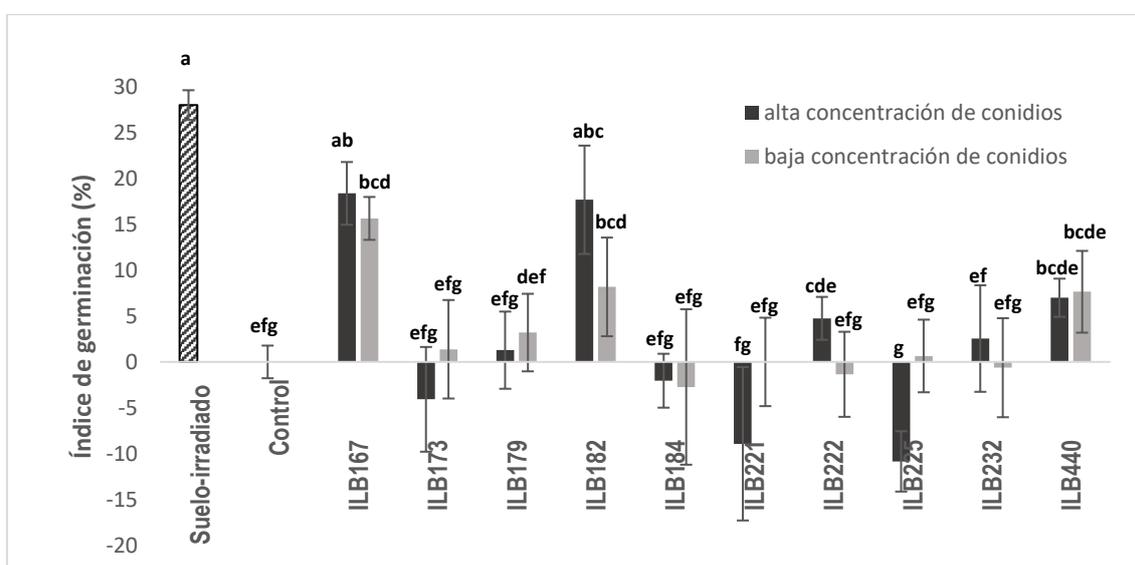


**Figura 3. 15.** Capacidad antagonista de cinco aislamientos de *Metarhizium* spp. frente a *Fusarium graminearum*. ILB332. Placas de cultivos duales dos días después de la lectura de los parámetros de inhibición. La placa arriba a la derecha presenta una colonia de *F. graminearum* ILB332, control del patógeno. El resto son cinco placas de cultivos duales donde la colonia de *Metarhizium* es la más pequeña ubicada a la izquierda y la colonia más grande corresponde a *F. graminearum* ILB332 ubicada a la derecha dentro de cada placa. Los números encima de las placas de cultivos duales corresponden a los aislamientos de *Metarhizium*: *M. robertsii* ILB167, *M. flavoviride* ILB184, *M. lepidiotae* ILB222, *M. lepidiotae* ILB232 y *M. robertsii* ILB440.

### 3.4.2. GERMINACIÓN Y EMERGENCIA EN SOJA INOCULADA CON *Metarhizium* spp., EN PRESENCIA DE SUELO CON ALTO ÍNDICE DE PATOGENICIDAD

#### 3.4.2.1 GERMINACIÓN DE SEMILLAS POR LA TÉCNICA EN PAPEL EN PRESENCIA DE SUELO PATOGENICO

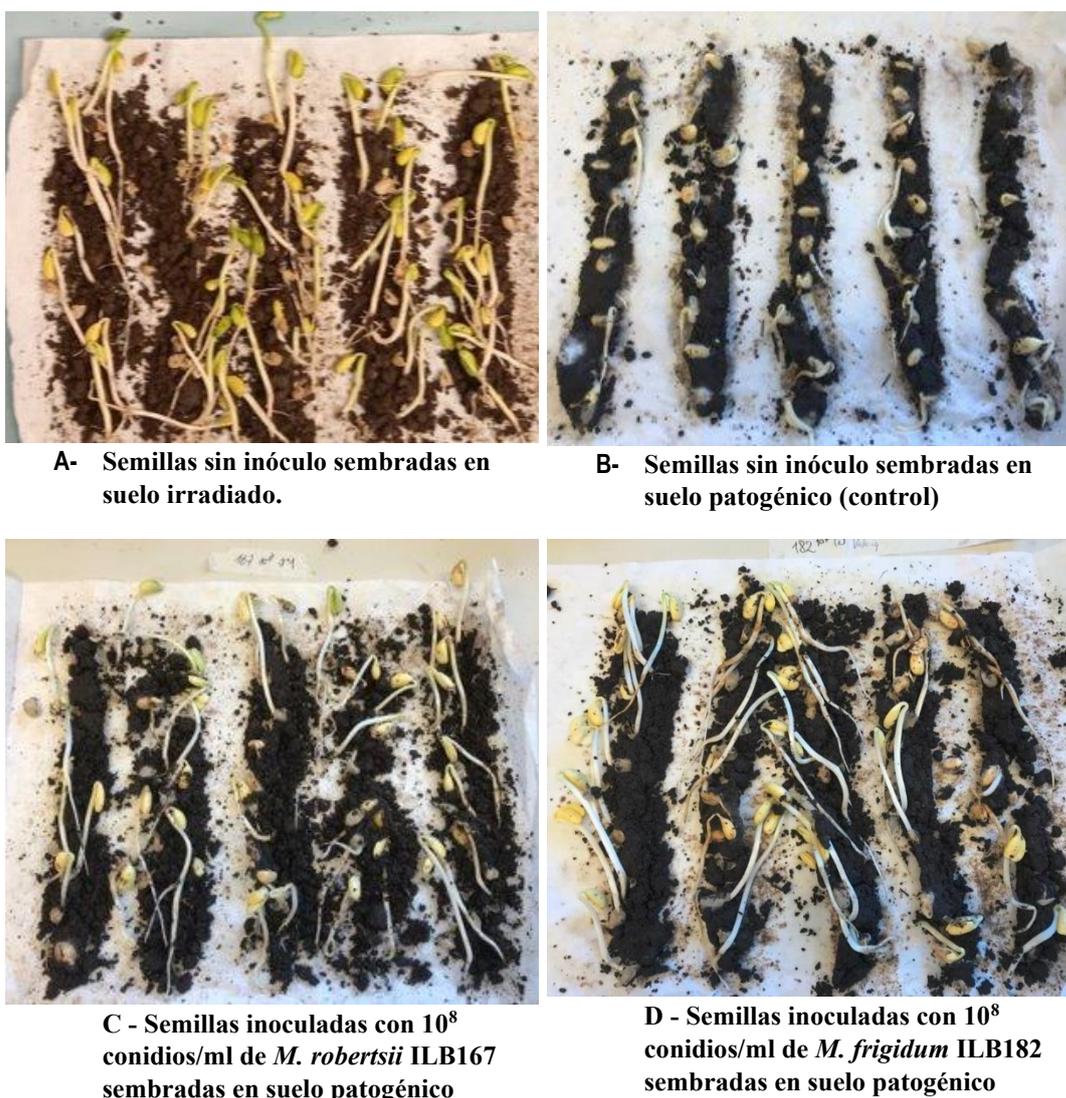
Las semillas tratadas con *M. robertsii* ILB167 y *M. frigidum* ILB182, obtuvieron los valores más altos de germinación, significativamente distintos al control de semillas sin tratar en presencia de suelo patogénico ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3. 16. Efecto de *Metarhizium* sobre la germinación de soja N5909 en presencia de suelo patogénico.** En negro - semillas inoculadas con una “alta concentración de conidios” ( $10^8$  conidios/mL). En gris - semillas inoculadas con “baja concentración” ( $10^6$  conidios/mL). Únicamente el aislamiento ILB225 presenta  $10^6$  conidios/ml como “alta concentración de conidios” y de  $10^4$  conidios/ml como “baja concentración de conidios”. Las barras indican el error estándar ( $n = 4$ ). Suelo-irradiado: Semillas sin inóculo sembradas en suelo irradiado con microondas. *Control*: Semillas sin inóculo sembradas en suelo patogénico. Letras diferentes indican diferencia significativa según test de Fisher ( $p \leq 0,05$ ) Técnica de germinación en papel. Los números en el eje horizontal corresponden a 10 aislamientos de *Metarhizium* de la colección: ILB167 e ILB 440 (*M. robertsii*); ILB173, ILB179, ILB221, ILB222, ILB225 e ILB232 (*M. lepidiotae*); ILB182 (*M. frigidum*); y ILB184 (*M. flavoviride*)

El suelo patogénico disminuyó en un  $28 \pm 2$  % la germinación de la soja sin tratar (Figura 3.16), con respecto a la germinación en suelo irradiado con aproximadamente un 97% de germinación (Figura 3.16). Las semillas inoculadas con *M. robertsii* ILB167 en las dos

concentraciones de conidios probadas ( $10^6$  y  $10^8$  conidios/mL) presentaron una mejora en la germinación del  $17 \pm 3$  % con respecto al control ( $p < 0,05$ ) (ver Figura 3.16). Por su parte, las semillas inoculadas con *M. frigidum* ILB182 con la concentración más alta ( $10^8$  conidios/mL) presentaron un incremento del  $18 \pm 6$  % con respecto al control. El resto de los aislamientos de *Metarhizium* aplicados a las semillas en concentración baja o alta de conidios no incrementaron significativamente la germinación de las semillas de soja con respecto al control sin tratar y en suelo patogénico ( $p > 0,05$ )



**Figura 3. 17. Efecto protector de *M. robertsii* ILB167 y *M. frigidum* ILB182 sobre las semillas sembradas en suelo patogénico.** Las fotos muestran el desarrollo de las radículas de las semillas germinadas de cuatro tratamientos distintos, a los 7 días de la siembra a 24°C. A- Semillas no inoculadas sembradas en suelo irradiado B- Control: Semillas no inoculadas sembradas en suelo patogénico. C- Semillas inoculadas con *M. robertsii* ILB167 sembradas en suelo patogénico. D- Semillas inoculadas con *M. frigidum* ILB182 sembradas en suelo patogénico.

Además de registrar el número de semillas germinadas, se observó en algunos tratamientos un aspecto sanitario saludable y un tamaño adecuado de las radículas en comparación con el control sin tratar. Las radículas de las semillas inoculadas con *M. robertsii* ILB167 y *M. frigidum* ILB182 mostraron tamaño, apariencia y color similares al control sin inoculación en suelo irradiado, como se ilustra en la Figura 3.17. En contraste, se notó una marcada diferencia con las semillas sin inocular sembradas en suelo patogénico (Figura 3.17B).

### 3.4.2.2 EMERGENCIA EN MACETAS CON SUELO CON ALTO ÍNDICE DE PATOGENICIDAD

Las semillas inoculadas con *M. robertsii* ILB440 sembradas en suelo patogénico, presentaron un incremento en la emergencia del 41 % ± 14 % en comparación con el grupo de control sembradas en suelo patogénico ( $p > 0,05$ ). Este tratamiento fue el único que mostró una diferencia significativa en la emergencia de la soja en comparación con el grupo de plantas control (Tabla 3.7.).

Tabla 3. 7. Emergencia en suelo patogénico

Tratamiento	Emergencia (%) ± E.E.
<b>Control</b>	49 ± 5 c
<i>M. robertsii</i> ILB167	66 ± 6 bc
<i>M. frigidum</i> ILB182	61 ± 8 bc
<i>M. robertsii</i> ILB440	69 ± 7 b
<b>Suelo-irradiado</b>	94 ± 4 a

Emergencia de semillas inoculadas con diferentes aislamientos de *Metarhizium* sembradas en suelo patogénico en macetas incubadas en invernáculo a  $25,6 \pm 5,5$  °C. **Control:** Semillas sin inocular sembradas en suelo patogénico. **Suelo-irradiado:** Semillas sin inocular sembradas en suelo irradiado con microondas. **E.E.** error estándar (n=8). Letras diferentes indican diferencia significativa según test de Fisher ( $p \leq 0,05$ ) dentro de cada columna.

### 3.4.2.2.1 Efecto del tratamiento con *Metarhizium* en la nodulación y peso seco de plantas de soja en suelo patogénico

Al cabo de 31 días de sembradas las semillas, la cantidad de nódulos por planta (NN), entre el grupo control y el grupo de plantas provenientes de semillas inoculadas con *M. robertsii* (ILB167 e ILB440) y *M. frigidum* ILB182, no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Los valores promedio de NN por planta de soja se ubicaron en el rango de  $58 \pm 4$  y  $84 \pm 13$  nódulos/planta. Los registros de peso seco de las raíces (PSR) y peso seco de la parte aérea (PSA) tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Tabla 3.8)

En cuanto a las plantas de suelo irradiado, tuvieron como se esperaba un aumento en el PSR y el PSA con respecto al control de suelo patogénico (Tabla 3.8). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el NN por planta entre ninguno de los tratamientos evaluados. En lo referente al peso seco de los nódulos (PSN), no se observaron diferencias significativas entre el grupo de control y los tratamientos con *Metarhizium*, con promedios oscilando entre  $68 \pm 6$  y  $73 \pm 7$  mg/planta. En cambio, las plantas crecidas en suelo irradiado presentaron la mitad del PSN del resto de los tratamientos (ver tabla 3.8). Una posible explicación a esto es el aumento de disponibilidad de nitrógeno en el suelo irradiado, donde hay menos competencia por este nutriente, ya que no cuenta con los microorganismos del suelo natural.

Estos resultados indican que el número de nódulos no se ve afectado ni por la presencia de *Metarhizium* ni por el suelo patogénico. Con respecto al desarrollo de la biomasa de la planta, el suelo patogénico afecta tanto el peso seco de la parte aérea y de la raíz, independientemente si las semillas fueron tratadas o no con *Metarhizium*. Esto indica que la presencia de cualquiera de los tres aislamientos evaluados no promueve el crecimiento en condiciones de patogenicidad.

**Tabla 3. 8. Número de nódulos y peso seco de nódulos, parte aérea y raíz, a los 31 días de la siembra en suelo patogénico como sustrato único.**

Tratamientos	PSA $\pm$ E.E. (g)	NN $\pm$ E.E.(n)	PSN $\pm$ E.E. (x10 <sup>-2</sup> g)	PSR $\pm$ E.E. (x 10 <sup>-1</sup> g)
<b>Control</b>	1,07 $\pm$ 0,05 <b>b</b>	58 $\pm$ 4 <b>a</b>	6,93 $\pm$ 0,57 <b>a</b>	3,69 $\pm$ 0,11 <b>b</b>
<i>M. robertsii</i> ILB167	0,87 $\pm$ 0,10 <b>b</b>	77 $\pm$ 13 <b>a</b>	6,88 $\pm$ 0,69 <b>a</b>	3,14 $\pm$ 0,34 <b>b</b>
<i>M. frigidum</i> ILB182	0,97 $\pm$ 0,10 <b>b</b>	59 $\pm$ 8 <b>a</b>	6,80 $\pm$ 0,63 <b>a</b>	3,35 $\pm$ 0,28 <b>b</b>
<i>M. robertsii</i> ILB440	0,94 $\pm$ 0,08 <b>b</b>	73 $\pm$ 4 <b>a</b>	7,28 $\pm$ 0,73 <b>a</b>	3,79 $\pm$ 0,33 <b>b</b>
<b>Suelo-irradiado</b>	1,45 $\pm$ 0,10 <b>a</b>	84 $\pm$ 15 <b>a</b>	3,55 $\pm$ 0,53 <b>b</b>	6,32 $\pm$ 0,18 <b>a</b>

**Control:** Semillas sin inocular sembradas en suelo patogénico. **Suelo-irradiado:** Semillas sin inocular sembradas en suelo irradiado con microondas. NN: número de nódulos. PSN: peso seco nodular. PSR: peso seco de raíz. PSA: peso seco parte aérea. E.E. error estándar (n=4). Letras diferentes indican diferencia significativa según test de Fisher ( $p \leq 0,05$ ) dentro de cada columna

### 3.4.3 CAPACIDAD BIOCONTROLADORA DE *Metarhizium* spp. DE FITOPATÓGENOS QUE AFECTAN LA EMERGENCIA DE LA SOJA

#### 3.4.3.1. CONTROL DE FITOPATÓGENOS MEDIANTE INOCULACIÓN CON SUSPENSIÓN DE CONIDIOS DE *Metarhizium* EN INVERNÁCULO

##### 3.4.3.1.1 Capacidad para controlar a *F. graminearum*, experimento de invernáculo

Las semillas inoculadas con los diferentes aislamientos *Metarhizium* y sembradas en sustrato con *F. graminearum* al 10% (p/p), tuvieron emergencias alrededor del  $38 \pm 8 \%$  y no fueron significativamente distintas al control ( $p > 0,05$ ) cuya emergencia fue de  $44 \pm 6 \%$  (Tabla 3.9). Las semillas inoculadas con aislamientos de *Metarhizium* en presencia de *F. graminearum* ILB332 al 20 % tuvieron emergencias alrededor del  $14 \pm 5 \%$  fueron menores que el control con una emergencia de  $23 \pm 5 \%$ , pero no presentaron diferencias significativas con este ( $p > 0,05$ ).

Tabla 3. 9. Emergencia en plantas de soja sembradas en sustrato con diferentes concentraciones de *Fusarium graminearum* ILB332 y *Rhizoctonia oryzae* ILB428 en ambiente semi-controlado de invernáculo.

Tratamiento	<i>Fusarium graminearum</i> ILB332 (% p/p) ± EE		<i>Rhizoctonia oryzae</i> ILB428 (% p/p) ± EE		
	10 *	20 *	5 ***	7.5 **	10 ***
<i>M. robertsii</i> ILB167	40 ± 8 b	14 ± 4 c	38 ± 5 b	4 ± 3 e	0 e
<i>M. frigidum</i> ILB182	36 ± 7 b	13 ± 4 c	28 ± 6 b	6 ± 3 e	10 ± 7 de
<i>M. lepidiotae</i> ILB232	41 ± 7 b	16 ± 5 c	20 ± 8 bc	5 ± 2 e	3 ± 3 e
<i>M. robertsii</i> ILB440	34 ± 8 b	12 ± 4 c	33 ± 9 b	5 ± 3 e	5 ± 3 e
<b>Control</b>	<b>44 ± 6 b</b>	<b>23 ± 5 c</b>	<b>33 ± 5 b</b>	<b>3 ± 2 e</b>	<b>0 e</b>
<b>Control sin patógeno</b>	<b>69 ± 5 a</b>		<b>73 ± 4 a</b>		

Valores promedio de emergencia de semillas tratadas con una suspensión de conidios de *Metarhizium*, sembradas en cinco condiciones diferentes: sustrato con *F. graminearum* al 10 y al 20 % (p/p) a 20°C en invernáculo y sustrato con *R.oryzar* 5, 7.5 y 10% (p/p) a 20 °C en invernáculo. **Control**- semillas sin tratar sembradas en sustrato con fitopatógeno. **Control sin patógeno**-semillas sin tratar sembradas en sustrato sin fitopatógeno. **E.E.** – Error estándar. Letras distintas dentro de cada columna son significativamente diferentes según test de Fisher ( $p \leq 0,05$ ). (\*) - Experimento repetido cuatro veces en el año (n = 16). (\*\*) - Experimento repetido dos veces (n = 8). (\*\*\*) - Experimento realizado una vez (n = 4).

En las condiciones de este experimento ninguno de los aislamientos de *Metarhizium* fue capaz de controlar a *F. graminearum* ILB332.

#### 3.4.3.1.2 Capacidad para controlar a *R. oryzae* experimento de invernáculo

El fitopatógeno *R. oryzae* agregado en una concentración del 10 y 7,5 % (p/p) trajo como consecuencia una reducción de la emergencia mayor al 90% con respecto al control sin patógeno, aun cuando las semillas de soja habían sido tratadas con los aislamientos de *Metarhizium* spp.(Tabla 3.9.). Mientras que a un menor porcentaje de *R. oryzae* (5% p/p), la emergencia se redujo al 55 %, independientemente de si las semillas fueron o no tratadas con *Metarhizium* (Tabla 3.9).

Los resultados obtenidos indicaron que los tratamientos con *Metarhizium*, mediante la inoculación de semillas en el momento de la siembra, no lograron aumentar la emergencia en presencia de *R. oryzae* en las tres concentraciones probadas 5, 7,5 y 10 % (p/p).

#### **3.4.3.1.3 Capacidad para controlar a *P. ultimum* ILB317 y a *P. sylvaticum* ILB323 en invernáculo**

Es importante recordar que tanto la puesta a punto de este experimento como de los anteriores, implicó elegir una concentración de fitopatógeno que redujera la emergencia al 50 %, y que el control sin patógeno tuviera una emergencia cercana al 100%. Sin embargo, cuando se realizaron los experimentos definitivos, se encontró que los controles con patógeno obtuvieron resultados completamente distintos.

La disminución de la temperatura en el experimento de control de *Pythium* realizado en julio, pudo ser la responsable de la disminución de la emergencia a cero de todos los tratamientos salvo del control sin patógeno. Las temperaturas en julio aun teniendo control de temperatura fueron de 11 °C mínima y 30 °C máxima. El estudio de la fluctuación de la temperatura dió como promedio  $17 \pm 5$  °C (DE). Agosto tuvo días de calor, lo que modificó la temperatura a 13 °C la mínima y 33,5 °C la máxima, con un promedio de  $20 \pm 4$  °C (DE). Es por este motivo que los resultados de los experimentos de control de *P. sylvaticum* ILB323 se expresan a dos temperaturas promedio diferentes  $17 \pm 5$  °C y  $20 \pm 4$  °C . No se pudo realizar el experimento de *P. ultimum* ILB317 a la temperatura de  $20 \pm 4$  °C.

Los experimentos de control de *P. ultimum* ILB317 y *P. sylvaticum* ILB323 ambos al 10 % (p/p), realizados a una temperatura promedio del invernáculo de  $17 \pm 5$  °C (julio muy frío), presentaron niveles de emergencia de 0 % frente a la emergencia del control sin patógeno que presentó un  $60 \pm 7$  % (Tabla 3.10.) Sin embargo, la emergencia de los controles de *P. sylvaticum* al 10 % a 20 °C fue cercana al 50 %, aunque no se diferenció del control sin patógeno. Este mismo resultado se obtuvo en el caso del control con *P. sylvaticum* al 5%.

Tabla 3. 10. Emergencia de plantas de soja sembradas en sustrato con diferentes concentraciones de *Pythium sylvaticum* ILB323 y *Pythium ultimum* ILB317 en ambiente semi-controlado de invernáculo

Tratamiento	<i>Pythium ultimum</i> ILB317 (a 17 ± 5°C) (% p/p) ± EE	<i>Pythium sylvaticum</i> ILB323 (a 17± 5 °C) (% p/p) ± EE	<i>Pythium sylvaticum</i> ILB323 (a 20± 4 °C) (% p/p) ± EE	
	10	10	5	10
<i>M. robertsii</i> ILB167	0	0	25 ± 6 bc	50 ± 7 ab
<i>M. frigidum</i> ILB182	0	0	30 ± 9 abc	55 ± 6 a
<i>M. lepidiotae</i> ILB232	0	0	40 ± 12 abc	45 ± 10 abc
<i>M. robertsii</i> ILB440	0	0	23 ± 11 c	40 ± 7 abc
<b>Control</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>53 ± 9 a</b>	<b>53 ± 6 a</b>
<b>Control sin patógeno</b>	<b>60 ± 7</b>	<b>60 ± 7</b>	<b>55 ± 13 a</b>	

Valores promedio de emergencia de semillas tratadas con una suspensión de conidios de *Metarhizium*, sembradas en cuatro condiciones: sustrato con *P. ultimum* al 10% (p/p) a 17 °C en invernáculo, sustrato con *P. sylvaticum* ILB323 al 10% a 17 °C en invernáculo, sustrato con *P. sylvaticum* ILB323 al 10% a 20 °C en invernáculo y sustrato con *P. sylvaticum* ILB323 al 5% a 20 °C en invernáculo. **Control**- semillas sin tratar sembradas en sustrato con fitopatógeno. **Control sin patógeno**-semillas sin tratar sembradas en sustrato sin fitopatógeno. **E.E.** – Error estándar (n = 4). Letras distintas dentro de cada columna son significativamente diferentes según test de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

En las condiciones de temperatura  $20 \pm 4$  °C, no se pudo apreciar la reducción de la emergencia debido a la presencia de *P. sylvaticum* en comparación con el control sin patógeno, ambos con emergencias cercanas al 50%. No se encontraron diferencias de los tratamientos con los controles ( $p > 0,05$ ). No se encontró el motivo de tan baja emergencia del grupo control sin patógeno. Por lo que en principio *P. sylvaticum* ILB323 a la temperatura de  $20 \pm 4$  °C, no parece ser responsable del 47% de reducción de la emergencia, por lo que no se puede analizar control de este patógeno por parte de *Metarhizium* spp.

El método de cultivo de patógenos en arroz influyó negativamente en los resultados de emergencia en el estudio de control de patógenos en invernáculo. La presencia del arroz (sin patógeno) en proporciones iguales o mayores a 7,5 % (p/p) en sustrato turba-vermiculita-arena, tuvo un efecto significativamente negativo en la emergencia. Cuando

las concentraciones de arroz fueron de 7,5 y 10 % (p/p) de arroz, la emergencia disminuyó de un 22 a un 26 % con respecto al control, y cuando el arroz estuvo en una proporción del 20 % (p/p) la disminución de la emergencia fue casi del 50 %. Esto sugiere que la presencia del arroz pudo enmascarar algún posible efecto de control de alguno o todos los aislamientos de *Metarhizium* sobre los patógenos estudiados.

### **3.4.3.2 CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS MEDIANTE COBERTURA DE SEMILLAS CON *Metarhizium* EN CÁMARA DE CRECIMIENTO**

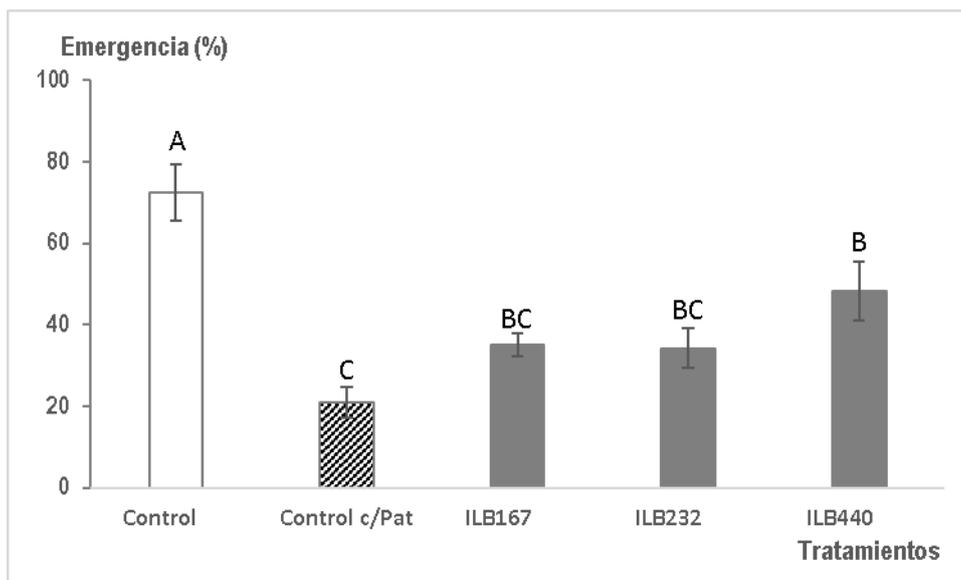
En este experimento, se evaluó el efecto biocontrolador de tres cepas de *Metarhizium*, aplicadas en forma de cobertura de semilla, contra los fitopatógenos *F. graminearum* ILB332 al 1,0% (p/p), *R. oryzae* ILB428 al 12 % (p/p), *P. ultimum* ILB317 0,5 % (p/p) y *P. sylvaticum* ILB323 al 1,0 % (p/p), en ambiente controlado. Se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.01$ ) en la emergencia dependiendo de la cepa de *Metarhizium* empleada. El porcentaje de emergencia promedio de plantas tratadas con respecto a los patógenos varió entre el 33% y el 40%. Dentro de estos tratamientos, *M. robertsii* (ILB167 e ILB440) mostró el mayor porcentaje de emergencia, con un valor promedio del 38%, el cual fue significativamente diferente del promedio de emergencia de las plantas no tratadas, que fue del 27%. No obstante, al analizar individualmente el efecto de las tres cepas sobre cada uno de los patógenos, se observa que *Metarhizium* no ejerce un control equitativo sobre todos ellos. Se destaca que *M. robertsii* exhibe una notable tendencia a duplicar la emergencia de las semillas sometidas a los patógenos *F. graminearum* y *R. oryzae*, sin embargo, no se registra un efecto significativo en la emergencia de semillas expuestas a *P. ultimum* ni *P. sylvaticum*. Por otra parte, *M. lepidiotae*, no presentó diferencias significativas con los controles con patógeno. Estos hallazgos subrayan la diversidad en la respuesta de las plantas ante diferentes patógenos y cepas de *Metarhizium*. A continuación, se exponen los resultados discriminados por patógeno.

### 3.4.3.2.1 Control de *Fusarium graminearum* ILB332: Experimento en Cámara de Crecimiento

Las semillas tratadas con cepas de *Metarhizium*, sembradas en un sustrato con *Fusarium graminearum* ILB332 al 1.0% (p/p) (patógeno), mostraron un aumento significativo en la emergencia en comparación con las semillas del control con patógeno (control c/Pat.) no tratadas con *Metarhizium* (ver Figura 3.18). En particular, las semillas inoculadas con *M. robertsii* ILB440 presentaron más del doble de emergencia con relación al control c/patógeno. Asimismo, las semillas tratadas con las cepas *M. robertsii* ILB167 y *M. lepidiotae* ILB232 superaron en 1,6 veces la emergencia observada en el control c/patógeno.

Desde un análisis estadístico, únicamente la cepa *M. robertsii* ILB440 mostró un control eficaz sobre *F. graminearum* ILB332, alcanzando una tasa de emergencia del  $53 \pm 8 \%$ , lo cual es significativamente diferente ( $p \leq 0,05$ ) en comparación con el control c/Pat., cuya emergencia fue del  $21 \pm 4 \%$  (ver Figura 3.18). Los otros dos aislamientos ensayados no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al control c/patógeno, con un valor de  $p > 0,05$ .

A pesar de que la inoculación con *Metarhizium* promovió un incremento en la emergencia de las semillas expuestas al patógeno, no logró erradicar completamente la infección. La tasa de emergencia promedio de las semillas tratadas con *M. robertsii* ILB440 fue un 67 % de la observada en el control sin patógeno (ver Figura 3.18).

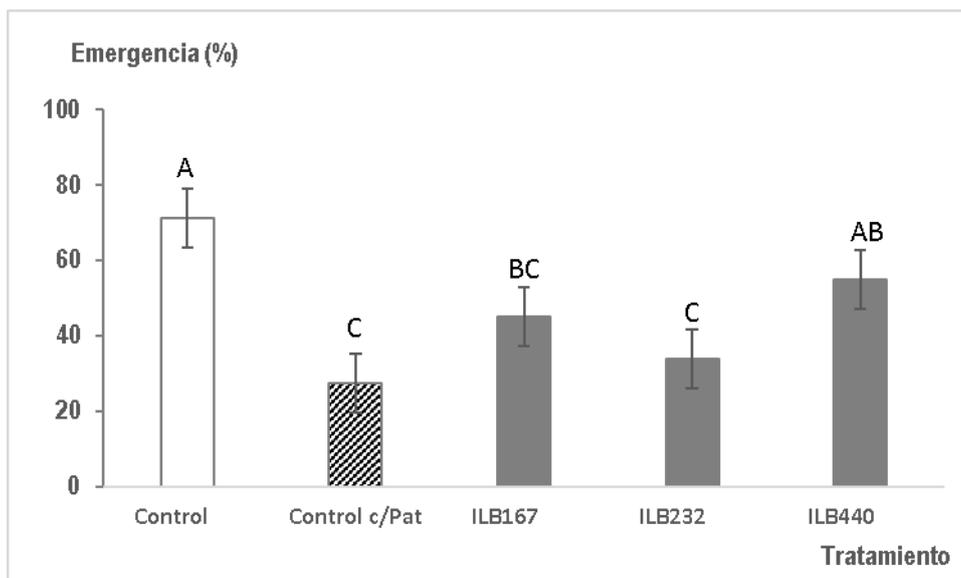


**Figura 3. 18. Control de *Fusarium graminearum* ILB332 al 1,0 % en soja tratada con tres aislamientos de *Metarhizium*.** La variable representada es la emergencia, expresada como porcentaje, a los 10 días de la siembra bajo condiciones de 24 °C. **Control-** control sin patógeno. **Control c/Patógeno** – Control con patógeno sin tratamiento con *Metarhizium*. Las barras corresponden al error estándar (n = 12) Letras diferentes indican diferencia significativa según test de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.4.3.2.2 Control de *Rhizoctonia oryzae* ILB428, experimento de cámara de crecimiento

Las semillas inoculadas con *M. robertsii* (cepas ILB167 e ILB440) mostraron una clara tendencia al aumento en la emergencia en comparación con el control c/Pat y sin tratar con *Metarhizium* (Figura 3.19). Por el contrario, el tratamiento con *M. lepidiotae* ILB232 no mostró una mejora en la emergencia. Es destacable que el tratamiento con *M. robertsii* ILB440 duplicó la emergencia en comparación con el control c/Pat. Este tratamiento mostró una emergencia del  $55 \pm 8$  %, mientras que el control c/Pat presentó una emergencia del  $28 \pm 4$  %. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los demás tratamientos y el control c/Pat; las emergencias promedio variaron entre el  $38 \pm 10$  % y el  $46 \pm 9$  % (Figura 3.19).

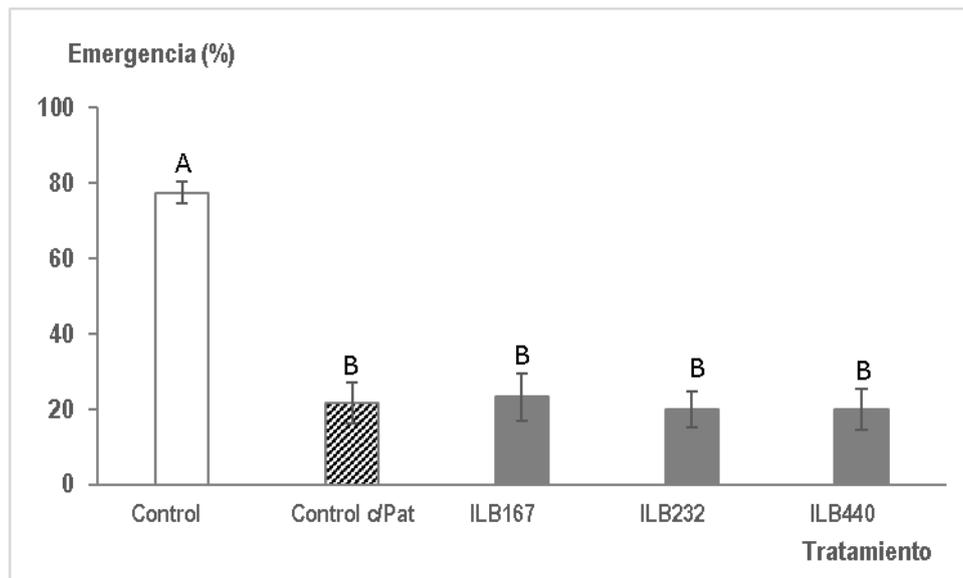
Los valores de emergencia de las semillas tratadas con *M. robertsii* ILB440 en presencia de *R. oryzae* ILB428 no tuvieron diferencias significativas con la situación ideal correspondiente al control sin patógeno (Figura 3.19).



**Figura 3. 19.** Control de *Rhizoctonia oryzae* ILB428 al 12 % (p/p) en soja tratada con tres aislamientos de *Metarhizium*. La variable representada es la emergencia, expresada como porcentaje, a los 10 días de la siembra bajo condiciones de 24 °C. **Control**- control sin patógeno. **Control c/Patógeno** – Control con patógeno sin tratamiento con *Metarhizium*. Las barras corresponden al error estándar (n = 8). Letras diferentes indican diferencia significativa según test de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

#### 2.4.3.2.3 Control de *Pythium ultimum* ILB317, experimento en cámara de crecimiento

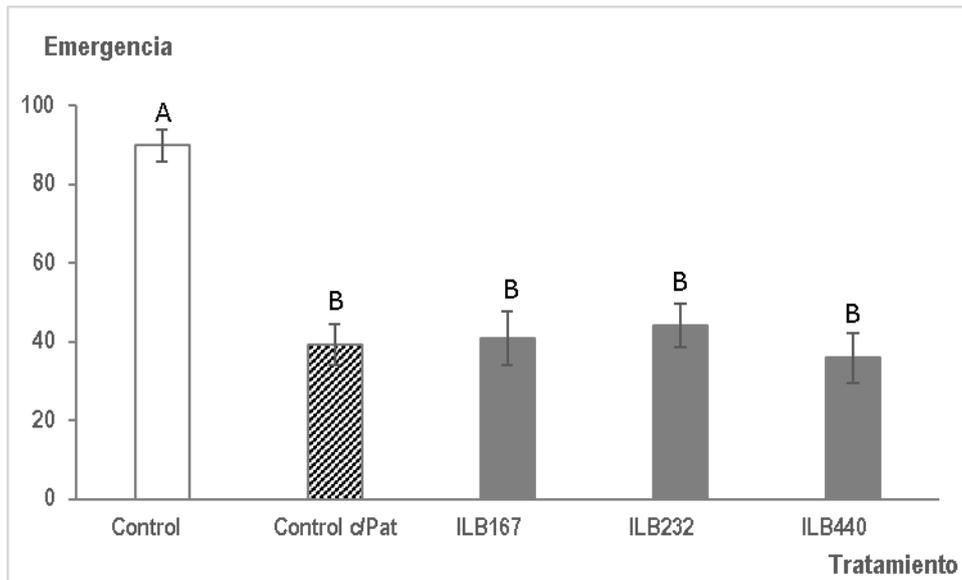
Los tratamientos de las semillas con *M. robertsii* (ILB167 e ILB440) así como con *M. lepidiotae* ILB232, no lograron revertir el efecto del patógeno *P. ultimum* al 0,5 % (p/p). Los valores de emergencia promedio oscilaron entre el  $19 \pm 5\%$  y el  $23 \pm 6\%$ , y no mostraron diferencias estadísticas significativas en comparación con el control c/Pat  $p > 0,05$  (figura 3.20).



**Figura 3. 20. Control de *Pythium ultimum* ILB317 al 0,5 % (p/p) en soja tratada con cuatro aislamientos de *Metarhizium*.** La variable representada es la emergencia, expresada como porcentaje, a los 10 días de la siembra bajo condiciones de 24 °C. **Control-** control sin patógeno. **Control c/Patógeno** – Control con patógeno sin tratamiento con *Metarhizium*. Las barras corresponden al error estándar (n = 12). Letras diferentes indican diferencia significativa según test de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

#### **2.4.3.2.4 Control de *Pythium sylvaticum* ILB323, experimento en cámara de crecimiento**

Las semillas tratadas con *M. robertsii* (ILB167 e ILB440), así como con *M. lepidiotae* ILB232, no mostraron una diferencia significativa en la emergencia ( $p > 0,05$ ) en comparación con el control c/Pat, (sustrato con *P. sylvaticum* ILB323 al 1,0 % (p/p)) (Figura 3.21). Los niveles de emergencia observados en todos los tratamientos no superaron el  $43 \pm 7$  %. Obviamente ninguno de los tratamientos alcanzó los niveles de emergencia del control sin patógeno.



**Figura 3. 21. Control de *Pythium sylvaticum* ILB323 al 1,0 % (p/p) en soja tratada con cuatro aislamientos de *Metarhizium*.** La variable representada es la emergencia, expresada como porcentaje, a los 10 días de la siembra bajo condiciones de 24 °C **Control-** control sin patógeno. **Control c/Patógeno** – Control con patógeno sin tratamiento con *Metarhizium*. Las barras corresponden al error estándar (n = 12). Letras diferentes indican diferencia significativa según test de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

## **CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

## 4.1 Discusión

El presente trabajo se enfocó en la "etapa de evaluación y selección de cepas", una fase esencial dentro del conjunto de etapas necesarias para desarrollar un biocontrolador eficaz contra enfermedades en el cultivo de soja. El objetivo principal fue identificar, entre 13 cepas de *Metarhizium spp.* evaluadas, al menos una con potencial para actuar como biocontrolador de enfermedades de implantación en soja. Estas cepas pertenecían a cuatro especies: *M. flavoviride*, *M. frigidum*, *M. lepidiotae* y *M. robertsii*. Para ello, la cepa seleccionada debía cumplir varias condiciones clave: controlar eficazmente los fitopatógenos responsables del *damping-off* en soja, ser compatible con la planta de soja y su simbionte *Bradyrhizobium elkanii* sin interferir en el proceso de nodulación, colonizar la rizósfera utilizando los nutrientes aportados por los exudados radiculares y, adicionalmente, asociarse con las raíces de la planta tanto de forma superficial como endofítica. Estas características asegurarían la persistencia del microorganismo en el entorno radicular, permitiendo ejercer la función antagonista frente a los fitopatógenos de manera más eficiente y prolongada, en línea con la hipótesis de Liao (2014), que plantea que la colonización de la raíz es un requisito previo para la mayoría de los efectos beneficiosos de *Metarhizium*

En este estudio, primero se evaluó la compatibilidad de las 13 cepas de *Metarhizium* con *Bradyrhizobium elkanii* en placa, donde se encontró que la especie *Metarhizium lepidiotae* inhibía el crecimiento de los rizobios. Sin embargo, cuando se evaluó *in vivo*, aplicando las cepas a las semillas en una concentración de aproximadamente  $10^3$  conidios por semilla, ninguna de ellas afectó la nodulación en las raíces de soja. Este resultado sugiere que las cepas probadas *in vivo* no interfieren con el rendimiento del cultivo de soja dependiente de la fijación biológica de nitrógeno. Aunque los rizobios suelen coexistir con otros microorganismos en el suelo y nodular eficientemente las raíces (Mataranyika et al., 2022), la confirmación experimental *in vivo* fue esencial para validar la compatibilidad entre *Metarhizium* y *Bradyrhizobium elkanii*, especialmente ante los resultados iniciales en placa. Estas diferencias subrayan la importancia de realizar pruebas *in vivo* para validar resultados preliminares.

La capacidad de las cepas de *Metarhizium spp.* para crecer sin dificultad en medios basados en exudados radiculares (ER) de soja resalta su potencial para establecerse de manera efectiva en la rizósfera de este cultivo. Este hallazgo coincide con estudios

previos, como el de Behie (2017), quien demostró que *M. robertsii* metaboliza carbohidratos de los ER de *Phaseolus vulgaris*, generando un intercambio mutualista que incluye la provisión de nitrógeno a la planta. Además, investigaciones de Behie y Bidochka (2014) evidenciaron que especies como *M. robertsii* y *M. flavoviride* (entre otras) transfieren nitrógeno a diversas plantas, aumentando su productividad. Estas observaciones no solo subrayan la capacidad de *Metarhizium spp.* para adaptarse a los diversos metabolitos liberados por las raíces, sino que también sugieren un papel potencialmente crucial de *Metarhizium spp.* en el establecimiento de interacciones mutualistas que podrían mejorar la salud y el rendimiento de los cultivos.

Dentro de las cepas analizadas en este estudio, se destacaron *M. flavoviride* ILB184 y *M. robertsii* ILB167, que mostraron periodos de adaptación (fase lag) más cortos y tasas de crecimiento más altas que el resto. Esto sugiere que estas cepas tienen una mayor eficiencia en el uso de los nutrientes presentes en los ER, lo que podría conferirles ventajas competitivas en la colonización de la rizosfera. Además, ambas cepas produjeron más biomasa en ER de soja que en medios artificiales, lo que posiciona a *M. robertsii* como un colonizador natural del rizoplaneo (Vega, 2018) y sugiere que *M. flavoviride* tiene potencialidades por explorar. Este comportamiento refleja su capacidad para aprovechar compuestos como azúcares simples, aminoácidos y ácidos orgánicos presentes en los exudados radiculares (Oliveros-Bastidas, 2009). La variabilidad atípica en las curvas de crecimiento observada en algunas cepas tampoco es un comportamiento desconocido en el estudio de los hongos ya que coincide con lo reportado anteriormente por Vrabl et al. (2019), quienes describen que la composición del medio puede influir en las fases de crecimiento de hongos filamentosos.

En este trabajo, al evaluar el endofitismo de *M. robertsii* en plantas de soja de 39 días de edad mediante tres metodologías distintas, no se detectó la presencia del hongo en forma endofítica en las raíces tratadas. Este resultado es consistente con los hallazgos de Moonjely y Bidochka (2019), quienes no observaron colonización endofítica en plantas dicotiledóneas tratadas con cepas de *Metarhizium spp.*, incluido *M. robertsii*. En su estudio, emplearon siembra en PDA de fragmentos homogenizados de raíces de plantas tratadas con diferentes cepas de *Metarhizium* a los 10 y 20 días post-inoculación, obteniendo resultados similares a los del presente trabajo. Sin embargo, Barelli et al. (2018) reportaron colonización endofítica de *M. robertsii* en plantas de judía (*Phaseolus*

*vulgaris*) a los 60 días de la inoculación, utilizando siembra en PDA y qPCR como metodologías. Estos autores sugirieron que el tiempo necesario para que ocurra la colonización endofítica podría variar según la planta hospedera y las condiciones experimentales, lo que podría explicar la ausencia de endofitismo en las raíces de soja a los 39 días post-inoculación observada en este estudio. Estos resultados resaltan la importancia de considerar tiempos de muestreo más prolongados y variables experimentales específicas al estudiar la interacción endofítica entre *Metarhizium spp.* y diferentes plantas hospedero.

Los cultivos duales realizados en este trabajo demostraron que las cepas *M. robertsii* ILB167 e ILB440 presentaron un antagonismo significativo frente a los fitopatógenos *F. graminearum*, *P. ultimum*, *P. sylvaticum* y *R. oryzae*. En particular, los porcentajes de inhibición obtenidos para *F. graminearum* de  $37 \pm 3$  %, fueron comparables a los reportados por He et al. (2020), quienes encontraron una inhibición del 39,8 % para *Fusarium solani* en cultivos duales en PDA al quinto día de interacción. Esto refuerza la hipótesis de que *M. robertsii* actúa como un antagonista natural frente a hongos del género *Fusarium*. Asimismo, Tomilova et al. (2020) describieron que *M. robertsii* degradó significativamente el micelio superficial de *Rhizoctonia solani* en zonas de contacto directo, lo que concuerda con el antagonismo observado en este trabajo frente a *R. oryzae*. Estos resultados destacan el potencial de *M. robertsii* como agente de biocontrol *in vitro*, y su actividad contra *Pythium spp.* aporta nueva evidencia sobre interacciones poco estudiadas entre *Metarhizium spp.* y este género.

En este trabajo, se observó que el efecto antagonista de *Metarhizium spp.* persistió incluso cuando la colonia del patógeno había alcanzado toda la superficie de la placa, lo que sugiere que la interacción inhibidora no se limita a las fases iniciales de crecimiento. Además, las cepas *M. frigidum* ILB182 e ILB185, así como *M. flavoviride* ILB184 e ILB189, demostraron inhibir significativamente el crecimiento de *R. oryzae*, a pesar de tener tasas de crecimiento más bajas que las observadas en las cepas de *M. lepidiotae* (ILB173, ILB179, ILB221, ILB222, ILB223, ILB225 e ILB232) y de *M. robertsii* (ILB167 e ILB440). Sin embargo, cabe destacar que la actividad observada *in vitro* no siempre se traduce directamente en biocontrol *in vivo*, resaltando la necesidad de pruebas bajo condiciones más cercanas al campo.

Los resultados del presente trabajo destacan la capacidad de *M. robertsii* ILB440 para incrementar significativamente la emergencia de plántulas de soja en presencia de *F. graminearum* y *R. oryzae* bajo condiciones controladas, lo cual contrasta con lo reportado por Rivas (2019) en maíz, donde el recubrimiento de semillas con *M. robertsii* F447 no mostró una capacidad biocontroladora significativa frente a *F. graminearum*. Esta discrepancia podría explicarse por diferencias en las cepas utilizadas, la presión de patógenos o las condiciones experimentales, ya que Rivas trabajó en invernaderos, mientras que este estudio utilizó cámaras de crecimiento con altas cargas de patógenos. Además, los resultados coinciden con los de Sasan y Bidoschka (2013), quienes observaron que plantas de frijol colonizadas por *M. robertsii* mostraron un crecimiento más saludable y menores índices de enfermedad al ser expuestas a *Fusarium solani*. Estas evidencias sugieren que la efectividad de *M. robertsii* como biocontrolador depende de interacciones específicas entre el hongo, el patógeno y el huésped, así como de las condiciones ambientales. En este caso, el uso de soja como modelo experimental aporta información novedosa y relevante, subrayando la importancia de seleccionar cepas específicas para escenarios adversos. Aunque los mecanismos detrás de esta capacidad biocontroladora no fueron abordados en profundidad, el incremento en la emergencia podría estar asociado con la inhibición directa de los patógenos o la activación de defensas en la planta. Estos resultados son prometedores para el manejo integrado del *damping-off* en soja y sugieren la necesidad de validar esta eficacia en condiciones de campo para su implementación práctica en sistemas agrícolas sostenibles.

Actualmente, no se dispone de investigaciones que evalúen la emergencia y/o germinación de semillas tratadas con *Metarhizium* en suelos altamente patogénicos, utilizando técnicas como germinación en papel o macetas. Los experimentos realizados permitieron simular condiciones de campo en un entorno controlado, aunque sin determinar la composición exacta de los patógenos presentes en el suelo. Aun así, los resultados destacaron que *M. robertsii* ILB167 (en concentraciones de conidios alta de  $10^6$  conidios/mL y baja de  $10^4$  conidios/mL) y *M. frigidum* ILB182 (en la concentración de  $10^6$  conidios/mL) redujeron significativamente el impacto del suelo patogénico sobre la germinación de semillas en papel. De igual forma, en condiciones de invernadero, la cepa *M. robertsii* ILB440 (concentración de  $10^8$  conidios/mL) mejoró significativamente la emergencia en macetas con suelo patogénico comparado con los controles. Esto evidencia el potencial biocontrolador de estas cepas frente a fitopatógenos diversos y no

necesariamente limitados a *F. graminearum*, *R. oryzae*, *P. ultimum* o *P. sylvaticum*. Además, la técnica de germinación en papel demostró ser un método rápido y accesible para evaluar inoculantes, mientras que los experimentos en maceta permitieron identificar diferencias significativas en emergencia. Estos estudios preliminares resaltan la utilidad de probar bioinsumos a pequeña escala para seleccionar opciones adaptadas a campos específicos, ofreciendo alternativas prometedoras para productores.

Finalmente, sobre la evaluación de la capacidad de producción de conidios de las cepas en fermentación en sustrato sólido, *M. robertsii* mostró una alta eficiencia, alcanzando rendimientos en el orden de  $10^9$  conidios por gramo de arroz seco. Este nivel de producción no solo es competitivo frente a valores reportados en la literatura, como los obtenidos por *M. anisopliae* en arroz de  $9 \times 10^8$  conidios / g de arroz en estudios de los estudios recientes de Alcantara-Vargas (2020). Además, este rendimiento destaca por su escalabilidad, mostrando un potencial considerable para aplicaciones industriales. Este hallazgo posiciona a *M. robertsii* ILB440 como un bioinsumo prometedor para el manejo sostenible de enfermedades en el cultivo de soja.

## 4.2 Conclusiones

Este estudio permitió caracterizar el comportamiento de diferentes cepas de *Metarhizium spp.* y seleccionar a *M. robertsii* ILB440 como la más prometedora para su desarrollo como bioinsumo en el manejo de enfermedades de implantación en el cultivo de soja.

Las pruebas de compatibilidad entre *Metarhizium spp.* y *Bradyrhizobium elkanii* confirmaron que, aunque *M. lepidiotae* inhibió el crecimiento del rizobio en pruebas *in vitro*, ninguna de las cepas afectó la nodulación ni la fijación biológica de nitrógeno en soja cuando se evaluaron *in vivo*. Esto asegura que la coexistencia entre *Metarhizium spp.* y rizobios es viable, permitiendo preservar la fijación biológica de nitrógeno esencial para sistemas agrícolas sostenibles.

En las evaluaciones de antagonismo *in vitro*, *M. robertsii* ILB440 e ILB167 mostraron actividad significativa frente a *Fusarium graminearum*, *Pythium ultimum*, *Pythium sylvaticum* y *Rhizoctonia oryzae*, demostrando una interacción inhibidora persistente incluso en las fases avanzadas de crecimiento de los patógenos. Además, las pruebas

realizadas en sustratos con concentraciones controladas de *F. graminearum* y *R. oryzae* evidenciaron que *M. robertsii* ILB440 es capaz de mejorar significativamente la emergencia de plántulas de soja duplicando los valores de los controles sin *Metarhizium*, destacándose como un agente eficaz para el biocontrol en estas condiciones. Sin embargo, no se observaron mejoras significativas frente a *Pythium spp.*, lo que resalta la necesidad de explorar estrategias complementarias para abordar patógenos de este género.

Por otra parte, los experimentos realizados en suelo patogénico, caracterizado por una alta carga de microorganismos no identificados, evidenciaron que *M. robertsii* ILB167 y *M. frigidum* ILB182 lograron reducir significativamente el impacto de los patógenos sobre la germinación de semillas de soja en pruebas realizadas en papel. Asimismo, *M. robertsii* ILB440 mostró una capacidad destacada para mitigar la reducción en la emergencia de plántulas en experimentos en macetas con suelo patogénico, resaltando su potencial como una de las cepas más prometedoras en este contexto.

En relación con su capacidad de crecimiento en exudados radiculares, *M. flavoviride* ILB184 y *M. robertsii* ILB167 se posicionaron como las cepas más eficientes en los parámetros evaluados, superando a otras cepas. Sin embargo, *M. robertsii* ILB440 también demostró una adaptación destacable, alcanzando tasas de crecimiento y producción de biomasa comparables a las mejores cepas, lo que respalda su potencial para colonizar eficientemente la rizósfera de la planta de soja.

Por último, la capacidad de producción de conidios en sustrato sólido posicionó a *M. robertsii* ILB440 e ILB167 como las cepas más eficientes, alcanzando rendimientos de hasta  $10^9$  conidios/g de arroz seco. Este rendimiento competitivo frente a valores reportados en la literatura subraya su viabilidad para la producción industrial de bioinsumos.

En conjunto, los resultados obtenidos posicionan a *M. robertsii* ILB440 como una cepa con gran potencial para ser desarrollada como bioinsumo agrícola. Sus características destacadas en este estudio, como la capacidad para biocontrolar fitopatógenos clave, mejorar la emergencia de plántulas y producir conidios a niveles competitivos, la convierten en una opción prometedora para el manejo integrado de enfermedades en el cultivo de soja. Aunque se requiere evaluar su desempeño bajo condiciones de campo y explorar aspectos técnicos, agronómicos y ambientales en mayor detalle, estos hallazgos

constituyen un avance importante hacia el desarrollo de soluciones biológicas sostenibles que puedan contribuir a reducir la dependencia de fungicidas químicos y fortalecer la resiliencia de los sistemas agrícolas.

### 4.3 Perspectivas y Futuras Direcciones de Investigación

El presente trabajo proporciona un punto de partida relevante para explorar el potencial de *Metarhizium spp.*, particularmente de *M. robertsii* ILB440, como herramienta para el manejo integrado de enfermedades en soja. Aunque se han logrado avances significativos, aún existen aspectos clave que requieren ser investigados para consolidar el conocimiento sobre las capacidades de estas cepas y su aplicación en la agricultura. Las líneas de investigación futura abarcan tanto estudios a nivel molecular como evaluaciones prácticas en condiciones reales, con el objetivo de profundizar en los mecanismos subyacentes y optimizar su uso en el campo. A continuación, se presentan las principales áreas que se proyectan como prioridades para continuar avanzando en esta línea de trabajo:

- **Investigación de metabolitos antagonistas:** Profundizar en la identificación y caracterización de los metabolitos producidos por *M. robertsii* ILB440 que inhiben el crecimiento de fitopatógenos, especialmente aquellos que afectan a *Pythium spp.*
- **Evaluación de beneficios adicionales:** Explorar si otras cepas, como *M. flavoviride* ILB184, pueden aportar beneficios adicionales al cultivo de soja, como promoción del crecimiento o inducción de resistencia sistémica.
- **Experimentos en campo:** Realizar estudios a escala de campo para validar la eficacia de *M. robertsii* ILB440 en condiciones reales y evaluar su impacto a largo plazo en la producción y salud del cultivo.
- **Optimización de formulaciones y métodos de aplicación:** Investigar diferentes formulaciones y técnicas de aplicación, como recubrimientos de semillas con polímeros, para mejorar la adherencia y supervivencia de los conidios en condiciones de campo.

La continuidad de esta línea de investigación contribuirá al desarrollo de soluciones biológicas efectivas y sostenibles para el manejo de enfermedades en soja, promoviendo prácticas agrícolas más amigables con el medio ambiente y mejorando la productividad del cultivo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abreo, E., Vaz-Jauri, P., Nuñez, L., Stewart, S., Mattos, N., Dini, B., & Altier, N. (2017). Pathogenicity of *Pythium* spp. obtained from agricultural soils and symptomatic legume seedlings in Uruguay. *Australasian Plant Disease Notes*, 12(1), 35.
- Ahmad, I., Del Mar Jiménez-Gasco, M., Luthe, D. S., & Barbercheck, M. E. (2020). Systemic colonization by *Metarhizium robertsii* enhances cover crop growth. *Journal of Fungi*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/jof6020064>
- Alcantara-Vargas, E., Espitia-López, J., Garza-López, P. M., & Angel-Cuapio, A. (2020). Producción y calidad de conidios de cepas de entomopatógenos del género *Metarhizium anisopliae*, aislados en zonas agrícolas del Estado de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 91, e912912. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2020.91.2912>
- Altier, N., Beyhaut, E., Dall, M., & Rivas, F. (2012). Plataforma De Bioinsumos De Uso Agrícola En Base a Microorganismos Benéficos. *Revista INIA*, 29, 47–50. [http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos\\_compartidos/18429300612191129.pdf](http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos_compartidos/18429300612191129.pdf)
- Araujo, E., & De Albuquerque, E. (2008). Hongos Entomopatógenos: Importante Herramienta Para El Control De “Moscas Blancas” (Homoptera: Aleyrodidae). *Anais Da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, 5(6), 209–242. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/25735/1/Maranhao.pdf>
- Arrua, A. A., Lopez-nicora, H. D., Ríos, D. F., & Javier, C. (2021). El impacto de las enfermedades fúngicas en el cultivo de soja (*Glycine max*) en Paraguay ¿es posible estimar las pérdidas? *Investigaciones y Estudios - UNA*, 12. <https://doi.org/10.47133/ieuna2114>
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 233–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
- Barelli, Larissa & Moreira, Camila & Bidochka, Michael. (2018). Initial stages of endophytic colonization by *Metarhizium* involves rhizoplane colonization. *Microbiology*. 164. 10.1099/mic.0.000729.

- Barelli, L., Waller, A. S., Behie, S. W., & Bidochka, M. J. (2020). Plant microbiome analysis after *Metarhizium* amendment reveals increases in abundance of plant growth-promoting organisms and maintenance of disease-suppressive soil. *Plos One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231150>
- Batta, Y. A. (2013). Efficacy of endophytic and applied *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) against larvae of *Plutella xylostella* L. (Yponomeutidae: Lepidoptera) infesting *Brassica napus* plants. *Crop Protection*, *44*, 128–134. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2012.11.001>
- Behie, S. W., & Bidochka, M. J. (2014). Plant partitioning of the insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* reveals role for secondary metabolites in rhizosphere interactions. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 609. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00609>
- Behie, S. W., & Bidochka, M. J. (2014). Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: An additional branch of the soil nitrogen cycle. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(5), 1553–1560. <https://doi.org/10.1128/AEM.03338-13>
- Behie, S. W., Moreira, C. C., Sementchoukova, I., Barelli, L., Zelisko, P. M., & Bidochka, M. J. (2017). Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. *Nature Communications*, *8*, 1–5. <https://doi.org/10.1038/ncomms14245>
- Behie, S. W., Zelisko, P. M., & Bidochka, M. J. (2012). Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science*, *336*(6088), 1576–1577. <https://doi.org/10.1126/science.1222289>
- Beyhaut, E., & Sicardi, M. (2012). *Fijación biológica de nitrógeno en soja: compatibilidad entre curasemillas y rizobios \* I*. 10–12. INIA
- Clifton, E. H., Jaronski, S. T., Coates, B. S., Hodgson, E. W., & Gassmann, A. J. (2018). Effects of endophytic entomopathogenic fungi on soybean aphid and identification of *Metarhizium* isolates from agricultural fields. *PLoS ONE*, *13*(3), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194815>
- Couto, P., Ortiz, A., Gonzalez, C., & Alfonso, F. (2021). ENCUESTA AGRÍCOLA. “INVIERNO 2021.” *Estadísticas Agropecuarias (DIEA)*.

- Dara, S. K., Dara, S. S. R., & Dara, S. S. (2017). Impact of Entomopathogenic Fungi on the Growth, Development, and Health of Cabbage Growing under Water Stress. *American Journal of Plant Sciences*, 08(06), 1224–1233. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.86081>
- Deaker, R., Hartley, E., & Gemell, G. (2012). Conditions affecting shelf-life of inoculated legume seed. *Agriculture (Switzerland)*, 2(1), 38–51. <https://doi.org/10.3390/agriculture2010038>
- Deaker, R., Roughley, R. J., & Kennedy, I. R. (2007). Desiccation tolerance of rhizobia when protected by synthetic polymers. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(2), 573–580. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.09.005>
- Donzelli, B. G. G., & Krasnoff, S. B. (2016). Molecular genetics of secondary chemistry in *Metarhizium* fungi. En B. Lovett & R. J. St. Leger (Eds.), *Advances in Genetics* (Vol. 94, pp. 365-436). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.005>
- Dutta, P., Kaushik, H., Bhawmick, P., Puzari, K. C., & Hazarika, G. N. (2015). *Metarhizium anisopliae* as endophyte has the ability of plant growth enhancement. *International Journal of Current Research*, 7(4), 14300–14304.
- Ellis, M. L., Broders, K. D., Paul, P. A., & Dorrance, A. E. (2011). Infection of soybean seed by *Fusarium graminearum* and effect of seed treatments on disease under controlled conditions. *Plant Disease*, 95(4), 401–407. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-10-0317>
- Espinel Correal, C., Torres Torres, L. A., Villamizar Rivero, L. F., Bustillo Pardey, A. E., Zuluaga Mogollón, M. V., & Cotes Prado, A. M. (2018). *Hongos entomopatógenos en el control biológico de insectos plaga* (pp. 334,334-367,367). <http://hdl.handle.net/20.500.12324/34071>
- Faria, M. R. d., & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237–256. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>
- Ferraris, G. (2005). Aportes actuales y futuros de tratamientos biológicos sobre la nutrición nitrogenada y producción de soja en el Cono Sur. *I*, 1–4.

- Ferron, P. (1978). Biological control of insect pest by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*, 23(1), 409-442
- Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 337–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>
- Gally, T. (2006). Enfermedades de las semillas de soja en Argentina. *Departamento de Tecnología, Universidad Nacional de Luján*, 7(6700), 5–9. <http://www.sidalc.net/repdoc/A1846e/A1846e.pdf>
- Gao Q, Jin K, Ying SH, Zhang Y, Xiao G, et al. (2011) Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genet* 7: e1001264.
- García, M., Capello, S., Leshner, J., & Molina, R. (2011). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *HORIZONTE SANITARIO*, 10.
- García, J., Elena, J., Posadas, J., Peticari, A., Lecuona, A., & Roberto, E. (2011). *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin Promotes Growth and Has Endophytic Activity in Tomato Plants. *Advances in Biological Research*, 5(1), 22–27.
- Gaviria, J., Parra, P. P., Gonzales, A., Gaviria, J., Parra, P. P., & Gonzales, A. (2020). Selection of strains of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) for endophytic colonization in coconut seedlings. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 36(ahead), 0–0. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902020005000101>
- Glare, T. R. (1994). Stage-dependent synergism using *Metarhizium anisopliae* and *Serratia entomophila* against *Costelytra zealandica*. *Biocontrol Science and Technology*, 4(3), 321–329. <https://doi.org/10.1080/09583159409355340>
- Goettel, M., Koike, M., Kim, J., Aiuchi, D., Shinya, R., & Brodeur, J. (2008). Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes, and plant diseases. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), 256–261. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.009>

- Greenfield, M., Gómez-Jiménez, M. I., Ortiz, V., Vega, F. E., Kramer, M., & Parsa, S. (2016). *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biological Control*, *95*, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.002>
- He, J., Zhang, X., Wang, Q., Li, N., Ding, D., & Wang, B. (2023). Optimization of the Fermentation Conditions of *Metarhizium robertsii* and Its Biological Control of Wolfberry Root Rot Disease. *Microorganisms*, *11*(10), 2380. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102380>
- Hernández, F., García, L. A., Figueroa, K. A., Figueroa, B., Salinas, J., Sangerman, D. M., & Díaz, E. L. (2019). Análisis de las investigaciones sobre *Metarhizium anisopliae* en los últimos 40 años. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *22*, 155–166. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i22.1866>
- Hu, S., & Bidochka, M. J. (2021). Root colonization by endophytic insect-pathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology*, *130*(2), 570–581. <https://doi.org/10.1111/jam.14503>
- Hummadi, E. H., Cetin, Y., Demirbek, M., Kardar, N. M., Khan, S., Coates, C. J., Eastwood, D. C., Dudley, E., Maffeis, T., Loveridge, J., & Butt, T. M. (2022). Antimicrobial Volatiles of the Insect Pathogen *Metarhizium brunneum*. *Journal of Fungi*, *8*(4), 326. <https://doi.org/10.3390/jof8040326>
- Ivancovich, A. (2013). *Enfermedades de soja: Diagnóstico y Manejo*. 1–87. <http://www.agro.unc.edu.ar/~wpweb/fitopatologia/wp-content/uploads/sites/30/2018/03/Enfermedades-de-soja.-Diagnostico-y-manejo..pdf>
- Jaber, L. R., & Enkerli, J. (2016). Effect of seed treatment duration on growth and colonization of *Vicia faba* by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. *Biological Control*, *103*, 187–195. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2016.09.008>
- Jaber, L., & Ownley, B. (2018). Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological Control*, *116*. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.018>
- Jackson, M. A., Dunlap, C. A., & Jaronski, S. T. (2010). Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl*, *55*(1), 129–145. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9240-y>

- Jackson, M. A., & Jaronski, S. T. (2009). Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological Research*, 113(8), 842–850. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.03.004>
- Jaronski, S. T. (2014). "Capítulo 11 - Producción en masa de hongos entomopatógenos: estado del arte", en *Producción en masa de organismos beneficiosos*, editores J. A. Morales-Ramos, M. G. Rojas y B. O. Shapiro-Ilan (Academic Press), 357–413.
- Kepler, R. M., Ugine, T. A., Maul, J. E., Cavigelli, M. A., & Rehner, S. A. (2015). Community composition and population genetics of insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* from soils of a long-term agricultural research system. *Environmental Microbiology*, 17(8), 2791–2804. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12778>
- Khan, A. L., Hamayun, M., Khan, S. A., Kang, S. M., Shinwari, Z. K., Kamran, M., ur Rehman, S., Kim, J. G., & Lee, I. J. (2012). Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1483–1494. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0950-9>
- Krell, V., Jakobs-Schoenwandt, D., Patel, A., & Vidal, S. (2018). Encapsulation of *Metarhizium brunneum* enhances endophytism in tomato plants. *Biological Control*, 116. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.05.004>
- Labandera, C. (2003). SOJA : Inoculantes e Inoculación. *Revista Del Plan Agropecuario*, 53–54.
- Labandera, C. (2005). Actividades en fijación biológica de nitrógeno departamento de microbiología de suelos situación actual y perspectivas. *Agrociencia-Sitio en Reparación*, 9(1-2), 299-303.
- Liao, X., O'Brien, T. R., Fang, W., & St. Leger, R. J. (2014). The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(16), 7089–7096. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5788-2>

- Liao, X., O'Brien, T. R., Fang, W., & St Leger, R. J. (2014). Genetic transformation of *Metarhizium anisopliae* to enhance fungal virulence against mosquito larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(9), 2878-2886.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00889-14>
- Lira, A. C. de, Mascarin, G. M., & Delalibera Júnior, Í. (2020). Microsclerotia production of *Metarhizium* spp. for dual role as plant biostimulant and control of *Spodoptera frugiperda* through corn seed coating. *Fungal Biology*, 124(8), 689–699.  
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.03.011>
- López, C., & Scorsetti, A. C. (2007). Revisión de los hongos Entomophthorales (Zygomycota: Zygomycetes) patógenos de insectos de la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. Recuperado de <https://www.biodiversitylibrary.org/part/112443>.
- Mamani de Marchese, A., & Filippone, M. P. (2018). Bioinsumos : componentes claves de una agricultura sostenible Bio-products : key components of sustainable agriculture. *Rev. Agron. Noroeste Argent.*, 38 (1), 9–21.
- Moonjely, S., & Bidochka, M. J. (2019). Generalist and specialist *Metarhizium* insect pathogens retain ancestral ability to colonize plant roots. *Fungal Ecology*, 41, 209–217.  
<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.06.004>
- Motta, P., & Murcia, O. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Revista Ambiente e Agua*, 6(2), 77–90.
- Musa, S., Richter, O., Balsam, M., Kneer, A., & Barbe, S. (2018). Macroporous films from acetylated lignin and cellulose as precursors for smart coatings based on regenerated wood. *European Journal of Wood and Wood Products*, 76(4), 1363–1366.  
<https://doi.org/10.1007/s00107-018-1308-x>
- Olivera Alegre, M. (2023). *Tecnologías de multiplicación y formulación de cepas de Trichoderma para el desarrollo de un bioinsumo de uso agrícola* [Tesis de Maestría, Universidad de la República]. INIA Las Brujas.
- Ownley, B., Griffin, M., Klingeman, W., Gwinn, K., Moulton, J., & Pereira, R. (2008). *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), 267–270. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.010>

- Ownley, B. H., Gwinn, K. D., & Vega, F. E. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: Ecology and evolution. *BioControl*, 55(1), 113–128. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9241-x>
- Padilla-Melo, G. N., Bernal-Uribe, M. G., Vélez-Arango, P. E., & Montoya-Restrepo, C. (2000). Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos de diferentes ordenes insectiles. *Cenicafe*, 51(1), 28–40.
- Pell, J. K., Eilenberg, J., Hajek, A. E., & Steinkraus, D. C. (2001). Biology, ecology and pest management potential of entomophthorales. En T. M. Butt, C. W. Jackson, & N. Magan (Eds.), *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential* (pp. 71–153). CABI Publishing.
- Quesada-Moraga, E., Rodríguez-Sánchez, A., & Garrido-Jurado, I. (2019). Hongos patógenos de insectos como endófitos. En C. López-Lastra & R. E. Lecuona (Eds.), *Micopatología de artrópodos: hongos entomopatógenos para ser usados como bioinsumos en el control microbiano de plagas* (pp. 151-166). Ediciones INTA.
- Raya-Díaz, S., Sánchez-Rodríguez, A. R., Segura-Fernández, J. M., Del Campillo, M. D. C., & Quesada-Moraga, E. (2017). Entomopathogenic fungi-based mechanisms for improved Fe nutrition in sorghum plants grown on calcareous substrates. *PLoS ONE*, 12(10), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185903>
- Razinger, J., Lutz, M., Schroers, H.-J., Urek, G., Ju", J., & Grunder, J. (2014). Evaluation of Insect Associated and Plant Growth Promoting Fungi in the Control of Cabbage Root Flies. *J. Econ. Entomol*, 107(4), 1348–1354. <https://doi.org/10.1603/EC14004>
- Rehner, S. A., & Kepler, R. M. (2017). Species limits, phylogeography and reproductive mode in the *Metarhizium anisopliae* complex. *Journal of Invertebrate Pathology*, 148, 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.06.007>
- Rivas, F. (2018). *A new approach for delivery of entomopathogenic fungi for plant protection against insect pests and plant diseases via maize seed coating* [Lincoln University, Lincoln, New Zealand.]. [http://researcharchive.lincoln.ac.nz/bitstream/handle/10182/10509/Rivas\\_Franco\\_PHD.pdf?sequence=3&isAllowed=y](http://researcharchive.lincoln.ac.nz/bitstream/handle/10182/10509/Rivas_Franco_PHD.pdf?sequence=3&isAllowed=y)

- Rivas-Franco, F., Hampton, J. G., Altier, N. A., Swaminathan, J., Rostás, M., Wessman, P., Saville, D. J., Jackson, T. A., Jackson, M. A., & Glare, T. R. (2020). Production of Microsclerotia From Entomopathogenic Fungi and Use in Maize Seed Coating as Delivery for Biocontrol Against *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 606828. (January 2021) <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.606828>
- Rivas, F., Hampton, J. G., Morán-Diez, M. E., Narciso, J., Rostás, M., Wessman, P., Jackson, T. A., & Glare, T. R. (2019). Effect of coating maize seed with entomopathogenic fungi on plant growth and resistance against *Fusarium graminearum* and *Costelytra giveni*. *Biocontrol Science and Technology*, 29(9), 877–900. <https://doi.org/10.1080/09583157.2019.1611736>
- Rivas-Franco, F., Hampton, J., Narciso, J., Rostás, M., Wessman, P., Saville, D., Jackson, T., & Glare, T. (2020). Effects of a maize root pest and fungal pathogen on entomopathogenic fungal rhizosphere colonization, endophytism and induction of plant hormones. *Biological Control*, 150, 104347. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104347>
- Rizvi, S. S. A., & Yang, X. B. (1996). Fungi associated with soybean seedling disease in Iowa. In *Plant Disease* (Vol. 80, Issue 1, pp. 57–60). <https://doi.org/10.1094/PD-80-0057>
- Salvagiotti, F., Capurro, J., & Enrico, J. (2009). El manejo de la nutrición nitrogenada en soja. *Inta*, 42, 45–51.
- Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. (2012). The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American Journal of Botany*, 99(1), 101–107. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100136>
- Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. (2013). Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(3), 288–293. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.823114>
- Shalan, R. S., Gerges, E., Habib, W., & Ibrahim, L. (2021). Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* induces growth promotion effect and increases the resistance of cucumber plants against *Aphis gossypii*. *Journal of Plant Protection Research*, 61(4), 358. <https://doi.org/10.24425/jppr.2021.139244>

- Shahid, A . A ., Rao, Q . A ., Bakhsh, A ., & Husnain, T . (2012). Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. *Archives of Biological Sciences*, 64(1), 21-42
- Sorhouet, P., & Souza, F. (2019). Damping off causada por *Fusarium* en soja: efecto de la especie y su control. Universidad de la República Facultad de Agronomía.  
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/29587>
- Starobinsky, G., Monzón, J., Broggi, M., & Braude, H. (2021). Bioinsumos para la agricultura que demandan esfuerzos de investigación y desarrollo Capacidades existentes y estrategia de política pública para impulsar su desarrollo en Argentina. *Inta*.
- Steinhaus, E. (1956). MICROBIAL CONTROL-THE EMERGENCY OF IDEA. A Brief History of Insect Pathology Trough the Nineteenth Century. *A Journal of Agricultural Science Published by the California Agricultural Experiment Station*, 26, N°2, 107–160.
- Stewart, S., & Rodríguez, M. (2013). Manual de identificación de enfermedades de la soja. In *INIA, Boletín de divulgación 104*. [http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos/compartidos/bd\\_104\\_2013.pdf](http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos/compartidos/bd_104_2013.pdf)
- Tariq, M., Yasmin, S., & Hafeez, F. Y. (2010). Biological control of potato black scurf by rhizosphere associated bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3), 439–451.
- Tomilova, O. G., Shaldyaeva, E. M., Kryukova, N. A., Pilipova, Y. V., Schmidt, N. S., Danilov, V. P., Kryukov, V. Y., & Glupov, V. V. (2020). Entomopathogenic fungi decrease rhizoctonia disease in potato in field conditions. *PeerJ*, 8, 1–26.  
<https://doi.org/10.7717/peerj.9895>
- Urrea, K., Rupe, J. C., & Rothrock, C. S. (2013). Effect of fungicide seed treatments, cultivars, and soils on soybean stand establishment. *Plant Disease*, 97(6), 807–812.  
<https://doi.org/10.1094/PDIS-08-12-0772-RE>
- Valle-Ramírez, S. B., Torres-Gutiérrez, R., Caicedo-Quinche, W. O., Abril-Saltos, R. V., & Sucoshañay-Villalba, D. J. (2022). Aislamiento y caracterización de *Metarhizium* spp. de cultivos de caña de azúcar y su patogenicidad contra *Mahanarva andigena* (Hemiptera: Cercopidae). *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 23(1).  
[https://doi.org/10.21930/rcta.vol23\\_num1\\_art:2361](https://doi.org/10.21930/rcta.vol23_num1_art:2361)

- Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N. K., Monzón, A., Ownley, B. H., Pell, J. K., Rangel, D. E. N., & Roy, H. E. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, 2(4), 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.05.001>
- Wall, M. T. (1983). *Cultural, pathological, and environmental factors influencing treatment of soybean seeds with fungicides* (Tesis de maestría). Iowa State University. <https://doi.org/10.31274/rtd-180813-8547>
- Wyrebek, M., Huber, C., Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. (2011). Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. *Microbiology*, 157(Pt 10), 2904–2911. <https://doi.org/10.1099/mic.0.051102-0>
- Wyrebek, M., & Bidochka, M. J. (2013). Variability in the Insect and Plant Adhesins, Mad1 and Mad2, within the Fungal Genus *Metarhizium* Suggest Plant Adaptation as an Evolutionary Force. *PLoS ONE*, 8(3), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059357>

## ANEXO

### Medio de cultivo Triptona y extracto de levadura (TY)

Componentes	Concntración (g/L)
Triptona	5,0
Extracto de levadura	3,0
CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	0,9
H <sub>2</sub> O destilada	1,0 L

(Beringer, 1976)

### Medio de cultivo Extracto de Levadura Manitol y Agar (EMA) modificado

Componentes	Concntración (g/L)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
NaCl	0,1
Extracto de Levadura	0,5
FeCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1 gota de una solución al 10%
Manitol	10,0
SO <sub>4</sub> Mn	1 gota de una solución al 10%
Agar	15,0
H <sub>2</sub> O	1,0 L

Ajustar a pH 6,8 – 7 con 0,1N de KOH

### Medio selectivo de *Metarhizium* MSM

Componentes	g/L
Avena	30,0
CTAB	0,60
Cloramfenicol *	0,50
Cicloheximide *	0,25
Agar	20,0

Mezclar todos los componentes sin los antibióticos, completar con agua destilada hasta 1 L. luego se esteriliza 15 min a 121°C y 1,5 atm.

\* Esterilización por filtrado e incorporación al medio de cultivo esterilizado

CTAB – Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*)

### **Procedimiento de tinción con WGA-Alexa/ yoduro de propilo/ ConA-AF/rojo Congo**

- Remojar las fracciones de raíz en EtOH 95% durante la noche a 4 °C
- Tratar con KOH al 10% durante otra noche
- Incubar en la solución de tinción durante aproximadamente 30 min, durante este tiempo, infiltrar al vacío las muestras 3 veces durante aproximadamente 1-2 min cada vez
- Dejar en PBS durante 3 hs. y luego en tampón nuevo durante la noche
- Almacenar las muestras en la oscuridad a 4 °C hasta su análisis para microscopía fluorescente/confocal (filtros:

### **Soluciones de tinción en 1X PBS (pH 7,4):**

- 20 µg/mL de yoduro de propidio
- 10 µg/mL WGA-AF488
- 10 µg/mL ConA-AF633
- 10 µg/mL Rojo Congo
- 0,1% Triton X-100

### **Soluciones de stock:**

- Yoduro de propidio: 10 mg/mL en PBS, conserva a 4 °C
- WGA-AF488: 1 mg/mL en H<sub>2</sub>O, almacenar a 4 °C en oscuridad
- ConA-AF633: 5 mg/mL en H<sub>2</sub>O, almacenar a 4 °C en oscuridad

### **Solución de Tampón de fosfato salino PBS**

<b>Componente</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
NaCl	8,0
KCl	0,2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24
H <sub>2</sub> O destilada	Hasta completar 1,0 L

Ajustar pH a 7,4 con HCl o KOH