

## CONTROL BIOLÓGICO DE LA MANCHA DE LA HOJA DEL TRIGO CON ESPECIES DEL GÉNERO *TRICHODERMA*

Stocco, M.<sup>1,2,\*</sup>; Consolo, F.<sup>2,4</sup>; Monaco, C.<sup>1,3</sup>; Kripelz, N.<sup>1,3</sup>;

Salerno, G. L.<sup>2,4</sup>; Cordo, C.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> CIDEFI, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. Calle 60 y 119, La Plata; <sup>2</sup> CONICET; <sup>3</sup> CICBA, Buenos Aires; <sup>4</sup> FIBA, Vieytes 3103, Mar del Plata.

\*marinastocco343@yahoo.com.ar

### RESUMEN

El objetivo de esta presentación es demostrar que el biocontrol de la mancha de la hoja del trigo es posible con la aplicación de *Trichoderma* spp. en diferentes modalidades. Se presenta una revisión de los bioensayos en invernáculo para seleccionar las mejores cepas de *Trichoderma* spp. como reductoras de la severidad de la enfermedad. Los resultados obtenidos motivaron experimentos en condiciones de campo, evaluando el efecto de dos cepas de *Trichoderma* spp. en el desarrollo de la enfermedad y en la ganancia del rendimiento de trigo.

Palabras clave: biocontrol, septoriosis del trigo, rendimiento.

### ABSTRACT

The objective of this presentation is to demonstrate that the biocontrol of the Septoria leaf blotch is possible on wheat with the application of *Trichoderma* spp. on different modalities. A review of bioassays in greenhouse to select the best strains of *Trichoderma* spp. that reduce the severity of the disease is presented. The results obtained led to experiments under field conditions, evaluating the effect of two strains of *Trichoderma* spp. as a biofungicide, considering the reduction of the disease severity and the gain of the wheat yield.

### INTRODUCCION

El género *Trichoderma* forma parte de un grupo de hongos de vida libre, de reproducción asexual, que interactúan con raíces, suelo y filoplano. Las poblaciones de este hongo muestran un alto nivel de variabilidad genética. Producen un amplio rango de sustancias antibióticas y parasitan otros hongos.

También compiten con otros microorganismos por exudados que estimulan la germinación de propagulos de patógenos de plantas en el suelo. Además, inhiben o degradan pectinasas y otras enzimas que son esenciales para los hongos patógenos de plantas que penetran la superficie de las hojas. Pueden inducir resistencia sistémica o localizada a una gran variedad de patógenos de plantas. Entre las enfermedades foliares de los cereales, la mancha de la hoja del trigo (MHT), causada por *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Shroeter,

in Cohn (anamorfo *Septoria tritici* Rob.et Desm.) es una enfermedad causante de importantes perdidas de rendimiento (Annone *et al.* 1991, Simon *et al.* 1996). El mejoramiento orientado a la resistencia es la medida mas economica de control; los tratamientos quimicos y las practicas culturales se suman para un manejo integrado (Jacobsen y Blackman 1993). Los compuestos quimicos controlan las enfermedades de los cultivos, aunque favorecen el desarrollo de patogenos resistentes a los fungicidas. El control biologico se considera ventajoso por disminuir los riesgos para el medioambiente.

Los antecedentes sobre agentes de biocontrol para enfermedades foliares de los cereales en Argentina citan a los hongos como alternativa (Dal Bello *et al.* 1998, Perello *et al.* 2001). La combinacion de los antagonistas con niveles reducidos de productos quimicos (control integrado) tambien disminuyen las enfermedades de manera similar al tratamiento tradicional (Monte 2001, Jeque *et al.* 2008). Todos estos trabajos se refieren a la reduccion de la severidad de las lesiones producidas por *Bipolaris sorokiniana* (Dal Bello *et al.* 1998), *Pyrenophora tritici-repentis* (Perello *et al.* 2009), *Mycosphaerella graminicola* (Cordo *et al.* 2007, Perello *et al.* 2009) en trigo, aunque poco se conoce sobre la manera en que influye el biocontrol en el rendimiento.

El objetivo de esta publicacion es demostrar que el biocontrol de la mancha de la hoja del trigo es posible con la aplicacion de *Trichoderma* spp. en diferentes modalidades. Se presenta una revision de los distintos experimentos cuyos resultados motivaron la aplicacion del agente biocontrolador bajo condiciones de campo, evaluando su influencia en el desarrollo de la enfermedad y en la ganancia del rendimiento.

## MATERIALES Y METODOS

### Bioensayos en invernáculo

El primer paso para realizar estudios de actividad biocontroladora sobre un patogeno comienza con la seleccion de cepas del organismo antagonista, que en nuestro caso es *Trichoderma* spp. Para ello se recolectaron muestras de suelo de toda la region triguera argentina: de la Region I, Santa Fe; de la II Norte, Pergamino; de la II Sur, Los Hornos, Bragado; de la III, Parana; de 198 Stocco - Consolo - Monaco - Kripelz - Salerno - Cordo la IV, Loberia; de la V Norte, Manfredi y la V Sur, Bordenave (Figura 1). El muestreo de modo jerarquico se realizo de la rizosfera de trigo. Cada muestra fue acondicionada y conservada en la heladera a 4 oC. Luego de la recoleccion se realizaron los aislamientos de las cepas de *Trichoderma* spp., mediante la tecnica de dilucion en placas, utilizando el medio de cultivo selectivo para el genero. Las cepas fueron conservadas mediante la tecnica de papel de filtro

descrita por Stocco *et al.* 2010. Se realizaron ensayos biológicos en invernáculo, mediante inoculaciones artificiales del patógeno sobre plantulas provenientes de semillas peleteadas con el agente biocontrolador (Cordo *et al.* 2007).

Para cada localidad se ensayaron 30 cepas de *Trichoderma* spp. Se evaluó el potencial antagonista por la reducción del área necrosada y de la superficie cubierta con picnidios, para las hojas 1° y 2°, cuando las plantas de trigo de un cultivar susceptible (Buck Guapo) se inocularon con una mezcla de 2 cepas virulentas de *S. tritici*. Los porcentajes de necrosis y de cobertura picnidial se analizaron por ANOVA, comparando sus medias con el test de LSD para un nivel de significancia del 5%. Se seleccionaron las cepas que redujeron un 50% o más de la necrosis y/o de la cobertura picnidial con respecto al testigo.

Figura 1. Regiones Trigueras argentinas. SINAVIMO.

Identificación molecular y variabilidad genética de *Trichoderma harzianum*

Para la identificación de la especie *T. harzianum* se aplicó la técnica de PCR con los *primers* (cebadores) ITS1, ITS4. Para analizar la variabilidad genética entre los diferentes aislamientos de la especie, se utilizaron 12 *primers* de ISSR y 4 *primers* de UP-PCR (Consolo *et al.* 2011).

Control biológico de la mancha de la hoja del trigo... 199

Experimentos bajo condiciones de campo

Se utilizaron semillas de trigo del cultivar Buck 55CL2 (moderadamente susceptible al patógeno). Las cepas de *S. tritici* provinieron de las localidades 9 de Julio (FALP9J008) y Pla (FALPLA008) (Buenos Aires). Para la inoculación, los conidios obtenidos en agar extracto de malta se suspendieron en agua destilada, ajustando la concentración a  $1 \times 10^6$  esporas ml<sup>-1</sup>.

Para producir inóculo de *Trichoderma* spp., tanto para el peleteado como para la aplicación aérea, se utilizaron las cepas Th5cc y Th118. El ensayo se realizó en la Estación Experimental J. Hirschhorn, en Los Hornos (La Plata). Se evaluó el efecto biocontrolador de las cepas solas y en combinación con un fungicida comercial (mezcla de Azoxystrobin-Ciproconazole, a dosis recomendada) sobre la severidad de la mancha de la hoja del trigo y su efecto sobre el rendimiento. Se implementaron diferentes técnicas de aplicación, en tres estadios fenológicos (plantula, macollaje, espigazón), según los siguientes tratamientos: plantas testigo inoculadas con el patógeno; plantas provenientes de semillas peleteadas con las cepas de *T. harzianum* e inoculadas con *S. tritici*; plantas provenientes de semilla peleteada y pulverizadas en hoja con suspensión de *T. harzianum*, 24 horas antes que la inoculación con *S. tritici* o combinando una suspensión de *T. harzianum* aplicada con 24h de anticipación y fungicida aéreo en mitad de la dosis, aplicado 7 días antes de la inoculación con el patógeno y testigos, con aplicaciones de fungicida

en plantula, plantula y macollaje, plantula, macollaje y espigazon y solo espigazon e inoculados con *S. tritici*. Se cuantifico el control a traves de la disminucion de la severidad y los parametros de rendimiento. Se realizaron tres evaluaciones durante el desarrollo del cultivo: inicio de encanazon (GS31), espigazon (GS59) y grano pastoso (GS82). Los valores medios de severidad y del rendimiento y sus componentes se analizaron por ANOVA para parcelas divididas. Las medias se compararon mediante el test LSD ( $P=0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Bioensayos en invernáculo

Las siguientes cepas de *Trichoderma* spp. integran el Banco micologico que se ofrece en el CIDEFI, recomendandolas por su efecto significativamente reductor de los parametros de severidad. En la Tabla 1 se presentan las cepas de *Trichoderma* spp., destacadas por reducir el 50% o mas de la necrosis de la 1° hoja de trigo.

200 Stocco - Consolo - Monaco - Kripelz - Salerno - Cordo

Tabla 1. Cepas biocontroladoras de *Trichoderma* spp. de las diferentes regiones trigueras argentinas

Cepas de

*Trichoderma* spp

73 80 90 92 107 114      129 131 140

% de reduccion

de la necro.

50 50 50 50 52 50      75 65 68

Cepas de

*Trichoderma* spp

141 160 162                      206 221

% de reduccion

de la necro.

75 92 65                      71 70

En gris se destacan las cepas que produjeron simultaneamente una importante reduccion de los dos parametros de la severidad.

Las cepas destacadas por reducir el 50 % o mas de la cobertura picnidial producidas por *S. tritici* en 1° hoja de trigo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas biocontroladoras de *Trichoderma* spp. de las diferentes Regiones trigueras argentinas.

Cepas de

*Trichoderma* spp

92 104 107      129 131 140 151 160 162

% de reduccion

de la necro.

71 72 71      70 70 70 70 70 78

Cepas de

*Trichoderma* spp

165                    177            182 210

% de reduccion

de la necro.

76                    70            80 70

En gris se destacan las cepas que produjeron simultaneamente una importante reduccion de los dos parametros de la severidad.

Identificación molecular y variabilidad genética de *Trichoderma harzianum*

La identificación basada en las secuencias de ITS revelo que, de un total de 77 cepas estudiadas, el 50% correspondieron a *T. harzianum*.

En la Figura 2 se observa el dendrograma UPGMA basado en el indice de similitud Dice (SD) que ilustra la relacion genetica entre las 20 cepas de *T. harzianum* de dos de las 8 localidades de la region triguera argentina.

Para un coeficiente de similitud del 73%, se han determinado 3 grandes grupos. El primer *cluster* (a) se encontro integrado por 7 cepas de *T. harzianum*, 6 de Los Hornos y 1 de Bragado. El segundo grupo (b) cuenta con 4

Control biologico de la mancha de la hoja del trigo... 201

cepas, 3 pertenecen a Bragado y 1 cepa a Los Hornos. Por ultimo, el tercer gran grupo (c) esta constituido por 6 cepas de *T. harzianum*, de las cuales 3 fueron aisladas de Los Hornos y 3 de Bragado. Tambien se puede observar que existen 3 cepas 28, 17b y 4 que no se encuentran dentro de los tres grandes *clusters*. Este dendrograma se vera modificado con la incorporacion al analisis del resto de las cepas estudiadas.

Figura 2. Dendrograma UPGMA basado en el indice de similitud de Dice.

Experimentos bajo condiciones de campo

En la Tabla 3 se presentan los valores promedio de severidad para los 3 estadios evaluados.

Tabla 3: Medias de Severidad por *S. tritici* en 2°hoja (GS31), 5°hoja (GS59) y hoja bandera (HB) y bandera-1 (HB-1)(GS82) en un ensayo con diferentes tratamientos.

Tratamientos

Severidad (%)

de necrosis)e

Severidad (%)

de necrosis)

Severidad (%)

de necrosis)

Encanazon

(GS31)

Espigazon

(G59)

Grano pastoso

(GS 82)

Testigo 60,8c 82,3aa 83,2 ab

Tr. pell + S.t 58,6c 78,1aa 46,9 d

Tr. Pell + Tr. aer maco + S.t 58,6c 68,8a 61,7 c

Tr. pell + Tr. aer mac +

Tr. aer espig. + S.t 58,6c 68,8a 87,3 a

Tr pell + FF . d plant + St 45,2b 73,0a 66,5 bc

Tr pell + FF . d mac

+ Tr aer mac + St 45,2b 79,8a 73,8 abc

202 Stocco - Consolo - Monaco - Kripelz - Salerno - Cordo

Tr pell + FF . d mac, espig

+ Tr aer mac, espig + St 45,2b 79,8a 86,1 a

FF plant + St 35,6aa 61,9b 87,3 a

FF plant, mac + St 35,6aa 64,1b 78,0 abc

FF plant, mac, espig + St 35,6a 64,1b 47,0 d

FF espig + St 35,6a 64,1b 84,2 ab

S.t: *Septoria tritici*; Tr. pell: *Trichoderma* spp. peleteada en semilla; Tr. aer

mac.: *Trichoderma* spp. aerea aplicada en macollaje; Tr.aer.espig: *Trichoderma*

spp. aplicada en espigazon; FF: fungicida foliar dosis recomendada;

FF.1/2d.: fungicida foliar aplicado en media dosis de lo recomendado.

En el estado de grano pastoso, los menores valores de severidad se presentaron con tres aplicaciones de fungicida foliar (en plantula, macollaje y espigazon). No obstante, estos valores fueron comparables a la aplicacion de *Trichoderma* solo como *pellet* en la semilla, sin recibir otras aplicaciones o una aplicacion aerea de *Trichoderma* en macollaje, como un refuerzo a la aplicacion del antagonista en la semilla. Estos resultados estan relacionados con las demostraciones experimentales de Segarra *et al.* (2002), Cordo *et al.* (2007). Como *Trichoderma* spp. no estuvo presente en las hojas de las plantas inoculada con el patogeno que crecian a partir de semillas peleteadas con el mismo biocontrolador, la estimulacion de la actividad proteolitica, a traves de la serin-proteasa en el fluido intercelular de las hojas asintomaticas, debio ser considerada como una respuesta sistematica inducida. Constituye uno de los mecanismos bioquimicos de la defensa en la planta propuestas por Hanson & Howell (2004).

Los valores de rendimiento obtenidos con la aplicacion del fungicida foliar en los estadios de macollaje y espigazon son equiparables a los obtenidos con solo el peleteado de la semilla con *Trichoderma*, superando levemente el rendimiento promedio, con una ganancia de 278.5 kg ha<sup>-1</sup>; no obstante, el tratamiento que recibio un refuerzo aereo del biocontrolador en macollaje

fue el que mayor ganancia produjo, con 426.5 kg ha<sup>-1</sup> mas que el rendimiento promedio. El rendimiento tambien se vio incrementado cuando a la plantula proveniente de la semilla peleteada con el antagonista se le aplico media dosis del fungicida foliar con una ganancia de 234.5 kg ha<sup>-1</sup>. Los tratamientos con aplicacion del fungicida y/o el biocontrolador redujeron la severidad, aumentando el rendimiento debido al mantenimiento de la actividad fotosintetica del follaje durante el llenado del grano (Pepler *et al.* 2005). El n° de espigas m<sup>-2</sup> y el peso de 1.000 granos fueron mayores con los tratamientos combinados (*pellet* y aerea), comparados con el testigo enfermo. Ademas, con solo el peleteado de la semilla con el antagonista se obtuvieron valores altos en el n°

Control biologico de la mancha de la hoja del trigo... 203

de espigas m<sup>-2</sup>, semejantes a una unica aplicacion de fungicidas en el estadio de espigazon y con una aplicacion aerea del antagonista como refuerzo del peleteado. En cuanto al peso de mil granos, la aplicacion de *Trichoderma* solamente a la semilla arrojó valores semejantes a la aplicacion combinada del antagonista y media dosis de fungicida aereo en todos los estadios. Al inducir una proteccion hasta el inicio de la floracion, se favorecio una mayor acumulacion de fotosintatos con el consiguiente aumento de la biomasa. Hay un periodo prolongado (desde inicio de encanazon hasta cerca de la antesis) con severidad disminuida que define mayor n° de espigas planta<sup>-1</sup> y, por lo tanto, por m<sup>-2</sup>. Falico *et al.* (2007), combinando aplicaciones en diferentes estadios y en el suelo como un biofertilizante, mejoro la biomasa de un trigo de ciclo largo, aumentando el n° de plantas m<sup>-2</sup> y el rendimiento entre un 8 y el 19% con respecto al testigo sin tratar y del 10% con respecto al tratado con fungicida. Tanto para la severidad como en el rendimiento y sus parametros, las diferencias en la tolerancia de los conidios de *Trichoderma* spp. a las condiciones microclimaticas (temperatura, luz ultravioleta, escasa humedad) que caracterizan a la aplicacion en espigazon explicarian la falta de proteccion que observo Perello *et al.* (2009) en repetidas ocasiones.

## CONCLUSIONES

Se destaca la importancia de la seleccion previa de las cepas de *Trichoderma* en ensayos en invernaculo, para corroborar su capacidad biofungicida en posteriores experimentos a campo. Para esta ultima condicion, al menos dos aplicaciones (peleteado en semilla y una aplicacion aerea en macollaje) no solo disminuyo la severidad hasta grano pastoso, sino que tambien aumento el rendimiento en kg ha<sup>-1</sup>.

## BIBLIOGRAFIA

- Annone J., O. Calzadori, H. Polidoro and H. Conta. 1991. Efecto de la mancha de la hoja causada por *Septoria tritici* sobre el rendimiento. INTA EEA Pergamino. Informe No 122, 4 pp.
- Consolo F.V., C.I. Monaco, C.A. Cordo and G.L. Salerno. 2011. Characterization of novel *Trichoderma* spp. Isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28:1389-1398.
- Cordo C., C. Monaco, C. Segarra, M.R. Simon Y.M., Mansilla, A. Perello, N. Kripelz, D. Bayo and R.D. Conde. 2007. *Trichoderma* spp. as elicitors of wheat plant defense responses against *Septoria tritici*. *Biocontrol Science and Technology* 17:687-698.
- Dal Bello G., M. Sisterna, M.R. Simon and C.I. Monaco. 1998. Control Biologico del tizon de la plantula del trigo causado por *Bipolaris sorokiniana*. Congreso argentino de control biologico de las enfermedades de las plantas. Buenos Aires.
- 204 Stocco - Consolo - Monaco - Kripelz - Salerno - Cordo
- Falico L. and C. Varaschini. 2007. Experiencia de implantacion de trigo con microorganismos incorporados a la siembra. Jornada de actualizacion en enfermedades de trigo. Insitituto Fitotecnico de Santa Catalina, FCAyF, UNLP. 47-49 pp.
- Hanson L.E. and C.R. Howell. 2004. Elicitors of plant defense responcees from biological control strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 94:171-176.
- Jacobsen B. and P. Blackman. 1993. Biological and cultural plant disease control, alternatives and supplements to chemical in IPM systems. *Plant Disease* 77:311-315.
- Jequé F.A., Simon M.R., C. Cordo, C. Monaco. 2008. Control biologico de la mancha de la hoja del trigo con *Trichoderma harzianum*. VII Congreso Nacional de trigo. V Simposio Nacional de Siembra Otono-Invernal, I encuentro del MERCOSUR. Santa Rosa, La Pampa. PV26.
- Monte E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology* 4:1-4.
- Pepler S., M. Gooding, K. Ford, R. Ellis and S. Jones. 2005. Delaying senescence of wheat with fungicides has interacting effects with cultivar on grain sulphur concentration but not with sulphur yield or nitrogen sulphur ratios. *European Journal of Agronomy* 22:405-416
- Perello A, M.R. Simon, C. Cordo and A.M. Arambarri. 2001. Greenhouse sceening of the saprophytic resident micoflora for control leaf spots of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Phytoparasitica* 29:341-351.
- Perello A, V. Moreno, C. Monaco, M.R. Simon and C. Cordo. 2009. Biological control of *Septoria tritici* blotch of wheat by *Trichoderma* spp under field conditions in Argentina. *Bio-Control* 54:113-122.
- Segarra C., C. Casalongue, M. Pinedo, C. Cordo and D. Conde. 2002. Changes in wheat leaf extracellular proteolytic activity after infection with *Septoria tritici*. *Journal of Phytopathology* 150:105-111.
- Simon M.R., A. Perello, C. Cordo and H. Arriaga. 1996. Influencia de la infeccion tardia de *Septoria tritici* Rob. Ex Desm. Sobre el peso de mil granos y algunos parametros de calidad en *Triticum aestivum* L. *Investigación Agraria* 11:161-171.
- Stocco M, C.I. Monaco and C. Cordo. 2010. A comparison of preservation methods for *Trichoderma harzianun* cultures. *Revista Iberoamericana de Micología* 27 (4):213.
- <http://www.sinavimo.gov.ar/articulo/sistema-de-vigilancia-en-el-cultivo-de-trigo>