

Capacidad biocontroladora de *Trichoderma* sp. sobre la manifestación de la septoriosis del trigo

Cecilia Mónaco; Marina Stocco; Gladys, Lampugnani; Cecilia Abramoff; Natalia Kripelz;
Cristina Cordo

CIDEFI, CICBA, Curso de Terapéutica vegetal

FCAYF UNLP

La Plata, Buenos Aires

Resumen

En los últimos años, el uso de antagonistas llegó a ser una de las técnicas más promisorias para manejar la septoriosis del trigo. El objetivo del trabajo fue evaluar el poder biocontrolador de dos cepas de *Trichoderma* sp (Th5cc y Th118), sobre la expresión de la mancha de la hoja del trigo inducido con el recubrimiento de las semillas y una aplicación aérea en macollaje. El ensayo se realizó en la Estación Experimental J. Hirschhorn durante julio-diciembre de dos años. La disposición experimental fue en bloques al azar con seis tratamientos y cuatro repeticiones. Se evaluó el efecto de dos cepas de *Trichoderma* sp, cada una aplicada con la técnica de semillas recubiertas y como un rocío de suspensión de esporas en macollaje. Uno de los tratamientos consistió en la aplicación de Azoxystrobina-Ciproconazole (en plántula y en macollaje) como testigo positivo y un testigo negativo, inoculado con *Septoria tritici*. A los 21 días de la inoculación con el patógeno para cada estadio fenológico, se evaluaron parámetros de severidad de la enfermedad (porcentaje de necrosis en hoja) y de cobertura picnidial) y se evaluó el rendimiento del cultivo. Los resultados demostraron que en estado de plántula, tanto el porcentaje de necrosis como el de cobertura picnidial, se redujeron significativamente en las plantas provenientes de semillas recubiertas por ambas cepas, siendo la cepa Th118 la de mejor comportamiento. La protección se mantuvo hasta el estado de macollaje. En cuanto al rendimiento, si bien no hubo diferencias significativas entre tratamientos, las plantas provenientes de semillas recubiertas con las cepas Th5cc y Th118, mostraron un incremento en el rendimiento de 432,28 Kg/m² y 221,80 Kg/m² respectivamente. Estos

resultados resultan promisorios para considerar a *Trichoderma* sp. como un agente biológico para controlar la septoriosis del trigo y, de esta forma, ser introducida como una técnica dentro de un manejo integrado de la enfermedad.

Palabras claves: biocontrol, antagonistas, manejo de enfermedades

1. Introducción

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 presente en muchas áreas productoras de trigo del mundo. El mejoramiento orientado a la resistencia es la medida más económica para controlar la enfermedad. Los cultivares comerciales se comportan moderadamente desde resistentes a susceptibles frente a esta enfermedad, y sugieren la presencia de una resistencia no-específica cuantitativa, gobernada por varios genes. No obstante, otros materiales también demostraron una interacción específica entre el aislamiento y el cultivar a través de un solo gen (Simón et al., 2005). A esta medida se suman también los tratamientos químicos y las prácticas culturales apropiadas, aunque estos métodos aislados no pueden resolver el problema, que requieren la implementación de un manejo integrado. Los compuestos químicos han sido tradicionalmente utilizados para el control de las enfermedades fúngicas de los cultivos, sin embargo, el abuso de su empleo ha favorecido el desarrollo de patógenos resistentes a los fungicidas. Con el objetivo de minimizar el uso de estos productos, el control biológico se considera una opción atractiva. La utilización de microorganismos antagonistas ha tomado gran relevancia en estos últimos años (Cordo et al., 2004; Dal Bello et al., 2009; Perello et al., 2001 a y b). Esta alternativa tiene la ventaja de ser específica y sin riesgos para el medioambiente.

El control biológico incluye el uso de microorganismos benéficos, tales como hongos (Dal Bello et al., 2009; Perelló et al., 2001), bacterias (Perelló et al.: 2001) y nematodos, los cuales atacan y controlan a patógenos de plantas. Además, la combinación de los agentes de control biológico con niveles reducidos de productos químicos (control integrado) promueve la reducción de las enfermedades de manera similar al tratamiento tradicional (Monte, 2001; Jeque et al., 2008). Otros autores (Lorito et al., 1994) demostraron la acción sinérgica entre los compuestos enzimáticos involucrados en el mecanismo de biocontrol y la acción de los fungicidas más ampliamente usados.

La información que existe acerca de las posibilidades de biocontrol de patógenos fúngicos de cereales es un campo poco explorado aún en Argentina (Alippi et al., 2000; Cordo et al., 2007; Perelló et al, 2001 a y b, 2006, 2008, 2009). Su empleo resulta promisorio, ya que se han señalado diferentes especies de bacterias y hongos que

redujeron significativamente las lesiones foliares desarrolladas y que exhibieron una fuerte inhibición del crecimiento de los patógenos in vitro (Alippi et al.: 2000). En general, los diferentes trabajos refieren a reducción de la severidad de las lesiones producidas por patógenos de cereales como *Bipolaris sorokiniana* (Dal Bello et al.: 2009), *Pyrenophora tritici-repentis* (Perelló et al., 2008), *Mycosphaerella graminicola* (Cordo et al., 2007; Perello et al., 2009) aunque no se conocen hasta el momento la repercusión que pudiera ocasionar el efecto biocontrolador sobre el rendimiento de granos. No obstante, la mayoría de estudios sobre efecto en el rendimiento de aplicaciones de biofungicidas se han realizado sobre cultivos intensivos como las hortalizas, tomate, pimiento (Tsor et al.: 2001). Esta es la primera vez que se registran los resultados sobre el efecto de dos cepas de *Trichoderma sp.* como biocontroladoras de una mancha foliar y su incidencia en el aumento del rendimiento y las modificaciones de sus parámetros.

Las especies fúngicas del género *Trichoderma* han sido investigadas como agentes de control biológico por mas de 70 años, pero sólo recientemente han comenzado a utilizarse a escala comercial. Debido a su alta capacidad reproductiva, a la tolerancia para sobrevivir bajo condiciones desfavorables, a su eficiencia en la utilización de los nutrientes, a la capacidad de modificar la rizósfera, a la resistencia que presenta frente a distintos compuestos tóxicos entre otros, el uso de *Trichoderma* como agente de control biológico presenta grandes ventajas. (Harman et al.: 2004; Benitez et al.: 2004).

Los objetivos del presente trabajo son evaluar el poder biocontrolador de dos cepas de *Trichoderma sp* (Th5cc y Th118), sobre la expresión de la mancha de la hoja del trigo y establecer su efecto sobre el rendimiento del cultivo.

2. Metodología

2.1 Material vegetal: Se utilizaron semillas de *Triticum aestivum* L cultivar BIOINTA 2004 (Moderadamente susceptible a septoriosis) y provenientes de INTA Marcos Juárez, provincia de Córdoba, Argentina.

2.2 Producción del inóculo de *Septoria tritici*: Los aislamientos de *S. tritici* provinieron de las localidades 9 de Julio (FALP9J008) y Pla (FALPLA008) de la Provincia de Buenos Aires, Para la esporulación, estos se cultivaron en tubos en estría

con el medio agar de malta. Los conidios se obtuvieron inundando la superficie del cultivo con 5 ml. de agua destilada estéril y quitándolos con una barra doblada de vidrio. La suspensión resultante se filtró con una tela de malla tramada y el filtrado se ajustó a 1×10^6 esporas.ml. Inmediatamente antes de la inoculación de las plantas, se mezcló con 50 ul.L^{-1} de 0.05% (v/v) Tween 20 en solución acuosa.

2.3 Producción del inoculo de *Trichoderma spp*: dos aislamientos de *Trichoderma* sp (Th5cc y Th118) se cultivaron en medio de agar de papa dextrosa (PDA 2%) con 12 hs. de luz de fotoperíodo (3500 luz más cerca de la luz UV, 365 nm) a 20 ± 2 °C por 7-15 días. Los conidios de cada aislamiento se obtuvieron inundando la superficie del cultivo con agua destilada estéril para separarlos con una barra estéril de vidrio. Después de filtrar a través de 2 telas de malla tramadas, la concentración de propágulos se ajustó a 1×10^8 conidios.ml, y se adicionó 50 ul.L^{-1} de 0.05% (v/v) Tween 20 en solución acuosa. Las semillas de trigo recubiertas con *Trichoderma* sp. se prepararon como describió Perello et al. (2006). Dos días antes de sembrar, las semillas se colocaron en solución de hipoclorito de sodio al 5% (v/v) por 5 min. Diez mililitros de la suspensión de cada aislamiento de *Trichoderma* sp. se suspendió en 90 ml de agar agua al 2,5% y se mezcló con 85 gramos de semillas de trigo desinfectadas por 20 min. Finalmente, esta solución se agitó en agitador magnético (120rpm) durante 20 minutos. Después de drenar el líquido en exceso, las semillas recubiertas fueron secadas bajo la corriente de aire estéril por 3 hs y luego conservadas a 5°C hasta la siembra. Las semillas del testigo fueron tratadas con suspensión de agar agua y agua destilada sin *Trichoderma* sp.

2.4 Ensayos en campo para el biocontrol de la mancha de la hoja: El ensayo se llevó a cabo en la Estación Experimental Julio Hirschhorn, ubicada en Los Hornos, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de La Plata. Se evaluó el efecto biocontrolador de dos cepas de *Trichoderma* sp. comparado con una aplicación de fungicida (Amistar X: Azoxystrobin –Ciproconazole) a una dosis de $600 \text{ cm}^3/\text{ha}^{-1}$, sobre la severidad de la mancha de la hoja del trigo y su efecto sobre el rendimiento. Se implementaron diferentes técnicas de aplicación, en dos estadios fenológicos (plántula y macollaje). Plantas de la variedad mencionada fueron sembradas en el mes de julio de 2013, con un diseño de bloques al azar con 4 repeticiones y se sometieron a diferentes tratamientos: plantas testigo inoculadas con el patógeno; plantas provenientes de semillas recubiertas con las cepas de *Trichoderma* sp e inoculadas con *Septoria tritici*,

plantas provenientes de semillas recubiertas y pulverizadas en hoja con suspensión de *Trichoderma* sp., 24 horas antes de la inoculación con *S. tritici*. Se agregaron tratamientos como testigo, que contemplaron las aplicaciones de fungicida en plántula y macollaje, e inoculados con *S. tritici*, para demostrar comparativamente la ventaja de los tratamientos con el agente de control biológico tanto en los parámetros de severidad como en los del rendimiento.

El tamaño de las parcelas fue de 1,40m de ancho (comprendiendo 7 hileras) X 3m de largo. El tamaño de cada bloque fue de 48m de X 3m de largo (los 28 tratamientos estuvieron separados por 0,20m), dando una superficie total de 144m² por repetición. Las parcelas principales se separaron con avena para disminuir la transferencia del inóculo. El inóculo se preparó a partir de una mezcla de los dos aislamientos de *Septoria tritici* mencionados. A un volumen total de 45 L de inóculo, se le agregaron 3-4 gotas de Tween 20 por litro.

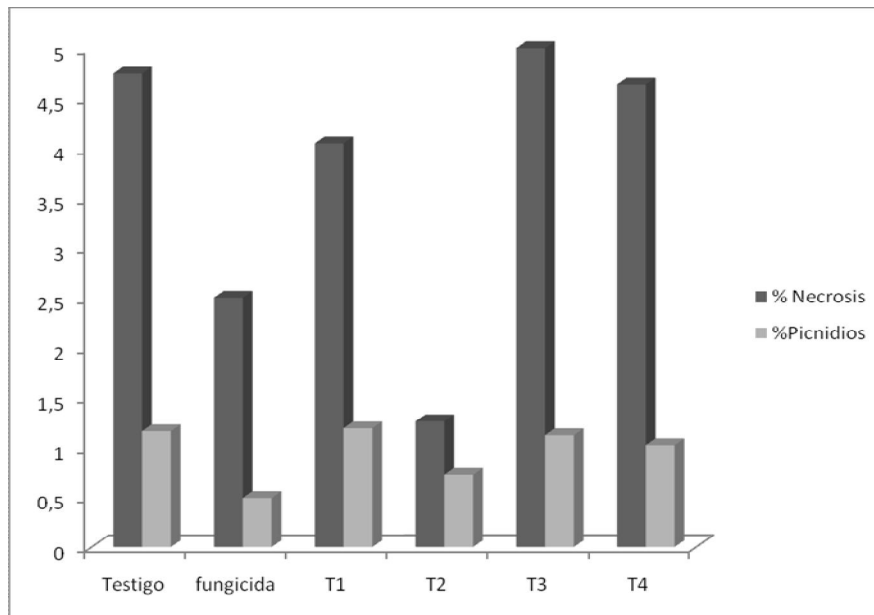
Se cuantificó el control sobre la “mancha de la hoja del trigo” a través de la disminución de la severidad (porcentaje de hoja necrosada y de cobertura por picnidios) y los parámetros de rendimiento medidos en número de espigas m⁻², número de granos por espiga, peso de 1000granos y kg de grano por hectárea. En este trabajo, se realizaron dos evaluaciones durante el desarrollo del cultivo: inicio de encañazón (GS31) y espigazón (GS62), en doce plantas principales tomadas de 3 hileras centrales de las 7 sembradas. De las dos primeras evaluaciones se obtuvo la severidad del total de las hojas verdes y en la tercera evaluación se determinó la severidad de la hoja bandera (HB) y la debajo de ella (HB-1). A la cosecha se determinó en cada tratamiento, los componentes del rendimiento (número de espigas m⁻², granos por espiga⁻¹, y peso de mil granos), y así calcular el rendimiento por m⁻².

3. Análisis e interpretación de los resultados

Los resultados demostraron que en estado de plántula, tanto el porcentaje de necrosis como el de cobertura picnidial se redujeron significativamente en las plantas provenientes de semillas recubiertas por ambas cepas, siendo la cepa Th118 la de mejor comportamiento (Figura 1). La protección se mantuvo hasta el estado de macollaje. En cuanto al rendimiento, si bien no hubo diferencias significativas entre tratamientos, las

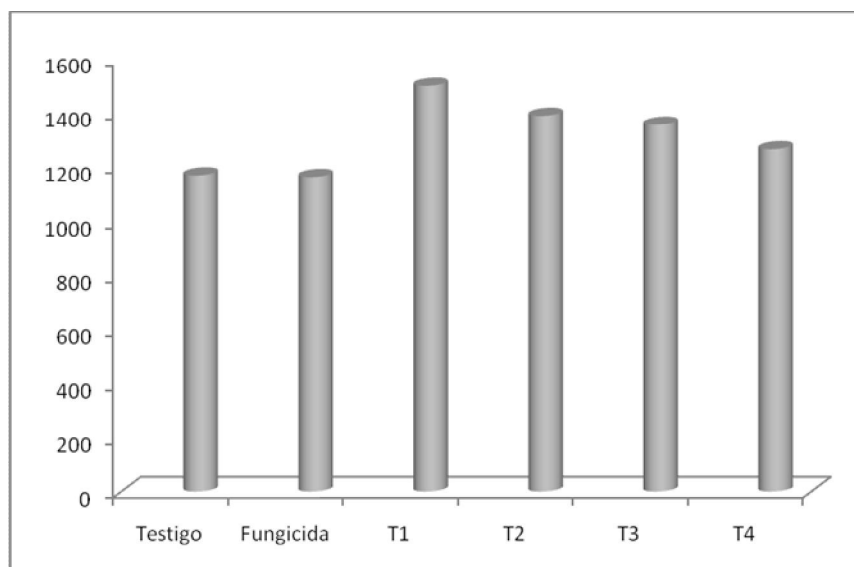
plantas provenientes de semillas recubiertas con las cepas Th5cc y Th118, mostraron un incremento en el rendimiento de 432,28 Kg/m² y 221,80 Kg/m² respectivamente (Figura 2).

Figura 1



Porcentaje de Necrosis y Cobertura picnidial en Hoja 2. Referencias: Testigo: plantas inoculadas con *Septoria tritici*. T1: semilla recubierta con *Th5cc* e inoculadas; T2: semilla recubierta con *Th118* e inoculadas; T3: semilla recubierta con *Th5cc* + asperjado; T4: Semilla recubierta con *Th118* y luego en macollaje asperjadas con una suspensión de conidios de *Trichoderma*.

Figura 2



Rendimiento en kg/ha. Referencias: Testigo: plantas inoculadas con *Septoria tritici*. T1: semilla recubierta con *Th5cc* e inoculadas; T2: semilla recubierta con *Th118* e inoculadas; T3: semilla recubierta con *Th5cc* + asperjado; T4: Semilla recubierta con *Th118* y luego en macollaje asperjadas con una suspensión de conidios de *Trichoderma*.

4. Transferencia y/o impacto

Las cepas de *Trichoderma* sp. (*Th5cc* y *Th118*) se están evaluando desde el año 2010 en diferentes ensayos a campo, con resultado muy promisorios. Este Trabajo se realizó para evaluar la efectividad del uso del antagonista aplicado en la semilla como recubrimiento de la misma y observar si el control de la enfermedad se mantiene hasta cosecha, sin necesidad de realizar una nueva aplicación aérea en macollaje. Los valores de rendimiento del cultivo confirman esto, de manera que podemos recomendar el uso del antagonista solo aplicado a la semilla, si se tiene en cuenta que se llega a un incremento de hasta 400kg/ha en el rendimiento.

5. Conclusiones

Estos resultados resultan promisorios para considerar a *Trichoderma* sp. como un agente biológico para controlar la septoriosis del trigo, ya que con solo el recubrimiento de las semillas, se logra una protección de las plantas hasta macollaje e incrementos en el rendimiento.

Bibliografía

Alippi A., Perelló A.; Sisterna M.; Greco N.; Cordo C. (2000). "Biological control of wheat foliar diseases with spore-forming bacteria". *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 107, pp.155-169.

Benitez, t.; Rincon, A.; Limón, C. And Codón, A. (2004). "Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains". *International Microbiology* 7, pp.249-260.

Cordo C.; Mónaco C.; Simón M.R.; Perelló A.; Kripelz N.; Bayo D.; Segarra C. (2004). "Biocontrol de la mancha de la hoja del trigo con aislamientos de *Trichoderma* spp.". *VI Congreso Nacional de trigo, Actas del Congreso*. Ediciones INTA.

Cordo, C.; Mónaco C.; Segarra C.; Simón M.R.; Mansilla Y.A.; Perelló .A.; Kripelz N.; Bayo D.; Conde D. (2007). "*Trichoderma* spp. as elicitors of wheat plant defense responses against *Septoria tritici*". *Biocontrol Science and Technology* 17, pp. 687-698.

Dal Bello, G.; Mónaco C. y Sisterna; M. and Nico, A. (2009). "Relationship between an invitro and greenhouse assay for biological control of *Bipolaris sorokiniana*-induced seedling blight of wheat". *Biological Agriculture & Horticulture* 26:pp. 103-119.

Harman, G.; Howell, Ch.; Viterbo, A.; Chet, I and Lorito, M. (2004). "*Trichoderma* species- opportunistic, avirulent plant symbionts". *Nature reviews* 2,pp. 43-56.

Lorito M.; Hayes C.; Di Pietro A.; Woo S.; Harman G. (1994). "Pufication, characterization, and synergistic activity of a Glucan 1, 3- β -Glucosidase and an N-Acetyl- β -Glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*". *Phytopathology*, 84, pp. 398-405.

Monte E. (2001). "Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology". *International Microbiology* 4, pp. 1-4.

Perelló A; Simón M.R.; Cordo C.; Sisterna M., Arambarri A.M. (2001). "Microflora of wheat (*Triticum aestivum* L.) In Buenos Aires Province (Argentina) and its possible significance in the biological control of foliar pathogens". *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Planzenschutz* ,108, pp.123-132, Alemania.

Perelló A.; Simón M.R.; Cordo C.; Arambarri A.M.(2001). “Greenhouse screening of the saprophytic resident micoflora for control leaf spots of wheat (*Triticum aestivum* L.)” *.Phytoparasitica* 29, pp. 341-351.

Perelló A.; Mónaco C.; Moreno M.V.; Cordo C.; Simón M.R. (2006). “The effect of *Trichoderma harzianum* and *T. Koningii* on the control of tan spots (*Pyrenophora tritici-repentis*) and leaf blotch (*Mycosphaerella graminicola*) of wheat under field conditions in Argentina”. *Biocontrol Science and Technology*, 16, pp. 803-813.

Perelló, A.; Moreno, V.; Mónaco, C. and Simón MR. (2008). “Effect of *Trichoderma* spp. isolates for biological control of tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis* under field conditions in Argentina”. *BioControl* 53, pp. 895-904.

Perelló A.; Moreno V.; Mónaco C.; Simón M.R.; Cordo C. (2009). “Biological control of *Septoria tritici* blotch of wheat by *Trichoderma* spp under field conditions in Argentina”. *BioControl* 54, pp. 113-122.

Simón M.R.; Perelló A.E.; Cordo C.A.; Larrán .S; Van der Putten .P, Struik P.C.(2005) “Association between *Septoria tritici* blotch, plant height and heading date, in wheat”. *Agronomy Journal* 97,pp.1072-1081.

Tsrer L.; Barak R.; Sneh B.(2001). “Biologica control of black curf on potato under organic management”. *Crop Protection* 20,pp.145-150.

