



A1-198 Reservorio fenotípico de cepas de *Trichoderma* spp con capacidad biocontroladora: su aporte para un manejo agroecológico de enfermedades.

Stocco, M^{1,5}; Mónaco, C^{1,2}; Lampugnani, G³; Abramoff, C³; Kripelz, N^{1,2}.; Consolo, F^{4,5} y Cordo, C^{1,2}

¹CIDEFI. ³Curso de Terapéutica Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP. Calle 60 y 119. ²CICBA. ⁴INBIOTEC-CONICET. ⁵CONICET. Correo electrónico: marinastocco343@yahoo.com.ar

Resumen

Las especies de *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el biocontrol de enfermedades de plantas, debido a su ubicuidad y su facilidad para ser aisladas y cultivadas. El objetivo fue lograr una colección de especies de *Trichoderma*, de distinto origen geográfico y actividad biocontroladora sobre *Zymoseptoria tritici*, en trigo. Se evaluaron 240 aislamientos de *Trichoderma* obtenidos de muestras de suelo de la región triguera argentina. La capacidad antagonista se ensayó en plántulas de trigo, en invernáculo. Se seleccionaron las cepas con mejor aptitud biocontroladora (por reducir el porcentaje de área necrosada y de cobertura picnidial en hoja). Se observó que la reducción de la cobertura picnidial fue el parámetro que más homogéneamente se repite con todas las cepas, alcanzando entre un 45 a 90% de reducción. Con estas cepas caracterizadas fenotípicamente se organizó el Banco Micológico en el que se pone a disposición de la comunidad científica aislamientos nativos de *Trichoderma* spp. para ser utilizados en el manejo de enfermedades locales, dentro de una agricultura sustentable.

Palabras claves: biocontrol; *Trichoderma* sp.; *Zymoseptoria tritici*.

Abstract

Trichoderma species are the antagonists used for biocontrol of plant diseases, due to its ubiquity and its ability to be isolated and cultured. The objective was to achieve a collection of species of *Trichoderma*, from different geographical origin and with biocontroller activity on *Zymoseptoria tritici* in wheat. *Trichoderma* isolates (240) obtained from samples of soil from the wheat growing region of Argentina were evaluated. The antagonistic capacity was tested in seedlings of wheat in the greenhouse. The biocontrollers strains were selected by reducing the percentage of necrotic area and pycnidial coverage. It was observed that reducing pycnidial coverage was more homogeneously the parameter is repeated with all strains, reaching between 45 to 90% reduction. With these strains, characterized phenotypically, organized the Fungal collection in which they are available, native strains of *Trichoderma* spp. to be used in the management of local diseases, within a sustainable agriculture.

Keywords: Biocontrol; *Trichoderma* sp.; *Zymoseptoria tritici*.

Introducción

Dentro de las enfermedades foliares de los cereales, la mancha de la hoja del trigo (MHT), causada por *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvlieg & Crous (antiguamente *Mycosphaerella graminicola* y *Septoria tritici*) es una enfermedad que ocasiona pérdidas de rendimiento en Argentina del 17 y 50% dependiendo del estado fenológico en el que ocurre la infección (Simón et al. 1996). Tradicionalmente el productor agropecuario aplica fungicidas en altas dosis y frecuencias para el control (o erradicación) de las enfermedades causadas por hongos, eliminando una gran cantidad de especies fúngicas, la mayoría saprófitas. Este

vacío provoca un riesgo de reinvasión por parte de los patógenos ante las pérdidas del efecto amortiguador que le opone la flora saprobia. La consecuencia de la eliminación de los saprobios naturales ha forzado a la utilización de fungicidas cada vez más potentes, lo que significa una mayor agresión al ecosistema y la presencia de altos niveles de residuos en productos cosechados (Mónaco, 2002). Otra de las consecuencias del excesivo uso de agroquímicos, además de los altos costos en la producción, es la contaminación ambiental (suelo, aire, agua) y los problemas de toxicidad para el hombre y los animales, además de la eliminación de la fauna benéfica (Butt et al., 2001). Otro problema, fundamental para la Agroecología, es el acceso a la tecnología. Hay que tener en cuenta que el 70 % de los agricultores de la Argentina son agricultores familiares y no siempre tienen dinero para comprar los insumos. En este caso es fundamental fortalecer los procesos ecológicos de regulación biótica y este trabajo puede hacer un aporte en este sentido.

La Agroecología busca, entre otras cosas un mayor fortalecimiento de los procesos ecológicos que provee la biodiversidad para disminuir el uso de insumos externos. Las plantas hospedan muchos microorganismos no patógenos o débilmente patógenos en forma endófito o epífita. Tales microorganismos pueden ser importantes antagonistas que se encuentran dentro, sobre tejidos vegetales y en la rizosfera del cultivo (Mónaco, 2002). Según la capacidad antagónica que posean, podrán desplazar, reducir, suprimir o inducir la resistencia al patógeno (Mónaco, 2002). Las especies de *Trichoderma*, están ampliamente difundidas en la comunidad microbiana de los suelos y alguno de sus representantes se destacan, por sus propiedades antagonistas (Dal Bello, 1997). Estas especies son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Papavizas et al., 1982). Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno son fundamentalmente de cuatro tipos: competición directa por el espacio o por los nutrientes, producción de metabolitos antibióticos, parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre el hongo fitopatógeno e inducción de la resistencia en plantas (Howell, 2003; Harman et al., 2004; Shores et al., 2010). El control biológico es el resultado de un número de diferentes mecanismos de acción del antagonista que actúan en forma sinérgica (Howell, 2003). La importancia relativa de cada uno de ellos depende de cada interacción de antagonista-patógeno y de las condiciones ambientales.

El objetivo de este trabajo fue lograr una numerosa colección de especies del género *Trichoderma*, de distinto origen geográfico y actividad biocontroladora comprobada sobre *Zymoseptoria tritici*, en plantas de trigo. La colección permitirá ampliar la red de trabajos científicos sobre la capacidad biocontroladora de las cepas a nivel experimental y en un futuro a nivel aplicado.

Metodología

Durante los años 2008, 2009, 2010 y 2011 se recolectaron muestras de suelo de distintas zonas geográficas de la Región Triguera Argentina, pertenecientes a las localidades de Los Hornos, Bragado, Bordenave, Parana, Manfredi Lobería, Pergamino y Santa Fe (Figura 1). Se realizó un muestreo jerárquico de la rizosfera de las plantas de trigo. Cada una de estas muestras se acondicionó (secada a temperatura ambiente, molida con un mortero y tamizada a través de un cedazo) y se conservó en la heladera a 4 °C.



FIGURA 1. Mapa de las Subregiones trigueras de la Argentina. Sitios de aislamiento de *Trichoderma*: (a) Los Hornos (b) Bragado (c) Bordenave (d) Paraná (e) Manfredi (f) Lobería (g) Pergamino (h) Santa Fe.

Obtención de aislamiento de Trichoderma spp.

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. se realizaron a partir de las muestras de suelo conservadas a baja temperatura. Se utilizó la técnica de dilución en placas con el medio de cultivo selectivo para *Trichoderma* (TSM) (Elad et al., 1981). De cada una de las diluciones, se colocó en cajas de Petri, 1 ml de la suspensión con 1 ml de la solución fungistática con PCNB (Pentacloronitrobenceno). Posteriormente, se agregó el medio de cultivo (TSM) fundido y enfriado a 50°C. Las cajas fueron incubadas en estufa a 26°C, durante 5 días. Aquellas colonias de *Trichoderma* spp. que crecieron de manera aislada fueron repicadas en agar de papa glucosado al 2% (APG).

Aislamientos y producción de inóculo de Z. tritici

Los aislamientos de *Z. tritici* se realizaron a partir de fragmentos de tejido infectado de hojas de trigo. Para la producción del inóculo se utilizó una mezcla de dos aislamientos virulentos de *Z. tritici*, de dos localidades: 9 de Julio (FALP9J008) y Pla (FALPLA008), ambas de la provincia de Buenos Aires. Para lograr una cuantiosa esporulación, los aislamientos se cultivaron en cajas de Petri con el medio de cultivo agar malta. La suspensión de conidios se obtuvo inundando las cajas con aproximadamente 5 ml de agua destilada; luego se raspó la superficie de la colonia con un ansa estéril y, por último, la suspensión resultante se filtró con una malla tramada. La concentración de la suspensión se ajustó a 1×10^6 esporas/ml.

Actividad biocontroladora de aislamientos seleccionados de Trichoderma frente al agente causal de la MHT

Los ensayos biológicos se realizaron mediante inoculaciones artificiales en invernáculo siguiendo la técnica descrita por Cordo et al. (2007). Se seleccionaron 30 cepas de *Trichoderma* spp. de cada una de las zonas de la región triguera argentina (Figura 1). Cada una de las 30 cepas se aplicó recubriendo la semilla de trigo con el micelio y conidios del antagonista. Para esto, se agitaron las semillas por 30 minutos en una suspensión preparada con 90 ml de agar agua al 2% al que se adicionaron 10 ml de una suspensión de conidio de *Trichoderma* spp. y 1 gota de tensioactivo. Luego se las dejó secar a temperatura ambiente por 24h. Las semillas recubiertas con cada cepa de *Trichoderma* spp. se sembraron en bandejas de (16 cm x 10 cm x 5 cm) en tres repeticiones por bloque. En el caso del testigo se sembraron semillas sin el hongo. Estas bandejas se mantuvieron en

invernáculo durante la duración del ensayo con un período variable entre 35 y 43 días, dependiendo de la influencia de la temperatura. Diariamente se registraron las temperaturas máximas, mínimas y la humedad ambiental máxima y mínima. De esta manera se controló que las condiciones ambientales fueran las adecuadas para el desarrollo de la enfermedad. Se evaluó el potencial antagonista de las cepas ensayadas estimando la reducción del área necrosada y de la superficie cubierta con picnidios, ambas para la primera y la segunda hoja, cuando las plantas de trigo de un cultivar susceptible (Buck Guapo) se inocularon con una mezcla de las dos cepas virulentas de *Z. tritici*. Esto se comparó con un testigo sin antagonistas. De esta forma se midió la capacidad de cada aislamiento de *Trichoderma* spp. de restringir el progreso de la MHT, 21 días posteriores a la inoculación.

Resultados y discusión

A nivel nacional o internacional no existen antecedentes similares sobre el comportamiento de poblaciones de *Trichoderma* spp. en ensayos conducidos en plántulas de trigo para evaluar actividad biocontroladora. En este estudio se ensayaron 240 cepas de *Trichoderma* obtenidas de muestras de suelo de diferentes localidades de la región triguera argentina. La vasta extensión de esta región integra una gran amplitud de regímenes térmicos, hídricos y una gran diversidad de suelos. Dal Bello et al. (2011), para lograr la supresión de *Botrytis cinerea* in vitro, ensayaron 300 cepas de diferentes especies de antagonistas, obtenidas a partir de hojas, frutos y flores de plantas de la familia Solanaceas. Ambos estudios destacan la importancia de utilizar antagonistas microbianos nativos para el control de hongos a campo o en invernáculo. Sutton (1995), al igual que otros autores como Mónaco (2002) y Dal Bello (1997), señalaron la importancia de la adaptación ecológica de los microorganismos utilizados como antagonistas en los cultivos. Consolo et al. (2012) estudiaron 33 cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de suelo de diferentes agroecosistemas (Cultivos de soja, arroz y maíz) de Buenos Aires; sin embargo, sólo analizaron el comportamiento in vitro de las cepas sobre diferentes patógenos. Cordo et al. (2007) determinaron que la técnica de aplicación de los antagonistas más eficiente para controlar a *Z. tritici* es el recubrimiento de la semilla. Al igual que en este estudio, la capacidad antagonista fue realizada en bioensayos en plántulas. Sin embargo, los aislamientos de *Trichoderma* spp. fueron obtenidos de diferentes cultivos (alfalfa, clavel y trigo) o seleccionados por sus antecedentes como hiperparásitos de *Sclerotium rolfsii*.

La Tabla 1 muestra el origen geográfico de los aislamientos con actividad biocontroladora. Se observó que los aislamientos 123 y 160 disminuyeron la necrosis en hoja en más de un 90 % (comparadas con el testigo =100% de enfermedad). Los aislamientos 73, 80, 93, 107, 108, 114, 123, 129, 131, 140, 141, 160, 162, 165, 170, 172, 206 y 215 presentaron una reducción mayor del 50 % comparado con el testigo. Teniendo en cuenta la cobertura picnidial, se dedujo que la reducción de la enfermedad es más uniforme entre todos los aislamientos. Estos valores de reducción variaron entre un 45% y un 80%. Los aislamientos más destacados fueron el 123 y el 170 por reducir más del 90% este parámetro.

TABLA1. Origen geográfico de los aislamientos con actividad biocontroladora comprobada.

Localidad	Año	Nº de identificación de los aislamientos
Los Hornos	2008	1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 12,13, 14, 15, 18, 24, 26, 29, Th5CC, Th118
Bragado	2008	33, 34, 42, 46, 50, 54, 56, 57, 58, 59, 60
Bordenave	2009	62, 63, 66, 67, 68, 69, 71, 72, 73, 74, 76, 77, 78, 79, 80,81, 83, 87, 89, 90
Paraná	2009	92, 93, 95, 97, 98, 102, 103, 107, 108, 113,114, 115, 117, 119
Manfredi	2010	123, 129, 131, 140,141
Lobería	2010	160, 162, 165, 170, 172, 177
Pergamino	2011	181, 182,183, 206, 210
Santa Fe	2011	211, 215, 217, 218, 219, 220, 229, 236

Se ha demostrado que *Trichoderma* tiene la capacidad de inducir la resistencia frente a una amplia gama de enfermedades, causadas por diversas clases de patógenos (hongos, bacterias y virus). La resistencia sistémica queda demostrada porque el control de la enfermedad se produce en un sitio que está lejos de la ubicación del antagonista (Harman et al., 2004). En este principio se basa el uso de semillas de trigo cubiertas con los organismos antagonistas, como la técnica adoptada en nuestros ensayos (Cordo et al., 2007; Perelló et al., 2009; Stocco et al., 2009, 2012).

Las bondades que presentan las cepas del antagonista *Trichoderma*, han hecho posible la elaboración de productos biológicos con características amigables con el ambiente. El éxito de estos productos está amparado por una precisa selección de cepas, tanto desde el punto de vista fisiológico, como por su capacidad biocontroladora y por un estricto sistema de calidad para su producción.

Conclusión

Con las cepas aisladas y caracterizadas fenotípicamente, se organizó el Banco Micológico. Se encuentran disponibles cepas nativas de *Trichoderma* spp. para ser utilizadas en el manejo de enfermedades locales, dentro de una agricultura sustentable. El Banco se encuentra en el Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. Las cepas de *Trichoderma* están disponibles para ser utilizadas en ensayos de control biológico, se solicitan por nota y se acuerda como se entregará un cultivo de las mismas.

Referencias bibliográficas

- Butt TM, C Jackson & N Magan (2001) Introduction-Fungal biological control agents: Progress, problems and potential. In: Fungal Biocontrol Agents: Progress Problem and Potential, CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom: 1-8.
- Consolo F, C Mónaco, C Cordo & G Salerno (2012) Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28 (4):1389–1398
- Cordo CA, C Monaco, CI Segarra, MR Simón, AY Mansilla, AE Perelló & RD Conde (2007) *Trichoderma* spp. as elicitors of wheat plant defense responses against *Septoria tritici*. *Biocontrol Science and Technology*, 17 (7): 687–698.
- Dal Bello G, C Mónaco & Chaves R (1997) Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo. *Revista Iberoamericana de Micología*, 14: 131–134.
- Dal Bello G, MC Rollán, G Lampugnani, C Abramoff, L Ronco, S Larrán, M Stocco & Mónaco (2011) Biological control of leaf grey mould of greenhouse tomatoes caused by *Botrytis cinerea*. *International Journal of Pest Management*, 57 (3): 177–182.
- Elad Y, I Chet & I Henis (1981) A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* sp. from soil. *Phytoparasitica*, 71: 59-67.
- Harman GE, CR Howell, A Viterbo, I Chet & M Lorito (2004) *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 43-56.
- Howell CR Stipanovic & R Lunsen (1993) Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. *Biocontrol Science and Technology*, 3: 435-441.
- Mónaco C (2002) Posibilidades del manejo de enfermedades mediante el uso de antagonistas. En: Agroecología. El camino hacia una agricultura sustentable. La Plata, Bs As. Argentina: 309-318.
- Papavizas GC, JA Lewis & TH Abd-El Moity (1982) Evaluation of new biotypes of *T. harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology*, 72: 126-132.
- Perelló A, V Moreno, C Mónaco, MR Simón & C Cordo (2009) Biological control of *Septoria tritici* blotch of wheat by *Trichoderma* spp under field conditions in Argentina. *Biocontrol*, 54: 113-122.
- Shoresh M, GE Harman & F Mastouri (2010) Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 21-43.
- Simón MR, A Perelló, C Cordo & H Arriaga (1996) Influencia de la infección tardía de *Septoria tritici* Rob. Ex Desm. Sobre el peso de mil granos y algunos parámetros de calidad en *Triticum aestivum* L. *Investigación Agraria*, 11: 161-171.
- Stocco M, F Consolo, C Mónaco, N Kripelz, GL Salerno & C Cordo (2012) Control biológico de la mancha de la hoja del trigo con especies del genero *Trichoderma*. En: Cereales de Invierno Segunda Jornada Temática del INBA "La investigación científico-técnica en cereales de Invierno". Universidad Nacional del Centro, Buenos Aires. Argentina: 197-205.
- Stocco M, C Mónaco, N Kripelz, C Segarra, G Lampugnani, C Abramoff, G Laporte, N Arteta & C Cordo (2009) Mecanismo de acción de *Trichoderma* spp. para el biocontrol de la Septoriosis del trigo. XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. 1-2 de octubre. Santiago del Estero. Argentina: 89.
- Sutton J (1995) Evaluation of microorganisms for biocontrol: *Botrytis cinerea* and strawberry, a case study. *Advances in Plant Pathology*, 11: 173–190.