

## ESTUDIOS PRELIMINARES DE BIOCONTROL DE “MANCHA EN RED” DE LA CEBADA EN SEMILLA, CON CEPAS DE *Trichoderma* spp. Ensayos “in vitro”

Paulina Moya<sup>1</sup>; Marina N. Sisterna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CIDEFI –CIC, FCAyF, UNLP. 60 y 119, 1900, La Plata, Bs. As.

Email: p\_moya\_@hotmail.com

La “mancha en red” de la cebada, producida por el hongo *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem. (teleomorfo *Pyrenophora teres* Drechsler) es una enfermedad endémica en la Argentina, llegando a tener una prevalencia del 76 % e incidencia del 100%, presentándose desde el estado de plántula hasta la cosecha. Produce pérdidas en el rendimiento del 20% y disminuye el peso y cantidad de granos/m<sup>2</sup>. La semilla infectada y el rastrojo son las principales fuentes de inóculo de la enfermedad. Las semillas constituyen el agente más eficiente de disseminación y el medio más seguro para la supervivencia de los patógenos cumpliendo un rol fundamental en sus ciclos de vida. La asociación de los patógenos con las semillas, les asegura la obtención de nutrientes en el momento de la germinación y emergencia de las plántulas (Reis et al., 1999). *D. teres*, se transmite de la semilla infectada a los órganos aéreos para dar continuidad a su ciclo de vida, con una tasa de transmisión del 21%, por esto el tratamiento de semilla es la clave para impedir la introducción de éste patógeno en los lotes de cultivo.

El método más frecuentemente utilizado para el control de las enfermedades de semillas es el uso de fungicidas. Si bien diversos estudios demostraron que se puede controlar con éxito la mancha en red (Reis et al. 1995, 1997; Carmona et al. 1999; Carmona et al. 2008), el uso continuo e indiscriminado de estas sustancias puede afectar al ambiente y al hombre. En este sentido, la concientización ecológica globalizada exige el uso de productos naturales y/u organismos, lo que ha llevado a implementar el manejo integrado de enfermedades (MIE) para la producción de semillas libres de enfermedades y de residuos tóxicos. El MIE implica el uso de técnicas orientadas a reducir las enfermedades a niveles tolerables (Apple, 1977). Dicho manejo trata de regular a los organismos fitopatógenos y no de erradicarlos, teniendo en cuenta la sustentabilidad ecológica. En éste las principales estrategias de control se basan en el uso de cultivares resistentes, la aplicación de fungicidas basados en el umbral de daño económico (UDE), el control de las prácticas culturales y el uso de agentes de control biológico (Reis et al, 2001). Este último método, se ejerce utilizando hongos (Rodríguez y Godeas 2005) bacterias (Alippi et al. 2000) y/o nemátodos (Rodríguez Solano et al. 2004) para controlar las poblaciones de los patógenos de las plantas.

Las especies del género *Trichoderma* actúan como agentes de control biológico y se han estudiado desde hace más de 70 años (Elad et al. 1981; Samuels and Lodge 1996). Son comunes en diversos suelos, principalmente en los ácidos y ricos en materia orgánica. Estas especies son fáciles de aislar, de cultivar y de propagar en diversos substratos y basan sus propiedades antagónicas en diversos mecanismos como, competencia por el espacio y los nutrientes, estimulación del crecimiento de las plantas y/o mecanismos de defensa. Además, algunos aislamientos suelen tener un sistema de enzimas capaz de atacar a un buen número de hongos fitopatógenos.

En el CIDEFI (Centro de Investigaciones de Fitopatología) perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de la Plata, se

comenzaron a realizar estudios preliminares de biocontrol de *Drechslera teres*, utilizando diferentes aislamientos de *Trichoderma* spp. en ensayos “in vitro”, con el objetivo de seleccionar los aislamientos de *Trichoderma* spp. que muestren mejor poder de biocontrol, y utilizarlos en ensayos de invernáculo.

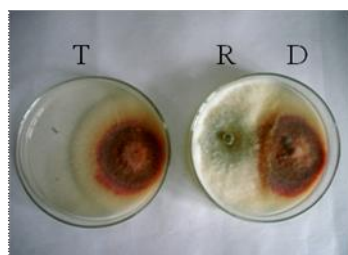
Se realizó el aislamiento de los microorganismos colectando y aislando cepas de *Trichoderma* spp. por medio de la técnica de dilución en placa (Elad et al. 1981) a partir de diferentes muestras de rizósfera provenientes de distintas áreas de la región productora de cebada de la prov. de Bs As.: Barrow, Bolívar, Bordenave y Tres Arroyos. Las cepas de *Drechslera teres* se aislaron mediante el método del agar, según normas impartidas por ISTA (Neegard 1979), a partir de muestras de semillas de cebada infectadas naturalmente. Las procedencias coinciden con las de las muestras de rizósfera. También se obtuvieron aislamientos del síntoma típico de la “mancha en red”, mediante los métodos fitopatológicos de rutina a partir de material enfermo de cultivos de la Estación Experimental Julio Hirschhorn de Los Hornos. Se tomaron 7 cepas de *Trichoderma* spp. y 3 de *D. teres* para realizar los ensayos en laboratorio.

A fin de seleccionar la mejores cepas de *Trichoderma* spp., se evaluó su potencial antagonico con la técnica del cultivo dual (Dal Bello et al. 1994) que consiste en colocar en cajas de Petri, con 9 ml. de medio de cultivo agar papa glucosado (APG), dos discos de 5 mm. de diámetro del patógeno (sembrado 3 días antes del antagonista) y de *Trichoderma* spp., ubicados a 4 cm. de distancia uno del otro. Se tomaron datos de los diámetros de las colonias a los tres y seis días de sembrados ambos microorganismos. La evaluación se realizó con los valores de los 3 días, calculando el porcentaje de inhibición miceliar (MGI), mediante la siguiente fórmula (Michereff et al. 1994):

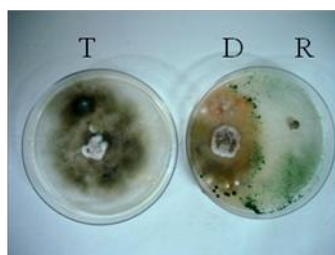
$MGI (\%) = [(MGC - MGT) / MGC] \times 100$  donde MGC es la longitud media del crecimiento miceliar testigo y MGT es la longitud media del crecimiento miceliar tratado. Los valores se transformaron, para ajustarse a una distribución normal, mediante el arcoseno de la raíz cuadrada de las probabilidades de las medias del MGI, y se sometieron a análisis estadístico por medio de ANOVA y Test de Múltiple Rango LSD.

Se realizaron tres ensayos con las tres cepas diferentes de *D. teres*. La cepa *D. teres* Medio (ensayo 1), la cepa *D. teres* Campo (ensayo 2) y la cepa *D. teres* T.A. 5d. c2 (ensayo 3). Las tres cepas contra *Trichoderma* spp. 1, 2, 3, 4, 7, 9 y 10 (T1, T2, T3, T4, T7, T9 y T10). Se incluyeron testigos en todos los tratamientos.

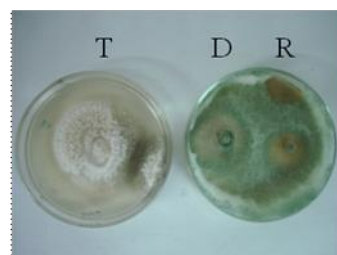
Cultivo dual: T= Testigo; R= *Trichoderma* spp.; D: *Drechslera* spp.



*D. teres* Medio vs. *D. teres* *Trichoderma* spp. 3



*D. teres* Campo vs. *Trichoderma* spp. 7



*D. teres* T.A. 5d c2 vs. *Trichoderma* spp. 3

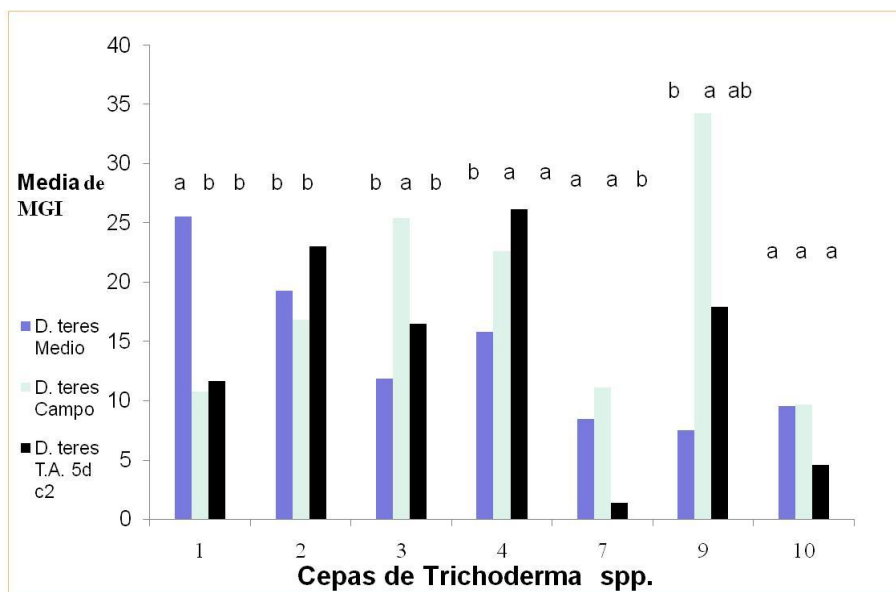
También se hicieron observaciones microscópicas de la zona de interacción *Trichoderma* spp.-*D. teres*.

Los resultados indicaron que para cada ensayo de *D. teres* existieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores transformados del (MGI)

entre las distintas cepas de *Trichoderma* spp. probadas, con un nivel del 95% de confianza.

Para *D. teres* Medio, la cepa de *Trichoderma* spp. que mostró mejor poder de biocontrol fue la 1, con una media de MGI de 25,54. En *D. teres* Campo, fue la cepa de *Trichoderma* spp. 9 con una media de MGI de 34,30 y para *D. teres* T.A. 5d c2, fue la cepa de *Trichoderma* spp. 4, con una media de MGI de 26,19. Sólo la cepa antagonista 10, no presentó diferencias estadísticamente significativas en el biocontrol de las tres cepas de *D. teres*

**Gráfico 1: Medias de MGI para cada *D. teres* vs. *Trichoderma* spp.**



Con letras se indica el agrupamiento asignado por el Test de Múltiple Rango LSD, para cada cepa de *Trichoderma* spp. vs. *D. teres*.

Letras iguales indica que no presentan diferencias estadísticamente significativas para una probabilidad de 0,05.

En todos los ensayos de cultivo dual se observó en la zona de contacto de ambos microorganismos, coloraciones diferentes a las típicas de las colonias de cada uno. En las observaciones microscópicas se vieron diferentes mecanismos antagónicos que involucraban a ambos hongos (Fig. 1)

Figura 1

**Se observaron mecanismos de antagonismo: micelio envolvente (coiling) (A) y vacuolización (B) en la zona de interacción de ambos microorganismos.**



A: Hifa de *D. teres* envuelta por micelio de *Trichoderma* spp. Aumento 100X



B: Hifa de *D. teres* con vacuolización. Aumento 100X

El análisis para las tres cepas del patógeno sugiere, que la acción biocontroladora de *Trichoderma* spp. sobre *Drechslera teres* es cepa-específica, en las combinaciones hasta ahora probadas, a excepción de la cepa *Trichoderma* spp. 10 que mostró igual poder de biocontrol para las tres cepas de patógeno. En una próxima etapa se continuarán los estudios utilizando las mismas cepas de *Trichoderma* spp. empleadas “in vitro” para evaluar si hay disminución de la incidencia de la enfermedad en ensayos de invernáculo.

## Bibliografía

- Alippi, A. M., A.E. Perelló, M.N. Sisterna, N.M. Greco and C.A. Cordo. 2000. Potential of spore- forming bacteria as biocontrol agents of wheat foliar diseases under laboratory and greenhouse conditions.
- Apple, J. 1977. The theory of disease management in plant disease. An advance treatise. Academic Press, New York , 465 pp
- Carmona, M.A., Barreto, D.E. and Reis, E.M. 1999. Detection, transmission and control of *Drechslera teres* in barley seed. *Seed Science & Technology* 27:761-769.
- Carmona M.A, Barreto D, Moschini and E. Reis. 2008. Epidemiology and Control of Seed-borne *Drechslera teres* on Barley. *Cereal Research Communications* 36: 637–645
- Dal Bello, G.M., C.I. Mónaco y M.N. Sisterna. 1994. Efecto de *Trichoderma* spp. sobre el control del tizón de la plántula en trigo ocasionada por *Bipolaris sorokiniana*. *Fitopatología Brasileira* 19(3): 394-400. Brasil.
- Elad, Y.; Chet, I and Henis, I. 1981. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* sp. from soil. *Phytoparasitica* 71: 59-67
- Michereff S.J, N.S.S. Silveira, A. Reis, R.L.R. Mariano. 1994. Epiphytic bacteria antagonistic to *Curvularia* leaf spot of yam. *Microbial Ecol.* 28, 101-110
- Neergaard P. 1979. *Seed Pathology*, vol. I and II. Revised Edition, Mac Millan Press, London, 1191 pp.
- Reis, E.M., Casa Trezzi, R. and Silva, M.S. 1995. Efeito do tratamento de sementes de cevada no controle e no desenvolvimento da mancha em rede, causada por *Drechslera teres*. *Fitopatología Brasileira* 20:561-565. 1995.
- Reis, E.M., Casa, M., Casa Trezzi, R., Carmona, M.A. and Barreto, D.E. 1997. Sensibilidade de *Drechslera teres* ao fungicida triadimenol usado em tratamento de sementes de cevada. *Fitopatología Brasileira* 22:539-543.
- Reis E, D. Barreto y M. Carmona. 1999. *Patología de semillas de cereales de invierno* 94 pp.
- Reis, EM, Casa Trezzi, R, Carmona, MA. 2001. Elementos para el manejo de enfermedades. Cap. 14, p. 275-308. En: “AGROECOLOGIA: El camino para una agricultura sustentable”, editado por Santiago J. Sarandón, para Ediciones Científicas Americanas, La Plata, Argentina, 557 pp.

- Rodríguez, M. A. y A. Godeas. 2005. Producción comercial de agentes de biocontrol de origen fúngico, desarrollo e impacto. En Introducción al reino de los hongos y grupos afines (Alberto R & Vadell E Eds.) Ediciones Científicas Americanas (ECA).
- Rodríguez Solano, R., Almazán García C. y Armendáriz González I. 2004. Estudios preliminares con nemátodos entomatógenos para el control biológico de la mosca del cuerno, *Haematobia irritans* L. (Diptera, Muscidae). Veterinaria México 35 (4): 339-350.
- Samuels, G.J. and Lodge, D.J. 1996. Three species of *Hypocrea* with stipitate stromata and *Trichoderma* anmorphs. Mycologia 88: 302-315