

PROYECTO EX-2025-00002135-CF-GES#DC

TIERRA DEL FUEGO, ANTÁRTIDA E ISLAS DEL ATLÁNTICO SUR

CONSEJO FEDERAL DE INVERSIONES

**“EVALUACIÓN DE LAS INTERACCIONES ANTAGÓNICAS ENTRE
HIERACIUM PILOSELLA L. Y MICROORGANISMOS EDÁFICOS NATIVOS
PARA EL DESARROLLO DE EXTRACTOS INHIBITORIOS CON
POTENCIAL BIOHERBICIDA EN LA PROVINCIA DE TIERRA DEL FUEGO”**

Informe Final

Fecha: 20/05/26

AUTORIDADES PROVINCIALES

Gobernador

Prof. Gustavo Adrián MELELLA

Ministro de Producción y Ambiente

Mg. Francisco DEVITA

CONSEJO FEDERAL DE INVERSIONES

Secretario General

Lic. Ignacio LAMOTHE

PROYECTO EX- 2025-00002135-CF-GES#DC

**“EVALUACIÓN DE LAS INTERACCIONES ANTAGÓNICAS ENTRE
HIERACIUM PILOSELLA L. Y MICROORGANISMOS EDÁFICOS NATIVOS
PARA EL DESARROLLO DE EXTRACTOS INHIBITORIOS CON
POTENCIAL BIOHERBICIDA EN LA PROVINCIA DE TIERRA DEL FUEGO”**

Informe Final

Autor

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA

Dotación

Dra. Noelia Ivana PAREDES (responsable del proyecto)

Lic. Rodrigo MAIO

Ing. Agr. Macarena CARDOZO

Dra. Gabriela GONZÁLEZ GARRAZA

Ing. Agr. Enrique LIVRAGHI

Lic. Gabriel Renato CASTRO

Contrapartes técnicas provinciales

Secretaría de Desarrollo Productivo y PyME del Ministerio de Producción y
Ambiente

Lic. Victoria ALAZARD

Contraparte técnica CFI

Lic. Alejandro ZICIS

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	9
3. CONTEXTUALIZACIÓN DEL PROBLEMA	10
4. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	13
5. ANÁLISIS INTEGRADO DE LOS COMPONENTES TÉCNICOS DEL PROYECTO	29
5.1. OE1 Aislamiento y caracterización de microorganismos nativos con potencial antagónico contra <i>Hieracium pilosella</i>	30
5.1.1. Diseño y recolección de muestras	30
5.1.2. Caracterización química de las muestras de suelo	32
5.1.3. Hongos y bacterias de suelo	38
5.1.4. Cianobacterias	56
5.1.5. Micorrizas.....	62
5.1.5.1. Detección y registro de asociaciones micorrícicas en raíces (endomicorrizas)	62
5.1.5.2. Diversidad micorrícica en muestras de suelo	65
5.1.6. Análisis e interpretación de los resultados	68
5.1.7. Adquisición de equipos y materiales de laboratorio.....	72
5.1.8. Ejecución y evaluación del OE1: actividades realizadas, nivel de cumplimiento, limitaciones operativas y ajustes metodológicos	74
5.2. OE2 Evaluación experimental de tratamientos de control sobre <i>Hieracium pilosella</i>	77
5.2.1. Recolección y análisis químico de muestras edáficas	77
5.2.2. Ensayo de aplicación de extracto de cianobacteria en suelo.....	82
5.2.3. Ensayo de aplicación foliar de extracto de cianobacteria	94
5.2.4. Ensayo de viabilidad	106
5.2.5. Evaluación fitopatológica de la clorosis vegetal	111
5.2.6. Análisis e interpretación de los resultados	118
5.2.7. Ejecución y evaluación del OE2: actividades realizadas, nivel de cumplimiento, limitaciones operativas y ajustes metodológicos	123
5.3. OE3 Evaluación del potencial inhibitorio de metabolitos microbianos	126
5.3.1. Capacitación técnica y transferencia metodológica sobre cianobacterias	127
5.3.2. Montaje de sistema de cultivo de cianobacterias.....	128
5.3.3. Obtención de extractos para aplicación en ensayos	130
5.3.4. Ensayo de capacidad inhibitoria de germinación en semillas de <i>Medicago sativa</i> (alfalfa) y de <i>Hieracium pilosella</i>	133

5.3.5. Análisis e interpretación de los resultados	139
5.3.6. Ejecución y evaluación del OE3: actividades realizadas, nivel de cumplimiento, limitaciones operativas y ajustes metodológicos	142
5.3.6. Comunicación y difusión del proyecto.....	144
6. CONCLUSIONES	146
7. PERSPECTIVAS.....	148
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	151
ANEXO I - MONITOREO DE LÍNEA BASE ASOCIADO A LOS TRATAMIENTOS IMPLEMENTADOS EN LA CLAUSURA DE ESTANCIA CULLEN	158
ANEXO II - PROTOCOLO DE MUESTREO	168
ANEXO III – PROTOCOLOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS QUÍMICOS DE LAS MUESTRAS DE SUELO	172
1. DETERMINACIÓN DE CONTENIDO HÍDRICO EN MUESTRAS DE SUELO (% HUMEDAD)	172
2. DETERMINACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA EN MUESTRAS DE SUELO ..	172
3. DETERMINACIÓN DE P EXTRAÍBLE EN SUELOS POR EL MÉTODO DE BRAY & KURTZ.....	173
4. DETERMINACIÓN DE PH DE SUELO	175
5. DETERMINACIÓN DE CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DE SUELO	176
6. DETERMINACION DE NITROGENO TOTAL (POR EL MÉTODO SEMIMICRO KJELDAHL)	177
ANEXO IV – METODOLOGÍAS PARA ABORDAR LA DIVERSIDAD BACTERIANA Y FÚNGICA EN MUESTRAS DE SUELO.....	178
1. DILUCIONES SERIADAS DE SUELO Y SIEMBRA EN MEDIOS DE CULTIVO	178
2. TRAMPAS DE ARROZ PARA EL AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS EDÁFICOS	180
3. AISLAMIENTOS MONOSPÓRICOS POR DILUCIÓN SERIADA.....	181
4. LAVADO DE SUELO Y SEMBRADO DE PARTÍCULAS	182
ANEXO IV - PREPARACIÓN DE RAÍCES PARA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE MICORRIZAS	183
ANEXO VI – METODOLOGÍA PARA DETERMINAR LA DIVERSIDAD DE HONGOS MICORRÍMICOS EN MUESTRAS DE SUELO.....	185
ANEXO VII – LISTADO DE EQUIPAMIENTO E INSUMOS ADQUIRIDOS EN EL MARCO DEL PROYECTO.....	186
ANEXO VIII- TABLAS DE ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LOS ENSAYOS EXPERIMENTALES BAJO INVERNADERO Y DE LAS PRUEBAS DE GERMINACIÓN	188
ANEXO IX: PROTOCOLO DE CULTIVO, ESCALADO Y COSECHA DE CULTIVOS DE CIANOBACTERIAS (ORDEN NOSTOCALES)	189

ANEXO X: DETERMINACIÓN Y LIBERACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN CIANOBACTERIAS	192
---	-----

1. RESUMEN

El proyecto abordó la problemática asociada a la invasión de *Hieracium pilosella* en los pastizales del norte de Tierra del Fuego, mediante un enfoque que integró el análisis de suelos, la caracterización de la microbiota edáfica y la evaluación del potencial de microorganismos y extractos biológicos como herramientas de manejo.

En una primera etapa, se realizó la caracterización de los ambientes de estudio, identificándose una importante heterogeneidad entre unidades a nivel físico-químico y microbiológico. En este contexto, se observaron condiciones diferenciales en sitios donde la presencia de *H. pilosella* fue menor, y se destacaron dos unidades (U1 y U5), que presentaron mayores niveles de materia orgánica, nutrientes y una mayor abundancia de microorganismos, particularmente micorrizas. Estos resultados permitieron reconocer la existencia de ambientes contrastantes dentro del sistema estudiado.

Desde el punto de vista microbiológico, se logró el aislamiento y reconocimiento de diversos grupos de organismos edáficos de interés. Entre ellos, se destacaron hongos filamentosos ampliamente distribuidos en suelo, pertenecientes a géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cladosporium* y *Alternaria*, además de una presencia generalizada de micorrizas en todas las unidades y en las raíces de las especies vegetales evaluadas, incluida *H. pilosella*. También se avanzó en el aislamiento de cianobacterias locales del orden Nostocales, identificándose tres morfotipos, entre ellos uno afín a *Anabaena cf. torulosa*, actualmente en proceso de estabilización en cultivo. A partir de estos aislamientos se inició el escalado progresivo de biomasa, ajustando condiciones de crecimiento y manteniendo las cepas, lo que permitió sentar las bases para el trabajo con estos organismos a nivel local.

En una segunda etapa, se evaluó el efecto de un extracto biológico obtenido a partir de la cianobacteria nostocal *Hydrocoryne australis*, especie no nativa, generado en un laboratorio externo a partir de biomasa cultivada en condiciones controladas. Los resultados obtenidos evidenciaron que la respuesta biológica frente a la aplicación del extracto varió según la vía de aplicación y las condiciones del ensayo.

En plantas, la aplicación en suelo no produjo efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *H. pilosella*, mientras que la aplicación foliar generó un efecto fitotóxico evidente, afectando hojas, estolones y estructuras reproductivas.

Los ensayos de germinación complementaron estos resultados, evidenciando una disminución progresiva del porcentaje de germinación en *H. pilosella* a medida que aumentó la concentración del extracto, lo que indicó una respuesta dosis-dependiente. En contraste, en *Medicago sativa* no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, aunque se observaron variaciones que no pudieron ser confirmadas, probablemente asociadas al diseño experimental.

Los resultados de los distintos ensayos muestran coherencia entre sí y permiten interpretar que el efecto del extracto se manifiesta principalmente bajo condiciones de mayor concentración o contacto directo, mientras que en condiciones de dilución o aplicación indirecta no se evidencian efectos inhibitorios sobre la planta.

Durante los ensayos también se evidenció la influencia de las condiciones experimentales, particularmente en el caso del invernadero, donde se registraron síntomas asociados a estrés y colonización por microorganismos oportunistas, especialmente en plantas control, lo que aportó un marco adicional para la interpretación de los resultados.

De manera transversal, el proyecto permitió ajustar metodologías de muestreo, aislamiento y cultivo, así como fortalecer capacidades técnicas locales vinculadas al manejo de microorganismos, al escalado de cultivos y al diseño de ensayos experimentales. En conjunto, el trabajo generó información de base sobre suelos, microbiota y respuesta biológica de *H. pilosella* a la aplicación de un extracto biológico, integrando enfoques microbiológicos, edáficos y fisiológicos en el análisis del sistema.

2. INTRODUCCIÓN

El proyecto “Evaluación de las interacciones antagónicas entre *Hieracium pilosella* L. y microorganismos edáficos nativos para el desarrollo de extractos inhibitorios con potencial bioherbicida en la provincia de Tierra del Fuego” se planteó como una aproximación inicial al estudio de alternativas biológicas para el manejo de esta especie invasora, con énfasis en el rol de los microorganismos del suelo y en el uso de extractos de origen microbiano.

Para abordar esta problemática, el trabajo se organizó en torno a los siguientes objetivos específicos:

- **OE1** | Aislar microorganismos nativos con potencial antagónico contra *Hieracium pilosella*.
- **OE2** | Evaluar la efectividad del control químico y extractos biológicos comerciales (biopreparados innovadores) en la inhibición del crecimiento y desarrollo de *H. pilosella* en condiciones controladas.
- **OE3** | Analizar la capacidad inhibitoria de los compuestos bioactivos extraídos de los microorganismos nativos en plantas modelo.

A lo largo de la ejecución se fueron combinando actividades de campo, laboratorio y ensayos experimentales. Esto implicó no solo la generación de información, sino también el ajuste de metodologías y la resolución de aspectos operativos vinculados al muestreo, al manejo de cultivos microbianos y al diseño de ensayos.

En el presente informe se integran los resultados obtenidos en estas distintas líneas de trabajo. En los que se habían comunicado avances parciales en etapas previas, se retomaron de manera sintética, priorizando los resultados finales y la relación entre ellos.

A continuación, se presentan los resultados correspondientes a la caracterización de los ambientes, el análisis microbiológico y los ensayos

experimentales realizados, con el objetivo de ofrecer una visión conjunta del sistema estudiado y de los alcances reales del trabajo desarrollado.

3. CONTEXTUALIZACIÓN DEL PROBLEMA

En el norte de la isla de Tierra del Fuego, los pastizales naturales constituyen el principal bioma de interés productivo, ya que en ellos se sustenta la actividad ganadera ovina de la región. Estos ambientes han soportado el pastoreo por animales domésticos durante más de un siglo (Soriano, 1983; Aagesen, 2000; Anchorena y col., 2001), lo que ha alterado significativamente la estructura de la vegetación. Este uso intensivo ha facilitado la proliferación de especies consideradas malezas, como *Azorella* sp., en coironales, faldeos y bordes secos de vegas y *Caltha sagittata* en sectores de vegas húmedas (Collantes y col., 2005). A éstas se suma la especie exótica *Hieracium pilosella* L. (Asteraceae), que no está ligada únicamente a condiciones de sobrepastoreo, pero que avanza paulatinamente, desplazando a las especies nativas de los pastizales fueguinos (Cipriotti y col., 2010), disminuyendo la calidad forrajera de los pastizales y, con ello, la receptividad ganadera (Cipriotti y col., 2014).

Hieracium pilosella es originaria del norte de Eurasia (Bishop y Davy, 1994) y ha invadido agresivamente pastizales en varios países, incluidos Nueva Zelanda (Duncan y col., 1997; Rose y col. 1998; Treskonova 1991), Estados Unidos (Vander Kloet, 1978; Voss y Böhlke, 1978), Suiza (Winkler y Stöcklin 2002) y Chile (Covacevich, 2001). En Nueva Zelanda, donde fue introducida en la década de 1920 (Makepeace y col., 1985), se mantuvo inicialmente en poblaciones de baja densidad hasta experimentar un crecimiento explosivo en la década de 1950 (Connor 1964, 1965, 1992). En Argentina, fue registrada por primera vez en 1993 en la región de estepa de la provincia de Tierra del Fuego (Livraghi y col., 1998). Esta especie es común en pastizales secos, pobres y degradados (Bishop y Davy, 1994), aunque presenta gran eficiencia en la captura y uso de pulsos de nutrientes (Fan y Harris, 1996). Además, puede liberar un compuesto alelopático de origen fenólico: la umbeliferona, que inhibe el crecimiento de las raíces de otras especies (Makepeace y col., 1985). Se reproduce tanto por estolones -cuya producción es estimulada por el pastoreo (Covacevich, 2009)- como por semillas generadas sexual o asexualmente, que

se dispersan eficientemente por el viento (Sheepens, 1994). La combinación particular de estas características le confiere una gran competitividad y tolerancia al estrés (Grime, 1977).

Según Cipriotti y col. (2010), en los pastizales de la región, *H. pilosella* puede reducir la biomasa de especies forrajeras hasta un 50%, llegando en casos extremos a una disminución del 90%, lo que afecta severamente la productividad ganadera. Asimismo, su capacidad reproductiva y resistencia a condiciones adversas dificultan su control, convirtiéndola en una amenaza persistente para la sostenibilidad de los pastizales.

El impacto de esta especie no se limita a la producción forrajera; también afecta la biodiversidad local al desplazar especies nativas y alterar la composición de las comunidades vegetales, restringiendo la disponibilidad de recursos para herbívoros y polinizadores. De acuerdo con Cipriotti y col. (2010), esta pérdida de diversidad no solo reduce la resiliencia del ecosistema, sino que también afecta los ciclos ecológicos y las interacciones tróficas, generando un impacto negativo a largo plazo en la salud de los ecosistemas (Cipriotti y col., 2010).

Actualmente, en la provincia se están realizando experiencias de control químico mediante el uso de herbicidas, buscando identificar principios activos y dosis efectivas (datos no publicados). Sin embargo, las condiciones climáticas de la isla limitan los períodos de aplicación, y algunos herbicidas han sido prohibidos por su toxicidad. Por ello, es fundamental desarrollar tecnologías alternativas para un manejo integrado y sostenible que favorezca la recuperación de los pastizales.

A nivel mundial, el control biológico se destaca como una herramienta eficaz para el manejo de especies invasoras. Este método, basado en principios ecológicos sólidos, utiliza enemigos naturales específicos de una planta considerada maleza, con el objetivo de limitar su población. Sin embargo, el impacto real de un agente biológico como regulador depende de su interacción con otros factores bióticos, así como con las condiciones abióticas presentes en el hábitat (De Bach, 1964).

Entre los factores bióticos, la microbiota del suelo desempeña un papel crucial en la salud y la productividad de los ecosistemas. Este conjunto de microorganismos -que incluye bacterias, hongos, protistas y otros- es esencial para procesos como la fertilidad del suelo y el reciclaje de nutrientes (Van Der Heijden y col., 2008; Fierer, 2017). Además, influye directamente en el crecimiento de las plantas y la dinámica poblacional de las malezas (Latz y col., 2012). La microbiota puede actuar como una barrera natural, compitiendo por recursos como el agua y los nutrientes, lo que dificulta el establecimiento y desarrollo de especies no deseadas (Kremer, 2006). Asimismo, algunos microorganismos producen compuestos químicos que inhiben el crecimiento de las malezas o provocan enfermedades que las debilitan (Inderjit y Callaway, 2003).

Por otro lado, ciertas malezas han desarrollado mecanismos para interactuar de manera favorable con la microbiota del suelo. Estas plantas exudan sustancias que modifican el microbioma edáfico a su favor, creando condiciones que favorecen su desarrollo en detrimento de las especies cultivadas o nativas (Kour y col., 2021). En este sentido, la gestión de la microbiota del suelo se presenta como una herramienta prometedora en el manejo sostenible, favoreciendo la recuperación de los pastizales y el control natural de las malezas, reduciendo así la dependencia de herbicidas químicos (Bakker y col., 2020).

Entre los microorganismos con potencial herbicida, destaca un subgrupo de cianobacterias, conocidas por sintetizar compuestos activos con capacidad para inhibir o reducir la germinación y el crecimiento en plántulas en algunas gramíneas y herbáceas (Paerl y col., 2013; Charoenying y col., 2022). Estos compuestos incluyen péptidos cíclicos (Singh y col., 2020) y polifenoles (Singht y col., 2016), reconocidos por su efectividad, biodegradabilidad e inocuidad ambiental (Singht y col., 2016).

En este contexto, diversas investigaciones (Brilisauer y col., 2019; Charoenying y col., 2022; Gleason y Case, 1986; Koodkaew y col., 2012; Sukkhaeng y col., 2015) han demostrado que distintos compuestos derivados de cianobacterias afectan negativamente, a través de diferentes vías bioquímicas, procesos clave como la germinación, la elongación radicular y la integridad de

las células epidérmicas. A nivel sudamericano, los trabajos liderados por el Lic. Gabriel Renato Castro y su equipo demostraron la potencialidad de extractos de cianobacterias locales para inhibir el crecimiento vegetal y de hongos fitopatógenos en árboles frutales y hortalizas (Castro y col., Proyecto CORFO; Castro y col., Proyecto SUC; datos no publicados). No obstante, hasta la fecha no se registran antecedentes específicos sobre la evaluación de estos extractos en el control de *Hieracium pilosella*. Esta línea de investigación abre nuevas perspectivas para el desarrollo de herramientas innovadoras y sostenibles destinadas a la gestión de malezas invasoras en la provincia de Tierra del Fuego.

4. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

4.1. Ubicación geográfica y caracterización general

Las actividades de recolección de muestras de suelo, agua y especies vegetales se llevaron a cabo en la Estancia Cullen, ubicada en el extremo norte de la isla Grande de Tierra del Fuego, aproximadamente a 120 km de la ciudad de Río Grande. Se trata de un establecimiento ganadero de gran escala (63.000 ha), cuya actividad principal desde fines del siglo XIX ha sido la cría ovina para la producción de lana fina y carne destinada a mercados continentales. Actualmente la carga animal promedio es de 0,5 equivalente ovino por hectárea, basada principalmente en el aprovechamiento del pastizal natural.

La estancia limita al norte con el Estrecho de Magallanes y el Mar Argentino, al oeste con la República de Chile, al sur con la Estancia San Martín y al este con el Mar Argentino. Su fundación data de 1896, bajo la firma Waldron and Wood, pioneros de la ganadería y de la industria frigorífica en la región austral.

Desde el punto de vista agroecológico, el área se ubica dentro de la Región Agroecológica de Estepa Magallánica Fueguina, equivalente a la estepa magallánica húmeda de la porción continental. Fisonómicamente corresponde a una estepa graminosa de coirón fueguino (*Festuca gracillima*), con sectores dominados por mata negra (*Chilliotrichum diffusum*) y otros en los que predomina el murtillar (*Empetrum rubrum*). También se encuentran praderas de pastos

cortos, alternadas en mosaico con coironales, y mallines de desarrollo dendrítico, que ocupan entre un 5 y 10 % de la superficie. El relieve es predominantemente ondulado, sobre terrazas de origen glacial, planicies glacifluviales y morenas cuaternarias, alternadas con áreas planas sobre mesetas sedimentarias terciarias.

El clima es semiárido, con precipitaciones anuales entre 270 y 400 mm, distribuidas de manera uniforme a lo largo del año. La temperatura media anual es de 5,4 °C, con valores estivales cercanos a 10 °C e invernales de 0 °C. Las nevadas son frecuentes, aunque de menor intensidad y persistencia que en otras áreas de la provincia. No existe un período libre de heladas.

En cuanto a los suelos, predominan los Molisoles con horizonte A de textura franco-arenosa y contenidos de materia orgánica entre 5 y 10 %. Según Collantes y col. (1989), los sustratos cuaternarios (planicies fluvioglaciales, morenas y terrazas marinas) originan suelos oligotróficos ácidos (pH 4–6), con baja saturación de bases y altos contenidos de aluminio. En contraste, los paisajes sobre depósitos terciarios desarrollan suelos eutróficos, con pH > 6, alta concentración de bases y bajos niveles de aluminio, mientras que sobre morenas se encuentran suelos mesotróficos de características intermedias. Los horizontes C suelen ser areno-gravillosos o arcillo-areno-gravillosos compactos.

La vegetación natural utilizada como base forrajera corresponde a distintas unidades:

- Coironales acidófilos de *Festuca gracillima*, en áreas planas u onduladas.
- Matorrales de mata negra (*Chilliotrichum diffusum*), en lomadas.
- Estepas subarbustivas de murtilla (*Empetrum rubrum*), en sectores planos.
- Praderas de pastos cortos, generalmente resultantes de coironales degradados por pastoreo.
- Vegas gramíneas y graminoides, con distintos grados de humedad, asociadas a cursos de agua permanentes o temporales.

Una situación particular se observa en las marismas de la Bahía San Sebastián, al sur de la estancia. Este valle glaciario con intrusión marina presenta suelos salino-sódicos, que sostienen vegetación halófila adaptada, incluyendo *Salicornia* sp., praderas gramíneas y matorrales de mata verde (*Lepidophyllum cupressiforme*) y coironales.

En estudios previos, Cipriotti y col. (2006) observaron en esta zona una relación entre el nivel o la historia de disturbios y la presencia de la especie invasora. Por lo tanto, algunos de los sitios seleccionados para el muestreo corresponden a potreros con antecedentes de uso vinculados a la implantación de pasturas, como el potrero “Pirámide” y el potrero “Pasturas Casco”. Asimismo, en este mismo trabajo se identificaron comunidades vegetales con mayor grado de invasión, registrándose valores más altos de abundancia en matorrales abiertos y coironales.

4.2. Definición y caracterización de los sitios de muestreo

La selección de los sitios de muestreo se llevó a cabo con el objetivo de representar la diversidad de condiciones ambientales y de manejo presentes en la Estancia Cullen, garantizando así la obtención de datos representativos para el estudio.

Para la realización del diseño de muestreo se consideraron los siguientes factores:

- *Cobertura vegetal*: zonas con presencia o ausencia de *Hieracium pilosella*.
- *Historial de uso del suelo*: ausencia o presencia actual de pastoreo, remoción de suelo e implantación de pasturas.
- *Historial de aplicaciones*: zonas con aplicación de soluciones para control químico (reciente y antigua).
- *Variabilidad topográfica*: sitios en laderas, planicies y depresiones.
- *Presencia de cianobacterias*: sitios en los que, a partir de un trabajo previo, se detectó presencia de cianobacterias.

- *Heterogeneidad del suelo*: diferenciación por textura, contenido de materia orgánica y humedad.

Además, se tuvieron en cuenta los datos registrados previamente por el equipo de trabajo durante una serie de recorridas y análisis de muestras llevadas a cabo dentro del mismo establecimiento, durante los meses de septiembre y noviembre de 2024. Esta información resultó vital para la construcción del diseño de muestreo, permitiendo seleccionar sitios que reflejaran la variabilidad ambiental y el historial de manejo del área. Como resultado, se identificaron siete sitios para la toma de muestras, cada uno representando una unidad muestral (8 sitios = 7 unidades muestrales de suelo y 1 unidad muestral de biopelícula; n=8).

La tabla 1 presenta el nombre y código de cada una de estas unidades, mientras que la figura 1 muestra su ubicación geográfica dentro del establecimiento.

Tabla 1. Presentación de ocho sitios de muestreo (unidades muestrales) seleccionados en Estancia Cullen (Río Grande, Tierra del Fuego).

UNIDAD MUESTRAL	CÓDIGO
UNIDAD 1 TRANSICIÓN SALINA	U1 TS
UNIDAD 2 CLAUSURA 40 AÑOS	U2 CLA
UNIDAD 3 SECTOR ALEDAÑO AL CASCO DE ESTANCIA	U3 CASCO
UNIDAD 4 MORENAS	U4 MOR
UNIDAD 5 ZONA CON PRESENCIA POTENCIAL DE MICORRIZAS	U5 MICO
UNIDAD 6 ZONA DE APLICACIÓN ANTIGUA	U6 AP ANTIGUA
UNIDAD 7 ZONA DE APLICACIÓN RECIENTE	U7 AP RECIENTE
UNIDAD 8 POTRERO ALFA	U8 ALFA

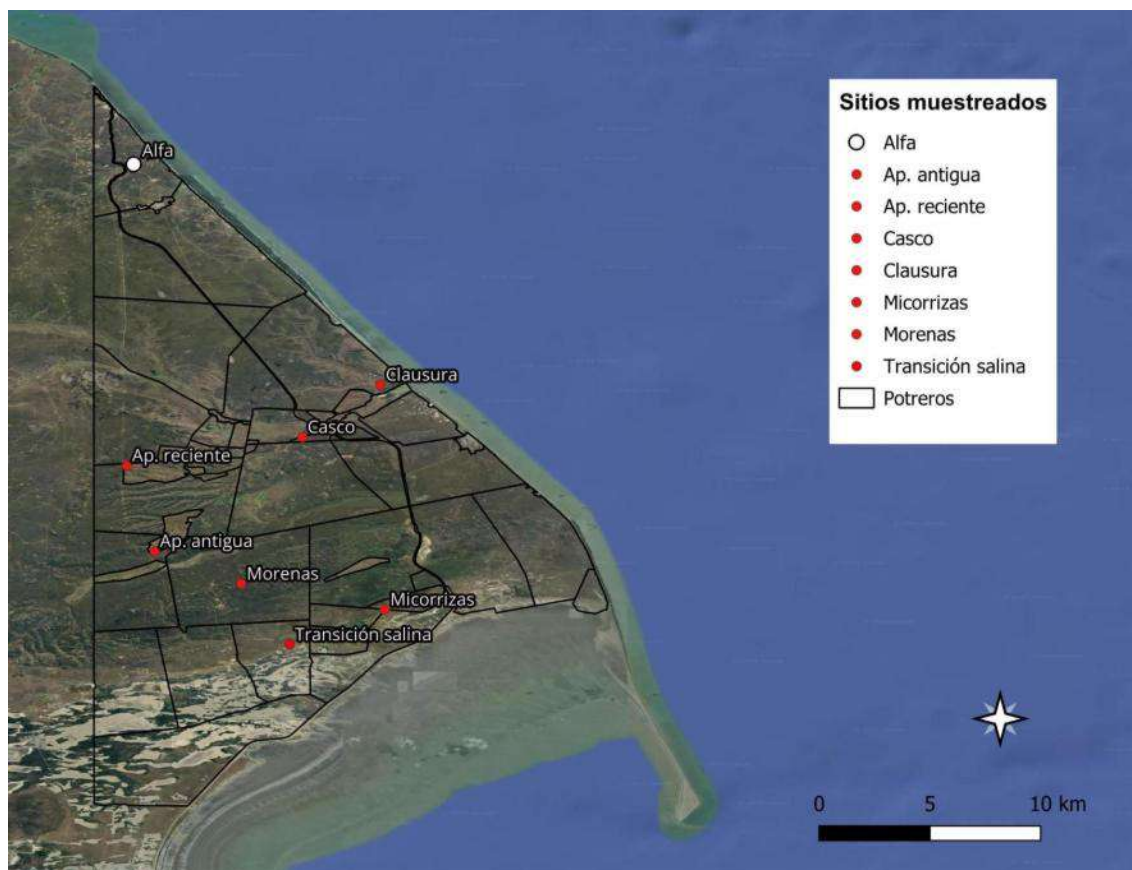


Figura 1. Mapa de distribución de ocho unidades de muestreo en Estancia Cullen (Río Grande, Tierra del Fuego AIAS).

A continuación, se describe en detalle cada una de las unidades de muestreo seleccionadas.

4.2.1. Unidad 1 - Transición salina

Coordenadas geográficas: Lat 53° 2' 5,64" S; Long 68° 28' 30,83" O

Este sitio se encuentra ubicado en el potrero “Filaret Este”, donde se presenta una situación intermedia entre el pastizal típico de estepa magallánica húmeda y la bahía salina, identificada como transición salina. En este lugar no se detecta invasión significativa de la maleza *Hieracium pilosella*, observándose únicamente algunas plantas aisladas de la especie.

El punto seleccionado para la extracción de muestras se ubica el faldeo sureste de un cerro, en una comunidad vegetal dominada por un coironal abierto con alta presencia de *Azorella* sp.

En este potrero se practica un régimen de pastoreo continuo, con presencia de animales durante todo el año.

Especies vegetales presentes: *Azorella trifurcata*, *Azorella monantha*, *Carex* sp., *Festuca gracillima*, *Poa pratensis*, *Armeria maritima*, *Taraxacum officinale*, *Hieracium pilosella*, *Deschampsia flexuosa*, *Rumex acetosella*, *Poa spiciformis*, *Bromus catharticus*, *Acaena pinnatifida* y *Baccharis magellanica*.



Figura 2. Unidad muestral N° 1: Transición salina, ubicado en el potrero “Filaret Este” (situación intermedia entre pastizal típico de estepa magallánica húmeda y la bahía salina).

4.2.2. Unidad 2 – Clausura

Coordenadas geográficas: Lat 52° 51' 35,88" S; Long 68° 24' 51,66" O

Se localiza dentro del potrero “Playa” y corresponde a una antigua clausura de aproximadamente 2,8 ha, delimitada por alambrado y excluida del pastoreo desde hace más de 40 años.

El relieve es predominantemente plano, aunque el sector se encuentra enmarcado por cerros al sur y al oeste. La comunidad vegetal corresponde a un coironal ácido de *Festuca gracillima*, con abundante acumulación de broza en superficie, atribuida principalmente a esta especie. Asimismo, se registró una elevada presencia de la especie invasora *H. pilosella*.

Especies vegetales presentes: *Festuca gracillima*, *Festuca magallánica*, *Hypochaeris incana*, *Senecio magellanicus*, *Armeria maritima*, *Berberis empetrifolia*, *Azorella trifurcata*, *Acaena magellanica*, *Bromus catharticus*, *Baccharis magellanica*, *Deschampsia flexuosa*, *Hieracium pilosella*, *Poa spiciformis*, *Perezia recurvata* y *Ranunculus* sp.



Figura 3. Unidad muestral N° 2: “Clausura”: Se localiza dentro del potrero “Playa” y corresponde a una antigua clausura excluida del pastoreo desde hace más de 40 años.

4.2.3. Unidad 3 – Casco

Coordenadas geográficas: Lat 52° 53' 42,78" S; Long 68° 28' 0,45" O

Esta unidad se ubica en un potrero próximo al casco de la estancia, donde históricamente se realizaron labores de remoción de suelo e implantación de pasturas. Actualmente, el área se utiliza como potrero de aguante para el ganado ovino, concentrando animales por cortos períodos en momentos específicos del año, coincidiendo con las maniobras de movimiento de hacienda.

El ambiente corresponde a una planicie o terraza, con sectores de suelo desnudo y sectores donde aflora el perfil C, conformando un pavimento de erosión. La vegetación, anteriormente dominada por un coironal degradado hacia murtilla, ha evolucionado hacia un coironal degradado con predominio de pastos cortos. En toda el área se observa una abundante presencia de la especie invasora *Hieracium pilosella*.

Especies vegetales presentes: *Agrostis* sp., *Azorella trifurcata*, *Deschampsia flexuosa*, *Poa pratensis*, *Poa spiciformis*, *Rytidosperma virescens*, *Colobanthus subulatus*, *Cerastium arvense*, *Hieracium pilosella*, *Rumex acetosella*, *Acaena pinnatifida*, *Taraxacum officinale*, *Carex* sp., *Trisetum spicatum*, *Berberis empetrifolia* y *Baccharis magellanica*.



Figura 4. Unidad muestral N° 3: Casco. Estancia Cullen.

4.2.4. Unidad 4 – Morenas

Coordenadas geográficas: Lat 52° 59' 38,31" S; Long 68° 30' 27,65" O

La unidad se sitúa en el potrero “Grasería Grande”, área con presencia continua de ganado durante todo el año. El relieve está conformado por una serie de colinas, originadas por el movimiento y depósito de sedimentos glaciarios durante el periodo cuaternario, conocidas como morenas.

El sitio de muestreo se ubicó en un sector bajo y plano, enclavado entre las morenas, donde predomina un coironal neutrófilo rodeado por un matorral denso de *Chiliotrichum diffusum*.

En esta unidad la invasión de *Hieracium pilosella* es escasa o nula, registrándose únicamente individuos aislados en áreas puntuales donde hubo disturbio del suelo, como banquinas o sectores próximos a pozos petroleros.

Especies vegetales presentes: *Festuca gracillima*, *Cerastium arvense*, *Rytidosperma virescens*, *Deschampsia flexuosa*, *Trisetum spicatum*, *Carex* sp., *Acaena pinnatifida*, *Taraxacum officinale*, *Rumex acetosella*, *Colobanthus subulatus*, *Bromus catharticus* y *Agrostis* sp.



Figura 5. Unidad muestral N° 4: Morenas, situada en el potrero “Grasería Grande”, área con presencia continua de ganado durante todo el año.

4.2.5. Unidad 5 – Micorrizas

Coordenadas geográficas: Lat 53° 0' 41,24" S; Long 68° 24' 40,85" O

La unidad se sitúa en el potrero “Carneros”, próximo a la Bahía Salina. Si bien no presenta las condiciones típicas de este ambiente, exhibe rasgos distintivos, como una mayor proporción de pastos cortos en detrimento de los coirones, atribuible a la elevada carga animal resultante de la concentración de hacienda en este sector.

Durante el muestreo se observó, en uno de los extremos del lote, una franja en forma de medialuna con vegetación de coloración verde notablemente más intensa, apreciable a simple vista. Esta particularidad podría estar asociada a la presencia de micorrizas, que favorecerían el crecimiento de las plantas otorgándoles mayor vigor y tamaño. Las muestras se tomaron en esta zona específica, ubicada sobre un terreno plano al pie de la ladera sureste de un cerro.

En el sector muestreado no se registró la presencia de la especie invasora *Hieracium pilosella*.

Especies vegetales presentes: *Poa atropidiformis*, *Azorella trifurcata*, *Taraxacum officinale*, *Agrostis* sp., *Acaena magellanica*, *Carex* sp., *Poa pratensis* y *Hordeum comosum*.



Figura 6. Unidad muestral N° 5: Micorrizas, se sitúa en el potrero “Carneros”, próximo a la Bahía Salina.

4.2.6. Unidad 6 – Ap Antigua

Coordenadas geográficas: Lat 52° 58' 19,67" S; Long 68° 33' 56,91" O

La unidad se localiza en un potrero destinado, a partir de la década de 1960, a la implantación de pasturas. Con el transcurso del tiempo, estas pasturas atravesaron un proceso progresivo de degradación, lo que favoreció la invasión de *Hieracium pilosella*, hasta conformar extensos manchones de alta densidad.

Con el objetivo de revertir esta situación, hace siete años se aplicó el herbicida hormonal “Picloram”. Actualmente, el pastizal natural se encuentra en proceso de recuperación, presentando una alta cobertura vegetal compuesta por especies nativas y forrajeras exóticas implantadas en el pasado.

Durante parte del año, este potrero sostiene una elevada carga animal, lo que genera un aporte constante de materia orgánica a través de heces y orina. En el momento del muestreo, se registró la presencia de ganado.

El relieve corresponde a una planicie situada al pie de la ladera sur de un cerro cercano. La comunidad vegetal predominante es un pastizal de pastos cortos con alta presencia de *Agrostis* sp.

Especies vegetales presentes: *Agrostis* sp., *Armeria maritima*, *Poa pratensis*, *Taraxacum officinale*, *Acaena magellanica*, *Rumex acetosella*, *Trifolium repens*, *Hieracium pilosella* (1 planta) y *Rytidosperma virens*.



Figura 7. Unidad muestral N° 6: Aplicación antigua, localizada en un potrero destinado, a partir de la década de 1960, a la implantación de pasturas.

4.2.7. Unidad 7 – Ap reciente

Coordenadas geográficas: Lat 52° 54' 52,28" S; Long 68° 35' 4,09" O

Esta unidad se localiza en el potrero “Pirámide”, históricamente destinado a la implantación de pasturas. Al igual que en el sitio “Casco”, con el paso de los años estas pasturas se degradaron progresivamente, favoreciendo el establecimiento y posterior expansión de *Hieracium pilosella*.

Al momento del muestreo, había transcurrido aproximadamente un año desde la aplicación del herbicida hormonal Picloram, utilizado para el control de la maleza. Esta intervención permitió reducir notablemente la cobertura de *Hieracium pilosella* y evidenciar la presencia, aún en recuperación, de especies nativas gramíneas y dicotiledóneas.

Con el fin de cumplir con los periodos de carencia establecidos tras la aplicación de productos fitosanitarios, el potrero permaneció clausurado al pastoreo durante el último año.

La extracción de muestras se realizó en la media loma de un cerro con orientación noreste, donde predomina un pastizal de pastos cortos. En este sector se observaron ejemplares aislados de *Hieracium pilosella* y restos de broza correspondientes a plantas muertas de la misma especie.

Vegetación presente: *Poa pratensis*, *Baccharis magellanica*, *Chilotrichum diffusum*, *Festuca gracillima*, *Festuca magellanica*, *Bromus catharticus*, *Hieracium pilosella*, *Taraxacum officinale*, *Rumex acetosella*, *Rytidosperma virescens*, *Perezia recurvata* y *Agrostis* sp.



Figura 8. Unidad Muestral N° 7: Aplicación reciente, localizado en el potrero “Pirámide”, históricamente destinado a la implantación de pasturas.

4.2.8. Unidad 8 – Alfa

Coordenadas geográficas: Lat. 52° 42' 41,67" S; Long. 68° 34' 48,04" O

Este sitio se ubica en el sector norte del establecimiento, aproximadamente a 400 m al este de la Ruta Nacional N° 3, en el cañadón “Alfa”. Corresponde a una zona deprimida por la que atraviesa uno de los chorrillos del río Alfa, con presencia de diversos caminos que facilitan el acceso a los antiguos pozos petrolíferos.

Fue seleccionado como el único sitio para la extracción de las muestras de agua y tapete o película superficial orgánica, destinadas al aislamiento de cianobacterias. Las muestras se obtuvieron de un cuerpo de agua temporal formado durante la temporada de lluvias, que presenta las características de laguna somera, con un diámetro aproximado de 30 m. En el pasado, este cuerpo de agua fue utilizado como pileta de decantación de un pozo petrolero actualmente abandonado, y se encuentra emplazado al pie de la ladera sur de un cerro.

La vegetación circundante está compuesta por especies adaptadas a condiciones de mayor humedad, incluyendo gramíneas y graminoides típicas de las vegas húmedas.



Figura 9. Cuerpo de agua temporal ubicado en Cañadón Alfa (norte de Estancia Cullen) seleccionado para la toma de muestras de biofilms para el aislamiento de cianobacterias.

4.3. Clausura experimental y antecedentes de manejo

Dentro del área de estudio se incluyó una clausura experimental ubicada en la Estancia Cullen, que constituye un sitio de particular interés por los antecedentes de manejo implementados con anterioridad al presente proyecto. En este sector se llevaron a cabo ensayos exploratorios de control de *Hieracium pilosella*, desarrollados en el marco de una iniciativa privada previa, que incluyeron la aplicación de un herbicida hormonal y de extractos biológicos de cianobacteria, así como parcelas sin intervención utilizadas como control.

La presencia de estos tratamientos confiere a la clausura un valor adicional como unidad de referencia para la caracterización del área de estudio, en tanto permite contextualizar el estado actual de la vegetación a partir de intervenciones históricas diferenciadas. En este marco, se realizó un relevamiento de la comunidad vegetal con el fin de registrar su composición florística, riqueza específica y diversidad, a partir de transectas de línea base y criterios estandarizados de muestreo.

El diseño experimental, las características de los tratamientos aplicados y la información detallada obtenida durante los relevamientos se presentan de manera completa en el ANEXO I.

5. ANÁLISIS INTEGRADO DE LOS COMPONENTES TÉCNICOS DEL PROYECTO

La presente sección organiza y analiza los resultados del proyecto en función de los objetivos específicos planteados, integrando los aspectos metodológicos, los resultados obtenidos y su interpretación. Este enfoque permite dar cuenta del grado de avance alcanzado en cada línea de trabajo, así como de las relaciones existentes entre los distintos componentes técnicos del proyecto. Asimismo, se incorporan las principales limitaciones identificadas y los ajustes realizados durante la ejecución, con el fin de contextualizar los resultados y orientar su proyección en etapas posteriores.

5.1. OE1 | Aislamiento y caracterización de microorganismos nativos con potencial antagonico contra *Hieracium pilosella*

El OE1-Aislar microorganismos nativos con potencial antagonico contra *Hieracium pilosella* en muestras de suelo de pastizales del norte de la provincia de Tierra del Fuego se orientó a identificar y aislar microorganismos nativos presentes en distintos ambientes de los pastizales del norte de Tierra del Fuego, con potencial capacidad antagonista frente a *Hieracium pilosella*. El propósito fue generar una base de conocimiento acerca de la diversidad microbiana local y seleccionar organismos que, por sus características biológicas, pudieran constituir insumos para el desarrollo futuro de alternativas de control biológico de la especie invasora.

El alcance del objetivo incluyó la caracterización ambiental de los sitios de muestreo (descrita en la sección anterior), la recolección sistemática de muestras de suelo, agua y material vegetal, la determinación de parámetros físico-químicos edáficos y el aislamiento de distintos grupos microbianos mediante técnicas microbiológicas clásicas. Asimismo, se incorporó la detección de asociaciones micorrícicas en raíces de especies vegetales representativas, como parte del abordaje integral de las interacciones planta-suelo.

Las actividades se estructuraron en etapas sucesivas que comprenden la definición de unidades de muestreo, el diseño de protocolos estandarizados de recolección y análisis, el aislamiento y la identificación preliminar de microorganismos.

5.1.1. Diseño y recolección de muestras

Previo a la toma de muestras, se realizó un recorrido general del área de estudio (Estancia Cullen) con el objetivo de definir las zonas de recolección y recopilar información que permitiera elaborar una descripción ambiental lo más completa posible de cada punto de muestreo.

Sobre esta base, se elaboró un diseño y protocolo de muestreo específico para las diferentes unidades seleccionadas, contemplando los aspectos tales como tipo de hábitat, número de muestras, profundidad y volumen de colecta,

tipo de recipientes, procedimientos de transporte y almacenamiento, registro de datos y precauciones para evitar contaminaciones.

El muestreo se llevó a cabo en siete unidades ambientales (descritas en la sección anterior), dentro de las que se delimitó una parcela de 5 m x 5 m en cada sitio con el fin de reducir la variabilidad espacial a escala local.

En cada unidad de muestreo se realizaron las siguientes actividades:

- *Muestreo de suelo para análisis químicos*, mediante la recolección de una muestra compuesta por unidad, integrada por *cinco submuestras superficiales*, resultando en un total de *siete muestras compuestas de suelo*.
- *Muestreo de suelo para aislamiento microbiano*, recolectando *cinco muestras* adicionales en cada una de las siete unidades, destinadas al aislamiento de bacterias y hongos edáficos.
- *Recolección puntual de ejemplares vegetales representativos* de las especies más frecuentes de cada unidad, con fines descriptivos para la caracterización florística de los sitios y para la obtención de material radicular destinado a la evaluación de asociaciones micorrícicas.

Si bien inicialmente el estudio se definió para trabajar exclusivamente con muestras de suelo, durante el desarrollo del proyecto se incorporó también el muestreo de ambientes acuáticos con el objetivo de ampliar la detección a otros grupos de microorganismos de interés. En este marco, se realizó el muestreo de biopelículas, tapetes microbianos y agua superficial en la Unidad 8, orientado específicamente al aislamiento de cianobacterias. En total, se recolectaron *diez muestras de agua y película orgánica superficial* en sectores con presencia visible de material biológico.

La incorporación de distintos tipos de muestras respondió al carácter exploratorio del estudio. En función de este enfoque, el diseño de muestreo se orientó a facilitar la detección de los siguientes grupos taxonómicos de interés:

- **Hongos de suelo**, incluyendo géneros como *Trichoderma*, *Penicillium* y *Aspergillus*.
- **Cianobacterias** (Dominio Bacteria, Phylum Cyanobacteriaphyta), por su capacidad de producir metabolitos secundarios con potencial actividad biológica.
- **Bacterias** (Dominio Bacteria), con énfasis en géneros con antecedentes de actividad inhibitoria, como *Streptomyces*, *Pseudomonas* y *Bacillus*.

Las muestras recolectadas fueron manipuladas, transportadas y almacenadas bajo condiciones controladas para preservar su integridad físico-química y biológica, manteniéndose refrigeradas y se procesaron dentro de las 48 horas posteriores a su recolección. En cada punto de muestreo se registraron, además, datos ambientales básicos con el fin de contextualizar los análisis posteriores.

El protocolo completo de muestreo se presenta de manera integral en el ANEXO II. En la presente sección se sintetizan únicamente los aspectos más relevantes del muestreo, necesarios para contextualizar los resultados desarrollados posteriormente.

5.1.2. Caracterización química de las muestras de suelo

Con el fin de caracterizar las condiciones edáficas de las áreas de muestreo y contar con información de base para la interpretación de los aislamientos microbianos, se planificó la determinación de los siguientes parámetros en las muestras de suelo recolectadas:

- **Contenido de humedad (%)**. Este parámetro se determinó por la diferencia de pesos de las muestras, antes y luego del secado en estufa (60°C) durante 48 hs. Siendo la pérdida de peso (%) el contenido hídrico de cada muestra.

- **Contenido de materia orgánica (carbono total).** El contenido de materia orgánica (expresado como carbono total) se determinó a partir de la diferencia de peso de las muestras antes y después de su incineración en mufla a 500°C. Este procedimiento permite la combustión completa de la materia orgánica presente, garantizando su eliminación total y dejando únicamente la fracción mineral (Schultte & Hopkins, 1996).
- **Contenido de fósforo.** Se realizó la determinación de fósforo extraíble mediante el método de Bray y Kurtz, en donde a partir de la preparación de diferentes soluciones se realiza la extracción de fósforo y posterior lectura colorimetría a través de la utilización de un espectrofotómetro.
- **Contenido de nitrógeno total.** Para determinar el contenido de nitrógeno total de las muestras, se siguió el procedimiento estándar de digestión ácida de Kjeldahl (Bremmer y Mulvaney, 1982).
- **pH.** Este parámetro fue determinado siguiendo el procedimiento indicado por el Laboratorio de Química del Instituto de Suelos del CIRN de INTA. En donde mediante la obtención de una suspensión de suelo en agua destilada, se procede a realizar la medición del parámetro luego de un tiempo estipulado por dicho protocolo.
- **Conductividad eléctrica:** el procedimiento fue el mismo que el utilizado para medición de pH.



Figura 10. Determinación de parámetros físico-químicos de las muestras analizadas en laboratorio. **A.** Proceso de determinación del contenido de fósforo. **B.** Retiro manual de material orgánico visible de muestras de suelo previo a la cuantificación de fósforo. **C.** Digestor con tubos para determinación de contenido de nitrógeno total (método Kjeldahl).

Los procedimientos utilizados para cada determinación se describen en el ANEXO III.

En total se obtuvieron 35 submuestras de suelo, correspondientes a las siete unidades de muestreo, las que fueron integradas en muestras compuestas por unidad.

El acondicionamiento inicial de las muestras, que incluyó el tamizado y la preparación preliminar para los análisis de nutrientes, se realizó inmediatamente luego del muestreo mediante el uso del maletín VISOCOLOR® (ver Fig. 10 A–C), lo que permitió el procesamiento del material en ausencia de infraestructura de laboratorio en la EEA TDF AEIAS. De esta manera, se optimizaron los

tiempos logísticos y se aseguró la adecuada conservación de las muestras para análisis posteriores de mayor precisión en laboratorio.

Durante esta etapa preliminar, las determinaciones cualitativas y semicuantitativas realizadas con el maletín VISOCOLOR® no permitieron detectar concentraciones medibles de compuestos nitrogenados inorgánicos (nitratos, nitritos y amonio), ni de fósforo disponible en las muestras analizadas. La ausencia de valores detectables sugiere una baja disponibilidad de nitrógeno mineral, con valores por debajo de los mínimos identificables por el maletín.

En función de estos resultados, y con el fin de obtener valores cuantitativos precisos, las determinaciones de nitrógeno total y fósforo extraíble se efectuaron posteriormente en el Laboratorio de Ecología Terrestre y Acuática del CADIC-CONICET, mediante los métodos estándar de Kjeldahl y Bray y Kurtz, respectivamente (ver Fig. 11. A–C).

Los resultados obtenidos para las distintas variables analizadas se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Presentación de resultados de determinación de parámetros químicos de las muestras de suelo tomadas en Estancia Cullen (Río Grande, Tierra del Fuego).

UNIDAD	HUMEDAD (%)	MO (%)	P (ppm)	N total (%)	pH	CE (dS/m)
U1 TS	20,48	22,26	10,81	0,42	6,16	0,25
U2 CLA	19,51	15,58	2,04	0,28	5,88	0,16
U3 CASCO	19,38	11,80	1,07	0,21	5,68	0,08
U4 MOR	19,36	11,98	7,30	0,23	5,88	0,13
U5 MICO	35,47	34,84	16,10	0,22	7,26	1,15
U6 AP ANTIGUA	23,22	12,09	2,70	0,65	5,58	0,07
U7 AP RECIENTE	22,75	21,24	5,66	0,21	5,56	0,10

El *contenido de humedad* de los suelos mostró valores relativamente homogéneos entre las unidades de muestreo, con registros comprendidos entre 19,36 % y 35,47 %. La unidad U5 (Micorrizas) presentó el valor más elevado de

humedad, lo que podría asociarse a condiciones locales de mayor retención hídrica y cobertura vegetal.

El *contenido de materia orgánica* evidenció una variabilidad marcada entre las unidades analizadas, con valores mínimos registrados en U3 (Casco) y máximos en U5 (Micorrizas). En general, los sitios con menor disturbio aparente y mayor cobertura vegetal presentaron contenidos más elevados de materia orgánica, mientras que las unidades con antecedentes de uso intensivo mostraron valores inferiores.

En cuanto al *fósforo extraíble*, los valores obtenidos se ubicaron en un rango bajo a moderado, con concentraciones que oscilaron entre 1,07 y 16,10 ppm. Las unidades U5 (Micorrizas) y U1 (Transición Salina) registraron los valores más elevados de fósforo, mientras que U3 (Casco) presentó el menor contenido.

El contenido de *nitrógeno total* mostró una variabilidad apreciable entre las unidades de muestreo (rango de variación: 0,21-0,65 %). La unidad U6 (Aplicación antigua) presentó el mayor contenido de nitrógeno total, lo que podría estar asociado al historial de uso del sitio y al aporte de materia orgánica derivado de la elevada carga animal. En contraste, las unidades U3 (Casco) y U7 (Aplicación reciente) registran los valores más bajos de nitrógeno total. Por último, es importante destacar que la unidad U5 (Micorrizas) presentó uno de los valores más bajos de nitrógeno total. Este comportamiento podría estar asociado a una mayor absorción, por parte de las plantas, de las fracciones de nitrógeno disponibles y asimilables en el suelo, favorecida por la actividad micorrícica presente en dicho sitio. Esta situación podría verse reflejada en el intenso color verde observado en las plantas correspondientes a esta unidad (Fig. 6).

Estos resultados indican que, si bien los *compuestos nitrogenados inorgánicos* no resultaron detectables mediante el maletín VISOCOLOR®, el suelo contiene reservas variables de *nitrógeno orgánico*, reflejadas en el contenido de nitrógeno total, cuya mineralización y disponibilidad potencial podrían desempeñar un rol relevante en la dinámica microbiana y vegetal de los sitios estudiados.

Los valores de *pH* se encontraron mayoritariamente en un rango ácido a ligeramente ácido, entre 5,56 y 5,88, con excepción de las unidades U1 (Transición Salina) y U5 (Micorrizas), que presentaron valores de 6,16 y 7,26, respectivamente.

La *conductividad eléctrica* presentó valores bajos en las unidades evaluadas, con registros comprendidos entre 0,12 y 1,15 dS/m, coincidentes con suelos ácidos a ligeramente ácidos, lo que indica una baja concentración de sales solubles y ausencia de condiciones de salinidad. El valor máximo se registró en la unidad U5 (Micorrizas).



Figura 11. Análisis de compuestos nitrogenados en muestras de suelo. **A.** Maletín VISOCOLOR® (Macherey-Nagel) para análisis de suelos. **B.** Tamizado de muestras de suelo. **C.** Preparación de muestras de suelo para determinaciones de nitratos, nitritos y amonios.

Los resultados obtenidos evidencian una marcada heterogeneidad química entre las unidades de muestreo, lo cual constituye un aspecto clave para la interpretación de la presencia, diversidad y comportamiento de los microorganismos edáficos aislados en cada sitio.

5.1.3. Hongos y bacterias de suelo

- **Metodología**

El estudio de los microorganismos edáficos se abordó mediante un esquema metodológico en dos etapas complementarias. En una primera etapa, desarrollada en el ámbito del INTA Tierra del Fuego en articulación con el CADIC-CONICET, se realizó un abordaje general de la microbiota del suelo mediante técnicas de cultivo clásico. Se aplicaron procedimientos de aislamiento a partir de muestras de suelo superficial utilizando medios de cultivo no selectivos, incluyendo agar recuento en placa (PCA), lo que permitió una recuperación amplia de microorganismos mesófilos, tanto bacterianos como fúngicos, y una primera aproximación a la diversidad microbiana de los sitios de muestreo. En paralelo, se implementaron técnicas de aislamiento específicas para hongos filamentosos mediante el uso de medios selectivos como agar Papa Glucosa y Rosa de Bengala, así como el empleo de trampas de arroz para favorecer la recuperación de organismos edáficos asociados a sustratos orgánicos.

A partir de estas metodologías (ver ANEXO IV), se obtuvieron cultivos que fueron diferenciados morfológicamente y sometidos a repiques sucesivos para su purificación. Los aislamientos obtenidos fueron conservados mediante subcultivos periódicos y almacenamiento a bajas temperaturas, con el objetivo de asegurar su viabilidad para análisis posteriores.

En una segunda etapa, orientada a profundizar la caracterización de la comunidad fúngica, se remitieron muestras de suelo al Instituto Spegazzini. En esta instancia se aplicaron metodologías específicas para el aislamiento de hongos de suelo, incluyendo técnicas de dilución seriada y el método de lavado de suelo y sembrado de partículas, bajo condiciones controladas de laboratorio. Estas metodologías permitieron mejorar la resolución de los aislamientos

fúngicos (ver ANEXO IV) y avanzar en su identificación taxonómica mediante criterios morfológicos detallados.

Finalmente, los aislamientos obtenidos fueron purificados bajo cámara de flujo laminar, transfiriendo colonias de interés mediante ansa estéril a nuevas cajas de Petri conteniendo medio de cultivo (APG). Una vez desarrolladas y con estructuras reproductivas visibles, se realizaron preparaciones microscópicas montadas en azul de algodón para confirmar su identidad a partir de la observación de estructuras vegetativas y reproductivas. La identificación taxonómica se efectuó mediante el uso de claves especializadas, siguiendo a Ellis (1971), Carmichael et al. (1980) y Domsch et al. (2003).

● Resultados obtenidos

La etapa inicial de aislamiento realizada en el ámbito del INTA Tierra del Fuego permitió obtener un total de 79 aislamientos, de los cuales 61 corresponden a hongos filamentosos y 18 presentaron morfología mucoide, de aspecto viscoso y brillante, compatible con levaduras o bacterias asociadas. Dentro del conjunto de hongos filamentosos, se observaron tanto aislamientos con estructuras reproductivas, que permitieron una aproximación taxonómica, como aislamientos que permanecieron en estado estéril, desarrollando únicamente micelio vegetativo. Estos últimos representaron una proporción significativa (20 aislamientos) (Fig.12) lo que limitó la posibilidad de avanzar en su identificación más allá del nivel morfológico general.

La caracterización morfológica inicial permitió identificar la presencia de géneros típicos de suelos, destacando *Trichoderma* y *Penicillium*, junto con otros hongos filamentosos compatibles con géneros como *Aspergillus*, *Rhizopus* y *Cladosporium* (Fig. 13). En particular, se aislaron siete posibles cepas de *Trichoderma*, con una distribución no homogénea entre las unidades de muestreo, concentrándose principalmente en determinados ambientes con características edáficas específicas: seis de ellas provenientes de la U1 (transición salina) y una de la U4 (casco).

La implementación de trampas de arroz no contribuyó a ampliar la diversidad de aislamientos obtenidos. Si bien se logró recuperar algunos microorganismos a partir de esta metodología, el proceso de purificación de los cultivos resultó complejo y no permitió la obtención de aislamientos puros, por lo que los mismos fueron finalmente descartados y no pudieron ser contemplados en el análisis.

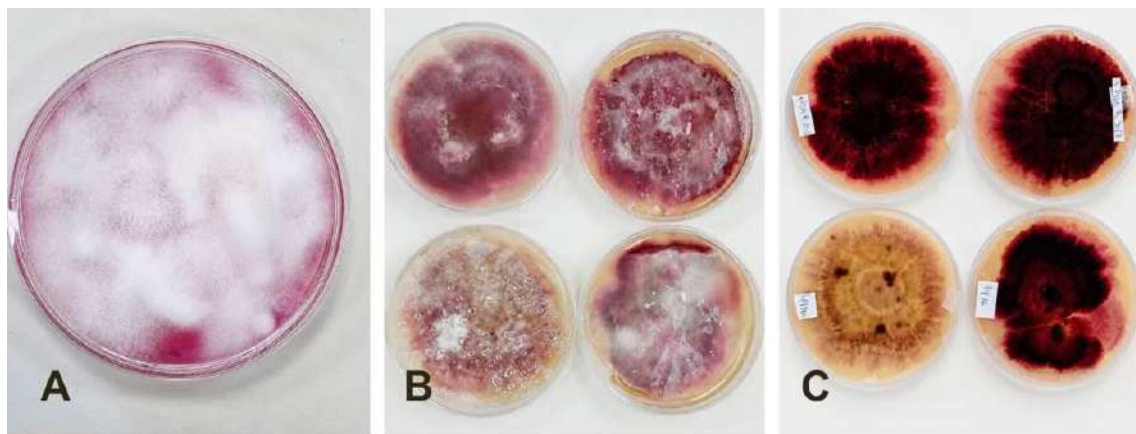


Figura 12. Aislamientos fúngicos correspondientes a micelio en estado estéril o vegetativo, obtenidos a partir de muestras de suelo de Estancia Cullen (Tierra del Fuego). **A.** Desarrollo de micelio estéril en medio de cultivo Rosa de Bengala. **B.** Colonias de micelio estéril que presentan difusión de pigmentos en el medio agar papa glucosado (APG). **C.** Aspecto del envés de las colonias mostradas en B, evidenciando variaciones en la pigmentación y textura del crecimiento micelial.

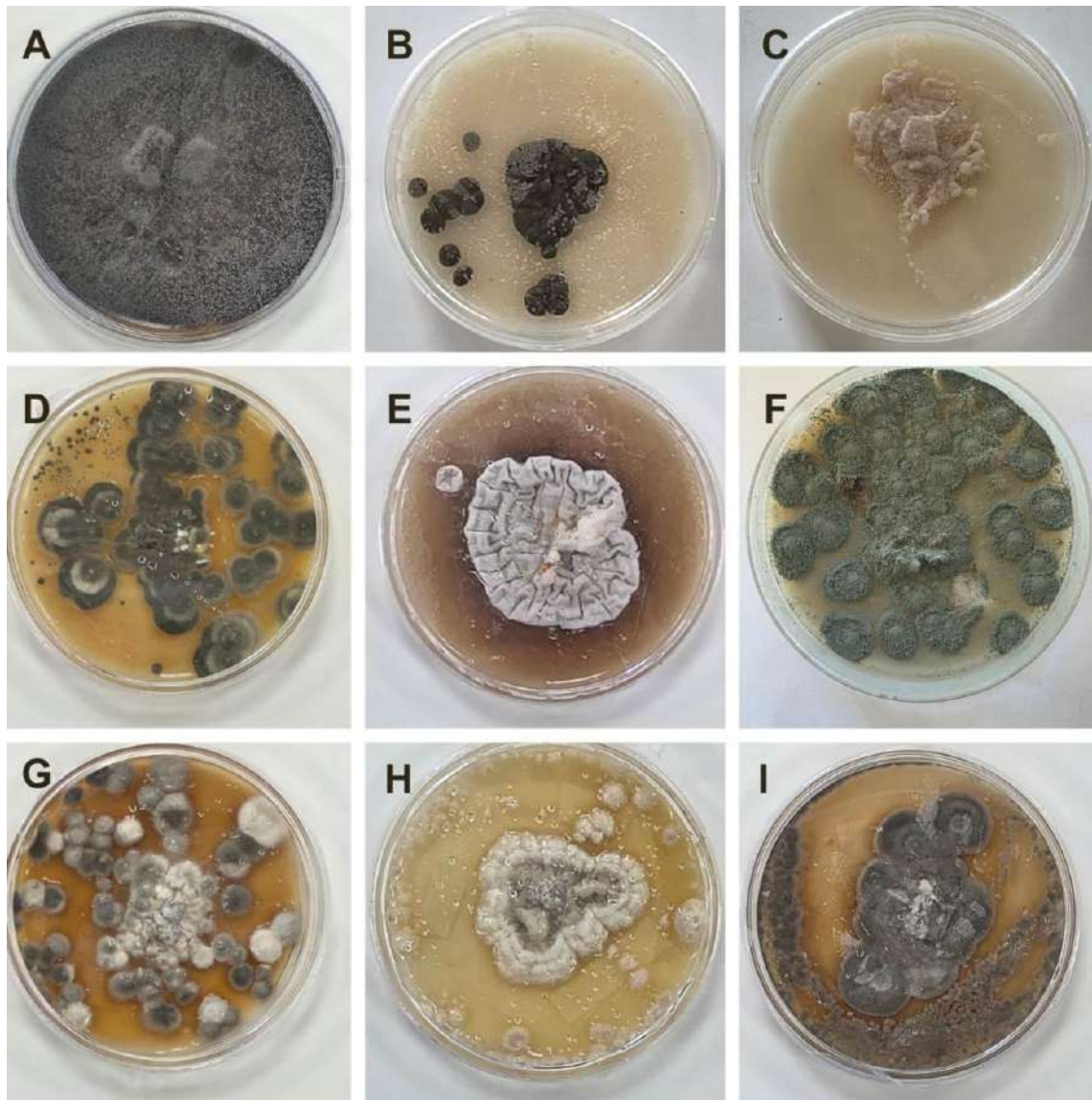


Figura 13. Aislamientos fúngicos obtenidos a partir de muestras de suelo de Estancia Cullen (Tierra del Fuego) cultivadas en medio agar papa glucosado (APG). Se presentan distintos morfotipos de colonias correspondientes a: **A.** *Rhizopus* sp. **B.** *Cladosporium* sp. **C.** Aislamiento levaduriforme. **D-I.** *Penicillium* sp.

No obstante, si bien esta etapa permitió establecer una base sólida de aislamientos y una primera aproximación a la diversidad fúngica, no fue posible completar la identificación taxonómica a nivel de especie para una proporción importante de los aislamientos, principalmente debido a la presencia de micelio estéril o a la falta de caracteres morfológicos suficientemente discriminantes. En este sentido, algunos de los aislamientos que no pudieron ser identificados serán remitidos al Instituto Spegazzini de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad de La Plata en el mes de julio, con el objetivo de avanzar en

su caracterización mediante técnicas más específicas. Por otra parte, los cultivos fueron conservados mediante la incorporación de discos de papel de filtro estéril sobre el medio de cultivo (Fig. 14.A), combinada con su preservación en freezer. Esta estrategia permitió resguardar el material biológico, asegurar su viabilidad y garantizar su disponibilidad para ensayos posteriores de antagonismo y estudios complementarios.

Asimismo, las cepas de *Trichoderma* aisladas en esta etapa (Fig. 14.B) serán transferidas en el mes de Julio del presente año, al Laboratorio de la Universidad Nacional de Tierra del Fuego (UNTDF), donde el equipo docente y de investigación vinculado al estudio de especies nativas de este género continuará con su conservación y caracterización taxonómica a nivel de especie. Esta articulación institucional permitió asegurar la continuidad del análisis de un grupo de alto interés dentro del proyecto.



Figura 14. Aislamientos fúngicos obtenidos a partir de muestras de suelo de Estancia Cullen (Tierra del Fuego) cultivados en medio sólido (agar papa glucosado, PDA). **A.** Placas con colonias fúngicas y porciones de papel de filtro estéril utilizadas

para la conservación de cepas mediante almacenamiento a baja temperatura. **B.** Detalle de aislamientos correspondientes al género *Trichoderma* spp.

Adicionalmente, durante la etapa inicial de trabajo se intentó el aislamiento de bacterias a partir de las mismas muestras de suelo, utilizando medios de cultivo generales como PCA. Sin embargo, durante el proceso se observó una persistente coexistencia de colonias bacterianas con levaduras, lo que dificultó la obtención de cultivos puros. En numerosos casos, los aislamientos que inicialmente presentaban características bacterianas evidenciaron, tras los repiques sucesivos, la presencia simultánea de ambos grupos de microorganismos, sin que fuera posible su separación mediante las metodologías implementadas.

Esta situación impidió la obtención de aislamientos bacterianos puros con el grado de confiabilidad necesario para su caracterización posterior. Asimismo, las limitaciones de tiempo asociadas al cronograma del proyecto no permitieron realizar ajustes metodológicos ni implementar protocolos específicos alternativos para el aislamiento bacteriano. En este contexto, se decidió no incluir los resultados correspondientes a bacterias en el presente informe, focalizando el análisis en la fracción fúngica, para la cual se obtuvo información consistente y validada. No obstante, se considera necesario planificar en futuras etapas un abordaje metodológico específico para el aislamiento bacteriano, que permita optimizar la recuperación de cultivos puros y avanzar en la caracterización integral de la microbiota del suelo.

Con el objetivo de validar y profundizar los resultados obtenidos en la etapa inicial, se llevó a cabo el análisis de las muestras de suelo en el Instituto Spegazzini mediante metodologías específicas de aislamiento fúngico (dilución seriada y lavado de suelo con sembrado de partículas; Fig. 14). Estos procedimientos permitieron obtener una caracterización más detallada y consistente de la comunidad fúngica presente en las unidades de muestreo, consolidando y ampliando la información generada previamente.

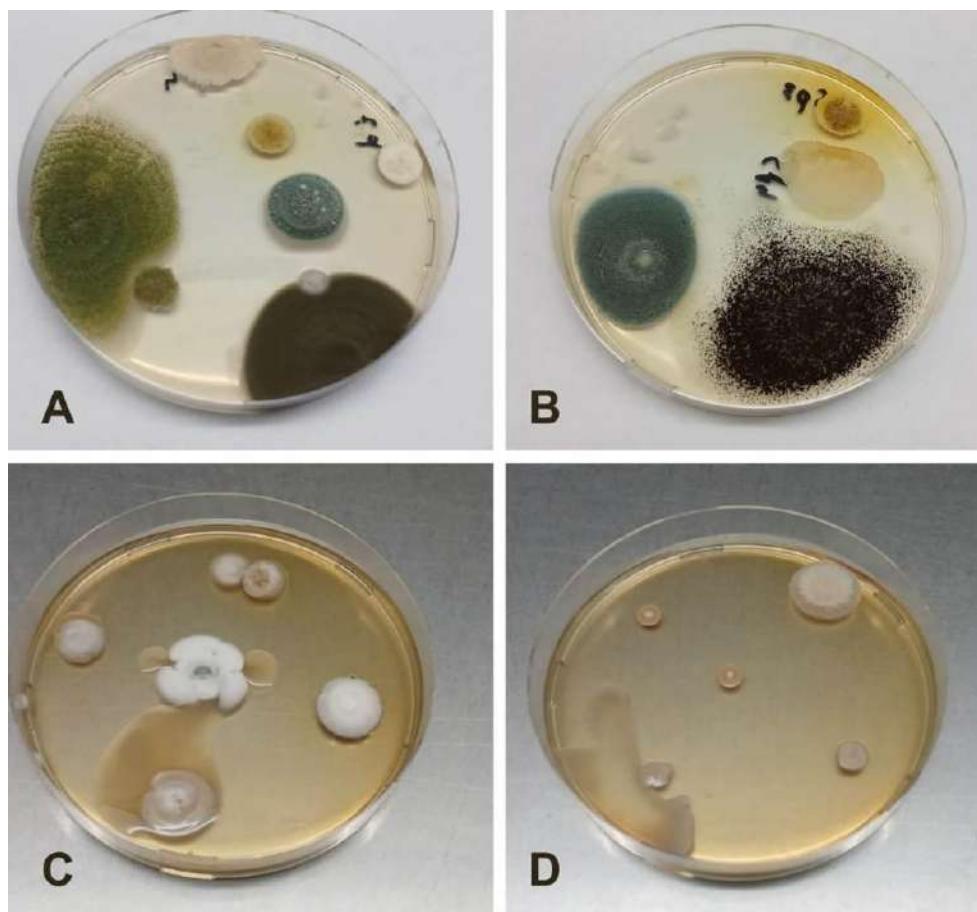


Figura 14. Ejemplos de aislamientos fúngicos obtenidos a partir de muestras de suelo de Estancia Cullen (Tierra del Fuego) mediante distintas metodologías de aislamiento. **A–B.** Colonias fúngicas desarrolladas a partir del método de dilución seriada, evidenciando diversidad de morfotipos en coloración, textura y patrón de crecimiento. **C–D.** Colonias fúngicas obtenidas mediante el método de lavado de suelo y sembrado de partículas, correspondiente a estructuras fúngicas asociadas a fragmentos edáficos en activo crecimiento.

A partir de un total de 324 aislamientos obtenidos, correspondientes a 278 aislamientos mediante el método de lavado de suelo y sembrado de partículas y 46 aislamientos mediante dilución seriada, se identificó un conjunto amplio de morfotipos fúngicos diferenciados (Tabla 3). En total, se registraron 43 morfotipos distintos, incluyendo tanto especies identificadas a nivel de género o especie como diferentes tipos de micelio estéril.

El análisis de la Tabla 3 evidencia la presencia de 13 géneros fúngicos, en la que se destacan géneros ampliamente distribuidos en suelos, tales como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Trichoderma* y *Rhizopus*, así como levaduras pertenecientes a los géneros *Saccharomyces* y

Schizosaccharomyces. Dentro de estos, el género *Penicillium* se presenta como el más representado en términos de número de morfotipos, con al menos nueve variantes diferenciadas.

Asimismo, se registró una proporción importante de aislamientos correspondientes a micelio estéril, incluyendo distintos morfotipos (hialinos, dematiáceos y pigmentados). Este patrón refuerza las limitaciones ya observadas en la etapa inicial y justifica la necesidad de estrategias complementarias para avanzar en la identificación taxonómica.

En términos metodológicos, se observa que el método de lavado de suelo aportó la mayor proporción de aislamientos ($\approx 85,8$ % del total), lo que refuerza su mayor eficiencia para la recuperación de hongos activos en el suelo, especialmente aquellos asociados a estructuras o fragmentos edáficos. Por su parte, la dilución seriada contribuyó con una menor cantidad de aislamientos ($\approx 14,2$ %), aunque permitió complementar el espectro de organismos detectados, especialmente en aquellos casos asociados a propágulos libres en suspensión.

El listado de la Tabla 3 confirma y amplía la diversidad detectada localmente en la etapa previa.

Tabla 3. Listado de especies de hongos edáficos obtenidos a partir de la integración de dos metodologías de aislamiento (dilución seriada y lavado de suelo con sembrado de partículas) en siete unidades muestrales de Estancia Cullen (Tierra del Fuego, Argentina). Se incluyen tanto taxones identificados a nivel de género o especie como distintos morfotipos de micelio estéril (hialinos, dematiáceos y pigmentados).

HONGOS EDÁFICOS	<i>Aspergillus flavus</i>
	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Aspergillus</i> sp. 1
	<i>Beauveria bassiana</i>
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
	<i>Cladosporium herbarum</i>

	<i>Cladosporium</i> sp. 1
	<i>Cladosporium</i> sp. 2
	<i>Fusarium oxysporum</i>
	<i>Fusarium</i> sp.
	<i>Humicola grisea</i>
	<i>Mucor</i> sp.
	<i>Penicillium rubrum</i>
	<i>Penicillium</i> sp. 1
	<i>Penicillium</i> sp. 2
	<i>Penicillium</i> sp. 3
	<i>Penicillium</i> sp. 4
	<i>Penicillium</i> sp. 5
	<i>Penicillium</i> sp. 6
	<i>Penicillium</i> sp. 7
	<i>Penicillium</i> sp. 8
	<i>Penicillium</i> sp. 9
	<i>Ramularia</i> sp.
	<i>Rhizopus stolonifer</i>
	<i>Saccharomyces</i> sp.
	<i>Schizosaccharomyces</i> sp.
	<i>Torula</i> sp.
	<i>Trichoderma harzianum</i>
	<i>Trichoderma polysporum</i>
MICELIO ESTÉRIL	Micelio estéril 1
	Micelio estéril 2
	Micelio estéril 3
	Micelio estéril 4
	Micelio estéril 5

	Micelio estéril 6
	Micelio estéril 7
	Micelio estéril 8
	Micelio estéril 9
	Micelio esteril amarillo
	Micelio esteril dematiáceo
	Micelio esteril hialino 1
	Micelio esteril hialino 2
	Micelio esteril hialino 3

A continuación, se presenta el análisis detallado de la estructura de la comunidad fúngica en cada unidad de muestreo a partir de los datos obtenidos mediante el método de lavado de suelo y sembrado de partículas, que constituyen la base del análisis cuantitativo y comparativo entre unidades. Esta decisión metodológica se sustenta en que la técnica de dilución seriada no permite realizar estimaciones confiables de abundancia relativa o frecuencia de los taxones, dado que favorece el desarrollo de organismos a partir de propágulos en suspensión y no refleja necesariamente su representación real en la matriz del suelo.

Los resultados obtenidos mediante dilución seriada fueron utilizados únicamente como información cualitativa, con fines de registro de presencia/ausencia de taxones y morfotipos fúngicos.

A continuación, se presenta el análisis detallado de la estructura de la comunidad fúngica en cada unidad de muestreo a partir de los datos obtenidos mediante el método de lavado de suelo y sembrado de partículas, los cuales constituyen la base del análisis cuantitativo.

En la *Unidad 1 (U1 – Transición salina)* (Fig. 15), se registraron 39 aislamientos, con una marcada predominancia de *Penicillium* sp.1, que representa más de la mitad de los registros. En segundo lugar, se observa una proporción relevante de micelio estéril, seguida por la presencia de *Rhizopus*

stolonifer y, en menor medida, *Aspergillus niger*. La composición muestra una distribución concentrada en pocos grupos, con dominancia de un taxón oportunista.

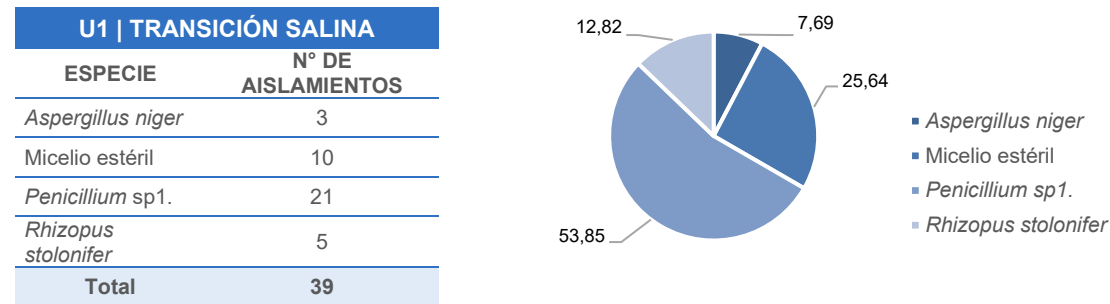


Figura 15. Número de aislamientos y proporción relativa (%) de especies de hongos edáficos en la Unidad Muestral N° 1 (Transición Salina), obtenidos mediante el método de lavado de suelo y sembrado de partículas.

La *Unidad 2 (U2 – Clausura)* (Fig. 16) presentó el menor número de aislamientos (26) entre las unidades analizadas. La composición es similar a U1, con predominio de *Penicillium* sp.1 y micelio estéril, la presencia de *Trichoderma harzianum* en baja proporción. La riqueza de taxones es reducida y la distribución se concentra en pocos grupos dominantes.

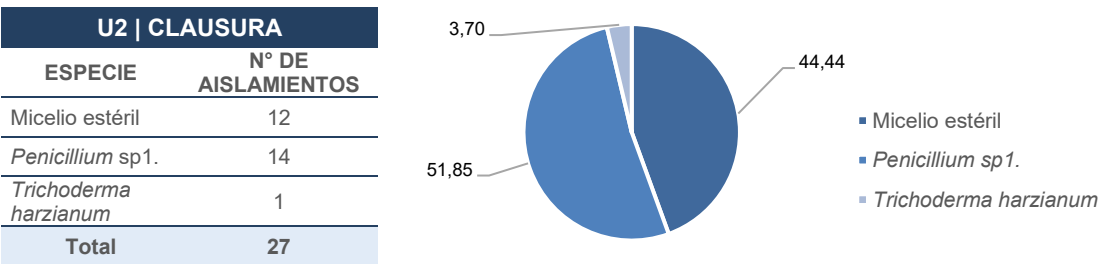


Figura 16. Número de aislamientos y proporción relativa (%) de especies de hongos edáficos en la Unidad Muestral 2 (Transición salina).

El mayor número de aislamientos (42) se registró en la *Unidad 3 (U3 – Casco)* (Fig. 17), que presenta la mayor variedad de taxones. Se identifican *Fusarium oxysporum* y *Saccharomyces* sp., entre las especies más frecuentes, junto con micelio estéril y otras especies en menor proporción. La distribución de los aislamientos se presenta más repartida entre distintos taxones, sin que uno solo concentre la mayor parte de los registros.

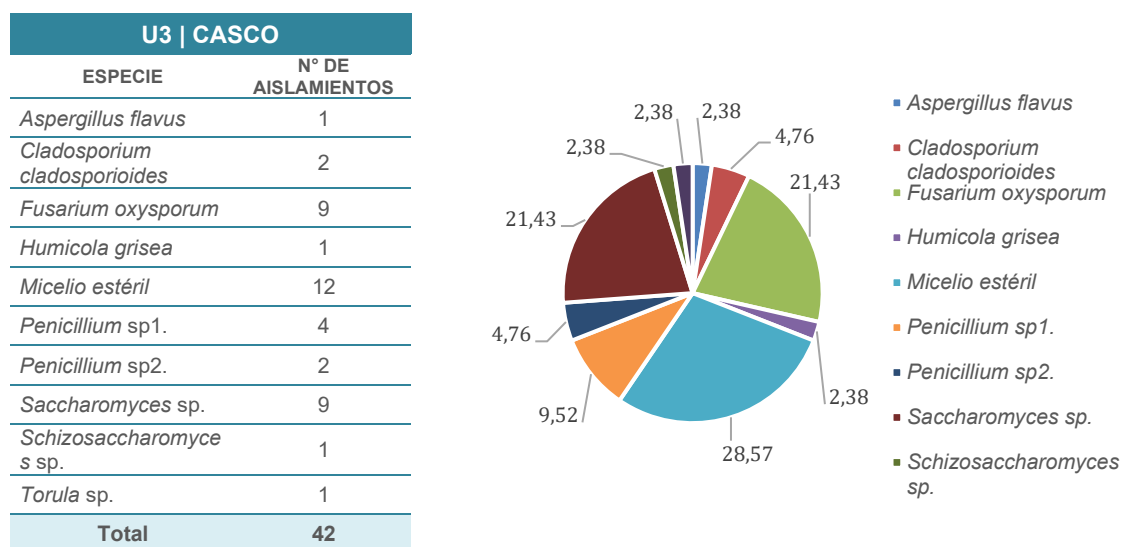


Figura 17. Número de aislamientos y proporción relativa (%) de especies de hongos edáficos en la unidad muestral en la Unidad Muestral N°3 (Casco).

En la *Unidad 4 (U4 – Morenas)* (Fig. 18) se contabilizaron 48 aislamientos, siendo una de las unidades con mayor abundancia. La comunidad está dominada por micelio estéril, que supera el 50 % de los aislamientos, seguido por *Humicola grisea*. El resto de los taxones aparece en proporciones considerablemente menores.

U4 MORENAS	
ESPECIE	N° DE AISLAMIENTOS
<i>Aspergillus niger</i>	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	1
<i>Humicola grisea</i>	11
Micelio estéril	24
<i>Mucor</i> sp.	1
<i>Penicillium</i> sp1.	3
<i>Penicillium</i> sp2.	3
<i>Saccharomyces</i> sp.	3
Total	47

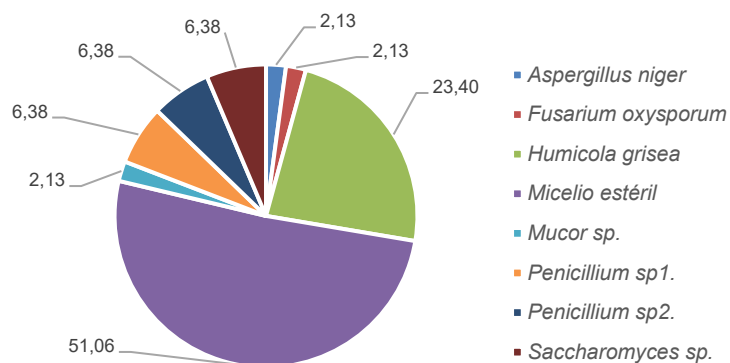


Figura 18. Número de aislamientos y proporción relativa (%) de especies de hongos edáficos en la Unidad Muestral N°4 (Morenas).

La *Unidad 5 (U5 – Micorrizas)* (Fig. 19) presenta 35 aislamientos y una composición más distribuida entre distintos grupos. Se registran micelio estéril, *Schizosaccharomyces* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. 2 y *Mucor* sp. Este patrón indica una diversidad moderada con coexistencia de distintos grupos funcionales, sin que un único taxón alcance proporciones dominantes frente al resto.

U5 MICORRIZAS	
ESPECIE	N° DE AISLAM.
<i>Fusarium</i> sp.	5
Micelio esteril	10
<i>Mucor</i> sp.	3
<i>Penicillium</i> sp2.	6
<i>Schizosaccharomyces</i> sp.	11
Total	35

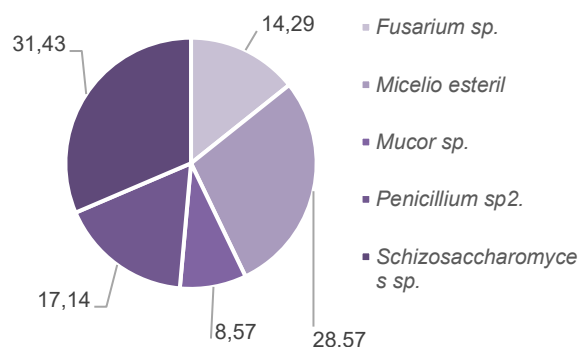


Figura 19. Número de aislamientos y proporción relativa (%) de especies de hongos edáficos en la Unidad Muestral N°5 (Micorrizas).

En la *Unidad 6 (U6 – Aplicación antigua)* (Fig. 20) se contabilizaron 39 aislamientos, con presencia de múltiples taxones distribuidos en proporciones

relativamente equilibradas. Se identifican *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma harzianum*, levaduras y micelio estéril, sin dominancia marcada de un único grupo.

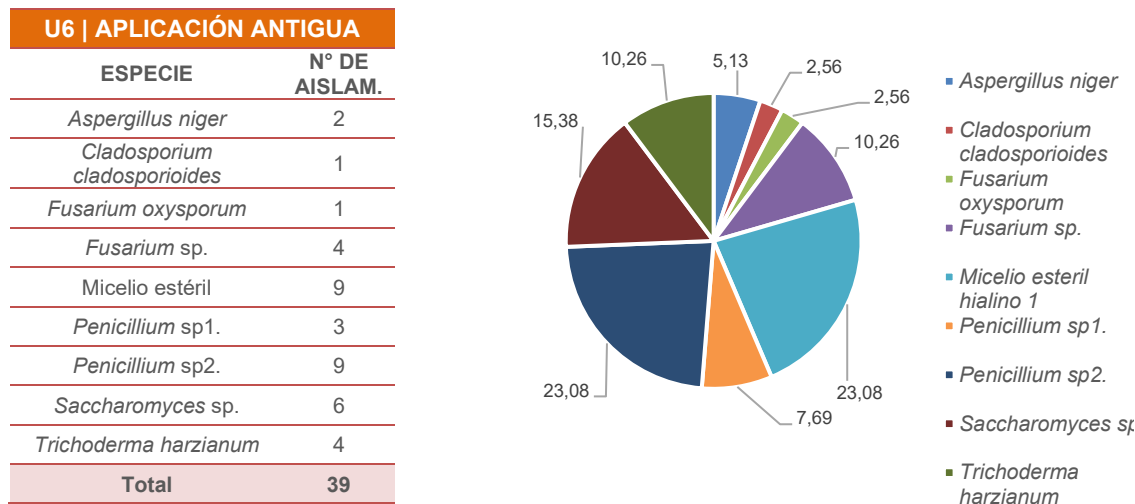


Figura 20. Número de aislamientos y proporción relativa (%) de especies de hongos edáficos en la Unidad Muestral N° 6 (Aplicación antigua).

Finalmente, en la *Unidad 7 (U7 – Aplicación reciente)* (Fig. 21) se registró la mayor abundancia total, con 49 aislamientos. La composición está fuertemente dominada por *Saccharomyces* sp., que representa cerca del 80 % de los aislamientos; mientras que el resto de los aislamientos corresponden principalmente a micelio estéril y, en menor medida, presencia marginal de *Mucor*.

U7 APLICACIÓN RECIENTE	
ESPECIE	Nº DE AISLAM.
Micelio esteril	10
<i>Mucor</i> sp.	1
<i>Saccharomyces</i> sp.	38
Total	49

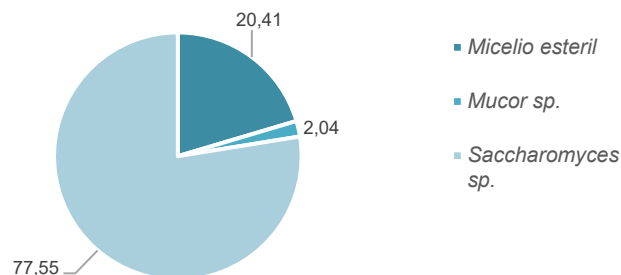


Figura 21. Número de aislamientos y proporción relativa (%) de especies de hongos edáficos en la Unidad Muestral N° 7 (Aplicación reciente).

El análisis resumido de las Figuras 15 a 21 permite identificar patrones de variación entre unidades:

- *Mayor dominancia:* U7 (dominancia de *Saccharomyces*) y U1-U2 (dominancia de *Penicillium*).
- *Mayor proporción de micelio estéril:* U4, seguida por U1 y U3, lo que sugiere condiciones limitantes para la esporulación.
- *Mayor presencia de levaduras:* U7 (*Saccharomyces* claramente dominante) y en menor medida U3 y U6.
- *Mayor heterogeneidad estructural:* U3 y U6.

El análisis descriptivo se complementa con los resultados presentados en la Tabla 4, donde se incorporan los índices de abundancia, riqueza, diversidad de Shannon (H') y equidad de Pielou (J'), lo que permite profundizar la interpretación de la estructura de las comunidades fúngicas en cada unidad de muestreo.

La unidad U3 presenta los valores más altos de riqueza (13) y diversidad ($H' = 2,21$) en relación con el resto de las unidades. De acuerdo con los criterios interpretativos del índice de Shannon, este valor se ubica dentro de un rango de diversidad intermedia-alta, lo que indica una comunidad compuesta por un número relativamente alto de taxones y con una distribución de abundancias moderadamente equilibrada (Magurran, 2004). En contraste, la unidad U7 exhibe la menor riqueza (3) y diversidad ($H = 0,6$), correspondiente a una

diversidad baja, reflejando una fuerte simplificación estructural asociada a la dominancia de un único género (*Saccharomyces* sp., Fig. 21).

En términos de abundancia, U7 registra el mayor número de aislamientos (49), seguida por U4 (47), mientras que U2 presenta el menor valor (26). Sin embargo, la comparación entre abundancia y diversidad evidencia que valores altos de abundancia no se correlacionan necesariamente con una mayor diversidad, sino que puede responder a una mayor representación relativa de uno o pocos taxones. Este patrón se explica porque la diversidad depende no sólo del número de registros, sino también de la distribución de las abundancias entre los taxones (Magurran, 2004; Kvalseth, 2024).

Los valores de equidad (J') son más elevados en U3, U4 y U6, lo que indica una distribución más homogénea de las abundancias entre los taxones registrados. Por el contrario, U7 presenta el valor más bajo de equidad, confirmando una fuerte dominancia de un único taxón y escasa uniformidad en la distribución de la comunidad.

Por último, la interpretación conjunta de estos indicadores resulta coherente con los patrones observados en las figuras 15 a 21.

Tabla 4. Datos de abundancia, riqueza, equidad y diversidad de hongos edáficos obtenidos por el método de lavado de suelo y sembrado de partículas de las muestras de siete unidades muestrales de Estancia Cullen, Tierra del Fuego.

UNIDAD	ABUNDANCIA	DIVERSIDAD (H')	EQUITATIVIDAD (J')	RIQUEZA
U1	39	1,32	3,06	5
U2	26	1,02	2,04	4
U3	42	2,21	8,17	13
U4	47	1,87	6,21	10
U5	35	1,12	2,89	5
U6	39	1,97	6,24	9
U7	49	0,6	0,95	3

- **Conservación de los aislamientos fúngicos**

Los aislamientos fúngicos obtenidos a partir de las muestras de suelo fueron sometidos a sucesivos repiques con el fin de alcanzar cultivos puros, mediante la selección de colonias con morfologías diferenciadas y su transferencia a nuevos medios de cultivo. Este proceso permitió eliminar contaminantes y aislar micelios homogéneos, cuya pureza fue verificada mediante la observación de características macroscópicas y microscópicas, incluyendo uniformidad en el crecimiento y en las estructuras reproductivas.

Una vez constatada la pureza (Fig. 22), los aislamientos fueron transferidos a tubos de ensayo con medio inclinado (*slant*), adecuados para su conservación a mediano y largo plazo.

Las cepas fueron incorporadas al cepario del Instituto Spegazzini (Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata) (Fig. 23), donde se conservan bajo condiciones controladas. Este procedimiento permite resguardar el material biológico obtenido en el marco del presente estudio y garantizar su disponibilidad para futuras investigaciones, incluyendo ensayos de antagonismo, caracterización taxonómica y estudios complementarios.

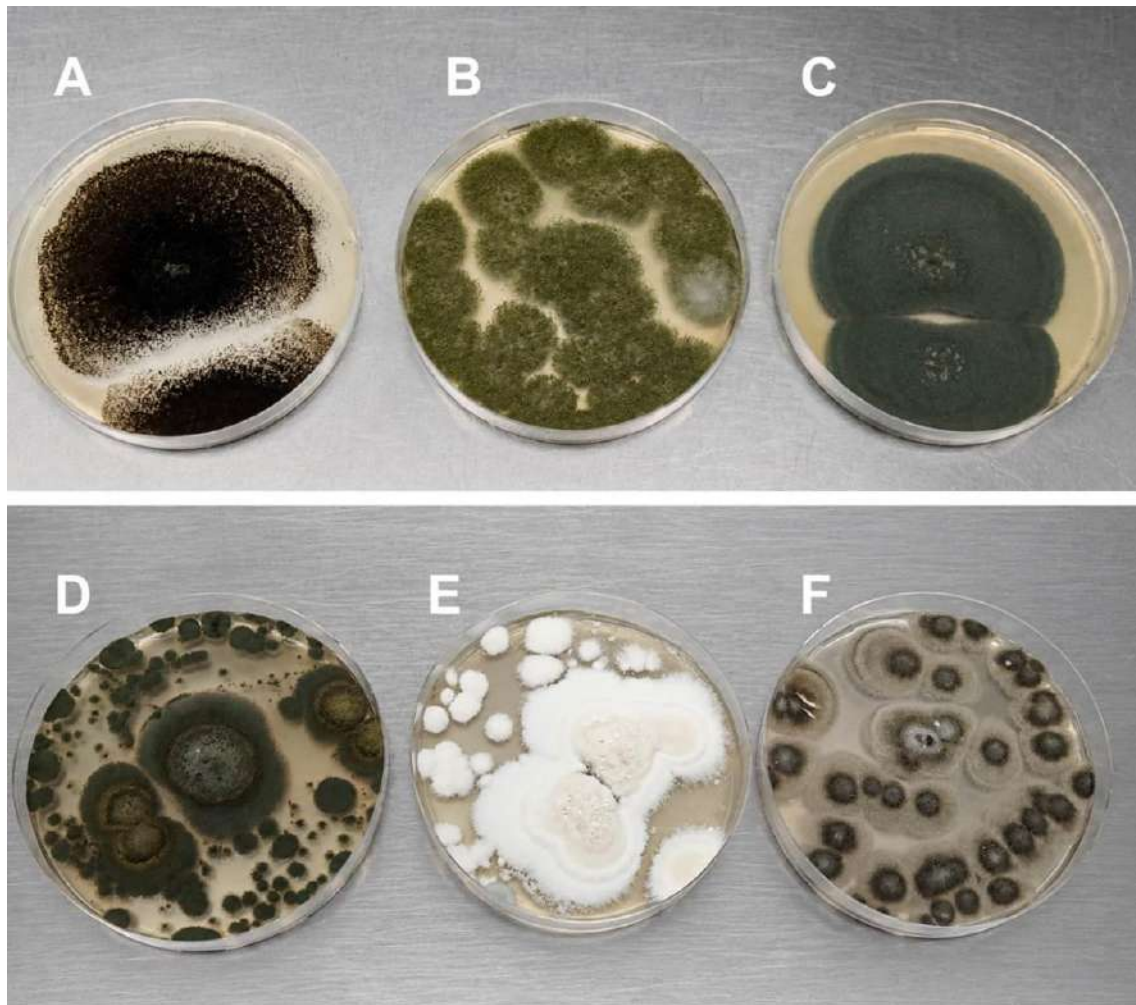


Figura 22. Purificación de aislamientos fúngicos. **A.** *Aspergillus niger*. **B.** *Aspergillus flavus*. **C.** *Penicillium* sp. 1. **D.** *Penicillium* sp. 2. **E.** *Beauveria bassiana*. **F.** *Cladosporium* sp.

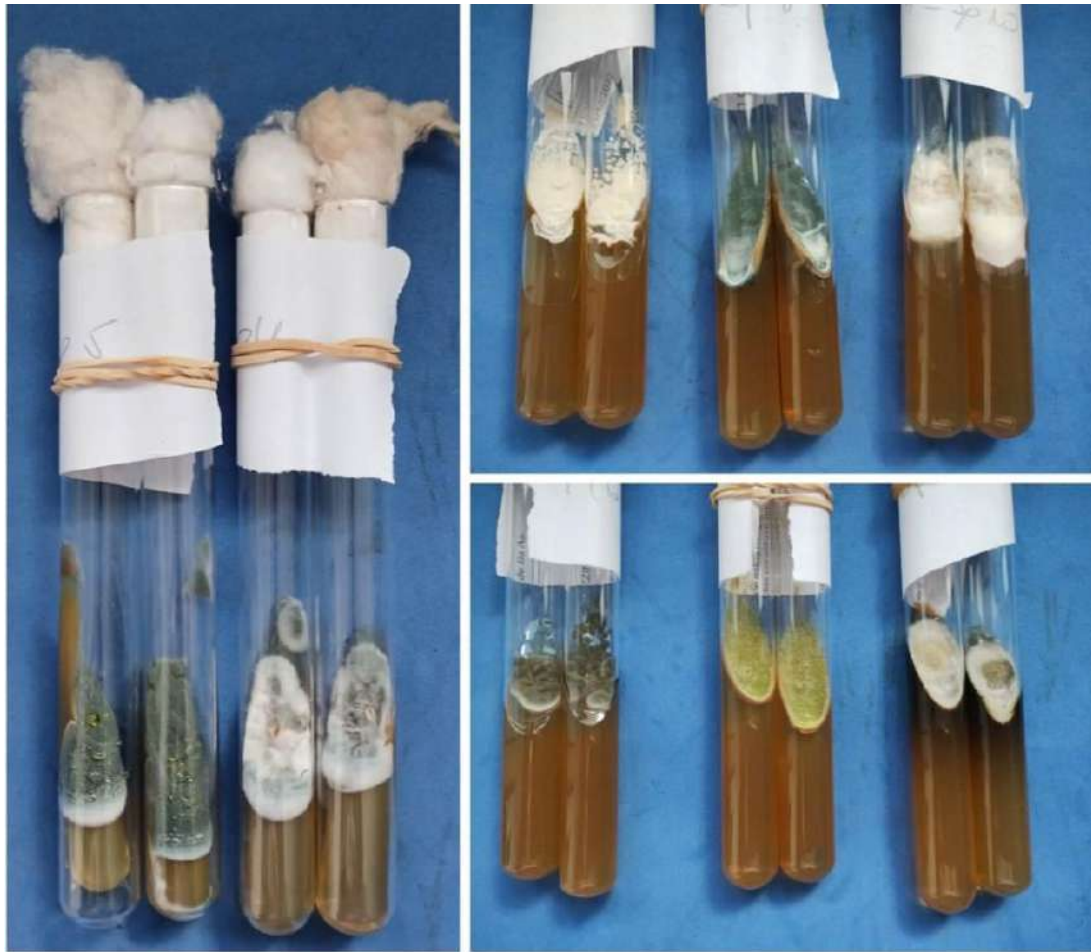


Figura 23. Cepas fúngicas aisladas de muestras de suelo provenientes de Estancia Cullen (Tierra del Fuego), conservadas en tubos en *slant* (medio inclinado) en el cepario del Instituto Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata.

5.1.4. Cianobacterias

- **Metodología**

Las muestras de agua y de tapete superficial orgánico recolectadas en la Unidad 8 (Alfa), ubicada en la Estancia Cullen ($52^{\circ} 42' 41,67''$ S; $68^{\circ} 34' 48,04''$ O), fueron destinadas al aislamiento de cianobacterias y procesadas en laboratorio mediante su siembra en placas de Petri con medio sólido BG-11. De manera complementaria, y con el objetivo de favorecer el crecimiento de cianobacterias del orden Nostocales, de particular interés para el presente proyecto, una alícuota de las muestras recolectadas fue sembrada en placas con medio BG-11 (0) (BG-11 sin nitrógeno).

Los cultivos se mantuvieron en cámara de cultivo bajo condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo, estableciéndose temperaturas de incubación comprendidas entre 14 y 20 °C, con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Las placas fueron monitoreadas semanalmente a fin de registrar el desarrollo de colonias y detectar el crecimiento de microorganismos con características compatibles con cianobacterias.

Transcurrida aproximadamente una semana desde la siembra, las placas fueron examinadas y, a partir de las colonias formadas, se extrajeron pequeñas porciones para su observación microscópica preliminar. En aquellos casos en los que los microorganismos presentaron rasgos compatibles con el grupo Nostocales, se procedió a la toma de inóculos y su resiembra en medio sólido fresco, con el objetivo de obtener cultivos monoespecíficos. Cuando el aislamiento no resultó exitoso en la primera instancia, el procedimiento fue repetido sucesivamente hasta lograr cultivos libres de contaminación observable (Fig. 24).

Los cultivos monoespecíficos obtenidos fueron conservados en placas de Petri con medio BG-11 sólido, mantenidos en cámara de cultivo bajo condiciones controladas. La identificación taxonómica se realizó mediante la observación directa de material fresco bajo microscopio óptico, registrándose características tales como la coloración, el tipo y disposición de los tricomas, la presencia o ausencia de heterocistos y acinetos, y la organización celular (Komárek 2013).



Figura 24. Cultivos de cianobacterias del género *Anabaena* aislada de la Ea. Cullen (Tierra del Fuego AIAS). **F:** filamento de cianobacteria, **C:** protista autotrófico (microalgas verdes), **P:** protista heterótrofo.

● Resultados obtenidos

Como resultado, se logró el aislamiento de tres cianobacterias pertenecientes al orden Nostocales, de las cuales dos especies aún no fueron identificadas a nivel de género o especie (Fig. 25 y 26).

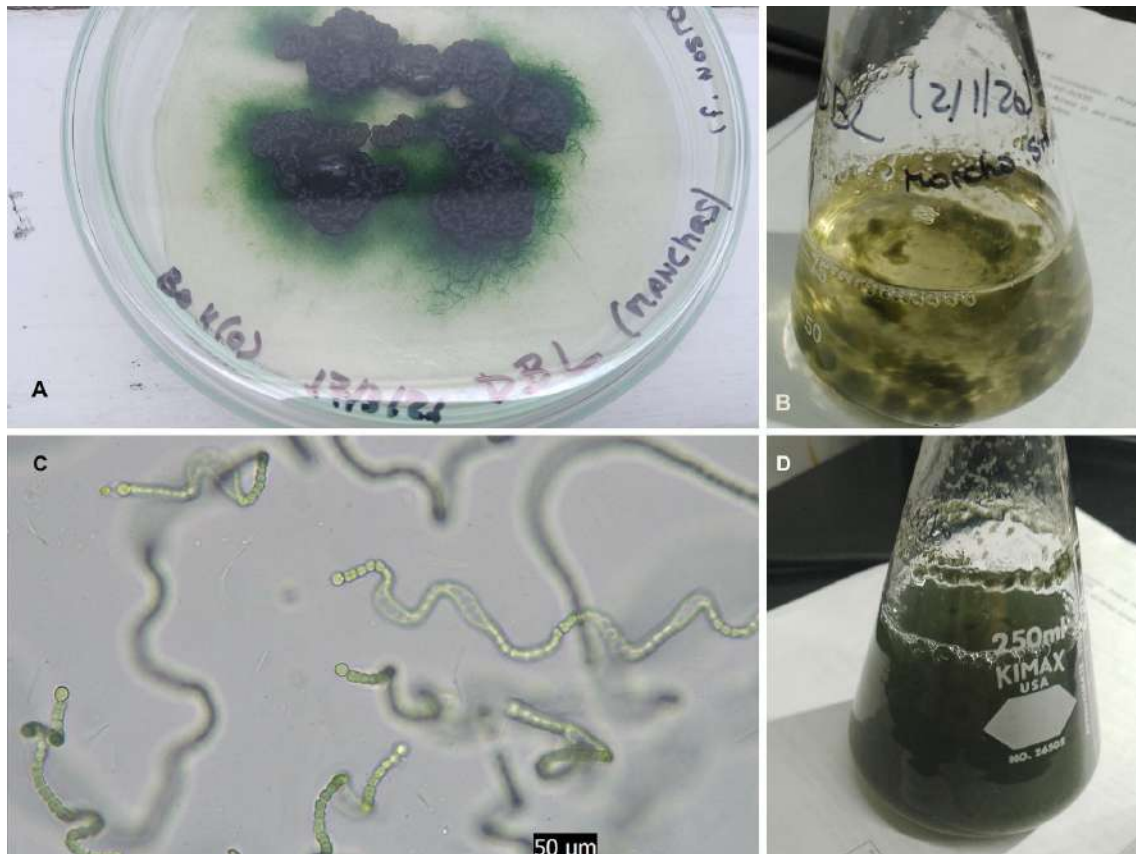


Figura 25. Cianobacteria nostocal no identificada. **A.** Crecimiento en medio sólido. **B.** Inicio del crecimiento en medio líquido. **C.** Observación del cultivo bajo microscopio óptico. **D.** Cultivo en medio líquido luego de cuatro meses de crecimiento.

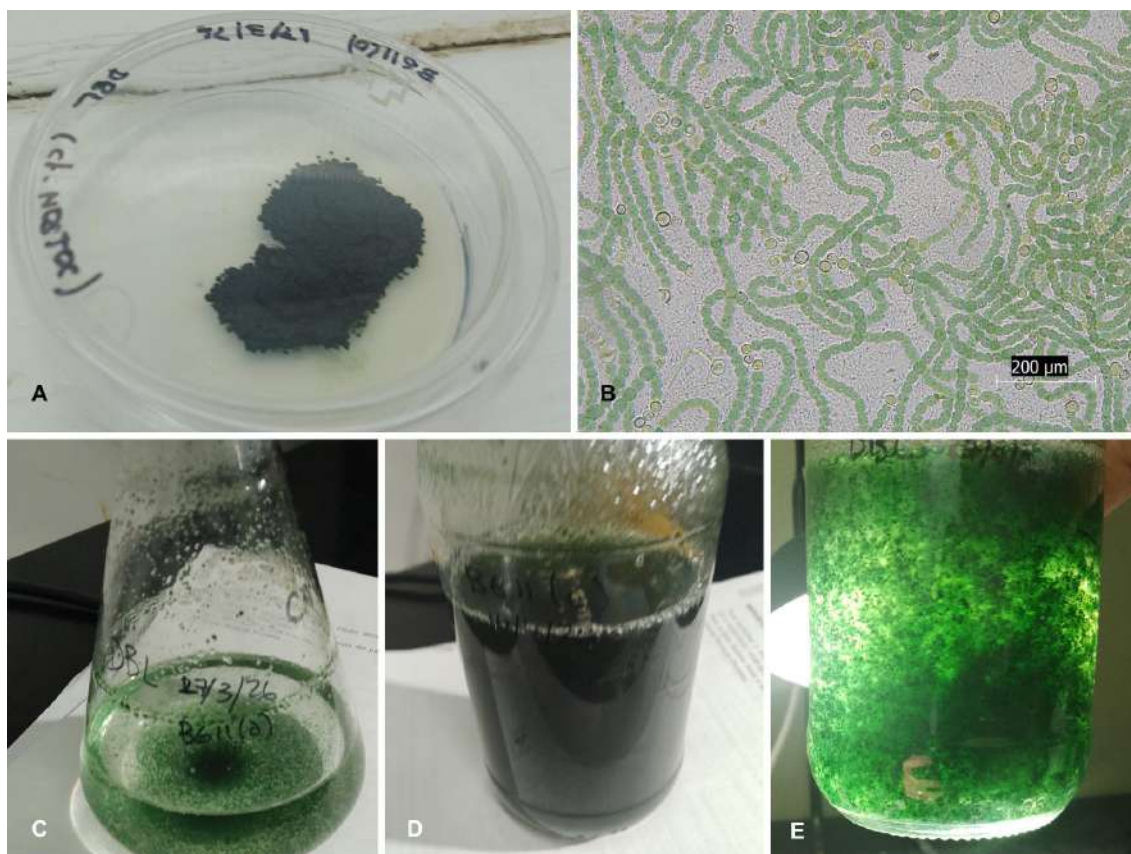


Figura 26. Cianobacteria nostocal no identificada. **A.** Crecimiento en medio sólido. **B.** Observación del cultivo bajo microscopio óptico. **C.** Inicio del crecimiento en medio líquido. **D y E.** Cultivo en medio líquido luego de cuatro meses de crecimiento.

Se realizó un registro fotográfico sistémico de las estructuras morfológicas que estaban presentes en los cultivos observados cada semana. A partir del análisis microscópico detallado y la consulta de bibliografía taxonómica especializada, se determinó que los cultivos aislados de Ea. Cullen obtenidos corresponden a la especie *Anabaena* cf. *torulosa* (también citada como *Anabaena oscillarioides* f. *torulosa*) (Komárek, 2013; www.algaebase.org). Esta asignación se basó principalmente en la forma, tamaño y en la ubicación de la acineta en el filamento, forma y tamaño de las células vegetativas y forma de las células terminales del filamento (Fig. 27). No obstante, el análisis deberá complementarse con futuros estudios moleculares que permitan confirmar la identidad taxonómica de la especie.

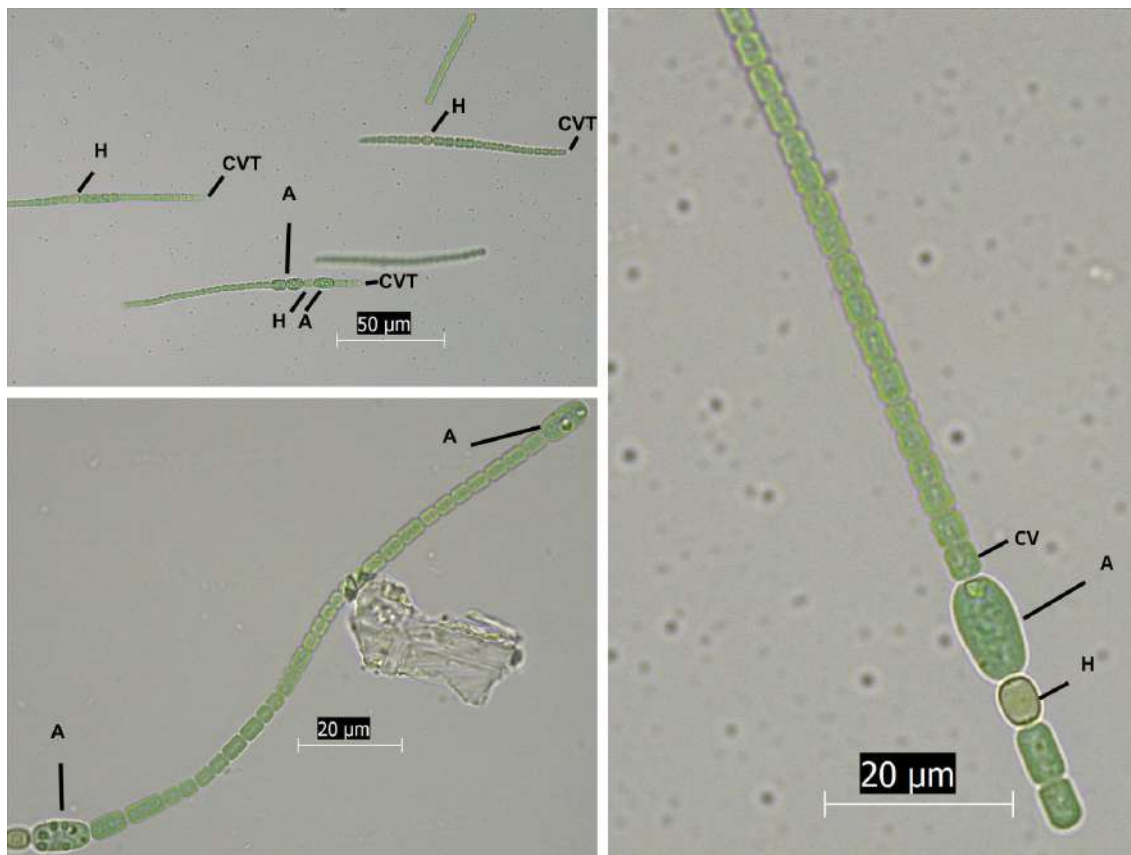


Figura 27. Filamento de la cianobacteria *Anabaena* cf. *torulosa* aislada de la Ea. Cullen (Tierra del Fuego AIAS). **CV**: célula vegetativa, **CVT**: célula vegetativa terminal, **H**: heterocisto (estructura de fijación de nitrógeno atmosférico), **A**: acineta (estructura de resistencia).

Cabe señalar que la observación de acinetas no siempre resulta inmediata en condiciones de cultivos, dado que su formación depende de condiciones ambientales específicas. No obstante, los cultivos obtenidos y mantenidos durante el período de estudio permitieron registrar la totalidad de las estructuras morfológicas para una identificación taxonómica confiable basada en caracteres morfológicos (fenotípicos).

Los cultivos monoespecíficos de cianobacterias fueguinas fueron incorporados a la colección de microorganismos fotosintéticos del CADIC-CONICET, donde se conservan bajo condiciones controladas. Esto permite resguardar el material biológico obtenido en el marco del presente estudio y

garantizar su disponibilidad para futuras investigaciones, incluyendo ensayos de inhibición, caracterización taxonómica y estudios moleculares complementarios.

5.1.5. Micorrizas

El estudio de las asociaciones micorrícicas se abordó mediante dos enfoques complementarios:

(i) la detección directa de estructuras micorrícicas en raíces (endomycorrizas), realizada en el Laboratorio de Ecología Terrestre y Acuática del CADIC-CONICET, y

(ii) el análisis de la diversidad de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) presentes en el suelo, llevado a cabo en el Instituto Spegazzini de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad de La Plata.

Este enfoque dual permitió evaluar tanto la colonización efectiva en plantas hospederas como el reservorio de propágulos fúngicos en el suelo.

5.1.5.1. Detección y registro de asociaciones micorrícicas en raíces (endomycorrizas)

- **Metodología**

Se analizaron las raíces de 34 especies vegetales, seleccionadas como las más representativas de cada unidad de muestreo. La detección de hongos formadores de micorrizas se realizó mediante la técnica Phillips & Hayman (1970) (ver ANEXO V) (Fig. 28). Para cada especie se realizaron 3 montajes microscópicos (3 muestras de raíces independientes por preparado), lo que resultó en la revisión de un total de 63 muestras.

Las observaciones se realizaron mediante microscopía óptica para identificar la presencia de estructuras micorrícicas (vesículas, micelio, hifas).

En la tabla 5 se presentan las especies registradas y determinadas, junto a la unidad de la cual fueron obtenidas.



Figura 28. Tubos Kahn con raíces tratadas para la detección de micorrizas. Las muestras corresponden a raíces sometidas al proceso de clarificación (ver ANEXO IV).

Tabla 5. Especies vegetales más frecuentes en siete unidades muestrales en Estancia Cullen (Tierra del Fuego).

UNIDAD	ESPECIES VEGETALES
U1 Transición salina	<i>Azorella trifurcata</i> , <i>Festuca gracillima</i> , <i>Poa spiciformis</i> , <i>Trisetum spicatum</i>
U2 Clausura	<i>Hieracium pilosella</i> , <i>Poa spiciformis</i> , <i>Baccharis</i> sp., <i>Deschampsia flexuosa</i> , <i>Festuca gracillima</i>
U3 Casco	<i>Rumex acetosella</i> , <i>Cerastium</i> sp., <i>Trisetum spicatum</i> , <i>Deschampsia flexuosa</i> , <i>Colobanthus subulatus</i> , <i>Hieracium pilosella</i>
U4 Morenas	<i>Hordeum comosum</i> , <i>Erygeron myosotis</i> , <i>Deschampsia flexuosa</i> , <i>Festuca gracillima</i>
U5 Micorrizas	<i>Poa pratensis</i> , <i>Poa atropidiformis</i> , <i>Hordeum comosum</i>
U6 Aplicación antigua	<i>Hieracium pilosella</i> , <i>Armeria maritima</i> , <i>Rytidosperma</i> sp., <i>Agrostis flavidula</i> , <i>Poa pratensis</i>
U7 Aplicación reciente	<i>Poa spiciformis</i> , <i>Agrostis flavidula</i> , <i>Poa pratensis</i>

- **Resultados obtenidos**

En todas las raíces vegetales analizadas se confirmó la presencia de estructuras de hongos micorrícicos. Se observaron vesículas intensamente teñidas, características de los hongos micorrícicos arbusculares, así como micelio asociado a los tejidos radicales.

En la figura 29 se evidencia la colonización micorrícica en raíces de *Agrostis flavidula* (Fig. 29.A), *Armeria maritima* (Fig.29. B), *Hieracium pilosella* (Fig. 29.C) y *Poa pratensis* (Fig. 29. D).

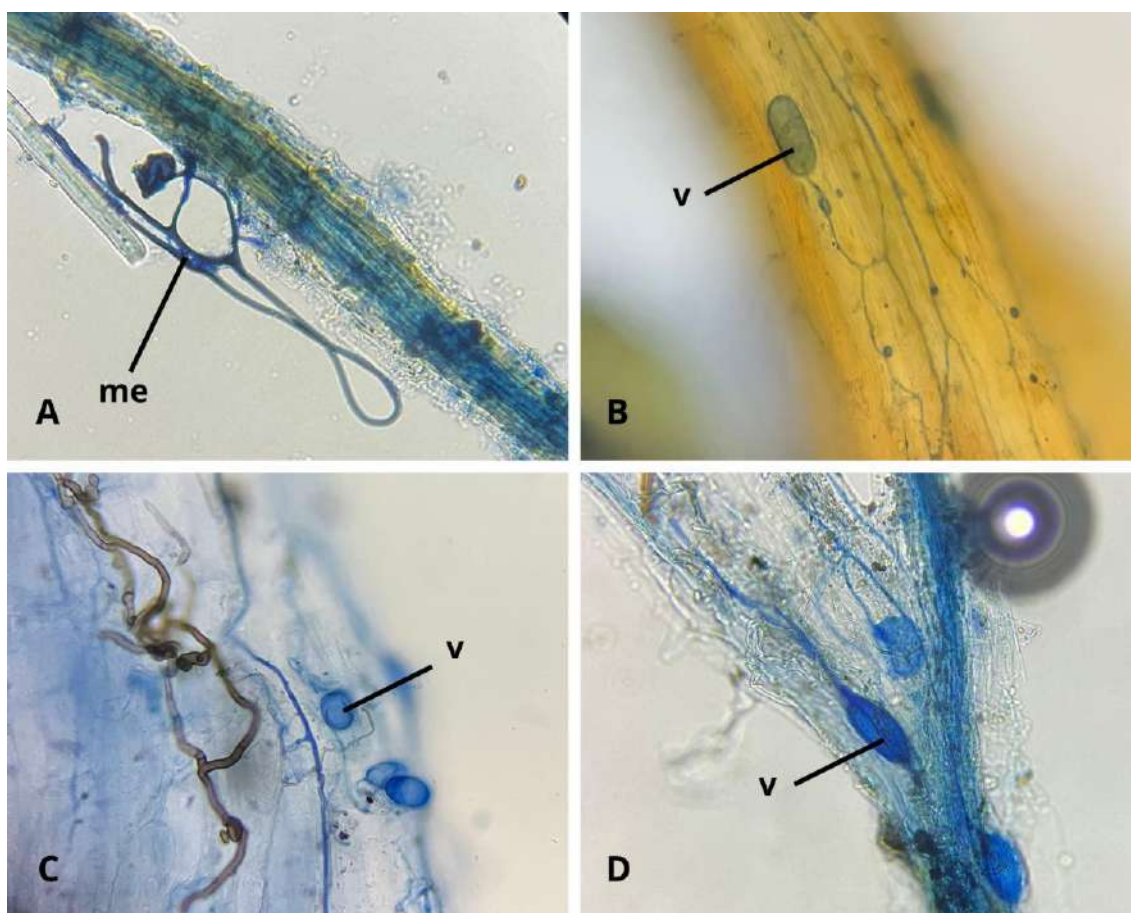


Figura 29. Fotografía de preparados microscópicos de raíces de: **A.** *Agrostis flavidula*. **B.** *Armeria maritima*. **C.** *Hieracium pilosella*. **D.** *Poa pratensis*. **v:** vesícula. **me:** micelio ectomicorrícico.

5.1.5.2. Diversidad micorrícica en muestras de suelo

- **Metodología**

Las muestras de suelo (100 g por unidad, previamente secas y tamizadas) fueron procesadas en el Instituto Spegazzini para la extracción de esporas del HMA.

Se aplicó la técnica de tamizado húmedo y decantación (Gerdemann y Nicholson, 1963), seguida de centrifugación en gradiente de sacarosa (Walker y col., 1982) (ANEXO VI).

Las esporas recuperadas fueron observadas bajo microscopio estereoscópico (40x) para su recuento, realizándose tres réplicas por muestra. Los morfotipos fueron posteriormente analizados bajo microscopio óptico utilizando polivinil alcohol lactofenol y reactivo de Melzer, permitiendo su aproximación taxonómica a partir de los caracteres diagnósticos de las paredes de las esporas.

La identificación de las morfoespecies de HMA se basó en los criterios taxonómicos actualmente aceptados para el tamaño, el color, la ornamentación de la superficie y la estructura de la pared de las esporas (Blaszkowski, 2012; <https://invam.wvu.edu/>). Los nombres específicos de las HMA y su clasificación en familias siguieron la clasificación consensuada en *Mycobank* (<https://www.mycobank.org>).

- **Resultados obtenidos**

En las muestras de suelo correspondientes a las siete unidades analizadas se observaron esporas de hongos micorrícicos arbusculares. El promedio general fue de 43 esporas cada 100 gramos de suelo seco, lo que evidencia la presencia de un banco de propágulos micorrícicos en todos los sitios estudiados.

A partir del análisis morfológico se identificaron representantes del phylum Glomeromycota, agrupados en siete familias: Acaulosporaceae, Entrophosporaceae, Funneliformaceae, Gigasporaceae, Glomeraceae,

Pacisporaceae y Scutellosporaceae. En total, se reconocieron 13 morfotipos a nivel de especie y uno a nivel de género (Fig. 30).

En la tabla 6 se presentan los valores de abundancia y riqueza específica para cada una de las unidades muestrales, lo que permite observar variaciones en la composición de las comunidades micorrícicas del suelo. La abundancia de esporas varió entre 25 y 80 individuos por unidad, siendo la Unidad 1 la unidad con mayor abundancia; mientras que la Unidad 7 presentó los valores más bajos. Por su parte, la riqueza específica osciló entre 3 y 9 taxa, registrándose el valor máximo también en la Unidad 1 y el mínimo en la Unidad 6.

Asimismo, el análisis de la tabla 6 permite identificar la presencia diferencial de especies entre unidades. Algunas especies, como *Acaulospora scrobilata*, presentan una amplia distribución, registrándose en varias unidades y con valores relativamente elevados de abundancia, lo que sugiere su carácter dominante en la comunidad. En contraste, otras especies muestran una distribución más restringida, apareciendo en pocas unidades o con bajas abundancias, como es el caso de *Gigaspora gigantea* o *Rhizophagus clarus*.

Los datos presentados evidencian que, si bien las comunidades de HMA están presentes en todas las unidades de muestreo, existen diferencias en su abundancia, riqueza y composición específica, lo que refleja la heterogeneidad de condiciones entre los distintos sitios analizados.

Tabla 6. Especies de hongos micorrícicos arbusculares presentes en muestras de suelo provenientes de siete unidades muestrales de Estancia Cullen, Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur. **U1:** Transición salina. **U2:** Clausura. **U3:** Casco. **U4:** Morenas. **U5:** Micorrizas. **U6:** Aplicación antigua. **U7:** Aplicación reciente.

ESPECIES	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7
Acaulosporaceae							
<i>Acaulospora delicata</i>	0	0	2	2	2	0	4
<i>Acaulospora laevis</i>	13	0	3	0	0	0	2
<i>Acaulospora mellea</i>	15	6	6	0	3	0	0
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	9	5	36	5	22	3	9
Entrophosporaceae							
<i>Entrophospora etunicata</i>	7	0	0	0	0	24	4

<i>Entrophospora infrequens</i>	0	3	0	0	0	0	0
Funneliformaceae							
<i>Funneliformis mosseae</i>	10	0	0	0	0	6	0
Gigasporaceae							
<i>Gigaspora gigantea</i>	0	0		3	0	0	0
Glomeraceae							
<i>Rhizophagus clarus</i>	0	0	0	5	0	0	0
<i>Rhizophagus intraradices</i>	10	0	0	0	0	0	0
<i>Glomus</i> sp.	4	0	2	6	0	0	0
Pacisporaceae							
<i>Pacispora franciscana</i>	8	4	0	0	2	0	0
<i>Pacispora patagonica</i>	4	17	0	7	0	0	3
Scutellosporaceae							
<i>Scutellospora calospora</i>	0	8	9	5	2	0	3
Abundancia	80	43	58	33	31	33	25
Riqueza Específica	9	6	6	7	5	3	6

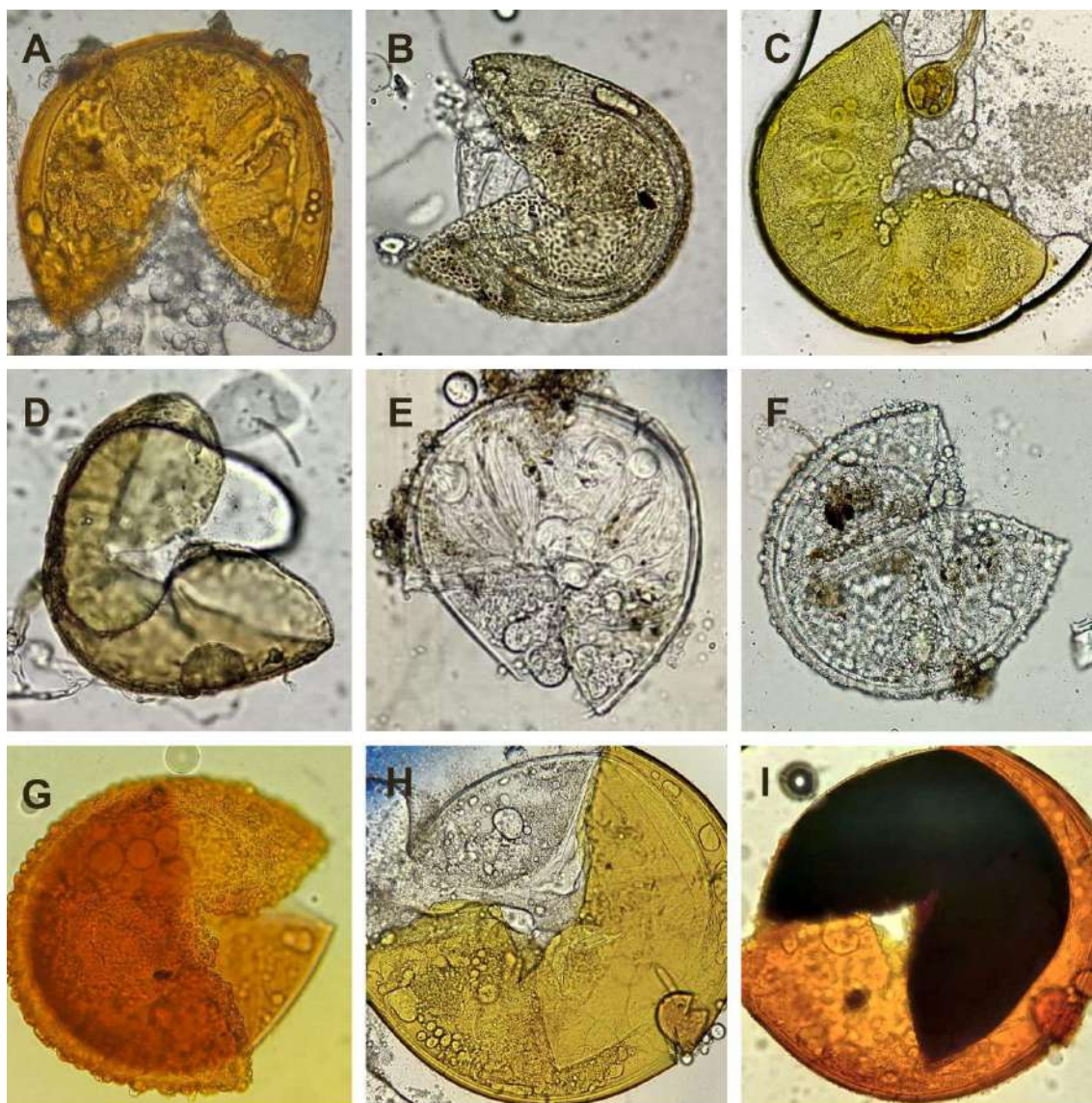


Figura 30. Imágenes de microscopía óptica de esporas de hongos micorrícicos arbusculares de muestras de suelo de Estancia Cullen, Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur. **A.** *Acaulospora mellea*. **B.** *Acaulospora scrobiculata*. **C.** *Gigaspora gigantea*. **D.** *Glomus* sp. **E.** *Pacispora franciscana*. **F.** *Pacispora patagonica*. **G.** *P. patagonica* con reactivo de Melzer. **H.** *Scutellospora calospora*. **I.** *Scutellospora calospora* con reactivo de Melzer.

5.1.6. Análisis e interpretación de los resultados

La integración de los resultados físico-químicos, microbiológicos y biológicos evidencia la existencia de patrones consistentes entre las condiciones edáficas, la estructura de las comunidades biológicas y el estado de los ambientes muestreados.

En términos generales, se evidencia una marcada variabilidad entre unidades en cuanto a riqueza, diversidad y equidad, lo que indica diferencias en la estructura de las comunidades fúngicas a escala local. Este patrón es consistente con lo reportado en estudios de hongos de suelo, donde la diversidad se encuentra fuertemente influenciada por factores ambientales y presenta una distribución espacial heterogénea (Liu y col., 2023; Shet y col., 2021). Asimismo, la falta de correspondencia directa entre riqueza, equidad y diversidad observada en este estudio coincide con la literatura ecológica, donde estos componentes pueden variar de manera independiente. En este sentido, la diversidad no depende únicamente del número de taxones presentes, sino también de la distribución relativa de sus abundancias (Magurran, 2004; Kvalseth, 2024).

En particular, la elevada abundancia de micorrizas en U1 refuerza la interpretación de un sistema más estable y funcional, donde las interacciones planta-hongo contribuyen a optimizar la disponibilidad de recursos. Este patrón ha sido ampliamente documentado en la literatura, donde se señala que las asociaciones micorrícicas incrementan la absorción de nutrientes (especialmente fósforo), mejoran la tolerancia al estrés y favorecen la estabilidad de los ecosistemas (Carrillo-Saucedo y col., 2022).

La Unidad 5 (Micorrizas) presenta un comportamiento similar, con altos valores de materia orgánica y nutrientes, lo que sugiere un suelo con mayor actividad biológica. En este caso, el incremento en fósforo y materia orgánica podría estar directamente vinculado a la actividad microbiana y micorrícica, así como una mayor retención de humedad y capacidad de intercambio de nutrientes.

En contraste, la unidad U3 (Casco), dominada por *Hieracium pilosella*, presentó un patrón opuesto. Los bajos contenidos de materia orgánica, fósforo extractable y nitrógeno total, junto con valores de pH ácido y baja conductividad eléctrica, indican un ambiente empobrecido desde el punto de vista edáfico y biológico. Este resultado coincide con lo reportado por Moretto y col. (2018), quienes observaron que los parches invadidos por *H. pilosella* en la estepa fueguina presentan disminuciones en pH, nitrógeno total y fósforo. En este sentido, la invasión podría modificar procesos vinculados al ciclo de nutrientes y a la microbiota edáfica, alterando el funcionamiento del ecosistema. La baja

disponibilidad de nutrientes observada en U3 podría estar relacionada con el avanzado estado de degradación del sitio y con la sustitución de especies nativas palatables por parches monoespecíficos de *H. pilosella*, situación que reduce el aporte y la calidad de residuos vegetales al suelo.

Un caso particularmente relevante es el de la Unidad 7 (aplicación reciente), correspondiente a un sitio con intervención reciente mediante herbicida (Picloram). Esta unidad presenta la mayor abundancia de aislamientos, pero con muy baja diversidad y equidad, debido a la fuerte dominancia de *Saccharomyces* sp. Esto sugiere una comunidad desequilibrada, típica de ambientes disturbados. En combinación con valores relativamente bajos de nitrógeno y condiciones ácidas, los resultados indican que se trata de un sistema empobrecido y en proceso de reorganización, con predominio de organismos oportunistas y sin desarrollo significativo de comunidades microbianas más complejas, como las micorrizas.

Cabe recordar que, previo a la aplicación, este sitio se encontraba invadido por *H. pilosella*, condición que probablemente modificó progresivamente las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo. Estudios realizados en la estepa fueguina indican que la broza de *H. pilosella* presenta tasas de descomposición considerablemente superiores a las de especies nativas (Braun, 2009), lo que contribuye a acelerar el recambio de materia orgánica y a alterar la dinámica de nutrientes y microorganismos del suelo. Al momento del muestreo aún se observaban restos de broza de la especie invasora en descomposición, los cuales podrían haber continuado aportando compuestos orgánicos fácilmente degradables y favoreciendo el predominio de ciertos microorganismos, en detrimento de otros.

La presencia de asociaciones micorrícicas en todas las especies vegetales analizadas, incluyendo *Hieracium pilosella* y plantas nativas, evidencia que estas interacciones forman parte de la estrategia ecológica general de las plantas. Diversos estudios han demostrado que las micorrizas pueden jugar un rol dual en procesos de invasión, facilitando tanto el establecimiento de especies invasoras como la resiliencia de comunidades nativas (Abarca, 2021; Morman y col., 2024). Sin embargo, en el presente estudio no se observa una relación lineal entre la abundancia de micorrizas y la presencia de *Hieracium pilosella*. Por

ejemplo, la U1, sin presencia de la especie invasora, presenta la mayor abundancia de micorrizas, mientras que la U3, fuertemente invadida, también muestra valores elevados (Tabla 6). Asimismo, unidades con baja o nula presencia de *H. pilosella* (U4, U5 y U6) presentan valores intermedios; mientras que la U7 registra la menor abundancia. Estos resultados sugieren que la distribución de las micorrizas no estaría exclusivamente determinada por la presencia de la especie invasora, sino que resultaría de la interacción de múltiples factores, entre ellos las condiciones edáficas y el grado de disturbio de cada unidad.

En relación con la comunidad fúngica edáfica, la presencia de géneros ampliamente distribuidos en suelos, tales como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Trichoderma* (Tabla 3), coincide con lo reportado en diversos estudios sobre microbiota de suelo (Eigid y col., 2019; Murali y col., 2021; Valle y col., 2021; Liu y col., 2023; Hossain y col., 2025), que describen estos géneros como componentes frecuentes de las comunidades fúngicas del suelo, las que presentan una alta variabilidad estructural en función de las condiciones ambientales (Liu y col., 2021). No obstante, las diferencias de dominancia, riqueza y equidad entre unidades evidencian una fuerte heterogeneidad estructural. La dominancia de taxones oportunistas en determinadas unidades sugiere respuestas adaptativas a condiciones de estrés o disturbios, donde estos organismos presentan ventajas competitivas.

Por otra parte, la elevada proporción de micelio estéril observada en varias unidades podría reflejar tanto limitaciones ambientales para la esporulación como restricciones del enfoque metodológico, lo que resalta la necesidad de finalizar las tareas vinculadas al uso de herramientas moleculares y así mejorar la resolución taxonómica y el análisis exploratorio de las unidades.

En cuanto al análisis de cianobacterias, los aislamientos obtenidos corresponden exclusivamente a la U8, asociada a un ambiente acuático, por lo que su interpretación no resulta directamente comparable con la dinámica de las comunidades edáficas analizadas en el resto de las unidades. La detección de organismos pertenecientes al orden Nostocales y su posterior cultivo en condiciones controladas constituye un resultado relevante desde el punto de vista experimental.

La obtención de cultivos monoespecíficos y su identificación preliminar representa un avance significativo, ya que permite contar con material biológico disponible para la realización de ensayos posteriores. Considerando que estos organismos poseen la capacidad de producir metabolitos secundarios con actividad biológica, su aislamiento abre la posibilidad de explorar su potencial en estudios de interacción con plantas o en el desarrollo de estrategias de control biológico en etapas futuras del proyecto.

5.1.7. Adquisición de equipos y materiales de laboratorio

La estrategia de adquisición e insumos de laboratorio fue concebida como una actividad crítica para garantizar la correcta ejecución del proyecto, dado que una parte sustancial de las tareas experimentales dependía de la disponibilidad de reactivos específicos y de calidad adecuada. En función de ello, se decidió concentrar la mayor parte de las compras en las etapas iniciales, con el objetivo de minimizar posibles interrupciones una vez iniciadas las actividades experimentales.

El proceso de adquisición incluyó las siguientes etapas:

- Identificación de los insumos y equipos necesarios en función de los diseños y protocolos
- Búsqueda y evaluación de proveedores especializados
- Solicitud y análisis comparativo de presupuestos, considerando costos, disponibilidad y tiempos de entrega
- Elaboración de informes técnicos que respaldaron la selección final de insumos y equipamiento

En el caso de insumos no disponibles en el mercado nacional, hubo retrasos relacionados con los tiempos administrativos y logísticos asociados a su importación. Durante ese período se recurrió de manera complementaria al uso de equipamiento y materiales en calidad de préstamo, provistos principalmente por el Laboratorio de Ecología Terrestre y Acuática del CADIC-CONICET, la Universidad Nacional de Tierra del Fuego AIAS y otros laboratorios

afines de la AER INTA Ushuaia. Esta colaboración permitió sostener una parte significativa de las actividades iniciales del proyecto.

No obstante, algunos reactivos clave para el cultivo de cianobacterias presentaron dificultades particulares de disponibilidad. Entre ellos, el citrato de amonio férrico verde, fuente de hierro recomendada para medios de cultivo tipo BG-11, no se encontraba disponible localmente ni pudo ser obtenido mediante préstamo. Con el objetivo de no retrasar el avance del proyecto, se trabajó de manera transitoria utilizando citrato de amonio férrico marrón.

De acuerdo a Andersen (2005), en medios clásicos como BG-11 y sus modificaciones el hierro debe suministrarse en formas que aseguren su estabilidad en solución y una adecuada biodisponibilidad. En este sentido, señala que el citrato de amonio férrico verde constituye la forma estándar recomendada, ya que genera complejos hierro–citrato relativamente homogéneos y lábiles, favoreciendo una provisión sostenida del micronutriente durante el crecimiento de las cianobacterias.

En contraste, el citrato de amonio férrico marrón puede presentar una menor homogeneidad química y una mayor tendencia a la formación de complejos menos solubles, lo que puede reducir la disponibilidad efectiva del hierro en el medio de cultivo. Estas diferencias adquieren particular relevancia en cultivos mantenidos durante períodos prolongados y en cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos, que presentan una elevada demanda de hierro. Por este motivo, si bien el uso del citrato marrón permitió continuar con parte de las actividades experimentales, la incorporación del citrato de amonio férrico verde fue considerada necesaria para asegurar condiciones de cultivo plenamente reproducibles y coherentes con los protocolos estándar descritos en la bibliografía especializada.

En términos generales, durante el transcurso del proyecto se concretó la adquisición de la gran mayoría del equipamiento y de los insumos planificados, alcanzando la capacidad operativa necesaria para la ejecución completa de las actividades experimentales. El detalle exhaustivo del equipamiento y los materiales adquiridos se presenta en el ANEXO VI, a fin de dejar constancia formal de los equipos y los recursos disponibles al cierre del proyecto.

5.1.8. Ejecución y evaluación del OE1: actividades realizadas, nivel de cumplimiento, limitaciones operativas y ajustes metodológicos

A continuación, en la tabla 7 se presenta una síntesis de las tareas desarrolladas en el marco del OE1, indicando para cada una el porcentaje de cumplimiento alcanzado y una breve observación explicativa.

En términos generales, el OE1 presentó un alto nivel de ejecución en las etapas iniciales vinculadas a la recolección de muestras y el aislamiento de microorganismos, alcanzando un 80% en el aislamiento (T2). Se logró la obtención de cultivos correspondientes a distintos grupos microbianos, incluyendo cianobacterias, hongos edáficos y esporas de micorrizas. Sin embargo, el aislamiento de bacterias de suelo no pudo completarse, debido a dificultades en la obtención de cultivos puros, principalmente asociadas a contaminaciones recurrentes con levaduras y a la complejidad de su separación bajo las condiciones de trabajo disponibles.

Las tareas vinculadas a técnicas moleculares (T4 y T5) no fueron ejecutadas durante el período informado, encontrándose previstas como actividades posteriores. Esto responde tanto a limitaciones operativas como a decisiones metodológicas, priorizando en esta etapa la consolidación de aislamientos y su caracterización inicial. Asimismo, se registraron inconvenientes en la conservación de las muestras originalmente destinadas a estudios moleculares, las cuales fueron almacenadas a -80 °C sin el uso de soluciones estabilizadoras, lo que implica la necesidad de realizar un nuevo muestreo. En este sentido, se prevé retomar estas actividades en etapas posteriores, incluyendo la revisión de protocolos (julio), la recolección de nuevas muestras (septiembre) y el inicio de los análisis moleculares (octubre).

Tabla 7. Tareas correspondientes al primer objetivo específico con su respectivo nivel de cumplimiento y observaciones.

TAREAS	NIVEL DE CUMPLIMIENTO (%)	OBSERVACIONES
T1. Recolectar las muestras de suelo en hábitats diferenciales de Ea. Cullen	100%	Sin observaciones.
T2. Aislar microorganismos de las muestras de suelo y agua	80%	Hasta el momento se ha logrado el aislamiento de cianobacterias, hongos edáficos y esporas de micorrizas. El trabajo con bacterias de suelo se encuentra pendiente de ejecución.
T3. Identificar a los microorganismos aislados mediante técnicas morfológicas	80%	Faltan identificar algunas especies.
T4. Identificar a los microorganismos aislados mediante técnicas moleculares	0%	Se realizará junto a la T5.
T5. Evaluar la diversidad microbiana mediante técnicas moleculares	0%	Los análisis se realizarán una vez finalizada la temporada invernal, dado que será necesario recolectar nuevas muestras de suelo debido a inconvenientes en la conservación del material previamente colectado.

Desde el punto de vista técnico, el desarrollo de las actividades estuvo condicionado por diversas limitaciones. Entre ellas se destacan la presencia de contaminaciones en cultivos, los tiempos requeridos para la obtención de aislamientos puros, y la alta frecuencia de micelio estéril, lo que restringió la resolución taxonómica de parte de los aislados. Asimismo, se registraron limitaciones analíticas en algunos ensayos, con resultados que no pudieron ser interpretados o que quedaron fuera de los rangos esperados, lo que requirió la repetición de mediciones o el ajuste de los procedimientos.

En cuanto a aspectos logísticos, se produjeron demoras en la adquisición de insumos críticos para el desarrollo del proyecto, en particular el citrato de amonio férrico verde y el nitrato de sodio. La gestión de compra de estos reactivos se inició a comienzos de junio de 2025 y, debido a su condición de insumos importados, estuvieron sujetos a los tiempos de provisión del mercado, con plazos de entre cuatro y ocho meses. Finalmente, ambos reactivos fueron recibidos en marzo de 2026, lo que impactó en la planificación de algunas actividades experimentales.

Adicionalmente, se consideró metodológicamente conveniente remitir muestras de suelo al Instituto Spegazzini, con el objetivo de complementar los resultados obtenidos a nivel local, particularmente en lo referido a la diversidad fúngica. Esta instancia permitió mejorar la resolución de la identificación taxonómica y robustecer la interpretación de los resultados.

Por otro lado, el enfoque inicial del proyecto contempló el trabajo simultáneo con distintos grupos taxonómicos, lo que implicó una elevada complejidad metodológica. La obtención de cultivos axénicos y el mantenimiento de cepas en condiciones adecuadas resultó especialmente demandante, dado que cada grupo presenta requerimientos específicos. En este contexto, se tomó la decisión de priorizar aquellos organismos con mayor viabilidad para su escalado y estudio posterior, en función de la experiencia del equipo y de los colaboradores involucrados. Sin embargo, la infraestructura disponible no permitió alcanzar los volúmenes de biomasa necesarios para avanzar en etapas más avanzadas, como la extracción de compuestos bioactivos.

A partir de esta experiencia, se identifica como ajuste metodológico relevante la necesidad de abordar en etapas futuras la producción de biomasa de manera prioritaria, mediante el diseño de estrategias de cultivo y escalado adecuadas, para luego avanzar hacia análisis bioquímicos y evaluaciones funcionales en condiciones controladas.

5.2. OE2 | Evaluación experimental de tratamientos de control sobre *Hieracium pilosella*

El OE2-Evaluar la efectividad del control químico y extractos biológicos comerciales (biopreparados innovadores) en la inhibición del crecimiento y desarrollo de *H. pilosella* en condiciones controladas, tuvo como finalidad evaluar la respuesta de *Hieracium pilosella* frente a distintas estrategias de control, tomando como referencia tanto el control químico convencional como la aplicación de extractos biológicos. El enfoque estuvo orientado al análisis de procesos tempranos de crecimiento y desarrollo de la especie invasora, como una aproximación a su sensibilidad frente a alternativas de control biológico.

El alcance del objetivo fue de carácter exploratorio y comparativo, orientado a generar información preliminar que permita valorar el potencial de los extractos biológicos como complemento o alternativa al control químico tradicional. En esta etapa no se buscó la validación operativa a campo, sino el diseño y evaluación de esquemas experimentales controlados que aporten criterios técnicos para orientar estudios posteriores.

Para dar cumplimiento a este objetivo se montaron dos ensayos experimentales en condiciones controladas, que se diferenciaron en función del modo de aplicación del extracto biológico de cianobacterias:

- (i) un ensayo de aplicación del extracto en el suelo y
- (ii) un ensayo de aplicación foliar del extracto.

En esta sección se describen los procedimientos y resultados vinculados al montaje y desarrollo de ambos ensayos. El proceso de *obtención y preparación de los extractos biológicos* empleados como tratamientos se desarrolla de manera independiente en la sección correspondiente (ver sección 5.3.3.).

5.2.1. Recolección y análisis químico de muestras edáficas

Con el fin de obtener material representativo para el desarrollo de los ensayos experimentales en condiciones controladas, se realizó la recolección de ejemplares de *Hieracium pilosella* y de suelo en la Estancia María Behety,

ubicada en el sector norte de la Isla Grande de Tierra del Fuego, a 15 km de la ciudad de Río Grande (53°47'9.24"S; 67°56'53.12"O). La selección de este establecimiento respondió a la presencia de ambientes ampliamente invadidos por la especie.

Previo a la recolección, se efectuó un reconocimiento de campo para definir los sectores de muestreo dentro de la estancia, considerando la presencia de parches monoespecíficos de *H. pilosella* y las características edáficas del área (Fig. 31). El material vegetal fue recolectado en un sector con alta cobertura de la especie invasora y suelo profundo, con baja pedregosidad, lo que permitió la extracción de bloques de suelo con el sistema radicular íntegro. De manera complementaria, el suelo destinado al armado del sustrato experimental fue recolectado en un sector próximo del mismo establecimiento, con condiciones ambientales similares pero sin presencia de *H. pilosella*, con el objetivo de minimizar la influencia del banco de semillas natural. De acuerdo con la clasificación propuesta por Cingolani (1999), el sitio de recolección corresponde a un ambiente mesotrófico, caracterizado por presentar una fertilidad edáfica intermedia, coironales o matorrales relativamente productivos, con contenidos moderados de materia orgánica y nutrientes, pH moderadamente ácido y una marcada respuesta al disturbio por pastoreo.

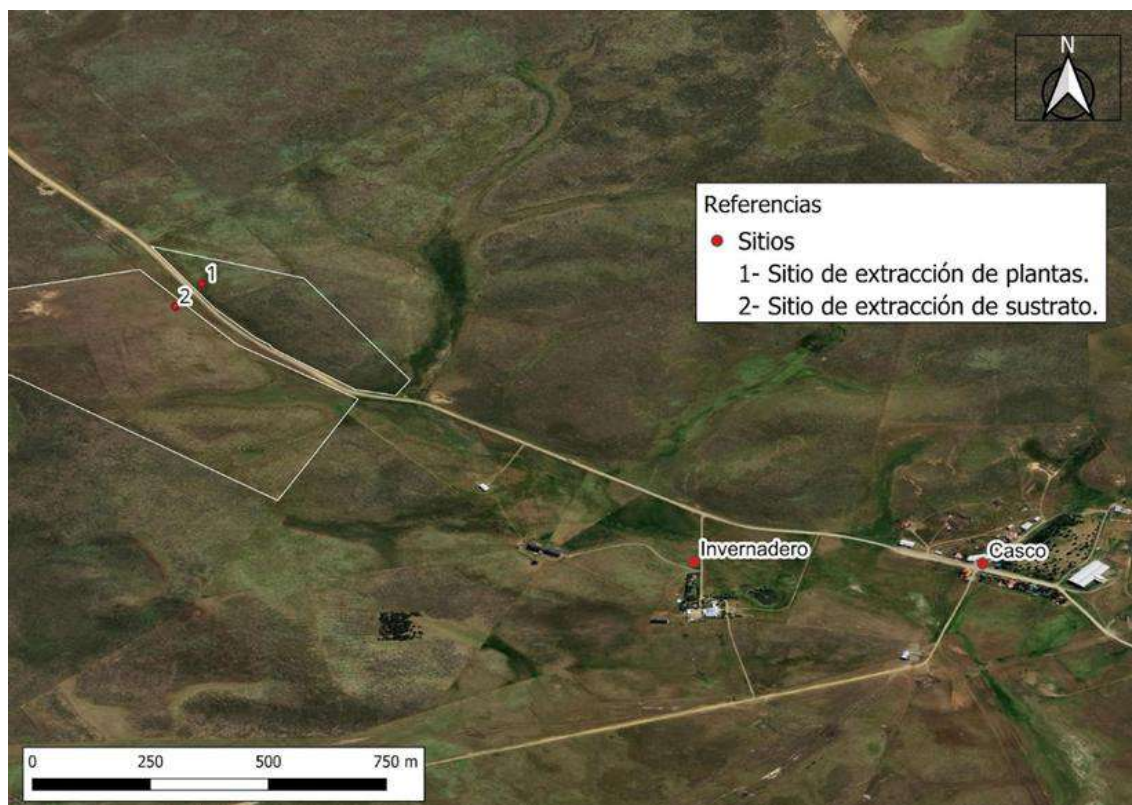


Figura 31. Sitios seleccionados para la extracción de suelo y plantas de *H. pilosella*, ambos próximos al invernadero ubicado en Estancia Maria Behety.

La recolección se realizó mediante la extracción manual de bloques de suelo de aproximadamente 20 cm de profundidad, procurando mantener la estructura del suelo y el tapete vegetal (Fig. 32). Estos bloques fueron utilizados tanto para la preparación del sustrato experimental como para la obtención de muestras para análisis de suelo. El material colectado fue procesado manualmente, retirando restos vegetales, piedras y fracciones gruesas y finalmente homogeneizado para obtener un sustrato uniforme destinado al armado de las macetas del ensayo.

A partir del material extraído se separaron cuidadosamente las plantas de *H. pilosella*, recuperando el suelo rizosférico asociado. Las raíces fueron lavadas para remover el suelo adherido, evitando daños mecánicos, y el material edáfico fue reservado tanto para la caracterización físico-química como para la descripción del sustrato utilizado en el ensayo.

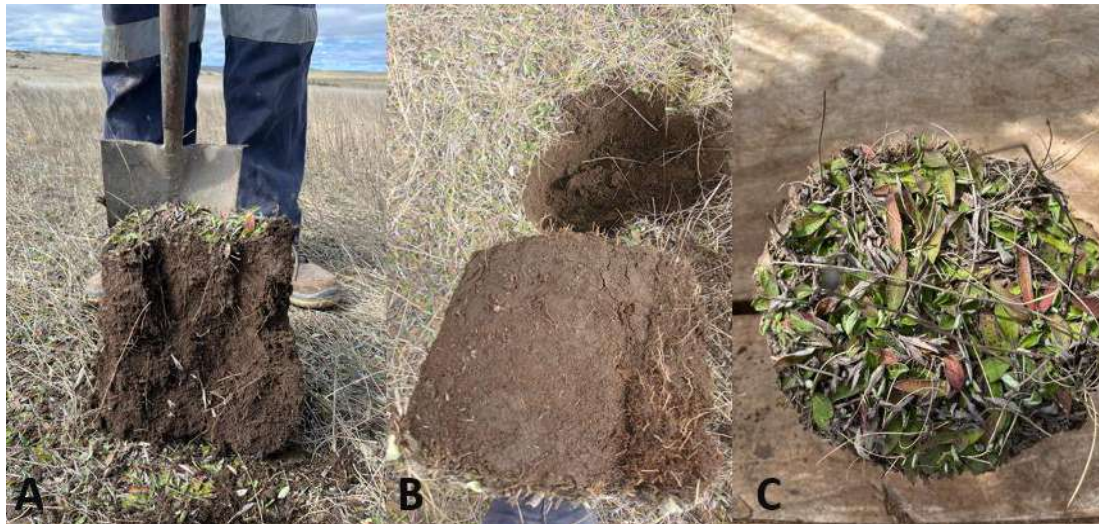


Figura 32. Recolección de bloques de suelo y ejemplares de *Hieracium pilosella* para montaje de ensayo experimental en Estancia Maria Behety (Tierra del Fuego AIAS). **A.** Vista frontal de bloque de suelo con *H. pilosella*. **B.** Vista lateral de bloque de suelo con *H. pilosella*. **C.** Tapete de *H. pilosella*.

La caracterización química se realizó sobre las muestras del sustrato homogeneizado y del suelo rizosférico. En ambas fracciones se determinaron parámetros básicos, incluyendo pH, conductividad eléctrica, humedad y concentración de nutrientes (nitrógeno en sus distintas formas, fósforo y potasio). Los análisis se realizaron utilizando un maletín VISOCOLOR® para análisis de suelos *Macherey-Nagel*, siguiendo los procedimientos estandarizados del kit para determinaciones semi-cuantitativas (Fig. 33).

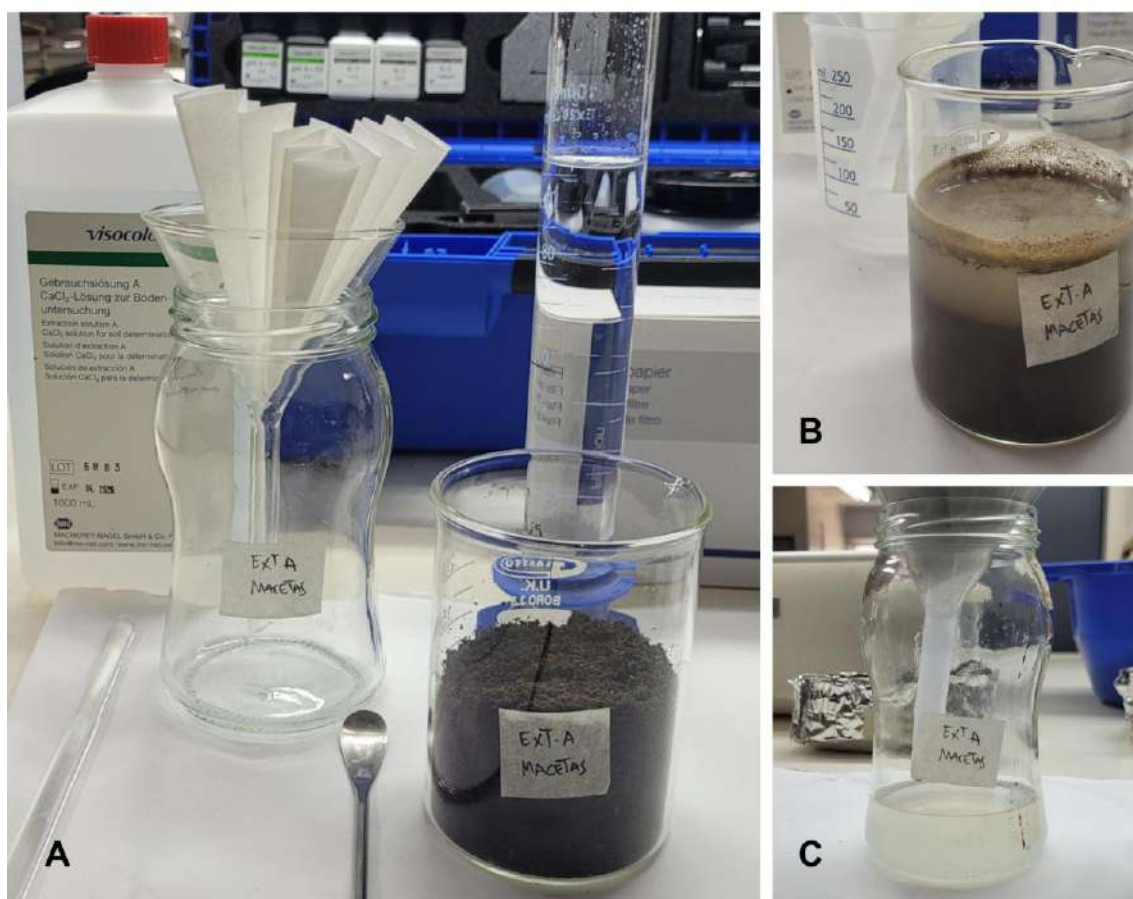


Figura 33. Preparación y análisis inicial de muestras de suelo de macetas mediante el maletín VISOCOLOR® (*Macherey-Nagel*) en ensayos experimentales en condiciones controladas. **A.** Preparación de muestra de suelo de macetas para la evaluación de pH, compuestos nitrogenados y potasio. **B.** Muestra de suelo tras el tratamiento con CaCl_2 (solución A). **C.** Filtración del extracto de suelo obtenida posterior al tratamiento, previo a las determinaciones analíticas.

Previo a los análisis, las muestras fueron tamizadas y acondicionadas en el Laboratorio de Ecología Terrestre y Acuática del CADIC-CONICET.

En relación con los *nutrientes nitrogenados*, no se detectaron concentraciones medibles de nitritos, nitratos y amonio en ninguna de las muestras analizadas. Estos valores nulos sugieren una baja disponibilidad de nitrógeno mineral al momento del muestreo, lo que es consistente con suelos de mineralización lenta y con actividad microbiana dependiente de las condiciones ambientales. Asimismo, la ausencia de nitritos indica que no se evidencian procesos recientes de nitrificación incompleta o disturbios químicos en el sistema.

El *fósforo* tampoco presentó valores detectables en ambas fracciones de suelo, lo que indicaría una limitación potencial del nutriente, frecuente en suelos de textura fina y con alta capacidad de fijación, como los limo arcillosos.

En cuanto al *contenido de potasio*, se observaron diferencias entre ambos materiales. El suelo rizosférico presentó una concentración de 94 mg/kg, mientras que el sustrato homogeneizado alcanzó 220 mg/kg, lo que sugiere una mayor disponibilidad de potasio intercambiable en el material utilizado para el armado de las macetas. Esta diferencia podría estar asociada al proceso de homogeneización del sustrato y a la incorporación de fracciones minerales con mayor contenido de este elemento.

Los *valores de pH* fueron ligeramente ácidos, con un pH de 6,1 en el suelo rizosférico y 5,2 en el sustrato homogeneizado. Ambos rangos se consideran compatibles con el desarrollo de *H. pilosella*, aunque la diferencia observada indica una mayor acidez en el sustrato, lo que podría influir en la disponibilidad de fósforo y en la actividad microbiana del suelo.

La *conductividad eléctrica* presentó los mismos valores en ambas muestras (0,06 dS/m), lo que indica una muy baja concentración de sales solubles tanto en el suelo rizosférico como en el sustrato homogeneizado. Estos valores permiten descartar la presencia de estrés salino o interferencias osmóticas, asegurando que las condiciones del ensayo no estuvieron condicionadas por efectos asociados a salinidad.

La caracterización química del suelo recolectado en la Estancia M. Behety permitió confirmar que el material utilizado en los ensayos presentaba condiciones adecuadas y relativamente homogéneas, sin restricciones edáficas severas que pudieran condicionar el desarrollo de las plantas ni la interpretación de los resultados experimentales.

5.2.2. Ensayo de aplicación de extracto de cianobacteria en suelo

El presente ensayo se diseñó con el objetivo de evaluar el efecto de la aplicación por riego de un extracto diluido de la cianobacteria nostocal

Hydrocoryne australis sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de *Hieracium pilosella* recolectadas en campo.

Se definió la aplicación mediante riego como vía principal de incorporación del extracto con el propósito de favorecer su contacto con el entorno inmediato del sistema radicular y minimizar pérdidas por deriva.

- **Diseño experimental**

A partir de las plantas de *H. pilosella* previamente recolectadas y acondicionadas, se evaluaron diferentes tratamientos mediante la aplicación de soluciones líquidas. Una pequeña fracción del extracto se aplicó mediante pulverización foliar sobre la biomasa aérea, mientras que el volumen principal se distribuyó directamente sobre el suelo a cada maceta.

El ensayo consistió en un total de siete tratamientos, con diez repeticiones por tratamiento. Cada repetición correspondió a una maceta individual que contenía una planta de *H. pilosella*. Las macetas fueron rotuladas y distribuidas bajo condiciones homogéneas dentro del invernadero.

Los tratamientos fueron diseñados para evaluar el efecto del extracto de la cianobacteria nostocal *Hydrocoryne australis* (sección 5.3.3) sobre el crecimiento y la reproducción de *H. pilosella*, considerando aplicaciones en distintas dosis y momentos. Paralelamente, se incorporó un tratamiento con herbicida comercial (*Picloram*) como control positivo, y un tratamiento control sin aplicación de productos, en el que se aplicó únicamente agua.

Las dosis de extracto utilizadas se fundamentan en experiencias previas desarrolladas por el colaborador experto, Lic. Gabriel R. Castro, en el marco del Proyecto SUC 230092, llevado adelante por la empresa *Spiral Blue SpA* (Chile). En dicho proyecto se evaluó la bioeficacia de un extracto peptídico cianobacteriano frente al hongo fitopatógeno *Diplodia seriata*, responsable de causar daños en madera y frutos de *Persea americana* (palta). En este contexto, ensayos *in vitro* e *in vivo* demostraron que la aplicación del extracto puro, bajo tres modalidades de aplicación (periférica, central o distribuida en toda la placa), alcanzó una alta efectividad biológica, con niveles de inhibición del crecimiento

micelial superiores al 99%. Las dosis utilizadas en estos ensayos fueron de 100, 200 y 300 µl de extracto por unidad experimental.

Asimismo, en pruebas comparativas de cribado biológico frente a otros extractos de control, se evaluaron volúmenes específicos de 200 y 400 µl con el objetivo de determinar, de manera cuantitativa, la concentración mínima inhibitoria y el porcentaje final de detención del micelio en el medio sólido (datos comunicados por el colaborador Lic. Gabriel R. Castro).

Cabe aclarar que, si bien estas dosis fueron originalmente definidas para el control del hongo antes mencionado, también se observaron efectos sobre otras especies, incluyendo la planta hemiparásita *Tristerix corymbosus*, lo que sugiere un potencial de acción más amplio del extracto.

En la Tabla 8 se presenta el detalle de los tratamientos aplicados en el ensayo, incluyendo concentraciones de extracto, los volúmenes utilizados y aditivos incorporados.

Tabla 8. Descripción de los tratamientos experimentales aplicados en el ensayo en condiciones controladas para la evaluación del efecto de extractos de *Hydrocoryne australis* sobre *Hieracium pilosella*, indicando dosis y aditivos.

CÓDIGO	TRATAMIENTO	DOSIS	ADITIVOS	TRATAMIENTO ADICIONAL
E1	Extracto dosis 1	2 ml de extracto en 97,9 ml de agua destilada	0,1 ml de coadyuvante	
E2	Extracto dosis 2	4 ml de extracto en 95,9 ml de agua destilada	0,1 ml de coadyuvante	
E3	Extracto dosis 3	6 ml de extracto en 93,9 mL de agua destilada	0,1 ml de coadyuvante	
E1-rep	Extracto dosis 1 reaplicación	2 ml de extracto en 97,9 ml de agua destilada	0,1 ml de coadyuvante	Reaplicación a las 4 semanas
E2-rep	Extracto dosis 2	4 ml de extracto	0,1 ml de	Reaplicación a las 4

	reaplicación	en 95,9 ml de agua destilada	coadyuvante	semanas
P	<i>Picloram</i>	2,53 ml en 100 ml	0,1 ml de coadyuvante	
C	Control			Solo se realizó riego con 100 ml de agua.

La aplicación de los tratamientos se realizó el 17 de noviembre de 2025, utilizando pulverizadores manuales previamente desinfectados. En una primera instancia se efectuó una pulverización foliar leve y, posteriormente se aplicó la totalidad del volumen correspondiente directamente sobre la superficie del suelo de cada maceta.

A partir de la aplicación, se implementó un seguimiento semanal durante 103 días, hasta finalizar el ensayo en el mes de marzo del año 2026. El monitoreo se basó en evaluaciones visuales y registros de síntomas y cambios morfológicos, incluyendo pigmentación foliar, desarrollo de botones florales, emisión de estolones, senescencia, entre otros. Este seguimiento se complementó con un registro fotográfico sistemático con frecuencia quincenal.

El riego se efectuó entre dos y tres veces por semana, aplicando un volumen inicial de 100 ml de agua por maceta, incrementándose posteriormente hasta 200 ml en función del aumento de las temperaturas dentro del invernadero. Si bien *Hieracium pilosella* no presenta elevados requerimientos hídricos, las condiciones de alta demanda evaporativa propias del ambiente controlado hicieron necesario un aporte regular de agua.

La temperatura del aire en el interior del invernadero fue monitoreada mediante un *datalogger* de cuatro canales, con registros cada una hora. Durante el mes de noviembre se registró una temperatura media de 15,7 °C, una máxima promedio de 24,6 °C y una mínima promedio de 7,7 °C. En el mes de enero se observó un aumento de las temperaturas máximas promedio, alcanzando los 30 °C. Hacia el final del ensayo, en el mes de marzo, se registró un descenso de las temperaturas máximas, con un promedio de 21 °C (Fig. 34).

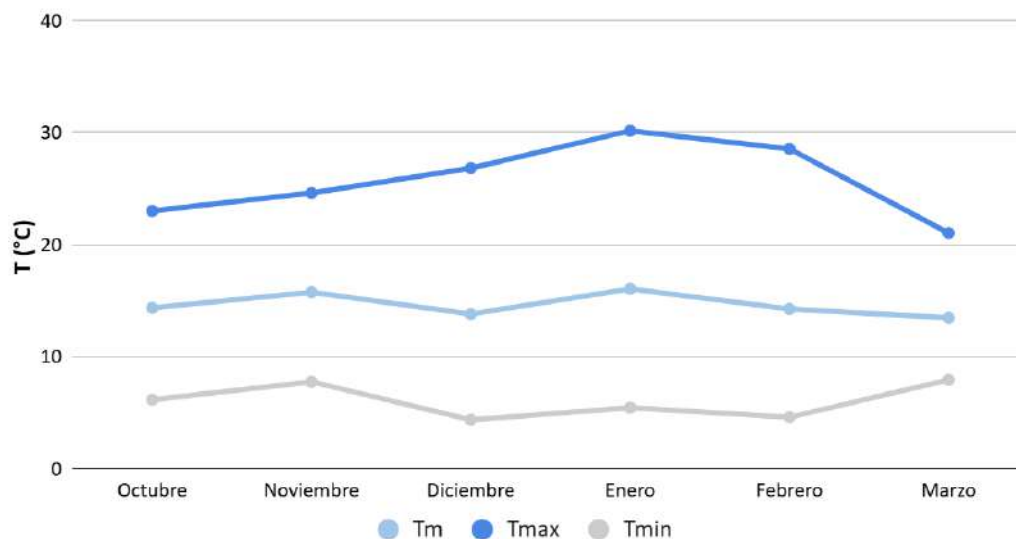


Figura 34. Evolución de la temperatura mínima, media y máxima (°C) registrada en el interior del invernadero de Estancia Maria Behety durante el período de desarrollo del ensayo, desde su inicio en el mes de octubre de 2025 hasta su finalización en marzo de 2026.

Se realizó la replicación de los tratamientos correspondientes a Extracto Dosis 1 (E1-rep) y Extracto Dosis 2 (E2-rep) el día 19 de diciembre de 2025, conforme al diseño experimental establecido.

La viabilidad de las semillas obtenidas de este ensayo se calculó y midió en un ensayo desarrollado en la sección 5.2.4.

● **Análisis estadístico**

En este experimento, la aparición de estolones, flores abiertas y flores maduras acumuladas se evaluó mediante modelos lineales generalizados mixtos (GLMM), ajustados con distribuciones Poisson o binomial negativa según correspondiera, utilizando el paquete *glmmTMB* en el entorno R. La variable tiempo (días desde el inicio del ensayo) y el tratamiento se consideraron como efectos fijos, mientras que cada maceta individual se consideró como efecto aleatorio.

Con el objetivo de evaluar el efecto de los tratamientos a lo largo del tiempo sobre la aparición de estolones y floración, se aplicó un diseño de medidas repetidas. Además, para evidenciar las diferencias entre los tratamientos en la variable peso seco de raíces, evaluada al final del ensayo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Previamente al ajuste de los modelos, se verificaron los supuestos de normalidad de los residuos y homogeneidad de las varianzas. Cuando correspondió, se aplicaron comparaciones a posteriori con el test de Tukey con un nivel de significancia de 0,05.

- **Resultados**

El análisis de la aparición de estolones no evidenció diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). No obstante, se observó un incremento en el número de estolones a lo largo del tiempo de evaluación (Tabla 18; ANEXO VIII).

En la figura 35 se observa la evolución del **número de estolones** a lo largo del ensayo; las curvas muestran tendencias similares, con valores que tienden a aproximarse entre sí a medida que avanza el tiempo.

A nivel descriptivo, el tratamiento R1 (extracto en dosis 1 con reaplicación) presentó los valores más altos de número de estolones hacia el final del período evaluado, alcanzando un promedio cercano a 5 estolones por planta, levemente superior a lo observado en el resto de los tratamientos (Fig. 35).

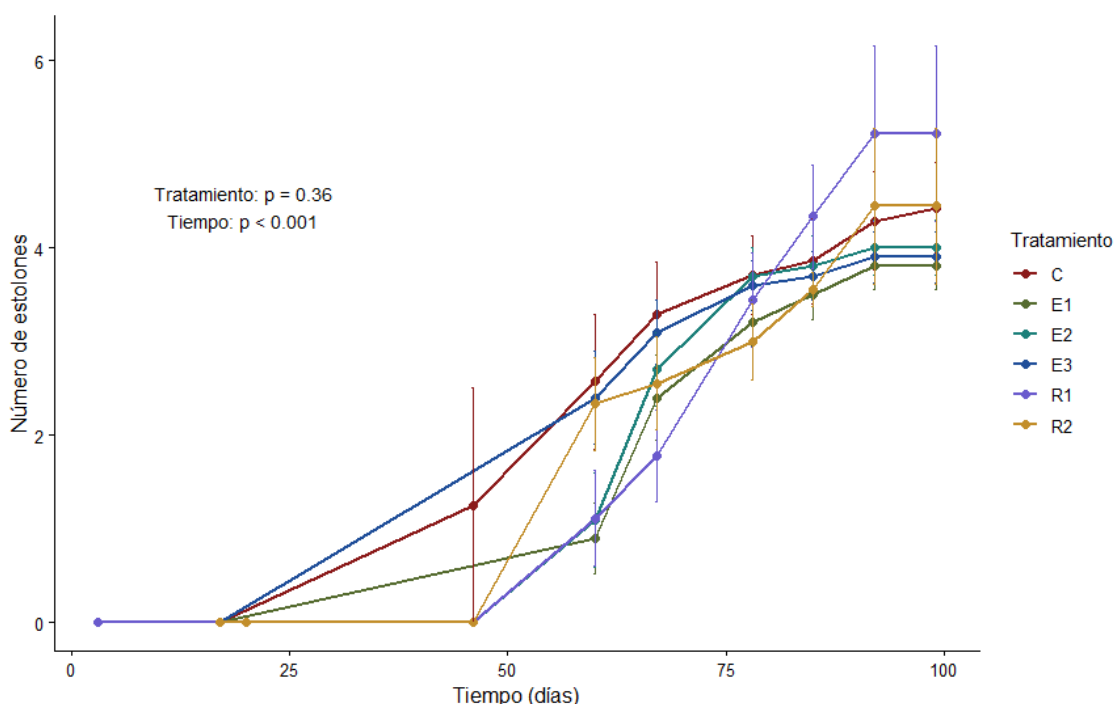


Figura 35. Evolución del número de estolones en *Hieracium pilosella* a lo largo del tiempo (días desde el inicio del ensayo), para los tratamientos **C** (control), **E1** (extracto en dosis 1), **E2** (extracto en dosis 2), **E3** (extracto en dosis 3), **R1** (extracto en dosis 1 con reaplicación) y **R2** (extracto en dosis 2 con reaplicación). Cada punto corresponde al valor medio por tratamiento y las barras representan el error estándar.

En relación a la **aparición y apertura floral**, se detectaron diferencias significativas entre tratamientos y en función del tiempo (Tabla 19; ANEXO VIII). El análisis *post hoc* indicó que el tratamiento E1 (extracto en dosis 1) presentó una mayor cantidad de flores abiertas respecto al control ($p = 0,0137$) y al tratamiento E3 (extracto en dosis 3) ($p = 0,0459$), sin registrarse diferencias significativas entre los demás tratamientos.

En la figura 36 se observa la dinámica temporal de la apertura de las flores para los distintos tratamientos. En todos los casos se observa un incremento progresivo hasta alcanzar un máximo aproximadamente entre los 60 y 70 días desde el inicio del ensayo, seguido por una disminución hacia el final del período evaluado.

El tratamiento R1 mostró un inicio más temprano del periodo de floración, registrándose la apertura de una sola flor abierta al inicio del ensayo. La mayor

concentración de flores abiertas se observó hacia fines de enero y principios de febrero, luego de pasados 50 días desde el inicio del ensayo.

El tratamiento E1 alcanzó los valores más elevados durante el pico de floración, mientras que el control y el tratamiento E3 presentaron una disminución más marcada en etapas posteriores. Los tratamientos R1, R2 y E2 mostraron comportamientos intermedios, sin diferencias pronunciadas en la tendencia general en el tiempo evaluado.

Cada punto representa el valor medio del número de flores abiertas por tratamiento para cada momento de evaluación, sin reflejar el total de flores abiertas para el ciclo reproductivo completo.

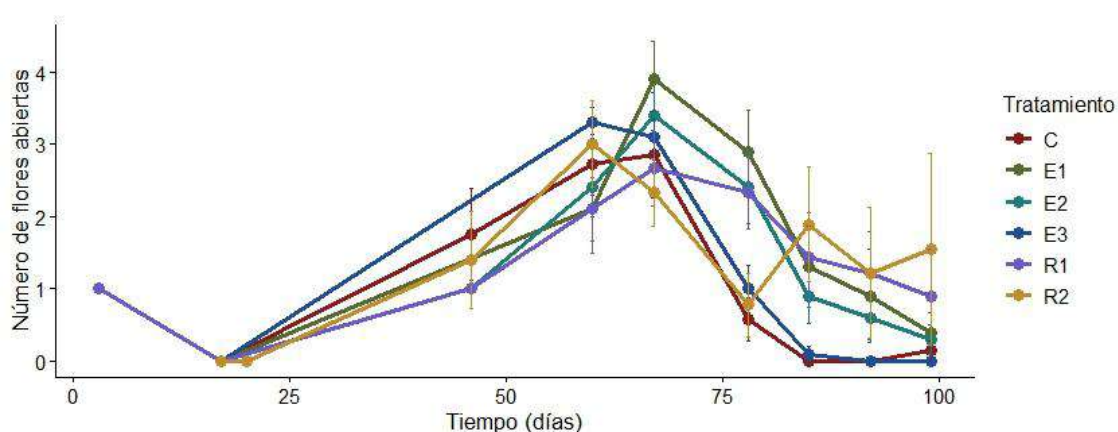


Figura 36. Evolución del número de flores abiertas en *Hieracium pilosella* a lo largo del tiempo (días desde el inicio del ensayo), para los tratamientos **C** (control), **E1** (extracto en dosis 1), **E2** (extracto en dosis 2), **E3** (extracto en dosis 3), **R1** (extracto en dosis 1 con reaplicación) y **R2** (extracto en dosis 2 con reaplicación). Cada punto corresponde al valor medio por tratamiento y las barras representan el error estándar.

Se consideraron como **flores maduras** aquellas que alcanzaron la etapa de fructificación, con desarrollo completo y exposición de las semillas. El análisis se basó en la cantidad acumulada de flores maduras a lo largo del tiempo, por tratamiento. En este sentido, se registró un incremento progresivo en el número de flores maduras en función del tiempo transcurrido del ensayo.

Por otro lado, los tratamientos mostraron diferencias significativas entre sí (Tabla 20; ANEXO VIII). El análisis indicó que los valores medios acumulados de flores maduras fueron mayores en los tratamientos R1 y E1, seguidos por R2 y E2, mientras que el control y E3 presentaron los valores más bajos.

Sin embargo, las comparaciones múltiples indicaron diferencias significativas únicamente entre los tratamientos E3 y R1, mientras que el resto de los tratamientos presentan valores intermedios sin diferencias estadísticas entre sí.

En la figura 37 se presenta la variación del número acumulado de flores maduras por tratamiento a lo largo del tiempo. El inicio de la etapa de fructificación se observa a partir de aproximadamente los 60 días desde el inicio del ensayo, a partir de los cuales se registra un incremento sostenido en el número de flores maduras en todos los tratamientos.

Si bien hacia el final del ensayo los valores acumulados tienden a ser similares entre tratamientos, se observan diferencias en la dinámica de acumulación a lo largo del tiempo. En particular, los tratamientos E1 y R1 presentan valores acumulados ligeramente superiores en las etapas intermedias del ensayo. Los tratamientos R2 y E2 muestran una dinámica intermedia, mientras que el control y el tratamiento E3 presentan un incremento más tardío.

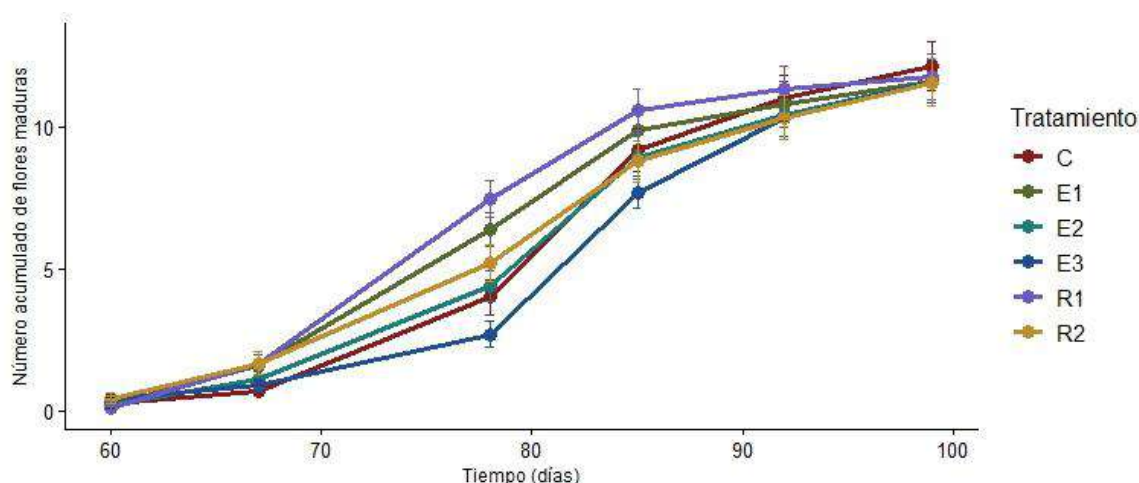


Figura 37. Evolución del número acumulado de flores maduras en *Hieracium pilosella* a lo largo del tiempo (días desde el inicio del ensayo), para los tratamientos **C** (control), **E1** (extracto en dosis 1), **E2** (extracto en dosis 2), **E3** (extracto en dosis 3), **R1** (extracto en dosis 1 con reaplicación) y **R2** (extracto en dosis 2 con reaplicación). Cada punto corresponde al valor medio por tratamiento y las barras representan el error estándar.

Finalmente, al concluir el ensayo se evaluó el **peso seco de raíces** en cinco plantas por tratamiento. Se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). Sin embargo, las comparaciones múltiples indicaron que R2 presentó valores mayores en relación con algunos tratamientos (E1 y R1), pero no se diferenció significativamente del control (C).

En la figura 38 se presenta la distribución del peso seco de raíces por tratamiento. El tratamiento R2 presenta la mayor mediana y comparte grupo estadístico con otros tratamientos, lo que indica que las diferencias no son coincidentes.

Los tratamientos C, E2 y E3 presentan valores intermedios sin diferencias significativas entre sí, mientras que E1 y R1 registran los valores más bajos, agrupados en una categoría diferente.

Se observa variabilidad entre tratamientos, pero los resultados no evidencian un patrón consistente que permita atribuir un efecto claro del agregado de extractos sobre el peso seco de raíces.

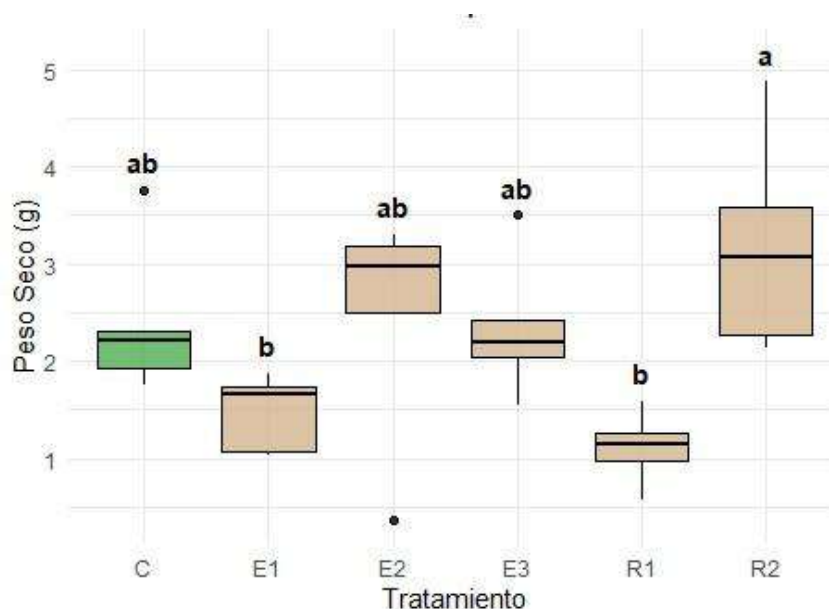


Figura 38. Peso seco de raíces (g) en plantas de *Hieracium pilosella* para los tratamientos **C** (control), **E1** (extracto en dosis 1), **E2** (extracto en dosis 2), **E3** (extracto en dosis 3), **R1** (extracto en dosis 1 con reaplicación) y **R2** (extracto en dosis 2 con reaplicación). La línea central de cada caja indica la mediana, los bordes representan el

rango intercuartílico y los puntos los valores atípicos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Además de los análisis estadísticos realizados a partir de los datos obtenidos en los seguimientos semanales, se registraron los cambios morfológicos a través de la identificación de sintomatología visual.

A los seis días posteriores a la aplicación de los tratamientos, comenzaron a observarse efectos visibles en las plantas sometidas al herbicida Picloram (P). Los síntomas incluyeron deformaciones foliares, crecimiento anómalo y clorosis generalizada, consistentes con la acción de herbicidas hormonales (Fig 39.B). El 4 de diciembre de 2025 se registró la muerte de la totalidad de las plantas correspondientes a este tratamiento.

En el tratamiento control (C) se observó una clorosis foliar que se extendió desde los bordes hacia el centro de las hojas (Fig. 39.B), en algunos casos, esto fue acompañado por una posterior senescencia foliar. A partir de estas observaciones, se recolectaron muestras foliares para posterior evaluación bajo microscopio (ver sección 5.2.5). En este mismo tratamiento, el 12 de diciembre de 2025 (25 días desde el inicio del ensayo), se registró la muerte de dos plantas.



Figura 39. Plantas de *Hieracium pilosella* bajo distintos tratamientos experimentales. **A.** Planta en estado de senescencia a los 14 días post aplicación de Picloram (P). **B.** Planta

correspondiente al tratamiento control (C) con clorosis foliar, evaluada a los 17 días desde el inicio del ensayo.

Las plantas tratadas con extracto de *H. australis* no presentaron síntomas visibles de afectación durante las primeras semanas posteriores a la aplicación. Sin embargo, tras la reaplicación de los tratamientos (E1-rep y E2-rep), se registraron en algunas plantas episodios de clorosis foliar, con características visuales similares a las observadas en las plantas control (Fig. 40).



Figura 40. Plantas de *Hieracium pilosella* bajo distintos tratamientos experimentales. **A.** Planta correspondiente al tratamiento E1 con reaplicación, evidenciando clorosis y marchitamiento foliar. **B.** Planta correspondiente al tratamiento E2 con reaplicación, evidenciando clorosis apical. Ambas imágenes corresponden a los 28 días posteriores a la reaplicación.

En el tratamiento E1-rep, 7 de las 10 plantas evaluadas presentaron clorosis, mientras que en el tratamiento E2-rep se registraron 9 plantas afectadas. Si bien la clorosis no implicó la pérdida total de la superficie foliar, las hojas afectadas presentan una disminución de su capacidad fotosintética, debido al daño en los pigmentos involucrados en este proceso, fundamental para el crecimiento de las plantas.

La respuesta fue heterogénea entre tratamientos y réplicas. En los tratamientos E1, E2 y E3 (sin reaplicación), las plantas mantuvieron en general

una coloración verde y aspecto normal durante el período evaluado, sin evidencias claras de afectación. Estas condiciones difieren de lo observado en el control.

Al finalizar el ensayo, la mayoría de las plantas tratadas presentaron una coloración homogénea y generalizada, con escasa presencia de síntomas cloróticos, evidenciando un buen estado sanitario.

5.2.3. Ensayo de aplicación foliar de extracto de cianobacteria

El presente ensayo tuvo como objetivo principal evaluar la respuesta de *Hieracium pilosella* frente a la aplicación foliar de extracto de la cianobacteria *Hydrocoryne australis*, como vía alternativa de incorporación del compuesto bioactivo.

La aplicación foliar representa una de las vías más eficientes para la acción de compuestos con potencial herbicida, ya que permite el contacto directo con los tejidos aéreos de la planta, posibilitando su absorción a través de la cutícula y los estomas, y facilitando tanto una translocación sistémica como un efecto de contacto.

La decisión de implementar un ensayo de aplicación foliar, complementario al de incorporación en suelo, se fundamentó en la necesidad de inferir el modo de acción del extracto sobre la arquitectura de la roseta de *H. pilosella*. Considerando que esta especie presenta una densa pilosidad y un hábito de crecimiento rastrero, resulta relevante, verificar si los compuestos bioactivos son capaces de superar dichas barreras e inducir un estrés metabólico efectivo.

● Diseño experimental

El ensayo se estructuró en seis tratamientos: tres dosis de extracto aplicadas en forma única (E1: dosis 1, E2: dosis 2 y E3: dosis 3) y dos tratamientos con reaplicación (E1-rep y E2-rep) (Tabla 9), corresponden a las dosis 1 y 2, respectivamente. Cada tratamiento contó con tres réplicas, y cada

unidad experimental consistió en una maceta individual con una planta de *H. pilosella*.

Tabla 9. Descripción de los tratamientos implementados en el ensayo en invernadero para evaluar el efecto de extractos de *Hydrocoryne australis* sobre *Hieracium pilosella*, incluyendo dosis.

CÓDIGO	TRATAMIENTO	DOSIS	TRATAMIENTO ADICIONAL
E1	Extracto dosis 1	2 ml de extracto	
E2	Extracto dosis 2	4 ml de extracto	
E3	Extracto dosis 3	6 ml de extracto	
E1-rep	Extracto dosis 1 reaplicación	2 ml de extracto	Reaplicación a las 4 semanas
E2-rep	Extracto dosis 2 reaplicación	4 ml de extracto	Reaplicación a las 4 semanas

● Montaje del ensayo

La instalación del ensayo se realizó en el invernadero de la Agencia de Extensión Rural INTA Ushuaia.

Las plantas utilizadas fueron recolectadas en campo y previamente acondicionadas en condiciones controladas, siguiendo el mismo procedimiento descrito en la sección 5.2.1. Las macetas fueron distribuidas bajo condiciones homogéneas de temperatura e iluminación, procurando minimizar gradientes ambientales dentro del espacio experimental.

● Metodología de aplicación y seguimiento del ensayo

La aplicación de los tratamientos se realizó el 19 de diciembre de 2025, mediante pulverización directa sobre la superficie foliar, utilizando pulverizadores

manuales (capacidad: 5ml) previamente desinfectados. Se procuró lograr una cobertura homogénea del área aérea de cada planta.

El seguimiento del ensayo se realizó mediante evaluaciones periódicas (Fig. 41), registrándose cambios morfológicos y síntomas visibles, tales como clorosis, necrosis, debilitamiento, desarrollo de estructuras reproductivas (botones florales y flores), emisión de estolones y senescencia. Este monitoreo se complementó con registros fotográficos sistemáticos.



Figura 41. Esquema temporal de los ensayos realizados para evaluar el efecto del extracto de la cianobacteria *Hydrocoryne australis* sobre *Hieracium pilosella*. Los colores diferencian los tratamientos experimentales: el color verde se corresponde al ensayo número 1 (aplicación del extracto al suelo), mientras que el color azul referencia al ensayo 2 (aplicación foliar del extracto).

La viabilidad de las semillas obtenidas de este ensayo se calculó y midió en un ensayo desarrollado en la sección 5.2.4.

- **Análisis estadístico**

En este experimento, la aparición de estolones y botones florales se evaluó a través modelos lineales generalizados mixtos (GLMM), utilizando distribuciones Poisson o binomial negativa según correspondiera, mediante el paquete *glmmTMB* en el entorno R.

Las variables *tiempo* (días desde el inicio del ensayo) y *tratamiento* se consideraron como efectos fijos, mientras que cada maceta individual se consideró como efecto aleatorio.

Para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos a lo largo del tiempo, se utilizó un diseño de medidas repetidas. Además, el peso seco de raíces, medido al finalizar el ensayo, se analizó mediante un ANOVA de una vía, seguido de comparaciones *a posteriori* con el test de Tukey con un nivel de significancia de 0,05.

Previo al análisis, se verificaron los supuestos de normalidad de los residuos y homogeneidad de varianzas. Las pruebas post-hoc se aplicaron únicamente en los casos en que el ANOVA evidenció diferencias significativas.

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre las hojas, la variable respuesta se expresó como el porcentaje de hojas afectadas respecto al total por planta. Debido a problemas de convergencia asociados al ajuste de modelos binomiales mixtos, se aplicó una transformación arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción ($y' = \arcsin(\sqrt{p})$). Posteriormente, los datos fueron analizados mediante modelos lineales mixtos (LMM), considerando como efectos fijos al tratamiento y a la condición de aplicación (pre y post replicación), e incorporando la maceta como efecto aleatorio.

- **Resultados**

Tras la aplicación de extracto, se registró una respuesta fenotípica temprana en los ejemplares de *Hieracium pilosella*, observándose los primeros signos de fitotoxicidad a las 72 horas posteriores al inicio del ensayo. A los siete días de iniciado el ensayo, todas las plantas tratadas evidenciaron síntomas, con

proporciones de hojas afectadas que variaron entre 25% (E 3) hasta un 72% (E 1) (Fig. 42).

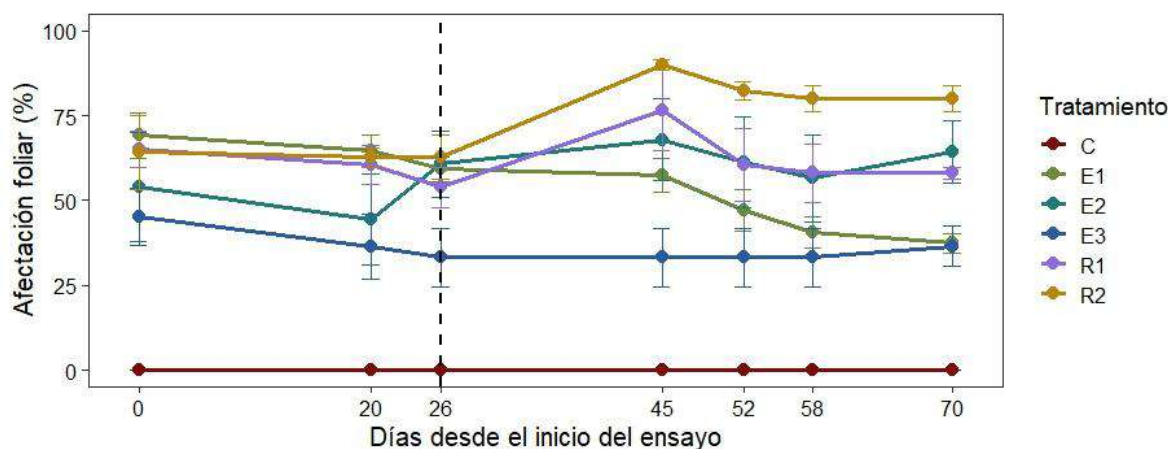


Figura 42. Evolución del porcentaje de afectación en hojas de *Hieracium pilosella* a lo largo del tiempo(días desde el inicio del ensayo), para los tratamientos **C** (control), **E1** (extracto en dosis 1), **E2** (extracto en dosis 2), **E3** (extracto en dosis 3), **R1** (extracto en dosis 1 con reaplicación) y **R2** (extracto en dosis 2 con reaplicación). . Los valores representan medias $\pm$ error estándar. La línea vertical punteada representa el momento de reaplicación del extracto de cianobacterias, realizada el 21/01/26.

En términos generales, la evolución temporal de la **afección foliar** (Fig. 42) mostró patrones diferentes entre tratamientos, particularmente a partir de la reaplicación del extracto. Durante la fase inicial del ensayo (días 0-20), los tratamientos E1 y E3 presentaron niveles moderados de afectación foliar (45-70%), mientras que las plantas sin tratamiento no mostraron afección foliar. Luego de 26 días, previo a la reaplicación del extracto, se observó una leve disminución o estabilización en la proporción de hojas afectadas en varios tratamientos, lo que sugiere una posible recuperación parcial o adaptación a las condiciones.

Sin embargo, tras la reaplicación realizada el 21/01/2026 en R1 y R2, se evidenció un cambio en el patrón, con un incremento marcado de la afección foliar, particularmente en estos tratamientos (85-90% en R2 y 70-75% en R1), y en menor medida en E2, lo que sugiere un efecto fitotóxico potenciado, posiblemente acumulativo. Hacia la etapa final (70 días de iniciado el ensayo), se registró una estabilización o leve disminución en la proporción de hojas

afectadas, aunque persistieron diferencias entre tratamientos, con R2 mostrando el mayor daño y E3 los valores más bajos (35-40%)(tabla 21, ANEXO VI). Esta reducción podría asociarse tanto a procesos de recuperación parcial como a la abscisión de hojas severamente dañadas.

En los casos más severos, el daño comprometió hasta el 60% de la superficie foliar, manifestándose como clorosis marginal pronunciada, debilitamiento estructural de la cutícula y aparición de puntos necróticos (Fig. 43). Hacia el día 19, si bien disminuyó la proporción de hojas afectadas en cada tratamiento, la severidad del daño foliar aumentó en hojas individuales, alcanzando un 85% de superficie afectada por planta en algunos ejemplares.

Los resultados obtenidos sugieren que las hojas son los tejidos más dañados por la aplicación foliar del extracto de cianobacteria nostocal mostrando desde clorosis marginal hacia clorosis generalizada y, en casos extremos, necrosis total y muerte del tejido foliar (Fig. 44 y 45).



Figura 43. Sintomatologías foliares registrada en *Hieracium pilosella* tras la aplicación del extracto de *Hydrocoryne australis*. **A.** Debilitamiento estructural de la cutícula. **B.** Aparición de puntos necróticos. **C.** Clorosis marginal. **D.** Necrosis apical.



Figura 44: Evolución temporal de la clorosis foliar en plantas de *Hieracium pilosella* luego de la aplicación del extracto de *Hydrocoryne australis*. **A.** 7 días post aplicación. **B.** 14 días post aplicación.



Figura 45. Hoja de *Hieracium pilosella* con necrosis total a los 14 días posteriores a la aplicación foliar de 4 ml de extracto de *Hydrocoryne australis*.

En cuanto al efecto de la aplicación foliar del extracto de cianobacterias sobre el **desarrollo de estolones**, se observó una disminución significativa a lo largo del tiempo en el número de estolones en las plantas tratadas respecto al control. (tabla 22, ANEXO VI).

La dinámica temporal del número de estolones (Figura 46) mostró un incremento progresivo hasta valores máximos intermedios, seguido por un cambio de tendencia asociado a la reaplicación. En particular, tras la reaplicación en los tratamientos R1 y R2, se observó una disminución en el número de estolones, probablemente vinculada a procesos de senescencia inducidos por el estrés.

En cuanto al nivel de afección registrado, la reaplicación del extracto produjo un efecto parcial sobre estas estructuras, afectando sólo una proporción de los estolones presentes, siendo el tratamiento R2 el que evidenció el mayor grado de afección. No obstante, en aquellos estolones que resultaron afectados, el impacto fue severo, provocando su deterioro y, en muchos casos, la muerte del órgano reproductivo (Figura 47.A). Este patrón, consistente con lo observado en el daño foliar, sugiere un efecto fitotóxico dependiente tanto del tratamiento como de la exposición reiterada.

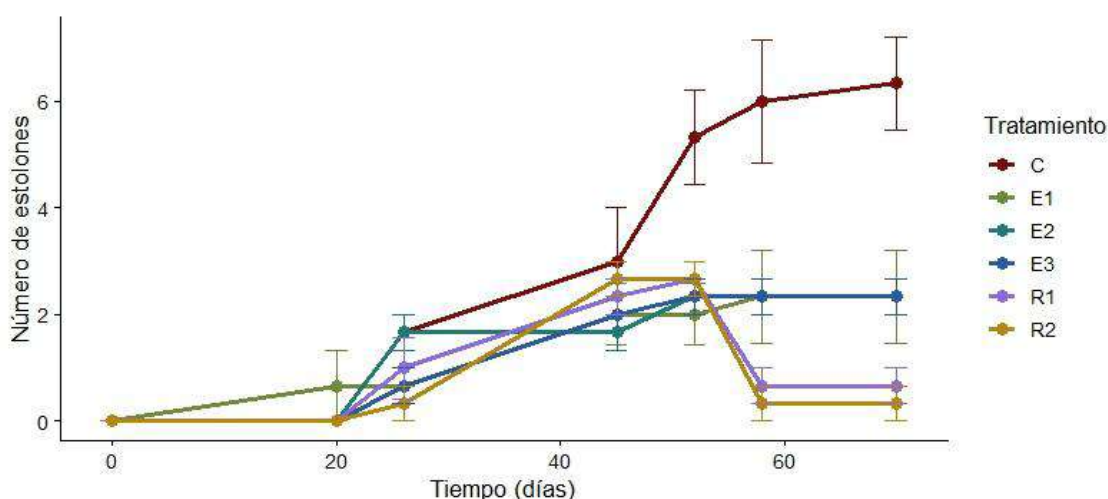


Figura 46. Evolución del número de estolones de *Hieracium Pilosella* a lo largo del tiempo (días desde el inicio del ensayo), para los tratamientos **C** (control), **E1** (extracto en dosis 1), **E2** (extracto en dosis 2), **E3** (extracto en dosis 3), **R1** (extracto en dosis 1 con reaplicación) y **R2** (extracto en dosis 2 con reaplicación). Los valores representan medias $\pm$ error estándar.

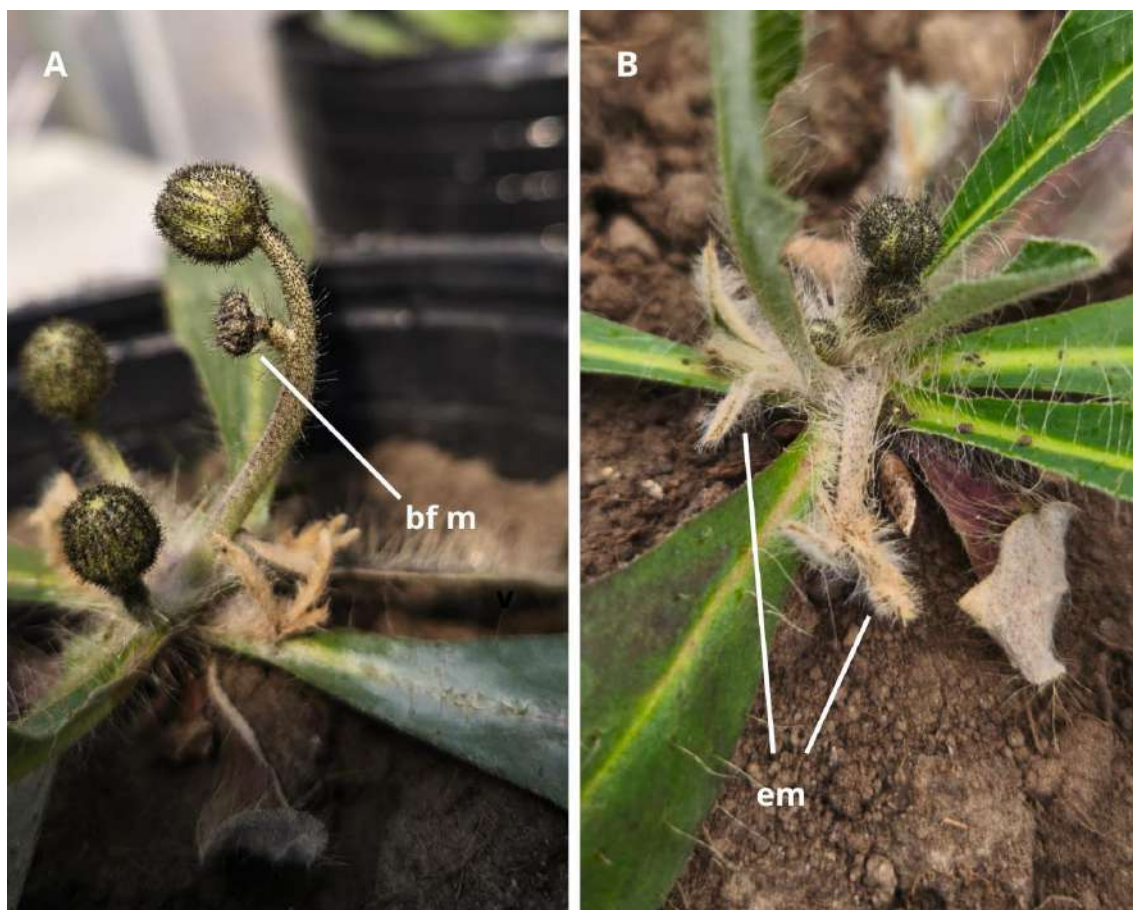


Figura 47. Fotografías de estructuras reproductivas de *Hieracium pilosella* afectadas por la aplicación del extracto de *Hydrocoryne australis*. **A.** Afección sobre botones florales. **B.** Afección sobre estolones. **bfm**: botón floral muerto; **em**: estolones muertos.

Por otro lado, la **producción de botones florales** varió significativamente entre tratamientos y en el tiempo, evidenciando un incremento general a medida que avanzó el ensayo (tabla 23, ANEXO VI). El análisis post-hoc (test de Tukey) indicó que el tratamiento C (control) presentó una mayor cantidad de botones florales que E2, R1 y R2, mientras que no se observaron diferencias significativas con E1 y E3. Entre los tratamientos con extracto, no se detectaron diferencias significativas.

En la figura 48 se presenta la dinámica temporal del número de botones florales. Se evidenciaron patrones contrastantes entre tratamientos. En el control se observó un pico temprano de producción, seguido por una disminución gradual asociada a la transición fenológica hacia la floración. Los tratamientos E1, E2 y E3 presentaron un patrón similar, con máximos hacia la mitad del

período experimental (50 días) y un descenso posterior, sin evidencias claras de efectos negativos marcados del extracto.

Por otra parte, los tratamientos con reaplicación (R1 y R2) mostraron una disminución anticipada en el número de botones florales respecto de los demás tratamientos, evidenciada inmediatamente después del evento de reaplicación. Este comportamiento sugiere un efecto negativo adicional asociado a la exposición repetida, que interrumpe el desarrollo normal de las estructuras reproductivas. En este sentido, la reducción observada puede vincularse, al menos en parte, con la mortalidad de botones florales registrada (figura 47.B y 49).

El análisis del **número final de estructuras reproductivas** (Fig. 49) refuerza esta tendencia. El tratamiento control presentó la mayor cantidad de flores abiertas y la menor proporción de botones muertos, mientras que los tratamientos con extracto evidenciaron una reducción en la cantidad de flores desarrolladas. En particular, R1 y R2 mostraron una mayor proporción de estructuras afectadas y una menor conversión a flores abiertas, indicando un impacto negativo sobre el éxito reproductivo. En aquellos botones afectados, el daño fue severo, conduciendo frecuentemente a su muerte.

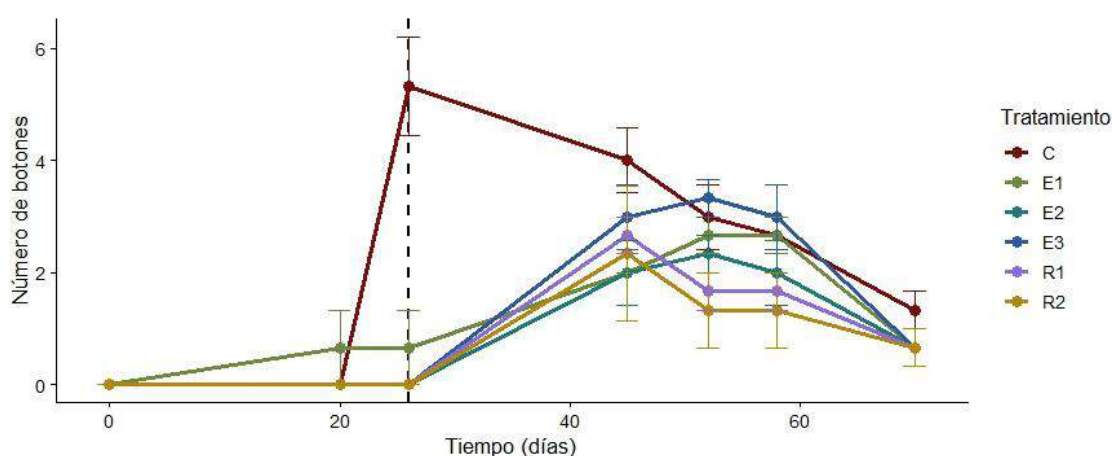


Figura 48. Evolución del número de botones florales de *Hieracium pilosella* largo del tiempo (días desde el inicio del ensayo), para los tratamientos **C** (control), **E1** (extracto en dosis 1), **E2** (extracto en dosis 2), **E3** (extracto en dosis 3), **R1** (extracto en dosis 1 con reaplicación) y **R2** (extracto en dosis 2 con reaplicación). Cada punto corresponde al valor medio por tratamiento y las barras representan el error estándar. Los valores

representan medias $\pm$ error estándar. La línea punteada representa el momento de reaplicación de extractos.

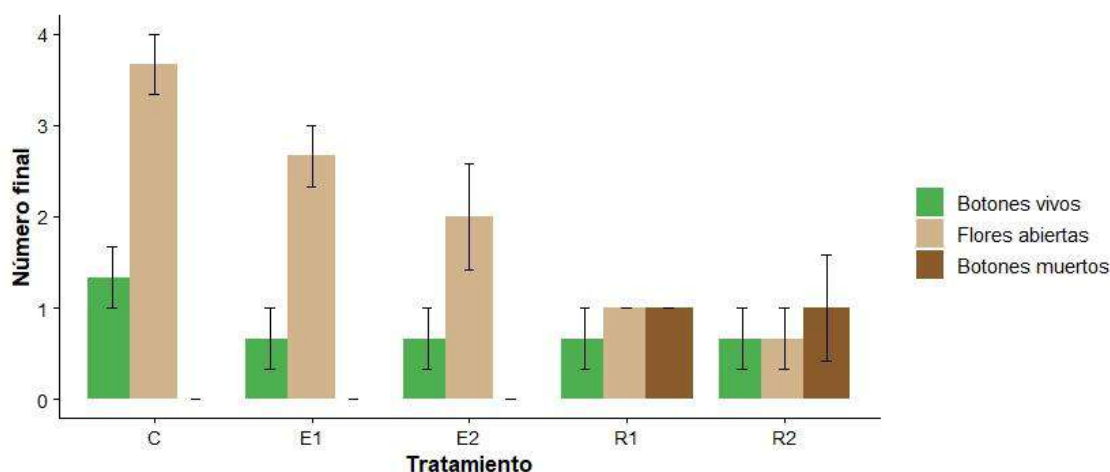


Figura 49. Número final de botones vivos, máximo acumulado de flores abiertas y botones muertos de *Hieracium pilosella* según tratamiento. Las barras verdes representan botones vivos, las barras marrón claro corresponden a flores abiertas y las barras marrón oscuro a botones muertos. **C:** control; **E1 y E2:** tratamientos con aplicación del extracto en dosis 1 y dosis 2, respectivamente; **R1 y R2:** tratamientos con reaplicación del extracto en dosis 1 y dosis 2, respectivamente. Los valores se expresan como medias $\pm$ error estándar.

En lo que respecta al **número de flores abiertas y maduras** (Fig. 50) , se observó que el control alcanzó los valores más altos tanto de flores abiertas como de flores que completaron su maduración. Los tratamientos con aplicación única (E1, E2 y E3) mostraron valores intermedios, mientras que los tratamientos con reaplicación presentaron las menores cantidades. Además, el proceso completo de maduración floral y formación de frutos solo se evidenció de manera consistente en el control y, en menor medida, en algunos tratamientos sin reaplicación, mientras que en R1 y R2 este proceso se vio interrumpido.

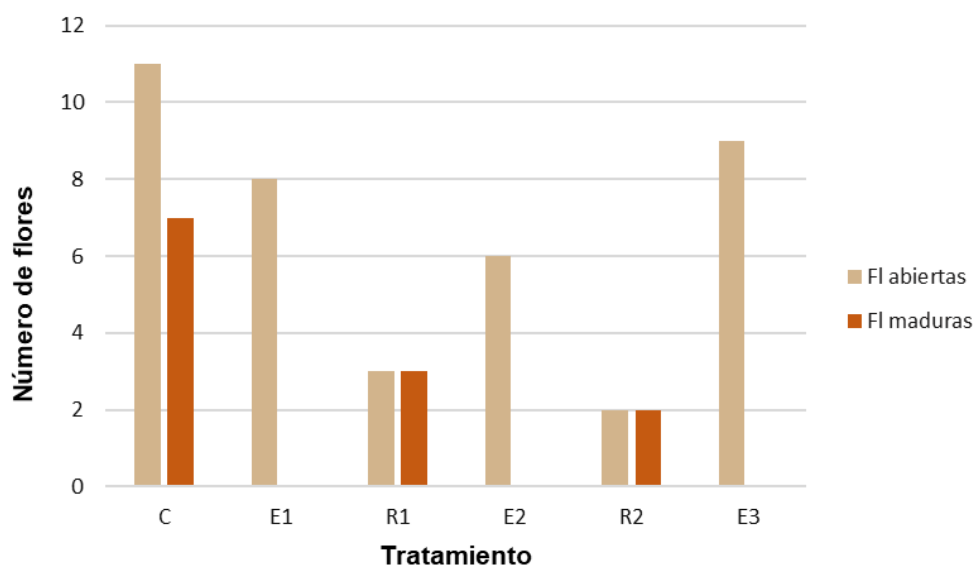


Figura 50. Número total de flores abiertas y flores maduras de *Hieracium pilosella* según tratamiento, registrado el 6 de marzo de 2026. Las barras marrón claro representan flores abiertas y las barras marrón oscuro corresponden a flores maduras. C: control; R1: tratamiento con reaplicación del extracto en dosis 1; R2: tratamiento con reaplicación del extracto en dosis 2.

Una vez dado por finalizado el ensayo, se evaluó el **peso seco de raíces**, en tres plantas por tratamiento. El análisis de varianza (ANOVA) evidenció diferencias significativas entre tratamientos. La prueba post-hoc (Tukey) mostró que los tratamientos E3 y R2 presentaron valores significativamente menores respecto al control, mientras que no se detectaron diferencias significativas entre los demás tratamientos .

El análisis de la distribución de los datos (Fig. 51) permite observar que el tratamiento control presentó los mayores valores de peso seco y una baja variabilidad, lo que indica un desarrollo radicular normal. En contraste, E3 mostró los valores más bajos y una distribución concentrada en rangos reducidos, evidenciando una fuerte inhibición del crecimiento radicular. El tratamiento R2 también presentó valores bajos, aunque con menor dispersión que E3, lo que sugiere un efecto negativo sostenido asociado a la reaplicación.

Los tratamientos E1, E2 y R1 exhibieron valores de peso seco de raíces moderados y mayor variabilidad, lo que indica respuestas más heterogéneas entre individuos. En particular, E2 mostró una mayor dispersión de los datos, lo

que podría reflejar una respuesta diferencial al extracto dependiendo del estado fisiológico de las plantas.

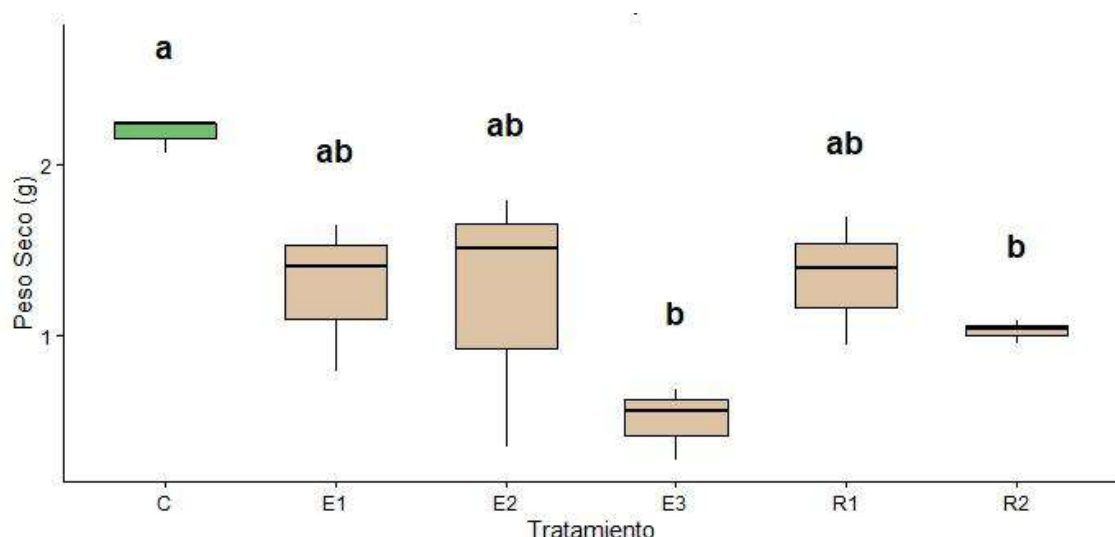


Figura 51. Peso seco de raíces de plantas de *Hieracium pilosella* según tratamiento. **C:** control; **E1, E2 y E3:** tratamientos con aplicación del extracto en dosis 1, 2 y 3, respectivamente; **R1 y R2:** tratamientos con reaplicación del extracto en dosis 1 y 2, respectivamente. La línea central de cada caja indica la mediana y las cajas representan el rango intercuartílico. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

5.2.4. Ensayo de viabilidad

Con el objetivo de evaluar el efecto del extracto obtenido de *Hydrocoryne australis* sobre la viabilidad de semillas de *Hieracium pilosella*, se llevó a cabo un ensayo de germinación utilizando semillas obtenidas a partir de las plantas tratadas en los ensayos descritos en las secciones 5.2.2 y 5.2.3.

- **Diseño experimental**

Se estableció un diseño experimental en el cual los tratamientos se definieron en función del ensayo de procedencia de las semillas y del tratamiento previamente aplicado a las plantas madre. La descripción detallada de los tratamientos evaluados se presenta en la Tabla 10.

Tabla 10. Descripción de los tratamientos evaluados en el ensayo de viabilidad de semillas de *Hieracium pilosella*, en función del origen de las semillas y del tipo de aplicación del extracto de la cianobacteria nostocal *Hydrocoryne australis*.

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
MB. E1	Semillas provenientes de plantas del tratamiento con dosis 1 del ensayo montado en la Estancia Maria Behety.
MB.E2	Semillas provenientes de plantas del tratamiento con dosis 2 del ensayo montado en la Estancia Maria Behety
MB.E3	Semillas provenientes de plantas del tratamiento con dosis 3 del ensayo montado en la Estancia Maria Behety
MB. E1-Rep	Semillas provenientes de plantas del tratamiento con dosis 1 y reaplicación de extracto, del ensayo montado en Ushuaia
MB. E2-Rep	Semillas provenientes de plantas del tratamiento con dosis 2 y reaplicación de extracto, del ensayo montado en Ushuaia
USH-E1-Rep	Semillas provenientes de plantas del tratamiento con dosis 1 y reaplicación de extracto, del ensayo montado en Ushuaia
USH-E2-Rep	Semillas provenientes de plantas del tratamiento con dosis 2 y reaplicación de extracto, del ensayo montado en Ushuaia
C	Semillas control (agua destilada estéril sin agregado de extractos)

Nota: Los tratamientos **MB** corresponden a aplicaciones del extracto mediante riego (aplicación al suelo), mientras que los tratamientos **USH** corresponden a aplicaciones foliares.

Se prepararon 3 réplicas por tratamiento, utilizando placas de Petri estériles de 15 cm de diámetro como unidades experimentales. En cada placa se colocaron 20 semillas, totalizando 480 unidades de análisis.

Se consideraron como “semillas viables” aquellas en las que se evidencio la germinación mediante el desarrollo del hipocotilo (Fig. 52)

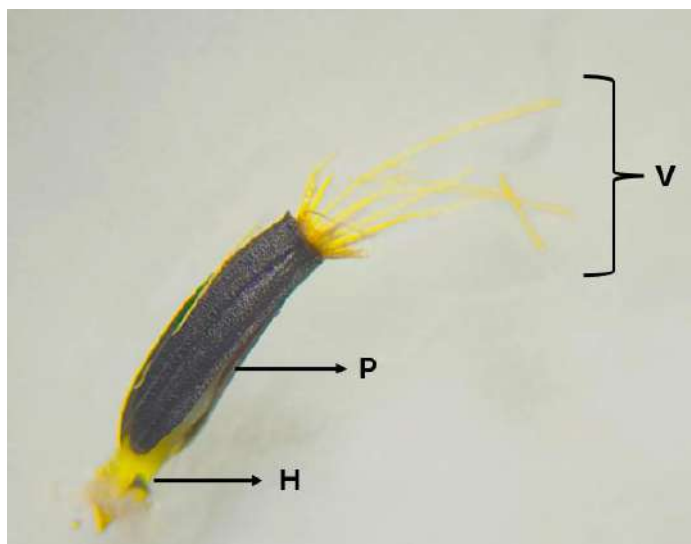


Figura 52: Semilla de *Hieracium pilosella* al inicio de la germinación. Las letras (V, P y H) indican diferencias estructurales visibles del fruto y de la semilla. **V:** Vilano. **P:** Pericarpo. **H:** Hipocótilo.

• Tratamiento previo de las semillas

Previo al inicio del ensayo, las semillas fueron sometidas a un proceso de desinfección superficial con el fin de minimizar interferencias derivadas de contaminaciones microbianas. Para ello, se realizó una inmersión en etanol al 70% durante 1 minuto con agitación suave, seguida de un tratamiento con hipoclorito de sodio al 2% durante 10 minutos. Posteriormente, las semillas fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril para eliminar los residuos de los agentes desinfectantes.

De igual manera, las placas de Petri y el resto de los materiales empleados fueron previamente esterilizados, garantizando que los efectos observados se atribuyen exclusivamente a la acción de los tratamientos evaluados.

- **Montaje**

El ensayo se realizó en las instalaciones de la AER INTA Ushuaia (Fig. 53), en un espacio acondicionado para el trabajo experimental con material vegetal y bajo condiciones óptimas de humedad, luz y temperatura.

Cada unidad experimental consistió en una placa de Petri (diámetro:15 cm), preparada con dos capas de papel de filtro estéril humedecidas con 2 ml de agua estéril. En cada placa se distribuyeron uniformemente 20 semillas sobre el sustrato húmedo.

Las placas fueron selladas con *Parafilm* para evitar pérdidas de humedad y se incubaron a 25°C bajo condiciones de iluminación ambiental estable. El ensayo se desarrolló durante un período de 7 días, registrándose la germinación acumulada.



Figura 53. Preparación de las unidades experimentales (placas de Petri) para el ensayo de viabilidad en semillas de *Hieracium pilosella*.

● Resultados

En la figura 54 se observa que el porcentaje de germinación de semillas de *H. pilosella* varió entre tratamientos. En general, los valores más altos se registraron en el control (95%) y en los tratamientos con aplicación del extracto al suelo (B), cuyos porcentajes oscilaron entre el 70 y 90%, sin diferencias significativas entre ellos.

En contraste, los tratamientos con aplicación foliar (USH) mostraron una reducción más marcada en la germinación. Particularmente, el tratamiento correspondiente a dosis 2 con reaplicación (R2-USH) presentó un descenso abrupto en el porcentaje de germinación (10%), siendo el único que difirió significativamente del resto de los tratamientos. El tratamiento R1-USH también evidenció una disminución respecto de los tratamientos MB y el control (50-55%), aunque sin diferencias significativas.

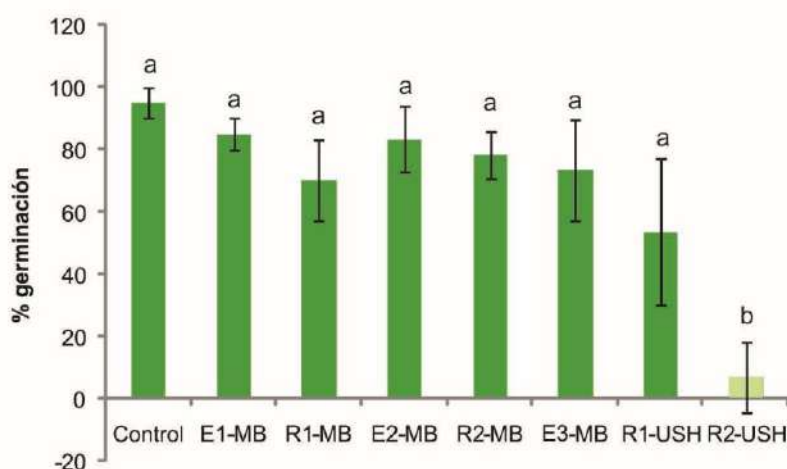


Figura 54. Porcentaje de germinación de semillas de *Hieracium pilosella* según tratamiento de origen. **Control:** semillas sin exposición al extracto. **MB:** semillas provenientes de plantas tratadas mediante aplicación al suelo. **USH:** semillas provenientes de plantas tratadas mediante aplicación foliar. **R1 y R2** indican tratamientos con reaplicación. Las barras representan media $\pm$ error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (test de Tukey, $p < 0,05$).

5.2.5. Evaluación fitopatológica de la clorosis vegetal

- **Metodología**

Ante la aparición de síntomas de clorosis foliar en plantas correspondientes al tratamiento control, se recolectaron hojas afectadas provenientes del ensayo realizado en Ea. Ma. Behety (C2 y C9) (sección 5.2.2), así como de hojas de tres plantas del ensayo en la AER Ushuaia (C10, E1 rep6 y E2 rep3) (sección 5.2.3), todas ellas con síntomas visibles de clorosis.

De cada planta se extrajo una hoja con signos evidentes del síntoma, las cuales fueron utilizadas para el montaje de cámaras húmedas con el objetivo de profundizar en la evaluación del posible origen biótico de la clorosis registrada.

Las cámaras húmedas se prepararon utilizando placas de Petri estériles con papel de filtro humedecido con agua destilada estéril, con la finalidad de favorecer la esporulación y el desarrollo de posibles microorganismos asociados a los tejidos foliares. Las muestras fueron incubadas durante varios días y posteriormente evaluadas mediante observaciones bajo lupa estereoscópica y microscopio óptico, a fin de detectar estructuras microbianas y caracterizar los morfotipos fúngicos presentes.

Adicionalmente, se realizaron aislamientos a partir del material vegetal en placas de Petri conteniendo medio agar papa glucosado (APG) y cloranfenicol, con el fin de inhibir el crecimiento bacteriano y favorecer el desarrollo de hongos filamentosos. Las placas fueron incubadas en condiciones controladas y monitoreadas periódicamente para la obtención de cultivos puros y su posterior caracterización morfológica.

- **Resultados**

Las observaciones realizadas bajo lupa estereoscópica evidenciaron el desarrollo de micelio en las zonas cloróticas de las hojas analizadas, particularmente en los márgenes apicales. El micelio observado correspondió a estructuras aéreas típicas de hongos hifomicetes (Fig. 55).

Luego de tres días de incubación en cámaras húmedas, las hojas presentaron un avanzado proceso de necrosis, acompañado por una intensa colonización fúngica (Figs. 56 y 57). En estas condiciones se observaron estructuras reproductivas asociadas a la formación de conidios, así como también estructuras de mayor resistencia, lo que sugiere la presencia de hongos con distintos tipos de estrategia de propagación y supervivencia.



Figura 55. Observaciones bajo lupa estereoscópica de hojas de *Hieracium pilosella* con síntomas de clorosis. **A.** Lámina foliar con margen clorótico. **B.** Desarrollo de micelio superficial asociado a zonas cloróticas. **m:** micelio.

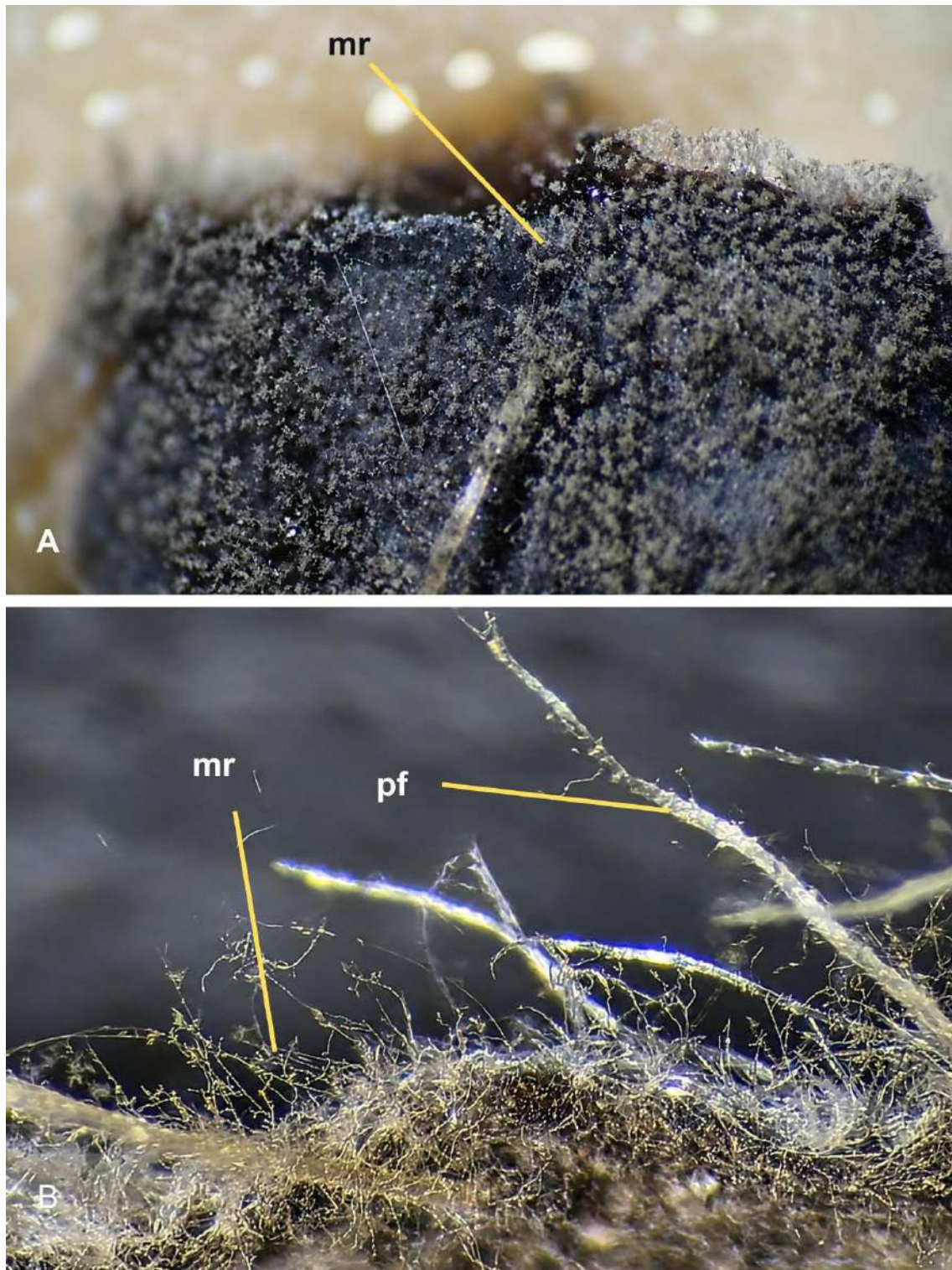


Figura 56. Colonización fúngica en hojas necrosadas de *Hieracium pilosella* incubadas en cámara húmeda (3 días). **A.** Lámina foliar colonizada por hongos hifomicetes. **B.** Borde de hoja completamente cubierto por micelio. **mr:** micelio con estructuras reproductivas (conidióforos). **pf:** pelos foliares.



Figura 57. Desarrollo de estructuras reproductivas fúngicas en hojas de *Hieracium pilosella* incubadas en cámara húmeda.

A partir de los aislamientos realizados, se logró recuperar un número limitado de cepas fúngicas. Cuatro de ellas no pudieron ser identificadas con precisión y serán enviadas al Instituto Spegazzini para su determinación. Asimismo, se lograron aislar hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Alternaria*.

Por otra parte, el análisis microscópico de las muestras permitió reconocer diversos morfotipos fúngicos (Figura 58), que estuvieron presentes en la totalidad de las hojas analizadas:

- *Morfotipos hialinos con conidios ovoides* (Fig. 58 A-b). Se observaron hifas hialinas con conidios unicelulares, ovoides a elipsoidales. Estos morfotipos podrían asociarse a géneros como *Acremonium*, o presentar

afinidad con formas tempranas de *Trichoderma* o *Fusarium*, aunque no se observaron estructuras diagnósticas suficientes para una identificación precisa.

- *Hifas septadas con estructura globosa* (Fig. 58 C). Se registraron hifas con estructuras esféricas densas, que podrían corresponder a clamidosporas, agregados de conidios o estructuras reproductivas inmaduras. Debido a la falta de caracteres distintivos, este morfotipo no fue asignado a un género determinado.
- *Hongos dematiáceos con conidios pigmentados* (Fig. 58 D-F). Este grupo presentó conidios oscuros, septados y muriformes, compatibles con hongos de géneros como *Alternaria* o *Ulocladium*. La ausencia de estructuras claramente diagnósticas, como picos apicales bien definidos, sugiere una identificación a nivel de carácter presuntivo.
- *Conidios pequeños asociados a micelio pigmentado*. Se observó una abundante presencia de conidios pequeños, hialinos o subhialinos, posiblemente asociados a otros taxa fúngicos presentes en la muestra. Estos podrían corresponder a formas compatibles con *Cladosporium*, aunque la evidencia morfológica no fue concluyente.

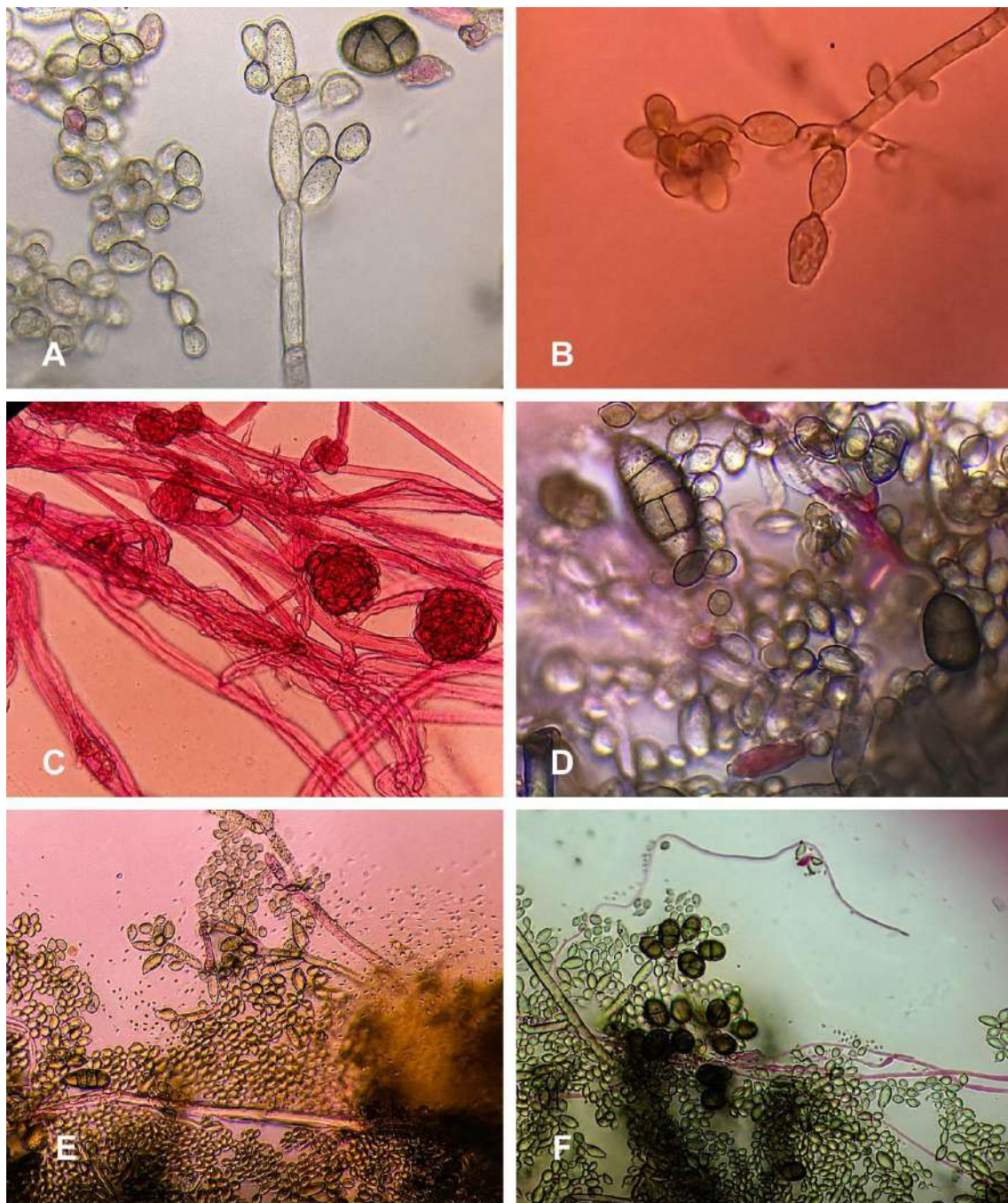


Figura 58. Morfotipos fúngicos observados al microscopio óptico a partir de material incubado en cámaras húmedas (hojas de *Hieracium pilosella*). **A-B.** Hifas hialinas con conidios ovoides, compatibles con hongos hialinos. **C.** Hifas septadas con estructuras globosas asociadas, posiblemente clamidosporas u otras estructuras de resistencia. **D-F.** Conidios pigmentados, septados y muriformes, compatibles con hongos dematiáceos. **E-F.** Presencia adicional de conidios pequeños hialinos a subhialinos asociados al micelio.

5.2.6. Análisis e interpretación de los resultados

Los resultados obtenidos en los ensayos experimentales evidencian que el efecto del extracto de la cianobacteria nostocal *Hydrocoryne australis* sobre *Hieracium pilosella* está determinado principalmente por la vía de aplicación, la dosis y la frecuencia de exposición, generando respuestas fisiológicas claramente diferenciadas.

En términos generales, se observa un comportamiento contrastante entre la aplicación en suelo, donde no se detecta un efecto herbicida directo y se registran indicios de mejora en el estado sanitario, y la aplicación foliar, donde se evidencia un efecto fitotóxico progresivo que afecta tanto el crecimiento como la reproducción de la especie.

Este comportamiento diferencial puede interpretarse a partir de la naturaleza multicomponente del extracto, que contiene una combinación de fitohormonas (particularmente auxinas y ácido abscísico, ABA), junto con metabolitos secundarios y péptidos bioactivos. En este tipo de sistemas, los compuestos hormonales tienden a actuar a bajas concentraciones, mientras que los metabolitos secundarios (asociados a respuestas de estrés) pueden generar efectos más intensos a partir del contacto con los tejidos vegetales (Singh y col., 2005; Singh y col., 2016; Sanjeewa y col., 2023).

- **Efectos diferenciales según la vía de aplicación**

La comparación entre los ensayos permite establecer que el extracto presenta dos modos de acción principales:

- Aplicación en suelo: efecto indirecto (bioestimulante)
- Aplicación foliar: efecto directo (fitotóxico y acumulativo)

Estas diferencias están estrechamente relacionadas con la forma de aplicación y el grado de dilución del extracto.

En el caso de la aplicación en suelo, la dilución del extracto en la matriz edáfica reduce significativamente la concentración efectiva de los metabolitos con actividad fitotóxica, mientras que los compuestos hormonales mantienen su

actividad. Este tipo de comportamiento ha sido ampliamente reportado en extractos de origen microbiano, donde la dilución favorece efectos bioestimulantes por sobre los efectos inhibitorios (Bakker y col., 2020; Charoenying y col., 2022). En cambio, en la aplicación foliar, el extracto se aplica en forma más concentrada y en contacto directo con los tejidos, lo que favorece la acción localizada de los metabolitos secundarios.

- ***Efecto integrado sobre el crecimiento y funcionamiento según la vía de aplicación***

- a. *Aplicación en suelo*

En la aplicación en suelo, el crecimiento vegetativo de *H. pilosella* no se vio inhibido. La producción de estolones, el desarrollo foliar y el funcionamiento general de la planta se mantienen en condiciones comparables al control, e incluso con tendencias a un mejor desempeño sanitario.

Este comportamiento puede explicarse por el predominio del efecto de las fitohormonas presentes en el extracto, especialmente aquellas asociadas a la regulación del crecimiento y la respuesta al estrés. En este contexto, el extracto actuaría como un bioestimulante, favoreciendo la estabilidad fisiológica de la planta, en línea con lo reportado para extractos de cianobacterias y microalgas que promueven el crecimiento y la tolerancia al estrés (Singh y col., 2005; Poudel y col., 2021). Si bien no se identificó un mayor crecimiento en las plantas tratadas, si se observó una mejora sanitaria de las mismas.

Asimismo, la presencia de un mejor estado sanitario en plantas tratadas sugiere un efecto indirecto adicional. La aparición de clorosis en plantas control indica que el ensayo estuvo influenciado por condiciones de estrés propias del invernadero (alta humedad, temperatura), que favorecieron el desarrollo de microorganismos oportunistas. En este sentido, los hongos detectados (*Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* y *Alternaria*) corresponden a colonizadores secundarios que suelen establecerse en tejidos debilitados (Al-Shaarani y Pecoraro, 2024; Ghiaie Asl y col., 2017).

El desarrollo de estos microorganismos está fuertemente condicionado por factores ambientales y el estado fisiológico del hospedador, en un esquema clásico de interacción planta–patógeno–ambiente (Mishra y col., 2024). En condiciones de invernadero, la elevada humedad favorece especialmente la esporulación y dispersión de estos hongos (Ma y col., 2025), mientras que el estrés vegetal incrementa la susceptibilidad a infecciones oportunistas (Guigard y col., 2025).

La menor incidencia de estos síntomas en plantas tratadas, así como la recuperación posterior a la reaplicación, indica que el extracto podría estar reforzando la respuesta de la planta frente al estrés, posiblemente mediante dos mecanismos complementarios:

- Efecto fisiológico directo (hormonal)
- Efecto indirecto mediado por la microbiota del suelo

Este tipo de interacción ha sido reportado en sistemas donde compuestos microbianos modulan comunidades edáficas y mejoran la sanidad vegetal (Bakker y col., 2020).

Los resultados indicaron que, bajo aplicación en suelo, el extracto no afecta negativamente el crecimiento, sino que contribuye a sostener el funcionamiento fisiológico y el estado sanitario general.

b. Aplicación foliar

En contraste, la aplicación foliar genera un efecto directo sobre los tejidos vegetales, con alteraciones visibles en hojas, estolones y estructura general de la planta.

A diferencia del tratamiento en suelo, la aplicación foliar expone los tejidos a una mayor concentración de metabolitos secundarios y péptidos bioactivos, los cuales actúan localmente como compuestos fitotóxicos. Estos metabolitos, asociados a respuestas de estrés, tienen efectos intensos aun a bajas concentraciones cuando entran en contacto directo con las células vegetales (Paerl y col., 2013; Singh y col., 2020).

El patrón observado indica que el efecto del extracto no es sistémico, sino local y de contacto. Las zonas donde el extracto se deposita presentan daño

(clorosis y necrosis), mientras que la planta continúa produciendo nuevas hojas. Esto es consistente con respuestas localizadas a compuestos alelopáticos o fitotóxicos que no se translocan fácilmente dentro de la planta (Inderjit y Callaway, 2003).

La reaplicación del extracto genera nuevos puntos de impacto, lo que conduce a la acumulación del daño en determinadas estructuras, especialmente hojas y órganos reproductivos. Este fenómeno define claramente un patrón de fitotoxicidad acumulativa, donde el efecto se intensifica con la repetición de la exposición.

La aplicación foliar compromete el funcionamiento fisiológico de la planta a nivel localizado, debilitando progresivamente su crecimiento sin producir una inhibición sistémica total.

- ***Efectos sobre la reproducción y la descendencia según la vía de aplicación***

- a. Aplicación en suelo*

En la aplicación en suelo, los procesos reproductivos no se ven afectados negativamente. La formación de estructuras reproductivas y la viabilidad de las semillas se mantienen en niveles altos, lo que indica que el extracto no compromete la reproducción de la especie bajo estas condiciones.

Este resultado es consistente con el efecto bioestimulante, que aumenta la resistencia de la planta al estrés. La estabilidad fisiológica de la planta, junto con un menor nivel de estrés sanitario, genera condiciones favorables para el desarrollo reproductivo.

Asimismo, la posible influencia del ABA (identificada a través del comportamiento en el ensayo de germinación) podría estar contribuyendo a la regulación adecuada de los procesos de maduración y dormición de las semillas, tal como ha sido ampliamente documentado para esta hormona (Fenner, 1991).

En este contexto, la aplicación en suelo no genera efectos negativos sobre la descendencia.

b. Aplicación foliar

En contraste, la aplicación foliar afecta significativamente el desarrollo reproductivo y la calidad de la descendencia.

Los resultados muestran una reducción en la formación de botones florales, un aumento en la mortalidad de estructuras reproductivas y una menor proporción de flores maduras. Estos efectos se intensifican bajo esquemas de reaplicación, lo que indica una alta sensibilidad de los procesos reproductivos al extracto.

Este patrón es coherente con lo observado en estructuras vegetativas y responde a un efecto fitotóxico generalizado. A su vez, el ensayo de viabilidad evidencia una disminución marcada en la capacidad de germinación de semillas provenientes de tratamientos foliares intensivos.

Desde una perspectiva fisiológica, esto puede interpretarse como un efecto inducido por estrés, en el cual las condiciones adversas durante el desarrollo reproductivo afectan la calidad de las semillas (Fenner, 1991). En este contexto, el rol del ABA resulta particularmente relevante, dado que esta fitohormona regula directamente los procesos de dormición y germinación.

Los resultados indicaron que la aplicación foliar del extracto compromete tanto el éxito reproductivo como la viabilidad de la descendencia.

Efecto de la dosis y la reaplicación

El análisis integrado de los tratamientos evidencia un comportamiento dosis-dependiente y acumulativo. Este tipo de respuesta ha sido reportada en extractos biológicos complejos, donde la concentración relativa de metabolitos determina el tipo de efecto predominante (bioestimulante vs fitotóxico) (Sanjeewa y col., 2023).

Los resultados obtenidos permiten concluir que el extracto de la cianobacteria nostocal *Hydrocoryne australis* presenta un comportamiento funcional dual, determinado por su composición y la vía de aplicación:

- Aplicación en suelo: efecto indirecto, asociado a la modulación del sistema planta–suelo, con acción bioestimulante que mejora el estado sanitario.
- Aplicación foliar: efecto directo, local y acumulativo, caracterizado por fitotoxicidad y reducción del desempeño reproductivo.

En este sentido, el extracto se comporta como un sistema biológicamente complejo, resultado de la interacción entre planta, metabolitos y ambiente.

Finalmente, estos resultados destacan la necesidad de avanzar en la caracterización química del extracto y en la optimización de su obtención, tal como se plantea en estudios recientes sobre productos biológicos multicomponente (Bakker y col., 2020; Charoenying y col., 2022).

5.2.7. Ejecución y evaluación del OE2: actividades realizadas, nivel de cumplimiento, limitaciones operativas y ajustes metodológicos

En la tabla 11 se presenta una síntesis de las tareas desarrolladas en el marco del OE2, indicando para cada una el porcentaje de cumplimiento alcanzado y una breve observación explicativa.

Si bien la mayoría de las actividades propuestas fueron ejecutadas de manera satisfactoria, se registraron limitaciones operativas que condicionaron parcialmente el alcance del objetivo, particularmente en relación con la implementación de ensayos en condiciones a campo.

En esta etapa del proyecto se priorizó la obtención y análisis de resultados provenientes de ensayos realizados bajo condiciones controladas, tanto mediante aplicación del extracto por riego al suelo como por vía foliar. Estos ensayos permitieron generar información robusta para la evaluación del efecto del extracto y resultaron fundamentales para ajustar el diseño experimental, especialmente en aspectos vinculados a la definición de dosis, modalidades y

frecuencia de aplicación, así como a la sección de variables de respuesta y estrategias de análisis.

Tabla 11. Tareas correspondientes al segundo objetivo específico con su respectivo nivel de cumplimiento y observaciones.

TAREAS	NIVEL DE CUMPLIMIENTO (%)	OBSERVACIONES
T1. Diseñar experimentos en vivo para evaluar la capacidad de los microorganismos seleccionados en inhibir el crecimiento de <i>H. pilosella</i>	100%	Sin observaciones.
T2. Realizar pruebas de interacción en condiciones controladas y semi-controladas	60 - 70%	No se llevaron a cabo ensayos en condiciones semi-controladas o a campo debido a limitaciones logísticas, principalmente asociadas a la producción de extracto cianobacteriano. Para los ensayos en macetas se requirió un volumen aproximado de 120 litros de cultivo, lo que restringió la escalabilidad del experimento.
T3. Analizar estadísticamente los datos obtenidos	100%	Sin observaciones.
T4. Caracterizar bioquímicamente a <i>H. pilosella</i>	10 - 20%	No se realizó la caracterización bioquímica en esta etapa, ya que el trabajo se centró en la evaluación experimental. Actualmente, se están desarrollando y ajustando protocolos de análisis mediante HPLC para extractos de cianobacterias en la UNTDF, con el objetivo de identificar los compuestos responsables de los efectos observados en etapas futuras.

La implementación de ensayos a campo no fue posible durante el período de ejecución debido a limitaciones logísticas, principalmente asociadas a la producción de extracto cianobacterias. En particular, los ensayos en maceta

requirieron un volumen de 120 litros de cultivo, lo que restringió la disponibilidad de biomasa y, en consecuencia, la posibilidad de escalar las experiencias a condiciones de mayor complejidad operativa. No obstante, se espera que este valor se modifique en futuras etapas al trabajar con cepas nativas de cianobacterias en el marco del proyecto.

Asimismo, los ensayos realizados se llevaron a cabo utilizando una cepa provista por un colaborador, lo que permitió avanzar en la evaluación experimental del efecto del extracto. Sin embargo, aún resta replicar estos estudios utilizando las cepas de cianobacterias nativas aisladas durante el proyecto, lo cual permitirá validar la consistencia de los resultados obtenidos y ajustar su aplicabilidad en el contexto local.

Adicionalmente, los tiempos biológicos de *Hieracium pilosella*, particularmente en las condiciones latitudinales del área de estudio, limitaron la ventana temporal para la realización de ensayos a campo. Los ensayos en maceta finalizaron hacia el mes de marzo, coincidiendo con el cierre del ciclo fenológico de la especie, lo que restringió la posibilidad de implementar nuevas pruebas en condiciones a cielo abierto dentro del período previsto.

Por otra parte, la implementación de ensayos en condiciones de campo implica una mayor complejidad logística y experimental, incluyendo la selección adecuada del sitio de ensayo, la recolección y establecimiento de plantas, la instalación del experimento, la disponibilidad de insumos y la gestión de una mayor variabilidad ambiental.

En función de los resultados obtenidos en condiciones controladas, se prevé avanzar en la validación a campo durante la temporada estival 2026/2027. Esta etapa permitiría escalar los resultados obtenidos, así como ajustar los aspectos metodológicos y logísticos requeridos para su implementación en condiciones reales.

Finalmente, si bien la caracterización bioquímica no fue abordada experimentalmente en esta etapa, se avanzó en el desarrollo y ajuste de protocolos analíticos mediante HPLC en la Universidad Nacional de Tierra del Fuego (UNTDF), lo que permitirá en trabajos futuros identificar los compuestos responsables de los efectos observados.

5.3. OE3 | Evaluación del potencial inhibitorio de metabolitos microbianos

El OE3 - *Aislar la capacidad inhibitoria de los compuestos bioactivos extraídos de los microorganismos nativos en plantas modelo* se planteó como una instancia integradora de los objetivos previos, orientada a profundizar el estudio funcional de los microorganismos seleccionados a partir de los aislamientos realizados en el OE1 y para la realización de los ensayos exploratorios realizados en el OE2. En este marco, y con el fin de asegurar la disponibilidad de extractos estandarizados para los ensayos, se trabajó en esta etapa con un extracto obtenido a partir de la cianobacteria *Hydrocoryne australis*, empleada como organismo de referencia debido a su similitud morfológica y afinidad taxonómica con las cianobacterias locales de interés.

El propósito central de este objetivo fue evaluar la capacidad inhibitoria de extractos biológicos, obtenidos principalmente de cianobacterias, sobre procesos tempranos del desarrollo vegetal, tal como la germinación. La evaluación se realizó tanto en semillas de alfalfa (*Medicago sativa*), considerada como planta modelo por su sensibilidad y uso frecuente en bioensayos, como en semillas de *Hieracium pilosella*. Este abordaje permitió detectar efectos fitotóxicos en etapas críticas del ciclo de vida de ambas especies.

El alcance del OE3 fue de carácter experimental y exploratorio, y comprendió:

- (i) la puesta a punto y aplicación de protocolos para la extracción de metabolitos bioactivos a partir de cultivos de cianobacterias,
- (ii) el montaje de sistemas de cultivo y escalado de biomasa microbiana en condiciones controladas,
- (iii) la evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos mediante ensayos de germinación dosis-respuesta en semillas de *M. sativa* y *H. pilosella*.

5.3.1. Capacitación técnica y transferencia metodológica sobre cianobacterias

El equipo técnico (INTA–CADIC) participó de una instancia de capacitación y transferencia de conocimientos sobre cianobacterias, llevada adelante por el Lic. Gabriel R. Castro, en la que se abordaron aspectos conceptuales y metodológicos vinculados a su ecología, diversidad, potencial biotecnológico y aplicaciones.

Las actividades teórico-prácticas se desarrollaron en el Laboratorio de Ecología Terrestre y Acuática del CADIC-CONICET. En una primera etapa, se realizó un relevamiento de la infraestructura y el equipamiento disponible, con el objetivo de evaluar la factibilidad operativa para el aislamiento, escalamiento y obtención de extractos de cianobacterias.

Durante las jornadas se profundizó en el metabolismo de estos microorganismos, particularmente en la producción de metabolitos secundarios, así como en los protocolos de cultivo (ANEXO VII) e hidrólisis (ANEXO VIII) relevantes para los objetivos del proyecto.

A partir de la planificación operativa y la revisión de protocolos, se avanzó en la preparación de soluciones y medios de cultivo para las etapas de aislamiento e hidrólisis. Durante esta fase, se realizó el seguimiento microscópico de cultivos de cianobacterias aisladas, y, ante la detección de contaminaciones, se implementaron procesos de purificación mediante inoculación en medio líquido BG11(0), bajo condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar. Los cultivos se mantuvieron a 20 °C y con un fotoperíodo 12:12 h, para favorecer su crecimiento selectivo.

Asimismo, se llevó a cabo un ajuste preliminar del protocolo de hidrólisis utilizando biomasa ambiental proveniente del sitio “U8-Alfa” de Estancia Cullen. Si bien la calidad de la muestra era limitada, esta instancia permitió ajustar el procedimiento a las condiciones operativas del laboratorio. Entre los aspectos críticos identificados se destacan la necesidad de instrumental para la medición de pH a temperaturas superiores a 65 °C y la optimización de la transferencia térmica en los sistemas de calentamiento.

Esta experiencia resultó fundamental para anticipar dificultades logísticas y avanzar hacia la estandarización de los extractos destinados a los bioensayos de germinación.

5.3.2. Montaje de sistema de cultivo de cianobacterias

Siguiendo el protocolo de cultivo de cianobacterias (ANEXO VII), se implementó un sistema de cultivo para cepas nativas aisladas en las instalaciones del CADIC-CONICET, en un espacio acondicionado para el trabajo con microorganismos fotosintéticos (Fig. 59 y 60).

Dicho espacio cuenta con condiciones controladas de temperatura, iluminación y agitación, lo que permitió establecer cultivos estables y mantenerlos en condiciones productivas durante la primera etapa de trabajo con los aislamientos.

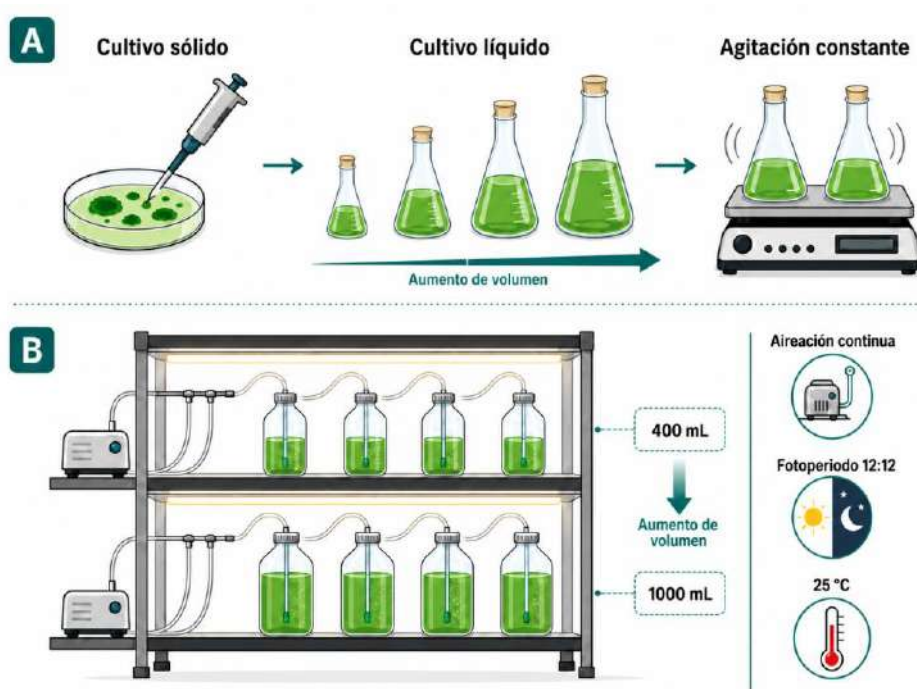


Figura 59. Esquema del sistema de cultivo de cianobacterias nativas de Tierra del Fuego instalado en el Laboratorio de Ecología Terrestre y Acuática del CADIC-CONICET (Ushuaia). **A.** Proceso de aislamiento y purificación del cultivo en medio sólido y posterior transferencia a cultivo líquido. **B.** Sistema de escalamiento implementado en estantería, con aireación continua mediante bomba y fotoperiodo controlado de 12:12.

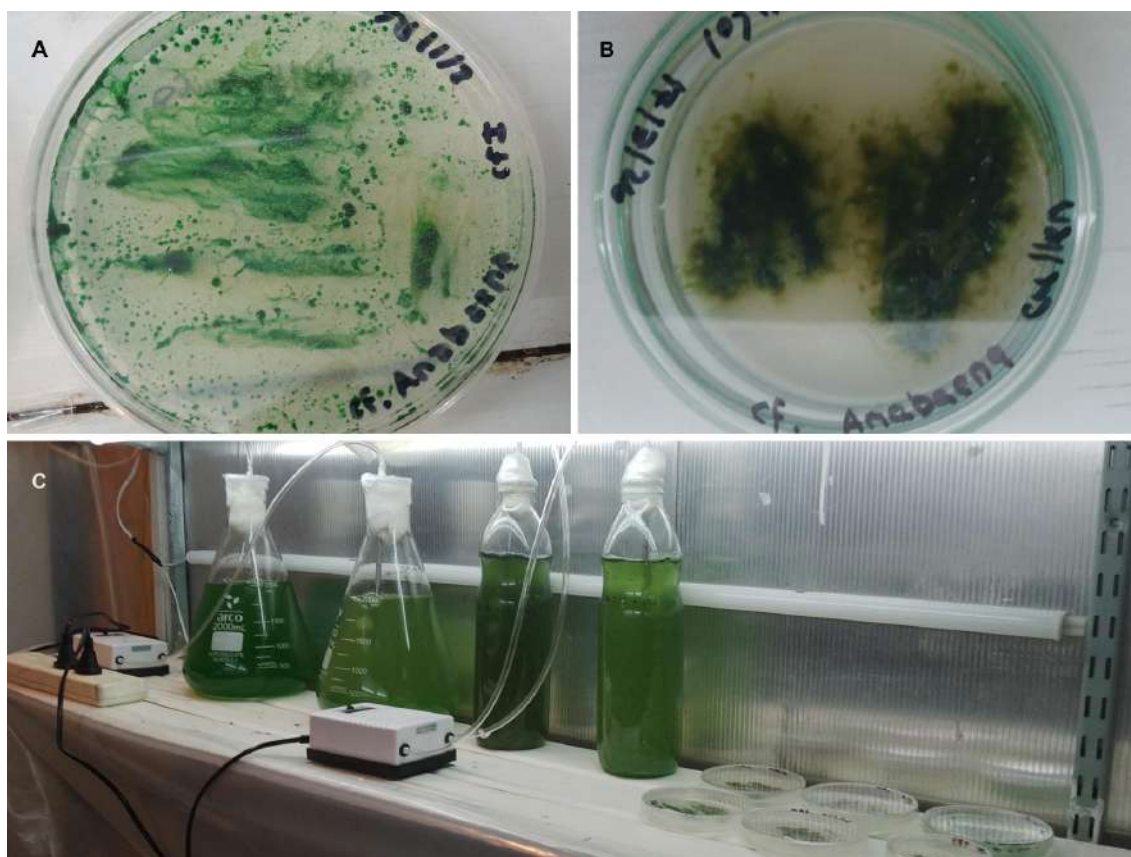


Figura 60. Sistema de cultivo en estanterías de cianobacterias nativas de Tierra del Fuego instalado en el Laboratorio de Ecología Terrestre y Acuática del CADIC-CONICET (Ushuaia) con iluminación LED, control de fotoperiodo y aireación. **A y B.** Cultivo en medio sólido de *Anabaena* cf. *torulosa*. **C.** Cultivos líquidos de *Anabaena* cf. *torulosa* en botellas de 1 l, erlenmeyer de 2 l durante la fase de crecimiento.

El esquema fue diseñado con un enfoque escalable, combinando etapas de propagación en medio sólido y líquido, con volúmenes crecientes y aireación continua, a fin de favorecer el incremento sostenido de biomasa. La fase de cultivo líquido, en botellas dispuestas en estanterías con iluminación LED y control de fotoperíodo (12:12 h), se encuentra en funcionamiento continuo desde noviembre (2025), lo que permitió un aumento progresivo del volumen cultivado.

Si bien la biomasa obtenida mediante este sistema no fue utilizada directamente para la elaboración de los extractos empleados en los ensayos experimentales, su implementación constituyó un avance significativo en la consolidación de capacidades técnicas para el manejo, mantenimiento y escalado de cultivos de cianobacterias nativas.

En este sentido, se dejó instalada la infraestructura necesaria para replicar el sistema en la AER INTA Ushuaia. No obstante, el inicio de los cultivos a mayor escala se encuentra supeditado al ajuste de condiciones óptimas para la producción de biomasa. Cabe señalar que actualmente el volumen de producción alcanza aproximadamente los 7 litros, lo que representa un avance respecto de lo informado en el Informe Parcial 2. Asimismo, se destaca la obtención de cultivos puros en volúmenes de hasta 2 litros.

No obstante, es importante mencionar que el volumen total estimado de producción por lote continúa siendo limitado, alcanzando aproximadamente 10 L, lo que constituye una restricción para la obtención de biomasa a mayor escala.

5.3.3. Obtención de extractos para aplicación en ensayos

El proceso de obtención de cultivos monoespecíficos de cianobacterias a partir de las muestras recolectadas en el sitio U8 (Alfa Frontera) presentó una complejidad técnica superior a la prevista, lo que implicó un mayor tiempo de aislamiento, purificación y estabilización de las cepas nativas, no contemplado inicialmente en el cronograma del proyecto. Esta situación generó un retraso en las etapas de escalado, impidiendo alcanzar en los plazos previstos la densidad celular necesaria para la producción de biomasa destinada a la elaboración de los extractos a utilizarse en los ensayos experimentales (secciones 5.2.2 y 5.2.3).

Ante este escenario, y con el objetivo de asegurar el cumplimiento del cronograma de ejecución, se implementó una estrategia de articulación técnico-logística. En este marco, el Lic. Rodrigo Maio realizó una estancia técnica en el laboratorio especializado *Spiral Blue Spa*, donde llevó adelante las etapas de escalado y obtención de extractos, siguiendo los protocolos de cultivo, escalamiento y extracción establecidos (ANEXOS VII y VIII), bajo la supervisión del colaborador Lic. Gabriel R. Castro.

En función de la similitud morfológica observada entre las cianobacterias aisladas en este proyecto y el morfotipo reportado para *Hydrocoryne*, se definió trabajar con *Hydrocoryne australis* (Fig. 62) como organismo de referencia para la preparación del extracto, a fin de disponer de biomasa suficiente y

estandarizada para los ensayos. Esta decisión se sustenta en antecedentes que muestran que cepas con morfología “tipo *Anabaena*” pueden corresponder filogenéticamente a *Hydrocoryne* (Nostocales). Asimismo, ambas pertenecen al mismo grupo taxonómico (Nostocales), comparten requerimientos ecológicos similares y presentan un potencial comparable para la producción de compuestos bioactivos, lo que refuerza la pertinencia de emplear este taxón como aproximación operativa al material local mientras se completa la estabilización de las cepas nativas.

Por otra parte, en experiencias previas desarrolladas por el colaborador experto (proyecto SUC 230092 de *Spiral Blue SpA*, Chile), se evidenciaron efectos fitotóxicos en la planta hemiparasita *Tristerix corymbosus*, presente en árboles frutales, tras la aplicación foliar de extractos biológicos obtenidos de *Hydrocoryne australis*. Dichos extractos, basados en péptidos antimicrobianos (AMPs) de bajo peso molecular y tamaño nanométrico, presentarían una elevada capacidad de penetración en los tejidos vegetales. Este comportamiento se asocia a la inducción de procesos de desestabilización celular y daño tisular en hojas y tallos, incluyendo la posible alteración de los haces vasculares que conectan el parásito con la planta hospedadora, sin afectar significativamente la fisiología de esta última (datos comunicados por el colaborador Lic. Gabriel R. Castro).



Figura 61: Fotografía de *Hydrocoryne australis* observada en microscopio óptico (detalle de filamentos).

La cianobacteria *Hydrocoryne australis* cuenta con registros en el Hemisferio Sur y fue descrita a partir de materiales recolectados en hábitats acuáticos someros, charcos y márgenes de lagos costeros de la Antártida, particularmente en King George Island y James Ross Island (Islas Shetland del Sur y Península Antártica). Según su descripción original, la especie es característica de ambientes acuáticos polares y subpolares del Hemisferio Sur, con presencia documentada en distintas localidades de la Antártida. Si bien hasta el momento no se han reportado registros formales de *H. australis* para la Patagonia argentina o chilena, los antecedentes antárticos (aprox. 62-63° S) constituyen evidencia de su ocurrencia en el extremo sur del Hemisferio Sur, en ecosistemas fríos y de altas latitudes.

Esta acción fue posible gracias a la articulación y el soporte financiero de la Secretaría de Desarrollo Productivo y PyME, a través del Plan Forrajero, lo que permitió garantizar la disponibilidad, en tiempo y forma, de los compuestos bioactivos requeridos para el desarrollo de los ensayos experimentales en condiciones controladas.

En paralelo, los cultivos locales continúan en fase de mantenimiento y optimización. Actualmente se alcanzó un volumen aproximado de 6 L en producción, lo que representa un incremento respecto a registros previos (4 L), aunque aún insuficiente para la obtención de extractos a escala experimental. Se han identificado limitantes asociadas a la disponibilidad de equipamiento (sistemas de aireación e iluminación adecuados) y al control de contaminaciones, aspectos que requieren mejoras para avanzar en el escalado.

Asimismo, se inició la cosecha de biomasa y se avanzó en el aislamiento de cuatro cepas nativas pertenecientes al grupo Nostocales, actualmente conservadas tanto en medio líquido como en placas de Petri. Resulta prioritario profundizar en su caracterización fisiológica y taxonómica, así como en la optimización de las condiciones de cultivo para incrementar la producción de biomasa.

5.3.4. Ensayo de capacidad inhibitoria de germinación en semillas de *Medicago sativa* (alfalfa) y de *Hieracium pilosella*

Con el objetivo de evaluar la capacidad inhibitoria del extracto obtenido de *Hydrocoryne australis* sobre la germinación, se diseñaron dos ensayos experimentales.

En una primera instancia, se utilizó alfalfa (*Medicago sativa*) como planta modelo, con el propósito de evaluar los potenciales efectos fitotóxicos de los extractos y, simultáneamente, ajustar el diseño experimental. A partir de estos resultados preliminares, se optimizaron las variables del ensayo.

Posteriormente, se realizó un segundo ensayo sobre semillas de *Hieracium pilosella*, con el fin de determinar si los efectos observados en la especie modelo

se replicaban en la especie objetivo del estudio. En esta etapa, y con el objetivo de incrementar la robustez estadística del análisis, se aumentó el número de réplicas por tratamiento, quedando conformado cada uno por ocho placas de Petri con 16 semillas cada una.

● **Diseño experimental**

El ensayo fue planteado bajo un esquema dosis-respuesta, con el objetivo de evaluar para evaluar el efecto del extracto de *Hydrocoryne australis* sobre la germinación de alfalfa (*Medicago sativa*) y *Hieracium pilosella*.

Para ello, se estableció un conjunto de tratamientos que incluyó concentraciones crecientes del extracto, un control positivo (agua estéril) como y un control negativo basado en la inhibición hormonal mediante ácido abscísico (ABA).

Los tratamientos implementados en el ensayo de inhibición de la germinación, junto con sus respectivas dosis, se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12. Descripción de los tratamientos evaluados en el ensayo de inhibición de la germinación de semillas de alfalfa (*Medicago sativa*), incluyendo concentración de extracto de *Hydrocoryne australis*, control hídrico y tratamiento con ácido abscísico (ABA).

TRATAMIENTO	VOLUMEN APLICADO POR PLACA	VOLUMEN APLICADO POR SEMILLA
Control	Agua estéril:200 µL	12 µL
D1	Extracto Dosis 1: 200 µL	12,5 µL
D2	Extracto Dosis 2: 400 µL	25 µL
D3	Extracto Dosis 3: 600 µL	37 µL

D4	Extracto Dosis 4: 800 µL	50 µL
D5	Extracto Dosis 5: 1000 µL	62 µL
A	ABA	30 µL

En el caso del ensayo en *Medicago sativa*, se establecieron tres réplicas por tratamiento, utilizando placas de Petri estériles de 15 cm de diámetro como unidades experimentales. En cada placa se dispusieron 16 semillas, totalizando 336 unidades de análisis.

Para el ensayo con semillas de *Hieracium pilosella*, y con el objetivo de aumentar la robustez estadística del ensayo, el número de réplicas se aumentó a 8 placas de petri con 16 semillas, por tratamiento. contando así con un total de 897 semillas.

Se consideraron como “semillas germinadas” aquellas que evidenciaron los mismos criterios que en la sección 5.2.4.

Las semillas de alfalfa (*Medicago sativa* Var. Baldrich ABC 350) fueron provistas provenientes del *Plan Forrajero* de la Secretaría de Desarrollo Productivo y PyME (Ministerio de Producción y Ambiente del Gobierno de la provincia de Tierra del Fuego AIAs), mientras que las semillas de *Hieracium Pilosella* fueron recolectadas durante el verano de 2024 en Cullen, por el Ing. Agr. Enrique Frers, asesor privado de la Estancia Cullen.

- **Tratamiento previo de las semillas**

El proceso de desinfección y activación previa de las semillas se realizó siguiendo la metodología descrita en la sección 5.2.4.

- **Montaje**

El montaje experimental se llevó a cabo siguiendo la misma metodología descrita en la sección 5.2.4. En este caso, dado que el objetivo fue evaluar el efecto de distintas dosis del extracto, en cada placa se aplicaron los volúmenes correspondientes a cada tratamiento (Fig. 62).

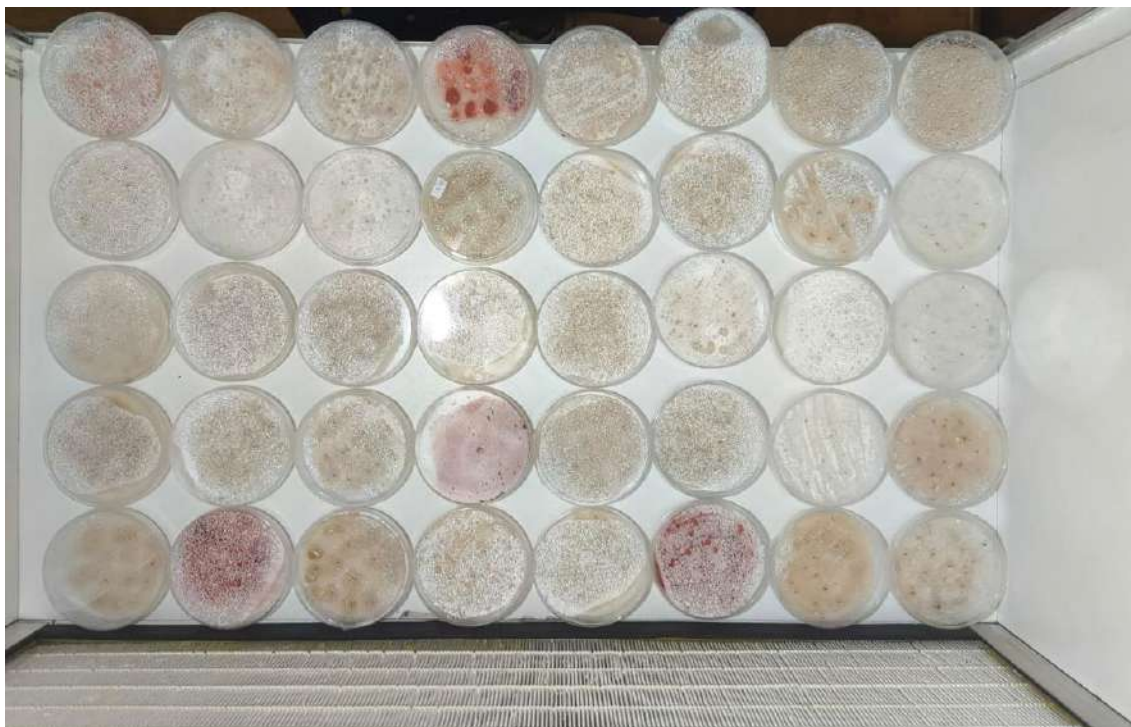


Figura 62. Montaje experimental del ensayo de germinación de semillas de *Hieracium pilosella* realizado en cámara de flujo laminar. Cada coloración de las distintas unidades experimentales (placas de Petri) corresponden a los diferentes tratamientos evaluados.

El seguimiento de la germinación se realizó durante un período de 14 días, registrándose diariamente la germinación acumulada.

- **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados mediante un modelo lineal mixto generalizado (GLMM), considerando el tratamiento como efecto fijo y la unidad experimental (placa de Petri) como efecto aleatorio. Se utilizó una distribución binomial para la variable “respuesta”. Previamente, se verificaron los supuestos

del modelo. Las comparaciones *a posteriori* se realizaron mediante el test de Tukey. Los análisis se efectuaron utilizando el paquete *lme4* en el entorno R.

● Resultados

Para el caso de *Medicago sativa* no se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de germinación entre los tratamientos con extracto y control (Fig. 63). No obstante, se observa una tendencia general a la disminución en la germinación en todos los tratamientos con extracto respecto al control.

En particular, el control presentó los valores más altos de germinación (aprox. 100%), mientras que los tratamientos con extracto oscilaron entre aproximadamente 65% y 85%, sin evidenciar un patrón dosis-dependiente claro. Asimismo, la superposición de los intervalos de error sugiere una elevada variabilidad entre réplicas, lo que podría haber enmascarado diferencias entre tratamientos.

Estos resultados indican que, bajo las condiciones evaluadas, el extracto de cianobacterias no ejerce un efecto inhibitorio significativo sobre la germinación de *M. sativa*, aunque se observan indicios de una leve respuesta negativa.

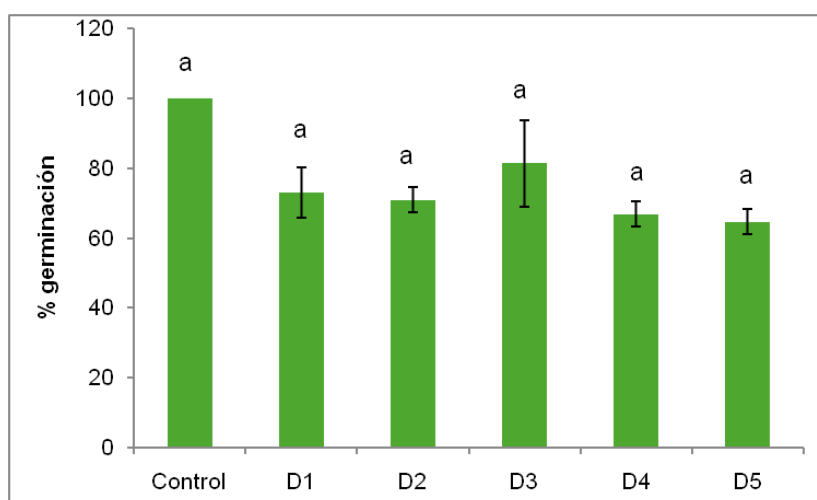


Figura 63. Porcentaje de germinación de semillas de *Medicago sativa* bajo diferentes tratamientos con extracto de *Hydrocoryne australis*. **Control:** semillas incubadas con agua estéril. **D1–D5:** tratamientos con concentraciones crecientes del extracto. Las barras representan

la media $\pm$ desvío estándar. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre tratamientos (test de Tukey, $p < 0,05$).

En contraste, en el ensayo con *Hieracium pilosella* se observó una disminución significativa del porcentaje de germinación en los tratamientos con extracto de cianobacterias respecto del control (Fig. 64). El control presentó valores de germinación superiores (50–60%), mientras que la incorporación del extracto produjo una reducción marcada en la germinación incluso en las dosis más bajas.

Se evidencia un patrón dosis-dependiente, en el cual las dosis más elevadas (D4 y D5) redujeron la germinación a valores cercanos a cero. En particular, estos tratamientos no mostraron diferencias significativas respecto al control negativo con ABA, lo que indica un efecto inhibitorio comparable al de un regulador hormonal conocido por su acción supresora sobre la germinación.

Los tratamientos intermedios (D1–D3) presentaron valores de germinación reducidos respecto al control, aunque con mayor variabilidad, lo que sugiere una respuesta gradual del sistema.

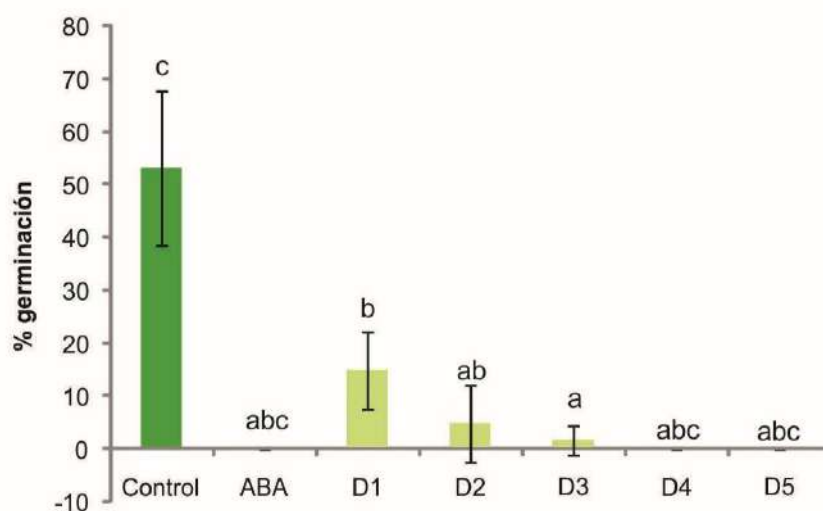


Figura 64. Porcentaje de germinación de semillas de *Hieracium pilosella* en respuesta a distintos tratamientos. **Control:** semillas incubadas con agua destilada estéril. **ABA:** inhibidor de la germinación. **D1-5:** tratamientos con diferentes dosis de extracto de cianobacterias. Las barras representan la media $\pm$ desvío estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (test de Tukey, $p < 0,05$).

Los resultados muestran una respuesta diferencial entre especies frente al extracto de cianobacterias. Mientras que *Medicago sativa* mostró una baja sensibilidad a los tratamientos evaluados, *Hieracium pilosella* evidenció una fuerte inhibición de la germinación, particularmente a mayores concentraciones.

Estos resultados deberán ser validados mediante ensayos adicionales, especialmente utilizando extractos obtenidos a partir de cepas nativas de cianobacterias, a fin de confirmar la consistencia del efecto en condiciones más representativas del sistema local.

5.3.5. Análisis e interpretación de los resultados

Los resultados obtenidos evidencian avances en distintos niveles del proceso experimental, incluyendo aspectos operativos y de consolidación de capacidades, resultados asociados al cultivo y fisiología de las cianobacterias nativas aisladas y la evaluación del potencial biológico del extracto de cianobacterias sobre la germinación de semillas. Además, aportan información adicional sobre el comportamiento del extracto.

- **Desarrollo operativo y generación de capacidades técnicas**

Desde el punto de vista operativo, la implementación del protocolo de aislamiento, cultivo y escalado de cianobacterias del orden Nostocales permitió consolidar capacidades experimentales necesarias para la obtención de biomasa y posterior generación de extractos.

La estandarización del proceso de hidrólisis enzimática constituyó un punto clave, ya que permitió transformar la biomasa en un producto utilizable en ensayos biológicos. Sin embargo, una característica central de este procedimiento es su carácter no selectivo, lo que implica que el extracto obtenido no corresponde a un compuesto definido, sino a una mezcla compleja de metabolitos.

Este aspecto resulta fundamental para interpretar los resultados de esta sección y su relación con los ensayos en planta (Sección 5.2).

- **Ensayo de evaluación del potencial inhibitorio**

El ensayo de germinación fue planteado inicialmente utilizando *Medicago sativa* (alfalfa) como especie modelo, incorporando posteriormente *Hieracium pilosella* mediante el uso de semillas obtenidas de los ensayos previos (Sección 5.2). Esta estrategia permitió evaluar el comportamiento del extracto tanto en una especie cultivada como en la especie invasora objetivo.

Los resultados obtenidos evidenciaron diferencias claras entre ambas especies.

En semillas de *Hieracium pilosella*, se observó una respuesta dosis-dependiente bien definida, caracterizada por una disminución progresiva en la tasa de germinación a medida que aumentó la concentración del extracto aplicado (Fig. 64). Este resultado indica un efecto inhibitorio directo sobre el proceso germinativo.

Por el contrario, en semillas de *Medicago sativa* (Fig. 63), si bien se registraron diferencias observacionales entre tratamientos en relación con la germinación, estas no alcanzaron significancia estadística.

Este comportamiento sugiere que la ausencia de diferencias significativas no necesariamente reflejan una menor sensibilidad de la especie al extracto, sino que podría estar asociada a limitaciones del diseño experimental. En particular, el bajo número de réplicas (placas de Petri con 16 semillas) podría haber reducido la robustez estadística del análisis, limitando la capacidad de detectar efectos dosis-dependientes en esta especie.

- **Bases fisiológicas y bioquímicas del efecto inhibitorio**

El efecto inhibitorio observado en la germinación puede interpretarse a partir de la interacción de los distintos metabolitos presentes en el extracto.

Las auxinas, si bien actúan como promotoras del crecimiento a bajas concentraciones, pueden comportarse como inhibidores de la germinación cuando se encuentran en niveles elevados. Se ha demostrado que compuestos auxínicos pueden inducir alteraciones en vías regulatorias asociadas con ABA y

etileno, promoviendo respuestas de estrés y reprimiendo genes vinculados al crecimiento y a la germinación de semillas (Raghavan y col., 2006).

A su vez, otros metabolitos potencialmente presentes en el extracto (como compuestos fenólicos, péptidos bioactivos y metabolitos alelopáticos característicos de Nostocales) pueden contribuir al efecto inhibitorio mediante múltiples mecanismos (Sukkhhaeng y col., 2015; Koodkaew y col., 2012; Brilisauer y col., 2019), tales como:

- alteraciones en la permeabilidad celular,
- inducción de estrés oxidativo
- interferencia en procesos metabólicos.

Estos mecanismos configuran un efecto fitotóxico complejo y dependiente de la concentración, lo cual resulta consistente con la respuesta observada en *H. pilosella*.

- ***Articulación con los resultados de los ensayos en plantas (sección 5.2)***

Los resultados del ensayo de germinación se integran de manera coherente con los observados en los ensayos en planta (Sección 5.2).

Mientras que en germinación (donde el extracto se aplica en condiciones concentradas y de contacto directo) se observa un efecto inhibitorio claro, en la aplicación en suelo el extracto se encuentra diluido, lo que favorece el predominio de efectos bioestimulantes.

Esta diferencia refuerza la hipótesis planteada previamente: el comportamiento del extracto está determinado por la concentración efectiva y la vía de aplicación.

Además, se refuerza el patrón observado:

- El extracto aplicado en alta concentración y por contacto, tiene un efecto tóxico
- El extracto aplicado diluido en suelo, tiene un efecto bioestimulante.

Este patrón también permite explicar por qué en el ensayo en con aplicación en suelo no se observaron efectos negativos sobre la germinación ni el crecimiento, mientras que en los ensayos foliares y en germinación sí se registraron efectos inhibitorios.

5.3.6. Ejecución y evaluación del OE3: actividades realizadas, nivel de cumplimiento, limitaciones operativas y ajustes metodológicos

En la tabla 13 se presenta una síntesis de las tareas desarrolladas en el marco del OE3, indicando para cada una el porcentaje de cumplimiento alcanzado y una breve observación explicativa.

Tabla 13. Tareas correspondientes al segundo objetivo específico con su respectivo nivel de cumplimiento y observaciones.

TAREAS	NIVEL DE CUMPLIMIENTO (%)	OBSERVACIONES
T1. Extraer los metabolitos secundarios de los microorganismos nativos seleccionados	0%	No se alcanzó la producción de biomasa suficiente de cepas nativas para la obtención de extractos. Se avanzó en el cultivo y escalado, pero aún se requieren ajustes en las condiciones de producción.
T2. Analizar bioquímicamente los compuestos bioactivos	0-20%	No se realizó el análisis en esta etapa. Se encuentran en desarrollo protocolos analíticos mediante HPLC para extractos de cianobacterias en la UNTDF.
T3. Evaluar la actividad herbicida en pruebas de inhibición con plantas modelo	100%	Se realizaron ensayos de germinación en <i>Medicago sativa</i> y <i>Hieracium pilosella</i> , evidenciando respuestas diferenciales entre especies y tratamientos.
T4. Analizar estadísticamente los datos obtenidos	100%	Sin observaciones.
T5. Realizar una jornada de	—	Se generaron resultados

transferencia y difusión		experimentales y articulaciones técnicas; la transferencia formal a actores productivos queda prevista para etapas posteriores (ver sección 5.3.6).
--------------------------	--	---

El desarrollo del OE3 estuvo condicionado principalmente por limitaciones operativas vinculadas a la producción de biomasa de cianobacterias nativas. La obtención de cultivos monoespecíficos y su posterior escalado demandó un tiempo mayor al previsto, lo que dificultó alcanzar volúmenes suficientes para la extracción de metabolitos en las condiciones experimentales requeridas.

En este contexto, y con el objetivo de garantizar la disponibilidad de extractos para el desarrollo de los ensayos, se implementó una estrategia de articulación técnico-logística. El Lic. Rodrigo Maio realizó una estancia técnica en un laboratorio especializado dirigido por el colaborador del proyecto, donde se llevaron adelante las etapas de escalado y obtención del extracto de *Hydrocoryne australis*. Esta instancia fue posible gracias al financiamiento provisto por la Secretaría de Desarrollo Productivo y PyME (Ministerio de Producción y Ambiente del Gobierno de la provincia), lo que permitió asegurar la disponibilidad de biomasa y extracto en tiempo y forma.

Si bien esta estrategia permitió avanzar en la evaluación experimental, implica que los ensayos se realizaron con una cepa de referencia y no con las cianobacterias nativas aisladas en el proyecto, lo que limita la extrapolación directa de los resultados al contexto local.

A partir de los resultados obtenidos, se plantea como principal ajuste metodológico la optimización del sistema de cultivo y escalado de cianobacterias nativas, mediante la mejora de las condiciones de crecimiento (iluminación, aireación y control ambiental), con el objetivo de incrementar la producción de biomasa en volúmenes adecuados para la obtención de extractos. En este sentido, resulta prioritario estandarizar protocolos de crecimiento y cosecha, incluyendo el estudio de las cinéticas de crecimiento de las cepas nativas, lo que

permitirá definir momentos óptimos de recolección y mejorar la reproducibilidad del proceso.

Por otra parte, se prevé avanzar en la caracterización bioquímica de los extractos mediante técnicas analíticas como HPLC, actualmente en desarrollo en la UNTDF, lo que permitirá identificar los compuestos responsables de los efectos observados y fortalecer la interpretación de los resultados experimentales.

Finalmente, se considera fundamental replicar los ensayos realizados utilizando extractos obtenidos a partir de las cianobacterias nativas aisladas en el proyecto, con el objetivo de validar la consistencia de los resultados y evaluar su potencial aplicación en el contexto local.

5.3.6. Comunicación y difusión del proyecto

La comunicación y difusión del proyecto, si bien fueron planificadas como actividades específicas dentro de la *T5 - Realizar una jornada de transferencia y difusión*, constituyen en la práctica un proceso continuo, dinámico y transversal a toda la ejecución. En este sentido, si bien existen instancias formalmente previstas, gran parte de las acciones de vinculación surgieron también como respuesta a demandas espontáneas y oportunidades de interacción con actores del territorio.

En función de ello, se incorporó la participación temprana en espacios de intercambio territorial, con el objetivo de difundir el proyecto desde sus etapas iniciales, presentando sus objetivos, el equipo de trabajo, los avances alcanzados y los resultados esperados. Esta estrategia permitió no solo generar visibilidad, sino también fortalecer vínculos con actores clave y favorecer la articulación para las siguientes fases del proyecto.

En este marco, el 11 de junio de 2025, Noelia Paredes, Macarena Cardozo y Rodrigo Maio presentaron los avances correspondientes al OE1 en la Mesa Ganadera de Tierra del Fuego. En dicha instancia participaron productores ganaderos, asesores agropecuarios, representantes de la Sociedad Rural de Tierra del Fuego, autoridades de la Subsecretaría de Producción y PyME,

personal de las Agencias de Extensión Rural Río Grande y Ushuaia, así como integrantes de la Estación Experimental Agropecuaria Tierra del Fuego, lo que permitió una amplia difusión institucional y territorial.

Posteriormente, el 8 de agosto de 2025, Macarena Cardozo y Rodrigo Maio realizaron una presentación de contextualización de la problemática y de los objetivos del proyecto ante estudiantes de la Universidad Tecnológica Nacional (UTN) Río Grande, en el marco de las Jornadas Regionales de Química organizadas por dicha institución, contribuyendo a la difusión del trabajo en el ámbito académico.

Asimismo, el 23 de septiembre de 2025, en Chincolco (Santiago de Chile), Rodrigo Maio presentó la problemática asociada a *Hieracium pilosella* y los avances del proyecto en la jornada de transferencia *Workshop: Desarrollo de biopolímeros para mitigar la escasez hídrica de la zona*, organizada por el colaborador experto Gabriel Renato Castro en el marco de un proyecto CORFO. Esta instancia permitió posicionar el trabajo en un contexto internacional y fortalecer vínculos científicos.

Finalmente, el 28 de noviembre de 2025, Rodrigo Maio realizó una presentación introductoria sobre la problemática vinculada a *H. pilosella* en el marco de las Jornadas de Agroecología organizadas por la Agencia de Extensión Rural Ushuaia, ampliando la llegada del proyecto a nuevos espacios de comunicación y extensión.

Una vez finalizado el proyecto, se prevé profundizar las acciones de transferencia mediante instancias de difusión dirigidas a productores y público general. En este sentido, se contempla la realización de una jornada abierta que permita socializar los resultados obtenidos, promover el intercambio y orientar futuras líneas de investigación.

Asimismo, se prevé la elaboración de material de difusión en formato accesible (digital y papel) destinado a productores y a los establecimientos que participaron y brindaron apoyo durante el desarrollo del proyecto. En particular, se considera relevante la realización de instancias presenciales de devolución en los establecimientos involucrados, tales como Estancia Cullen y Estancia María Behety, a fin de comunicar los resultados de manera directa.

Por último, se contempla la difusión de los resultados en ámbitos académicos y científicos mediante la participación en congresos, seminarios y jornadas de divulgación, así como a través de la elaboración de publicaciones en revistas especializadas.

6. CONCLUSIONES

El estudio de mecanismos de control biológico de la especie invasora *Hieracium pilosella* mediante la utilización de microorganismos constituye una línea de investigación aún incipiente en la provincia. En este sentido, los análisis realizados permitieron identificar diferencias entre los ambientes evaluados, tanto a nivel edáfico como microbiológico, reconociendo características particulares en algunos sitios.

En particular, aquellos ambientes donde la presencia de *H. pilosella* fue menor presentaron mejores condiciones nutricionales y una mayor abundancia de microorganismos asociados. Entre ellos se destacaron U1 (transición salina) y U5, que mostraron valores elevados de materia orgánica y una importante presencia de micorrizas. Estas características los posicionan como sitios de interés dentro del sistema estudiado, en los cuales se observan condiciones diferenciales respecto del resto de las unidades evaluadas.

A nivel microbiológico, se lograron aislar y reconocer distintos grupos de organismos edáficos de interés, principalmente hongos filamentosos con amplia distribución en suelo, pertenecientes a géneros como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cladosporium* y *Alternaria*, los cuales representaron una proporción importante de la microbiota cultivable obtenida en las distintas unidades de muestreo. Asimismo, se identificó la presencia de micorrizas en todas las unidades de suelo analizadas y en las raíces de las especies vegetales relevadas, incluida *H. pilosella*. Entre las especies micorrícicas se destacó la elevada presencia de *Acaulospora scrobilata*, y una baja abundancia de otras especies como *Gigaspora gigantea* y *Rhizophagus clarus*.

Además, fue posible el aislamiento de cianobacterias locales pertenecientes al orden Nostocales, identificándose preliminarmente tres

morfotipos, entre ellos uno afín a *Anabaena cf. torulosa*. Estos aislamientos se encuentran actualmente en proceso de estabilización en cultivo y se ha iniciado el escalado progresivo de biomasa mediante el ajuste de las condiciones de crecimiento. Este proceso permitió consolidar una línea de trabajo local vinculada al manejo de cianobacterias, sin que las cepas obtenidas hayan sido aún utilizadas para la producción de extractos biológicos.

Los ensayos realizados bajo condiciones controladas evidenciaron un comportamiento diferencial del extracto según la vía de aplicación. En los ensayos en planta, la aplicación en suelo no mostró efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *H. pilosella*, mientras que la aplicación foliar produjo efectos fitotóxicos evidentes, incluyendo daño en hojas, estolones y estructuras reproductivas, así como una disminución en el desempeño reproductivo.

De manera complementaria, los ensayos de germinación acompañaron este comportamiento. En semillas de *H. pilosella* se observó una disminución progresiva del porcentaje de germinación en función de la concentración aplicada, evidenciando una respuesta dosis-dependiente. En contraste, en *Medicago sativa* no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, aunque sí se registraron variaciones a nivel observacional que podrían estar asociadas a limitaciones del diseño experimental.

En conjunto, los resultados obtenidos a partir de los ensayos en planta y de germinación son consistentes entre sí y muestran que el efecto del extracto depende tanto de la concentración como de la forma de aplicación. Bajo condiciones de aplicación en suelo no se registraron efectos inhibitorios, mientras que en condiciones de contacto directo o mayor concentración se observaron efectos fitotóxicos sobre distintos procesos del desarrollo vegetal.

Durante los ensayos también se evidenció la influencia de las condiciones experimentales, particularmente en el caso del invernadero, donde se observaron síntomas asociados a estrés y colonización por microorganismos oportunistas, especialmente en plantas control. La menor incidencia de estos síntomas en plantas tratadas sugiere un posible efecto asociado al tratamiento, aunque no puede establecerse con precisión el mecanismo involucrado a partir de los resultados obtenidos.

La ejecución de este proyecto permitió generar información de base, avanzar en el aislamiento y caracterización de microorganismos, ajustar metodologías experimentales y desarrollar capacidades técnicas vinculadas al manejo de microorganismos y a la evaluación de extractos biológicos.

Es importante destacar, además, que el inicio de este proceso de investigación fue impulsado por Estancia Cullen, que, en la búsqueda de una solución a esta problemática, promovió y facilitó el intercambio público-privado entre los actores involucrados. En este marco, el proyecto fue retomado y ejecutado, dando continuidad a la iniciativa original.

Asimismo, se establecieron las condiciones iniciales para la continuidad de estudios vinculados al uso de microorganismos nativos en el manejo de *H. pilosella*, integrando la información generada sobre suelos, microbiota y respuesta biológica de la especie bajo distintas condiciones experimentales.

7. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en el presente proyecto abren nuevas líneas de investigación orientadas al desarrollo de herramientas biológicas para el manejo sustentable de *Hieracium pilosella* en la provincia de Tierra del Fuego. No obstante, el trabajo realizado también permitió identificar una serie de limitaciones y vacíos de información que deberán ser abordados en futuras etapas para dar continuidad al enfoque propuesto.

En relación con la *caracterización de la microbiota edáfica*, resulta necesario continuar con la identificación taxonómica y molecular de los microorganismos aislados, particularmente en aquellos casos donde la resolución fue limitada, como ocurre con las bacterias de suelo. Asimismo, será fundamental avanzar en la evaluación específica de su capacidad antagonista mediante ensayos en condiciones controladas de invernadero y, posteriormente, a campo.

En cuanto al estudio de *cianobacterias*, se considera prioritario avanzar en la utilización de las cepas locales aisladas en el marco del proyecto. Hasta el

momento, los ensayos realizados se basaron en extractos obtenidos a partir de una especie no nativa (*Hydrocoryne australis*), lo que limita la extrapolación de los resultados al contexto local. En este sentido, será necesario continuar con los procesos de estabilización, escalado de biomasa y posterior obtención de extractos a partir de las cepas fueguinas, para su evaluación en los distintos sistemas experimentales.

Un aspecto central que surge a partir de los resultados obtenidos es la necesidad de profundizar en la *caracterización química del extracto* utilizado. La ausencia de información sobre la composición del extracto empleado en los ensayos limita la posibilidad de confirmar o descartar las hipótesis planteadas en relación con su modo de acción. En este sentido, resulta necesario avanzar en la identificación de los metabolitos presentes, así como en la comprensión de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos involucrados en los efectos observados sobre crecimiento, reproducción y germinación.

En línea con esto, se considera particularmente relevante *optimizar los procesos de purificación y dosificación de los extractos*, con el objetivo de reducir la complejidad composicional y mejorar la interpretación de los resultados. Asimismo, se plantea la necesidad de avanzar en el desarrollo de formulaciones que permitan potenciar su efecto de contacto, mejorar su estabilidad y persistencia, y optimizar su eficiencia de aplicación en condiciones reales.

A *nivel experimental*, resultará fundamental continuar evaluando distintas concentraciones, modos y momentos de aplicación, así como la frecuencia de uso del extracto, con el objetivo de determinar las condiciones más adecuadas para maximizar su potencial como bioherbicida. En este sentido, considerando que los ensayos realizados evidenciaron efectos significativos sobre diversos aspectos vinculados a las estrategias reproductivas de *Hieracium pilosella* (como la producción de estolones, el número de flores, la maduración de las estructuras reproductivas y la viabilidad de las semillas obtenidas a partir de plantas tratadas), resulta relevante incorporar el análisis del efecto del tratamiento sobre la cantidad total de semillas producidas por planta. Este aspecto permitiría profundizar la comprensión del impacto del extracto sobre la capacidad reproductiva de la especie, integrando variables de reproducción tanto vegetativa como sexual. Asimismo, el estudio de la producción total de semillas

podría constituir un elemento clave para evaluar el potencial efecto del extracto sobre la dinámica poblacional de la maleza a mediano y largo plazo.

Contar con información integral sobre los efectos del tratamiento en los diferentes mecanismos reproductivos de *H. pilosella* aportará herramientas valiosas para el diseño de estrategias de manejo y control más eficientes y sostenibles. Estos estudios deberán complementarse con ensayos en condiciones de invernadero y a campo, que permitan validar los resultados en escenarios más próximos a las condiciones reales de manejo.

Por otra parte, el proyecto evidenció la necesidad de profundizar el trabajo con *otros grupos de microorganismos aislados*. En este sentido, la articulación establecida con el equipo especializado en *micorrizas y hongos edáficos* del Instituto Spegazzini representa una oportunidad de alto valor para la continuidad del trabajo. La experiencia de este grupo en aislamiento, identificación y conservación de cepas, junto con la disponibilidad de un cepario consolidado, constituye una plataforma clave para avanzar en estudios de antagonismo y en la caracterización funcional de nuevos microorganismos. La *incorporación de nuevos integrantes* y el fortalecimiento de esta línea permitirán replicar y ampliar el enfoque desarrollado con cianobacterias hacia otros grupos microbianos de interés.

El abordaje de este tipo de sistemas microbiológicos requiere de un *equipo interdisciplinario y con mayor capacidad operativa*. Por ello, se considera necesario fortalecer el equipo de trabajo mediante la incorporación de nuevos integrantes con formación específica, lo que permitirá mejorar la dinámica de trabajo y ampliar el enfoque metodológico. Asimismo, se plantea como una línea de acción relevante la generación de espacios de formación de recursos humanos locales, a través de la incorporación de estudiantes en prácticas profesionales supervisadas, trabajos finales de grado y posgrado, y otras instancias de capacitación.

En términos operativos, resulta fundamental *fortalecer la infraestructura disponible*, particularmente en lo referido a sistemas de cultivo y escalado de microorganismos. Las limitaciones actuales en la producción de biomasa condicionan el alcance de los ensayos realizados, por lo que será necesario

gestionar nuevas fuentes de financiamiento que permitan ampliar la capacidad instalada y superar las restricciones vinculadas a los volúmenes de trabajo.

Asimismo, se considera clave continuar y *fortalecer la articulación con otros actores del sistema científico-tecnológico*, incluyendo INTA, CADIC-CONICET, UTN, UNTDF, la Universidad Nacional de La Plata y otros grupos de trabajo, lo que permitirá complementar capacidades, acceder a nuevas metodologías y sostener el desarrollo de las distintas líneas de investigación.

En este marco, resulta igualmente importante *fortalecer la vinculación con productores ganaderos*, promoviendo la generación de espacios de trabajo conjunto e intercambio de experiencias, e incorporándose activamente en el proceso de desarrollo de estas herramientas. La participación del sector productivo permitirá ajustar las estrategias evaluadas a las condiciones reales de manejo, identificar limitaciones operativas y orientar las líneas de investigación en función de las demandas concretas del territorio, favoreciendo una mayor apropiación de los resultados y su eventual implementación.

Finalmente, la continuidad del proyecto permitirá no solo profundizar el conocimiento generado, sino también aportar información relevante para el diseño de futuros planes de manejo de *Hieracium pilosella* a nivel provincial, integrando herramientas biológicas en estrategias más amplias de manejo de especies invasoras. En este proceso, el fortalecimiento de las capacidades técnicas del equipo y la consolidación de líneas de trabajo locales resultan aspectos clave para avanzar hacia el desarrollo de soluciones adaptadas al contexto regional.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aagesen, D. (2000). Crisis and conservation at the end of the world: sheep ranching in Argentine Patagonia. *Environmental Conservation*, 27(2), 208-215.

Al-Shaarani, A. A. Q., & Pecoraro, L. (2024). Pathogenic airborne fungi and bacteria in different environments. *Frontiers in Microbiology*, 15. DOI:

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1428415>

- Anchorena, J., Cingolani, A., Livraghi, E., Collantes, M. B., & Stoffella, S. (2001). Manejo del pastoreo de ovejas en Tierra del Fuego. Conicet-INTA, Buenos Aires.
- Aryal, S. (2022). Plate Count Agar (PCA)-Composition, Principle, Preparation, Results, Uses. *Microbe Notes. Consultado le*, 2, 07-22.
- Bakker, P. A. H. M., Pieterse, C. M. J., & de Jonge, R. (2020). The soil-borne legacy. *Cell*, 172(6), 1178–1180. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.024>
- Braun, K. (2009). Efectos del pastoreo, el ambiente y las invasiones sobre procesos de la estepa fueguina. [Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires].
- Berry, J. P., Gantar, M., Perez, M. H., Berry, G., y Noriega, F. G. (2008). Cyanobacterial Toxins as Allelochemicals with Potential Applications as Algaecides, Herbicides and Insecticides. *Marine Drugs*, 6(2), 117–146.
- Bewley, J. D., & Black, M. (1994). Seeds: Physiology of Development and Germination (2nd ed.). Plenum Press, New York, NY. ISBN 0-306-44747-9 (hardcover); ISBN 0-306-44748-7 (paperback).
- Bishop, G. F., & Davy, A. J. (1994). Biology of *Hieracium pilosella* L. *Journal of Ecology*, 82(1), 195–210. <https://doi.org/10.2307/2261390>
- Brillisauer, K., Rapp, J., Rath, P., Schöllhorn, A., Bleul, L., Weiß, E., Stahl, M., Grond, S., y Forchhammer, K. (2019). Cyanobacterial antimetabolite 7-deoxy-sedoheptulose blocks the shikimate pathway to inhibit the growth of prototrophic organisms. *Nature Communications*, 10(1), 545.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., & Malajczuk, N. (1996). *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture*. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR Monograph 32).
- Carmichael, J.W., Bryce Kendrick, W., Connors, I.L. y Sigler, L. 1980. Genera of Hyphomycetes. The University of Alberta Press, Edmonton, Alberta Canadá. 386pp.
- Carrillo-Saucedo, Silvia Margarita, Puente-Rivera, Jonathan, Montes-Recinas, Saraí, & Cruz-Ortega, Rocío. (2022). Las micorrizas como una herramienta para la restauración ecológica. *Acta botánica mexicana*, (129) <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.1932>
- Cabrera, G. L. J., Paredes, N. D. V., Guerrero, J. N. Q., & Batista, R. M. G. (2023). Evaluación de la supervivencia de Microorganismos eficientes aplicados en el suelo del cultivo Banano orgánico. *Revista Científica Agroecosistemas*, 11(3), 68-75.4
- Charoenying, P., Laosinwattana, C., y Chotsaeng, N. (2022). The Allelopathic Activity of Extracts and Isolated from *Spirulina platensis*. *Molecules*, 27(12), 3852.
- Charoenying, P., Pathom-aree, W., & Lumyong, S. (2022). Cyanobacterial metabolites as bioherbicides and their potential agricultural applications. *Plants*, 11(4), 512. <https://doi.org/10.3390/plants11040512>
- Cingolani, A. M. (1999). Efectos de 100 años de pastoreo ovino sobre la vegetación y suelos del norte de Tierra del Fuego. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3101_Cingolani.pdf

Cipriotti, P. A., Collantes, M. B., Escartín, C., & Anchorena, J. (2010). Does drought enhance the negative effects of exotic plant invasion on native plant communities? *Journal of Vegetation Science*, 21(5), 1005–1018. <https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2010.01213.x>

Cipriotti, P. A., Collantes, M., Rauber, R., Brain, K., De la Peña, G., Escartin, C., Arriaga, M., Stampacchio, M., Jacob, M., Livraghi, E., & Sampedro, C. (2006). Invasión de *Hieracium pilosella* L. (Asteraceae) en pastizales de Tierra del Fuego: Factores asociados y posibilidad de manejo. Consejo Federal de Inversiones.

Cipriotti, P. A., Rauber, R. B., Collantes, M. B., & Anchorena, J. (2014). Invasion of *Hieracium pilosella* and its effects on plant community composition in Tierra del Fuego. *Biological Invasions*, 16, 145–156. <https://doi.org/10.1007/s10530-013-0507-7>

Ciarlo E. A, Muschietti M. D. P., Peralta N. Comparín M., Gregorini F., Cipriotti P. A. & Giuffrè L. (2020). Variabilidad espacial de propiedades del suelo: Efecto del uso y tipo. *Ciencia del Suelo (Argentina)*, 38 (2): 249-261.

Collantes, M. B., Anchorena, J., & Cingolani, A. (2005). Grazing effects on vegetation heterogeneity in Tierra del Fuego grasslands. *Ecología Austral*, 15(2), 189–200.

Connor, H. E. (1964). Tussock grasslands and mountain lands institute review. *Proceedings of the New Zealand Ecological Society*, 11, 45–52.

Connor, H. E. (1965). The botany of change in tussock grasslands. *Proceedings of the New Zealand Ecological Society*, 12, 18–24.

Connor, H. E. (1992). *The botany of change in tussock grasslands*. Lincoln University Press.

Cooke, M. M. (2025). ¿Qué mecanismos determinan el éxito en plantas invasoras? Estudio sobre la alelopatía, la competencia y los controladores abióticos de la especie invasora *Hieracium pilosella* L. [Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires]. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

Covacevich, N. (2001). *Malezas invasoras de praderas patagónicas de Chile*. INIA Kampenaike.

Covacevich, N. (2009). Efecto del pastoreo sobre la expansión vegetativa de *Hieracium pilosella*. *Boletín INIA*, 185, 33–41.

DeBach, P. (1964). *Biological control of insect pests and weeds*. Chapman & Hall.

Di Ciocco C. A., Sandler R. V., Falco L. B & Coviella C. E., 2014. Actividad microbiológica de un suelo sometido a distintos usos y su relación con variables físico-químicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo*, 46(1):73-85.

Djemiel, C., Dequiedt, S., Horrigue, W., Bailly, A., Lelièvre, M., Tripied, J., Guillard, C., Perrin, S., Comment, G., Saby, N. P. A., Jolivet, C., Bispo, A., Boulonne, L., Pierart, A., Wincker, P., Cruaud, C., Maron, P.-A., Terrat, S., & Ranjard, L. (2024). Unraveling biogeographical patterns and environmental drivers of soil fungal diversity at the French national scale. *SOIL*, 10, 251–273. <https://doi.org/10.5194/soil-10-251-2024>

Domsch, K.H., Gams, W. & Anderson, T.H. 2003. Compendium of soil fungi. Academic Press, New York, NY, USA.

Duncan, R. P., Colhoun, K., & Foran, B. D. (1997). The distribution and abundance of *Hieracium pilosella* in New Zealand grasslands. *New Zealand Journal of Ecology*, 21(1), 23–29.

Egidi E, Delgado-Baquerizo M, Plett JM, Wang J, Eldridge DJ, Bardgett RD, Maestre FT, Singh BK. A few Ascomycota taxa dominate soil fungal communities worldwide. *Nat Commun*. 10(1):2369. doi: 10.1038/s41467-019-10373-z.

Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes Ed. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England 608 pp.

Fan, J., & Harris, W. (1996). Growth and nitrogen uptake by *Hieracium pilosella* in nutrient pulses. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 39(2), 263–269.

Fenner, M. (1991). The effects of the parent environment on seed germinability. *Seed Science Research*, 1, 75–84. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0960258500000696>

Finkelstein, R. R., & Lynch, T. J. (2000). Absciscic acid inhibition of radicle emergence but not seedling growth is suppressed by sugars. *Plant Physiology*, 122(4), 1179–1186. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1179>

Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15, 579–590. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>

Genuário D., Machado Correa D., Komárek J. Fiore M. F., 2013. Characterization of freshwater benthic biofilm-forming *Hydrocoryne* (Cyanobacteria) isolates from Antarctica. *Journal of Phycology*, 49(6): 1142-53. doi: 10.1111/jpy.12124

Ghiaie Asl, I., Motamedi, M., Shokuhi, G. R., et al. (2017). Molecular characterization of environmental *Cladosporium* species. *Current Medical Mycology*, 3(1), 1–5. DOI: <https://doi.org/10.29252/cmm.3.1.1>

Guigard, L., Nazaret, F., Almario, J., et al. (2025). Microbial ecology and plant health under environmental stress. *Journal of Applied Microbiology*, 136(7). DOI: <https://doi.org/10.1093/jambio/ixaf168>

Gleason, F. K., y Case, D. E. (1986). Activity of the Natural Algicide, Cyanobacterin, on Angiosperms. *Plant Physiology*, 80(4), 834–837

Grime, J. P. (1977). Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *The American Naturalist*, 111(982), 1169–1194.

Hossain, M.M.; Sultana, F.; Mostafa, M.; Rubayet, M.T.; Mishu, N.J.; Khan, I.; Mostofa, M.G. Biological Management of Soil-Borne Pathogens Through Tripartite Rhizosphere Interactions with Plant Growth-Promoting. *Fungi. Appl. Microbiol.* 2025, 5, 123. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol5040123>

- Inderjit, & Callaway, R. M. (2003). Experimental designs for the study of allelopathy. *Plant and Soil*, 256, 1–11. <https://doi.org/10.1023/A:1026202216679>
- Jarvis, B. (1973). Comparison of an improved rose bengal-chlortetracycline agar with other media for selective isolation and enumeration of moulds and yeasts in foods. *Journal of Applied Bacteriology*, 36(4), 723–727. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1973.tb04149.x>
- Kjeldahl, J. (1883). "A New Method for the Determination of Nitrogen in Organic Matter." *Zeitschrift für Analytische Chemie*, 22, 366–382.
- Koodkaew, I., Sunohara, Y., Matsuyama, S., & Matsumoto, H. (2012). Phytotoxic action mechanism of hapalocyclamide in lettuce seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 58, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.06.002>.
- Kollmen, J., & Strieth, D. (2022). The beneficial effects of cyanobacterial co-culture on plant growth. *Life*, 12(2), 223. DOI: <https://doi.org/10.3390/life12020223>
- Komárek, J. 2013. Cyanoprokaryota 3. Teil: Heterocystous genera. En: Büdel, B., Gärtner, G., Krienitz, L. y Schagerl, M. (eds.), Süßwasserflora von Mitteleuropa, Vol. 19/3. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J., & Johansen, J. R. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*, 86(4), 295–335.
- Kour, D., Rana, K. L., Yadav, N., Yadav, A. N., Kumar, M., & Singh, B. (2021). Microbiome as a key player in sustainable agriculture and weed management. *Sustainability*, 13(4), 2228. <https://doi.org/10.3390/su13042228>
- Kremer, R. J. (2006). Weed management and the rhizosphere microbial community. *Journal of Nematology*, 38(3), 282–287.
- Kvalseth, T. O. (2024). Diversity analysis: richness versus evenness. *Ecology and Evolution*, 14(9), e70275. <https://doi.org/10.1002/ece3.70275>
- Latz, E., Eisenhauer, N., Rall, B. C., Allan, E., Roscher, C., Scheu, S., & Jousset, A. (2012). Plant diversity improves protection against soil-borne pathogens by fostering antagonistic bacterial communities. *Journal of Ecology*, 100(3), 597–604. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2011.01940.x>
- Lecuona, R. E. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Ed. Buenos Aires, Argentina: Talleres gráficos Mariano Mas.
- Ledezma Saucedo, L. A. (2024). Eficiencia de insumos biológicos comerciales en el desarrollo y rendimiento de la lechuga trocadero (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*) comparada con un cultivo artesanal de microorganismos eficientes [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza]. Repositorio UNAM.
- Liu S, Xiong C, Lin L, Keyhani NO, Zhu M, Zhao Z, Zhang W, Yang C, Su H, Liu P, Guan X and Qiu J, 2023. Assessing the structure and diversity of fungal community in plant

soil under different climatic and vegetation conditions. *Front. Microbiol.* 14:1288066. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1288066>

Livraghi, E., Anchorena, J., & Collantes, M. B. (1998). Primer registro de *Hieracium pilosella* L. en Tierra del Fuego (Argentina). *Anales del Instituto de la Patagonia*, 26, 85–88.

Ma, J., Chai, A., Shi, Y., et al. (2025). Diurnal release of airborne pathogen spores in greenhouses. *Advanced Science*. DOI: <https://doi.org/10.1002/advs.202501500>

Magurran, A. E. (2004). *Measuring Biological Diversity*. Oxford: Blackwell Publishing.

Makepeace, W., Dobson, A. T., & Scott, D. (1985). Interference phenomena due to mouse-ear and king devil hawkweeds. *New Zealand Journal of Botany*, 23(1), 79–90.

Mishra, S., Srivastava, A., Singh, A., et al. (2024). Fungi–plant interactions under environmental constraints. *Frontiers in Fungal Biology*, 5. DOI: <https://doi.org/10.3389/ffunb.2024.1363460>

Moretto, A. S., Pancotto, V., Escobar, J., Mansilla, R., & Cipriotti, P. (2018). Impacto de *Hieracium pilosella* sobre propiedades físicas y químicas del suelo. XXVI Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo.

Murali M, Naziya B, Ansari MA, Alomary MN, AlYahya S, Almatroudi A, Thriveni MC, Gowtham HG, Singh SB, Aiyaz M, Kalegowda N, Lakshmidevi N, Amruthesh KN. Bioprospecting of Rhizosphere-Resident Fungi: Their Role and Importance in Sustainable Agriculture. *J Fungi (Basel)*18;7(4):314. doi: 10.3390/jof7040314. Neogen Corporation. (2020). *Potato Dextrose Agar (NCM0018), Technical Specification Sheet* (Rev. 3). Neogen Corporation. <https://www.neogen.com/categories/culture-media/potato-dextrose-agar/>

Paerl, H. W., Otten, T. G., & Kudela, R. (2013). Mitigating the expansion of harmful algal blooms across the freshwater-to-marine continuum. *Environmental Science & Technology*, 47(10), 5519–5529. <https://doi.org/10.1021/es303988g>

Parkinson, D. y Williams, S.T. 1961. A method for isolating fungi from soil microhabitats. *Plant and Soil* 13: 347-355.

Perera, R. M. T. D., Herath, K. H. I. N. M., Sanjeewa, K. K. A., & Jayawardena, T. U. (2023). Recent reports on bioactive compounds from marine cyanobacteria in relation to human health applications. *Life*, 13(6), 1411. DOI: <https://doi.org/10.3390/life13061411>

Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158–161. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)

Poudel, M., Mendes, R., Costa, L. A. S., et al. (2021). The role of plant-associated microorganisms in stress mitigation. *Frontiers in Microbiology*, 12, 743512. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.743512>

Raghavan, C., Ong, E. K., Dalling, M. J., & Stevenson, T. W. (2006). Regulation of genes associated with auxin, ethylene and ABA pathways by 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in *Arabidopsis*. *Functional & integrative genomics*, 6(1), 60–70.

Righini, H., Francioso, O., Martel Quintana, A., & Roberti, R. (2022). Cyanobacteria: A natural source for controlling plant diseases and improving plant growth. *Horticulturae*, 8, 58. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae8010058>

Rose, A. B., Frampton, C. M., & Sheppard, A. W. (1998). The biology of Canadian hawkweeds in New Zealand. *Proceedings of the New Zealand Plant Protection Conference*, 51, 23–27.

Schulte E. E. & Hopkins B. G. (1996). Estimation of soil organic matter by weight loss-on-ignition. In F. R. Magdoff, M. A. Tabatabai, & E. A. Hanlon Jr. (Eds.), *Soil organic matter: Analysis and interpretation* (pp. 21–31). Soil Science Society of America. (SSSA Special Publication No. 46). <https://doi.org/10.2136/sssaspecpub46.c3>

Sergeeva, E., Liaimer, A., & Bergman, B. (2002). Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta*, 215(2), 229–238.

Shen C, Wang J, He JZ, Yu FH, Ge Y. Plant Diversity Enhances Soil Fungal Diversity and Microbial Resistance to Plant Invasion. *Appl Environ Microbiol*. 2021 May 11;87(11):e00251–21.

Singh, S., Kate, B. N., & Banerjee, U. C. (2005). Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(3), 73–95. DOI: <https://doi.org/10.1080/07388550500248498>

Singh, J. S., Kumar, A., Rai, A. N., & Singh, D. P. (2016). *Cyanobacteria: A precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 529.

Singh, J. S., Kumar, A., Rai, A. N., & Singh, D. P. (2020). Cyanobacteria: A precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1910. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01910>

Sheppens, P. C. (1994). *Fortpflanzung und Ausbreitung von Hieracium pilosella*. Universität Zürich.

Soriano, A., & Sala, O. E. (1983). *Ecological strategies in a Patagonian arid steppe*. *Vegetatio*, 56, 9–15.

Sukkhaeng, S., Sanevas, N., & Suwanwong, S. (2015). Nostoc sp. extract induces oxidative stress-mediated root cell destruction in *Mimosa pigra* L. *Botanical Studies*, 56(1), Artículo 3. <https://doi.org/10.1186/s40529-014-0081-3>

Treskonova, M. (1991). Changes in the structure of tall tussock grasslands induced by *Hieracium pilosella*. *New Zealand Journal of Ecology*, 15(1), 65–78.

Valle F. M., Castellari C., Andreoli Y., Diaz Delfino A. y Picone L., 2022. Abundancia y distribución de la microbiota modificada por el uso del suelo en el sudeste bonaerense. *Rev. Facultad de Agronomía UBA*, 42 (1) 15-25.

- Van der Heijden, M. G. A., Bardgett, R. D., & van Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11(3), 296–310. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x>
- Vander Kloet, S. P. (1978). The biology of Canadian weeds: *Hieracium pilosella*. *Canadian Journal of Plant Science*, 58(2), 401–405
- Voss, E. G., & Böhlke, J. R. (1978). *Flora of North America and adjacent regions*. New York Botanical Garden.
- Wang, X., Chi, Y., & Song, S. (2024). Important soil microbiota effects on plants and soils: a systematic review. *Frontiers in Microbiology*, 15. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1347745>
- Wanwan Yu, Hua Xing, Chunchun Wang, Xinyue Cui, Xian Wu, Yu Li (2024). Assessing soil fungal diversity under different sampling schemes in conjunction with remote sensing technologies in a subtropical forest. *Geoderma*, Volume 450, 117058. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2024.117058>
- Weigel, D., & Glazebrook, J. (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Widden, P. y Parkinson, D. 1973. Fungi from Canadian coniferous forest soils. *Canad. J. Bot.* 51: 2275-2290.
- Winkler, E., & Stöcklin, J. (2002). Sexual and vegetative reproduction of *Hieracium pilosella* in relation to habitat conditions. *Plant Ecology*, 161, 287–296.

9. ANEXOS

ANEXO I - MONITOREO DE LÍNEA BASE ASOCIADO A LOS TRATAMIENTOS IMPLEMENTADOS EN LA CLAUSURA DE ESTANCIA CULLEN

Durante la primavera de 2024 se estableció una clausura mediante alambrado permanente en Estancia Cullen (Tierra del Fuego AIAS), abarcando una superficie de 15x16m, caracterizada por una alta cobertura de *Hieracium pilosella*. La implementación de la clausura tuvo como finalidad generar un área controlada para la realización de ensayos exploratorios de control de la especie, mediante la aplicación de extractos de origen biológico.

Las actividades se desarrollaron en el marco de un proyecto de carácter privado llevado adelante por la Estancia Cullen, con asesoramiento técnico-profesional del Lic. Gabriel Renato Castro y del Ing. Agr. Enrique Frers, y con la colaboración institucional del INTA, a través de las Agencias de Extensión Rural de Río Grande y Ushuaia, en tareas de acompañamiento técnico y monitoreo.

En el mes de noviembre de 2024, la superficie clausurada fue subdividida en siete parcelas de 2mx16m (Fig. 65) sobre las que se implementaron los tratamientos descritos en la tabla 4.

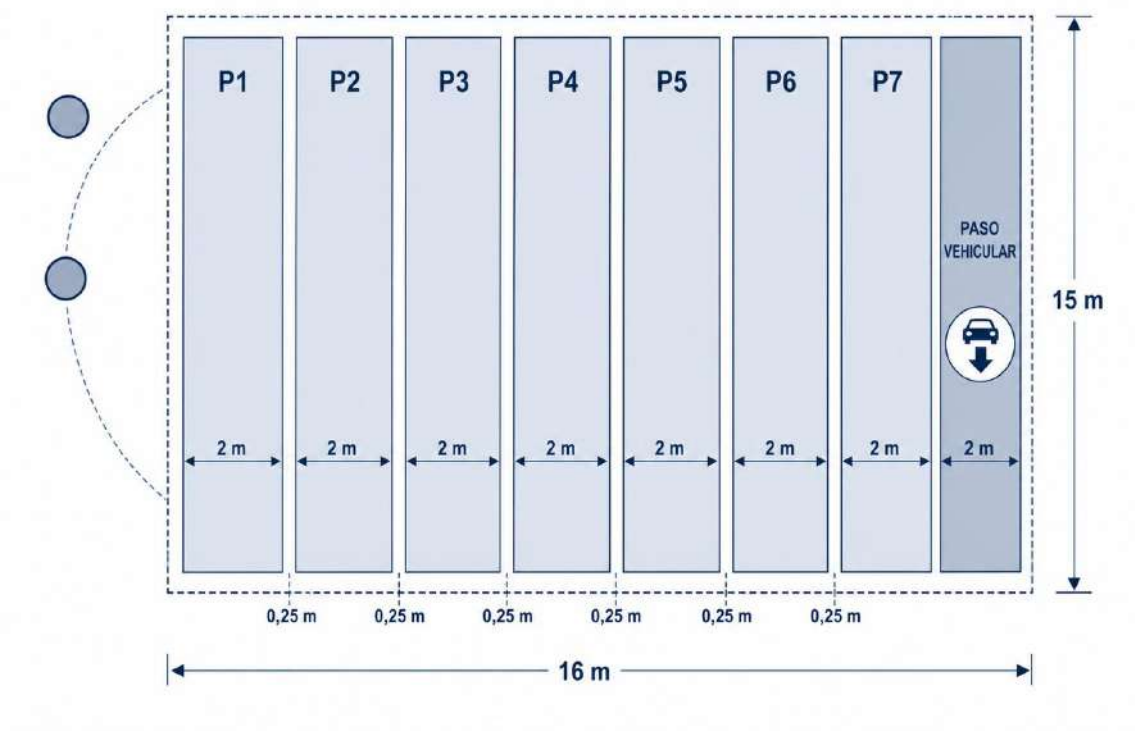


Figura 65: Diseño del ensayo de control de *Hieracium pilosella* implementado en 2024, en una clausura (15mx16m) ubicada en Estancia Cullen (Tierra del Fuego AIAS). **P1:** tratamiento con picloram. **P2:** tratamiento con enzima “Celusol 40M”. **P3:** tratamiento con enzima “SOLQUIM”. **P4:** tratamiento con mezcla de enzimas. **P5 y P6:** tratamiento con péptidos de la cianobacteria *Hydrocoryne australis*. **P7:** control.

Tabla 14. Tratamientos, productos comerciales y dosis aplicadas en una clausura experimental de la Estancia Cullen (Tierra del Fuego AIAS; primavera 2024) para el control exploratorio de *Hieracium pilosella*.

PARCELA	TRATAMIENTO	PRODUCTO COMERCIAL	DOSIS
P1	Picloram	GLORIUS MYL	1,9 l/ha
P2	Enzima 1	CELUSOL 40M	3,125 g/m²
P3	Enzima 2	SOLQUIM	1,56 ml/m²
P4	Mezcla de enzimas	CELUSOL 40M + SOLQUIM	3,33 g/m²
P5	Péptido	Extracto de <i>Hydrocoryne australis</i>	7,8 ml/m²
P6	Péptido + Coadjuvante	Extracto de <i>Hydrocoryne australis</i> + Ligier Grass bio	7,8 ml/m² + 0,16 ml/m²

P7	Control		
----	---------	--	--

Previo a la aplicación de los productos, el día 04/11 se estableció una línea base para cada parcela, con el objetivo de caracterizar el estado inicial de la vegetación. La metodología consistió en el tendido de una cuerda a lo largo de la superficie a evaluar, utilizada como transecta de referencia. Sobre dicha línea se definieron puntos de muestreo cada 15 cm, en los que se registraron en planillas las especies presentes.

Posteriormente, esta información fue utilizada para el cálculo de índices de diversidad, los que permitieron estimar riqueza, diversidad y equidad en su distribución.

A continuación, en la tabla 15 se describen los índices calculados.

Tabla 15. Índices ecológicos utilizados para el análisis de diversidad y equidad de especies.

ÍNDICE	DESCRIPCIÓN	FÓRMULA	ELEMENTOS
ÍNDICE DE SHANNON (H')	Mide la diversidad considerando tanto el número de especies como la abundancia relativa de cada una. Valores altos de H' indican comunidades más diversas, con una distribución más equilibrada de los individuos y menor dominancia de una sola especie.	$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln(p_i)$	S = número de especies p_i = proporción de individuos de la especie i respecto del total de individuos de la muestra ln(p_i) = logaritmo natural de p _i .
ÍNDICE DE PIELOU (J)	Mide la equidad o uniformidad en la distribución de los individuos entre las especies presentes. Se deriva del índice de Shannon y permite evaluar cuán cercana es la comunidad a una distribución perfectamente equitativa.	$J = \frac{H'}{\ln(S)}$	H' = índice de Shannon S = número total de las especies.

RESULTADOS

Cabe señalar que, si bien en los muestreos iniciales se evaluaron la totalidad de las parcelas de la clausura experimental, en la presente campaña el relevamiento se efectuó únicamente sobre cuatro parcelas, correspondientes a las transectas L1, L5, L6 y L7. Esta decisión se adoptó siguiendo la recomendación del colaborador experto G. Castro, dado que en los muestreos preliminares no se habían detectado diferencias significativas entre parcelas sometidas a tratamientos equivalentes.

En consecuencia, en el presente anexo se comparan exclusivamente los resultados correspondientes a dichas transectas, en función de los criterios metodológicos definidos para esta etapa del ensayo y con el objetivo de optimizar el esfuerzo de muestreo sin comprometer la representatividad de la información obtenida. Asimismo,

los resultados se comunican a partir de la comparación entre los datos obtenidos en las fechas de relevamiento previo (4/11/24) y posterior (6/12/25) a la aplicación de los tratamientos.

- **Análisis de riqueza, composición florística y diversidad**

El relevamiento de la línea base realizado en las transectas L1, L5, L6 y L7 permitió caracterizar la estructura inicial de la vegetación en la clausura experimental de Estancia Cullen, en términos de riqueza específica y abundancia total de individuos, previo a la aplicación de los distintos tratamientos (tabla 16). Posteriormente, los mismos parámetros fueron evaluados en dichas transectas durante el muestreo post-tratamientos, lo que posibilita comparar la dinámica temporal de las comunidades vegetales bajo diferentes condiciones (tabla 17), así como los cambios en la composición florística relativa observada en cada transecta (Fig. 66, 67, 68 y 69) y en el índice de diversidad de Shannon (Fig. 70).

El índice de equidad de Pielou (J) fue calculado como complemento del índice de Shannon (H'), con el fin de evaluar los cambios en la distribución relativa de los individuos entre especies, particularmente en relación con la dominancia de *Hieracium pilosella*. No obstante, el análisis comparativo se centró principalmente en el índice de Shannon y en la riqueza específica como descriptores principales de la diversidad, dado que el primero integra simultáneamente los efectos de la riqueza y de la dominancia relativa de las especies.

En la *transecta* L1, correspondiente al tratamiento con Picloram, se observó un incremento de la riqueza específica de 5 especies en el muestreo previo (Tabla 16) a 8 especies en el muestreo posterior (Tabla 17), acompañado por un aumento leve en la abundancia total de individuos, de 88 a 94 plantas, respectivamente (Tablas 16 y 17). Este cambio estructural se refleja además en una marcada modificación de la composición florística (Fig. 66): *Hieracium pilosella*, que representaba una proporción dominante de los registros en noviembre de 2024 ($\approx 11,6\%$), no fue registrada en el muestreo de diciembre 2025; mientras que *Festuca gracillima* incrementó notablemente su proporción relativa, pasando a constituir la especie más frecuente. Asimismo, se incorporaron especies de los géneros *Poa*, *Luzula* y *Trisetum*, indicando un proceso de recolonización posterior al tratamiento con herbicida.

Este proceso se tradujo en un aumento sustancial de la diversidad comunitaria, con un incremento del índice de Shannon de 1,19 a 1,59 luego de la aplicación de Picloram (Fig. 66), lo que refleja no sólo un mayor número de especies, sino también cambios en la estructura comunitaria tras la eliminación de la especie dominante.

La *transecta* L5, tratada con extracto de *Hydrocoryne australis*, presentó el cambio más pronunciado, con un aumento de la riqueza específica de 7 especies en la línea base (Tabla 16) a 12 especies en el muestreo posterior (Tabla 17), y un incremento en la abundancia total de individuos de 103 a 138 plantas (Tablas 16 y 17). No obstante, el análisis de la composición florística muestra que este incremento no estuvo asociado a una reducción de la especie objetivo (Fig. 67): *Hieracium pilosella* mantuvo proporciones relativas muy similares antes y después del tratamiento ($\approx 17\%$), conservando su condición de especie dominante. Paralelamente, se observó una mayor frecuencia relativa de especies como *Cerastium arvensis*, *Colobanthus* sp., *Poa ligularis* y *Poa* sp.,

lo que explica el aumento de la riqueza específica. En concordancia con este patrón, el índice de Shannon aumentó de 1,03 a 1,36 (Fig. 70), indicando un incremento moderado de la diversidad comunitaria, impulsado principalmente por la incorporación de nuevas especies, aunque sin una reorganización sustancial de la estructura jerárquica de la comunidad.

En la *transecta* L6, correspondiente al tratamiento con extracto de *H. australis* combinado con coadyuvante, se registró una disminución de la riqueza específica de 12 especies en el muestreo previo (Tabla 16) a 8 especies en el muestreo posterior (Tabla 17), junto con un leve aumento en el número total de individuos, de 116 a 122 plantas (Tablas 16 y 17). Esta reducción comunitaria se refleja claramente en la composición florística (Fig. 68): aunque *Hieracium pilosella* redujo su proporción relativa de 20,3% a 15,9%, continuó siendo la especie dominante. Al mismo tiempo, varias especies presentes en la línea base dejaron de registrarse en el muestreo posterior.

A pesar de la pérdida de especies, el índice de Shannon se mantuvo prácticamente estable (1,06 en 2024 y 1,09 en 2025; Fig. 66), lo que indica que la diversidad efectiva de la comunidad no varió de manera significativa, debido a una distribución algo más homogénea de los individuos entre las especies remanentes.

Por su parte, la *transecta* L7, correspondiente al control sin aplicación de productos, mostró una estructura relativamente estable entre ambos muestreos, con un incremento marginal en el número de especies, de 11 en la línea base (Tabla 16) a 12 en el muestreo posterior (Tabla 17), y una abundancia prácticamente constante, de 132 a 131 individuos (Tablas 16 y 17). Sin embargo, a nivel composicional se observó una disminución moderada en la proporción relativa de *Hieracium pilosella* (de $\approx 19,8\%$ a $\approx 15,5\%$), junto con un incremento en la frecuencia relativa de especies como *Colobanthus* sp., *Festuca gracillima* y algunas Poaceae (Fig. 65). En concordancia, el índice de Shannon aumentó de 1,27 a 1,42 (Fig. 66), reflejando un incremento moderado de la diversidad comunitaria atribuible a procesos naturales de reorganización de la comunidad, sin intervención directa. Este comportamiento sugiere que, aún en ausencia de intervención, se producen fluctuaciones naturales en la dominancia relativa de las especies, sin alterar sustancialmente la estructura general de la comunidad. En este sentido, se sugiere también que las variaciones observadas en las demás transectas se asocian principalmente a los efectos de los tratamientos aplicados y no a una dinámica natural homogénea del sistema.

Consideradas en conjunto, las cuatro transectas pasaron de un total de 439 individuos registrados en el muestreo previo (Tabla 16) a 485 individuos en el muestreo posterior (Tabla 17), lo que representa un incremento neto en la abundancia total. Sin embargo, los cambios en riqueza específica y estructura comunitaria fueron heterogéneos entre transectas, evidenciando respuestas diferenciales de la vegetación frente a los tratamientos evaluados.

La integración de los datos estructurales con la composición florística indica que los tratamientos evaluados generaron respuestas contrastantes: el Picloram produjo una eliminación local de *H. pilosella* y su sustitución por gramíneas y herbáceas acompañantes (Fig. 66), el extracto de *H. australis* incrementó la riqueza sin reducir la dominancia de la especie objetivo (Fig. 67), el tratamiento combinado indujo una reducción comunitaria con persistencia en la dominancia (Fig. 68), y el control evidenció cambios moderados atribuibles a la dinámica natural del sistema (Fig. 69).

Tabla 16. Riqueza específica y abundancia total de individuos registrados en siete transectas durante el relevamiento de línea base, previa aplicación de tratamientos (4/11/24), en la clausura experimental de Estancia Cullen (Tierra del Fuego, AIAS). L1: *Picloram*; L5: extracto de *Hydrocoryne australis*; L6: extracto de *H. australis* + coadyuvante; L7: control.

DATOS	LÍNEAS			
	L1	L5	L6	L7
N° de especies vegetales	5	7	12	11
N° de individuos (plantas)	88	103	116	132
Total individuos (plantas)	439			

Tabla 17. Riqueza específica y abundancia total de individuos registrados en cuatro transectas durante el relevamiento de línea base, post aplicación de tratamientos (6/12/25), en la clausura experimental de Estancia Cullen (Tierra del Fuego, AIAS). L1: *Picloram*; L5: extracto de *Hydrocoryne australis*; L6: extracto de *H. australis* + coadyuvante; L7: control.

DATOS	LÍNEAS			
	L1	L5	L6	L7
N° de especies vegetales	8	12	8	12
N° de individuos (plantas)	94	138	122	131
Total individuos (plantas)	485			

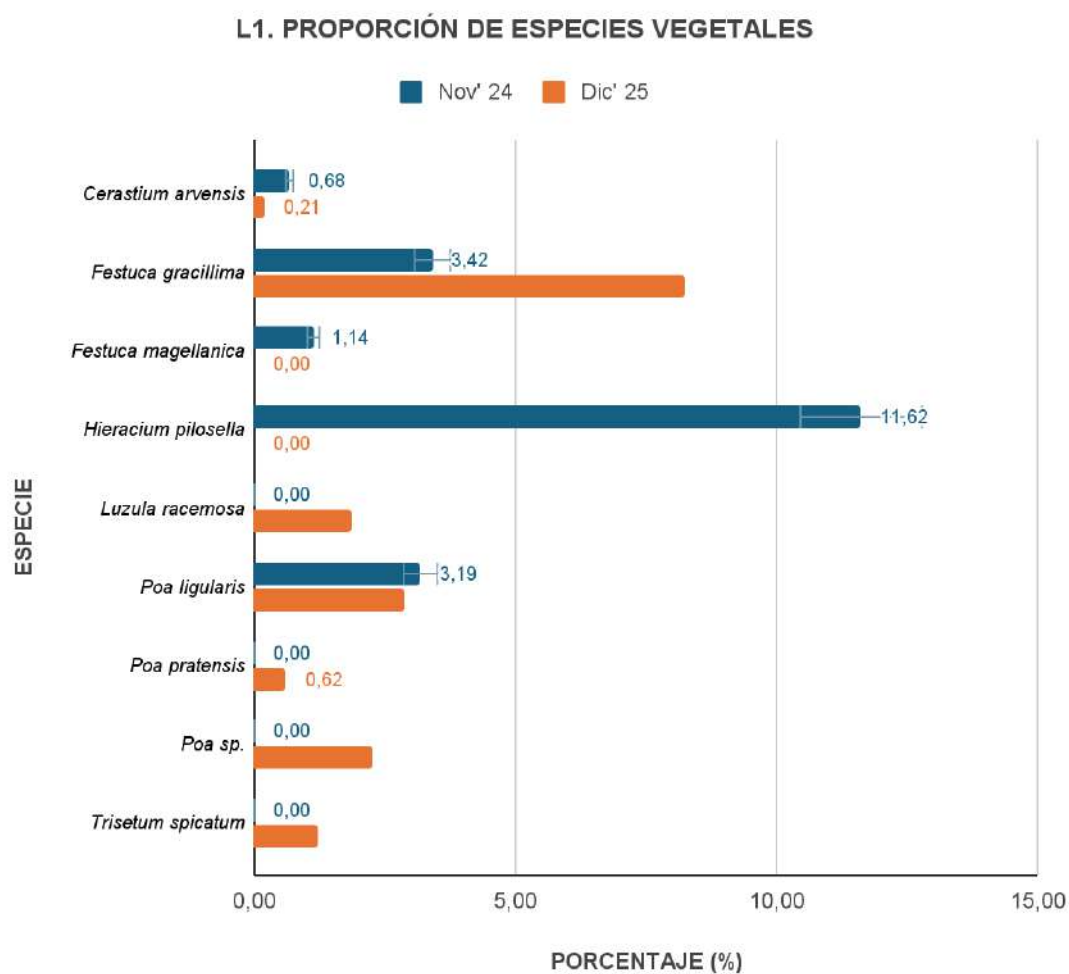


Figura 66. Proporción relativa (%) de las especies vegetales registradas en la transecta L1, correspondiente al tratamiento con Picloram, durante el relevamiento de línea base previo a la aplicación de los tratamientos en la clausura experimental de Estancia Cullen (Tierra del Fuego, AIAS).

L2. PROPORCIÓN DE ESPECIES VEGETALES

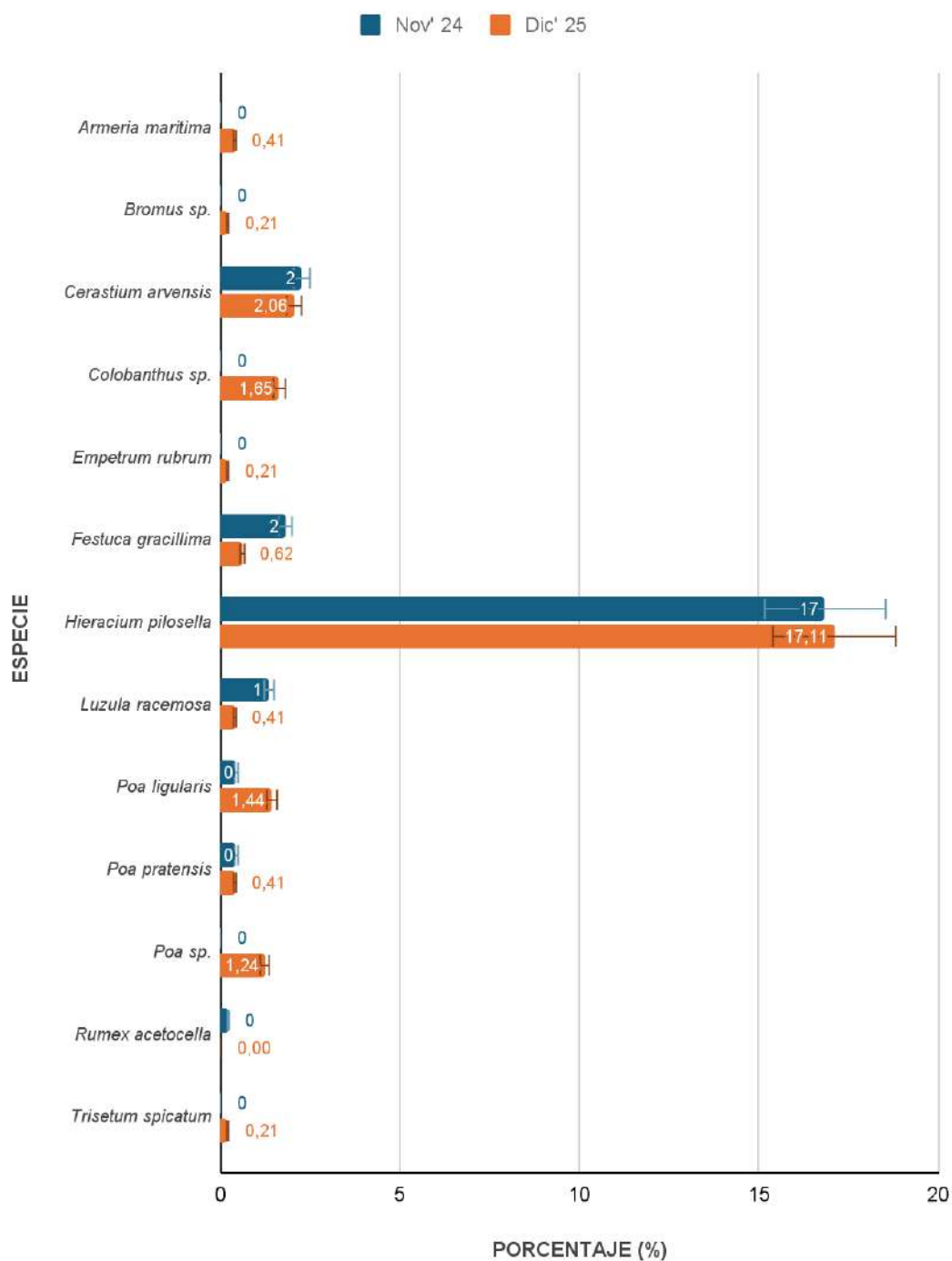


Figura 67. Proporción relativa (%) de las especies vegetales registradas en la transecta L5, correspondiente al tratamiento con extracto de *Hydrocoryne australis*, durante el relevamiento de línea base previo a la aplicación de los tratamientos en la clausura experimental de Estancia Cullen (Tierra del Fuego, AIAS).

L6. PROPORCIÓN DE ESPECIES VEGETALES

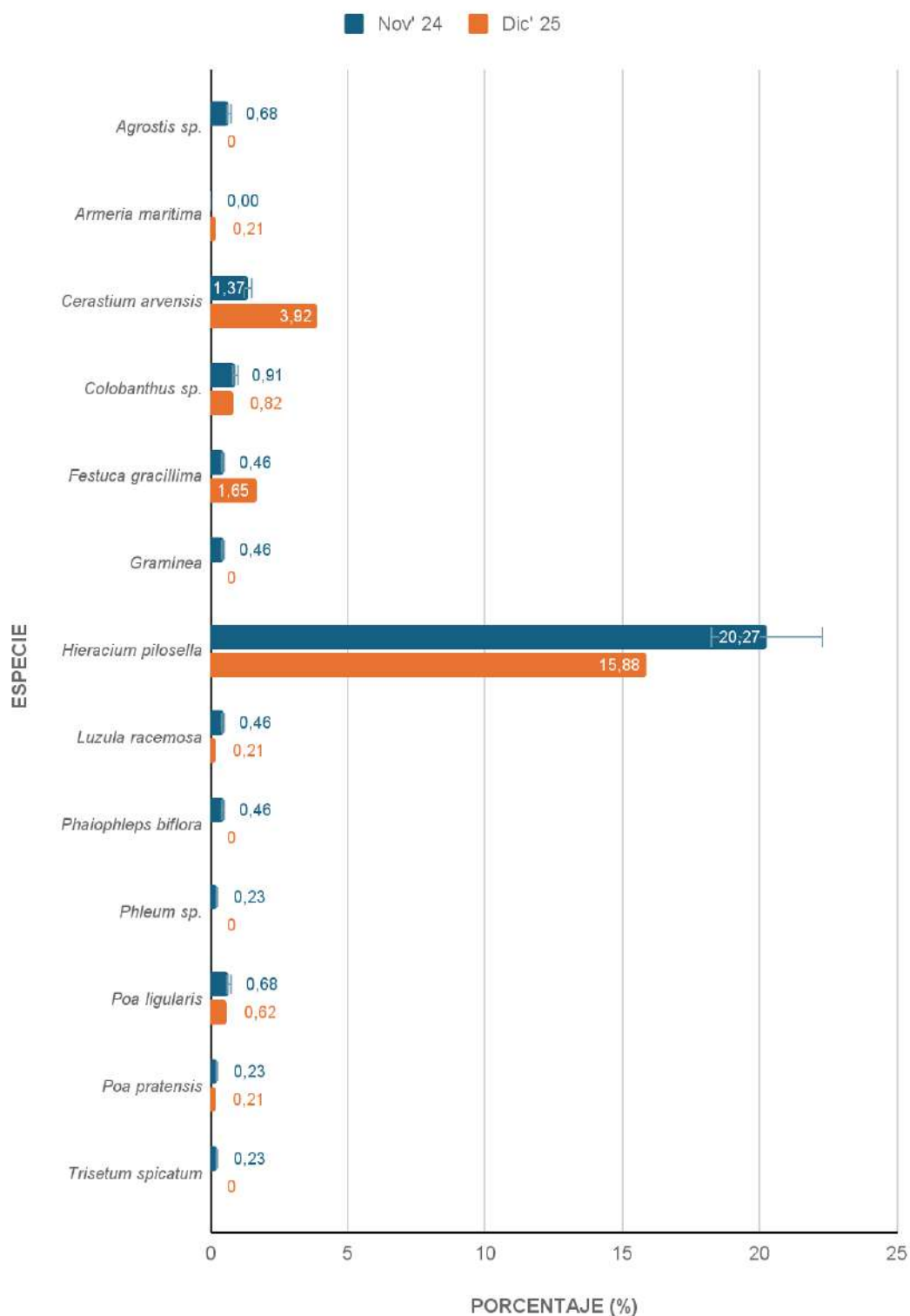


Figura 68. Proporción relativa (%) de las especies vegetales registradas en la transecta L6, correspondiente al tratamiento con extracto de *Hydrocorine australis* y coadjuvante, durante el relevamiento de línea base previo a la aplicación de los tratamientos en la clausura experimental de Estancia Cullen (Tierra del Fuego, AIAS).

L7. PROPORCIÓN DE ESPECIES VEGETALES

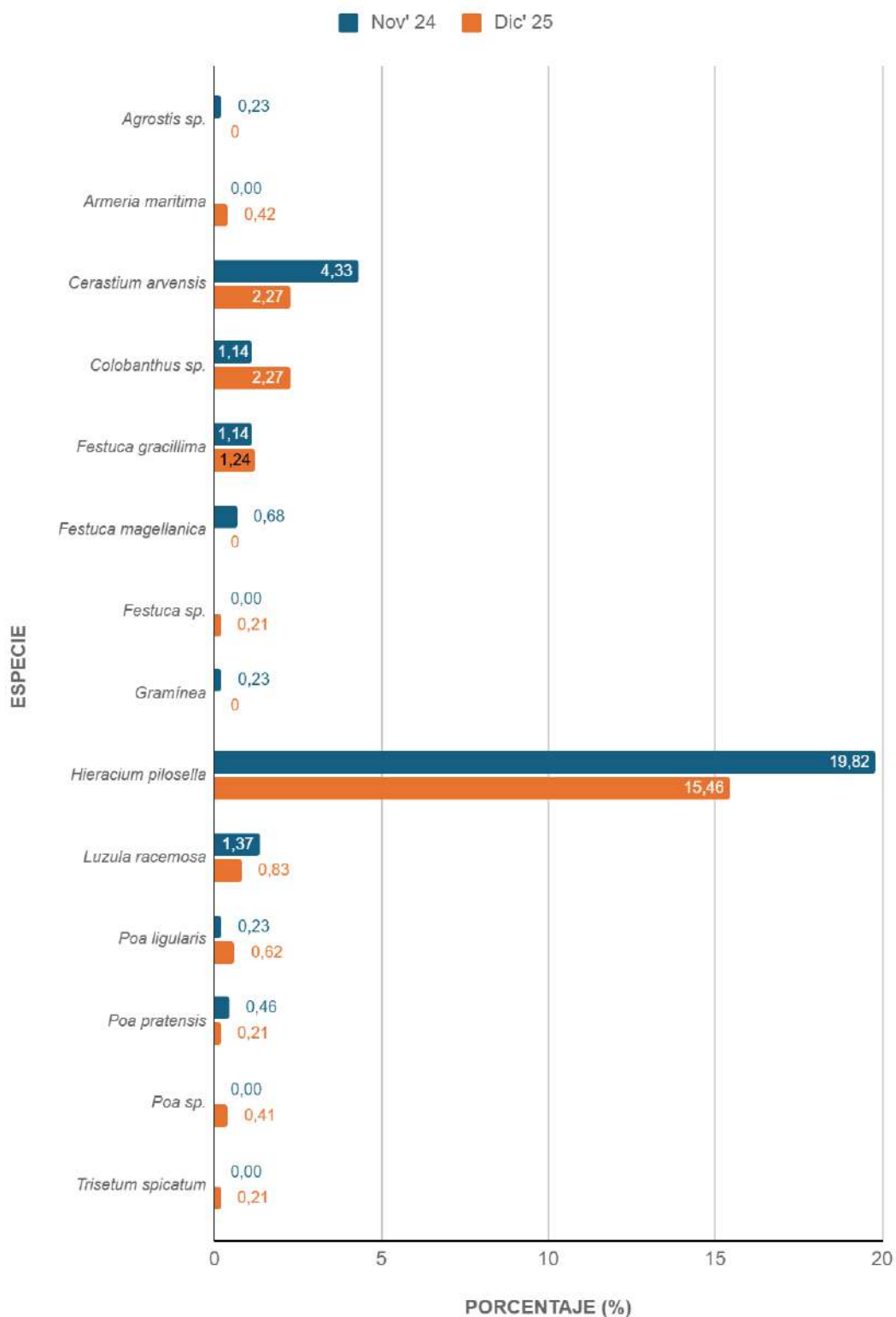


Figura 69. Proporción relativa (%) de las especies vegetales registradas en la transecta L7, correspondiente al control, durante el relevamiento de línea base previo a la aplicación de los tratamientos en la clausura experimental de Estancia Cullen (Tierra del Fuego, AIAS).

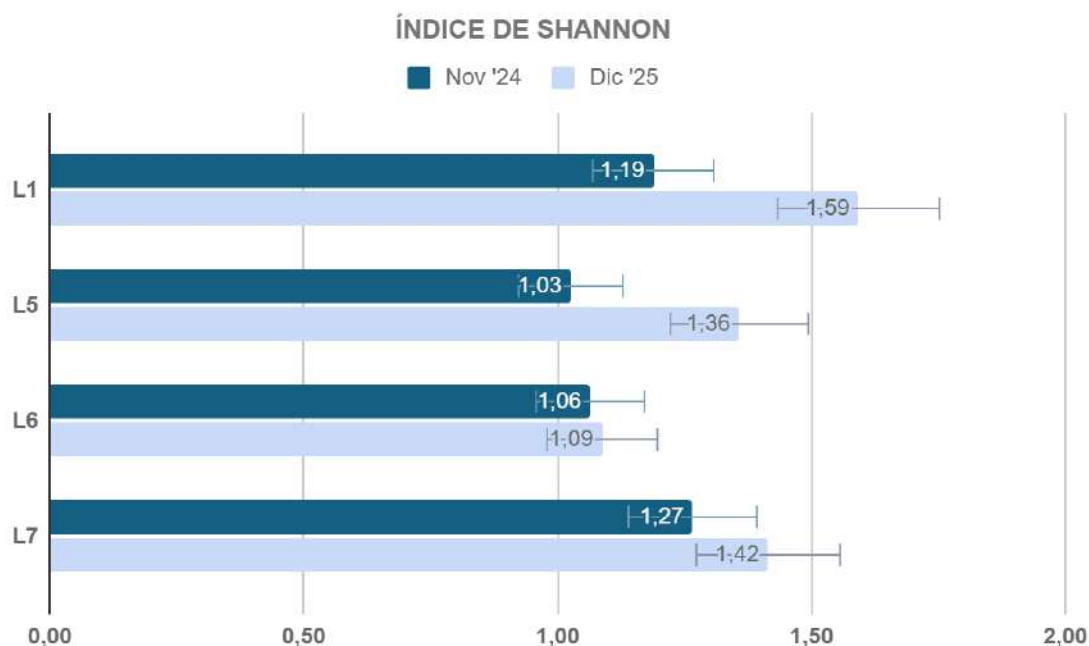


Figura 70. Valores del índice de Shannon (H') registrados en las transectas L1 (Picloram), L5 (extracto de *Hydrocorine australis*), L6 (extracto de *H. australis* + coadyuvante) y L7 (control) durante los muestreos de noviembre de 2024 (pre-tratamientos) y diciembre de 2025 (post-tratamientos) en la clausura experimental de Estancia Cullen (Tierra del Fuego, AIAS).

ANEXO II - PROTOCOLO DE MUESTREO

1. ESTRATEGIA DE MUESTREO DE SUELO EN CADA UNIDAD | Se definió una cuadrícula o parcela de muestreo (*plot*) de 5m x 5m en cada sitio para reducir la variabilidad local. Se tomaron cinco (5) submuestras dentro de cada cuadrícula, destinadas a la determinación de parámetros fisicoquímicos. Estas submuestras se tomaron de puntos distribuidos de manera uniforme o aleatoria dentro del área, siguiendo un patrón que garantiza una representación adecuada del sitio (Fig. 67). Se recolectaron utilizando un barreno de suelo (volumen de suelo colectado por submuestra = 850 cm³), y se combinaron para formar una muestra compuesta por sitio (unidad).

Al mismo tiempo, se tomaron diez (10) submuestras destinadas al aislamiento de hongos y bacterias y para la posterior realización de estudios moleculares de la comunidad microbiana, en el sector próximo al de la toma de submuestras colectadas con el barreno (Fig. 71).

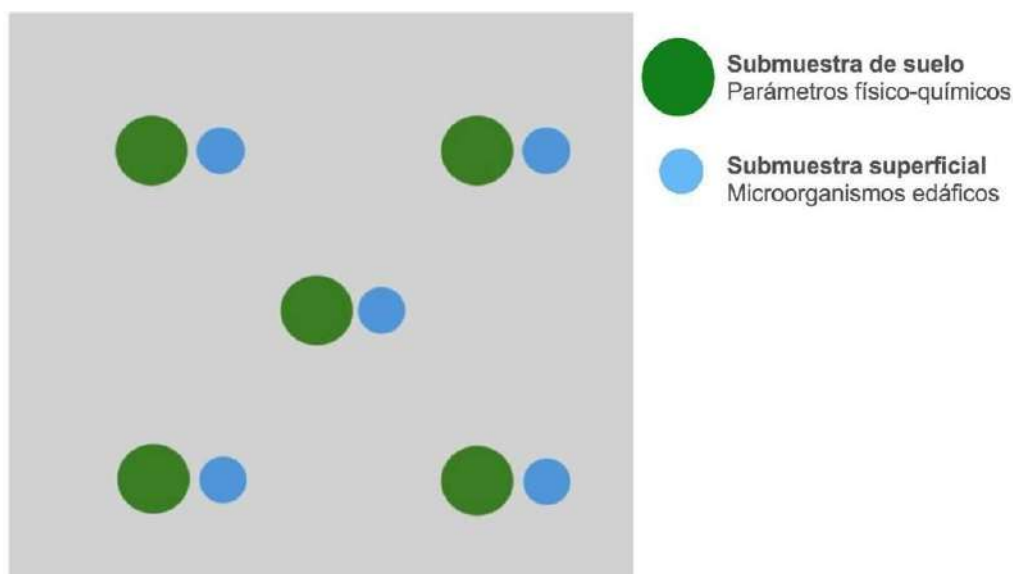


Figura 71. Distribución de puntos de toma de muestras en una parcela de muestreo (tamaño = 5 m x 5 m) de una unidad muestral.

El cálculo de la cantidad de submuestras se realizó siguiendo las recomendaciones de Ciarlo y col. (2020) y Di Ciocco (2014) para la toma de submuestras. Se consideró:

- *Volumen de muestra mínimo:* 500-1000 cm³ por profundidad.
- *Peso seco requerido:* 500 g de suelo seco por muestra para análisis estándar.
- *Peso fresco recomendado:* 1 kg por muestra para garantizar suficiente material en análisis de humedad y materia orgánica.

Las muestras se colocaron en bolsas negras de polietileno etiquetadas que se transportarán cerradas y almacenadas en conservadoras de Telgopor.

2. CONSIDERACIONES PARA LA TOMA DE MUESTRAS DE SUELO DESTINADAS AL AISLAMIENTO DE HONGOS Y BACTERIAS | Las submuestras se tomaron de la capa superficial del suelo (profundidad = 0-1,5 cm) y se colocaron placas de Petri estériles (Ø 90mm x 14mm), utilizando cuchillo y espátula desinfectadas con alcohol al 70% y guantes, para reducir la probabilidad de contaminación con microorganismos ajenos al suelo muestreado.

3. CANTIDAD DE MUESTRAS DE SUELO FINALES POR UNIDAD | Sumando todas las muestras de los sitios, se obtuvieron:

- 6 muestras para análisis químicos (1 muestra compuesta por unidad) obtenidas a partir de 35 submuestras (5 submuestras x 7 unidades)
- 35 muestras para el estudio de hongos y bacterias (5 placas de Petri colectadas x 6 unidades)
- 35 muestras para el estudio de comunidad microbiana (5 placas de Petri colectadas x 6 unidades)

4. ESTRATEGIA DE MUESTREO DE PELÍCULA ORGÁNICA EN UN CUERPO TEMPORAL DE AGUA | El muestreo se realizó con el objetivo de obtener material para

el análisis de cianobacterias presentes en tapetes microbianos y en el agua superficial. La recolección se llevó a cabo en sectores del cuerpo de agua que presentaban acumulación visible de película orgánica, procurando abarcar diferentes microhábitats dentro del mismo.

Para cada muestra, se utilizaron recipientes de polipropileno estériles de 100 ml (vasos de análisis clínico), los cuales fueron previamente rotulados con el código de identificación correspondiente. La toma de tapetes se efectuó empleando espátulas estériles, desprendiendo cuidadosamente el material superficial y depositándolo directamente en el recipiente junto con una pequeña cantidad de agua del sitio para mantener la humedad y la estructura original.

En total, se colectaron diez (10) muestras individuales. Una vez cerrados herméticamente, los recipientes fueron dispuestos en una conservadora de *telgopor* junto a *pads* refrigerantes previamente congelados, manteniendo la temperatura cercana a 4 °C durante el transporte. Esta metodología tuvo como fin preservar la viabilidad y composición original de las comunidades microbianas hasta su arribo al laboratorio para su posterior análisis.

5. ESTRATEGIA DE MUESTREO DE ESPECIES VEGETALES EN CADA UNIDAD |

El muestreo se llevó a cabo recolectando exclusivamente ejemplares vegetales representativos de las especies más frecuentes en todas las unidades de muestreo, con excepción del sitio destinado a la toma de película orgánica en agua. El objetivo fue doble: por un lado, contribuir a la caracterización florística de los sitios, y por otro, disponer de material radicular para la evaluación de asociaciones micorrícicas.

Para cada ejemplar seleccionado, se procedió a extraer la planta completa junto con un bloque de suelo adherido, con el fin de preservar la integridad del sistema radicular y minimizar daños a las raíces. Este material se introdujo cuidadosamente en bolsas plásticas de cierre hermético, previamente rotuladas con el código de identificación correspondiente a la unidad y fecha de muestreo.

Las bolsas fueron colocadas en una conservadora de *Telgopor* junto a *pads* refrigerantes previamente congelados, manteniendo la temperatura cercana a 4 °C durante el transporte. Este procedimiento buscó preservar tanto la estructura de las raíces como la viabilidad de las asociaciones micorrícicas hasta su análisis en laboratorio.

6. MANEJO Y TRANSPORTE DE MUESTRAS | Para garantizar la calidad y conservación de las muestras recolectadas, según su estado (seco o húmedo), es necesario considerar los factores presentados a continuación, vinculados a las condiciones óptimas durante su almacenamiento y traslado.

- *Muestras de suelo* | Son envasadas en bolsas de polietileno debidamente etiquetadas, lo que permite su correcta identificación y trazabilidad. Estas muestras deben almacenarse en un ambiente fresco, evitando la exposición a temperaturas elevadas o humedad excesiva que pueda alterar su composición.
- *Muestras húmedas* | Son conservadas en recipientes herméticos, preferentemente de material inerte, que impidan la contaminación o pérdida de humedad. Es fundamental mantenerlas refrigeradas a una temperatura de 4°C,

lo que ayuda a preservar sus características microbiológicas y fisicoquímicas hasta su análisis.

- *Tiempo máximo de transporte* | Independientemente del tipo de muestra, el tiempo total desde la recolección hasta su procesamiento no debe superar las 48 horas. Esto minimiza la degradación y garantiza la validez de los resultados obtenidos en los estudios posteriores.

De este modo, se asegura que las muestras lleguen en condiciones óptimas para su análisis, evitando alteraciones que puedan comprometer la calidad de los datos obtenidos.

7. CONSIDERACIONES ADICIONALES PARA EL ANÁLISIS DE MUESTRAS | La fiabilidad de los resultados y la representatividad de los datos obtenidos en el análisis de muestras, es fundamental y se garantiza a través de la aplicación de una serie de medidas adicionales que aseguren su correcta manipulación, almacenamiento y validación.

- *Homogeneización* | Antes de la subdivisión de las muestras para distintos análisis, se recomienda realizar un proceso de homogeneización que garantice la distribución uniforme de los componentes presentes en la muestra. Para ello, cada muestra compuesta debe ser mezclada manualmente dentro de una bolsa estéril antes de proceder a la extracción de las alícuotas necesarias para los diferentes estudios. Este procedimiento minimiza variaciones en los resultados y mejora la precisión de los análisis.
- *Control de contaminación* | La manipulación de muestras debe realizarse bajo condiciones de asepsia para evitar la introducción de contaminantes externos que puedan alterar la composición química o microbiológica. Se recomienda: Uso de guantes estériles para prevenir la transferencia de microorganismos o sustancias ajenas a la muestra.
- *Empleo de agua destilada estéril* para la disolución o lavado de utensilios de trabajo, asegurando que no haya presencia de contaminantes indeseados.
- *Utilización de pipetas desechables* en la manipulación de muestras de cianobacterias, reduciendo el riesgo de contaminación cruzada entre muestras.
- *Registro de parámetros ambientales* | El contexto ambiental en el que se obtienen las muestras puede influir significativamente en su composición. Por ello, es esencial llevar un registro de las siguientes variables en el punto de muestreo:
 - *Temperatura del suelo*, para evaluar su influencia en la actividad microbiológica y en la estabilidad de los compuestos presentes en la muestra.
 - *Humedad gravimétrica*, como indicador del contenido de agua en el sustrato, lo que puede afectar la proliferación microbiana y la estabilidad química.

- *Cobertura vegetal*, expresada en porcentaje (%), para estimar el grado de cobertura del suelo y su posible impacto en la composición y dinámica de la muestra recolectada.

ANEXO III – PROTOCOLOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS QUÍMICOS DE LAS MUESTRAS DE SUELO

1. DETERMINACIÓN DE CONTENIDO HÍDRICO EN MUESTRAS DE SUELO (% HUMEDAD)

Fundamento. El contenido hídrico del suelo es un parámetro fundamental para evaluar su estado físico, su capacidad de retención de agua y su disponibilidad para las plantas. El método gravimétrico es el procedimiento estándar y de referencia, ya que se basa en la pérdida de peso de la muestra tras el secado en estufa a 105 °C, temperatura suficiente para eliminar el agua libre e higroscópica sin descomponer la materia orgánica. Esta determinación permite comparar la humedad relativa entre distintos sitios, caracterizar condiciones edáficas y establecer relaciones con otros parámetros fisicoquímicos y biológicos del suelo.

Procedimiento

1. Tomar 10 g de suelo fresco y tamizar con una zaranda de 2 mm para eliminar partículas gruesas y restos orgánicos de gran tamaño.
2. Pesar la muestra (peso fresco) en una cápsula (de aluminio o porcelana) previamente tarada.
3. Colocar la muestra en estufa a 105°C hasta alcanzar peso constante (aprox. 24 horas).
4. Pesar nuevamente (peso seco).
5. Calcular el contenido hídrico según la siguiente fórmula:

$\text{Contenido hídrico} = \% \text{ humedad} = \frac{(\text{peso fresco} - \text{peso seco}) \times 100}{\text{peso fresco}}$

2. DETERMINACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA EN MUESTRAS DE SUELO

Fundamento. El contenido de materia orgánica del suelo (MOS) es un indicador clave de la fertilidad, la capacidad de intercambio catiónico y la calidad edáfica. El método de pérdida por ignición (LOI, Loss on Ignition) es ampliamente utilizado porque permite una estimación rápida y confiable de la materia orgánica. Se basa en la diferencia de peso entre la muestra seca a 105 °C (libre de agua) y la misma muestra tras su calcinación en mufla a 500–550 °C, donde la materia orgánica es oxidada y eliminada como CO₂ y vapor de agua. El residuo resultante corresponde a la fracción mineral del suelo.

Procedimiento

1. Secar al aire muestra de suelo hasta eliminar la humedad superficial.
2. Tamizar aproximadamente 5 g de suelo con malla de 2 mm para retirar piedras y restos gruesos.

3. Colocar la muestra en cápsula (crisol) tarada y llevar a estufa a 105°C hasta alcanzar peso constante (aproximadamente 48 horas). Registrar el peso seco.
4. Introducir la cápsula con la muestra seca en la mufla a 500°C durante 24 horas, hasta la combustión completa de la materia orgánica.
5. Retirar, enfriar en desecador y registrar el peso muflado (solo fracción mineral).
6. Calcular el contenido de materia orgánica según la fórmula:

$$\% \text{ Materia orgánica} = \% \text{ MO} = \frac{(\text{peso seco} - \text{peso muflado})}{\text{peso seco}} \times 100$$

Referencias

Davies, B. (1974). Loss-on-ignition as an estimate and soil organic matter. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, volumen (38), 138-151.

Schulte E. E. & Hopkins B. G. (1996). Estimation of soil organic matter by weight loss-on-ignition. In F. R. Magdoff, M. A. Tabatabai, & E. A. Hanlon Jr. (Eds.), *Soil organic matter: Analysis and interpretation* (pp. 21–31). *Soil Science Society of America*. (SSSA Special Publication No. 46). <https://doi.org/10.2136/sssaspecpub46.c3>

3. DETERMINACIÓN DE P EXTRAÍBLE EN SUELOS POR EL MÉTODO DE BRAY & KURTZ

Fundamento. El fósforo (P) disponible para las plantas corresponde a la fracción extraíble en condiciones ácidas o neutras, y es un indicador clave de la fertilidad del suelo. El método de Bray & Kurtz (1945) se utiliza principalmente en suelos ácidos, donde el fluoruro de amonio libera el fósforo ligado al Al y Fe, y el ácido clorhídrico solubiliza las fracciones de P menos disponibles. El fósforo extraído se cuantifica por el método colorimétrico del azul de molibdeno, en el cual el P reacciona con molibdato de amonio en medio ácido para formar un complejo que, reducido por ácido ascórbico, desarrolla una coloración azul cuya intensidad se mide en espectrofotómetro (882 nm).

Preparación de soluciones

- **Solución extractora.** Agregar 50 ml de agua destilada a un matraz aforado de 500 ml, luego añadir 2.5 ml de HCl 5N (para 100 ml, agregar 41,7 ml de HCl). Por otro lado, pesar 0,555 g de fluoruro de amonio y disolver en 100 ml de agua destilada en un vaso de precipitados. Esta última solución añadirla al matraz aforado y enrasar con agua destilada.
- **Reactivo Mezcla.** Colocar en un matraz de 1 L, 500 ml de H₂SO₄ 5 N (para 500 ml, añadir 150 ml de agua destilada en matraz aforado y luego agregar 70 ml de H₂SO₄, enrasar con agua destilada) y 100 ml de molibdato de amonio (disolver 12 g en 200 ml de agua destilada) y 50 ml de tartrato de amonio y potasio (disolver 0,2743 g en 100 ml de agua destilada), llevar a volumen. Colocar en frasco color caramelo y añadir 250 ml de agua destilada. Se puede conservar en heladera por 20 días.
- **Reactivo mezcla + ácido ascórbico** (preparar solo lo necesario para las muestras a determinar). Para 250 ml de reactivo mezcla pesar 1,056 g de ácido ascórbico.

Procesamiento de las muestras de suelo

1. Pesar 2,5 g de suelo previamente secado al aire y tamizar con una malla de 2 mm.
2. Transferir la muestra a un tubo de plástico de 50 ml (tipo falcón) para su posterior extracción.

Procedimiento

- Agregar 20 ml de solución extractora a los 2,5 g de suelo tamizado
- Agitar los tubos en un agitador orbital durante 5 minutos.
- Filtrar la suspensión a través de papel (2,5 µm), descartando las primeras gotas del filtrado.
- Transferir 5 ml del filtrado a un matraz 50 ml.
- Incorporar 30 ml de agua destilada y luego añadir 10 ml de reactivo mezcla + ácido ascórbico.
- Enrasar a 50 ml con agua destilada y homogeneizar por inversión del matraz.
- Dejar reaccionar durante 20 minutos en oscuridad.
- Medir la absorbancia en espectrofotómetro a 882 nm.

Curva de calibración

- Preparar una serie de patrones en matraces de 50 mL con solución patrón de 5 ppm P, adicionando:
 - 0 ml (blanco)
 - 1 ml
 - 3 ml
 - 5 ml
 - 8 ml
 - 10 ml
- A cada matraz añadir 10 ml de reactivo mezcla + ácido ascórbico y enrasar a 50 ml.
- Medir a 882 nm y graficar la curva de calibración.

Materiales y equipos

- Suelo tamizado a 2 mm (2,5 g por muestra).
- Tubos de plástico de 50 ml (tipo Falcon).
- Embudos y papel de filtro Whatman N° 42.
- Matraces aforados de 50 y 500 ml
- Vasos de precipitados.
- Probetas graduadas.
- Micropipetas (1000–5000 µl y 1000–10000 µl).
- Agitador orbital.
- Espectrofotómetro (882 nm).

Referencia

Bray, R. H., & Kurtz, L. T. (1945). Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science*, 59(1), 39–45

4. DETERMINACIÓN DE PH DE SUELO

pH en suspensión suelo: agua destilada. Relación 1: 2,5

Fundamento. El pH del suelo expresa la concentración de iones hidrógeno (H^+) en solución, siendo un indicador clave de la reacción del suelo (acidez, neutralidad o alcalinidad). Este parámetro controla procesos físicos, químicos y biológicos esenciales, como:

- La disponibilidad de nutrientes (ej. el fósforo y micronutrientes son más solubles en medios ácidos, mientras que el calcio y el magnesio predominan en suelos neutros o alcalinos).
- La toxicidad de ciertos elementos, como el aluminio y el manganeso, que aumentan en suelos ácidos.
- La actividad microbiana y enzimática, que depende de intervalos específicos de pH.

La determinación en suspensión suelo:agua (1:2,5) es un método estándar, ya que refleja el equilibrio entre los coloides del suelo y la solución acuosa, proporcionando una estimación reproducible y comparable entre sitios.

Materiales y equipos

- Balanza con una tolerancia de 0,1 g.
- Balanza con una tolerancia de 0,0001 g.
- Bureta, probeta graduada, o dispensador de 25 ml.
- Recipiente de 30 a 50 ml de capacidad.
- Varillas de vidrio o descartables.
- pHmetro con ajuste y control de temperatura.
- Termómetro o sonda capaz de medir temperaturas con aproximación de 1°C.
- Electrodo de vidrio y electrodo de referencia o electrodo combinado de comportamiento similar.

Procedimiento técnico

1. Pesar 10 g $\pm$ 0,1 g de suelo seco al aire (o en estufa de circulación a una temperatura menor de 40°C) previamente tamizado por 2mm, en un recipiente de 30 a 50 ml de capacidad.
2. Agregar 25 ml de agua destilada con bureta, probeta graduada, o dispensador.
Nota: se pueden cambiar la masa de suelo y el volumen de agua, siempre que se resepte la relación suelo: agua de 1: 2,5.
3. Agitar con varilla de vidrio y dejar en reposo durante 1 hora.
4. Agitar nuevamente y dejar reposar 1 hora adicional.
Nota: En la mayoría de los suelos el equilibrio de pH se alcanza en el tiempo mencionado; sin embargo, en suelos muy orgánicos, encalados, contaminados o con carbonatos, el equilibrio puede ser más lento. En estos casos se recomienda realizar una segunda medición a las 24 horas y, si persisten diferencias, informarlo junto con los valores respectivos.
5. Controlar y ajustar la temperatura de la suspensión asegurando que no difiera en más de 1°C respecto de las soluciones buffer.

6. Calibrar el peachímetro, según las especificaciones del manual del instrumento, con las soluciones buffer, 7 y 4 o 7 y 9 según el rango de pH esperable de los suelos en estudio. Enjuagar el electrodo.
7. Agitar enérgicamente la suspensión inmediatamente antes de sumergir el electrodo.
8. Medir el pH en la suspensión. Considerar estable la lectura cuando en un período de 5 segundos no se registren variaciones mayores a 0,02 unidades de pH.
Nota: normalmente el tiempo requerido para la estabilización de la lectura es menor a 1 minuto.
9. Enjuagar el electrodo con agua destilada entre determinaciones.

Referencias

Técnicas analíticas de los laboratorios integrales de la RILSAV. Determinación de pH en muestras de suelo. Primer Ensayo de Comparación Interlaboratorios – RILSAV. Julio de 2007.

Protocolos de PROMAR – Programa de Métodos Analíticos de Referencia. AACS – Comité de Química.

McLean, E. O. (1982). Soil pH and lime requirement. In A. L. Page (Ed.), *Methods of Soil Analysis. Part 2: Chemical and Microbiological Properties* (pp. 199–224). ASA-SSSA.

Thomas, G. W. (1996). Soil pH and soil acidity. In D. L. Sparks (Ed.), *Methods of Soil Analysis. Part 3: Chemical Methods* (pp. 475–490). SSSA.

5. DETERMINACIÓN DE CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DE SUELO

Suspensión suelo: agua destilada. Relación 1: 2,5

Fundamento. La conductividad eléctrica (CE) mide la capacidad de la solución del suelo para conducir corriente eléctrica, la cual depende directamente de la concentración total de sales solubles (iones como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , NO_3^-).

Este parámetro es un indicador indirecto de:

- El contenido de sales solubles, asociado a la fertilidad y a la disponibilidad de nutrientes.
- El grado de salinidad del suelo, crítico en ambientes áridos o bajo riego.
- Posibles problemas de toxicidad iónica y limitaciones para el crecimiento vegetal.

La determinación se realiza en una suspensión suelo:agua (1:2,5), que permite extraer los iones solubles presentes en el suelo hacia la solución. La medición se efectúa con un conductímetro calibrado y compensado por temperatura, dado que la conductividad varía significativamente con los cambios térmicos.

Materiales y equipos

- Balanza con una tolerancia de 0,1 g.
- Balanza con una tolerancia de 0,0001 g.
- Bureta, probeta graduada, o dispensador de 25 ml.
- Recipiente de 30 a 50 ml de capacidad.

- Varillas de vidrio o descartables.
- Conductímetro con ajuste y control de temperatura.
- Termómetro o sonda capaz de medir temperaturas con aproximación de 1°C.
- Electrodo de vidrio y electrodo de referencia o electrodo combinado de comportamiento similar.

Procedimiento

- 1. Pesar 10 g $\pm$ 0,1 g de suelo seco al aire (o en estufa de circulación a una temperatura menor de 40°C), previamente tamizado con malla de 2mm, y colocarlo en un recipiente de 30-50 ml de capacidad.
- Agregar 25 ml de agua destilada con bureta, probeta graduada, o dispensador.
Nota: la masa de suelo y el volumen de agua pueden variar, siempre que se mantenga la relación suelo: agua de 1: 2,5.
- Agitar con varilla de vidrio o descartable y dejar en reposo durante 1 hora.
- Agitar nuevamente y dejar en reposo por 1 hora adicional.
- Medir la CE en la suspensión, habiendo agitado enérgicamente la suspensión inmediatamente antes de sumergir el electrodo.
- Considerar la lectura como estable cuando, en un periodo de 5 segundos, la variación no supere 0,02 unidades de CE.
Nota: el tiempo de estabilización de la lectura suele ser menor a 1 minuto.
- Enjuagar el electrodo con agua destilada entre determinaciones.

Referencias

Rhoades, J. D. (1982). Soluble salts. In A. L. Page (Ed.), *Methods of Soil Analysis. Part 2: Chemical and Microbiological Properties* (pp. 167–179). ASA-SSSA.

Rhoades, J. D., Chanduvi, F., & Lesch, S. M. (1999). *Soil salinity assessment: Methods and interpretation of electrical conductivity measurements*. FAO Irrigation and Drainage Paper 57.

6. DETERMINACION DE NITROGENO TOTAL (POR EL MÉTODO SEMIMICRO KJELDAHL)

Fundamento

El método Kjeldahl (propuesto en 1883 por Johan Kjeldahl) es uno de los procedimientos clásicos y más utilizados para la determinación del nitrógeno total en suelos, plantas, animales y otros materiales biológicos.

El principio del método se basa en dos etapas principales:

- 1- Digestión de la muestra para convertir el N a NH_4^+ .
- 2- Determinación del NH_4^+ en el digesto.

Metodología

1- *Digestión*. Pesar 0,25 g de suelo (previamente tamizado por 35 mesh). En caso de material vegetal 0,05 g. Colocar la muestra en un tubo de ensayo, agregar 2 ml de agua destilada y agitar manualmente (este paso se debe evitar en caso de material vegetal). Agregar una cucharadita (aproximadamente 1 g) de mezcla de sales catalizadoras y 3 ml de ácido sulfúrico concentrado. Digerir hasta color verde pálido. Una vez alcanzado este color, mantener en el digestor unos minutos más.

2- *Destilación*. Transvasar el digesto a la probeta de destilación, agregando agua destilada para limpiar el tubo de ensayo, colocar la probeta en el destilador. Se inicia la secuencia, la que agrega 10 ml de agua, 5 ml de hidróxido de sodio 10 N para neutralizar y descarga 5ml de ácido bórico-indicador en un erlenmeyer. Se inicia la destilación durante un período a determinar para obtener unos 60 ml, puede observarse que durante la misma, la solución pasa de color rojo vinoso a verde brillante.

3- *Titulación*. El amoníaco destilado se titula con 0.01 N de ácido sulfúrico, hasta obtener nuevamente el color rojo vinoso. Paralelamente se realiza un blanco.

4- Cálculos (para titulaciones con ácido 0.01N):

$$\frac{(\text{ml inc.} - \text{ml bco.}) \times 0.14 \text{ mg N} \times 100 \times 1}{\text{peso 1000}} = \% \text{ N}$$

Reactivos necesarios (para N total)

* Mezcla catalítica de sales

10 g K₂ SO₄

1 g Cu SO₄

0.1 g Se (opcional)

* Ácido bórico indicador: disolver 20 g de ácido bórico en 700 ml de agua destilada precalentada. Una vez frío, transferir a un matraz que contiene 200 ml de alcohol etílico y 20 ml de indicador mixto. Enrasar a 1 litro con agua destilada.

* Indicador mixto: disolver por separado 0.33 g de verde de bromocresol y 0.165 g de rojo de metilo con etanol. Llevar a 500 ml con el mismo solvente.

* 10 N de Na OH: pesar 400 g de NaOH en lentejas y diluir a 1 litro con agua destilada precalentada y enfriada.

* 0.01 N de H₂ SO₄: a partir de ácido 0.1 N exactamente valorado. Se toma una alícuota de 100 ml y se la lleva a 1 litro.

ANEXO IV – METODOLOGÍAS PARA ABORDAR LA DIVERSIDAD BACTERIANA Y FÚNGICA EN MUESTRAS DE SUELO

El presente anexo reúne las metodologías empleadas en este proyecto para recuperar, aislar, seleccionar y conservar microorganismos fúngicos asociados a muestras edáficas. Las técnicas se organizan de acuerdo con su objetivo operativo: recuperación por dilución y siembra, uso de trampas de arroz, obtención de aislamientos monospóricos y aislamiento a partir de partículas de suelo lavadas.

1. DILUCIONES SERIADAS DE SUELO Y SIEMBRA EN MEDIOS DE CULTIVO

Fundamento

La técnica de diluciones seriadas permite disminuir progresivamente la concentración de partículas y microorganismos presentes en una suspensión de suelo, de modo de obtener colonias separadas y distinguibles en medios de cultivo. Su aplicación facilita la

cuantificación preliminar de morfotipos, la selección de colonias diferenciadas y el posterior aislamiento de hongos filamentosos, levaduras y otros microorganismos cultivables. En este caso, la metodología fue utilizada durante la etapa preliminar desarrollada en INTA Tierra del Fuego.

Procedimiento

Descompactar manualmente y de manera cuidadosa una submuestra superficial de suelo correspondiente a cada unidad de muestreo, retirando raíces y restos vegetales visibles.

1. Separar 1 g de suelo y transferirlo a un tubo Falcon estéril de 50 ml.
2. Agregar agua destilada estéril hasta alcanzar un volumen final de 50 ml y homogeneizar la suspensión inicial.
3. Tomar 1 ml de la suspensión inicial y transferirlo a un nuevo tubo estéril con 49 ml de agua destilada estéril, obteniendo la dilución 10^{-2} .
4. Repetir el procedimiento de transferencia sucesiva hasta alcanzar una dilución final de 1×10^{-4} .
5. Extraer alícuotas de 1 ml de la dilución 1×10^{-4} y sembrarlas por extensión superficial en placas de Petri con los medios de cultivo definidos.
6. Preparar, por cada unidad muestral, 5 placas con medio APG (agar papa glucosa) suplementado con 0,005 mg de cloranfenicol, para el aislamiento de hongos filamentosos y levaduras.
7. Preparar, por cada unidad muestral, 5 placas con medio APC (agar plate count / agar recuento en placa), para el aislamiento y recuento de hongos filamentosos, bacterias y levaduras.
8. Preparar, por cada unidad muestral, 2 placas con medio RB (Rosa Bengala) suplementado con 0,005 mg de cloranfenicol, para el aislamiento de hongos filamentosos y levaduras.
9. Incubar las placas a temperatura ambiente, en completa oscuridad, durante tres días.
10. Realizar controles diarios para monitorear el desarrollo microbiano, registrar la aparición de colonias diferenciadas y evitar el sobrecrecimiento.
11. Una vez detectadas colonias definidas e independientes, realizar el recuento del número de morfotipos presentes en el conjunto total de placas analizadas.
12. Asignar a cada morfotipo un código alfanumérico específico, escrito en el reverso de la placa, para ordenar el registro y facilitar su reconocimiento posterior.
13. Repicar las colonias codificadas en nuevas placas de Petri, utilizando el mismo medio de cultivo en el que fueron originalmente detectadas.
14. Realizar dos subcultivos de cada colonia aislada y codificada: uno destinado a conservación y preservación del aislamiento, y otro destinado a su identificación taxonómica.

Observación metodológica: Antes de definir la dilución de trabajo se realizó una prueba piloto para determinar la concentración más adecuada para las siembras. En total, se prepararon 12 placas por unidad muestral.

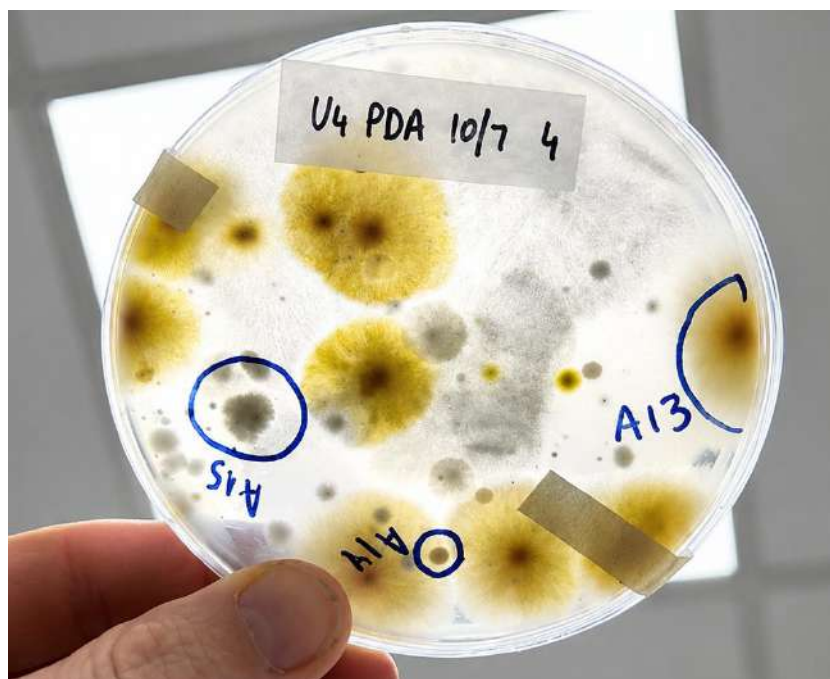


Figura 72. Ejemplo del sistema de identificación alfanumérica de aislamientos en placas de cultivo. Se observan los aislamientos A13, A14 y A15, registrados en una placa con medio PDA correspondiente a la unidad Morenas (U4).

2. TRAMPAS DE ARROZ PARA EL AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS EDÁFICOS

Fundamento

Las trampas de arroz funcionan como un sustrato orgánico colonizable que favorece la recuperación de microorganismos edáficos activos en condiciones de campo. El arroz cocido aporta una matriz fácilmente degradable y, al suplementarse con melaza, ofrece una fuente adicional de carbono que estimula el crecimiento microbiano. Esta estrategia complementa las siembras directas y permite ampliar la diversidad de aislamientos obtenidos a partir del suelo.

Procedimiento

1. Preparar tubos Falcon estériles de 50 ml con 40 ml de arroz cocido suplementado con melaza.
2. Esterilizar las trampas en autoclave a 121 °C y 1 atm durante 20 minutos.
3. Sellar cada tubo con un filtro confeccionado con friselina estéril, de manera que permita el intercambio con el suelo circundante y limite el ingreso de partículas de mayor tamaño.
4. Colocar las trampas en los sitios de muestreo definidos.
5. Disponer un total de 14 trampas en las 7 unidades muestrales evaluadas, identificadas como U1 a U7.
6. Mantener las trampas enterradas durante aproximadamente 45 días, período considerado suficiente para favorecer la colonización por microorganismos edáficos.
7. Recuperar las trampas y realizar una inspección macroscópica detallada de cada una.

8. Registrar cambios de color, textura del sustrato, presencia de micelio u otras estructuras visibles asociadas al desarrollo microbiano.
9. Seleccionar secciones diferenciadas de cada trampa, priorizando aquellas con contrastes notorios de tonalidad, consistencia o evidencia directa de colonización (Fig. 73).
10. Transferir las secciones seleccionadas a placas de Petri con medio PDA.
11. Incubar las placas para favorecer el crecimiento de los microorganismos colonizadores.
12. Repicar las colonias de interés para su aislamiento, identificación y caracterización posterior.

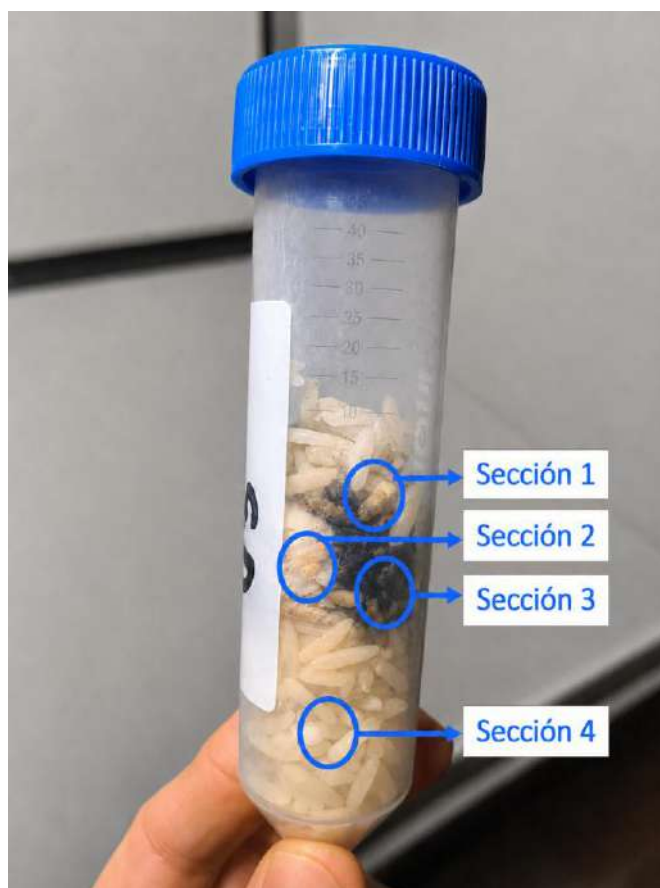


Figura 73. Sistema de identificación y selección de secciones diferenciadas en una trampa de arroz colonizada.

3. AISLAMIENTOS MONOSPÓRICOS POR DILUCIÓN SERIADA

Fundamento

La obtención de aislamientos monospóricos permite trabajar con cultivos derivados de una única spora o unidad propagativa, reduciendo la mezcla de genotipos o morfotipos en una misma colonia. La metodología basada en diluciones seriadas favorece la separación de propágulos fúngicos viables y su posterior desarrollo en medio selectivo, lo que facilita la obtención de cultivos puros para estudios taxonómicos, fisiológicos o de interacción biológica.

Procedimiento

1. Suspender 10 g de cada muestra de suelo en 90 ml de agua destilada estéril.
2. Agitar la suspensión durante cinco minutos con agitador magnético.
3. Dejar reposar la suspensión durante 30 minutos.
4. Tomar 1 ml del sobrenadante de cada muestra y transferirlo a un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril.
5. Agitar la dilución mediante vórtex durante un minuto.
6. Repetir el procedimiento hasta obtener cuatro diluciones seriadas.
7. Tomar 100 µl de la segunda y cuarta dilución.
8. Sembrar las alícuotas en cápsulas de Petri de 9 cm de diámetro con medio APG.
9. Suplementar el medio APG con una solución de sulfato de estreptomicina al 0,5 % (p/v) y cloranfenicol al 0,25 % (p/v).
10. Distribuir uniformemente el inóculo en cada cápsula utilizando un ansa de Drigalsky.
11. Incubar las cápsulas a 24 °C, en oscuridad, durante 5 a 7 días, hasta la emergencia de colonias fúngicas.
12. Seleccionar las colonias compatibles con aislamientos individuales y repicarlas para obtener cultivos puros.

4. LAVADO DE SUELO Y SEMBRADO DE PARTÍCULAS

Fundamento

El método de lavado de suelo y siembra de partículas permite aislar hongos asociados a partículas edáficas y, especialmente, aquellos que se desarrollan a partir de hifas activas. Los lavados sucesivos reducen la presencia de esporas libres y otros propágulos no adheridos, por lo que las colonias obtenidas tienden a representar microorganismos vinculados directamente con las fracciones de suelo seleccionadas.

Procedimiento

1. Tomar 50 g de cada muestra edáfica.
2. Disponer la muestra sobre un sistema de dos tamices: el superior con abertura de malla de 700 µm y el inferior con abertura de 250 µm.
3. Conservar la fracción de suelo retenida entre ambos tamices, correspondiente a partículas comprendidas aproximadamente entre 700 y 250 µm.
4. Realizar diez lavados con agua destilada estéril para eliminar posibles esporas libres y favorecer que las colonias desarrolladas provengan de hifas en activo crecimiento.
5. Filtrar las partículas de suelo lavadas por presión de vacío utilizando discos de papel de filtro estériles.
6. Dejar secar las partículas dentro de cápsulas de Petri tapadas, a temperatura ambiente, durante 24 horas.
7. Sembrar 50 partículas por muestra en placas de Petri, a razón de 5 partículas por caja.
8. Utilizar placas con medio APG suplementado con sulfato de estreptomicina al 0,5 % (p/v) y cloranfenicol al 0,25 % (p/v).
9. Incubar las placas hasta observar el desarrollo de colonias fúngicas emergentes desde las partículas sembradas.
10. Bajo cámara de flujo laminar y con ansa estéril, tomar muestras de las colonias de interés.
11. Transferir las colonias seleccionadas a nuevas cajas de Petri con medio APG para su purificación y conservación.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Lecuona, R. E. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Ed. Buenos Aires, Argentina: Talleres gráficos Mariano Mas.

Parkinson, D. y Williams, S.T. 1961. A method for isolating fungi from soil microhabitats. *Plant and Soil* 13: 347-355.

Widden, P. y Parkinson, D. 1973. Fungi from Canadian coniferous forest soils. *Canad. J. Bot.* 51: 2275-2290.

ANEXO IV - PREPARACIÓN DE RAÍCES PARA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE MICORRIZAS

Fundamento

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) forman asociaciones simbióticas obligadas con las raíces de la mayoría de las plantas terrestres. En este tipo de micorrizas, los hongos penetran en los tejidos radiculares y desarrollan estructuras intracelulares e intercelulares características, como hifas, vesículas y arbusculos, que son las evidencias directas de colonización.

El método de referencia para su detección es el de aclarado y tinción de raíces (Phillips & Hayman, 1970), que consiste en:

- Aclarado de raíces con soluciones alcalinas (KOH), para eliminar pigmentos y componentes celulares que dificultan la observación.
- Tinción con colorantes específicos (azul de tripano, azul de anilina o tintas en lactoglicerol), que permiten resaltar las estructuras fúngicas al microscopio óptico.

El fundamento del procedimiento radica en que, al teñir las paredes de las hifas y estructuras micorrícicas, éstas se vuelven visibles bajo microscopía, lo que posibilita:

- Detectar la presencia o ausencia de micorrizas en las raíces.
- Identificar las estructuras típicas (vesículas, arbusculos, hifas intracelulares).
- Cuantificar el grado de colonización, mediante métodos de recuento en intersecciones o estimaciones porcentuales de longitud radicular colonizada (Giovannetti & Mosse, 1980).

Este enfoque es fundamental porque el análisis de raíces colonizadas refleja la interacción funcional entre la planta y el hongo, y no solo la presencia de propágulos en el suelo.

Procedimiento

1. Lavar las raíces con abundante agua para eliminar la tierra adherida.
2. Cortar en segmentos de aproximadamente 2 cm de largo (si fueran raíces muy largas) y dejar secar a temperatura ambiente.
3. *Clarificación.* Se colocan las raíces en un tubo de ensayo y se las cubre totalmente con una solución de KOH 10%. Se calientan los tubos en baño 90°C por 15 minutos y luego se lavan con agua.

4. *Pre-tinción*. Se adiciona una solución de HCl 0,1N durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se decanta el HCl sin lavar.
5. *Tinción*. Se agrega tinta azul a las raíces y se calientan en baño a 90°C por 20 minutos.
6. Se retiran las raíces del tubo y se disponen sobre un portaobjetos. Se dejan secar por unos minutos. 7. El preparado final se monta con glicerina.

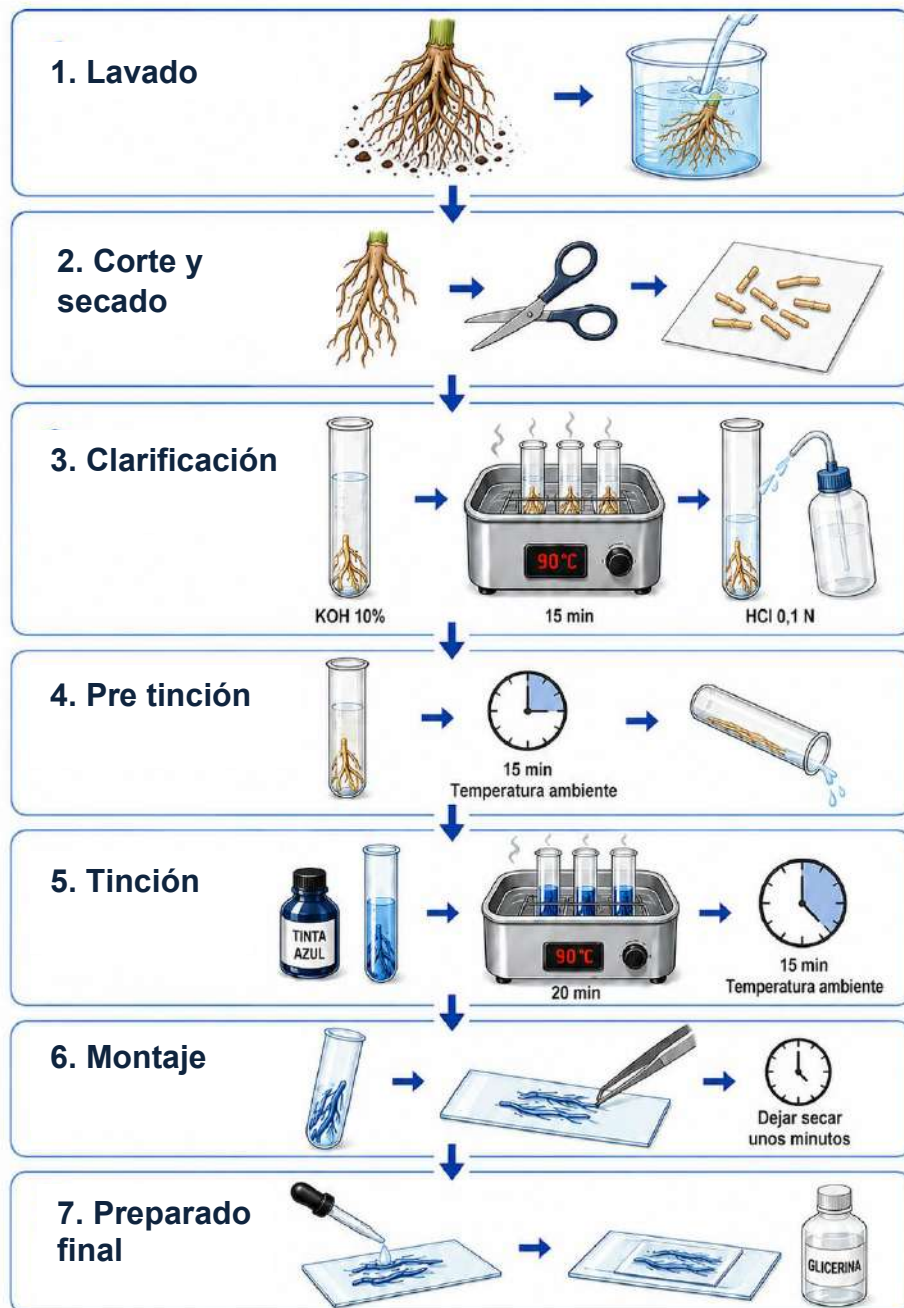


Figura 74.. Esquema del procedimiento de tinción de raíces para la observación de estructuras micorrícicas.

Referencias

Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158–161.

Giovannetti, M., & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular–arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84(3), 489–500.

ANEXO VI – METODOLOGÍA PARA DETERMINAR LA DIVERSIDAD DE HONGOS MICORRÍDICOS EN MUESTRAS DE SUELO

El presente anexo describe una metodología orientada a la recuperación de esporas de hongos micorrícicos presentes en muestras de suelo, mediante tamizado húmedo, decantación y centrifugación en solución de sacarosa. El material recuperado puede utilizarse para su observación, separación preliminar e identificación morfológica.

Extracción y recuperación de esporas por tamizado húmedo y centrifugación en sacarosa

Fundamento

El tamizado húmedo permite separar fracciones de suelo según el tamaño de partícula y concentrar estructuras fúngicas, como esporas, en tamices de diferente abertura de malla. La centrifugación en solución de sacarosa favorece la separación por densidad entre partículas minerales y esporas, permitiendo recuperar estas últimas desde el sobrenadante. La combinación de ambos procedimientos mejora la eficiencia de recuperación del material micorrícico presente en el suelo.

Procedimiento

1. Suspender cada muestra de suelo en agua.
2. Decantar la suspensión a través de una serie de tamices con aberturas de malla de 0,350 mm, 0,125 mm y 0,045 mm.
3. Repetir el procedimiento de suspensión y decantación un total de tres veces para aumentar la recuperación del material retenido.
4. Lavar cuidadosamente el material retenido en el primer tamiz.
5. Transferir el material del primer tamiz, con agua, a una placa de Petri para su observación o separación posterior.
6. Transferir el contenido retenido en los tamices restantes a tubos Falcon de 50 ml.
7. Agregar entre 30 y 40 ml de solución de sacarosa a cada tubo para establecer un gradiente de concentración.
8. Centrifugar las muestras a 1500-2000 r.p.m. durante 4 minutos, con el fin de separar partículas de suelo y esporas.
9. Extraer el sobrenadante mediante una jeringa desde la base del gradiente.
10. Transferir el sobrenadante a un tamiz limpio de 0,045 mm.
11. Lavar el material retenido durante 2-3 minutos con agua para eliminar restos de sacarosa.
12. Colocar el material recuperado en una placa de Petri para su observación y evaluación posterior.

Resultado esperado: Obtención de material concentrado con esporas y estructuras asociadas a hongos micorrícicos, disponible para observación bajo lupa o microscopio y para su posterior identificación morfológica.

Referencias bibliográficas

Błaszowski, J. (2012). Glomeromycota. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences.

Gerdemann, J. W., & Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological society, 46(2), 235-244.

Walker, C., Mize, C.W., McNabb, H.S., 1982. Populations of endogonaceous fungi at two populations in Central Iowa. Can. J. Bot. 60, 2518–2529. <https://doi.org/10.1139/b82-305>.

ANEXO VII – LISTADO DE EQUIPAMIENTO E INSUMOS ADQUIRIDOS EN EL MARCO DEL PROYECTO

CATEGORÍA	ÍTEM
Equipamiento	Maletín de reactivos para determinaciones en suelos - Macherey-Nagel
	pHmetro pocket DLAB
	Micropipeta autoclavable LABNET BIOPETTE 2-20ul
	Micropipeta autoclavable DLAB HIPETTE 100-1000ul
	Micropipeta autoclavable DLAB HIPETTE 20-200ul
	Micropipeta autoclavable DLAB HIPETTE 10-100ul
	Refractómetro de mano
	pHmetro portátil de alta temperatura APERA
	Conductímetro pocket DLAB
Reactivos	Ácido cítrico (1kg)
	Ácido EDTA disódico 2-hidrato (250g)
	Agar nutriente (BAM) (500g)
	Cloruro de calcio 2-hidrato (250g)
	Fosfato de potasio monobásico (250g)
	Sulfato de magnesio 7-hidrato(250g)
	Cloruro de sodio 2-hidrato (250g)
	Ácido bórico (250g)
	Cloruro de Manganese (II) 4-hidrato (250g)
	Nitrato de cobalto (II) 6-hidrato (100g)
	Sulfato de cobre 5-hidrato (250g)
	Ácido fosfórico (orto) 8% (1kg)
	Sulfato de amonio y hierro (III) 12-hidrato (250g)
	Citrato de amonio y hierro (III) (verde claro) (1kg)
	Nitrato de sodio (250 g)

	Extracto de carne (500g)
	Peptona bacteriológica (400g)
	Agua destilada
Material de laboratorio	6 Frascos autoclavables tipo Schott (1 litro)
	10 Frascos autoclavables tipo Schott (500 ml)
	Portaobjetos
	Portaobjetos excavados
	Parafilm
	Placas de Petri 60x15mm
	Placas de Petri 90x14mm
	Guantes descartables
	Filtro de membrana de nitrato de celulosa
	Papel de filtro cuantitativo de filtrado lento
	Papel de filtro cualitativo MN 615
	Papel de filtro cualitativo MN 617
	Tips 10 ul
	Tips 200ul
	Tips 1000 ul
	Microtubos eppendorff 2ml
	Guantes de nitrilo descartables
	Vasos de análisis clínicos
	Jeringas descartables
	10 Aspersores
	Pipetas Pasteur 1ml
Sistema de cultivo de cianobacterias	8 Listones de luz LED
	1 Timmer
	1 Aireador de dos salidas
	Conectores simples y en T
	Llaves de paso
	4 Erlenmeyer (1 litro)
	2 Erlenmeyer (2 litros)

ANEXO VIII- TABLAS DE ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LOS ENSAYOS EXPERIMENTALES BAJO INVERNADERO Y DE LAS PRUEBAS DE GERMINACIÓN

Tabla 18: Análisis de de varianza (pruebas Chi-cuadrado tipo III) del modelo lineal generalizado mixto para número de estolones en *Hieracium pilosella*. gl (grados de libertad).

Efecto	Chi-cuadrado	gl	p-valor
Intercepto	60,08	1	<0,001
Tratamiento	5,46	5	0,36
Tiempo	303,70	1	<0,001

Tabla 19: Análisis de de varianza (pruebas Chi-cuadrado tipo III) del modelo lineal generalizado mixto para el número de flores abiertas en *Hieracium pilosella*. gl (grados de libertad).

Efecto	Chi-cuadrado	gl	p-valor
Intercepto	2,75	1	0,096
Tratamiento	16,70	5	<0,001
Tiempo	4,03	1	<0,01

Tabla 20: Análisis de de varianza (pruebas Chi-cuadrado tipo III) del modelo lineal generalizado mixto para el número de flores maduras en *Hieracium pilosella*. gl (grados de libertad).

Efecto	Chi-cuadrado	gl	p-valor
Intercepto	363,60	1	<0,001
Tratamiento	13,60	5	<0,01
Tiempo	1076,4	1	<0,001

Tabla 21: Análisis de de varianza (pruebas Chi-cuadrado tipo III) del modelo lineal mixto para grado de afectación en hojas de *Hieracium pilosella*. Ensayo bajo invernadero en AER Ushuaia. gl (grados de libertad).

Efecto	F value	gl	p-valor
Tratamiento	70,02	5	<0,001
Reaplicación	0,11	1	0,735
Tratamiento x Reaplicación	4.16	5	<0,01

Tabla 22: Análisis de de varianza (pruebas Chi-cuadrado tipo III) del modelo lineal generalizado mixto para número de estolones en *Hieracium pilosella*. Ensayo bajo invernadero en AER Ushuaia. gl (grados de libertad).

Efecto	Chi-cuadrado	gl	p-valor
Intercepto	3,32	1	0,068
Tratamiento	41,97	5	<0,001
Tiempo	71,96	1	<0,001

Tabla 23: Análisis de de varianza (pruebas Chi-cuadrado tipo III) del modelo lineal generalizado mixto para número de botones florales vivos en *Hieracium pilosella*. Ensayo bajo invernadero en AER Ushuaia. gl (grados de libertad).

Efecto	Chi-cuadrado	gl	p-valor
Intercepto	2,19	1	0,138
Tratamiento	16,96	5	<0,01
Tiempo	26,26	1	<0,001

ANEXO IX: PROTOCOLO DE CULTIVO, ESCALADO Y COSECHA DE CULTIVOS DE CIANOBACTERIAS (ORDEN NOSTOCALES)

1. Fundamento

La producción de metabolitos secundarios con actividad bioherbicida requiere de una biomasa estandarizada y metabólicamente activa. El cultivo líquido en sistemas tipo *batch* o lote alimentado permite una transferencia de masa y energía (luz/CO₂) más eficiente que el cultivo en soporte sólido, optimizando el rendimiento de compuestos extracelulares e intracelulares.

El proceso de escalado secuencial resulta crítico para mantener la viabilidad celular y minimizar el estrés oxidativo durante la transición de volúmenes, asegurando que el inóculo alcance la fase logarítmica de crecimiento antes de cada transferencia. Asimismo, la cosecha oportuna (generalmente al final de la fase exponencial) es fundamental para maximizar la concentración de péptidos y compuestos alelopáticos previo a la activación de procesos de degradación celular.

2. Materiales

- *Medio de cultivo líquido:* BG11(0) para cepas fijadoras de nitrógeno como *Nostoc* spp.) u otros medios adaptados que cubran la necesidad nutricional de macro y micronutrientes sin el aporte de nitrógeno.
- *Material de vidrio*
 - Erlenmeyers de 125, 250, 500, 1000 y 2000 ml
 - Varillas huecas de vidrio
 - Bidones de 5000 ml y de 20000 ml
- *Componentes de aireación*
 - Bombas de aire de acuario de flujo regulable
 - Mangueras de silicona de grado médico (autoclavables)
 - Difusores de aire (piedras difusoras de cerámica o vidrio)
 - Filtros de aire de 0.22 μm (para asegurar aireación estéril)
- *Elementos de cierre*
 - Tapones de silicona perforados
 - Algodón cardado
 - Gasa
 - Papel de aluminio
- *Desinfectantes*
 - Etanol 70% v/v
 - Solución de hipoclorito de sodio al 10% para limpieza de mesadas
- *Equipamiento*
 - Espectrofotómetro
 - Agitador orbital
 - Cámara de flujo Laminar
 - Microscopio óptico
 - Cámara de Neubauer o cámara de Sedgewick-Rafter
 - pHmetro

3. Procedimiento

- **Procesamiento e inoculación**
 1. Tomar una muestra de un cultivo líquido o sólido que se encuentre en condiciones de pureza comprobada.
 2. Transferir un volumen conocido de inóculo en condiciones de asepsia en cabina de flujo laminar.
 3. Inocular en un matraz Erlenmeyer de 125 ml que contenga 50 ml de medio previamente autoclavado. Durante esta etapa se mantendrá la relación 50% cultivo: 50 %medio.

Nota: Las condiciones de Incubación requieren temperatura constante de 20 °C, fotoperíodo: 12:12 (luz:oscuridad), intensidad lumínica constante y agitación en agitador orbital (200-240 rpm).

- **Escalado (upscaling)**

1. A partir de un volumen final de 2 litros, el escalado se realizará utilizando una relación volumétrica de 20% de inóculo, 20% de medio de cultivo y 60% de agua destilada autoclavada.
2. Cada 48 h se evaluará la densidad óptica del cultivo mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 720 nm. Simultáneamente, se medirá el pH de la muestra tomada y se cuantificará la concentración celular (células·ml⁻¹) mediante recuento en cámara de Neubauer utilizando microscopio óptico.
3. Cuando la densidad óptica sea entre 0.8 y 1.0 y el pH se sitúe entre 9.5 y 10.2, se transferirá la totalidad a un frasco de 500 ml con 200 ml de medio nuevo.

Nota: Estas condiciones corresponden al inicio de la fase estacionaria del crecimiento celular de las cianobacterias

4. El procedimiento se repetirá hacia recipientes de mayor volumen, respetando las proporciones mencionadas anteriormente, según la biomasa requerida para los ensayos de hidrólisis.

Nota: Realizar revisiones microscópicas semanales con el fin de verificar la morfología de los filamentos y descartar la presencia de contaminaciones por bacterias o protozoos.

5. **Cosecha.** Cosechar la biomasa utilizando una tela de malla o trama de 18 µm cuando el cultivo alcance la fase estacionaria temprana.
6. **Conservación.** Congelar inmediatamente el material biológico para conservar la integridad de los metabolitos sensibles al calor.

4. Referencias

Acien, F. G., Molina, E., Reis, A., Torzillo, G., Zittelli, G. C., Sepúlveda, C., & Masojidek, J. (2017). Photobioreactors for the production of microalgae. En *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts* (pp. 1-44). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00001-7>

Chang, J. S., Show, P. L., Ling, T. C., Chen, C. Y., Ho, S. H., Tan, C. H., Nagarajan, D., & Phong, W. N. (2017). Photobioreactors. En *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 313-352). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63664-5.00011-2>

Ranganathan, P., Pandey, A. K., Sirohi, R., Hoang, A. T., & Kim, S. H. (2022). Recent advances in computational fluid dynamics (CFD) modelling of photobioreactors: Design and applications. *Bioresource Technology*, 350, 126920. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126920>

Razzak, S. A., Bahar, K., Islam, K. M. O., Haniffa, A. K., Faruque, M. O., Hossain, S. M. Z., & Hossain, M. M. (2024). Microalgae cultivation in photobioreactors: Sustainable solutions for a greener future. *Green Chemical Engineering*, 5(4), 418-439. <https://doi.org/10.1016/j.gce.2023.03.004>

Skifa, I., Chauchat, N., Cocquet, P. H., & Le Guer, Y. (2025). Microalgae cultivation in raceway ponds: Advances, challenges, and hydrodynamic considerations. *EFB Bioeconomy Journal*, 5, 100073. <https://doi.org/10.1016/j.bioeco.2025.100073>

ANEXO X: DETERMINACIÓN Y LIBERACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN CIANOBACTERIAS

1. Fundamento

La utilización de cianobacterias (orden *Nostocales*) como fuente de compuestos bioactivos con potencial bioherbicida sobre *Hieracium pilosella* representa una estrategia biotecnológica innovadora y sustentable.

Dado que una fracción significativa de estos metabolitos (principalmente péptidos y exopolisacáridos) se encuentran en forma intracelular, resulta necesaria la aplicación de un proceso de hidrólisis enzimática controlada que permita la ruptura de las estructuras celulares y la liberación de los compuestos al medio acuoso, evitando el uso de solventes tóxicos y preservando la actividad biológica de las moléculas de interés.

2. Materiales

- **Soluciones**
 - Tampón fosfato 50 mM: ajustar el pH según el requerimiento de la enzima (rango óptimo 6.5 - 7.5)
 - Soluciones de ajuste de pH: Ácido cítrico 1 N e Hidróxido de sodio 1 N
 - Enzimas Hidrolíticas: según objetivo (celulasa, lisozima, proteasas como alcalasa/papaína y una mezcla comercial de enzimas peptidasas (Flavourzyme)
 - Agua destilada / Solución fisiológica
- **Equipamiento**
 - Micropipeta 100-1000 µl
 - Matraz 1000 ml
 - Agitador magnético con temperatura
 - Termómetro
 - pHmetro de alta temperatura
 - Espectrofotómetro
 - Balanza de precisión
 - Estufa de secado

3. Procedimiento

- **Adecuación de la biomasa previa a la hidrólisis**
 1. Pesar con precisión 50 g de biomasa húmeda de cianobacterias utilizando papel de filtro.
 2. Secar la biomasa en estufa a 50 °C hasta alcanzar peso constante.
 3. Estimar la relación biomasa húmeda / biomasa seca.

4. Calcular la cantidad de biomasa húmeda necesaria para obtener 50 g de biomasa seca y rehidratar en 1000 ml de tampón fosfato 50 mM, manteniendo una relación 1:10 (p/v) para obtener 1 litro de suspensión de cianobacterias.
5. Homogeneizar mediante agitación manual durante 15-30 minutos.

- **Hidrólisis**

Etapa 1 | celulasa

7. Calentar la suspensión hasta 40°C con agitación magnética constante (100-150 rpm).
8. Ajustar el pH de la solución a 6.0.
9. Adicionar 1 ml de enzima celulasa.
10. Mantener las condiciones de pH, T° y agitación durante 60 minutos.
11. Tomar una alícuota para: medición de absorbancia en espectrofotómetro (620-650 nm) y observación microscópica del grado de degradación celular.

Etapa 2 | proteasa (alcalasa)

12. Elevar la temperatura a 50°C.
13. Ajustar pH a 8.0.
14. Adicionar 0,6 ml de enzima alcalasa.
15. Mantener las condiciones de pH, T° y agitación durante 60 minutos.
16. Tomar nuevamente muestras para espectrofotometría (620-650 nm) y observación microscópica.

Etapa 3 | enzimas peptidasas

17. Elevar la temperatura a 65°C.
18. Ajustar pH a 6.00.
19. Adicionar 1 ml de la enzima peptidasa Mantener las condiciones de pH, T° y agitación durante 60 minutos.
20. Tomar muestras para espectrofotometría (620-650 nm) y observación microscópica.

Etapa 4 | Inactivación enzimática y conservación

21. Ajustar pH a 5,5.
22. Pasteurizar la solución durante 30 minutos a 85 °C.
23. Conservar el extracto en frascos estériles, en oscuridad, a 4°C para uso inmediato o a -20°C para almacenamiento a largo plazo.

4. Referencias

Łubek-Nguyen, A., Ziemichód, W., & Olech, M. (2022). Application of enzyme-assisted extraction for the recovery of natural bioactive compounds for nutraceutical and pharmaceutical applications. *Applied Sciences*, 12(7), 3232.

Sanjeewa, K. A., Herath, K. H. I. N. M., Kim, Y. S., Jeon, Y. J., & Kim, S. K. (2023). Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from seaweeds and microalgae. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 167, 117266.

Singh, S., Kate, B. N., & Banerjee, U. C. (2005). Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Critical reviews in biotechnology*, 25(3), 73-95.