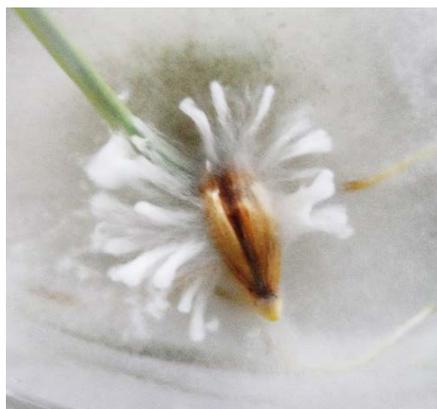


Facultad de Ciencias Naturales y Museo  
Universidad Nacional de La Plata.



Antagonismo y efecto biocontrolador de  
*Trichoderma* spp. sobre *Drechslera teres*, agente  
causal de la "mancha en red" de la cebada  
(*Hordeum vulgare* L. var. *vulgare*).

*Tesis Doctoral*



Paulina Moya

*Licenciada en Biología con Orientación Ecología*

2016

Directoras: Ing. Agr. Marina N. Sisterna

Dra. Andrea V. Toledo

Lugar de trabajo:

**Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI)**

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales – UNLP.

Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

## Agradecimientos

*En primer lugar quiero dedicar este trabajo de tesis a la memoria de la Dra. Angélica Arambarri (Vasca) por su acompañamiento en mis inicios de este camino de la investigación.*

*Les quiero agradecer :*

*A mis directoras, la Ing. Agr. Marina Sisterna por guiarme y brindarme todo su apoyo para llevar adelante este trabajo de tesis, y a la Dra. Andrea Toledo por su acompañamiento y correcciones del manuscrito.*

*A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICBA) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el financiamiento de mis estudios de postgrado.*

*A la Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo por permitirme realizar el doctorado.*

*A cada uno de los que me ayudaron a completar cada capítulo de este trabajo, a la Dra. Viviana Barrera, al Dr. Pedro Balatti y el Lic. Ernesto Franco por sus aportes con la biología molecular y la filogenia.*

*Al Dr. Juan Girotti por su colaboración con la cromatografía gaseosa, espectrometría de masas y su siempre buena voluntad a responder mis preguntas.*

*A la Dra. Mariela Bruno por su ayuda con el espectrofluorómetro y su buena predisposición.*

*Al Dr. Jürgen Graf por su colaboración con los análisis de HPLC y NMR.*

*A mi amiga la Prof. Cecilia Alonso por sus revisiones del Inglés.*

*A todos los que colaboraron con mis ensayos e hicieron que sean más llevaderos:  
Lucila, Darío, Carolina y Josefina.*

*A Cristian, por acompañarme en todos los momentos, comprenderme y ayudarme  
haciendo que todo parezca más fácil.*

*Al CIDEFI y a cada uno de sus integrantes por su compañía, consejos y charlas  
compartidas.*

*A mi hermana Luciana por su colaboración con algunas tareas prácticas de esta  
investigación y por creer en mí.*

*A Mari, Ceci, Romi y Ale por su compañía, charlas y “empuje” dentro y fuera del  
laboratorio.*

*A mis amigos de la facultad Canari, Cacho, Diego, Ale, Ana, Martín, María, Lara y  
Caro porque formaron parte de muchos momentos durante el desarrollo de este trabajo  
aunque no lo supieran.*

*A mis padres, Alicia y Mario, por estar siempre, creer en mí, darme aliento y  
apoyarme en este camino elegido.*

# ÍNDICE

Anexo Abreviaturas y Siglas.....	i
Anexo Composición de medios de cultivo y buffers.....	ii
Resumen.....	1
Abstract.....	5
Capítulo I	
Introducción General	
1.1. Origen del Cultivo de cebada .....	9
1.2 Producción de cebada en el mundo.....	9
1.3 La cebada en la Argentina.....	10
1.4 Principales patologías de la cebada.....	12
1.5 Mancha en red de la cebada.....	13
1.5.1 Importancia económica.....	13
1.5.2. Sintomatología.....	13
1.5.3 El patógeno <i>Drechslera teres</i> .....	14
1.5.3.1. Ubicación taxonómica.....	14
1.5.3.2. Características morfológicas.....	14
1.5.3.3 Ciclo biológico.....	16
1.5.4 Fuentes de inóculo: la semilla.....	17
1.5.5 Manejo de la enfermedad.....	18
1.5.5.1. Uso de cultivares resistentes.....	19
1.5.5.2. Control químico.....	19
1.5.5.3 Prácticas culturales.....	20

1.5.5.4. Control biológico .....	20
1.5.6 <i>Trichoderma</i> spp. como agente de control biológico.....	22
Hipótesis.....	23
Objetivos.....	24
Capítulo II	
Aislamiento de microorganismos, caracterización morfológica y molecular de <i>Drechslera teres</i> y <i>Trichoderma</i> spp.	
2.1. Introducción.....	25
2.1.1. Taxonomía de <i>Drechslera teres</i> .....	25
2.1.2. Taxonomía de <i>Trichoderma</i> spp.....	27
Objetivos.....	29
2.2. Materiales y métodos.....	29
2.2.1 Aislamiento de los microorganismos.....	29
2.2.1.1. <i>Trichoderma</i> spp.....	29
2.2.1.2. <i>Drechslera teres</i> .....	30
2.2.2. Caracterización morfocultural.....	32
2.2.2.1. <i>Trichoderma</i> spp.....	32
2.2.2.2. <i>Drechslera teres</i> .....	33
2.2.3. Identificación y caracterización molecular.....	33
2.2.3.1. <i>Trichoderma</i> spp.....	33
2.2.3.2. <i>Drechslera teres</i> .....	34
2.3. Resultados.....	35
2.3.1. Aislamiento de los microorganismos.....	35
2.3.2. Caracterización morfocultural.....	37

2.3.2.1. <i>Trichoderma</i> spp.....	37
2.3.2.2. <i>Drechslera teres</i> .....	43
2.3.3. Identificación molecular.....	44
2.3.3.1. <i>Trichoderma</i> spp.....	44
2.3.3.2. <i>Drechslera teres</i> .....	46
2.4. Discusión.....	47
 Capítulo III	
Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad y los mecanismos antagónicos de <i>Trichoderma</i> spp., frente a <i>Drechslera teres</i> .	
3.1. Introducción.....	51
Objetivos.....	54
3.2. Materiales y métodos.....	54
3.2.1 Cultivos duales.....	55
3.2.2. Microscopía confocal.....	55
3.2.3. Caracterización del pigmento originado por <i>D. teres</i> durante la interacción <i>in vitro</i> con <i>Trichoderma</i> spp.....	56
3.2.4. Metabolitos volátiles.....	57
3.2.4.1. Técnica de cultivos enfrentados.....	57
3.2.4.2. Extracción de VOCs.....	58
3.3. Resultados.....	60
3.3.1. Cultivos duales.....	60
3.3.2. Microscopía confocal.....	65
3.3.3. Caracterización del pigmento.....	67
3.3.4. Metabolitos volátiles.....	72
3.3.4.1. Técnica de los cultivos enfrentados.....	72

3.3.4.2. Extracción de los VOCs.....	74
3.4. Discusión.....	77
 Capítulo IV	
Evaluación <i>in vivo</i> de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. como biocontroladores de <i>D. teres</i> y promotores de crecimiento en cebada.	
4.1. Introducción.....	82
4.1.1. Efecto de <i>Trichoderma</i> spp. sobre tejidos vegetales vivos.....	82
4.1.2. Respuestas de defensa inducidas por <i>Trichoderma</i> spp.en las plantas.....	83
4.1.3. El uso de <i>Trichoderma</i> spp. en el biocontrol.....	85
4.1.4. <i>Trichoderma</i> spp.como agente de biocontrol en tratamientos de semilla.....	86
Objetivo.....	87
4.2. Materiales y métodos.....	87
4.2.1. Ensayos de invernáculo en sustrato estéril.....	88
4.2.1.1. Preparación de los inóculos.....	88
4.2.1.2 Metodología de inoculación.....	89
4.2.2. Ensayos de invernáculo en tierra.....	93
4.3. Resultados.....	94
4.3.1. Ensayos de invernáculo en sustrato estéril.....	94
4.3.2. Ensayos de invernáculo en tierra.....	98
4.4. Discusión.....	101
Conclusiones finales y perspectivas.....	107
Bibliografía.....	112

## **Anexo Abreviaturas y Siglas**

**AJ:** Ácido Jasmónico

**ANOVA:** Análisis de la Varianza

**APG:** Medio de cultivo Agar Papa Glucosado

**AS:** Ácido Salicílico

**CG:** Cromatografía Gaseosa

**ET:** Etileno

**HPLC:** Cromatografía Líquida de Alta Resolución

**ITS:** Espaciador Transcripto Interno

**MGI:** Porcentaje de Inhibición Miceliar.

**MS:** Espectrometría de Masas

**NMR:** Resonancia Magnética Nuclear

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**PR:** Proteínas relacionadas a la patogenicidad

**RSA:** Resistencia Sistémica Adquirida

**RSI:** Resistencia Sistémica Inducida

**SNA:** medio de cultivo sintético (Spezieller Nährstoffarmer Agar)

**SPAD:** colorímetro que permite estimar el contenido de clorofilas en hojas

**Tef1:** Factor de la elongación de la Transcripción 1

**TLC:** Cromatografía en Capa Fina

**TSM:** Medio Selectivo para Trichoderma

**VOCs:** Compuestos Orgánicos Volátiles

## **Unidades**

**µg:** Microgramos.

**µm:** Micrómetros.

**g:** Gramos.

**h:** Horas

**mg:** Miligramos.

**ml:** Mililitros.

**ul:** Microlitros.

## **Anexo Composición de medios de cultivo y buffers**

**SNA** : “Synthetischer nährstoffarmer” Medio sintético pobre en nutrientes

**Composición:** 1 gr de fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ); 1 gr de nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ); 0.5 gr de sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ); 0.5 gr de cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ ); 0.2 gr de glucosa; 0.2 gr de sacarosa; 20 gr de agar y 1000 ml de agua destilada.

**APG** : Agar papa glucosa

**Composición:** 18 gr de agar, 20 gr de glucosa, 200 gr de papa y 1000 ml de agua destilada.

**TSM:** “Trichoderma selective medium” Medio selectivo para *Trichoderma*.

**Composición:** 0.2 gr de sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ); 0.9 gr de fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ); 0.15 gr de cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ ); 1 gr de nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ); 3 gr de glucosa; 0.25 gr de cloranfenicol ; 0.2 gr de pentacloronitrobenzeno (PCNB); 0.15 gr. de rosa de bengala; 20 gr de agar y 1000ml de agua destilada.

**Buffer CTAB**

**Composición:** 50 mM Tris-HCl (ph 8); 0.7 M NaCl; 10mM EDTA; 1% CTAB (hexadeciltrimetilamonio); 1% PVP 40 y 0.1 %  $\beta$ -mercaptoetanol.

## RESUMEN

La Argentina es el mayor productor de cebada destinada a la industria maltera de Sudamérica, llegando en el año 2015 a 3,4 millones de toneladas. Entre las enfermedades más importantes que afectan el cultivo de cebada se encuentra la “mancha en red”, causada por el patógeno fúngico *Drechslera teres*. Esta enfermedad produce pérdidas en promedio del 20%, afectando el peso y número de granos y la calidad de malta para la elaboración de cerveza.

El patógeno *D. teres* sobrevive de una temporada a la siguiente en los restos culturales de la campaña anterior y en semillas infectadas, siendo estos sus principales fuentes de inóculo. Es por ello que es necesario priorizar su manejo para evitar su propagación y dispersión.

En el marco del manejo integrado de enfermedades, el biocontrol, mediado por microorganismos con propiedades antagonistas, es una medida tendiente a disminuir la carga inicial de inóculo permitiendo niveles tolerables de enfermedad. Este manejo conlleva a una disminución en las aplicaciones y dosis de fungicidas químicos, lo que reduce la contaminación y la generación de resistencia de los agentes fitopatógenos.

El objetivo de la presente tesis fue realizar estudios de biocontrol sobre el patógeno *D. teres* con aislamientos nativos de *Trichoderma* spp. en el marco de la búsqueda de estrategias sustentables para el control de la “mancha en red” en la Argentina. Para esto se plantearon los siguientes objetivos específicos: 1)- Aislar cepas de *Trichoderma* spp. y de *D. teres* provenientes de distintas áreas productora de cebada de la Argentina . 2)- Caracterizar morfológica y molecularmente los aislamientos 3)- Analizar la interacción de ambos microorganismos *in vitro* e identificar los mecanismos biológicos y bioquímicos que intervienen en dicha interacción. 4)- Evaluar el efecto de *Trichoderma* spp. en ensayos *in vivo* y determinar su eficiencia como biocontrolador de *D. teres*.

El patógeno *D. teres* se aisló de hojas de cebada con el síntoma típico de “mancha en red” provenientes de cultivos de la Estación Experimental Julio Hirschhorn (Los Hornos, Buenos Aires) y de semillas infectadas naturalmente de diferentes regiones productoras de cebada de la provincia de Buenos Aires: Barrow, Bolívar, Bordenave y Tres Arroyos. *Trichoderma* spp. se aisló a partir de muestras de rizósfera del mismo origen que las

semillas de cebada. Se seleccionaron 3 cepas de *D. teres* (*D. teres* A; *D. teres* C y *D. teres* M) y 8 de *Trichoderma* spp. (T0, T2, T3, T4, T7, T8, T9 y T10) que se caracterizaron morfofoculturalmente y filogenéticamente. El análisis molecular se realizó con el marcador ITS para *D. teres* y Tef1 para *Trichoderma* spp. Los análisis confirmaron la identidad del patógeno, mientras que para el agente antagonista, permitieron diferenciar los aislamientos obtenidos en dos grupos taxonómicos: siete de ellos (T2, T3, T4, T7, T8, T9 y T10) se agruparon dentro del complejo de especies *T. harzianum* y uno (T0) dentro del clado *T. longibrachiatum*.

Se evaluó la capacidad antagónica *in vitro* de los 8 aislamientos de *Trichoderma* frente al patógeno *D. teres*. Para esto se realizaron cultivos duales en los que se registró el porcentaje de inhibición micelial del patógeno y se realizaron observaciones de la zona de interacción mediante microscopía óptica y microscopía de fluorescencia confocal. Durante la confrontación en los cultivos duales, se observó que *D. teres* produce una pigmentación rojo-anaranjada en la zona de interacción con *Trichoderma* spp. Se procedió a la extracción y caracterización de los pigmentos mediante medidas de absorbancia en el espectro UV-visible, espectrofluorometría y cromatografía en capa fina (TLC). Además, los pigmentos fueron purificados por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) y se analizaron mediante Resonancia Magnética Nuclear (NMR) para determinar sus identidades.

Las observaciones en los cultivos duales mostraron que todos los aislamientos de *Trichoderma* spp. inhibieron el crecimiento micelial de *D. teres* en un rango del 18% al 54%. El aislamiento T3 fue el que mejor inhibición produjo con un MGI del 39% al 54%. La pigmentación observada en la zona de contacto de ambos microorganismos se presentó solo durante la confrontación y mostró propiedades fungistáticas. Los mecanismos antagónicos observados microscópicamente en la zona de interacción fueron: micoparasitismo con enrollamiento (*coiling*), micelio vacuolizado, paredes delgadas sin pigmentación característica (hifas albinas) y micelio deformado. Bajo microscopía confocal se observó autofluorescencia en vesículas citoplasmáticas de *D. teres* durante la confrontación con *Trichoderma* spp., sin embargo esta fluorescencia no se evidenció en los cultivos mono-específicos.

A partir de la extracción del pigmento rojo-anaranjado formado durante la interacción *D. teres*- *Trichoderma* spp. y del análisis de su espectro UV- visible, se obtuvieron 4 picos de

absorbancia de 489, 279, 254 y 230 nm. El espectro de absorción del pigmento observado coincidió según la bibliografía con un tipo de catenarina. Con la técnica de TLC se obtuvieron tres bandas de pigmento, sugiriendo que al menos tres son los pigmentos observados en *D. teres* durante la confrontación. La coincidencia de los espectros de emisión a 488 nm obtenidos por microscopía confocal y espectrofluorimetría indicaron que los pigmentos rojo-anaranjados de la zona de interacción serían los que están presentes en las vesículas citoplasmáticas de *D. teres*. La comparación de los cromatogramas obtenidos por HPLC de los pigmentos de la zona de interacción y de un estándar de catenarina comercial (1,4,6,8-tetrahidroxi-3-metilantraquinona) resultaron ser muy similares, mostrando además un alto grado de correspondencia en sus espectros NMR. Todo esto sugiere que al menos uno de los compuestos generados por *D. teres* durante la interacción sería 1,4,6,8-tetrahidroxi-3-metilantraquinona.

Se evaluó la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *D. teres* mediada por compuestos orgánicos volátiles (VOCs) con la técnica de cultivos enfrentados a través de la estimación del MGI del patógeno. Los VOCs liberados por los microorganismos solos y en confrontación se extrajeron mediante la técnica “espacio de cabeza” (HS) y los análisis se realizaron por Cromatografía Gaseosa (CG) y Espectrometría de Masas (MS).

La evaluación del MGI mediante la liberación de VOCs por *Trichoderma* spp. evidenció que todos los aislamientos inhibieron entre 19% y 38% el crecimiento de *D. teres*, siendo T3 el que presentó mayor porcentaje de MGI, coincidiendo con los resultados para cultivos duales. Se observó albinización en las colonias de *D. teres* expuestas a los VOCs y sus observaciones microscópicas evidenciaron vacuolización, micelio debilitado y paredes muy finas con respecto a lo observado en los testigos. En el análisis de los perfiles CG-MS de VOCs liberados por los cultivos monoespecíficos de *Trichoderma* spp. se observó una composición similar entre ellos y al encontrado durante la confrontación con *D. teres* aunque con algunas modificaciones. De ellos, el mayor porcentaje de los compuestos lo representaron los sesquiterpenos, diterpenos y terpenoides. El aislamiento T0 fue el que produjo mayor abundancia relativa solo y en la confrontación con *D. teres*. También se observó que la presencia del patógeno estimuló la producción de VOCs en los antagonistas. Se evaluaron los aislamientos de *Trichoderma* spp. probados *in vitro*, en ensayos de invernáculo mediante sus efectos sobre el biocontrol de *D. teres* y como promotor del

crecimiento. Se realizaron ensayos en sustrato estéril (vermiculita) con el fin de seleccionar los mejores aislamientos para ser probados en tierra. Se emplearon semillas de cebada con 30% de infección natural de *D. teres*, la cual fue considerada escasa por lo que a su vez fueron inoculadas artificialmente con el aislamiento *D. teres*. *Trichoderma* spp se inoculó 24 h. antes de la siembra. Cada tratamiento consistió en semillas de cebada infectadas artificialmente con el patógeno más el aislamiento de *Trichoderma* spp. a testear. Las variables evaluadas fueron: incidencia (%), severidad en hojas y tallos (%), clorofila (SPAD), peso seco aéreo y radicular (mg). Los ensayos en tierra se realizaron con los aislamientos T0, T2, T3 y T9 que mostraron mayores habilidades antagonistas en cultivo *in vitro* e *in vivo*. Todos los aislamientos probados disminuyeron significativamente el porcentaje de incidencia hasta un 53%. La severidad del tallo disminuyó hasta un 77%, siendo los aislamientos más destacados T2, T3 y T9. La severidad en hoja fue disminuida hasta un 70% siendo T0, y T3 los que mostraron menores valores. En cuanto a la variable clorofila, todos los aislamientos presentaron una tendencia hacia valores más altos que el testigo destacándose T0. Para las variables peso seco aéreo y radicular T0 y T3 fueron los que presentaron mayores valores. Con estos datos, se encontró una clara tendencia en la capacidad diferencial de biocontrol entre los aislamientos de *Trichoderma* spp. que se correspondió con los ensayos *in vitro*.

Esta investigación permitió contribuir al conocimiento de los mecanismos biológicos que intervienen en la interacción *D. teres-Trichoderma* spp. aún no abordada en la Argentina, para ser aplicados en potenciales prácticas de biocontrol de enfermedades.

Se registró por primera vez la producción del pigmento catenarina generado por *D. teres* durante la interacción con *Trichoderma* spp.

Se determinó que algunos de los aislamientos de *Trichoderma* spp. probados *in vitro*, ejercieron control *in vivo* mediante la disminución de la transmisión del patógeno de semilla a plántula y de la severidad de la enfermedad. Además, se evidenció que *Trichoderma* mostró una tendencia hacia la promoción del crecimiento y vigorización de las plántulas de cebada, lo que posiblemente confiere ventajas a las plantas y minimiza el impacto negativo causado por factores bióticos y abióticos.

## ABSTRACT

Argentina is the largest producer of barley destined to the malting industry of South America, reaching in 2015 to 3,4 million of tons. Among the most important diseases that affect the barley crops is the “spot net blotch” caused by the fungal pathogen *Drechslera teres*. This disease produces losses on an average of 20 %, affecting the weight and number of grains and malt quality for brewing.

The pathogen *D. teres* survives from one season to the next in the cultural remains of the previous campaign and in infected seeds, being its main sources of inoculum. That is why it is necessary to prioritize its management in order to avoid its spread and dispersion.

In the context of the integrated diseases management, the biocontrol mediated by microorganisms with antagonistic properties is a measure tending to reduce the initial inoculum load, allowing tolerable levels of disease. This management carries to a decrease in the applications and doses of chemical fungicides, which reduces the pollution and the growth of resistance of the phytopathogen agents.

The aim of the present thesis was to carry on biocontrol studies on the *D. teres* pathogen with native isolates of *Trichoderma* spp. in the framework of the search of sustainable strategies for the control of the "spot net blotch" in Argentina. For this, the following specific aims were proposed: 1) - To isolate strains of *Trichoderma* spp. and of *D. teres* from different barley producing areas of the Argentina. 2) – Characterize these isolates, both morphologically and molecularly 3) - Analyze the interaction of both microorganisms *in vitro* and identify the biological and biochemical mechanisms involved in such interaction. 4) - To evaluate the effect of *Trichoderma* spp. in *in vivo* tests and to determine its efficiency as biocontrol agent of *D. teres*.

The pathogen *D. teres* was isolated from barley leaves with the typical symptom of "spot net blotch” from crops of the Experimental Station Julio Hirschhorn (Los Hornos, Buenos Aires) and of naturally infected seeds from different barley producing regions of Buenos Aires state: Barrow, Bolivar, Bordenave and Tres Arroyos. *Trichoderma* spp. were isolated from rhizosphere samples of the same origin that the seeds of barley. Three strains of *D. teres* (*D. teres* A; *D. teres* C and *D. teres* M) and 8 of *Trichoderma* spp. (T0, T2, T3, T4,

T7, T8, T9 and T10) were selected and characterized morphoculturally and phylogenetically. Molecular analysis was performed with the ITS marker for *D. teres* and Tef1 for *Trichoderma* spp. The analysis confirmed the identity of the pathogen, while for the antagonist agent it allowed to differentiate the isolates obtained in two taxonomic groups: seven of them (T2, T3, T4, T7, T8, T9 and T10) were grouped within the species complex *T. harzianum* and one (T0) within the clade *T. longibrachiatum*.

The *in vitro* antagonistic capacity of the 8 isolates of *Trichoderma* against the *D. teres* pathogen was evaluated. For this, dual cultures were performed in which the percentage of mycelial inhibition (MGI) of the pathogen was recorded and observations of the interaction zone were made by optical microscopy and confocal fluorescence microscopy. During the confrontation of the dual cultures, it was observed that *D. teres* produced a red-orange pigmentation in the zone of interaction with *Trichoderma* spp. The pigments were extracted and characterized by absorbance measurements in the UV-visible spectrum, spectrofluorometry and thin layer chromatography (TLC). In addition, the pigments were purified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and analyzed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) to determine their identities.

Observations on dual cultures showed that all isolates of *Trichoderma* spp. inhibited *D. teres* mycelial growth in the range of 18% to 54%. The T3 isolation produced the best inhibition with an MGI of 39% to 54%. The pigmentation in the contact zone of both microorganisms was observed only during the confrontation and showed fungistatic properties. In the interaction zone, the antagonistic mechanisms observed microscopically were: mycoparasitism with coiling, vacuolated mycelium, thin walls without characteristic pigmentation (albino hyphae), and deformed mycelium. Under confocal microscopy, autofluorescence was observed in cytoplasmic vesicles of *D. teres* during the confrontation with *Trichoderma* spp., however this fluorescence was not evidenced in monospecific cultures.

From the red-orange pigment extraction and the analysis of its UV-visible spectrum, four absorbance peaks of 489, 279, 254 and 230 nm were obtained. The absorption spectrum of the pigment coincides with a type of catenarin according to previous reports. With the TLC technique, three pigment bands were obtained, suggesting that at least three pigments were present in *D. teres* during the confrontation. The coincidence of emission spectra at 488 nm

obtained by confocal microscopy and spectrofluorometry indicated that the red-orange pigments of the interaction zone would be those present in the cytoplasmic vesicles of *D. teres*. The comparison of the chromatograms obtained by HPLC of the pigments of the interaction zone and a commercial catenary standard (1,4,6,8-tetrahydroxy-3-methylanthraquinone) were very similar, showing a high degree of correspondence in their NMR spectra. All this suggests that at least one of the compounds generated by *D. teres* during the interaction would be 1,4,6,8-tetrahydroxy-3-methylanthraquinone.

The antagonistic capacity of *Trichoderma* spp. on *D. teres* mediated by volatile organic compounds (VOCs) was evaluated with the “facing culture technique” through the estimation of the MGI of the pathogen. The VOCs released by the microorganisms alone and in confrontation were extracted using the head space technique (HS) and the analysis were performed by Gas Chromatography (GC) and Mass Spectrometry (MS).

The evaluation of MGI by effect of the release of VOCs by *Trichoderma* spp. showed that all isolates inhibited growth of *D. teres* between 19% and 38%, with T3 having the highest percentage of MGI, coinciding with the results for dual cultures. Albinization was observed in the colonies of *D. teres* exposed to VOCs and its microscopic observations evidenced vacuolization, weakened mycelium and very thin walls, in comparison with controls. In the analysis of VOCs released by monospecific cultures of *Trichoderma* spp. a similar composition was detected between them and the one found during the confrontation with *D. teres*, although with some modifications. Of these, the highest percentage of the compounds were represented by sesquiterpenes, diterpenes and terpenoids. The T0 isolation was the one that produced greater relative abundance only and in the confrontation with *D. teres*. It was also observed that the presence of the pathogen stimulated the production of VOCs in the antagonists. The isolates of *Trichoderma* spp. tested *in vitro*, were evaluated in greenhouse trials by their effects on the biocontrol of *D. teres* and as a growth promoter. The tests were performed on sterile substrate (vermiculite) in order to select the best isolates to be tested on land. Seeds of barley were used with 30% natural infection of *D. teres*, which were also artificially inoculated with the strain *D. teres* A. *Trichoderma* spp. was inoculated 24 h. before sowing. Each treatment consisted of artificially infected barley seeds with the pathogen plus the *Trichoderma* spp. isolation to be tested. The variables evaluated were: incidence (%), leaf and stem severity (%), chlorophyll (SPAD), aerial dry

weight and radicular (mg). The soil tests were performed with the isolates T0, T2, T3 and T9 that showed greater antagonistic capacity *in vitro* and *in vivo* culture. All isolates tested decreased significantly the incidence rate up to 53%. The percentage of stem severity decreased up to 77%, being the most prominent isolates T2, T3 and T9. The percentage of leaf severity was reduced to up 70%, with T0, T2 and T3 showing the lowest values. In respect of chlorophyll variable, the T2, T0 and T3 isolates showed the highest values, differing from the control. For the aerial and radicular dry weight variables, T0 and T3 were the most outstanding. With these data, a clear trend was found in the differential capacity of biocontrol between the isolates of *Trichoderma* spp, which corresponded with the *in vitro* assays.

This research allowed to contribute to the knowledge of the biological mechanisms involved in the interaction *Trichoderma* spp. *D. teres*, to be applied in potential biocontrol practices of diseases. It was determined that some of the isolates of *Trichoderma* spp tested *in vitro*, exerted control *in vivo* by reducing the transmission of the pathogen from seed to seedling and the severity of the disease. In addition, it was evidenced that *Trichoderma* spp. showed a tendency towards the promotion of the growth and vigorization of the barley seedlings, which possibly confers advantages to the plants and minimizes the negative impact caused by biotic and abiotic stresses. The catenarine pigment generated by *D. teres* during the interaction with *Trichoderma* spp. is reported for the first time in this work.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1 Origen del cultivo de cebada

La cebada (*Hordeum vulgare* var. *vulgare* L.) es un cultivo ancestral cuyos orígenes se remontan a casi 10.000 años A.C. Ya se la cultivaba en el antiguo Egipto, siendo citada en el libro del Éxodo en relación a las plagas que asolaron esa región. También fue conocida por los griegos, quienes la utilizaban para elaborar pan y conformó la base de la alimentación de los gladiadores romanos. Su principal particularidad es su gran adaptación a las diferentes condiciones climáticas y/o geográficas. Se puede encontrar cebada desde Escandinavia o Canadá con latitudes mayores a 50° de lat. Norte, hasta la sabana colombiana con 4° de lat. Norte. También crece en los Andes sudamericanos a más de 3000 m de altura, donde constituye una de las principales fuentes de carbohidratos para los pueblos andinos (Cattáneo, 2011).

### 1.2 Producción de cebada en el mundo

En relación al volumen de producción a nivel mundial, la cebada se considera el cuarto cereal de importancia, ubicándose detrás del maíz, arroz y trigo. Su principal destino es para forraje (73%), el 20% para cebada maltera y el resto para consumo humano directo y otros usos industriales. Como principales productores mundiales se destacan la Unión Europea, Rusia y Canadá. Dentro de la Unión Europea los principales productores son España, Francia y Alemania, que en conjunto aportan el 50% de la producción de la Comunidad. En América del Norte, Canadá se constituyó en el mayor productor con 8,2 millones de toneladas (M tn) al año en 2015, seguido por Estados Unidos con 4,6 M tn. En el Hemisferio Sur, Australia es el mayor productor de cebada con 7 M tn anuales promedio, de las cuales el 30% están destinadas a la industria maltera, tanto local como para exportación (Cattáneo, 2011)

En Sudamérica, la mayor producción de este cereal, destinada 100% a la industria maltera, corresponde a la Argentina. En este país en el año 2015, se registró una producción de 3,4 M tn (BCP 2015). Brasil y Uruguay aportan alrededor de 300.000 toneladas anuales, para el mismo destino. También Perú es un importante productor con 200.000 toneladas anuales promedio, de las cuáles el 70% se destina a consumo humano, mientras que el resto

es utilizado para consumo animal (Cattáneo, 2011). La figura 1 muestra los principales países en el mercado mundial para el año 2015.

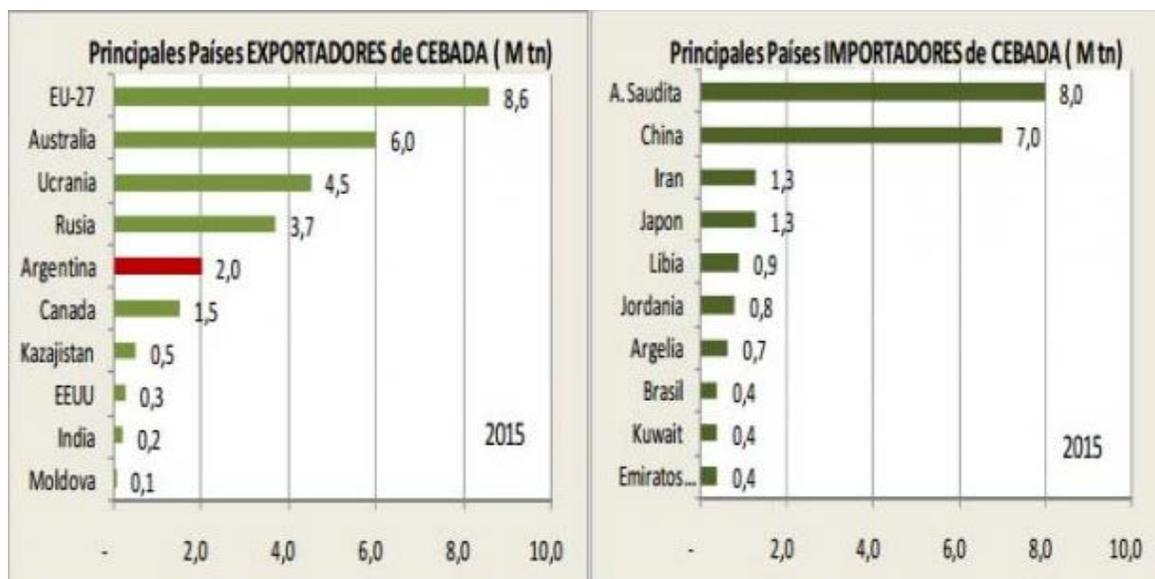


Figura 1: Producción de cebada por parte de los principales países exportadores e importadores, registrada durante el año 2015 (Fuente: <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>).

### 1.3 La cebada en la Argentina

El cultivo de cebada ha tenido un desarrollo importante en la Argentina en los últimos diez años, principalmente aquella destinada a la producción de cerveza (Figura 2). Este incremento se ha debido a que constituye una alternativa más adecuada que el trigo para la rotación con el cultivo de soja y a un incremento en la demanda interna y externa (Cattáneo, 2011). En el país se registran cuatro zonas principales destinadas a la producción de cebada cervecera (Figura 3). Las tres más importantes están ubicadas en la provincia de Buenos Aires, donde se produce más del 90% del total. El sudeste bonaerense cuenta con alrededor del 40% de la producción; el sudoeste bonaerense y la provincia de La Pampa producen alrededor del 25% y el área central de Buenos Aires, aproximadamente un 30%. La zona ubicada en el oeste de Santa Fe y este de Córdoba tiene alrededor de un 5%, destinando gran parte para la alimentación de cerdos. Tanto en el centro de Buenos Aires como en Santa Fe y Córdoba se utiliza el cultivo de cebada cervecera principalmente

porque permite realizar la cosecha aproximadamente 15 días antes que el trigo y efectuar más tempranamente la siembra de soja de segunda (Tomasso, 2004).

<b>CEBADA CERVECERA</b>				
<b>Evolución del Área, Rendimiento y Producción</b>				
<b>CAMPAÑA</b>	<b>Área Sembrada (has.)</b>	<b>Área Cosechada (has.)</b>	<b>Rendimiento (kg/has.)</b>	<b>Producción (tns.)</b>
2001/02	260.330	241.660	2.157	521.150
2002/03	269.240	247.125	2.199	543.420
2003/04	343.128	331.413	3.023	1.001.730
2004/05	271.715	270.685	3.274	886.260
2005/06	271.000	268.000	3.020	810.000
2006/07	339.000	336.000	3.770	1.266.000
2007/08	440.000	416.000	3.500	1.475.000
2008/09	589.000	569.000	3.000	1.682.000
2009/10	545.000	503.000	2.700	1.356.000
2010/11	755.000	746.000	4.000	2.964.000
2011/12	1.171.000	1.118.000	3.600	4.077.000
2012/13	1.810.000	1.695.000	3.000	5.158.000
2013/14	1.260.000	1.200.000	3.900	4.700,00
2014/15	1.006.118	889.000	3.300	2.901.492
2015/16	1.467.421	1.246.891	3.961	4.938.720

Figura 2: Evolución del área, rendimiento y producción de cebada cervecera en la Argentina  
(Fuente: <http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/>)

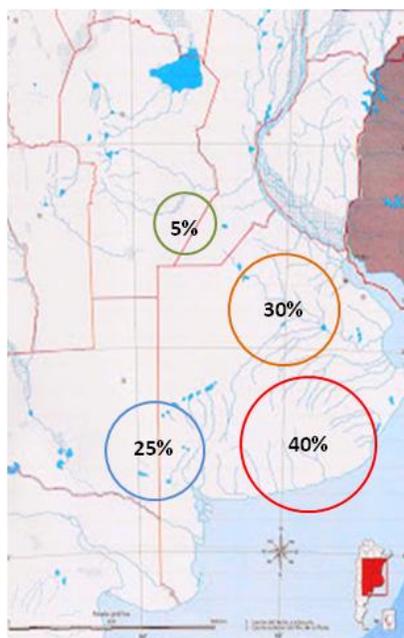


Figura 3: Mapa de las regiones productoras de cebada en la Argentina

#### 1.4 Principales patologías de la cebada

Las enfermedades vegetales son las respuestas de las células y tejidos a los agentes patógenos (bióticos y abióticos) que determinan un cambio adverso en la forma, función o integridad de la planta (Agrios, 1999).

Entre los factores de origen biótico más comunes están los hongos, las bacterias y los virus y entre los abióticos se encuentran el exceso o deficiencia de agua o nutrientes y las altas o bajas temperaturas prolongadas. Las causas de las enfermedades se originan por cambios en el hospedante, el patógeno y/o el ambiente, que propician las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad.

En el cultivo de cebada, en relación a las enfermedades provocadas por virus, en la Argentina se destacan el **Enanismo amarillo** (*Barley yellow dwarf virus*, BYDV) y el **Mosaico estriado** (*Barley stripe mosaic virus*, BSMV). Entre las patologías más importantes ocasionadas por bacterias se encuentran la **Espiga negra o rayado bacteriano** (*Xantomonas translucens* pv. *undulosa* (Smith, Jones & Reddy) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings y *Xantomonas translucens* pv. *translucens* (Jones, Johnson & Reddy) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings) y el **Tizón bacteriano** (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall).

Desde el punto de vista nutricional, los hongos patógenos, pueden estar asociados exclusivamente al tejido vegetal vivo, en cuyo caso se denominan biótrofos o pueden sobrevivir además en sustrato no vivo, conociéndose como necrótrofos (Carmona, 2009).

Entre los primeros se registran: **Roya de la hoja** (*Puccinia hordei* Otth); **Roya amarilla** (*Puccinia striiformis* Westend. f. sp. *hordei*); **Oídio** (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (DC.) E.O. Speer (Syn. *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) y **Carbón volador** (*Ustilago tritici* (Pers.) Rostr. (Syn *Ustilago nuda* var. *tritici*). Entre los necrótrofos se encuentran: **Escaladura** (*Rhynchosporium secalis* (Oudem) J.J. Davis); **Ramularia** (*Ramularia collo-cygni* Sutton B. & Waller J.M.); **Fusariosis** (*Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorfo *Gibberella zae* (Schwein.) Petch)); **Mancha borrosa o marrón** (*Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (teleomorfo *Cochiobolus sativus*)) y **Mancha en red** (*Drechslera teres* f. *teres* (Sacc.) Shoemaker (teleomorfo *Pyrenophora teres* Drechs) (Carmona et al., 2011).

## 1.5 Mancha en red de la cebada

### 1.5.1 Importancia económica

Esta enfermedad reduce el área fotosintética, el peso de raíces y tallos y el número de macollos, afecta la translocación de carbohidratos y la absorción de nitrógeno, lo que lleva a un menor rendimiento, tamaño y peso del grano (Carmona *et al.*, 2011). En cuanto a la calidad para malteo, infecciones altas de mancha en red, afectan al contenido de carbohidratos en el grano y en consecuencia el rendimiento de extracto de malta disminuye (Mathre, 1997)

En algunos países como Australia, Canadá e Inglaterra se han registrado mermas en el rendimiento de 10 a 40% (McDonald & Buchannon, 1964; Shipton, 1966; Jordan, 1981; Deadman & Cooke, 1987; Khan, 1988; Mathre, 1997) y las mismas dependen en gran medida del momento en el ciclo del cultivo en que se desarrolla esta enfermedad y la severidad alcanzada. Infecciones tempranas, antes del macollaje, provocan pérdidas de 30 a 40% en el rendimiento del grano (Mathre, 1997). Los cultivos con niveles altos de infección tienden a volcar, aumentando así las mermas respecto a una cosecha normal, por pérdida de granos. En Uruguay, las mayores mermas ocurrieron en los años donde las infecciones de mancha en red fueron tempranas (Pereyra & Germán, 2010). En la Argentina, los últimos monitoreos realizados entre 1999 y 2000 mostraron a la mancha en red como la enfermedad más importante del cultivo de cebada, con un promedio de pérdidas del 20% (Carmona *et al.*, 2008).

### 1.5.2. Sintomatología

El síntoma típico ocurre principalmente en las hojas, donde aparecen estrías necróticas longitudinales cruzadas por otras transversales, dando la apariencia de mancha en red. En lesiones más viejas el tejido afectado se vuelve clorótico. Cuando la infección proviene de semilla, la primera hoja generalmente muestra una estría longitudinal necrótica y su desarrollo puede provocar la muerte precoz de la misma.

Existen dos formas de *D. teres* morfológicamente similares pero que inducen lesiones diferentes: *D. teres* f. *teres*, típica mancha reticular y *D. teres* f. *maculata*, mancha

elíptica pardo oscura (mancha tipo *spot*) (Carmona *et al.*, 2011; Carmona & Sautua 2015) (Figura 4).

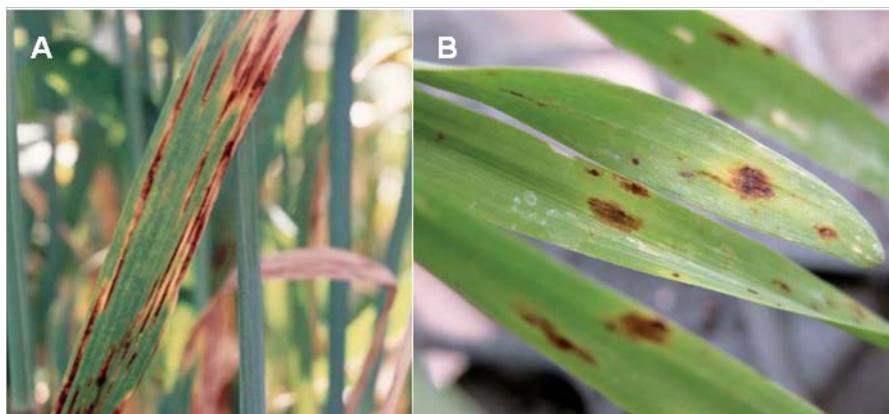


Figura 4: Síntomas típicos de mancha en red de la cebada causada por *D. teres f. teres* (A) y mancha tipo *spot*, causada por *D. teres f. maculata* (B). (Fuente: Pereyra & Germán, 2010)

### 1.5.3 El patógeno *Drechslera teres*

#### 1.5.3.1. Ubicación taxonómica

Esta especie pertenece al Phylum Ascomycota, Sub-phylum Pezizomycotina, Clase Dothideomycetes, Orden Pleosporales, Familia Pleosporaceae. Su estado sexual es *Pyrenophora teres* (Drechsler).

Si bien el nombre aceptado actualmente por el Nomenclature Committee for Fungi (NCF) en el International Botanical Congress del año 2011 (Wijayawardene *et al.*, 2014) para este patógeno es *Pyrenophora teres* (estado sexual), en la presente tesis se lo tratará como *Drechslera teres* ya que es el nombre genérico más antiguo y el estado predominante en la etapa de patogénesis de la enfermedad.

#### 1.5.3.2. Características morfológicas

En cultivo sólido *in vitro* en medio agar papa glucosado (APG) la colonia crece de manera uniforme generando un micelio gris oscuro. Presenta penachos blancos denominados *tufts*, cerca del borde de la colonia. El micelio sumergido en el medio de

cultivo muestra abundante anastomosis con la formación de numerosos sectores vesiculados o lobulados, de color marrón oscuro (Drechsler, 1923). El envés de la colonia es blanco al principio, luego se torna gris oscuro. En el micelio se pueden formar picnidios, prototecios y conidióforos con conidios (Sivanesan, 1987).

En el tejido vegetal, los conidióforos secundarios surgen directamente entre las células epidérmicas del hospedador y más raramente de los estomas, solitarios o en grupos de 2 o 3 (Kenneth, 1962). Miden hasta 220µm de largo y 7-11µm de ancho, con su base bulbosa. En sus comienzos son subhialinos y luego se tornan fuliginosos y se vuelven pardo oscuros a medida que maduran. El primer conidio que nace del ápice, al principio es hialino, volviéndose luego de color amarillento a marrón oliváceo. Su forma es cilíndrica, con contornos suaves y extremos redondeados y con presencia de 3-9 (la mayoría 4-6) septos transversales (dictioseptados), con constricción a nivel del septo. Sus medidas son 70-160 µm (la mayoría 90-120 µm) x 16-23 µm (la mayoría 19-21 µm) con una cicatriz basal oscura (Sivanesan, 1987). Poseen germinación anfigena, es decir por todas sus células (Figura 5 E). Los picnidios se desarrollan superficialmente o parcialmente inmersos en el substrato natural como hojas muertas, semillas y rastrojo. También pueden crecer en distintos medios de cultivo pobres en nutrientes como agar agua y medio de Sach (Kenneth, 1962). Son globosos a piriformes, ostiolados, con medidas de 64-176 µm de diámetro, con escasas setas, van del color amarillo a marrón (Figura 5 D). Las picnidiosporas que produce son aseptadas, hialinas, esféricas o elipsoidales con medidas que van de 1.4-3.2 µm x 1-2 µm (Sivanesan, 1987). Estas dan micelio infectivo que ocasiona las manchas y clorosis, síntomas típicos de la enfermedad (Smedegarg & Petersen, 1972).

Su fase sexual, presenta pseudotecios (ascomata) que se desarrollan en el rastrojo (Figura 5 C), hojas muertas y semillas como también en medios ricos y pobres en nutrientes. Estos contienen ascas desarrolladas en lóculos separados por masas de pseudoparénquima (Kenneth, 1962). Los pseudotecios son globosos a elongados y cerca de la maduración se vuelven cónicos, con un pico ostiolar cilíndrico y setoso (Kenneth, 1962; Sivanesan, 1987) (Figura 5 B). Las ascas son clavadas a cilíndricas con 2 a 8 esporas, bitunicadas, con medidas que van de 175-275 µm x 32-60 µm. Las ascosporas son hialinas al principio, luego amarillo-marrón, muriformes con 3-4 septos transversales y pueden tener o no 1-2 septos verticales en las células centrales y raramente en una de las finales (Figura 5 A). Su rango de medidas es 36-65 µm x 14-28 µm. Eventualmente se desarrollan

ascomas estériles sin hifas ascógenas, denominadas prototecios (Shoemaker, 1955), los cuales pueden encontrarse en el campo sobre el sustrato natural, como así también en medios de cultivo donde se forman sobre material vegetal introducido en los mismos.

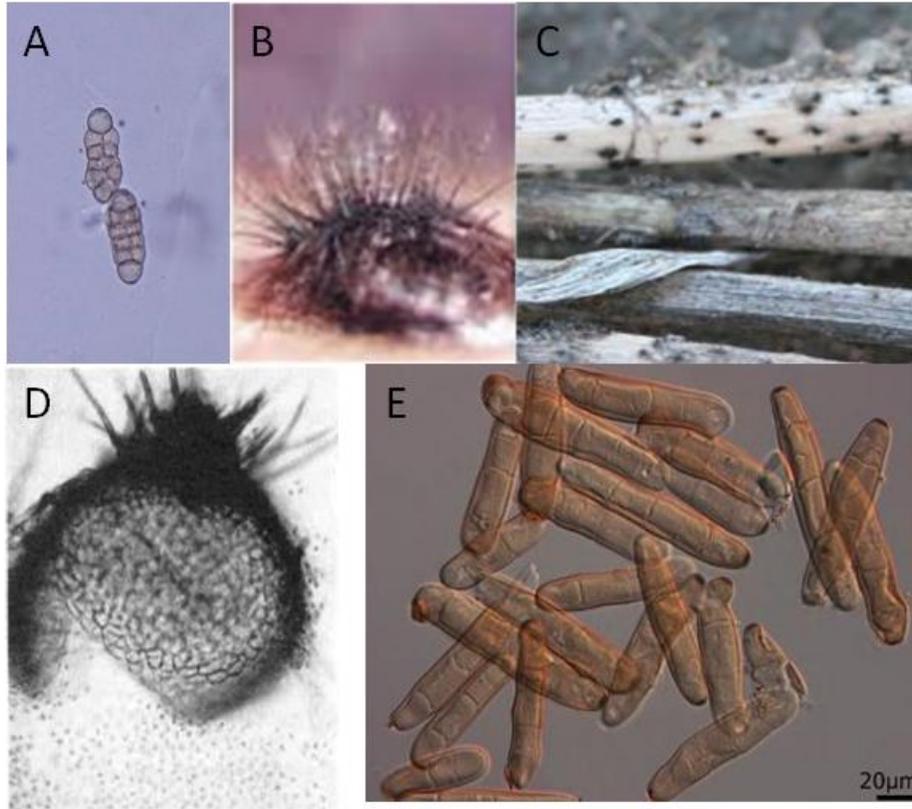


Figura 5: Estructuras morfológicas de *Drechslera teres*. A: ascosporas muriformes. B: pseudotecio. C: pseudotecios en rastrojo de cebada. D: picnidio con picnidiosporas. E: conidios dictioseptados.

### 1.5.3.3 Ciclo biológico

La principal fuente nutritiva del patógeno es la cebada, ya sea la planta viva, el rastrojo o la semilla.

El hongo se transmite a través de las semillas infectadas al cotiledón o primeras hojas. También se puede transmitir, mediante conidios y/o ascosporas, a través del aire y la lluvia desde el rastrojo de cebada de temporadas anteriores a las plantas desde mediados del macollaje en adelante (Andrade, 2010). Una vez sobre el tejido vegetal, los conidios y ascosporas germinan produciendo hifas que generan enzimas que actúan sobre las células del hospedante, dando lugar a la mancha foliar típica. La esporulación sobre estas manchas

genera inóculo secundario que puede afectar a las brácteas florales, alojándose y transmitiéndose a las semillas de la siguiente generación (Figura 6).

*D. teres* no posee estructuras de dormancia (conidios latentes) ni de resistencia (esclerocios y clamidosporas) que le permitan sobrevivir períodos desfavorables en ausencia de un hospedador (Reis, 1991), por esto sobrevive en el rastrojo y sobre plantas hospedantes alternativas convirtiéndose éstos en fuentes de inóculo primario para la próxima temporada (Mathre, 1982).

Las condiciones óptimas para que se produzca la infección son temperaturas de 15 a 25 °C, humedad relativa mayor a 90% en el ciclo del cultivo y de 12 a 36 h de mojado del follaje (Andrade, 2010).

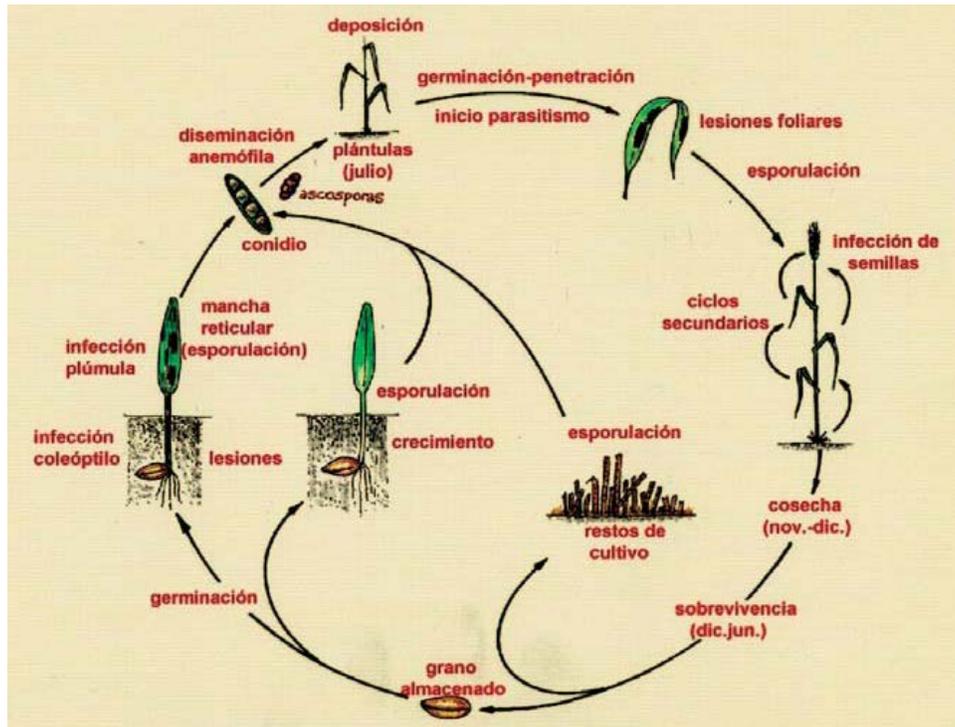


Figura 6: Ciclo biológico de *Drechslera teres* en cebada (Fuente: Pereyra & Germán, 2011)

#### 1.5.4 Fuentes de inóculo: la semilla

La semilla es la principal fuente de inóculo de *D. teres* y por ello cumple un rol fundamental en su ciclo biológico, ya que proporciona la sobrevivencia del patógeno,

asegurando su proliferación y garantizando su ciclo de vida en el cultivo (Reis, 1991). Desde la cosecha hasta el momento de la siembra, el micelio del patógeno permanece en el interior de las semillas alojado en la cáscara y el pericarpio (Luz, 1982). La transmisión hacia la plántula puede estar favorecida por factores que reducen la aparición de la plúmula, como la temperatura del suelo, entre 10 y 15 °C, suelos secos y la profundidad de la siembra (Reis, 1991).

Varios autores han realizado estudios sobre la tasa de transmisión de *D. teres* de semilla a plántula y han establecido que ésta es del 20% en condiciones de campo y de 9% en condiciones de invernáculo (Forcelini & Reis 1990; Carmona *et al.*, 1999; 2008).

Para los patógenos de semilla, tales como *D. teres*, que causa manchas foliares, la semilla representa un factor fundamental. Su importancia se debe no sólo a que posibilita la transmisión del patógeno con alta frecuencia, causando pérdidas en el cultivo de alrededor del 20%; sino que, además facilita su amplia distribución geográfica. Es importante priorizarlas dentro del manejo sanitario de semillas para evitar su consecuente transmisión a los órganos aéreos y contribuir a la disminución del número de aplicaciones de fungicidas (Carmona & Reis, 1998).

### 1.5.5 Manejo de la enfermedad

El control de los patógenos y/o enfermedades involucra medidas tendientes a eliminar al organismo causal de una enfermedad siendo, por lo tanto, sólo aplicable a un número limitado de situaciones. Estas medidas aumentan el costo de producción y, consecuentemente, reducen el lucro de la actividad agrícola. En los últimos años, este concepto ha sido reemplazado por el de “Manejo Integrado de Enfermedades” (MIE) que implica un proceso continuo de eventos consistentes en la selección y uso de técnicas orientadas a reducir las enfermedades a niveles tolerables (Apple, 1977). El MIE trata de regular a los organismos fitopatógenos y no de erradicarlos, teniendo en cuenta la sustentabilidad ecológica. Las principales estrategias de control se basan en el uso de cultivares resistentes, en la aplicación de fungicidas basados en el umbral de daño económico (UDE), en el empleo de prácticas culturales y la utilización de agentes de control biológico (Reis *et al.*, 2001; Carmona *et al.*, 2011).

### 1.5.5.1. Uso de cultivares resistentes

El uso de cultivares susceptibles es el factor más significativo que afecta la pérdida del rendimiento. Se ha incrementado la superficie cultivada con poblaciones genéticamente uniformes, variedades emparentadas o las mismas de una sola especie vegetal, al tiempo que se incorporan materiales genéticos nuevos susceptibles a enfermedades. La mayoría de los cultivares de cebada son susceptibles a las manchas foliares en diversos grados. Debido a la existencia de biotipos con distinta virulencia, un cultivar puede ser resistente en un lugar del mundo y susceptible en otro. Como estrategia de control, es necesario incorporar genes específicos a los biotipos locales a través del mejoramiento genético, evaluando anualmente la reacción de los cultivares, para seleccionar los de mejor comportamiento (Carmona *et al.*, 2011). Conocer el comportamiento sanitario del cultivar es clave en un programa de manejo integrado de enfermedades. En general, para manchas foliares se busca incorporar resistencia a cultivares con buena adaptación y calidad maltera, mediante cruza simples, triples o retrocruza (Pereyra & Germán, 2011)

### 1.5.5.2. Control químico

La eficiencia del tratamiento químico en semilla depende de la cantidad de semillas infectadas, como así también de la eficacia del fungicida, la dosis empleada y la calidad de cobertura de la superficie de la semilla (Carmona *et al.*, 2011). Según Carmona *et al.* (2008) los fungicidas iminocadine, iprodione y guazatine erradicaron al patógeno *D. teres* de semilla con altos niveles de infección. Para mantener las epidemias causadas por patógenos necrótrofos por debajo del UDE, se recomienda el tratamiento específico con fungicidas cuando se practica la rotación de cultivos o en áreas donde no se hayan cultivado cereales de invierno anteriormente (Carmona *et al.*, 2011).

En la concepción del MIE, no se recomienda la aplicación de fungicidas foliares en ausencia de síntomas. Solo son posibles dichas aplicaciones teniendo en cuenta los UDE y los umbrales de daño de acción (UDA). Estos umbrales representan el máximo nivel de enfermedad tolerable económicamente en los lotes y son lo suficientemente bajos como para aprovechar las principales acciones de los fungicidas (preventivas y curativas) y para frenar la tasa de multiplicación del patógeno. El UDE para la mancha en red y borrosa

(causada por *Bipolaris sorokiniana*) fue determinado en 25-30% de incidencia foliar para el año 2008. Estos valores deben modificarse todos los años en función del precio de la cebada, del fungicida y del rendimiento potencial del lote (Carmona, 2008).

### 1.5.5.3 Prácticas culturales

Dentro de las modificaciones incorporadas por el hombre en las prácticas culturales, el aumento en la superficie destinada a la siembra directa ha favorecido el incremento de esta enfermedad, sobre todo beneficiando su supervivencia durante la fase saprofítica en los rastrojos. La medida clave para implementar la siembra directa es el uso de rotación de cultivos que no sean susceptibles a *D. teres*. La rotación es una forma de eliminar al huésped, dándole tiempo suficiente a los microorganismos del suelo a mineralizar el rastrojo. Esta práctica disminuye el inóculo inicial haciendo que la enfermedad aparezca más tardíamente, tenga menor tasa de desarrollo y menor intensidad máxima. El análisis sanitario del rastrojo de la campaña anterior puede ser una herramienta orientativa para decidir la siembra (Pereyra & Germán, 2011).

La eliminación de hospedantes secundarios y plantas "guachas" es otra medida a implementar en el MIE, ya que funcionan como "puentes verdes" comprometiendo el período de rotación. En Sudamérica se han registrado algunas especies del género *Hordeum*, *Bromus* y *Cynodon* como hospedantes alternativos constituyendo una opción más para la sobrevivencia de *D. teres*. (Pereyra, 1996; Carmona *et al.*, 2011).

### 1.5.5.4. Control biológico

Baker & Cook (1974) definen el control biológico como "la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del huésped o del antagonista, o por la introducción masiva de uno o más antagonistas". Por su parte, el agente biocontrolador se define como el microorganismo con capacidad de limitar o evitar de manera más o menos selectiva el crecimiento de un agente patógeno, sin interferir en el crecimiento de la planta.

El biocontrol no genera los efectos negativos que produce el control químico, tales como la resistencia de los hongos a los fungicidas, principalmente de acción sistémica, los riesgos toxicológicos de dichos productos, la contaminación de los alimentos y del suelo y su persistencia en el agua (Lumsden & Papavizas, 1988; Boland, 1990, Heydari & Pessarakli 2010).

Entre los mecanismos de acción de los agentes biocontroladores pueden mencionarse la **antibiosis**, que consiste en la síntesis de inhibidores del crecimiento o la muerte de un organismo cuando el mismo se expone a los productos del metabolismo del antagonista. El **parasitismo**, un tipo de interacción biotrófica en la cual los microorganismos se benefician a expensas de otros. Es muy frecuente entre los hongos, los cuales lo llevan a cabo mediante la liberación de metabolitos secundarios y enzimas capaces de degradar las paredes de su hospedador. La **competencia**, por nutrientes o por espacio, que consiste en el esfuerzo de dos o más organismos, para ganar la cantidad de substrato que cada uno necesita, en las condiciones específicas en que se presenta y cuando la cantidad del mismo, no es suficiente para ambos (Gullino, 1992; Elad, 1996; Harman, 2006).

El biocontrol puede presentar costos económicos menores y ser más eficientes respecto al uso de otras prácticas de control tradicionales. Esto es debido a que los antagonistas actúan en forma más lenta y en menor escala, pero su acción puede ser más estable y duradera en el tiempo que la del control químico. En este último caso, el efecto suele ser temporal y se requieren una serie de aplicaciones para lograr una protección adecuada de las plantas (Heydari & Pessarakli 2010).

Sin embargo, el control biológico tiene una serie de restricciones, limitaciones y requerimientos que deben conocerse. Los organismos biocontroladores son mucho más sensibles a las condiciones externas que los productos químicos. Entre sus limitaciones ecológicas se encuentran la inactivación por la presencia de otros organismos con los que se establecen competencias y el efecto de sustancias químicas. En este sentido, para un uso eficiente se requiere del conocimiento de su biología, ecología y mecanismos de acción sobre los patógenos a controlar (Lumsden & Papavizas, 1988; Boland, 1990).

### 1.5.6 *Trichoderma* spp. como agente de control biológico

*Trichoderma* muestra gran habilidad adaptativa a una variedad de nichos ecológicos, ya que se lo ha aislado de otros hongos, corteza, madera muerta, suelo, esponjas marinas y de plantas en las que vive como endófito (Samuels *et al.*, 2006 c; Jaklitsch, 2009; Druzhinina *et al.*, 2011).

Algunas especies son importantes productoras de enzimas industriales, como las utilizadas en la industria de los biocombustibles, biofertilizantes, biofungicidas y agentes de control biológico contra hongos fitopatógenos y nematodos (Szabó *et al.*, 2012).

A hongos del género *Trichoderma* se los suele encontrar como contaminantes en granjas productoras de hongos comestibles (Park *et al.* 2006; Hatvani *et al.*, 2007) y también como patógenos oportunistas en pacientes inmunocomprometidos (Kredics *et al.*, 2003). También son empleados como indicadores de perturbaciones en el suelo (Migheli *et al.*, 2009).

Sus representantes son grandes productores de metabolitos secundarios, algunos de importancia clínica y otros utilizados en la industria de los alimentos. Algunas especies son empleadas en la biorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos e inorgánicos, incluyendo metales pesados (Schuster & Schmoll, 2010; Harman, 2011 a y b; Mukherjee *et al.*, 2013).

En general, son fáciles de aislar, de cultivar y de propagar en diversos sustratos. Basan sus propiedades antagónicas en mecanismos como, parasitismo directo con producción de enzimas extracelulares y/o metabolitos secundarios; competencia por espacio y/o nutrientes; estimulación del crecimiento de las plantas y/o mecanismos de defensa (Harman *et al.*, 2004, 2006; Howell, 2006; Shores *et al.*, 2010).

Se ha propuesto que *Trichoderma* mejora el crecimiento de las plantas a través de la solubilización de nutrientes y por lo tanto muestra mejores efectos en las plantas que están bajo condiciones de estrés nutricional (Mastouri *et al.*, 2010, Shores *et al.*, 2010). También mejora las tensiones fisiológicas en las semillas como el envejecimiento y la latencia (Delgado-Sánchez *et al.*, 2010, Mastouri *et al.*, 2010).

En la rizósfera, induce la síntesis de fitoalexinas en las plantas, protegiéndolas del ataque de patógenos y plagas. Además, suele inducir la síntesis de proteínas relacionadas

con la defensa, proteínas de patogenicidad (PR) y la acumulación de polímeros estructurales tales como calosa y lignina, entre otros (Yedidia *et al.*, 1999).

Aunque la habilidad competitiva depende de la especie (Samuels, 1996), *Trichoderma* spp. está biológicamente adaptado para una colonización agresiva de los sustratos y una supervivencia, en condiciones adversas, a través de la producción de clamidosporas. La alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, hacen que sea muy eficiente como saprófito y aún más como agente de control biológico.

Entre las especies con propiedades antagonicas más comúnmente citadas se encuentran: *T. hamatum* Bain., *T. harzianum* Rif., *T. koningii* Oud. y *T. viride* Pers. Siendo hasta el momento *T. harzianum* el hongo antagonista más utilizado para el control de enfermedades de las plantas (Chet *et al.*, 1981; Chet & Inbar, 1994; Elad, 2000; Perelló *et al.*, 2003; Cordo *et al.*, 2007; Dal Bello *et al.*, 2008; Stocco *et al.*, 2016).

Atendiendo a todo lo expuesto, el presente trabajo de tesis estuvo dirigido a realizar estudios de biocontrol de la mancha en red de la cebada, producida por *Drechslera teres*, con especies del género *Trichoderma*, debido a que esta asociación aún no ha sido abordada en la Argentina.

**Las hipótesis planteadas fueron:**

- Algunos aislamientos de *Trichoderma* spp. producen diversos efectos antagonistas, que detienen el crecimiento de *Drechslera teres* en interacciones *in vitro*.
- El efecto biocontrolador de algunos aislamientos de *Trichoderma* spp. limita la infección de *D. teres* en plántulas de cebada.

**Objetivos:**

**Generales**

- Estudiar la interacción *in vitro* entre *Trichoderma* spp. y *D. teres*, para contribuir al conocimiento de los mecanismos biológicos que intervienen en la misma y su potencial aplicación para estudios de biocontrol.
- Determinar si los aislamientos de *Trichoderma* spp, con potencial antagónico, ejercen control en la transmisión del patógeno *D. teres* de semillas a plántulas de cebada.

**Particulares**

- Aislar cepas de *Trichoderma* spp. y de *D. teres* provenientes de distintas áreas productora de cebada de la Argentina.
- Caracterizar morfológica y molecularmente los aislamientos de *Trichoderma* spp. y *D. teres*.
- Analizar la interacción de ambos microorganismos *in vitro* e identificar los mecanismos biológicos y bioquímicos que intervienen en dicha interacción.
- Evaluar el efecto de *Trichoderma* spp. en ensayos *in vivo* y determinar su eficiencia como biocontrolador de *D. teres* y como promotor del crecimiento en plántulas de cebada.

## CAPÍTULO II

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS,  
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y  
MOLECULAR DE *DRECHSLERA TERES* Y  
*TRICHODERMA* SPP.

## 2.1. Introducción

### 2.1.1. Taxonomía de *Drechslera teres*

El género *Helminthosporium* Link ha sufrido, desde su creación (1809), numerosas revisiones taxonómicas. Las observaciones realizadas sobre ciertas especies revelaron variaciones en el origen, desarrollo y germinación del conidio, elemento reproductivo de gran significancia en la clasificación de los antiguos Deuteromycetes. Dichas especies incluyen numerosos agentes fitopatógenos difundidos principalmente sobre gramíneas, las cuales involucran cultivos de importancia.

Nisikado (1929) propuso la división del género en dos subgéneros 1) *Cylindro-Helminthosporium* para las especies que poseían conidios cilíndricos, que germinaban a partir de todas sus células y 2) *Eu-Helminthosporium* para aquellas especies que poseían conidios fusiformes que germinaban solo por las células polares. Esta separación taxonómica ya era evidente en el trabajo de Drechsler (1923) que agrupó y trató en primer término a las especies con conidios cilíndricos seguidas de aquellas con conidios fusiformes. En 1930, Ito sugirió elevar el subgénero *Cylindro-Helminthosporium* al rango genérico bajo el nombre de *Drechslera*. Durante mucho tiempo hubo resistencia a la introducción de este nuevo género segregado de *Helminthosporium*, hasta que fue revalidado por Hughes (1958) y Shoemaker (1959). Este último autor, propuso la creación de otro nuevo género: *Bipolaris*, que comprendía las especies del subgénero *Eu-Helminthosporium* (1959). Entonces, se consideró que quedaba automáticamente establecido el género *Helminthosporium*, con las restantes especies cuya ontogenia conidial difería de la que presentan las especies graminícolas. Por otro lado, Leonard & Suggs (1974) convalidaron estos tres taxones y a su vez segregaron de *Bipolaris* spp. algunas especies con estado ascógeno diferente, creando a *Exserohilum* spp. Finalmente Alcorn (1983) llevó a cabo una exhaustiva investigación, fundamentando el reconocimiento de estos tres géneros: *Drechslera*, *Bipolaris* y *Exserohilum*.

El género *Drechslera* fue revisado por Shoemaker (1962) quien realizó un profundo estudio en base a colecciones frescas y material de herbario y estableció conexiones con la fase sexual de *Pyrenophora*, confeccionando una clave en la cual incluyó a *Drechslera*

*teres*. Esta especie es heterotática y sus dos estados ocurren a lo largo de su ciclo de vida y pueden estar separados en tiempo y espacio (pleomorfismo).

Smedergård-Petersen (1971) propuso separar la especie *Drechslera teres* en dos formas en base a las características de sus síntomas. Esas dos formas fueron designadas *D. teres* f. *maculata* y *D. teres* f. *teres*, para aislamientos que inducen síntomas de tipo mancha y síntomas de tipo reticulado, respectivamente. Los primeros consisten en lesiones pardos-oscuros, circulares a elípticas que miden de 3 a 6 mm., rodeadas de zonas cloróticas de ancho variable (McLean *et al.*, 2009). Este tipo de síntoma se puede confundir con el síntoma de la mancha borrosa de la cebada, causado por *Cochliobolus sativus* (anamorfo *Bipolaris sorokiniana*) por lo cual es necesario realizar el análisis del tipo de espora para caracterizar el agente causal (Mathre, 1997; McLean *et al.*, 2009). Otra diferencia entre las dos formas de *D. teres* se da a nivel de sus ciclos de vida, estos son casi idénticos, excepto que *D. teres* f. *teres* puede sobrevivir de una temporada a la siguiente y dispersarse a través de la semilla infectada, mientras que en *D. teres* f. *maculata* la fase de dispersión y supervivencia en la semilla no se ha observado en la naturaleza hasta el momento (Louw *et al.*, 1996; Leisova *et al.*, 2005; Mc Lean *et al.*, 2009).

El análisis filogenético de las secuencias de ADN, en particular, los espaciadores transcritos internos del ADNr (ITS1 e ITS2), se han utilizado ampliamente para resolver las relaciones taxonómicas a nivel de especie (White *et al.*, 1990, Jacobs & Rehner, 1998).

Estudios moleculares de especies de *Pyrenophora/Drechslera* han dilucidado la ubicación taxonómica del género. Inicialmente el gen 18S del ARNr fue usado para la clasificación de *Pyrenophora/Drechslera* y géneros relacionados (Beerbe, 1996). Más tarde análisis filogenéticos de la región del ITS y del fragmento *gdp* codificante para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, mostraron que *Pyrenophora* es monofilético y sustentaron la separación del rango genérico *Drechslera* de otros hongos graminícolas (Zhang & Beerbe, 2001). Además en este mismo estudio el estado asexual *Drechslera* fue agrupado con *Pyrenophora*.

Estudios realizados en patrones de divergencia de secuencias del ADN y estructuras de haplotipos en el locus del gen mating-type (MAT) de ambas formas de *P. teres* (*teres* y

*maculata*) sugieren un gran aislamiento genético entre ellas, siendo la hibridación rara o ausente en condiciones naturales (Rau *et al.*, 2007).

### 2.1.2. Taxonomía de *Trichoderma* spp.

*Trichoderma* spp. pertenece al orden Hypocreales, es el estado anamórfico de *Hypocrea*, género tipo de la familia Hypocreaceae. Fue descrito por primera vez por Persoon en 1794. Los hermanos Tulasne en 1865 mostraron en sus ilustraciones las primeras evidencias de la conexión entre *Hypocrea rufa* y *Trichoderma viride*. Dyngle (1952-1957) estableció el primer tratamiento taxonómico del género aislando los anamorfos a partir de ascosporas y haciendo una descripción completa de los dos estados.

El género *Hypocrea* se caracteriza por poseer ascomas periteciales inmersos en estromas con alta variabilidad morfológica, con ascosporas verdes o hialinas formadas en ascos típicamente cilíndricos de ápice romo, a veces ligeramente engrosado, con 8 ascosporas bicelulares mono o dimórficas que se desarticulan a la madurez quedando ascos con 16 esporas (Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002).

Las bases de la sistemática del anamorfo *Trichoderma* fueron establecidas por Rifai en 1969, realizando el primer agrupamiento en nueve especies agregadas: *T. piluliferum* Webster & Rifai, *T. polysporum* (Link ex Pers) Rifai, *T. hamatum* (Bon) Bain, *T. koningii* Rifai, *T. aureoviride* Rifai, *T. harzianum* Rifai, *T. longibrachiatum* Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai y *T. viride* Pers ex S. F Gray. Esta identificación se realizó teniendo en cuenta diferencias morfológicas y fisiológicas, como tipo de ramificación del conidióforo, forma y crecimiento del conidio y coloración de la colonia, entre otras. En 1984 Bisset propuso la sección Longibrachiatum y en 1991 clasificó a los grupos de acuerdo al tipo de ramificación de sus conidióforos en tipo Gliocladium, Pachybasium, Verticillum y Trichoderma (Figura 1). Esta clasificación se mantiene aún hoy como referencia para describir la morfología de los conidióforos.

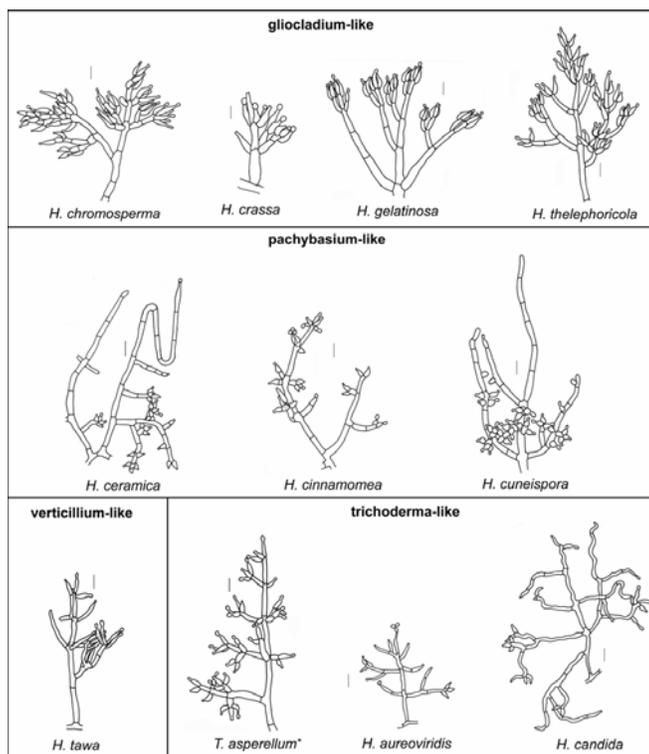


Figura 1: Tipos de ramificaciones de los conidióforos de *Trichoderma* spp. (Fuente: Bissett, 1991).

Los caracteres del estado anamórfico que presentan mayor variabilidad son:

- 1-Aspecto de la colonia en el medio de cultivo “Synthetischer nährstoffarmer” (SNA) (Nirenberg, 1976) en el cuál se forman pústulas o matas y/o proyecciones estériles.
- 2-Aspecto de la colonia en medio de cultivo agar papa glucosado (APG) donde se pueden identificar anillos de crecimiento, olor a coco y pigmentos difusibles.
- 3-Tipo de ramificación de los conidióforos.
- 4-Forma de las células conidiógenas (fiálides).
- 5-Forma, color y tamaño de los conidios.

Debido a las dificultades que se presentaban en la identificación de especies dentro del género, por la cercanía morfológica entre ellas, a mitad de los años '90 se comenzaron a emplear técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y

secuenciación de fragmentos del ADN, con el fin de esclarecer la filogenia de los diferentes grupos. Esto llevó a una identificación más fiable de las especies y aumentó rápidamente su número (Druzhinina & Kubicek, 2005). También gracias a las herramientas moleculares se reconoció que *Trichoderma* e *Hypocrea* eran filogenéticamente indistinguibles (Rehner & Samuels, 1995) mostrando que la forma asexual y sexual, respectivamente, formaban una especie holomórfica. Entre las secuencias y marcadores genéticos que se utilizan actualmente para la identificación de especies *Hypocrea/Trichoderma* se encuentran: los espaciadores transcritos internos (ITS), factor de elongación de la transcripción (*tef1*), calmodulina (*cal*), actina (*act*) y subunidad II de la ARN polimerasa (*rpb2*) (Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002; Samuels *et al.*, 2009; Druzhinina *et al.*, 2012).

En la actualidad se reconocen aproximadamente 256 especies de *Trichoderma* (Samuels *et al.*, 2012; Bissett *et al.*, 2015). La sistemática del género comprende dos secciones monofiléticas: Sección *Trichoderma* y Sección *Longibrachiatum* y un grupo parafilético que comprende catorce clados: *Spinulosa*, *Chlorospora*, *Harzianum*, *Semiorbis*, *Virens*, *Ceramica*, *Strictipilosa*, *Gelatinosa*, *Stromaticum*, *Hypocreanum*, *Psichrophila*, *Brevicompectum*, *Lutea* y grupo central *Pachybasium*. (Atanasova *et al.*, 2013).

Los objetivos planteados en el presente capítulo fueron:

- Recolectar y aislar cepas de *Trichoderma* spp. y *Drechslera teres* provenientes de distintas áreas de la región productora de cebada.
- Caracterizar morfológica y molecularmente los aislamientos de *Trichoderma* spp. y *D. teres*.

## 2.2. Materiales y métodos

### 2.2.1 Aislamiento de los microorganismos

#### 2.2.1.1. *Trichoderma* spp.

*Trichoderma* spp. se aisló a partir de muestras de rizósfera provenientes de distintas áreas de la región productora de cebada de la provincia de Buenos Aires: Barrow, Bolívar, Bordenave y Tres Arroyos. Estas áreas presentaban antecedentes de mancha en red, con incidencias en semillas entre el 10% y el 20%. Las muestras fueron tomadas a partir de la capa superior del suelo (rizósfera) del cultivo de cebada, hasta una profundidad no mayor a 15 cm. Cuando se realizó el muestro, los lotes estaban cultivados con cebada. El método utilizado fue la técnica de dilución en placa (Warcup, 1950). Esta consistió en realizar una suspensión de 2,5g de suelo seco tamizado en 25ml de agua destilada estéril. Luego de agitarla durante 15 minutos, se realizaron 3 diluciones seriadas (1:10) y se sembró 1ml de la última dilución en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo específico “Trichoderma selective medium” (TSM) (Elad *et al.*, 1981). Las placas fueron incubadas a 24 °C por 4 días, momento en cual se analizaron macroscópicamente y bajo microscopio óptico para efectuar la identificación del microorganismo.

Teniendo en cuenta que una característica importante de los agentes biocontroladores es su rápido crecimiento y colonización para una competencia efectiva contra otros microorganismos (Harman *et al.* 2004; Heydari & Pessarakli 2010), se utilizó este criterio para la selección de los aislamientos que luego se utilizaron en ensayos *in vitro* e *in vivo*. A partir de 40 aislamientos identificados previamente como *Trichoderma* spp. se seleccionaron 8 en base a los mayores radios de crecimiento promedio de las colonias presentado luego de 3 días de incubación en agar papa glucosado comercial (APG Britania) en oscuridad a 15 °C y a 25 °C.

#### 2.2.1.2. *Drechslera teres*

*D. teres* se obtuvo a partir de hojas con el síntoma típico de la “mancha en red” presentes en cultivos de cebada implantados en la Estación Experimental Julio Hirschhorn de la localidad de Los Hornos, provincia de Buenos Aires (34° 52’S y 57° 58’O) (Figura 2 A). El aislamiento de los fitopatógenos se realizó tomando trozos de hojas con lesiones necróticas, las cuales fueron desinfectadas superficialmente realizando pasajes sucesivos por alcohol 70°, hipoclorito de sodio al 5% y agua destilada estéril, antes de ser sembrados en APG. Además de realizar aislamientos desde el cultivo de cebada, también se aisló el

patógeno a partir de semillas naturalmente infectadas, provenientes de las mismas localidades que las muestras de rizósfera, mediante el método del agar, según normas impartidas por la International Seed Testing Association (ISTA) (Neegaard, 1979) (Figura 2 B). En este método las semillas, previamente desinfectadas, se sembraron en medios agarizados (APG).

A partir de 10 aislamientos provenientes de lesiones foliares y 10 de semillas infectadas identificados como *D. teres* se seleccionó uno de cada origen en base a su velocidad de crecimiento luego de 3 días de incubación en oscuridad a 24°C en APG y a la cantidad de conidios producidos luego de 6 días de incubación en oscuridad a 24°C en APG. Adicionalmente se eligió otro aislamiento proveniente de semilla que presentaba características culturales atípicas para esta especie.

Se realizó la caracterización morfológica de estos tres aislamientos y la caracterización molecular de dos de ellos.



Figura 2: Síntoma típico de “mancha en red” en hoja de plantas de cebada (A). Aislamiento de *D. teres* de semillas de cebada con infección natural (B).

## 2.2.2. Caracterización morfocultural

### 2.2.2.1. *Trichoderma* spp.

Los ocho aislamientos de *Trichoderma* spp. se caracterizaron de acuerdo a su morfología y características culturales siguiendo la metodología recomendada por Samuels *et al.* (2006b). A partir de los aislamientos cultivados en APG a  $25 \pm 1$  °C, con un fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad durante 7 días, se cortaron discos de 5 mm de diámetro y se transfirieron a placas de Petri de 90 mm conteniendo dos medios distintos: SNA y agar papa glucosado comercial (APG Britania). Las placas, 5 réplicas por aislamiento, se incubaron a 25 °C con un fotoperíodo de 12 h de luz blanca fluorescente. La observación de las características culturales macroscópicas, como aspecto y coloración de la colonia, presencia de olores característicos y liberación de pigmentos o secreciones al medio, fueron evaluadas en APG entre las 72 y 96 horas de incubación dependiendo de la velocidad de crecimiento de los aislamientos. Para describir la coloración se utilizó la carta de colores de Rayner (1970). Las observaciones bajo microscopio óptico (Nikon YS2 equipado con cámara fotográfica digital Nikon D40) se efectuaron a partir de los cultivos crecidos en SNA, ya que este medio pobre en hidratos de carbono, permite que las colonias crezcan con menor velocidad, posibilitando la observación de las estructuras antes de su maduración. Para cada aislamiento se registró el número de fiálides, la presencia de proyecciones estériles y de clamidosporas y el largo y el ancho de 40 conidios, calculando también la relación entre este último parámetro. Además de realizar las observaciones macro y microscópicas, se realizó un ensayo para medir la tasa de crecimiento de los aislamientos. Para tal fin se colocó un disco de micelio de crecimiento activo de cada uno de los aislamientos, en placas con APG y SNA a 3 cm del extremo de la placa. Se prepararon tres placas para cada medio y aislamiento, que fueron incubadas a 15, 25 y 35 °C, en oscuridad, durante 96 horas según Jaklitsch (2009). Se tomaron medidas del radio de la colonia cada 24 h.

### 2.2.2.2. *Drechslera teres*

La caracterización morfológica de los 3 aislamientos *D. teres* se realizó en APG de acuerdo a Ellis (1971) y Sivanesan (1987). Las colonias se analizaron por su coloración, presencia de pigmentos y tasa de crecimiento a los 3 y 6 días de incubación a 24 °C en oscuridad. Se realizaron observaciones bajo microscopio óptico de la forma, color y medidas de 40 conidios de cada aislamiento. Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico Nikon YS2 equipado con cámara fotográfica digital Nikon D40, con una magnificación de 400X.

### 2.2.3. Identificación y caracterización molecular

#### 2.2.3.1. *Trichoderma* spp.

La caracterización molecular de *Trichoderma* spp. se efectuó a través de la secuenciación de un fragmento del gen factor de elongación de la transcripción (*tef1*), ya que en grupos de especies complejos como éste, dicho marcador ha demostrado poseer suficiente variabilidad para resolver especies (Jaklitsch, 2009).

Los aislamientos se sembraron en cajas de Petri de 60 mm con caldo papa (CP) y se los incubó durante 72 h a 25 °C en ciclos de luz de 12 h. Luego se extrajo el micelio formado, se eliminó el excedente de agua con papel secante y se transfirió a tubos de 1,5 ml. La extracción del ADN se realizó utilizando el kit comercial QIAGEN (Master mix de New England Biolabs), siguiendo su protocolo.

La reacción de amplificación se llevó a cabo con los cebadores (*primers*) Ef728M-Ef2 (5'- CAT YGA GAA GTT CGA GAA GG- 3' y 5'- GGA RGT ACC AGT SAT CAT GTT-3') desarrollados por Samuels *et al.* (2011). La mezcla de reacción se realizó en un volumen de 20 µl, conteniendo 5-20 ng de ADN fúngico, una mezcla de 10 mM de cada nucleótido, 0,25 µM de cada uno de los *primers*, 1 U de Taq polimerasa, 1,25 mM de Cl<sub>2</sub>Mg y 1x buffer de reacción (Master mix de New England Biolabs).

El programa usado para la PCR fue el descrito por Samuels & Ismaiel (2009) y consistió en un ciclo de desnaturalización inicial de 1 min a 94 °C, 30 ciclos de 1 min de

desnaturalización a 94 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C con un paso de elongación final de 3 min a 72 °C.

Los fragmentos amplificados fueron secuenciados en la Unidad de Biotecnología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA Castelar) por medio del método de Sanger *et al.* (1977).

### Análisis filogenéticos

Las secuencias correspondientes al *tefl* fueron editadas mediante el programa BioEdit versión 7.0.9.0 (Hall, 1999) y utilizadas para realizar un análisis filogenético, el cual incluyó las secuencias de los aislamientos T0, T2, T3, T4, T7, T8, T9 y T10 de *Trichoderma* spp., productos de este estudio, y las secuencias de 22 especies de los géneros *Trichoderma/Hypocrea* disponibles en la base de datos del GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Ascomycota: Hipocreales) (AY883713.1) fue utilizada como *outgroup*. Previo al análisis filogenético, las secuencias fueron alineadas utilizando la herramienta ClustalW del programa Mega5 (Tamura *et al.*, 2011), suponiendo una penalidad por apertura y extensión de *gap* de 15 y 6,66, respectivamente. El alineamiento fue editado automáticamente por el software Gblock versión 0.91b (Talavera & Castresana, 2007), constituyendo 2 la longitud mínima de un bloque y dejando todas las demás opciones por defecto. El estudio filogenético se llevó a cabo mediante el análisis de máxima verosimilitud (Maximun Likelihood), utilizando 1000 réplicas de *bootstrap* para evaluar el soporte estadístico de los nodos.

#### 2.2.3.2. *Drechslera teres*

Se seleccionaron dos aislamientos que presentaron diferencias morfoculturales para su caracterización molecular: uno proveniente de semilla (Dt M10) y otro de tejido vegetal enfermo con el síntoma típico (Dt C10). Se utilizó el marcador genético ITS que junto con el *gdp* están recomendados para la delimitación entre especies del género (Hyde *et al.*, 2014). La caracterización molecular se realizó mediante una extracción del ADN genómico por el método convencional de extracción de ADN con buffer CTAB. Luego se amplificó

el fragmento de ADN ribosomal que incluye el extremo 3' del ARN 18S, el ITS 1, el ARN 5.8S, el ITS 2 y el extremo 5' del ARN 28 S del microorganismo en estudio, con los *primers* universales ITS 1 e ITS 4 (White *et al.*, 1990). Los fragmentos amplificados fueron secuenciados a través del servicio de secuenciación de Macrogen (Seúl, Corea) por medio del método de Sanger *et al.* (1977).

### Análisis filogenético

Se realizó un análisis filogenético empleando la secuencia ITS a fin de evaluar la posición taxonómica de los aislamientos *D. teres* M (DtLPS1) y *D. teres* A (DtLPS2). El *ingroup* consistió en 30 secuencias de 18 especies del género *Drechslera/Pyrenophora*, mientras que *Brunneosphaerella jonkershoekensis* fue utilizada como *outgroup*. Las secuencias se alinearon utilizando el algoritmo de ClustalW incluido en el software Geneious R9 (Kearse *et al.*, 2012). El alineamiento se editó de manera automática con el software Gblock Versión 0.91b (Talavera & Castresana, 2007), configurándose como 2 a la longitud mínima de un bloque y dejando todas las demás opciones por defecto. Se seleccionó el mejor modelo de sustitución utilizando el Criterio de Información de Akaike (AIC) (AIC; Akaike, 1974) mediante el software jModelTest versión 2. 1. 7 (Darriba *et al.*, 2012) y se llevó a cabo el análisis de máxima verosimilitud con el software PhyML v.3.0 (Guindon & Gascuel, 2003), usando la topología BioNJ como el árbol de partida para la mejor búsqueda heurística entre los algoritmos de intercambio del vecino más cercano (NNI) y de poda y reinserción de subárboles (SPR). El soporte estadístico de los nodos se evaluó usando 1000 réplicas de *bootstrap*.

## 2.3. Resultados

### 2.3.1. Aislamiento de los microorganismos

De los 40 aislamientos de *Trichoderma* spp. los ocho seleccionados fueron los que presentaron radios promedio de crecimiento iguales o mayores a 1 cm luego de tres días de

incubación a 15 °C y radios promedio iguales o mayores a 4 cm cuando fueron incubados a 25°C en APG a oscuridad.

Estos fueron caracterizados morfológica y molecularmente. Luego se utilizaron en ensayos *in vitro* e *in vivo* enfrentándolos con los tres aislamientos de *D. teres*.

De los 10 aislamientos de *D. Teres* provenientes de lesiones foliares y de los de semilla se eligió uno de cada origen. Ambos aislamientos alcanzaron un diámetro promedio de crecimiento igual a 4 cm a los tres días de incubación a oscuridad en APG y mostraron una abundante producción de conidios, cercana a  $1 \times 10^4$  conidios/ml.

En la tabla 1 se detallan los orígenes de los aislamientos de *Trichoderma* spp., mientras que en la tabla 2 se observan los de *D. teres*.

Tabla 1: Orígenes geográficos de los aislamientos de *Trichoderma* spp.

Aislamientos	Origen geográfico
T0	Tres Arroyos
T2	Tres Arroyos
T3	Bordenave
T4	Tres Arroyos
T7	Bolívar
T8	Bordenave
T9	Tres Arroyos
T10	Barrow

Tabla 2: Hospedante y orígenes geográficos de los aislamientos de *D. teres*.

Aislamientos	Hospedante/Origen geográfico
<i>D. teres</i> A	Hoja /Los Hornos
<i>D. teres</i> C	Semillas/ Bolívar
<i>D. teres</i> M	Semillas/Los Hornos

### 2.3.2. Caracterización morfocultural

#### 2.3.2.1. *Trichoderma* spp.

Las colonias de todos los aislamientos fueron de color verde, presentaron abundante esporulación en APG y una elevada tasa de crecimiento (más de 35 mm de radio) luego de 3 días de incubación a 25 °C en oscuridad. Todas las colonias, excepto las de T0, luego de una semana bajo fotoperíodo de luz blanca fluorescente, mostraron aspecto algodonoso, más floco hacia la periferia y algunas presentaron conidióforos dispuestos en anillos concéntricos y pigmentos amarillos en el medio de cultivo. La mayoría de los aislamientos no presentó olor característico, salvo T2, T3 y T4 que presentaron un leve olor dulce. El patrón de ramificación de los conidióforos fue del tipo *Pachybasium*, las fiálides fueron ampuliformes y los conidios subglobosos. Estas características morfoculturales, sumadas al rápido crecimiento, fueron las más importantes para la identificación de los aislamientos.

El aislamiento T0, luego de una semana de incubación en APG a 25 °C bajo fotoperíodo de luz blanca fluorescente, no creció de manera uniforme sino en forma de pústulas agregadas. Presentó escaso micelio aéreo, producción conidial concentrada en el centro de la colonia, difusión de pigmentos amarillos al medio de cultivo y olor característico. El patrón de ramificación de sus conidióforos no fue característico de alguno de los tipos aunque se asemejó al tipo *Pachybasium* (Bissett 1991), sus fiálides fueron uncinuladas y sus conidios oblongos.

Las características culturales de los aislamientos de *Trichoderma* spp. incubados a 25 °C bajo fotoperíodo de 12 h de luz blanca fluorescente en (APG y SNA) se detallan en las tablas 3 y 4 y figura 3. Los detalles microscópicos de su morfología se ilustran en las figuras 4 y 5 y se pueden visualizar en la tabla 5. Las tablas 6 y 7 presentan los promedios de las medidas de los conidios ( $\mu\text{m}$ ) observados bajo microscopio óptico y el radio de crecimiento (mm) de las colonias a 15, 25 y 35 °C respectivamente.

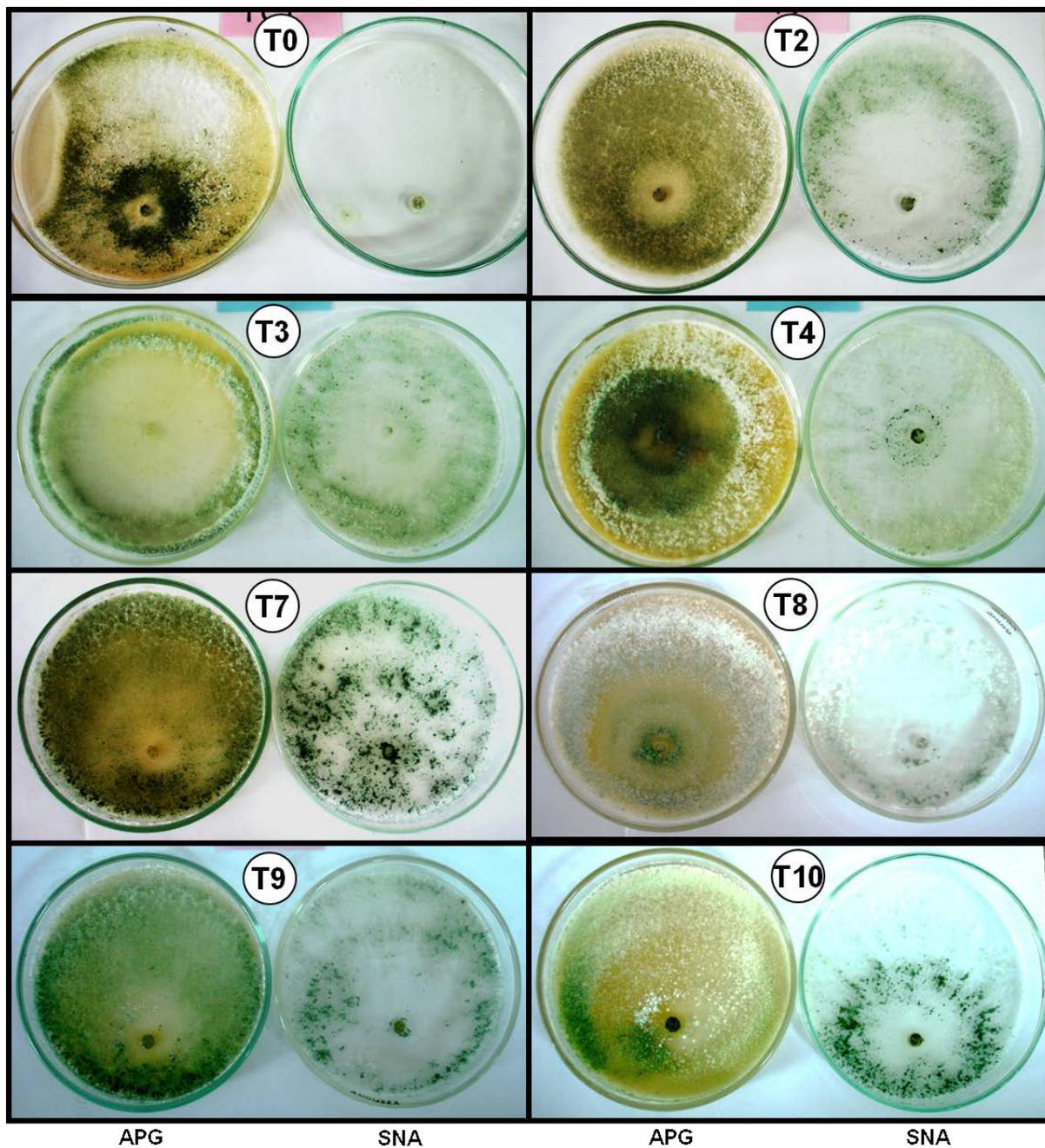


Figura 3: Características culturales de los aislamientos de *Trichoderma* spp. a los 5 días de incubación a 25 °C, bajo fotoperíodo de 12 h de luz blanca fluorescente, en APG y SNA.

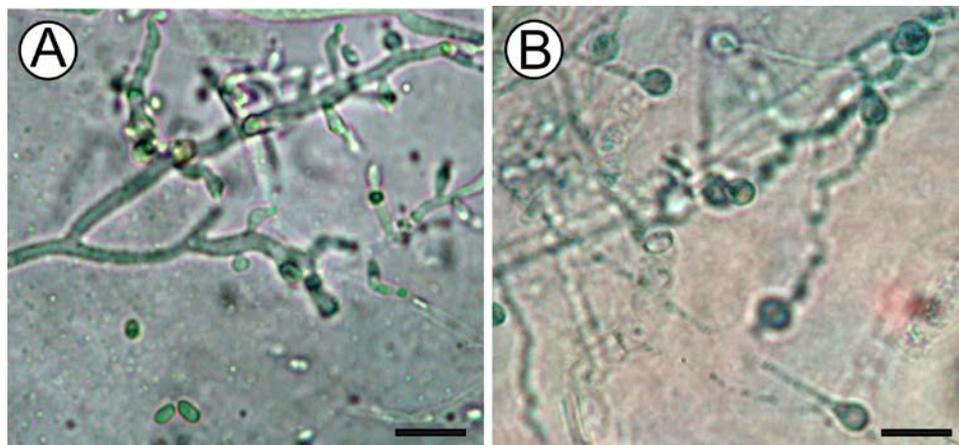


Figura 4: Detalles microscópicos de la morfología de T0. A) Conidióforo con fiálides filiformes y conidios oblongos. Escala de 10 $\mu$ m. B) Clamidosporas. Escala: 20  $\mu$ m

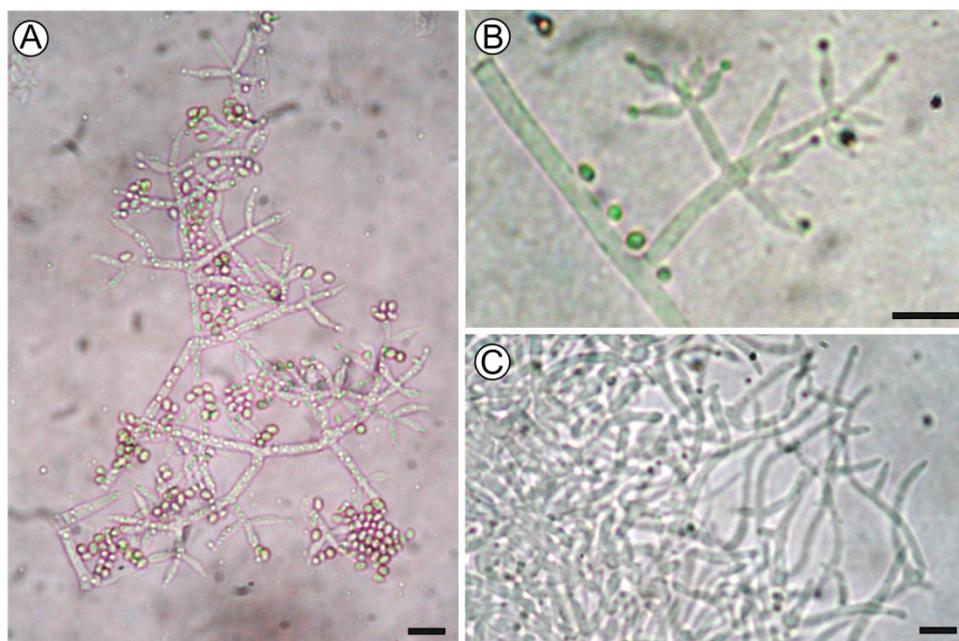


Figura 5: Detalles microscópicos de la morfología de T2 y T10. A) Conidióforos de T2 con fiálides ampuliformes y conidios subglobosos. B) Detalle de la ramificación dicotómica de T2. C) Proyecciones estériles rectas y ramificadas de T10. Escala: 10 $\mu$ m.

Tabla 3: Características culturales de *Trichoderma* spp. determinadas en medio de cultivo APD.

Aislamientos	Coloración	Aspecto de la colonia	Presencia de anillos de crecimiento	Liberación de pigmentos	Presencia de olor	Presencia de secreciones
T2	Verde herbáceo oscuro "Dark herbage Green"	Escaso micelio aéreo	No	Si, amarillo palido	No	Si, gotas color ámbar sobre micelio aéreo
T3	Verde Oscuro "Dark Green"	Escaso micelio aéreo	No	Si, amarillo palido	No	No
T4	Verde Oscuro "Dark Green"	Matas en la periferia	Si, 2.	Si, amarillo oscuro	No	No
T7	Verde herbáceo Oscuro "Dark herbage green"	Escaso micelio aéreo	No	No	No	No
T8	Verde Pistachio "Pistachio green"	Matas en la periferia	Si, 2.	Si, amarillos	No	No
T9	Verde Oscuro "Dark Green"	Abundante micelio aéreo	No	No	No	No
T10	Verde herbáceo Oscuro "Dark Herbage green"	Cespitoso, con escaso micelio aéreo	No	Si, amarillos	No	No
T0	Verde Pistacho Pistachio Green	Micelio ralo con formación de matas	No	Si, amarillos claro	Si	No

Tabla 4: Características culturales de *Trichoderma* spp. determinadas en medio de cultivo SNA

Aislamientos	Coloración	Aspecto de la colonia	Presencia de anillos de crecimiento	Liberación de pigmentos	Presencia de Olor	Presencia de secreciones
T2	Verde Oscuro "Dark Green"	Pústulas agregadas y micelio aéreo	No	No	Si, levemente dulce	No
T3	Verde Pistacho "Pistachio Green".	Pústulas agregadas	Si, 2	No	Si, levemente dulce	No
T4	Verde Pistacho "Pistachio"	Pústulas	Si, 1	No	Si, levemente	No

	Green”				dulce.	
<b>T7</b>	Verde Oscuro “Dark Green”	Matas agregadas, escaso micelio aéreo	Si, 2	No	No	No
<b>T8</b>	“Verde herbáceo oscuro” Dark herbage green	Pústulas agregadas	Si, 2	No	No	No
<b>T9</b>	Verde pistacho ”Pistachio Green”	Pústulas agregadas	Sí, 2	No	No	No
<b>T10</b>	Verde Oscuro “Dark Green”	Pústulas	Sí, 2	No	No	No
<b>T0</b>	Verde Pistacho “Pistachio Green”	Pústulas escasas en periferia	No	No	Si	No

Tabla 5: Características morfológicas de *Trichoderma* spp. observadas al microscopio óptico. 400X

	Ramif. conidiófo ro	Forma de fiálides	Nº de fiálides	Fiálides intercalares	Forma y color de conidios	Proyeccion es estériles	Clamidosporas
<b>T2</b>	Dicotómi ca	Ampuliformes	2 a 5	No	Subglobosos verdes	No	No
<b>T3</b>	Dicotómi ca	Ampuliformes	2 a 5	Si	Subglobosos verdes	Si, recta y ramificada	No
<b>T4</b>	Dicotómi ca	Ampuliformes	2 a 5	Si	Subglobosos verdes	No	No
<b>T7</b>	Dicotómi ca	Ampuliformes	2 a 5	Si	Subglobosos verdes	Si, recta	No
<b>T8</b>	Dicotómi ca	Ampuliformes	3 a 5	Si	Subglobosos verdes	No	No
<b>T9</b>	Dicotómi ca	Ampuliformes	2 a 5	No	Subglobosos verdes	No	No
<b>T10</b>	Dicotómi ca	Ampuliformes	2 a 5	No	Subglobosos verdes	Si, recta y ramificada	Si

<b>T0</b>	Irregular	Uncinuladas	1	No	Oblongos verdes	No.	Si
-----------	-----------	-------------	---	----	--------------------	-----	----

Tabla 6: Medidas promedio y mínimas-máximas ( $\mu\text{m}$ ) del largo y ancho de conidios de *Trichoderma* spp. y su relación.

<b>Aislamiento</b>	<b>Largo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Ancho (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>L/A (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
T2	2.82 (2.6-3.12)	2.4 (2.16-2.5)	1.17 (1.1-1.3)
T3	2.67 (2.3-3)	2.38 (2- 2.5)	1.12 (1-1.3)
T4	2.85 (2.5-3.12)	2.4 (2.15-2.3)	1.18 (1.1-1.3)
T7	2.7 (2.4-3.15)	2.43 (2.4-2.7)	1.10 (1-1.2)
T8	2.64 (2.4- 2.88)	2.48 ( 2.4-2.64)	1.06 (1-1.1)
T9	2.73 (2.4-3.12)	2.40 (2.36- 2.64)	1.14 (1-1.3)
T10	2.78 (2.6-2.86)	2.36 (2.16- 2.7)	1.16 (1-1.22)
T0	4.03 (3.12-4.8)	2.4 ( 2-2.5)	1.68 (1.3-2)

Tabla 7: Crecimiento promedio del radio de las colonias *in vitro* de *Trichoderma* spp.

<b>Aislamientos</b>	<b>APG</b>			<b>SNA</b>		
	<b>15 °C</b>	<b>25 °C</b>	<b>35 °C</b>	<b>15 °C</b>	<b>25 °C</b>	<b>35 °C</b>
<b>T0</b>	17.2 (16-18)	60 (55-67)	54 (50-63)	10.5 (9-11)	40 (35-45)	50 (45-56)
<b>T2</b>	10.5 (9-11)	60 (54-65)	36 (30-40)	11.2 (10-12)	55 (50-58)	24 (20-30)
<b>T3</b>	8.5 (6-10)	40 (30-50)	20 (15-25)	7.3 (6-8)	38 (35-43)	7 (4-10)
<b>T4</b>	9.7 (9-12)	55 (50-60)	20 (17-26)	6.5 (5-8)	32 (28-35)	6 (4-10)
<b>T7</b>	10.5 (8-11)	52 (45-55)	16 (13-20)	4.12 (3-5.5)	33 (25-37)	5.6 (3-10)
<b>T8</b>	7.12 (6-8)	40 (35-45)	17 (12-22)	5.9 (5-7)	22 (18-26)	11 (8-15)
<b>T9</b>	8.1(6-9)	54 (50-60)	9.2 (8-10)	6.5 (5-8)	43(39-45)	9 (6-12)
<b>T10</b>	10.5(9-12)	46 (40-55)	9 (7-11)	5.5(4.7-8)	24 (20-30)	8 (5-10)

Crecimiento tomado a las 72 h de incubación en oscuridad. Entre paréntesis figura el radio mínimo y máximo del crecimiento, en milímetros.

2.3.2.2. *Drechslera teres*

Los aislamientos A y C presentaron características culturales típicas. El micelio inicialmente fue de color gris, entre gris oscuro “Mouse Grey” y gris claro “Pale Mouse Grey” desarrollando cerca del borde formaciones blancas similares a penachos (*tufts*) (Figura 6 a, b). El aislamiento *D. teres* M., presentó micelio albino con sectores de pigmentación de color rojo-anaranjado desde el centro hacia la periferia (Figura 6 c).

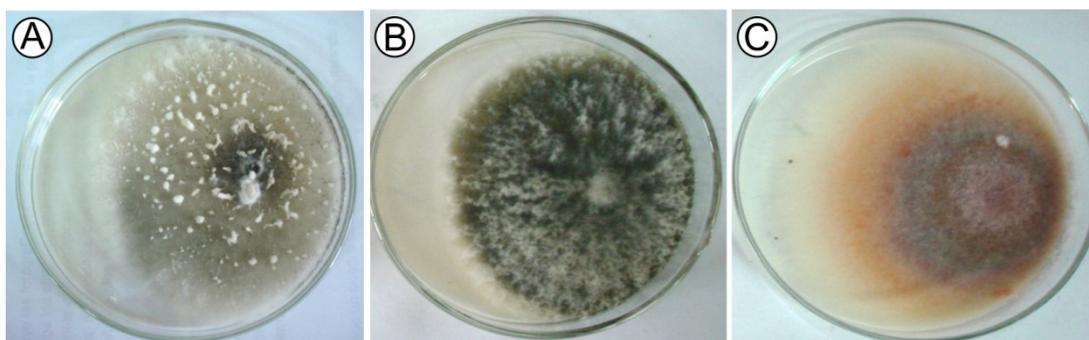


Figura 6: Características culturales de *D. teres*. Aislamientos *D. teres* A (A), *D. teres* C (B) y *D. teres* M (C).

Los conidios de los tres aislamientos presentaron un rango de colores de amarillento a marrón oliváceo, forma cilíndrica, con bordes rectos y redondeados en los extremos y de 2 a 5 pseudoseptos (Figura 7). Sus dimensiones se presentan en la Tabla 8. Las medidas del diámetro de crecimiento de las tres colonias fueron cercanas a los 40 mm a los tres días de incubación en APG, llegando a cubrir la superficie de las placas de Petri a los 6 días (Tabla 8).

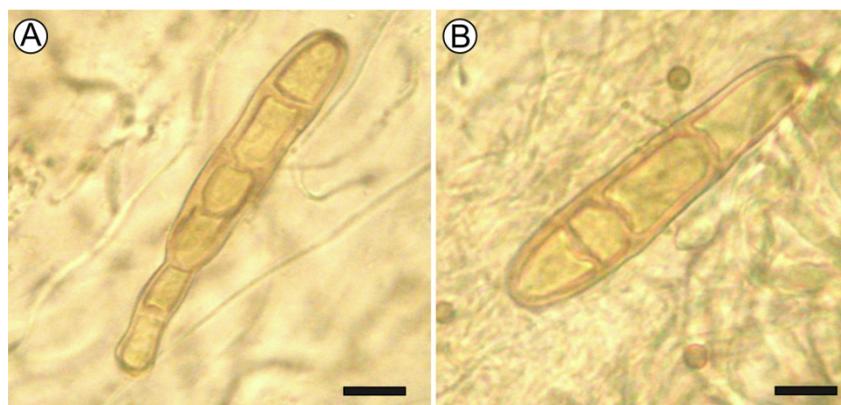


Figura 7: Conidios de *D. teres* C. Escala: 15  $\mu$ m.

Tabla 8: Crecimiento promedio y mínimas-máximas del diámetro de las colonias (mm) y largo y ancho ( $\mu\text{m}$ ) de los conidios de los tres aislamientos *D. teres*

Aislamiento	Crecimiento promedio (mm)		Medida de conidios ( $\mu\text{m}$ )	
	3 d	6 d	Largo	Ancho
<i>D. teres</i> A	40.0 (30-50.5)	80.5 (70-90)	65 (40-80)	19.5 (14-22)
<i>D. teres</i> C	30.8 (30-50.2)	80.6 (70.3-90)	48 (36-70)	18.7 (12-21)
<i>D. teres</i> M	30.6 (20.8- 50)	80.2 (70.5-90)	58 (36-72)	14.4 (12-18)

### 2.3.3. Identificación molecular

#### 2.3.3.1. *Trichoderma* spp.

Los aislamientos T2, T3, T4, T7, T8, T9 y T10, fueron ingresados en la base de datos del GenBank bajo los números de acceso KX572905.1, KX572906.1, KX572907.1, KX572908.1, KX572909.1, KX572910.1 y KX572911.1, respectivamente. El análisis de máxima verosimilitud (Maximun Likelihood) basado en el tef1 de los mismos, mostró que se agruparon en un mismo clado junto a *Trichoderma harzianum* (AF348100.1 y AF348101.1) y a *Hypocrea lixii* (EU279989.1) con un valor de *bootstrap* de 91%. Por otro lado el aislamiento T0 (KX572904) se agrupó con *T. longibrachiatum* (DQ297069.1) mediante un valor de *bootstrap* de 97 %. El árbol consenso de máxima verosimilitud, se muestra en la figura 8. Todos los aislamientos se encuentran precedidos por sus respectivos números de acceso a la base de datos del GenBank.

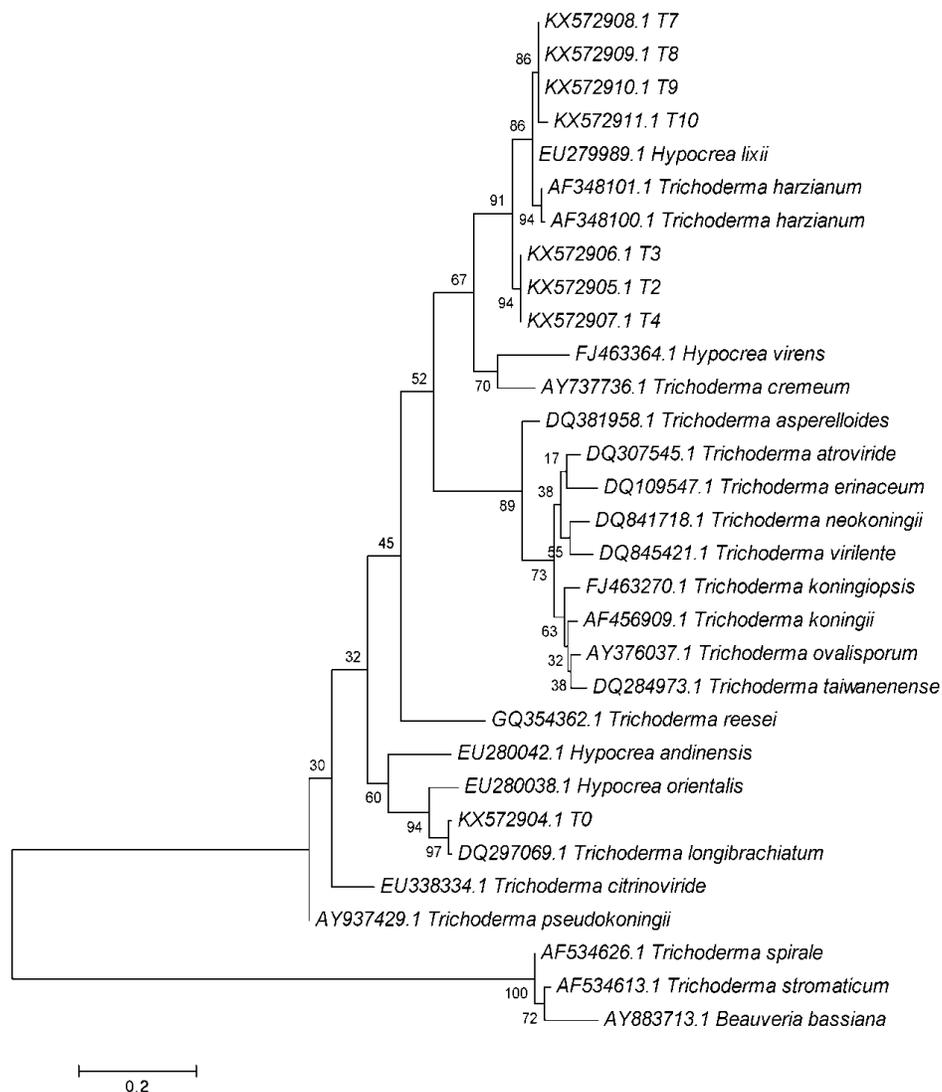


Figura 8: Árbol consenso de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood) basado en el *tef1* de los aislamientos de *Trichoderma* spp. T0, T2, T3, T4, T7, T8, T9 y T10, y de 22 secuencias de referencia correspondientes a diferentes especies de *Trichoderma/Hypocrea*. La barra en la parte inferior indica el número de sustituciones por sitio.

2.3.3.2. *Drechslera teres*

Los aislamientos *D. teres* M. (DtLPS1) y *D. teres* A (DtLPS2) fueron ingresados en la base de datos del GenBank bajo los números de acceso KF656728.1 y KF656729.1 respectivamente. El análisis de secuencias del ITS agrupó a los aislamientos dentro del clado *Drechslera teres* con un valor de *bootstrap* de 96%. El árbol consenso de máxima verosimilitud se muestra en la figura 9. Los aislamientos se encuentran precedidos por sus respectivos números de acceso a la base de datos del GenBank.



Figura 9: Árbol consenso de máxima verosimilitud basado en el ITS de los aislamientos *D. teres* M (DtLPS1) y *D. teres* A (DtLPS2) y de 30 secuencias de referencia correspondientes a diferentes especies de *Drechslera/Pyrenophora*. La barra en la parte inferior indica el número de sustituciones por sitio.

## 2.4. Discusión

En el estudio de las enfermedades de interés agrícola, la correcta identificación de los organismos fitopatógenos es de gran importancia para el establecimiento de medidas de prevención y manejo. También lo es la correcta identificación de especies para su uso como agentes de biocontrol, ya que su práctica implica la liberación de cantidades significativas de biomasa al medio y es crucial conocer su comportamiento y posibles interacciones con otros microorganismos y el hombre.

Los aislamientos de *D. teres* analizados en este trabajo presentaron características morfoculturales, así como la forma y color de los conidios, similares a lo encontrado por Sivanesan (1987). En los tres aislamientos se observó el micelio vegetativo vesicular en ciertos segmentos como lo describe Drechsler (1923) para esta especie. Si bien está citado en la literatura que *D. teres* esporula en cadena (catenulación) (Kenneth, 1962) esto no fue observado en nuestros aislamientos. Las medidas de los conidios se encontraron entre los límites inferiores citados por Sivanesan (1987), siendo las medidas del largo algo menores. Según Kenneth (1962) existe una gran versatilidad en este carácter dependiendo del aislamiento, las condiciones de cultivo y probablemente una tendencia innata hacia la variabilidad dentro de cada uno de ellos. Este autor afirma que el largo de los conidios es mayor cuando éstos provienen directamente a partir de las lesiones presentes en los hospedantes que si son medidos desde una lesión en cámara húmeda o en medio de cultivo. Este autor junto con Shoemaker (en comunicación personal) afirma que las medidas del ancho de los conidios son más constantes que las del largo, especialmente si el material fue incubado antes de medirlo.

La selección de los dos aislamientos del fitopatógeno para el análisis filogenético se realizó en base a las diferencias culturales que ambos evidenciaban, en particular aquellas relacionadas con la coloración del micelio y la producción de pigmentos. Uno de los aislamientos se caracterizó por presentar micelio típico gris oscuro con *tufts* y el otro, por desarrollar una colonia albina con abundante pigmentación rojo-anaranjada. El análisis filogenético del ITS de ambos aislamientos, los agrupó en el taxón *D. teres*, reflejando de este modo la variabilidad morfocultural que se puede encontrar en este microorganismo.

Varios investigadores (Williams *et al.*, 2001; Leisova *et al.*, 2005; Keiper *et al.*, 2008) han desarrollado sets de *primers* capaces de diferenciar las dos formas de *D. teres* (*maculata* y *teres*) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos han sido obtenidos por la ampliación de fragmentos de longitud variable (AFLP), marcadores polimórficos amplificados al azar (RADP) y marcadores microsátélites. De acuerdo a la bibliografía consultada, no es posible diferenciar solo morfológicamente las dos formas presentes en *D. teres* y serían necesarios otros estudios moleculares con *primers* específicos (Williams *et al.*, 2001). Sin embargo teniendo en cuenta que nuestros aislamientos fueron obtenidos a partir de semillas y de hojas con el síntoma típico, podemos asumir que todos ellos pertenecen a *D. teres* f. *teres*. Esta aproximación se sustenta en la falta de registros bibliográficos que evidencian la transmisión de *D. teres* f. *maculata* a través de la semilla (Leisova *et al.*, 2005; Mc Lean *et al.*, 2009).

Se conoce que los hongos en general producen melaninas que les confieren propiedades de resistencia ante factores de estrés ambiental, como la energía radiante, pérdida de agua y temperaturas extremas (Bell & Wheeler, 1986; Butler & Day, 1998). Las melaninas son polímeros complejos sintetizados por la polimerización de compuestos de tipo indol o fenol (Langfelder *et al.*, 2003). Dependiendo de los precursores que dan origen a estos polímeros se han descrito varios tipos, entre ellas las alomelaninas (DHN) que son las que se encuentran en el phylum Ascomycota. La síntesis de alomelaninas involucra la utilización de iones metales, aminoácidos, proteínas y diferentes derivados fenólicos incluyendo antraquinonas (Bell & Wheeler, 1986; Caesar-Tonthat *et al.*, 1995; Butler & Day, 1998) En relación a esto y de acuerdo con Wakulinsky *et al.* (2003) la pigmentación rojo-anaranjada observada en el aislamiento *D. teres* M podría deberse a que este aislamiento metaboliza y adhiere antraquinonas a su propia síntesis de melaninas y en consecuencia no las liberaría.

Debido a que *Trichoderma* spp. presenta caracteres morfológicos convergentes, no es suficiente efectuar su identificación teniendo en cuenta solo un tipo de carácter. Por lo cual, en el presente trabajo, se han seguido los conceptos morfológico (MSC) y filogenético (PSC) (Mayden, 1997) de reconocimiento de especies para la identificación de los taxones.

Tanto la caracterización morfo-cultural, como el análisis filogenético de los aislamientos permitieron identificar y diferenciar dos grupos taxonómicos: *T. harzianum* (T2, T3, T4, T7, T8, T9 y T10) y *T. longibrachiatum* (T0) (Gams & Bisset, 1998; Chaverri & Samuels, 2004; Samuels, 2004).

En trabajos previos se ha podido determinar que la temperatura óptima de crecimiento para *Trichoderma* spp. está comprendida entre 25 y 35 °C, con excepciones en 20°C (Chaverri & Samuels, 2004; Jaklitsch *et al.*, 2006). Las tasas de crecimiento características para cada especie constituyen una herramienta útil a la hora de identificar nuevos aislamientos y en la toma de decisiones taxonómicas. En nuestro estudio la mayoría de los aislamientos de *T. harzianum*, exhibieron radios de crecimiento de 10 a 40 mm cuando fueron incubados durante 3 días en oscuridad a 35 °C. Estas observaciones coinciden con lo reportado por Chaverri & Samuels (2004) para *H. lixii/T. harzianum*. Estos mismos autores reportaron que *T. harzianum* comparte la habilidad de crecer a 35 °C con *T. agresivum* dentro del grupo que presenta ascosporas verdes.

La producción de pigmentos y olor característico son caracteres que presentan variabilidad dentro de este grupo, dependiendo del aislamiento. En nuestro estudio T2, T3, T4, T8 y T10 liberaron pigmentos al medio, variando del color amarillo pálido a marrón claro. Estas observaciones coinciden con lo reportado por Chaverri & Samuels (2004) quienes observaron pigmentación del amarillo-pálido a pardo o marrón rojizo dentro de *H. lixii/T. harzianum*. Esta variabilidad observada en la caracterización morfo-cultural de los aislamientos pertenecientes al grupo *T. harzianum*, responde a que *H. lixii / T. harzianum* es considerado un complejo de especies, dentro del cual existe una gran diversidad fenotípica y genotípica. En él conviven e interactúan organismos con diferentes historias evolutivas sin una estricta frontera genética entre ellos (Chaverri & Samuels, 2004; Druzhinina *et al.*, 2010). Actualmente para clarificar las relaciones filogenéticas dentro del grupo de especies *T. harzianum* se emplean varios marcadores y combinaciones de los mismos. Entre ellos se pueden citar: factor de elongación de la transcripción (Tef1), fragmentos de la subunidad II de la ARN polimerasa (rpb2), regiones de la calmodulina (cal1), el fragmento codificante de la quitinasa GH18 Gen (chi18-5) y el espaciador transcripto interno (ITS) (Druzhinina *et al.*, 2010). En nuestro estudio el análisis filogenético de los aislamientos se realizó utilizando solo el marcador Tef1, el cuál en

combinación con la caracterización morfocultural permitió separar los dos grupos taxonómicos. Sin embargo, deberán realizarse estudios posteriores empleando en conjunto varios marcadores y características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas para llegar a una correcta identificación de las especies dentro del complejo *T. harzianum*.

En nuestro estudio, el aislamiento T0 perteneciente a *T. longibrachiatum*, se distinguió de los demás tanto por la morfología de sus fiálides y conidios como por su elevada tasa de crecimiento (hasta 60 mm a 35 °C), coincidiendo con lo reportado por Samuels *et al.* (2012). Debido a la capacidad de *T. longibrachiatum* de crecer a temperaturas por encima de los 35 °C, esta especie se ha encontrado más comúnmente en regiones tropicales que en regiones templadas. Esta misma capacidad hace frecuente su aislamiento a partir de pacientes inmunocomprometidos (Samuels *et al.*, 2012).

El clado *T. longibrachiatum* es monofilético y sus miembros son muy bien conocidos como productores de enzimas celulolíticas, en particular la especie *T. reesei*. Así mismo, se los reconoce como causantes de infecciones oportunistas en el hombre y los animales y por su asociación con materiales de construcción húmedos (Klein & Eveleigh, 1998; Kuhls *et al.*, 1999; Thrane *et al.*, 2001; Kredics *et al.*, 2003). Específicamente *T. longibrachiatum* se ha reportado como micoparásito y potencial agente de control biológico (Sanchez *et al.*, 2007), aunque de acuerdo con Samuels *et al.* (2012) habría que tomar precauciones en su uso y modo de aplicación como agente de biocontrol, ya que posee la habilidad de crecer a la temperatura del cuerpo humano y puede significar un riesgo sanitario.

Debido a las interacciones negativas que puede haber con el uso de algunas especies de *Trichoderma* spp., es de suma importancia su correcta identificación, sobre todo en el caso de aplicaciones tecnológicas y en la búsqueda de agentes de biocontrol para ser aplicados y liberados al ambiente. Además de los casos clínicos encontrados con *T. longibrachiatum*, entre los efectos negativos reportados para el género se han mencionado la producción de micotoxinas en *T. reesei* como el ácido 3-nitropropiónico y ocratoxina (Blumenthal, 2004), inhibición en la germinación de esporas de micorrizas arbusculares por *T. pseudokoningii* (Martínez *et al.*, 2004) y efectos de algunas especies como *T. pleurotum*, *T. pleuroticola*, *T. agresivum*, *T. longibrachiatum*, *T. harzianum*, *T. asperellum* y *T. atroviridae* sobre hongos comestibles (Samuels *et al.*, 2002; Schuster & Schmoll, 2010).

## CAPÍTULO III

# EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD Y LOS MECANISMOS ANTAGÓNICOS DE *TRICHODERMA SPP.*, FRENTE A *DRECHSLERA TERES*

### 3.1. Introducción

El biocontrol de patógenos fúngicos involucra varios modos de acción, entre ellos se encuentran el micoparasitismo, la competencia, la antibiosis y la inducción de mecanismos de resistencia en las plantas (Elad, 1996, 2000).

El **micoparasitismo** es definido como un tipo de interacción biotrófica en la cual los microorganismos se benefician a expensas de hongos. Es una de las propiedades más desarrolladas en la familia Hypocreaceae y la capacidad de antagonizar, parasitar o incluso matar a otros hongos, es particularmente común en el género *Trichoderma* (Atasanova *et al.*, 2013).

A partir de la secuenciación de los genomas de *T. atroviridae* y *T. virens* y su comparación con el de otros organismos, se ha formulado la hipótesis de que las especies de *Trichoderma* spp. han evolucionado a partir de la condición de micotrofia, es decir creciendo como saprófitos sobre estructuras fúngicas, y del micoparasitismo, combinando ambos mecanismos frente a las oportunidades ambientales (Druzhinina *et al.*, 2011). Durante esta interacción, enzimas tales como quitinasas, celulasas y glucanasas disuelven las paredes fúngicas de sus hospedadores y penetran sus células. *Trichoderma* spp. puede detectar la presencia de otros hongos aún antes del contacto con ellos activando la expresión de genes específicos y produciendo diferentes tipos de enzimas antes y después del contacto (Seidl *et al.*, 2009). Así, en una sola etapa, en el proceso de micoparasitismo se pueden afectar más de 20 genes distintos en un complejo control de regulación. La mayoría de estos productos génicos actúan en sinergismo con otros durante el proceso de micoparasitismo, así las enzimas celulolíticas pueden actuar junto con los compuestos antibióticos para ejercer el control (Harman, 2000). Las proteasas liberadas por algunas especies de este género también cumplen un rol importante en el micoparasitismo, inactivando las enzimas producidas por los microorganismos patógenos, en el suelo o sobre la superficie de las hojas (Rodríguez-Kabana *et al.*, 1978; Elad & Kapat, 1999). A nivel microscópico, este mecanismo se puede visualizar sobre el patógeno de diferentes maneras: enrollamiento (*coiling*), vacuolización, plasmólisis, deformación de estructuras vegetativas

y reproductivas, entre otras (Chet & Inbar, 1994; Calistru *et al.*, 1997; Moya & Sisterna, 2012)

Se define como **competencia por nutrientes o espacio** al comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento y se produce cuando la utilización de éste por uno de ellos reduce la cantidad o espacio disponible para los demás. La competencia resulta efectiva, cuando por medio de ésta, el antagonista excluye al patógeno de su sitio de infección (Gullino, 1992) o cuando actúa disminuyendo la disponibilidad de nutrientes exógenos que necesitan los conidios del patógeno para su germinación previa a la infección (Blakeman, 1993). Las especies de *Trichoderma* spp. son altamente eficientes en la asimilación de hierro ya que secretan compuestos quelantes de este elemento (sideróforos) y detienen el crecimiento de otros microorganismos que no poseen esta capacidad (Chet & Inbar, 1994). También, esta interacción cumple un rol fundamental en la fase saprofítica de los patógenos, compitiendo por las fuentes de carbono y afectando su supervivencia. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características intrínsecas del agente de control biológico, como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo. También depende del tipo de suelo, pH, temperatura, humedad y microflora. Durante su interacción con otros microorganismos, las especies de *Trichoderma*, se encuentran mejor adaptadas a suelos ácidos. Algunas cepas de *T. harzianum* pueden controlar el pH externo para asegurar que los valores sean los óptimos para sus propias enzimas secretadas (McIntyre *et al.*, 2004). Por otro lado, los componentes bióticos del suelo pueden tener grandes efectos en la capacidad de biocontrol de *Trichoderma* spp. ya que cantidades significativas de biomasa microbiana pueden inducir cambios en su crecimiento y esporulación, generando un suelo fungistático y limitando su potencial antagónico (Vinale *et al.*, 2008b).

La **antibiosis** se produce durante las interacciones mediadas por compuestos difusibles, producidos por el agente biocontrolador, que inhiben el crecimiento de otros microorganismos (Benitez *et al.*, 2004). Los compuestos antibióticos se encuentran dentro de un grupo de metabolitos secundarios, los cuales poseen diferentes estructuras químicas y distinta actividad biológica, entre las que se incluyen supervivencia, competencia, simbiosis y transporte de metales, entre otras (Demain & Fang, 2000). Ghisalberti & Sivasithamparam (1991) propusieron tres categorías para estos compuestos químicos: a)

compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y la mayoría de los derivados isociánicos; b) compuestos solubles en agua y c) peptaiboles (oligopéptidos lineales de 12 a 22 aminoácidos, ricos en ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico, un amino alcohol C-terminal y un grupo acetilado N-terminal). Las estructuras químicas de este grupo de metabolitos secundarios, pueden sugerir dos modos diferentes de acción. Por un lado los compuestos de bajo peso molecular, volátiles, no polares, ejercerían un control a una distancia relativamente larga sobre la microbiota del suelo mientras que por el otro, los compuestos polares y peptaiboles actuarían en una distancia cercana a las hifas que lo producen (Vinale *et al.*, 2008 b). Entre las sustancias citadas con propiedades antibióticas y antifúngicas se encuentran las alquil pironas, isonitrilos, policétidos, peptaiboles, diquetopiperazinas, sesquiterpenos, pironas y esteroides (Howell, 1998). Diversos estudios muestran que los VOCs producidos por *Trichoderma* spp. fueron capaces de disminuir el crecimiento hifal de diferentes hongos en cultivo *in vitro*, así como de producir colonias con micelio albino y debilitar sus paredes (Calistru *et al.*, 1997; Moya & Sisterna, 2014; Sánchez *et al.*, 2015). Además existen antecedentes de que los VOCs de *Trichoderma* spp. fueron capaces de inhibir la síntesis de deoxi-nivalenol (DON) en *Fusarium graminearum* y *F. moniliforme* (Cooney *et al.*, 2001; El-Hasan *et al.*, 2008) y la producción de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* (Aguero *et al.*, 2008).

Se ha comprobado que la asociación directa de *Trichoderma* spp. con las raíces de las plantas, estimula los mecanismos de defensa de la misma (Yedidia *et al.*, 1999), generando resistencia contra una variedad de microorganismos fitopatógenos como también de nematodos (Harman *et al.*, 2004; Shores *et al.*, 2010). Esta **resistencia inducida** puede ser localizada o sistémica. Como consecuencia, la planta ejerce una respuesta mayor y más rápida ante el ataque de patógenos (Harman *et al.*, 2004). Esta respuesta incluye la secreción de peroxidasas, la síntesis de fitoalexinas, la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis o “PR”, la biosíntesis de compuestos terpénicos y el aumento de los niveles de los ácidos salicílico y jasmónico (Harman *et al.*, 2004; Howell, 2006; Shores *et al.*, 2010). El mecanismo de inducción de la resistencia en las plantas generado por *Trichoderma*, se ampliará con más detalle en el siguiente capítulo.

La acción de los metabolitos secundarios combinados con los demás mecanismos, como la competencia por los nutrientes y/o el espacio, el micoparasitismo con la producción de enzimas y la inducción de mecanismos de resistencia en las plantas, contribuyen al éxito de este género como antagonista de hongos fitopatógenos (Zeillinger & Schuhmacher, 2013). Dado que la primera etapa en toda investigación de biocontrol, se basa en el estudio de la interacción *in vitro* patógeno-antagonista, en el presente capítulo se plantean los siguientes objetivos:

- Evaluar la capacidad antagonica *in vitro* de diferentes aislamientos de *Trichoderma* spp. frente al patógeno *D. teres*.
- Analizar la interacción de ambos organismos *in vitro* e identificar los mecanismos biológicos y los procesos bioquímicos que intervienen en dicha interacción.
- Identificar la naturaleza de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) liberados en estas interacciones y analizar sus propiedades.

### 3.2. Materiales y métodos

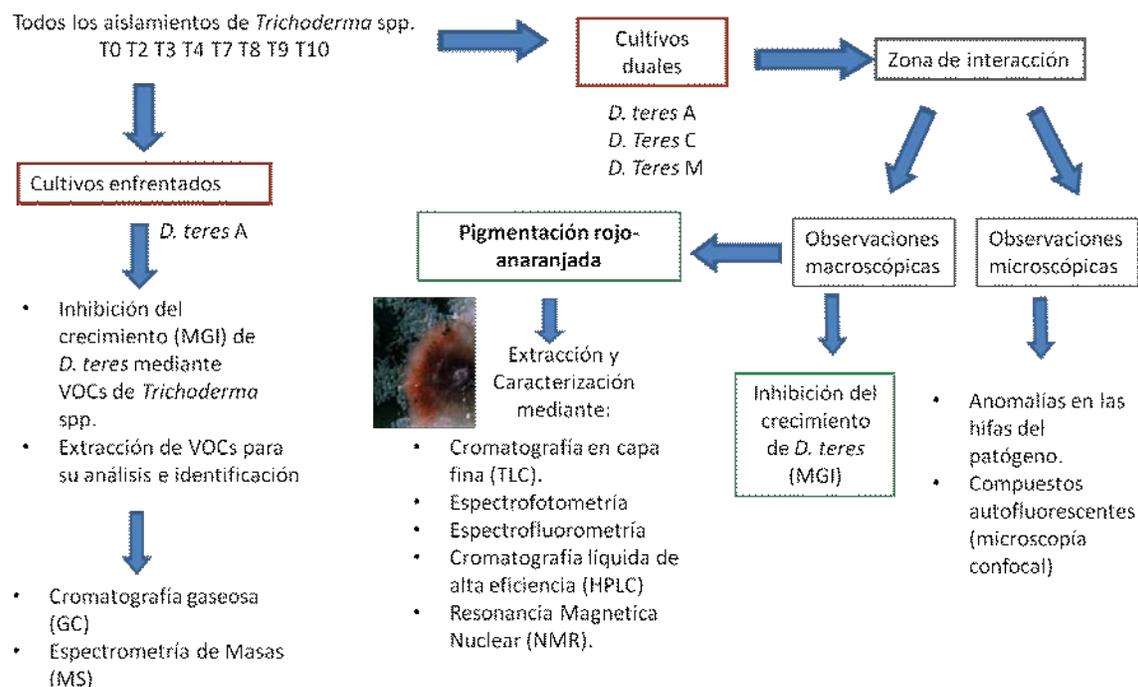


Diagrama de flujos de las metodologías empleadas en este capítulo.

### 3.2.1 Cultivos duales

Con el fin de seleccionar los mejores aislamientos de *Trichoderma* spp., se evaluó su potencial antagónico mediante la técnica del cultivo dual (Dal Bello *et al.*, 1994). Ésta consistió en colocar en placas de Petri, con 9 ml de medio de cultivo agar papa glucosado (APG), dos discos de 5 mm de diámetro: uno de *D. teres* y tres días después el de *Trichoderma* spp., ubicados a 4 cm de distancia uno del otro. Los testigos consistieron sólo en discos del patógeno. A los tres y seis días de sembrados ambos microorganismos, se midieron los diámetros de las colonias. La evaluación se realizó con los valores de los 6 días, tiempo en el que los testigos llegaron a su máximo crecimiento. Se calculó el porcentaje de inhibición micelial (MGI), mediante la fórmula utilizada por Michereff *et al.* (1994):

$$\text{MGI (\%)} = [(\text{MGC} - \text{MGT}) / \text{MGC}] \times 100$$

Donde MGC es la longitud media del crecimiento micelial testigo y MGT es la longitud media del crecimiento micelial tratado.

Se realizaron tres ensayos con los tres aislamientos de *D. teres* (A, C y M) confrontados con los ocho aislamientos de *Trichoderma* spp. (T0, T2, T3, T4, T7, T8, T9 y T10). El diseño experimental utilizado fue al azar con 4 réplicas por tratamiento. Los datos se analizaron por medio de ANOVA y Test de Múltiple Rango LSD Fisher utilizando el software Infostat versión 2011.

Complementariamente se realizaron observaciones microscópicas de la zona de interacción *D. teres-Trichoderma* spp. con el fin de detectar alteraciones en el micelio del patógeno, producto del micoparasitismo.

### 3.2.2. Microscopía confocal

Esta técnica fue utilizada con el objeto de detectar posibles componentes autofluorescentes asociados a la interacción *D. teres-Trichoderma* spp. Se sembraron ambos hongos en APG, por separado y confrontándolos en cultivo dual. Al término de una semana, se observaron al microscopio confocal (Leica, SP5) preparados de la zona de interacción y de cada uno de los microorganismos por separado. Se realizaron

observaciones en campo claro y en tres configuraciones de excitación/emisión: 488/670-730 nm, 488/500-550 nm y 543/580-620 nm.

### 3.2.3. Caracterización del pigmento originado por *D. teres* durante la interacción *in vitro* con *Trichoderma* spp.

Con el fin de conocer la naturaleza del pigmento anaranjado producido por el patógeno en la zona de exposición al antagonista, se confrontó un aislamiento de *D. teres* con *T. longibrachiatum* (T0), mediante la técnica del cultivo dual incluyendo testigos de *D. teres* como control. Se seleccionó este aislamiento de *Trichoderma* spp. ya que fue el que indujo mayor producción de pigmento en el patógeno. Para la extracción y purificación del pigmento se siguió la metodología citada en Wakuliński *et al.* (2003). En los cultivos duales, se obtuvo el micelio de la zona de interacción donde visualmente se concentraba el pigmento, mientras que en los testigos se utilizó todo el micelio. El mismo se secó a 60 °C durante 48 h en estufa. El pigmento se extrajo con 4ml de cloroformo, durante 24 h a temperatura ambiente y se filtró con papel de filtro (Whatman N°1) (Figura 1A). Mediante rotavapor se evaporó el cloroformo y el pigmento se resolubilizó con metanol (Figura 1B). Se efectuaron medidas de absorbancia en el espectro UV-visible (Shimadzu), en el rango de 200 a 500 nm. También se obtuvieron espectros de emisión mediante espectrofluorometría (RF-1501 Shimadzu). Con el fin de separar los pigmentos de acuerdo a su solubilidad/polaridad se realizó una cromatografía en capa fina (TLC) con el solvente de extracción TEF (tolueno, acetato de etilo y ácido fórmico 6:3:1) como se describe en Wakulinsky *et al.* (2003).

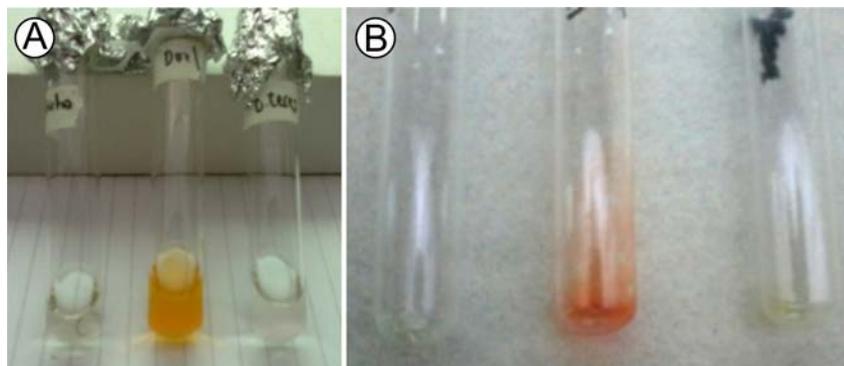


Figura 1: Extracción del pigmento de la zona de interacción *D. teres-Trichoderma sp.* A) De izquierda a derecha: control de *Trichoderma*, pigmento disuelto en cloroformo, control *D. teres*. B) Pigmento purificado luego de la evaporación del cloroformo (tubo ubicado en el centro de la imagen).

El espectro de emisión de los pigmentos obtenidos en el espectrofluorómetro se comparó con el obtenido en el microscopio confocal.

Para confirmar su naturaleza, los pigmentos encontrados en la interacción, se analizaron mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) y resonancia magnética nuclear (NMR). Esto se realizó en el Departamento de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear del Instituto de Química Orgánica de la Universidad de Heidelberg (Alemania), bajo la dirección del Dr. Jürgen Graf, durante una estadía de investigación en abril de 2016.

El análisis de HPLC se realizó con la muestra obtenida de la interacción patógeno-antagonista y con una muestra comercial estándar de 1,4,6,8-tetrahydroxy-3-metilntraquinona. Los componentes fueron separados en una columna C18 (125 x 4 mm, 5  $\mu$ m) isocrática en 40% agua + 0.1 % ácido trifluoroacético (TFA) y 60% acetonitrilo. Los picos fueron comparados con la muestra estándar comercial. El análisis por NMR en dimetilsulfóxido-  $d_6$  (DMSO- $d_6$ ) se realizó con el pico identificado como catenarina en ambas muestras y se compararon los espectros.

#### 3.2.4. Metabolitos volátiles

##### 3.2.4.1. Técnica de cultivos enfrentados

Para evaluar si los aislamientos de *Trichoderma* spp. generan sustancias volátiles que inhiben el crecimiento del patógeno, se utilizó la técnica de cultivos enfrentados de Dennis & Webster (1971). Esta consistió en tomar discos de micelio de 5 mm de diámetro del aislamiento *D. teres* A de 7 días de crecimiento, colocarlos en el centro de placas de Petri con 20 ml de APG e incubarlos a  $25 \pm 1$  °C en oscuridad. Luego de 72 h se los enfrentó con un disco de micelio de 5 mm de diámetro de cada uno de los 8 aislamientos de *Trichoderma* spp. colocados en la tapa de cada placa de Petri, conteniendo 20 ml de APG. Una vez que las placas fueron enfrentadas, se sellaron con parafilm y se incubaron a  $25 \pm 1$ °C durante 6 días. Los radios alcanzados por las colonias de *D. teres* fueron medidos a los 3 y a los 6 días de incubación. Se realizaron triplicados de cada uno de los aislamientos. El testigo consistió en enfrentar un disco de *D. teres* contra una placa de Petri sólo con APG. La evaluación se realizó con los valores de los 6 días, calculando el porcentaje de inhibición micelial (MGI), mediante la fórmula utilizada por Michereff *et al.* (1994).

Los datos se analizaron mediante un test no paramétrico Kruskal-Wallis, y su test de comparación de medias utilizando el software Infostat versión 2011.

#### 3.2.4.2. Extracción de VOCs

##### -Preparación de muestras

Para determinar la naturaleza de los VOCs liberados por los microorganismos solos y durante la confrontación se utilizaron dos metodologías diferentes. En ambas se sembró el mismo aislamiento de *D. teres* (A) que en el ensayo de cultivos enfrentados y tres de *Trichoderma* spp.: *T. longibrachiatum* (T0) y *T. harzianum* (T3 y T8) que habían mostrado diferentes porcentajes de inhibición en el crecimiento de *D. teres* para los cultivos duales y cultivos enfrentados.

La primer metodología se utilizó para efectuar la extracción de los VOCs a partir de cultivos monoespecíficos de *Trichoderma* spp. y *D. teres*. Cada uno fue sembrado en viales de vidrio de 3 cm de diámetro con medio de cultivo APG tapados con tapones de teflón. En

estas condiciones los microorganismos fueron incubados durante 6 días a  $23 \pm 1$  °C. Los VOCs se extrajeron al día 0 y al día 6.

La segunda metodología fue la técnica de los cultivos enfrentados. Esta se llevó a cabo para determinar si el perfil de los VOCs era el mismo cuando los microorganismos se cultivaban por separado, que cuando estaban juntos en una atmósfera común. En la Figura 2 se observa la preparación de las muestras y la metodología de extracción de VOCs, en cultivos monoespecíficos (A y B) y en cultivos enfrentados (C y D).

La extracción de los VOCs se realizó al día 0 y al día 6 de sembrados los aislamientos de *Trichodema* spp. Se incluyeron testigos que consistieron en placas con *D. teres* de un lado y en el lado opuesto medio de cultivo APG.

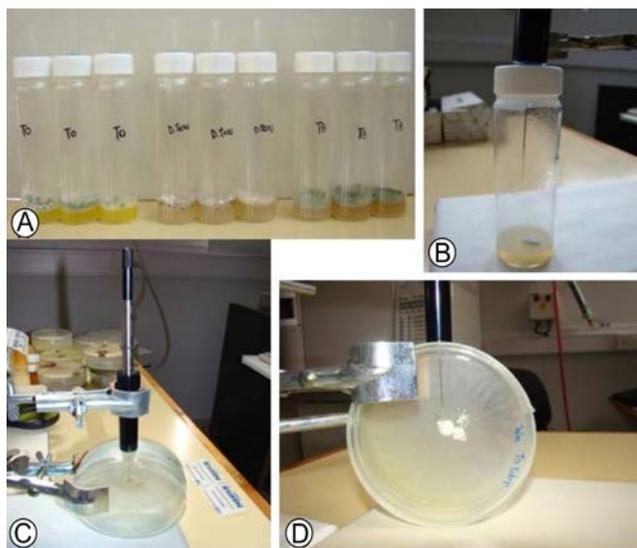


Figura 2: Preparación de muestras y metodología de extracción de VOCs. A y B: cultivos monoespecíficos. C y D: cultivos enfrentados.

#### -Extracción

La extracción de los VOCs se efectuó mediante la técnica espacio de cabeza (HS) con fibras de microextracción en fase sólida (SPME). Mientras que el análisis de los mismos se realizó mediante cromatografía gaseosa (CG) y espectrometría de masas (MS).

Tanto para la técnica empleada para los cultivos monoespecíficos, como para los cultivos enfrentados, los VOCs fueron muestreados por HS-SPME durante 30 minutos utilizando

fibras de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS / DVB) de 65  $\mu\text{m}$  de grosor (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Las fibras fueron acondicionadas de acuerdo a las instrucciones de manufactura y reacondicionadas antes de cada análisis.

Los análisis se realizaron utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 provisto de una columna capilar no polar DB-5 (30 m de longitud, 0,32 mm de diámetro y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de película) (J&W, Folsom, CA, USA). El inyector fue operado en el modo *splitless* a 250 °C, la temperatura del horno se programó (40 °C durante 2 min, 10°C / min a 200 °C, 15 °C / min a 250 °C, con un tiempo de retención de 5 min a la temperatura final). La temperatura del detector de ionización de llama (FID) se fijó en 280 °C.

El análisis de los VOCs se realizó acoplando un detector selectivo de masas (MS) (HP 5975C VL Agilent) al cromatógrafo gaseoso (CG). El MS se fijó en el modo de impacto electrónico y operó a 70 eV, con la línea de transferencia a 320 °C, la cámara de ionización a 230 °C y el cuadrupolo a 150 °C. Los VOCs fueron identificados tentativamente por la interpretación del espectro de fragmentación de masas, los espectros también se compararon con los datos de las bibliotecas de espectros de MS (NIST/EPA/NIH 2005; Adams, 2007) y también con el espectro y el índice de retención Kovats (KI) (Kovats, 1965) cuyos valores fueron previamente reportados por Stoppacher *et al.* (2010); Siddiquee (2014). Los valores de KI fueron calculados después del análisis de C6-C22 series n-alkano (Supelco) bajo las mismas condiciones cromatográficas.

Las medidas de cuantificación de los VOCs se determinaron mediante el cálculo del área bajo la curva cromatográfica.

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Cultivos duales

Todos los aislamientos de *Trichoderma* spp. inhibieron el crecimiento micelial de *D. teres* en cultivo dual en un rango de valores del 18% al 54% respecto al testigo (Tabla 1 y Figura 3, 4 y 5). Registrándose diferencias significativas en su capacidad de inhibir el crecimiento de los diferentes aislamientos del patógeno, siendo para *D. teres* A (F: 8,53; gl 7, p= 0,0002); *D. teres* C (F: 5,29, gl 7 p= 0,00020) y *D. teres* M (F: 12,66 gl 7 p=0,0001).

Para los 3 aislamientos de *D. teres*, *T. harzianum* (T3) fue el que mejor se comportó, presentando un rango de valores de MGI de 39% a 54%, respecto al testigo. El aislamiento *T. harzianum* (T8) presentó los valores más bajos para *D. teres* A y C, pero tuvo el segundo valor más alto para *D. teres* M. El aislamiento *T. harzianum* (T7) tuvo altos porcentajes de MGI para *D. teres* C y M y fue el tercero que mejor controló a *D. teres* M. Los restantes aislamientos, en general evidenciaron un mayor porcentaje de MGI para *D. teres* A y C que para *D. teres* M.

En todos los ensayos de cultivos duales, se presentaron diferentes velocidades de crecimiento y estrategias de antagonismo de *Trichoderma* spp.

Además, sobre *D. teres* y en la zona de contacto con *Trichoderma* spp., se observaron macroscópicamente diferentes coloraciones rojo-anaranjadas, distintas a las producidas típicamente por cada microorganismo en los cultivos monoespecíficos (Figura 3, 4 y 5). La zona pigmentada mostró un efecto fungistático contra el antagonista a partir del segundo día de la confrontación, que duró 2 o 3 días dependiendo del aislamiento de *Trichoderma* spp. probado.

Al día 6, los aislamientos de *T. harzianum* T2, T3 y T4 rodearon a *D. teres* en las zonas donde aún no se había producido el pigmento y cubrieron la mitad de las colonias, esporulando sobre ellas. El aislamiento *T. harzianum* T9 las rodeó, comenzando a esporular en el borde de las mismas, mientras que *T. harzianum* T7, T8 y T10 comenzaron a rodearlas pero sin esporular sobre ellas. De manera diferencial *T. longibrachiatum* T0 creció hasta dejar un halo de inhibición de crecimiento frente a la zona pigmentada de *D. teres*, la rodeó por detrás y comenzó a esporular.

Tabla 1: Valores medios y error estándar de los porcentajes de inhibición micelial (MGI) de *D. teres* A, C y M en presencia de los aislamientos de *Trichoderma* spp. T0, T2, T3, T4, T7, T8, T9 y T10.

Tratamientos	<i>D. teres</i> A	<i>D. teres</i> C	<i>D. teres</i> M
T0	42,59 ± 2,83 bc	45,93 ± 1,85 bc	17,78 ± 2,73 a
T2	45,56 ± 2,83 bc	41,94 ± 1,6 b	26,48 ± 2,73 b
T3	55,55 ± 2,83 d	44,45 ± 1,6 b	39,11 ± 2,12 c
T4	47,04 ± 2,83 c	45,56 ± 1,85 b	21,67 ± 2,73 ab
T7	38,52 ± 2,83 b	45,19 ± 1,85 b	35 ± 1,93 c
T8	27,04 ± 2,83 a	36,30 ± 1,85 a	35,93 ± 2,73 c
T9	41,85 ± 2,83 bc	51,11 ± 1,85 c	18,44 ± 2,12 a
T10	37,41 ± 2,83 b	46,30 ± 1,85 bc	27,78 ± 2,73 b

Letras iguales, no presentan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test LSD-Fisher ( $P \leq 0.05$ ).

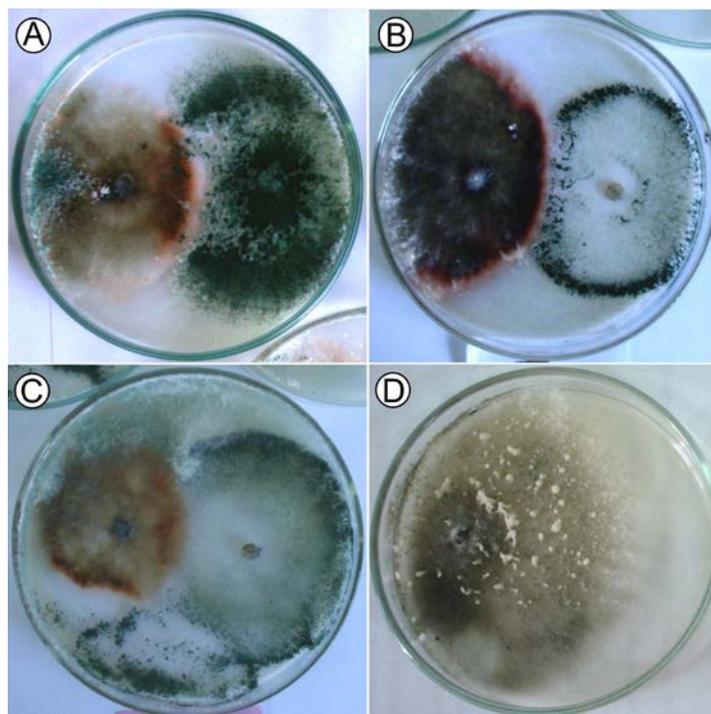


Figura 3: Cultivos duales enfrentando *D. teres* A con T0 (A), T7 (B) y T4 (C). Tratamiento testigo (D).

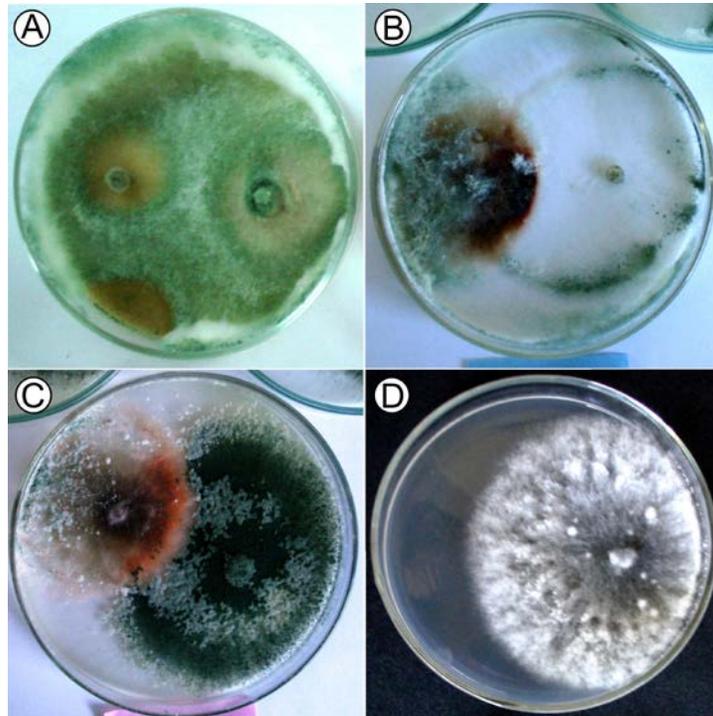


Figura 4: Cultivos duales enfrentando *D. teres* C con T3 (A), T2 (B) y T0 (C). Tratamiento testigo (D).

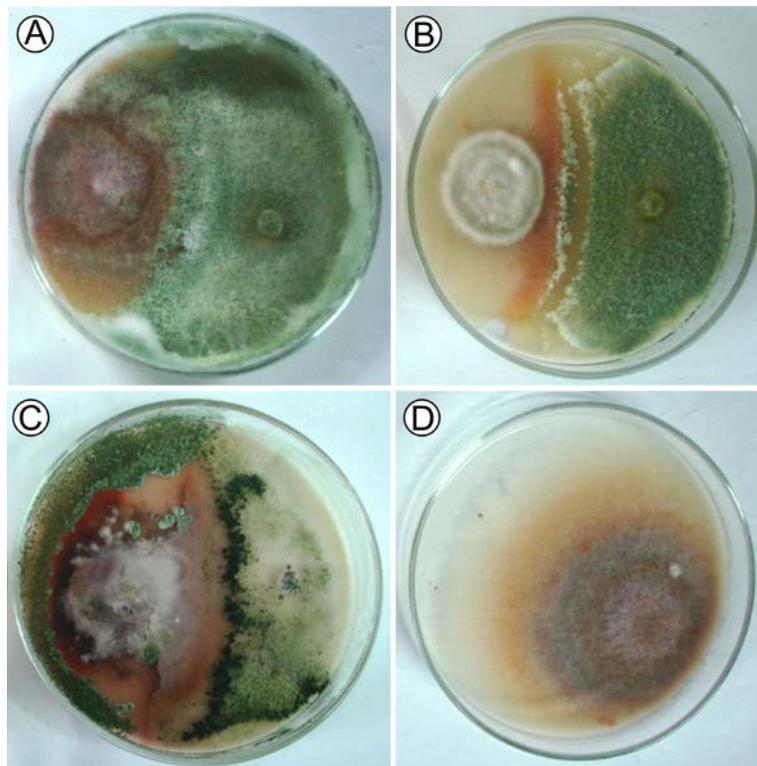


Figura 5: Cultivos duales enfrentando *D. teres* M con T3 (A), T8 (B) y T9 (C). Tratamiento testigo (D).

Observaciones microscópicas:

Los mecanismos antagónicos observados microscópicamente en la zona de interacción de los tres aislamientos de *D. teres* con los antagonistas fueron: micoparasitismo con enrollamiento (*coiling*) en las cultivos con *T. longibrachiatum* T0 y *T. harzianum* T3 (Figura 6 A y B), paredes delgadas sin pigmentación característica (hifas albinas) con *T. harzianum* T2, T4 y T7 (Figura 6 C), micelio vacuolizado (Figura 6 D) y micelio deformado con *T. harzianum* T8, T9 y T10.

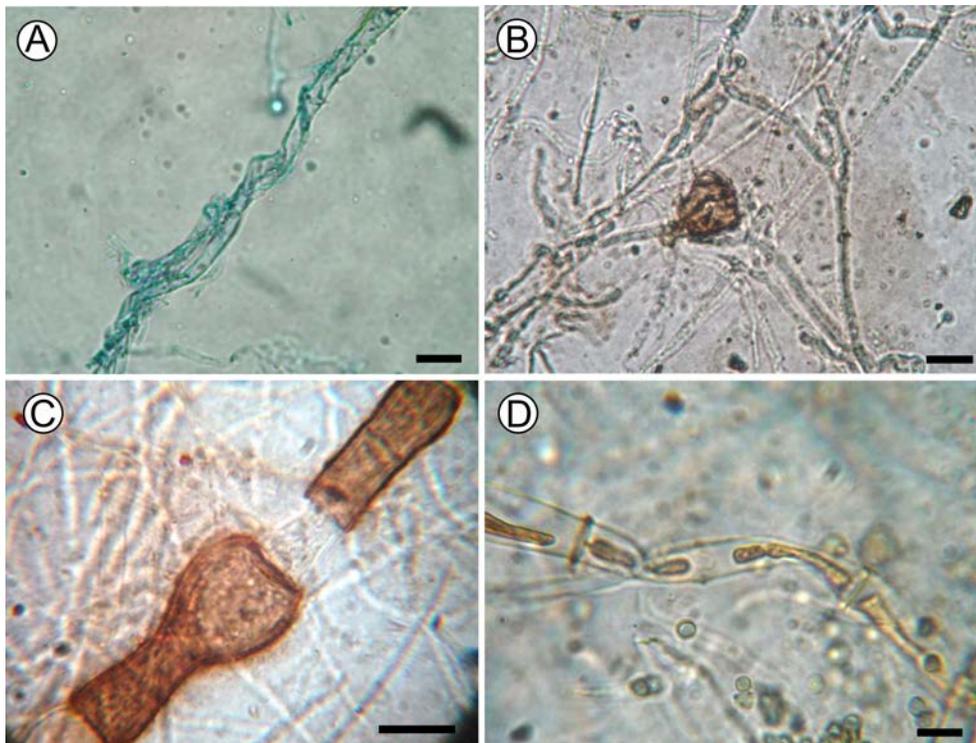


Figura 6: Mecanismos de antagonismo observados microscópicamente en la zona de interacción entre *D. teres* y el antagonista. A y B enrollamiento (*coiling*) de T3 sobre *D. teres*, escala: 30  $\mu\text{m}$ . C: paredes celulares de *D. teres* perdiendo pigmentación. D: micelio de *D. teres* vacuolizado, escala: 15  $\mu\text{m}$ .

3.3.2. Microscopía confocal

En la interacción patógeno-antagonista, se evidenció colocación completa de las tres señales de fluorescencia a 488, 514 y 543 nm (Figura 7), mientras que en el cultivo de T0 (*T. longibrachiatum*) sólo se observó fluorescencia en un solo canal de emisión/excitación (Figura 8). Por otro lado en el cultivo de *D. teres* no se registró ninguna señal (Figura 9). La colocación completa de las tres señales de fluorescencia en los cultivos duales, podría suponer la presencia de más de una sustancia autofluorescente, ya que en general los fluoróforos presentan un espectro de emisión determinada para cada excitación. La ausencia de dos de estas señales autofluorescentes en el cultivo de T0, sugiere una composición distinta a la presente en el cultivo dual.

En el análisis del espectro de emisión para las excitaciones probadas no se detectaron otras señales a las encontradas en las imágenes tomadas con la configuración 488/500-550, 488 /670-730 y 543 /580-620 nm. Esto indicaría que no existen otras sustancias además de las evidentes en los canales empleados.

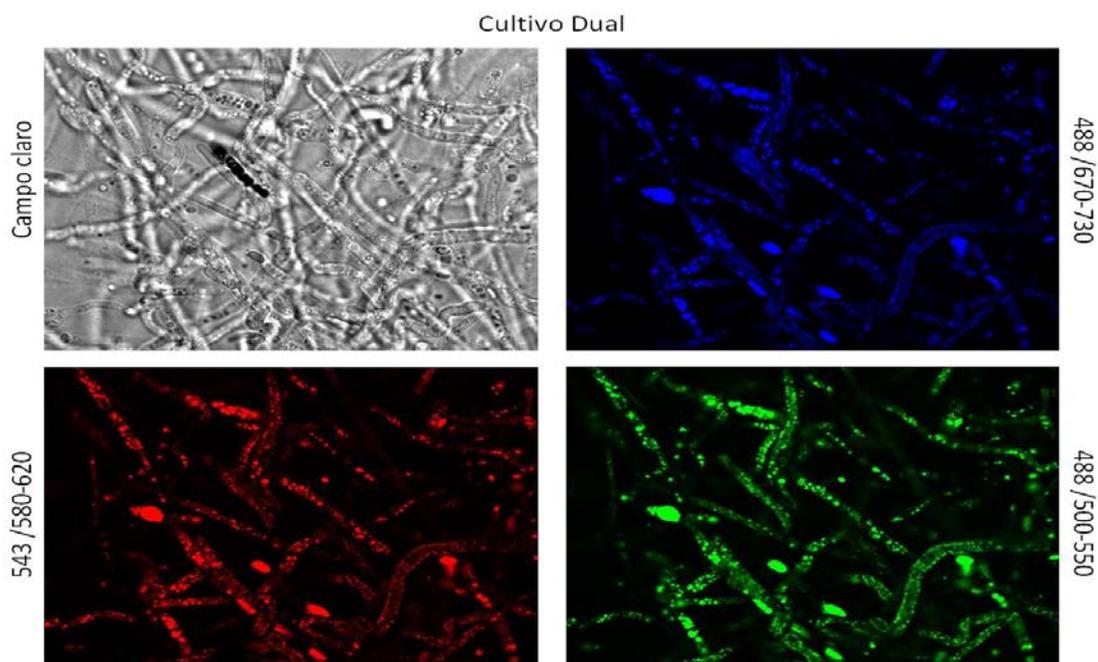


Figura 7: Autofluorescencia en vesículas citoplasmáticas del cultivo dual, observada en los tres canales excitación/emisión probados.

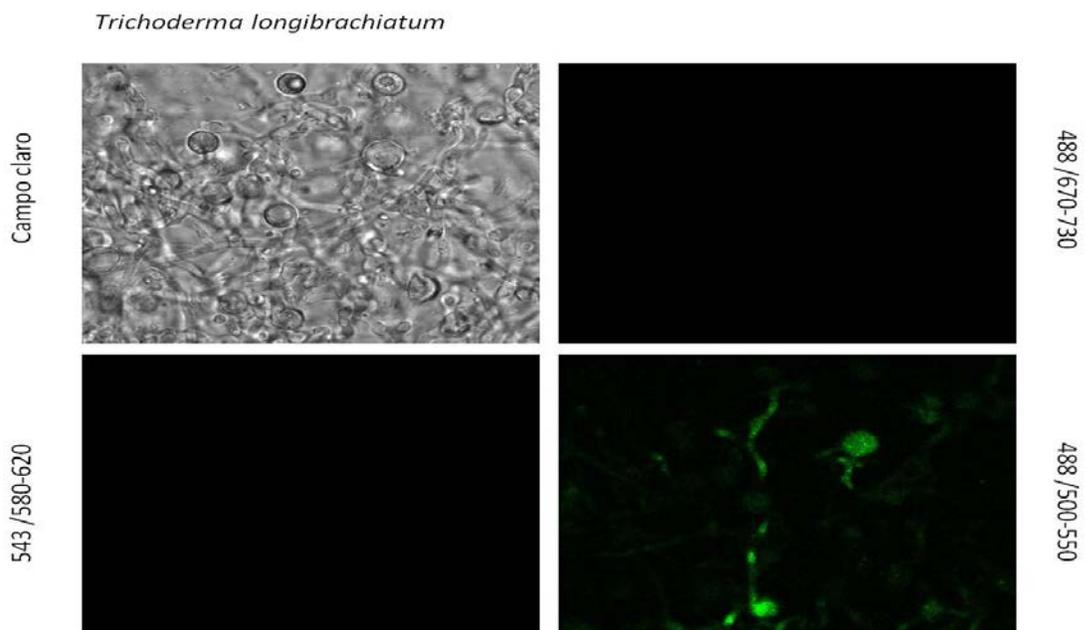


Figura 8: Autofluorescencia *en T0* (*T. longibrachiatum*) sólo con la configuración 488/500-550 nm.

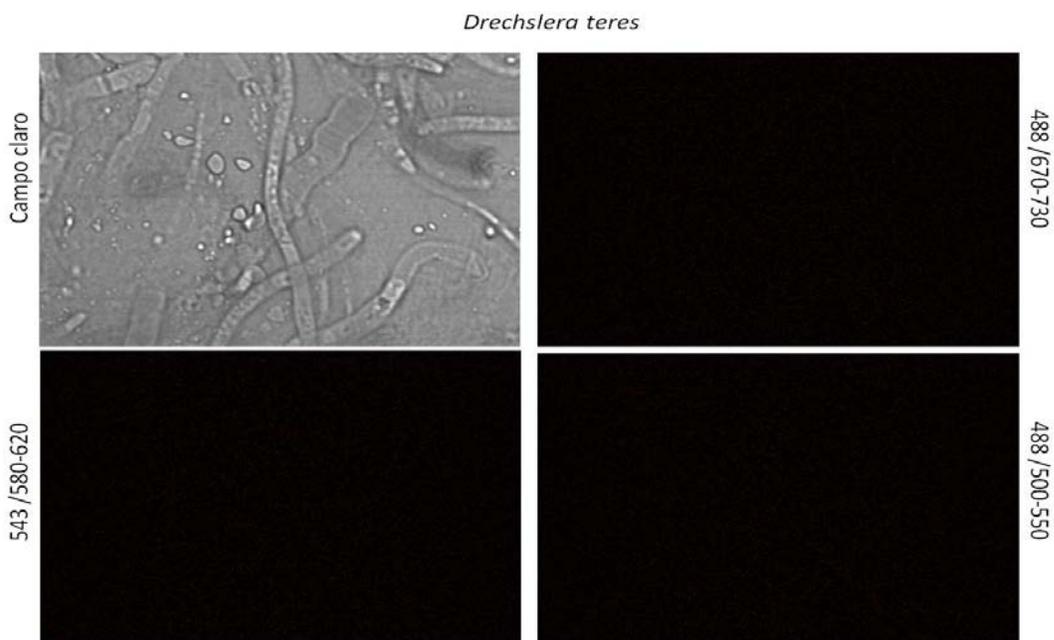


Figura 9: Ausencia de autofluorescencia en cultivos de *D. teres* ante todas las configuraciones empleadas.

### 3.3.3. Caracterización del pigmento

A partir de la extracción de la fracción liposoluble de la zona de interacción, se obtuvo un pigmento rojo-anaranjado, ausente en los cultivos monoespecíficos. Con el análisis del espectro UV- visible de este pigmento se obtuvieron 4 picos de absorbancia de 489, 279, 254 y 230 nm (Figura 10). El espectro de absorción del pigmento observado coincidió con el reportado por Wakuliński *et al.* (2003) para *Pyrenophora tritici- repentis*, atribuyendo este perfil a un tipo de catenarina.

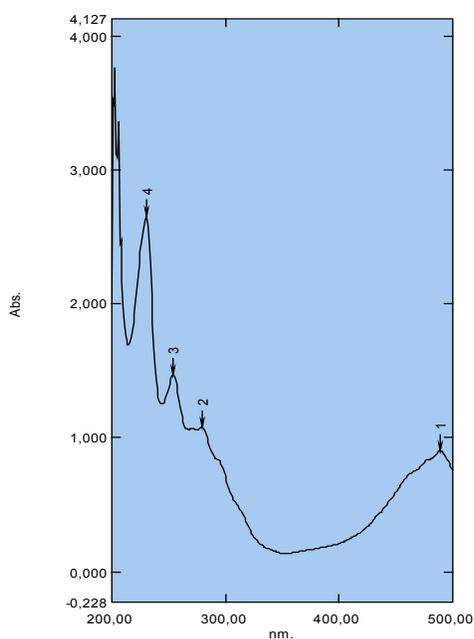


Figura 10: Espectro UV- visible del pigmento obtenido de la zona de interacción *D. teres*- T0.

Mediante la metodología de Cromatografía en Capa Fina (TLC), de la fracción liposoluble del pigmento de la zona de interacción, se obtuvieron tres bandas. Esto sugiere que al menos son tres los pigmentos observados (Figura 11).



Figura 11: TLC del pigmento obtenido en la zona de interacción de *D. teres*-T0. Se observa el patrón de bandas generado al sembrar la misma muestra en cuatro puntos de siembra.

Con el fin de determinar si los compuestos autofluorescentes presentes en *D. teres* en cultivo dual, tenían relación con los pigmentos extraídos de la zona de interacción, se procedió a registrar el espectro de emisión fluorescente del pigmento.

El espectro de emisión a 488 nm obtenido por microscopía confocal en las hifas de *D. teres* del cultivo dual, coincidió con el adquirido por espectrofluorometría del pigmento aislado (Figura 12). Esto indica que se tratarían de los mismos compuestos, es decir, que los pigmentos rojo-anaranjados extraídos de la zona de interacción serían los que están presentes en las vesículas citoplasmáticas de *D. teres*.

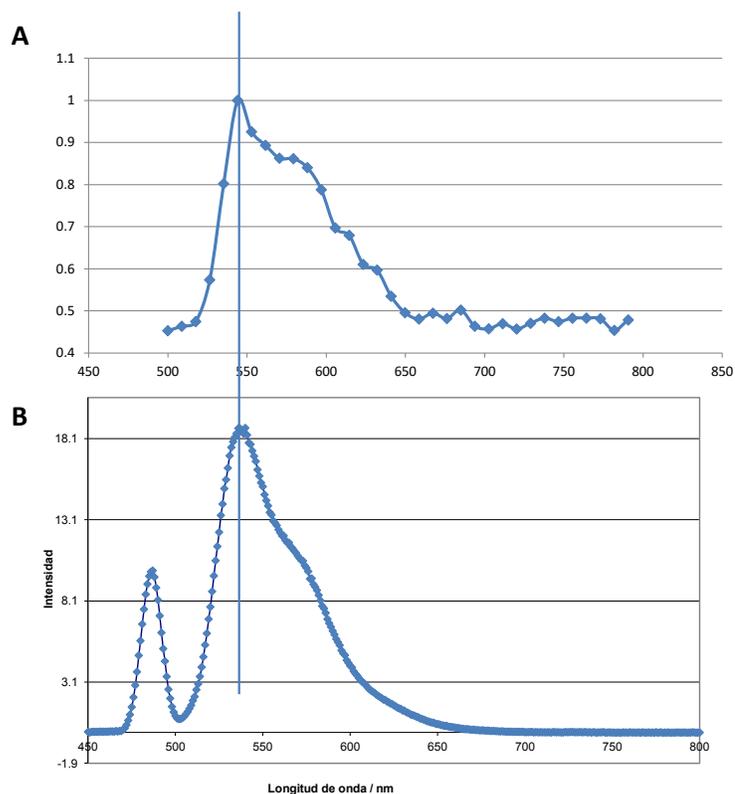


Figura 12: Comparación del espectro de emisión a 488 nm de la zona de interacción *D. teres*/*Trichoderma* spp. (A) Microscopía confocal del contenido en las vesículas de *D. teres*. (B) Espectrofluorometría del pigmento aislado.

A partir de los pigmentos extraídos de la zona de interacción, se procedió al análisis por HPLC y NMR para identificarlos. Los cromatogramas obtenidos por HPLC mostraron al menos cuatro picos claramente reconocibles (Figura 13). La comparación con el cromatograma del estándar de catenarina empleado (1,4,6,8-tetrahidroxi-3-metilantraquinona, FT66115, Carbosynth Limited) resultó ser muy similar al del pigmento obtenido de la zona de interacción (Figura 14). El principal compuesto presente en el estándar corresponde al tiempo de elución de 6,11 min, lo cual se correlaciona con el mayor pico encontrado en la muestra del pigmento.

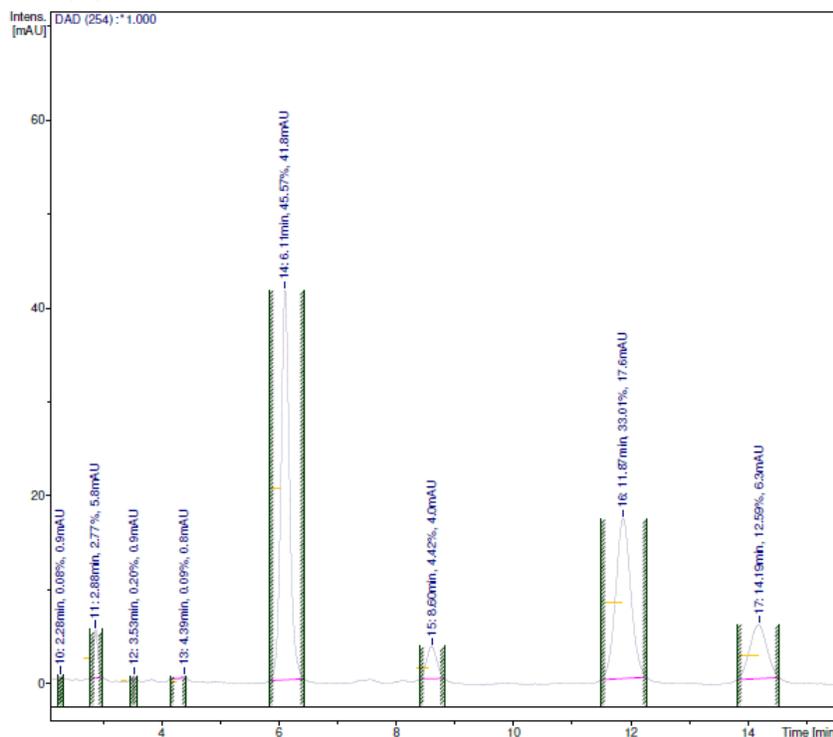


Figura 13: Cromatograma de HPLC obtenido de la zona de interacción *D. teres* -T0

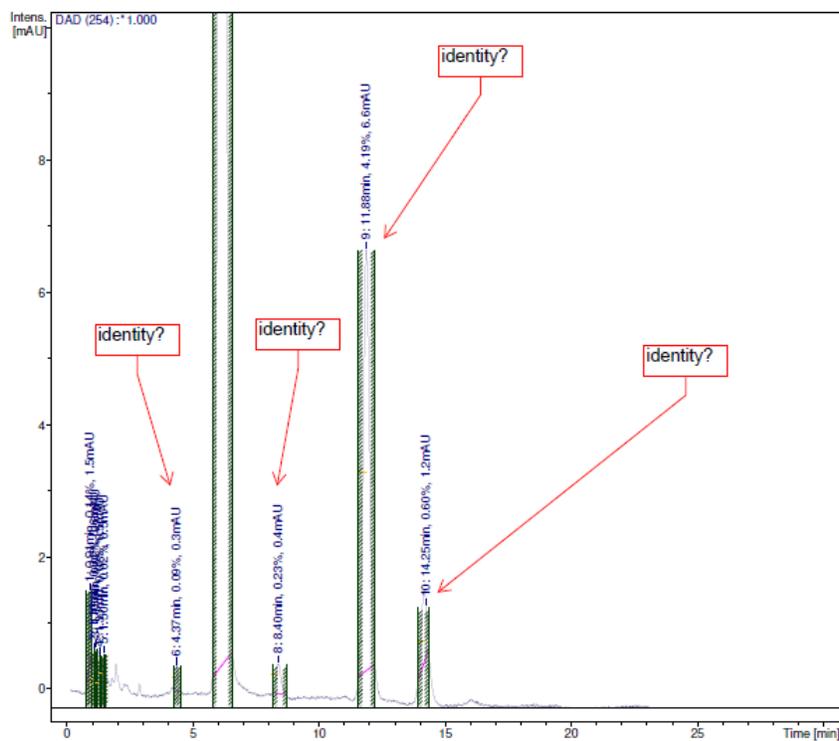


Figura 14: Cromatograma de HPLC de la muestra comercial 1,4,6,8 tetrahidroxi-3-metilntraquinona.

Se realizó un análisis de los espectros NMR para comparar la estructura del compuesto de mayor concentración (6,11 min) hallado en *D. teres*, con la muestra comercial. En esta comparación se encontró un alto grado de correspondencia estructural (Figura 15).

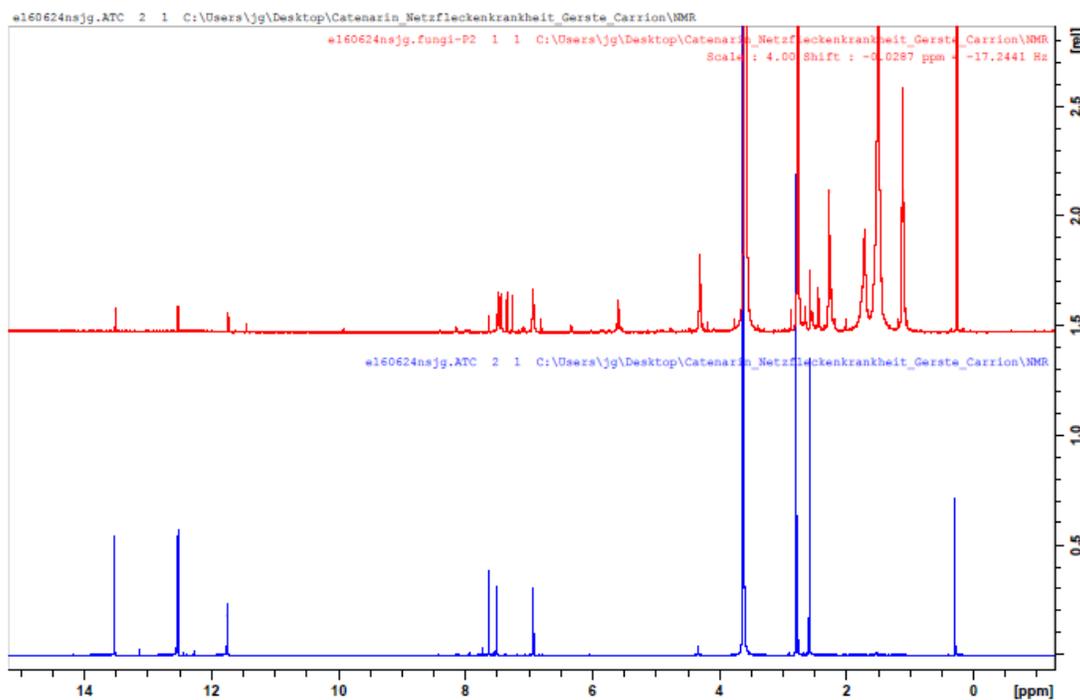


Figura 15: Espectro de NMR del pico identificado como catenarina. En rojo espectro de la muestra de la zona de interacción *D. teres*-T0, en azul espectro de la muestra comercial.

En el espectro del pigmento, también se detectaron picos que corresponderían a compuestos residuales provenientes de las precolumnas de C18. Estos resultados sugieren que el compuesto generado por *D. teres* en la zona de interacción podría ser 1,4,6,8-tetrahidrox-3-metilanthraquinona. Los demás compuestos separados por HPLC no alcanzaron la concentración suficiente, con la técnica hasta ahora empleada, para ser analizados por NMR.

3.3.4. Metabolitos volátiles:

3.3.4.1. Técnica de los cultivos enfrentados

Mediante la técnica de cultivos enfrentados se observó que todos los aislamientos de *Trichoderma* spp. probados ejercieron inhibición en el crecimiento del patógeno entre el 19% y el 38% respecto al testigo (H: 21,43 p= 0,0031) (Tabla 2 ). El aislamiento *T. harzianum* T3 fue el que presentó mayor porcentaje de MGI, coincidiendo con los resultados para cultivos duales. Luego, le siguieron *T. harzianum* T4, *T. longibrachiatum* T0, *T. harzianum* T9, T2, T8, T10 y por último *T. harzianum* T7, que fue el que mostró el menor porcentaje de MGI.

Tabla 2: Promedios de MGI y error estándar para los tratamientos con *Trichoderma* spp.

Tratamientos	Media MGI ± E.E.
T0	21,08 ± 2,3 bc
T2	19,25 ± 3,1 bc
T3	31,92 ± 1,3 c
T4	27,08 ± 1,4 c
T7	2,83 ± 1,2 a
T8	9,17 ± 1,1 ab
T9	20,33 ± 1,7 bc
T10	8,67 ± 0,7 ab

Letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas según el Test de Medias para una probabilidad de 0,05.

Macroscópicamente se observó que las colonias de *D. teres* que crecieron expuestas a los metabolitos volátiles de *Trichoderma* spp. mostraron albinización (Figuras 16 y 17).

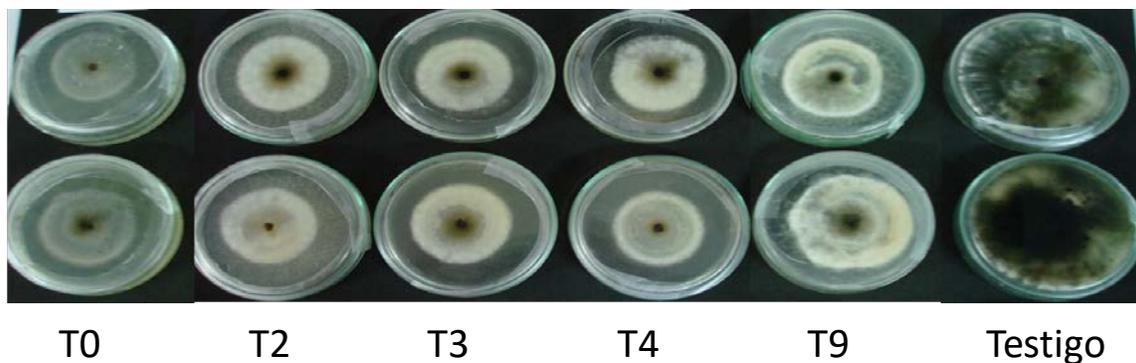


Figura 16: Aspecto de los cultivos de *D. teres* enfrentados con los distintos aislamientos de *Trichoderma* spp.

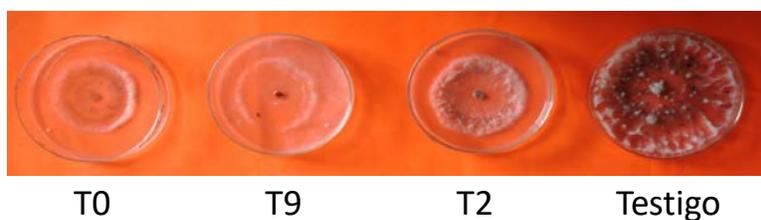


Figura 17. Detalle del micelio de *D. teres* en contacto con los volátiles de *Trichoderma* spp.

Las observaciones microscópicas de *D. teres* evidenciaron vacuolización, micelio debilitado y paredes muy finas con respecto a lo observado en los testigos (Figura 18).

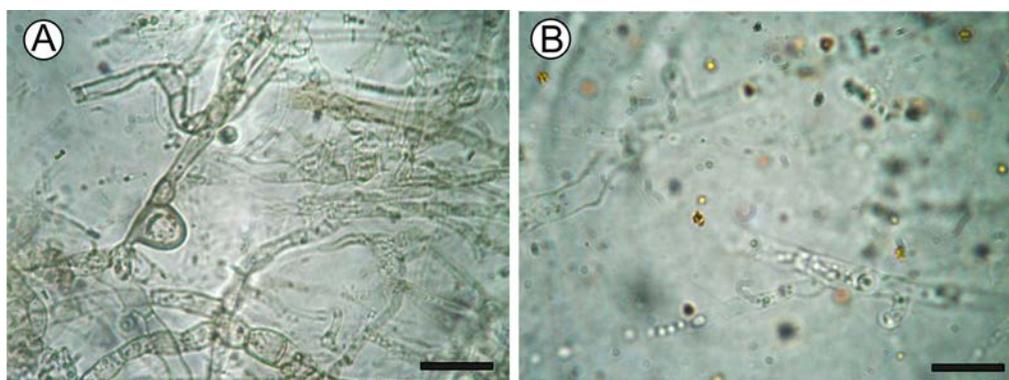


Figura 18: Efectos de los VOCs liberados por *Trichoderma* spp. A) Tratamiento testigo (*D. teres* A). B): micelio debilitado, sin coloración característica y vacuolización en las hifas de *D. teres* A. expuestas a los VOCs.

### 3.3.4.2. Extracción de los VOCs

Cuando se analizó el espectro CG-MS de VOCs de *D. teres*, se observaron bajos valores y perfiles poco reconocibles, que no aportaron información significativa.

Por otro lado, en los perfiles CG-MS de los VOCs liberados por los aislamientos de *Trichoderma* spp. (Gráfico 5), se observó que si bien *T. longibrachiatum* T0, *T. harzianum* T3 y T8 mostraron cierta variabilidad en la proporción de VOCs emitidos, los compuestos fueron similares en los tres aislamientos. Entre ellos se encontraban la 3-octanona, el 1-octen-3-ol y algunos sesquiterpenos, además T0 y T8 compartían compuestos como el 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol y 2-metil-1-butanol. La composición de los VOCs liberados por los 3 aislamientos de *Trichoderma* spp. (Tabla 3) fue similar a la encontrada en la confrontación de ellos con el patógeno. Sin embargo, algunos compuestos como los alcoholes liberados por el biocontrolador en cultivo monoespecífico, aparecieron como ésteres de ácido acético en los cultivos confrontados. Por este motivo, se necesitarán estudios complementarios además del análisis de VOCs, para corroborar si se producen cambios en rutas metabólicas cuando *Trichoderma* spp. se expone al patógeno.

Con respecto a la abundancia relativa de los VOCs liberados se evidenció que T0 produjo más que T3 y T8 y que *D. teres* tanto en el cultivo monoespecífico como en la confrontación con el patógeno (Tabla 4)

El análisis cualitativo de los espectros mostró que los principales grupos de compuestos encontrados fueron los sesquiterpenos, seguidos de diterpenos, terpenoides y compuestos de 8 carbonos.

Además se observó que la presencia de *D. teres* estimuló la producción de VOCs en los antagonistas. El aislamiento T0 generó 2.4 veces más VOCs en confrontación con el patógeno que cuando se lo cultivó solo. Lo mismo ocurrió con T3 (1.8 veces más) y con T8 (1 vez más) en confrontación con *D. teres*, comparado con lo liberado en cultivos monoespecíficos.

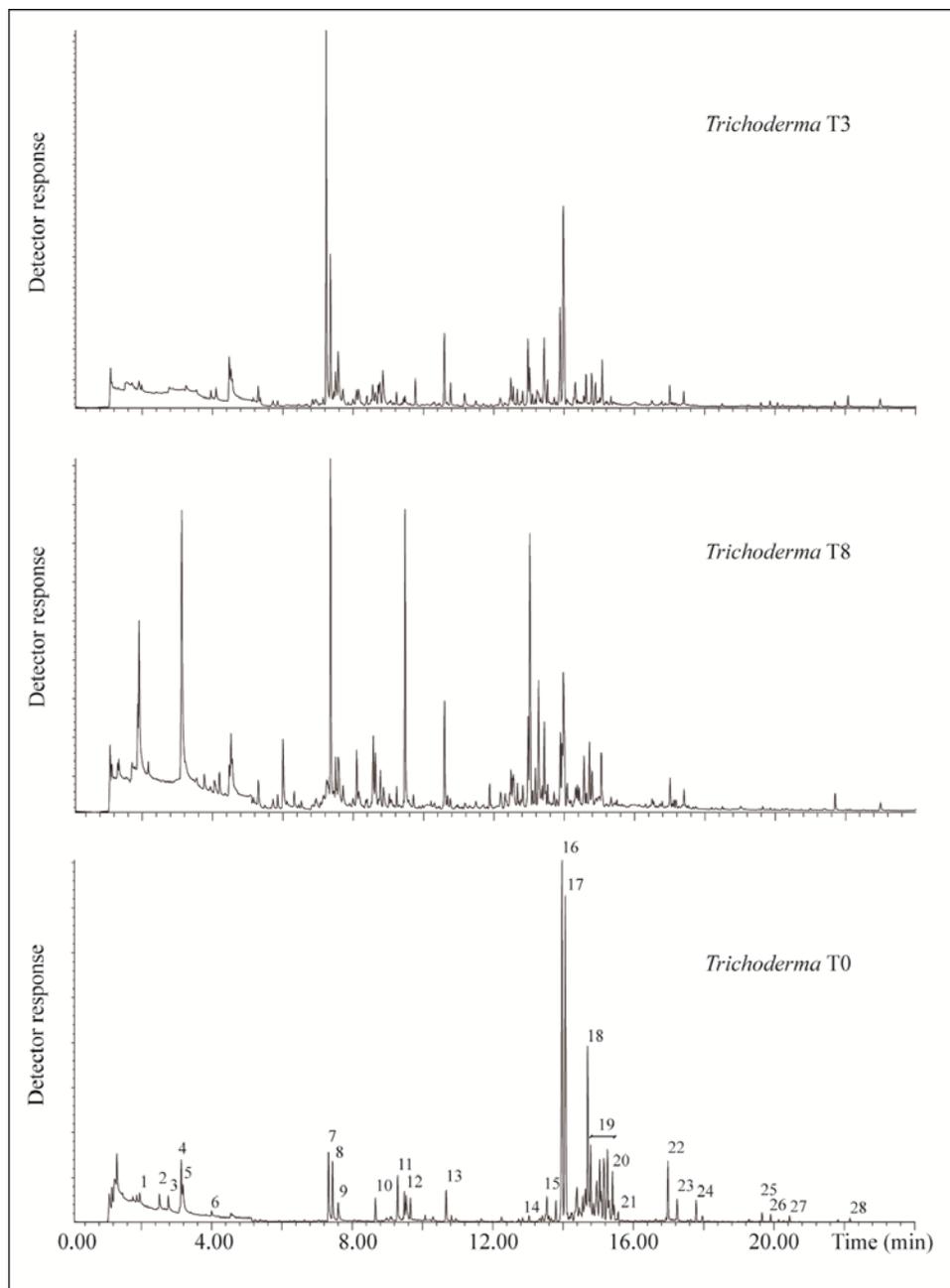


Grafico 5: Perfiles CG-MS de los VOCs liberados por los tres aislamientos de *Trichoderma* spp.

Tabla 3: Identificación de los VOCs liberados por *Trichoderma* spp. El número de picos corresponde al indicado en el perfil de T0 del gráfico 5. KI Kovats Index.

Número de pico	KI	Compuesto
1	613	2 - metil - 1 - propanol
2	659	2 - Pentenona
3	679	3 - Hidroxi - 2 - butanona
4	705	3 - metil - 1 - butanol
5	709	2 - metil - 1 - butanol
6	777	2,3-Butanodiol
7	975	1 - Octen - 3 - ol
8	985	3-Octenona
9	992	3 - Octanol
11	1100	Undecano
12	1112	2-Feniletanol
13	1186	Naftalina
14	1364	No identificado
15	1396	Alfa-Cedreno
16	1425	Acora-2,4-dieno
17	1431	Betha-Cedrene
18	1488	Acoradieno
19	1502	Alfa-Cuprenene
19	1504	Alfa bisaboleno
19	1508	Betha-bisaboleno
19	1525	Betha -Alaskeno
19	1532	Betha -Sesquiphellandreno
20	1546	Alfa-Longipineno
21	1569	Nerolidol
22	1683	Tricho-acorenol
23	1707	Acorenona
24	1757	No identificado
25	1984	Cembreno
26	2014	Verticiol
27	2045	No identificado
28	2383	Pimara - 7,15 - dien - 3 - ona

Tabla 4: Cantidad de VOCs emitidos por T0 en relación a lo que emite T3, T8 y *D. teres* A. cuando se encuentra solo (cultivo monoespecífico) y en cultivos enfrentados con *D. teres* A.

	T0 en relación a T3	T0 en relación a T8	T0 en relación a <i>D. teres</i>
Cultivos monoespecíficos	2	3,5	5
Cultivos enfrentados	5	7,9	-

### 3.4. Discusión

En las interacciones en cultivo dual para los aislamientos *T. harzianum* T2, T3 y T4, se observó sobrecrecimiento y supresividad, resultados similares a los reportados por Shalini *et al.* (2006) y Atasanova *et al.* (2013). Estos autores encontraron que *Trichoderma* spp. ejercía este mecanismo sobre *Rhizoctonia solani*, cubriendo con gran velocidad al patógeno y esporulando sobre él, expresando estrategias de depredación (muerte inmediata y consumición) y parasitismo. Atasanova *et al.* (2013) también registraron reacción neutral con signos de micoparasitismo débil de *T. reesei* contra *R. solani*, similar a lo encontrado en nuestro trabajo con los aislamientos *T. harzianum* T7, T8 y T10. La estrategia de antagonismo de *T. longibrachiatum* T0 coincidió con los resultados de Sreenivasaprasad & Manibhushanrao (1990), donde se evidenció una zona de inhibición de 3 a 4 mm de *T. longibrachiatum* contra *R. solani* y *Pythium aphanidermatum*, lo que sugiere la difusión de metabolitos fungistáticos no volátiles al medio.

Las observaciones microscópicas de las confrontaciones con los aislamientos *T. harzianum* T3 y *T. longibrachiatum* T0 mostraron signos de micoparasitismo por *coiling*, coincidiendo con las encontradas en la interacción entre *T. harzianum* - *Sclerotium rolfii* y *T. longibrachiatum* - *R. solani* (Elad *et al.*, 1983; Sreenivasaprasad & Manibhushanrao, 1990). También lo observado en los aislamientos T2, T4, T8, T9 y T10 fue similar a lo reportado por Sánchez *et al.* (2007), donde no registraron *coiling* pero sí la pérdida de la presión de turgencia de las hifas de *Thielaviopsis paradoxa* por *T. longibrachiatum*, lo que supone la liberación de enzimas celulolíticas y quitinolíticas por parte del antagonista.

El mayor componente de la pigmentación anaranjada observada en la zona de interacción de ambos microorganismos, se identificó como 1,4,6,8-tetrahidroxi-3-

metilantroquinona, que corresponde a una catenarina. Engstrom *et al.* (1993) determinaron la misma estructura química en los pigmentos liberados por *D. teres*, *D. graminea*, *D. tritici-repentis*, *D. phlei* y *D. dictyoides*, separando este compuesto de otros dos más, obtenidos de *D. avenae* y *Bipolaris sorokiniana* identificados como helmintosporin y cynodontin respectivamente. Se ha reportado que la catenarina posee propiedades antibióticas contra bacterias Gram-positivas (Engstrom *et al.*, 1993), e inhibitorias del crecimiento de varios hongos como *Epicoccum nigrum*, *Penicillium janczewinki*, *Gaeumannomyces graminis*, *Phaeosphaeria nodorum*, entre otros. Estos son representantes de especies comúnmente acompañantes de la fase saprofítica de *D. tritici-repentis*/*Pyrenophora tritici-repentis* (Wakuliński *et al.*, 2003; Bouras & Strelkov, 2008). Estos autores probaron también la eficiencia de este compuesto en el control del crecimiento de *T. harzianum*, aunque con muy baja efectividad. Estos resultados coinciden con los aquí encontrados, dado que el pigmento ejerció un efecto fungistático por un período muy breve, y pasado el mismo, no fue suficiente para inhibir el crecimiento de *Trichoderma* spp.

Nuestras observaciones constituyen el primer registro e identificación de 1,4,6,8-tetrahidroxi-3-metilantroquinona en *D. teres* durante la confrontación con *Trichoderma* spp., aportando un nuevo conocimiento en la caracterización de la interacción de dichos microorganismos, y un punto de partida para futuras investigaciones en el manejo de este patógeno.

La aplicación de la microscopía confocal demostró que el pigmento que produjo autofluorescencia en las vesículas citoplasmáticas de *D. teres*, es el mismo generado en la zona de interacción de ambos microorganismos. También a través de esta técnica se pudo corroborar que el pigmento autofluorescente solamente se forma en la interacción y que no es igual al que presenta *T. longibrachiatum* (T0), ya que la señal detectada fue distinta. La identificación de estos fluoróforos, podría permitir el estudio de la correlación entre la fluorescencia emitida por el patógeno, con su susceptibilidad al efecto de *Trichoderma* spp. y aportar información sobre la naturaleza de la interacción a nivel celular y bioquímico.

En la naturaleza, los VOCs liberados por *Trichoderma* spp. cumplen funciones de mediación en las interacciones entre el hongo y el medio ambiente circundante, incluyendo otros microorganismos y las raíces de las plantas (Wheatly, 2002). Estos compuestos

pueden ejercer efectos de promoción del crecimiento y generación de resistencia sistémica por parte de las plantas (Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008b) Los resultados obtenidos por la técnica de los cultivos enfrentados reveló que los VOCs liberados por los diferentes aislamientos de *Trichoderma* spp. inhibieron el crecimiento de *D. teres* e indujeron la producción de micelios albinos. Estos resultados coinciden con los encontrados por diversos autores en confrontación con *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *R. solani*, *Macrophomina phaseoli*, *Phytophthora cactorum* y *Aspergillus flavus*, (Calistru *et al.*, 1997; Hajieghrari *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2015). Las observaciones al microscopio óptico de los efectos de los VOCs de *Trichoderma* spp. sobre *D. teres*, mostraron hifas con paredes finas y sin melanina, al igual que lo observado en los cultivos duales con algunos aislamientos de *Trichoderma* spp. Se ha reportado que las melaninas le confieren a los hongos (especialmente dematiaceos) propiedades de resistencia ante factores de estrés ambiental, como la energía radiante, pérdida de agua y temperaturas extremas (Bell & Wheeler, 1986; Butler & Day, 1998). También están relacionadas con la virulencia y/o la patogénesis de muchos hongos (Jacobson, 2000). Una de sus principales funciones probablemente es proteger a las paredes celulares de la acción de enzimas hidrolíticas liberadas por el hospedante y por los microorganismos antagonistas (Bell & Wheeler, 1986; Jacobson, 2000). De esta manera, los VOCs de *Trichoderma* spp. actuarían debilitando las paredes celulares de *D. teres* para su posterior ataque con enzimas hidrolíticas. Además, los VOCs estarían afectando la supervivencia del patógeno dejándolo más susceptible a los estreses ambientales.

Los espectros CG-MS obtenidos para *Trichoderma* spp., si bien no fueron idénticos entre sí en cuanto a la abundancia de cada elemento, mostraron similitudes en su composición, presentando al menos tres grandes grupos de compuestos: los sesquiterpenos, los monoterpenos y los compuestos llamados de 8 carbonos (C8). Estos perfiles, en especial el de T0 fueron muy similares a los encontrados por Stoppacher *et al.* (2010) para *T. virens*, donde la mayoría de los VOCs liberados pertenecen al grupo de los sesquiterpenos, siguiéndole los compuestos C8 y luego los monoterpenos. Uno de los primeros compuestos volátiles con actividad antifúngica aislado de especies de *Trichoderma* fue el 6-pentil- $\alpha$ -pirona (6PP) (Collins & Halim, 1972). Este compuesto es el responsable del “olor a coco” asociado con ciertas especies de este antagonista. No presenta toxicidad y fue sintetizado

como aromatizante con propósitos industriales antes de ser descubierto como producto natural. Se ha reportado que la 6PP inhibió el crecimiento de hongos fitopatógenos como *R. solani*, *Botrytis cinerea* y especies de *Fusarium* (Denis & Webster, 1971). Bajo las condiciones ensayadas en nuestro estudio, no se registró liberación de 6PP en ninguno de los aislamientos. Dado que la producción de VOCs por *Trichoderma* spp. en general es dependiente de los factores medioambientales, las fuentes de carbono y de los microorganismos con los que interactúa (Zeilinger & Schuhmacher, 2013), habría que continuar realizando ensayos con diferentes modificaciones en las condiciones de cultivo para confirmar si los aislamientos probados producen 6PP.

Varios estudios muestran el potencial biológico de los sesquiterpenos como responsables en la supresividad del crecimiento y desarrollo de microorganismos competidores por espacio y/o nutrientes y la función que cumplen en la autoregulación del crecimiento (Hubbel *et al.*, 1983; Minerdi *et al.*, 2011; Polizzi *et al.*, 2011). Diversos autores sugieren que el modo de acción de los sesquiterpenos radica en la toxicidad causada por pérdida de control osmótico en las membranas celulares, ya que en su mayoría son compuestos lipofílicos (Inoue *et al.*, 2004). Otros señalan que éstos facilitan el pasaje de toxinas a través de las membranas, actuando como solventes (Kramer & Abraham, 2012). Algunos de los sesquiterpenos encontrados en este trabajo como trichoacorenol y acorenona coinciden con los obtenidos por Citron *et al.* (2011) en *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* y *T. viride*. También los compuestos,  $\delta$ -cuprenene y cupanere fueron observados por Polizzi *et al.* (2011) en *Penicillium decumbens*. El sesquiterpeno  $\beta$ -bisabolene presente en este estudio también fue encontrado por Stoppacher *et al.* (2010) quienes lo reportaron por primera vez para el género *Trichoderma* spp.

Los compuestos volátiles de ocho carbonos (C8) son elementos muy importantes, encargados de darles el sabor y el olor a las setas. Representan del 44,3% al 97,6% del total de la fracción volátil, dependiendo del método de extracción utilizado. Entre éstos el VOC 1-octen-3-ol es el más abundante (Combet *et al.*, 2006). En este trabajo, entre los compuestos de 8 carbonos obtenidos de los tres aislamientos, se registraron: 1-octen-3-ol; 3-octenona; 3-octanol. Los resultados coinciden con los encontrados por Nemcovic *et al.* (2008) y Herrero-Garcia *et al.* (2011) quienes demostraron que éstos inducen la conidiación en hongos y autoinhiben el crecimiento dependiendo de la densidad celular. Además se ha

reportado el efecto de 1-octen-3-ol como activador de genes de defensa en *Arabidopsis thaliana*. Cuando esta planta se expuso a su atmosfera, se activó la protección contra el ataque de *B. cinerea* (Kishimoto *et al.*, 2007).

Entre los alcoholes liberados por los aislamientos T0 y T8 se encuentra el 2-metil-1-butanol, que también fue hallado en *T. atroviridae*, *T. viride* y *T. pseudokoningii*. Estos alcoholes también se los hallaron inhibiendo el crecimiento micelial y síntesis de proteínas de hongos descomponedores de la madera (Humphris *et al.*, 2002).

Los resultados aquí presentados permitieron identificar diferencias en el modo de acción y en el grado de control de *Trichoderma* spp. contra *D. teres*. El aislamiento T3 fue el que presentó mayor porcentaje de inhibición micelial en cultivos duales y mediante liberación de VOCs. Los aislamientos *T. longibrachiatum* T0, *T. harzianum* T2, T4 y T9 presentaron porcentajes altos de inhibición micelial con ambas metodologías aunque fueron algo menores que *T. harzianum* T3. Por otro lado, los aislamientos *T. harzianum* T7, T8 y T10 fueron los que menos control ejercieron sobre *D. teres*. Esto también se corresponde con lo encontrado en la cuantificación de los VOCs de T0, T3 y T8, en los que se observó que T0 y T3 fueron los que más VOCs liberaron en comparación con T8.

Esta primera aproximación en el estudio *in vitro* de las interacciones, sirvió para detectar los aislamientos de *Trichoderma* spp. que presentaron mayores potenciales de biocontrol y seleccionar los que luego se probaron en ensayos *in vivo*. Además, se identificaron compuestos liposolubles como catenarinas y compuestos volátiles que poseen actividades fungistáticas reconocidas.

## CAPÍTULO IV

# EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LOS AISLAMIENTOS DE *TRICHODERMA* SPP. COMO BIOCONTROLADORES DE *D. TERES* Y PROMOTORES DE CRECIMIENTO EN CEBADA

## 4.1. Introducción

### 4.1.1. Efecto de *Trichoderma* spp. sobre tejidos vegetales vivos

La influencia positiva de *Trichoderma* spp. en las plantas está asociada a la generación de respuestas de defensa contra organismos fitopatógenos, a la mejor adaptación a los estreses abióticos, mayor solubilidad de nutrientes, estimulación del crecimiento, el refuerzo en la fotosíntesis y regulación de la arquitectura del sistema radicular (Yedida *et al.*, 2001; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Mastouri *et al.*, 2010; Shores *et al.*, 2010; Salas-Marina *et al.*, 2011). La influencia de *Trichoderma* spp. en la arquitectura radicular es muy importante ya que un cambio en la misma puede optimizar la absorción de agua y nutrientes del suelo, minimizando el impacto negativo causado por factores bióticos y abióticos.

Las raíces de las plantas liberan compuestos tales como azúcares, lípidos, ácidos orgánicos y aminoácidos que atraen a los microorganismos simbiotes, como *Trichoderma* spp. Estos colonizan la raíz e incrementan su capacidad de absorción a través de la inducción en la producción de pelos radiculares y raíces secundarias. La colonización de las raíces desencadena la emisión de señales difusibles tales como el ácido jasmónico (AJ), ácido salicílico (AS) y compuestos volátiles que producen un incremento en la fotosíntesis, activan respuestas de defensa y confieren protección contra estreses abióticos en diferentes partes de la planta (Harman, 2006, 2011a).

La promoción en el crecimiento de las plantas por *Trichoderma* spp., puede deberse no solo a un mejoramiento del sistema radicular, sino también a que facilita la hidrólisis de celulosa del suelo. Asimismo es capaz de liberar sustancias, como los compuestos quelantes, que aumentan la disponibilidad de nutrientes en las plantas dando como resultado un incremento de la biomasa vegetal. De esta manera *Trichoderma* spp. favorece la nutrición de las plantas generando una absorción más eficiente de nutrientes. Esto podría conducir a una modificación en las prácticas de manejo hacia una disminución y uso más racional de fertilizantes (Contreras-Cornejo *et al.*, 2013).

Un factor común que afecta negativamente a las plantas bajo condiciones de estrés es la acumulación de especies reactivas del oxígeno que son tóxicas y dan como resultado una mayor concentración de peróxidos lípidos. Se ha reportado que tratamientos de

semillas de tomate con *T. harzianum* redujeron la acumulación de peróxidos lípidos en las plántulas (Mastouri *et al.*, 2010).

La resistencia al estrés y probablemente el aumento en la eficiencia fotosintética, podría deberse a que *Trichoderma* spp. mejora el estado rédox de las plantas, optimizando la conversión por parte de estas, a través de diferentes vías, del glutatión oxidado y el ascorbato a la forma reducida (Mittler, 2002; Mastouri *et al.*, 2010).

#### 4.1.2. Respuestas de defensa inducidas por *Trichoderma* spp. en las plantas.

Las plantas cultivadas, tratadas con diferentes aislamientos de *Trichoderma* spp., pueden experimentar cambios físicos y bioquímicos relacionados a las respuestas de defensa. Las reacciones físicas pueden incluir deposición de calosa, engrosamiento de paredes celulares y la formación de tílides en los vasos del xilema (Bolton, 2009). Por otro lado, las respuestas bioquímicas incluyen la acumulación local o sistémica de especies reactivas de oxígeno, así como un aumento en la síntesis de moléculas marcadoras de respuestas de defensa como las fitoalexinas y proteínas PR (relacionadas a la patogenicidad) (Bolton, 2009; Harman *et al.*, 2012). La interacción de las moléculas señalizadoras o elicitores liberados por *Trichoderma* con los receptores de las plantas, puede determinar su adhesión y reconocimiento e inducir las respuestas de defensa. Los elicitores incluyen metabolitos secundarios, enzimas como: serin proteasas, xilanasas, celulasas, quitinasas o glucanasas, y componentes de la pared celular del hongo y de las plantas (Sriram *et al.*, 2009; López-Mondéjar *et al.*, 2011). Algunos inductores de *Trichoderma* pueden generar cambios en las plantas similares a los productos de genes de avirulencia y/o a patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), también conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). El reconocimiento de los elicitores por parte de los receptores de las plantas conlleva una rápida activación de canales iónicos y una despolarización de la membrana plasmática de las células vegetales. Durante la despolarización se acumulan especies reactivas del oxígeno en las células y se producen rápidos cambios de pH (Vinale *et al.*, 2008 b). Los tratamientos con *Trichoderma* spp. provocan la síntesis y acumulación de enzimas, metabolitos secundarios y moléculas señales, incluyendo el AJ, ET y AS. Estas vías de señalización están asociadas a la inducción de factores de transcripción de genes involucrados con la patogénesis. La

expresión de estos genes incluye enzimas de la biosíntesis de moléculas señal y compuestos antimicrobianos (Djonovic' *et al.*, 2006).

La inmunidad inducida por las plantas puede ser clasificada como resistencia sistémica inducida (RSI) o resistencia sistémica adquirida (RSA), que con frecuencia son fenotípicamente similares (Perazzolli *et al.*, 2008; Mathys *et al.*, 2012). Estos dos tipos de inmunidad se examinaron en *Arabidopsis thaliana* como planta modelo. Salas-Marina *et al.* (2011) demostraron que la RSA sobre todo, podría ser activada mediante la exposición de la planta a microorganismos patógenos biotróficos y hemibiotróficos, así como también a microorganismos no patógenos. Este tipo de resistencia esta típicamente correlacionada con la acumulación endógena de AS como elicitador y puede ir acompañada de una reacción de hipersensibilidad, lesiones necróticas o fitotoxicidad en las plantas (Karolev *et al.*, 2008; Sriram *et al.*, 2009). La RSI está relacionada a microorganismos no patógenos como las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas, (PGPR) y también a organismos necrótrofos o insectos herbívoros (Figura 1). Las vías reguladas por AJ y ET juegan un rol crucial en este tipo de activación de resistencia de la plantas. Según varios autores, muchos aislamientos de *Trichoderma* spp., son capaces de provocar la síntesis de AJ y de ET implicada en el desarrollo de RSI (Contreras-Cornejo *et al.*, 2011; Hermosa *et al.*, 2012). Por otro lado, otros estudios demostraron que *Trichoderma* spp. puede inducir cambios bioquímicos y moleculares en las plantas, característicos de la RSA, especialmente asociados con la expresión de proteínas (Hermosa *et al.*, 2012; Mathys *et al.*, 2012). La inducción de AS, ET y AJ por *Trichoderma* spp. en una misma planta, indica la presencia de mecanismos alternos de inducción de resistencia y una red compleja de señales que conectan respuestas de RSA y RSI, en función de la especie de la planta, de los aislamientos de *Trichoderma* spp. utilizados y del patógeno contra el que es dirigida dicha respuesta (Karolev *et al.*, 2008). Se cree que el empleo de aislamientos de *Trichoderma* spp. puede potenciar las reacciones naturales de defensa de las plantas, como RSI y RSA y asegurar un mejor rendimiento en respuesta a un amplio espectro de patógenos.

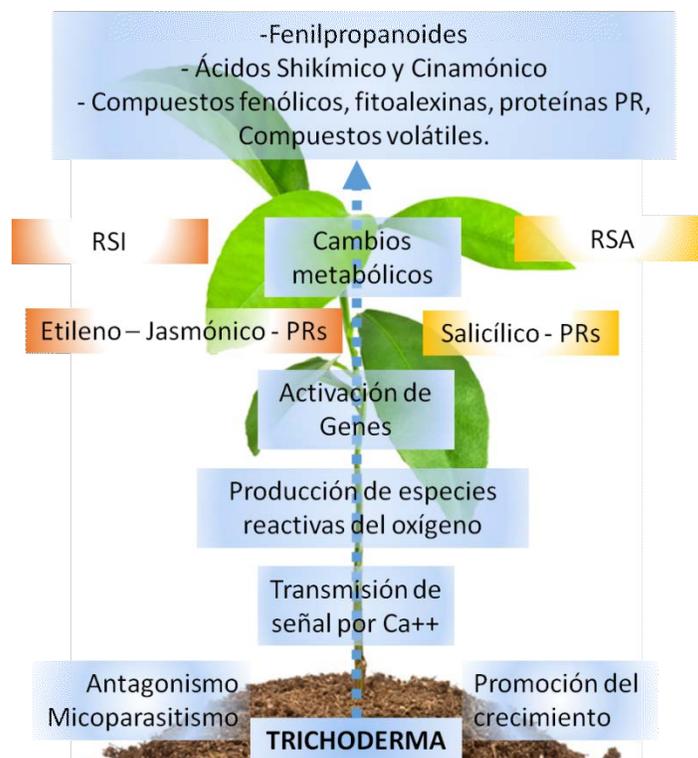


Figura 1: Vías de inducción de respuestas físicas y bioquímicas de defensa en las plantas por acción de *Trichoderma* spp.

#### 4.1.3. El uso de *Trichoderma* spp. en el biocontrol

Diversos estudios a nivel mundial, citan el empleo de *Trichoderma* spp. para el control de fitopatógenos en cultivos hortícolas y ornamentales (Coley-Smith, 1991; Clavijo & Cotes 1998; Wolcan *et al.*, 1998; Lewis & Lumsden, 2001; Mónaco *et al.*, 2006; Aquino-Martínez 2008; Pill *et al.*, 2009; Cuellas & Fernández 2012). Algunos trabajos también tratan el estudio de los mismos para el control de patógenos en cereales. Como ejemplos podemos citar a Reyes *et al.* (2008), quienes evaluaron la actividad de varios aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* spp. en cultivos de arroz en Cuba, y a Warren *et al.* (2005), quienes probaron en el sur de Australia la eficiencia de *Trichoderma koningii* y formulados comerciales sobre *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp. en cultivos de trigo y cebada.

En la Argentina, investigaciones previas con *Trichoderma* spp. para el control de patógenos en trigo, han mostrado resultados exitosos en su control en el filoplano (Perelló *et al.*, 2003; Cordo *et al.*, 2007; Dal Bello *et al.*, 2008; Stocco *et al.*, 2016) y en semilla (Mónaco *et al.*, 2004)

#### 4.1.4. *Trichoderma* spp. como agente de biocontrol en tratamientos de semilla

*Trichoderma* spp. es uno de los géneros de hongos utilizados para el control biológico, que probablemente ha recibido la mayor atención para el tratamiento en semillas (Taylor *et al.*, 1994; McQuilken *et al.*, 1998). Las diferentes especies estudiadas se aplican a las semillas como conidios o clamidosporas que se vuelven activas antes de la interacción con el patógeno. Para que el tratamiento sea eficiente el agente debe persistir sobre la semilla (espermoplano) o el área que rodea la semilla (espermósfera) en cantidad suficiente para protegerla en su germinación (Harman, 2006; Neumann & Laing, 2006).

La técnica de suspensión en un medio acuoso es un método común para la aplicación de bioprotectores en semillas (Taylor & Harman, 1990) y consiste en la mezcla de éste con un aglutinante acuoso. Se han empleado diversos aglutinantes que aumentan la capacidad de protección de *Trichoderma* spp. contra microorganismos patógenos. Entre estos se encuentran los geles tales como hidroxietil celulosa (Hadar *et al.*, 1984), Pelgel (® Nitragen) (Inbar *et al.*, 1996), películas industriales de recubrimiento (adhesivo de acetato de vinilo) (Cliquet & Scheffer, 1996), gelatina (Roberts *et al.*, 2005) y mesocarpio del fruto de *Elaeis guineensis*, la planta de donde se obtiene el aceite de palma (Kanjamaneesathian *et al.*, 2003). Estos materiales aglutinantes o de revestimiento pueden proporcionar una base alimenticia para *Trichoderma*.

Otra forma de incorporar *Trichoderma* efectivamente a las raíces es mediante su inmersión en suspensiones de conidios, con concentraciones conocidas, previo al trasplante o la siembra (Ahmed *et al.*, 2003). De esta manera se asegura la colonización del agente biocontrolador antes que la de los patógenos.

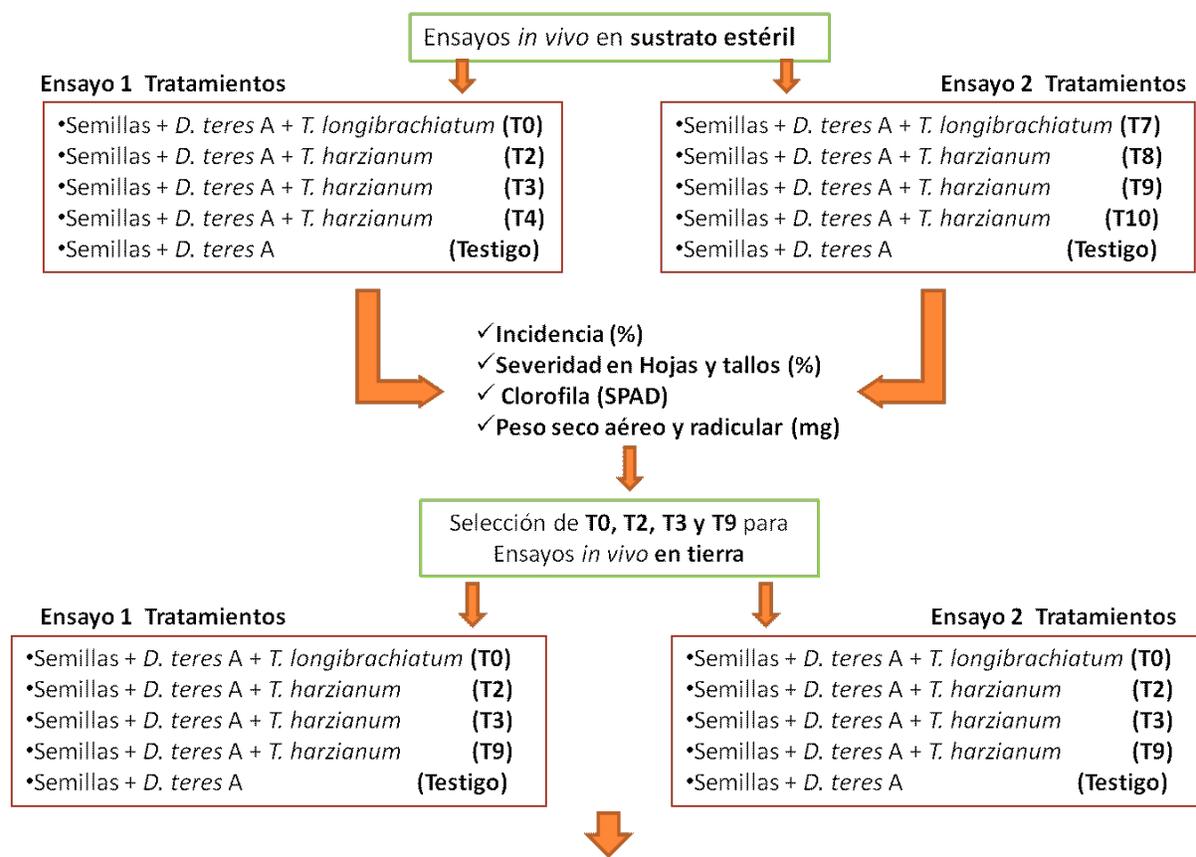
Con respecto al patógeno, las principales fuentes de inóculo de *D. teres* son los restos culturales y las semillas infectados. Estas últimas cumplen un rol importante en la supervivencia, diseminación y foco de inicio de epidemias de mancha en red (Shipton *et*

al., 1966; Piening, 1968; Jordan, 1981). Su tratamiento es clave para prevenir una reintroducción del patógeno principalmente en áreas con rotación de cultivos.

El objetivo del presente capítulo fue:

Evaluar *in vivo* los aislamientos de *Trichoderma* spp. probados en los ensayos *in vitro*, a través de sus efectos como promotores del crecimiento y mediante su capacidad de reducir la infección *D. teres* cuando se transmite de semillas a plántulas de cebada. Para llevar a cabo este objetivo, se eligió la metodología de inoculación de *Trichoderma* spp. en semilla.

#### 4.2. Materiales y métodos



Evaluación de Incidencia, severidad en hojas y tallos, clorofila y peso seco aéreo y radicular.

Diagrama de flujos de la organización de los ensayos realizados en este capítulo.

#### 4.2.1. Ensayos de invernáculo en sustrato estéril

Para evaluar el comportamiento de los ocho aislamientos de *Trichoderma* spp. en plántula, se realizaron dos ensayos en invernáculo en sustrato estéril (vermiculita) en los que se probaron cuatro aislamientos por ensayo. Para cada uno de ellos se utilizó la misma metodología. Se emplearon semillas de la variedad Scarlett, susceptibles a *D. teres*, con una infección natural de este patógeno del orden del 30%. El origen de las muestras fue la localidad de Tres Arroyos.

El diseño experimental fue de bloques al azar, dos bloques por tratamiento y 5 tratamientos. Las semillas se sembraron en bandejas germinadoras o *speedlings* de 75 celdas individuales, siendo cada bandeja un bloque.

Debido a la escasa infección natural encontrada en las semillas, éstas fueron inoculadas artificialmente con el aislamiento *D. teres* A. que ya había sido testeado *in vitro* mediante cultivo dual y cultivos enfrentados. Cada tratamiento consistió en semillas de cebada infectadas artificialmente con el patógeno más el aislamiento de *Trichoderma* spp. a testear. En el primer ensayo los tratamientos fueron: *T. longibrachiatum* T0/*D. teres* A, *T. harzianum* T2/*D. teres* A, *T. harzianum* T3/*D. teres* A y *T. harzianum* T4/*D. teres* A), mientras que en el segundo ensayo se enfrentaron: *T. harzianum* T7/*D. teres* A, *T. harzianum* T8/*D. teres* A, *T. harzianum* T9/*D. teres* A y *T. harzianum* T10/*D. teres* A). Ambos ensayos incluyeron un testigo cada uno, que consistió en semillas de cebada infectadas solo con *D. teres* A.

##### 4.2.1.1. Preparación de los inóculos

*Trichoderma* spp.

Todos los aislamientos de *Trichoderma* spp. se cultivaron en APG al 2% y se incubaron 7 días a  $21 \pm 1$  °C en fotoperíodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. Para preparar la suspensión de cada aislamiento, los conidios se recogieron inundando los cultivos con agua destilada estéril y luego frotando la superficie del cultivo con una varilla de vidrio estéril. Las suspensiones se filtraron a través de dos capas de gasa estéril y se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/ml mediante el uso de un hematocitómetro. A todas estas

suspensiones se les agregó además 2 ml de agar agua semisólido y una gota del tensioactivo Tween 20.

#### *Drechslera teres*

El patógeno *D. teres* A, se cultivó en APG al 2% durante los 10 días previos a la siembra y se incubó en estufa en oscuridad a temperatura de 23 °C.

#### 4.2.1.2 Metodología de inoculación

##### *Trichoderma* spp.

Para evitar cualquier interacción directa de *D. teres-Trichoderma* spp. sobre la semilla, se empleó el método por inundación con el antagonista. En primer lugar, para inducir la emergencia de las raíces en las semillas de cebada, se desinfectaron con alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 5% por 3 minutos y se sembraron en cajas de Petri con APG. Se incubaron en cámara climatizada a  $21 \pm 1$  °C, con ciclos de 12 h luz y 12 h oscuridad, durante 3 días. Luego de la emisión de las raíces, se realizó la inoculación. Para esto, las semillas se sumergieron durante 30 min en la suspensión de conidios de cada aislamiento de *Trichoderma* spp. a probar (Figura 2). Se escurrieron y se dejaron secar dentro de una placa de Petri estéril a una temperatura de  $21 \pm 1$  °C y en oscuridad, para luego de 24 h sembrarlas en los *speedlings*. Las semillas testigo fueron sumergidas en agua destilada estéril con 2 ml de agar agua semisólido y una gota de Tween 20.



Figura 2: Metodología de inundación para la inoculación con *Trichoderma* spp.

A) Semillas tratadas con el antagonista. B) Semillas testigo.

### *Drechslera teres*

Para la inoculación del patógeno, se siguió la metodología empleada por Istifadah & Mc Gee (2006) con algunas modificaciones. Esta consistió en la incorporación a la semilla, previamente tratada con el antagonista, de una porción de 5x5 mm de micelio activo de *D. teres* A, crecido durante 10 días en APG a  $21 \pm 1$  °C, con ciclos de 12 h luz y 12 h oscuridad (Figura 3). Luego estas semillas fueron sembradas.



Figura 3: Inoculación de *D. teres* A. sobre las semillas de cebada.

El primer ensayo se realizó en el mes de julio y el segundo en el mes de agosto con temperaturas entre los 7 y 23 °C y humedad entre 79 a 98%. Cada uno tuvo una duración de 23 días. Se añadió al sustrato por única vez, a los 10 días de la siembra, una solución de 1ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1M), 2 ml de  $\text{MgSO}_4$  (1M), 5 ml de  $\text{KNO}_3$  (1M), 5 ml de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (1M) para suplir los requerimientos nutritivos de las plántulas. Se midieron las variables relacionadas con la patogenicidad, como incidencia y severidad en hoja y en tallo y las

involucradas en la promoción del crecimiento vegetal, como clorofila, peso seco aéreo y radicular.

**Patogenicidad:** La evaluación de la incidencia y severidad se registró visualmente e *in situ*. Para la cuantificación de la severidad se construyeron escalas visuales que relacionaron la intensidad de la coloración de la mancha con el porcentaje de área afectada. Se realizó una escala para la cuantificación en el tallo (Figura 4) y en la hoja (Figura 5).

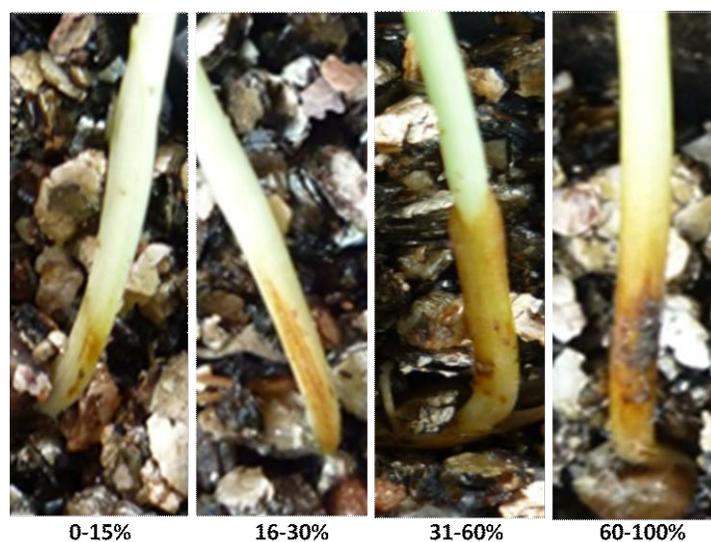


Figura 4: Escala utilizada para medir severidad en tallo.

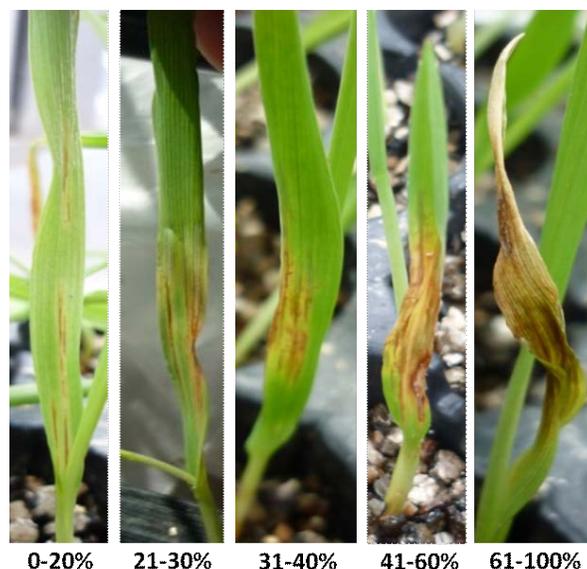


Figura 5: Escala utilizada para medir severidad en hoja.

**Promoción del crecimiento:** La clorofila se estimó mediante el medidor de clorofila Minolta<sup>®</sup> SPAD 502, en unidades SPAD. Se calculó el promedio de tres medidas de la mitad superior de la segunda hoja de las plántulas de cebada.

El peso de raíces y tallos se determinó a los 23 días. Se removieron 40 plántulas por bloque de cada tratamiento, se lavaron las raíces y se pusieron a secar en estufa a 60 °C por 7 días. Luego se pesaron y se registró su peso seco aéreo y radicular.

**Análisis estadísticos:** Los datos de incidencia se analizaron mediante Modelos Lineales Generalizados Mixtos (MLGM) utilizando el software InfoStat versión 2014 con plataforma R dependiente de R-DCOM (Baier & Neuwirth, 2007). El modelo planteado fue un Modelo Lineal Generalizado para datos Binarios con efectos fijos:

$$\pi(x) = \alpha + \beta x$$

donde  $\pi$  representa la variable incidencia de los tratamientos ( $x$ ) y  $\beta$  el cambio de probabilidad por unidad de  $x$  (tratamientos). La función de enlace utilizada por el modelo para la familia de datos binomiales fue la función logit. Las medias se compararon mediante la prueba DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002).

Los valores correspondientes a la variable clorofila, severidad del tallo y de la hoja se analizaron mediante el test no paramétrico de Friedman. Los datos de peso de raíz y aéreo se analizaron mediante ANOVA y test de LSD Fisher. Los análisis se efectuaron mediante el software InfoStat versión 2011.

#### 4.2.2. Ensayos de invernáculo en tierra

De acuerdo a los datos obtenidos de los dos ensayos realizados previamente en las pruebas *in vitro* y en sustrato estéril, se seleccionaron cuatro aislamientos de *Trichoderma* spp. *T. longibrachiatum* (T0) y *T. harzianum* (T2, T3 y T9) para ser probados en tierra, bajo condiciones de invernáculo. El sustrato utilizado fue “sustrato de germinación” (50% de compost, 40% de turba y 10% de perlita) el que permitió una buena retención de agua, buena aireación y buen descalce de las raíces de las plántulas cuando fueran retiradas para la medición de su peso seco.

Se realizó un ensayo en el mes de julio con temperaturas entre 9 y 26 °C y una media de humedad del 70%, y una repetición en el mes de agosto con temperaturas entre los 6 y 22°C y una media de humedad del 85%.

Se utilizaron las mismas semillas que en los ensayos en vermiculita. La metodología de inoculación de los microorganismos, la siembra y las variables evaluadas, junto con el diseño experimental también fueron los mismos que en los ensayos anteriores.

Los datos de incidencia se analizaron mediante MLGM, con el software InfoStat versión 2014 con plataforma R dependiente de R-DCOM (Baier & Neuwirth, 2007). El modelo planteado fue el mismo que para los ensayos en sustrato estéril.

Las variables clorofila y porcentaje de severidad en el tallo y en la hoja se analizaron mediante el test no paramétrico de Friedman, mientras que los datos de peso de raíz y aéreo por ANOVA y test de LSD Fisher. Para todos los análisis se utilizó el programa InfoStat versión 2011.

### 4.3. Resultados

#### 4.3.1. Ensayos de invernáculo en sustrato estéril

##### Primer ensayo

**Patogenicidad:** Los valores de incidencia observados para el primer ensayo con los tratamientos *T. longibrachiatum* T0/D.t A., *T. harzianum*T2/ D.t A, *T. harzianum*T3/ D.t A y *T. harzianum*T4/ D.t A fueron hasta un 30% menores que los observados para el testigo (Tabla 1). La incidencia observada con todos los aislamientos de *Trichoderma* spp. mostró diferencias significativas respecto al testigo. Los resultados del modelo aplicado indicaron que existe un efecto significativo de los tratamientos (F: 9,43 p= 0,0020).

Con respecto a la variable severidad del tallo, se observó que todos los tratamientos ejercieron una disminución significativa respecto al testigo (T: 22,13 p = 0,0001) aunque no hubo diferencias entre ellos, controlando a *D. teres* entre 53,2 y 56 %. Los tratamientos con *T. longibrachiatum* T0 y *T. harzianum* T4 fueron los que presentaron menores valores (Tabla 1). El proceso de infección del patógeno proveniente de la semilla, se evidenció principalmente en la primera hoja (Figura 6).

Tabla 1: Variables relacionadas a la patogenicidad: porcentaje promedio de incidencia y severidad (Primer ensayo).

Tratamientos	Incidencia promedio (%)	Severidad del Tallo (%)
T2	63 ± 3 a	8,4± 0,74 a
T3	62 ± 3 a	8,72± 0,83 a
T4	65 ± 3 a	8,15 ± 0,75 a
T0	64 ± 3 a	8,26 ± 0,74 a
Testigo	87 ± 2 b	18,6± 1,07 b

Los valores se expresan en media ± error estándar. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas para incidencia y severidad según las pruebas DGC y Friedman-dms ( $p \leq 0.05$ ), respectivamente.



Figura 6: Proceso de infección del patógeno proveniente de la semilla (izquierda). Síntomas de “mancha en red” en las primeras hojas de las plántulas de cebada

**Promoción del crecimiento:** Para la variable clorofila, los tratamientos con *Trichoderma* spp. mostraron diferencias significativas entre ellos (T: 23,8  $p=0,0001$ ) presentando valores menores al testigo, excepto el tratamiento con T4 (Tabla 2). Si bien este último no se diferenció significativamente del control mostró una tendencia a un mayor valor que éste.

En cuanto a la variable peso seco radicular, solo T3 y T4 mostraron valores significativamente menores al testigo (F: 29,7  $p=0,0001$ ). El tratamiento con T2 presentó valores ligeramente mayores a éste mostrando la misma tendencia para la variable peso seco aéreo. Para esta última variable, los demás aislamientos presentaron valores menores respecto al testigo (F: 35,1  $p=0,0001$ ) (Tabla 2).

En este ensayo solo se registró la severidad en el tallo, porque no se presentaron manchas en las hojas.

Tabla 2: Variables relacionadas a la promoción del crecimiento: clorofila, peso seco radicular y aéreo (Primer ensayo).

Tratamientos	Clorofila (SPAD)	Peso seco raíz (mg)	Peso seco aéreo (mg)
T2	17,31± 0,26 a	34,76± 0,87 c	41,47± 0,96 c
T3	18,13± 0,29 b	26,93± 0,64 a	32,37± 0,77 a
T4	20,45± 0,26 d	26,76± 0,65 a	30,63± 0,77 a
T0	19,76± 0,23 c	32,16± 0,65 b	37,13± 0,76 b
Testigo	19,91± 0,50 cd	34,19± 0,72 bc	41,18± 0,95 c

Los valores se expresan en media ± error estándar. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas según la prueba LSD- Fisher ( $p \leq 0.05$ ) para peso seco de raíz y aéreo; y según la prueba de (Friedman-dms) ( $p \leq 0.05$ ) para clorofila.

### Segundo ensayo

**Patogenicidad:** Para el segundo ensayo, los valores de incidencia observados con los tratamientos *T. harzianum*T7/D.t A., *T. harzianum* T8/ D.t A, *T. harzianum*T9/ D.t A y *T. harzianum*T10/ D.t A fueron de hasta un 35 % menores que el testigo (Tabla 3). La incidencia observada con todos los aislamientos de *Trichoderma* spp. mostró diferencias significativas respecto al testigo. Los resultados del modelo aplicado indicaron un efecto significativo de los tratamientos ( $F=13,50$   $p= 0,0005$ ).

Para la variable severidad en los tallos se observó que todos los tratamientos con *Trichoderma* spp. se diferenciaron estadísticamente del testigo ( $T= 11,6$   $p=0,0001$ ) siendo T8 y T9 los que mostraron mayor disminución de la severidad en los tallos, hasta un 55% menos que el testigo. En hojas, para esta variable todos mostraron valores significativamente menores que el testigo ( $T: 7,8$   $p= 0,0001$ ) siendo T7, T9 y T10 los más efectivos, controlando hasta un 80% la severidad en hoja (Tabla 3).

Tabla 3: Variables relacionadas a la patogenicidad: porcentaje promedio de incidencia y severidad observada en tallo y hoja (Segundo ensayo).

Tratamientos	Incidencia promedio (%)	Severidad de Tallo (%)	Severidad de Hoja (%)
T7	59 ± 3 a	12,5 ± 1,55 ab	1,84 ± 0,74 a
T8	54 ± 3 a	8,09 ± 0,85 a	6,94 ± 1,89 abc
T9	55 ± 3 a	8,82 ± 1,00 ab	3,09 ± 1,14 ab
T10	71 ± 3 b	12,67 ± 1,04 c	3,44 ± 1,24 ab
Testigo	83 ± 2 c	17,28 ± 1,16 d	13,23 ± 2,42 d

Los valores se expresan en media ± error estándar. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas para la variable incidencia y para la variable severidad ( $p \leq 0.05$ ), según las pruebas DGC y Friedman-dms, respectivamente.

**Promoción del crecimiento:** Con respecto a la clorofila todos los tratamientos presentaron valores significativamente mayores al testigo (T: 5,02  $p= 0,0006$ ), siendo T7 el que registró mayores valores de unidades SPAD, cercanos a 30 (Tabla 4).

Para la variable peso radicular, los tratamientos T9 y T10 mostraron los valores más altos, aunque no se diferenciaron estadísticamente del testigo (F: 2,58  $p= 0,038$ ). En la evaluación del peso seco aéreo con el aislamiento T9 se registraron los mayores pesos y diferenciándose estadísticamente del resto (F: 4,37  $p= 0,0021$ ) (Tabla 4).

Tabla 4: Variables relacionadas a la promoción del crecimiento: clorofila, peso seco radicular y aéreo (Segundo ensayo).

Tratamiento	Clorofila (SPAD)	Peso seco raíz (mg)	Peso seco aéreo (mg)
T7	28,48 ± 0,76 c	9,22 ± 0,60 ab	20,79 ± 0,95 a
T8	27,9 ± 0,51 c	8,6 ± 0,50 a	21,3 ± 0,84 a
T9	27,2 ± 0,37 b	10,58 ± 0,60 b	24,63 ± 0,83 b
T10	27,3 ± 0,42 bc	10,78 ± 0,50 b	21,43 ± 0,85 a
Testigo	25,5 ± 0,60 a	9,65 ± 0,62 ab	19,93 ± 0,86 a

Los valores se expresan en media ± error estándar. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas según LSD-Fisher, para peso seco radicular y aéreo, y según la prueba Friedman-dms ( $p \leq 0.05$ ) para clorofila.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en ambos ensayos, se puede concluir que todos los aislamientos probados ejercieron una disminución de la incidencia de *D. teres*

de hasta un 35 %. La severidad en tallos disminuyó hasta un 56% mientras que en hoja de un 50 a 80%.

Respecto a la clorofila y los pesos registrados, los resultados fueron variables en ambos ensayos. Los tratamientos T4 y T7 mostraron los valores más altos de SPAD.

En las variables peso seco radicular y aéreo, T2 y T9 se destacaron registrando los valores más elevados para ambos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas realizadas tanto *in vitro* (Ver capítulo III) como *in vivo*, se seleccionaron los aislamientos T0, T2, T3 y T9 para ser probados en tierra bajo condiciones de invernáculo.

#### 4.3.2. Ensayos de invernáculo en tierra

**Patogenicidad:** Todos los aislamientos probados disminuyeron significativamente el porcentaje de incidencia entre un 39 y un 55% respecto al testigo, en ambos ensayos, siendo F: 14.78  $p= 0.0056$  para el ensayo 1 y F: 9.88  $p=0.0136$  para el ensayo 2 (Tabla 5).

Con respecto a la variable severidad del tallo, todos los aislamientos presentaron diferencias significativas respecto al testigo tanto en el ensayo 1 como en el 2 (T: 26,01  $p= 0,0001$ ) y (T: 3,61  $p= 0,0064$ ), respectivamente. Estos mostraron una disminución entre el 50 y 77%. Para esta misma variable en la hoja se encontraron diferencias significativas entre tratamientos tanto en el ensayo 1 (T: 23,27  $p =0,0001$ ) como en el 2 (T: 16.30  $p\leq 0.0001$ ). El mayor control ejercido, para el ensayo 1 fue del 60% con el aislamiento T0, y para el ensayo 2 fue de 70% con T2 y T3 (Tabla 5). La Figura 7 muestra el aspecto del tratamiento testigo y del tratamiento con el aislamiento T3.

Tabla 5: Variables relacionadas con la patogenicidad: porcentaje promedio de incidencia y severidad en tallo y hoja (Ensayos 1 y 2).

Tratamientos	Porcentaje de incidencia		Severidad del Tallo (%)		Severidad de Hoja (%)	
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 1	Ensayo 2
T0	44 ± 4 a	42 ± 5 a	12,66 ± 1,80 bc	10,8 ± 1,94 ab	5,9 ± 1,74 a	17,5 ± 2,9 ab
T2	35 ± 4 a	48 ± 5 a	8,59 ± 1,47 a	17,33 ± 2,85 bc	6,53 ± 1,72 ab	15,65 ± 3 a
T3	37 ± 4 a	42 ± 5 a	6,28 ± 0,81 a	11,45 ± 2,35 ab	9,24 ± 1,85 bc	15,65 ± 3 a
T9	47 ± 4 a	47 ± 5 a	13,03 ± 1,85 bc	8,2 ± 1,58 a	12,81 ± 2,44 d	18,4 ± 2,8 ab
Testigo	77 ± 4 b	82 ± 4 b	24,27 ± 1,88 d	36,5 ± 3,14 d	14,69 ± 2,57 de	51,75 ± 4,4 d

Los valores se expresan en media ± error estándar. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas según la prueba DGC ( $p \leq 0.05$ ) para incidencia y según la prueba Friedman-dms ( $p \leq 0.05$ ) para las variables severidad del tallo y de la hoja.

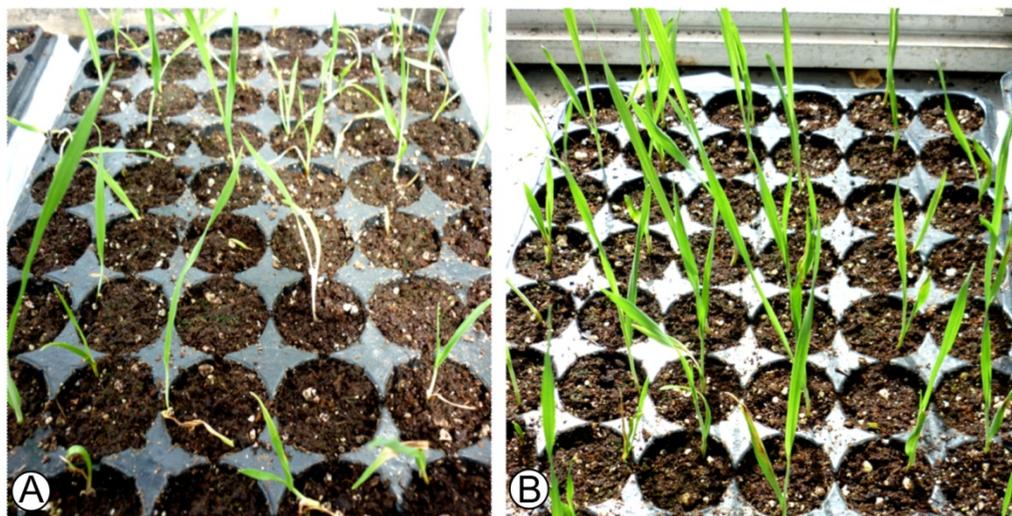


Figura 7: Aspecto de las plántulas del tratamiento testigo (A) y del tratamiento con T3 (B)

**Promoción del crecimiento:** En cuanto a la variable clorofila, en el ensayo 1 todos los tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo (T: 7,47  $p=0,0001$ ). El tratamiento que mostró los valores más altos fue T0. En el ensayo 2, si bien los tratamientos no presentaron diferencias significativas respecto al testigo (T: 1,64  $p=0,16$ ), los aislamientos T0, T2 y T3 mostraron los valores más altos (Tabla 6).

Para las variables peso seco aéreo y radicular los tratamientos que presentaron los valores más altos fueron diferentes en cada ensayo. En el ensayo 1, el tratamiento con T0 fue el que mostró los valores más altos diferenciándose significativamente testigo (F: 3,29

p=0,01) mientras que para el peso aéreo, si bien no se diferenciaron significativamente del control (F: 8,01 p= 0,0001) el tratamiento con T0 evidenció una tendencia hacia valores más altos que este. En el ensayo 2, para el peso seco radicular no se detectaron diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo (F: 2,11 p=0,08), aunque el aislamiento T3 fue el que mostró una tendencia hacia los mayores valores. En el peso aéreo también fue T3 el que se destacó diferenciándose significativamente del testigo (F. 2,97 p=0,02) (Tabla 6).

Tabla 6: Variables relacionadas con la promoción del crecimiento: clorofila, peso seco de raíz y aéreo (Ensayos 1 y 2).

Tratamientos	Clorofila (SPAD)		Peso seco raíz (mg)		Peso seco aéreo (mg)	
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 1	Ensayo 2
T2	29,83 ± 0,30 bc	32 ± 0,39 a	34,7 ± 1,2 a	12,5 ± 1 ab	45,1 ± 1,6 ab	28,4 ± 1,3 ab
T3	28,85 ± 0,29 b	31,94 ± 0,37 a	34,2 ± 1,5 a	14,2 ± 1,2 b	49,7 ± 2 bc	32,3 ± 1,6 b
T9	29,26 ± 0,76 bc	31,12 ± 0,30 a	32,9 ± 1,7 a	12,5 ± 1,2 ab	42,1 ± 1,5 a	25,4 ± 1,5 a
T0	29,86 ± 0,51 c	31,97 ± 0,38 a	39 ± 1,3 b	9,7 ± 0,79 a	53,1 ± 1,5 c	26,6 ± 1,3 a
Testigo	27,44 ± 0,52 a	31,33 ± 0,30 a	33,9 ± 1,2 a	12,7 ± 1,3 ab	52,8 ± 2 c	26,7 ± 2,2 a

Los valores se expresan en media ± error estándar. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas según la prueba LSD- Fisher ( $p \leq 0.05$ ) para las variables peso seco radicular y aéreo y según la prueba de Friedman-dms ( $p \leq 0.05$ ) para clorofila.

El análisis de los resultados en conjunto muestra que para las variables relacionadas con la patogenicidad todos los aislamientos probados en ensayos en tierra bajo condiciones de invernáculo, disminuyeron la transmisión del patógeno *D. teres* de semilla a plántula entre un 40 y un 55%. En cuanto a la severidad ésta fue disminuida en un rango del 50 a 77% en tallos y del 15 a 70% en hojas. Los aislamientos T0 y T3 fueron los que mostraron mejores resultados para ambos ensayos.

Para las variables relacionadas con la promoción del crecimiento todos los aislamientos manifestaron una tendencia hacia valores más altos de clorofila (SPAD) respecto al testigo, destacándose T0. Mientras que para las variables peso seco radicular y aéreo T3 y T0 fueron los que presentaron los mayores valores.

#### 4.4. Discusión

La conducción de los ensayos en un sustrato estéril como vermiculita, se llevó a cabo para analizar la respuesta de todos los aislamientos de *Trichoderma* spp. en un medio donde no existe la competencia con otros microorganismos y solo puede haber interacción con la planta y el patógeno. Teniendo en cuenta lo observado en estos ensayos y lo visto en los capítulos II y III se seleccionaron los aislamientos T0, T2, T3 y T9 para ser probados en plántulas en sustrato no estéril (tierra). Estos presentaron valores altos en el porcentaje de inhibición de *D. teres* en cultivo *in vitro*, mostraron bajos porcentajes de severidad en plántula y exhibieron valores altos para el peso radicular y aéreo. Además *T. longibrachiatum* T0 fue seleccionado porque pertenece a un taxón diferente del resto de los aislamientos y su respuesta bajo las mismas condiciones climáticas podría ser distinta a la de los demás.

De acuerdo con Bolton (2009) es de suma importancia que el mismo aislamiento antagonista no solo confiera inmunidad a las plantas, sino que también estimule su crecimiento, ya que la activación de sus mecanismos de defensa puede disminuir su tasa de crecimiento y desarrollo. Por tal motivo, en este estudio, las variables elegidas para evaluar las respuestas de *Trichoderma* spp. contemplaron tanto aspectos fitosanitarios (porcentaje de incidencia y severidad en hojas y tallos), como de promoción del crecimiento (clorofila, peso de raíces y hojas).

Comparando las respuestas de los aislamientos antagonistas en ensayos en sustrato estéril y en tierra, hubo ciertas diferencias en ambos para el mismo tratamiento y variable medida. Los aislamientos T0 y T3, que en sustrato estéril no presentaron los valores más bajos de severidad, sí mostraron esta tendencia en los ensayos en tierra. Lo mismo ocurrió con las variables peso radicular y aéreo, donde no se destacaron en sustrato estéril, pero sí lo hicieron en tierra, siendo T2 el que presentó mayores valores. Este comportamiento desigual en los distintos sustratos podría estar relacionado con la microflora presente en la tierra, que estimularía el crecimiento de estos antagonistas. De este modo T0 y T3 producirían una colonización más rápida de las raíces ejerciendo mayores respuestas de resistencia y promoción del crecimiento, comparadas con las encontradas en el sustrato estéril en ausencia de competencia. Como se refirió en el capítulo III, la presencia de *D. teres* estimuló el crecimiento y liberación de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en T0,

T3 y T8. Existe bibliografía en la que se hace referencia a que la presencia de otros microorganismos induce la activación de genes relacionados con el parasitismo en *T. atroviridae* y con la competencia por la adquisición más rápida de nutrientes en *T. reesei* (Atasanova *et al.*, 2013). También está reportado que la presencia de quitina en el suelo estimula la actividad antagonista de los microorganismos quitinolíticos como *T. harzianum* los cuales liberan enzimas capaces de degradar las paredes celulares de otros hongos aumentando las respuestas de defensa en las plantas (Ahmed *et al.*, 2003). Estos mecanismos podrían estar operando en los aislamientos *T. longibrachiatum* T0 y *T. harzianum* T3 y explicarían el comportamiento desigual observado en los dos sustratos.

Con respecto a la variable clorofila obtenida en los ensayos en ambos sustratos, se encontró que la mayoría de los aislamientos de *Trichoderma* spp. mostraron una tendencia hacia valores más altos respecto al testigo. Esto refleja un efecto vigorizante en las plantas tratadas respecto a las no tratadas. Resultados similares fueron encontrados por Harman (2000) en plantas de maíz tratadas con *T. harzianum* T-22, quien observó que las que provenían de semillas con T-22 eran más verdes y mostraban mayores valores SPAD que las no tratadas. Debido a que un aumento de verdor en el maíz está asociado a altos niveles de nitrógeno, este autor realizó pruebas aplicando T-22 a semillas de maíz con diferentes dosis de nitrógeno. Las plantas tratadas con T- 22 mostraron diferentes aumentos en el contenido de clorofila dependientes de las dosis de nitrógeno, además de presentar mayores rendimientos con las mismas dosis de nitrógeno que las plantas no tratadas. Esto indica que los tratamientos con *Trichoderma* spp. mejoran la eficiencia en la captación de nitrógeno lo que puede llevar al empleo de este microorganismo, en prácticas de manejo integrado, para un uso más racional y sustentable de los fertilizantes. Debido a que en el presente trabajo no se abordó el estudio del contenido de clorofila en relación con la calidad nutricional en las plántulas de cebada, podría ser objeto de futuras investigaciones.

Si se realiza una comparación de los dos ensayos diferidos en el tiempo realizados en tierra, se puede observar que el segundo presentó mayores porcentajes de severidad de mancha en red tanto en tallos como en hojas con respecto al primero. Esto podría deberse a las bajas temperaturas y alta humedad que predominaron durante el mes de agosto, cuando se realizó el segundo ensayo. Según Carmona (2009) las condiciones óptimas para la intensificación en los niveles de infección se dan con temperaturas entre 15 y 25 °C y humedad relativa mayor a 90%, condiciones similares a las presentes en nuestro estudio.

Además el primer ensayo mostró en general mayores valores de pesos aéreos y radiculares que el segundo, debido también a las temperaturas más cálidas durante el mes de julio que favorecieron un mayor desarrollo de las plántulas.

Con respecto a los tratamientos que se destacaron con mayores valores de pesos aéreos y radiculares, hubo diferencias entre los dos ensayos en tierra. El aislamiento T0 fue el que mejor se comportó en el ensayo 1, mientras que el aislamiento T3 se destacó en el ensayo 2. Estas diferencias podrían atribuirse también a que principalmente la temperatura influyó en el desarrollo de los aislamientos en cada ensayo. Durante el mes de julio, dentro del invernáculo, la mayoría de los días registraron temperaturas cercanas a los 26 °C, lo que podría haber favorecido un mayor crecimiento y desarrollo de T0 (*T. longibrachiatum*). Como se mencionó en el capítulo II, *T. longibrachiatum* se caracteriza por crecer y sobrevivir en temperaturas cálidas por encima de los 35 °C y es más común de encontrarse en ambientes tropicales que en climas templados (Samuels *et al.*, 2012). Estas condiciones podrían darle una ventaja a T0 sobre T3 (*T. harzianum*) cuyas temperaturas óptimas de crecimiento son algo menores (Chaverry & Samuels, 2003).

La máxima reducción de la incidencia de mancha en red encontrada en nuestro estudio, fue cercana al 60%. Valores similares fueron encontrados por Elad *et al.* (1980), Lewis & Papavizas (1985) e Inbar *et al.* (1994) para el control de la incidencia del “damping-off” con aislamientos de *T. harzianum* en diferentes cultivos como poroto, algodón, rábano y pimiento. Estos resultados junto con los encontrados en nuestro estudio indican la eficacia de los tratamientos con *Trichoderma* spp. en el control fitosanitario.

Los mayores valores en la reducción de los porcentajes de severidad encontrados en nuestros ensayos con los aislamientos de *Trichoderma* spp estuvieron entre el 50 y 77%. Valores similares para la severidad de la mancha de la hoja de trigo *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvl. & Crous fueron registrados por Cordo *et al.* (2007) y Stocco *et al.* (2016) bajo condiciones de invernáculo, en plantas provenientes de semillas tratadas con aislamientos nativos de *T. harzianum*. También se reportaron valores similares en ensayos a campo en la disminución del porcentaje de severidad de *D. tritici-repentis* en hojas de trigo (Perelló *et al.*, 2003) y en el porcentaje de infección de *Alternaria alternata* en semillas de trigo (Mónaco *et al.*, 2004) utilizando aislamientos locales de *T. harzianum*. Estos resultados junto con los encontrados en nuestro estudio, remarcan la importancia en la

selección de aislamientos nativos, con gran adaptación a las condiciones agroecológicas del cultivo que se quiere proteger.

Son conocidas las habilidades que posee *Trichoderma* spp. en la competencia presente en la rizósfera. Según Ahmad & Baker (1987) los organismos competentes en la rizósfera, son aquellos capaces de colonizar la misma o la superficie de la raíz, cuando son aplicados en la semilla o sobre otra fuente puntual al momento de la siembra en ausencia de flujo de agua. De este modo, estos tienen la capacidad fisiológica y genética de proliferar a lo largo de la raíz y desarrollarse. Para asegurar el establecimiento y la supervivencia del agente de biocontrol y a la vez lograr efectos antagonicos a largo plazo, se seleccionó la metodología de inoculación en semillas. Para los microorganismos que se transmiten por semilla, como *D. teres*, el tratamiento de las mismas reduce tanto la cantidad de inóculo por semilla como el porcentaje de infección que se manifiesta en el cultivo (Neergaard, 1977). De acuerdo con Harman (1992) esta es la metodología más adecuada de aplicación del antagonista para cultivos de producción extensiva, ya que de este modo, se asegura el establecimiento y protección en todo el ciclo del cultivo. Diversos autores (Perelló *et al.*, 1997; Dal Bello *et al.*, 2002; Stocco *et al.*, 2009; Cordo *et al.*, 2012) utilizaron la técnica de aplicación de *Trichoderma* spp. en semilla con resultados promisorios. Además, como reportó Perelló *et al.* (1997, 2003), la habilidad de las especies de *Trichoderma* para sobrevivir sobre la superficie de las hojas decrece rápidamente cuando es aplicada como inóculo aéreo.

La metodología utilizada en nuestros ensayos para el tratamiento con *Trichoderma* spp. en semilla, consistió en sumergir sus raíces en las suspensiones de conidios de los diferentes aislamientos, 24 h antes de la siembra. De este modo el antagonista puede lograr una colonización efectiva en la raíz, evitando la competencia con la microflora del suelo y con el patógeno *D. teres*, que fue inoculado sobre el episperma. De acuerdo con Harman (1992), las primeras 12-24 h del tratamiento en semilla son cruciales en la colonización y establecimiento del agente biocontrolador y pueden marcar la diferencia entre su éxito y su fracaso. Durante el desarrollo de esta investigación se realizaron varias técnicas y ensayos en cámara e invernáculo, en los que se pusieron a punto y se probaron las eficiencias de varias metodologías de inoculación del patógeno y del antagonista. Se notó que el agregado de *Trichoderma* spp. en la semilla con sus raíces ya germinadas presentó una tendencia hacia mayores porcentajes de control del patógeno *D. teres* que los encontrados con la

técnica del “pelleteado” sobre la semilla no germinada. Observaciones similares fueron encontradas por Clavijo & Cotes (1998) quienes reportaron una mayor actividad endoquitinasa en exudados y extractos de semillas pregerminadas en presencia y ausencia del antagonista, que en los exudados y extractos de semillas no pregerminadas. Se podría suponer entonces, y en concordancia con estos autores, que el tratamiento fisiológico de pregerminación controlada y consecuente germinación, estimularía significativamente la actividad endoquitinolítica de las semillas. Esta metodología de inoculación además de permitir una rápida colonización y establecimiento del antagonista en las raíces, activaría las enzimas propias de las semillas para una respuesta de defensa más rápida ante el ataque de agentes fitopatógenos.

Durante esta investigación, no se encontraron semillas de cebada con altos porcentajes de infección natural de *D. teres*. Por esta razón el patógeno fue inoculado artificialmente sobre la semilla, para asegurar una transmisión efectiva hacia la plántula y observable en condiciones de invernáculo. Es conocido y se ha reportado el rol epidemiológico de la semilla infectada en la introducción y posterior desarrollo de mancha en red, sobre todo donde se implanta cebada por primera vez o donde se realiza la rotación de cultivos (Hamptom, 1980; Carmona *et al.*, 2008). Piening (1968) estableció que lotes de semillas con 1% de infección de *D. teres* podrían ser significativos en el posterior desarrollo de la enfermedad. Jordan (1981) y Forcelini (1990) encontraron una alta severidad de mancha en red en los cultivos implantados en campos en los cuales no se había sembrado cebada al menos por cuatro años. Ante la falta de rastrojo, como fuente de inóculo, estos autores atribuyeron la severidad de la enfermedad al inóculo proveniente de la semilla. Carmona *et al.* (1999, 2008) determinaron que la tasa de transmisión de *D. teres* de semilla a plántula en condiciones de invernáculo es del 9%, mientras que en condiciones de campo es del 20%. De acuerdo con Carmona *et al.* (2004) aunque la transmisión a la plántula siempre es baja respecto a la infección de la semilla, la esporulación en los coleoptiles y plúmulas podrían tener un importante rol en las epidemias de mancha en red a campo. En dichas condiciones, la humedad relativa del canopeo, las corrientes de aire y las salpicaduras de lluvia pueden acelerar el inicio de infecciones secundarias. Por esta razón bajo condiciones de campo, el rol de la semilla infectada podría ser mucho más importante que en invernáculo. Serán necesarios futuros estudios en condiciones de campo para

determinar la eficiencia de los aislamientos de *Trichoderma* spp. en el control de *D. teres* cuando es transmitido por semilla.

El control de *D. teres* en este caso estuvo mediado por una respuesta de defensa a nivel bioquímico y/o fisiológico de la planta, ya que no hubo contacto directo entre el antagonista aplicado en las raíces y el patógeno proveniente de la semilla y establecido en la parte aérea. Está reportado que *Trichoderma* spp. produce elicitores capaces de provocar respuestas de defensa en las plantas (Bolton, 2009; Harman *et al.*, 2012). Estos elicitores conformados por compuestos de bajo peso molecular, péptidos y proteínas, incluyen a la enzima proteolítica serin-proteasa (Harman *et al.*, 2004). Algunos autores (Segarra *et al.*, 2002; Cordo *et al.*, 2007) atribuyen que el tratamiento con determinados aislamientos de *T. harzianum* produce una respuesta de resistencia sistémica inducida sobre la mancha de la hoja de trigo, a través de elicitores como la serin-proteasa. Para complementar los resultados de nuestros estudios realizados *in vivo* serán necesarias futuras investigaciones tendientes a identificar los mecanismos bioquímicos de defensa en plantas de cebada infectadas con *D. teres* y tratadas con *Trichoderma* spp.

# CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

La “mancha en red” de la cebada es una enfermedad ocasionada por el patógeno fúngico *Drechslera teres*. Es importante en nuestro país, ya que produce pérdidas en la producción del orden del 20% afectando el peso y número de granos y la calidad de malta para la elaboración de cerveza.

Las principales fuentes de inóculo del patógeno son los restos culturales y las semillas de cebada infectadas. Es por esto que para evitar su propagación y dispersión es necesario priorizar su manejo. Entre las medidas tendientes a regular las poblaciones de los microorganismos fitopatógenos, teniendo en cuenta la sustentabilidad ecológica, se encuentra el biocontrol. En el marco de la búsqueda de estrategias sustentables para el control de la “mancha en red” en la Argentina, el objetivo de la presente tesis fue realizar estudios de biocontrol sobre el patógeno *D. teres* con aislamientos nativos de *Trichoderma* spp.

Para su desarrollo se plantearon los siguientes objetivos:

- Estudiar la interacción *in vitro* entre *Trichoderma* spp. y *D. teres*, para contribuir al conocimiento de los mecanismos biológicos que intervienen en la misma y su potencial aplicación para estudios de biocontrol.
- Determinar si los aislamientos de *Trichoderma* spp, probados *in vitro*, ejercen control *in vivo* en la transmisión del patógeno *D. teres* de semillas a plántulas de cebada.

A continuación se expondrán los principales aportes y las conclusiones de este trabajo de tesis y las perspectivas futuras para la continuación de esta línea de investigación.

### **Conclusiones**

- Tanto la caracterización morfológica como molecular realizada en nuestro estudio permitieron confirmar la naturaleza del agente fitopatógeno *Drechslera teres* y

diferenciar a los aislamientos del antagonista *Trichoderma* spp. en dos grupos taxonómicos: *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*.

- La evaluación de la capacidad antagonista *in vitro* mediante la confrontación directa de *Trichoderma* spp. con *D. teres*, permitió evidenciar que todos los aislamientos inhibieron el crecimiento del patógeno, siendo T3 el que presentó mayores valores para las tres cepas probadas.
- La técnica de confrontación directa permitió detectar la presencia de un compuesto pigmentado, con efecto fungistático, generado por *D. teres* solamente en presencia del antagonista.
- Las observaciones microscópicas evidenciaron signos de micoparasitismo, con *coiling* y micelio vacuolizado, sugiriendo que enzimas y metabolitos secundarios estarían interviniendo en estas interacciones, facilitando la hidrólisis de las paredes fúngicas del fitopatógeno.
- La implementación de las técnicas de microscopía confocal, espectrofluorometría y cromatografía en capa fina (TLC) permitieron caracterizar el pigmento generado por *D. teres* durante la confrontación con *Trichoderma* spp.
- A través del análisis por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) y resonancia magnética nuclear (NMR) se concluyó que al menos el compuesto de mayor concentración del pigmento era catenarina, un tipo de antraquinona con reportadas propiedades antibióticas y antifúngicas.
- A través de la técnica de los cultivos enfrentados se pudo no solo comprobar la disminución en el crecimiento y debilitamiento del micelio de *D. teres* por los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) liberados por *Trichoderma* spp., sino también distinguir diferencias en la capacidad antagonista de estos aislamientos.

- La metodología empleada para la extracción de VOCs en la confrontación de ambos microorganismos, reportada por primera vez en nuestro trabajo, permitió evidenciar que la presencia de *D. teres* estimuló una mayor producción de VOCs por parte del antagonista *Trichoderma* spp.
- El análisis cualitativo de los espectros de los VOCs liberados por *Trichoderma* spp. evidenció que los principales grupos de compuestos encontrados fueron los sesquiterpenos, diterpenos, terpenoides y compuestos de 8 carbonos, los cuáles poseen reportadas propiedades antifúngicas y como inductores de resistencia en las plantas.
- La realización de los ensayos *in vivo*, bajo condiciones de invernáculo, permitió la comprobación de los efectos observados por *Trichoderma* spp. en ensayos *in vitro*. Se pudo concluir que los aislamientos antagonistas que mejor se comportaron *in vitro* frente a *D. teres*, también lo hicieron cuando fueron probados en plántulas de cebada con “mancha en red”.
- Se evidenció que algunos aislamientos de *Trichoderma* spp. mostraron una tendencia hacia la promoción del crecimiento y vigorización de las plántulas de cebada, lo que posiblemente confiere ventajas a las plantas y minimiza el impacto negativo causado por factores bióticos y abióticos.

Por todo lo antes expuesto podemos concluir que los objetivos antes propuestos fueron cumplidos.

### **Perspectivas**

Los estudios *in vitro* llevados a cabo durante esta investigación permitieron aportar conocimiento sobre los mecanismos biológicos que intervienen en la interacción *Trichoderma* spp. - *D. teres*, temática aún no abordada en la Argentina. Además, se pudo comprobar la eficiencia *in vivo* de aislamientos de *Trichoderma* spp. nativos probados *in*

*vitro*, destacando la importancia en el empleo de microorganismos adaptados a las condiciones agroecológicas del cultivo de cebada.

Todos los resultados obtenidos en el presente trabajo han generado el planteo de futuros estudios con miras a ampliar el conocimiento acerca de la utilización de *Trichoderma* spp. como agente de control biológico de *D. teres* y otros fitopatógenos en la Argentina:

- Conociendo la gran variabilidad de caracteres bioquímicos y fisiológicos que existe dentro del complejo de especies *T. harzianum*, para llegar a una correcta identificación de los aislamientos y poder incorporarlos como agentes de control biológico, deberán emplearse en conjunto más de un marcador molecular y características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas.
- Se plantea en un futuro indagar sobre la naturaleza de los compuestos liberados por los microorganismos antagonistas en la confrontación con *D. teres* ya que serían muy útiles para ser empleados en la industria de productos fitosanitarios de origen biológico.
- A partir de la detección del pigmento generado por *D. teres* durante la confrontación con *Trichoderma* spp. se plantea la realización de bioensayos para probar su eficiencia en el control de otros fitopatógenos, para su potencial uso en prácticas alternativas de manejo.
- La evaluación de los diferentes VOCs en su capacidad de inhibir el crecimiento de *D. teres* y otros fitopatógenos, podría constituir una línea de investigación relevante para el control de enfermedades fúngicas.
- Debido a que tanto la virulencia de las cepas patógenas como las condiciones medioambientales ejercen influencia directa sobre el patosistema estudiado, se necesitarán futuros estudios a campo utilizando otras cepas de *D. teres* con

diferentes virulencias, para probar la eficiencia de los antagonistas empleados en nuestro trabajo.

- Si bien se observó cierta tendencia de algunos aislamientos de *Trichoderma* spp. hacia la promoción del crecimiento y vigorización, fue variable en los ensayos, por esto serían necesarias más pruebas bajo condiciones de invernáculo y a campo para su confirmación.

# BIBLIOGRAFÍA

Adams, R.P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry. 4.ed. Illinois: Allured Publishing Corporation. 803p

Agrios, G. N. 2005. Chap. I Introduction. En Plant Pathology, Fifth Edition Elsevier Academic Press. 4-74 pp.

Agüero, L.E.M., Alvarado, R., Martínez, A. & Dorta, B. 2008. Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin b1 production in stored maize grains exposed to volatile compounds of *Trichoderma harzianum rifai*. Interciencia 33: 219–222.

Ahmad, J.S. & Baker, R. 1987. Rizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 77: 182–189.

Ahmed, A.S., Ezziyyani, M., Pérez Sánchez, C. & Candela, M.E. 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. European Journal of Plant Pathology 109: 633–637.

Aidemark, M., Tjellström, H., Sandelius, A.S., Stålbrand, H., Andreasson, E., Rasmusson, A.G. & Widell, S. 2010. *Trichoderma viride* cellulase induces resistance to the antibiotic pore-forming peptide alamethicin associated with changes in the plasma membrane lipid composition of tobacco BY-2 cells. BMC Plant Biology. 10: 1–13.

Akaike H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. 1983. En: Petrov BN, Csaki F (Eds.). Second International Symposium on Information Theory. Budapest (Hungary): Akademiai Kiado, 1973: 267–281.

Alcorn, J.L.. Generic concepts in Drechslera, Bipolaris and Exserohilum. Mycotaxon 17: 1-86.

Andrade O. 2010 La Mancha en red o Mancha reticulada de la hoja de la cebada. [http://www.eeagrodelSur.cl/docs/Mancha\\_en\\_red\\_o\\_reticulada\\_de\\_la\\_hoja\\_de\\_la\\_cebada.pdf](http://www.eeagrodelSur.cl/docs/Mancha_en_red_o_reticulada_de_la_hoja_de_la_cebada.pdf).

Apple, J. 1977. The theory of disease management in plant disease. An advance treatise. Academic Press, New York , 465 pp.

Aquino-Martínez, J.G., Vázquez-García L.M., & Reyes-Reyes B.G. 2008. Biocontrol *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans con Hongos Antagonistas Nativos de la Zona Florícola de Villa Guerrero, Estado de México. Revista Mexicana de Fitopatología. 26: 127–137.

Atanasova, L., Le Crom, S., Gruber, S., Couplier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C.P. & Druzhinina, I.S. 2013. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. BMC Genomics 14: 121.

Atanasova, L., Druzhinina I.S. & Jaklitsch, W.M. 2013. Two Hundred *Trichoderma* Species Recognized on the Basis of Molecular Phylogeny. In: *Trichoderma: Biology and applications*, Mukherjee P.K., Horwitz, B.A., Singh, U. S., Mukherjee, M. & Schmoll, M. (Eds). CAB International. pp. 10–42.

Baier, T. & Neuwirth E. 2007. “Excel::COM::R.” Computational Statistics 22(1): 91-108. <http://www.springerlink.com/index/uv6667814108258m.pdf> (Accessed November 3, 2011)

Baker, K.F., & Cook, R.J. 1974 Biological Control of Plant Pathogens. Freeman. San Francisco, CA, EEUU. 432 pp.

Baker, S.E., Perrone, G., Richardson, N.M., Gallo, A., & Kubicek, C.P. 2012. Phylogenomic analysis of polyketide synthase – encoding genes in *Trichoderma*. Microbiology 158: 147–154.

Berbee, M. L. 1996. Loculoascomycete origins and evolution of filamentous ascomycete morphology based on 18S rRNA gene sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, 13(3): 462-470.

Bell, A.A., & Wheeler, M.H. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology* 24: 411–451.

Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C. & Codón, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249–60.

Bisset, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma* I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Canadian Journal of Botany* 62: 924–931.

Bissett, J., Gams, W., Jaklitsch, W. & Samuels, G.J. 2015. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA FUNgUs* 6: 263–295.

Blakeman, J.P. 1993. Pathogens in the foliar environment. *Plant Pathology* 42: 479-493.

Blumenthal, C. Z. 2004. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39(2): 214-228.

Boland, G. 1990. Biological control of plant diseases with fungal antagonists: challenges and opportunities. *Canadian Journal of Plant Pathology* 12: 295–299.

Bolsa de cereales y productos de Bahía Blanca (BCP) <http://www.bcp.org.ar/> informes de mercado 2015.

Bolton, M.D. 2009. Primary metabolism and plant defense-fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 5: 487–497.

Bouras, N. & Strelkov, S.E. 2008. The anthraquinone catenarin is phytotoxic and produced in leaves and kernels of wheat infected by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72: 87–95.

Burdon, J.J. & Silk, J. 1997. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. *Phytopathology* 87: 664-669.

Butler, M.J. & Day, A.W. 1998. Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology* 44: 1115–1136.

Caesar-Tonthat, T., Van Ommen, K.F., Geesey, G.G. & Henson, J.M. 1995. Melanin production by a filamentous soil fungus in response to copper and localization of copper sulfide by sulfide-silver staining. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1968–1975.

Calistru, C., McLean, M. & Berjak, P. 1997. *In vitro* studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. A study of the production of extracellular metabolites by *Trichoderma* species. *Mycopathologia* 137: 115–124.

Canadian Wheat Board (CWB) (<http://www.cwb.ca/public/en/>)- Informes anuales

Carmona, M. A. 1994. Distribución, incidencia y severidad de las enfermedades foliares de la cebada cervecera en la provincia de Buenos Aires en 1992. *Fitopatología* 29: 214–217.

Carmona, M. & Reis, E.M. 1998. Control de las enfermedades de los cereales de invierno mediante la reducción de las fuentes de inóculo. *Actas de conferencias del 5° Congreso Nacional de AAPRESID (Asociación Argentina de Productores de Siembra Directa)* 70–77p.

Carmona, M., Barreto, D. E., Reis, E. M. 1999. Detection, transmission and control of *Drechslera teres* in barley seed. *Seed Science and Technology*, 27: 761-769.

Carmona, M.A., Zweegman, J., & Reis, E.M. 2004. Detection and transmission of *Drechslera avenae* from oat seed. *Fitopatologia Brasileira* 29: 319–321.

Carmona, M. 2008. Manual para la Identificación y Manejo de las Enfermedades del Cultivo de cebada. Ed. Horizonte A. Buenos Aires.

Carmona, M.; Barreto, D.; Moschini, R. & Reis, E. 2008. Epidemiology and Control of Seed-borne *Drechslera teres* on Barley. *Cereal Research Communications* 36: 637–645.

Carmona, M.A. 2009. Enfermedades causadas por hongos necrotróficos. Manual de Identificación y manejo de las enfermedades del cultivo de la Cebada. 14–18.

Carmona, M.A., Barreto, D. & Romero, A.M. 2011 Enfermedades del cultivo. Importancia, síntomas y manejo integrado. Cap. 6. Cebada cervecera. Eds.: Miralles D.; Benech-Arnold R.L y Abeledo L.G. 1° Edición Buenos Aires. Orientación Gráfica editora 2011.

Carreras-Villasenor, N., Sánchez-Arreguín, J.A., & Herrera-Estrella, A.H. 2012. *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology* 158: 3–16.

Cattáneo, M. 2011. Los mercados de cebada cervecera en la Argentina y en el mundo. Cap. 10. Cebada cervecera. Eds.: Miralles D.; Benech-Arnold R.L y Abeledo L.G. 1° Edición Buenos Aires. Orientación Gráfica editora 2011.

Chaverri, P., Castlebury, L.A., Samuels, G.J. & Geiser, D.M. 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 302–313.

Chaverri, P. & Samuels, G.J. 2003 *Hypocrea* /*Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Studies in Mycology* 48: 1–116.

Chet, I., Harman, G. E., & Baker, R. 1981. *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbial Ecology* 7: 29–38.

Chet, I. & Inbar, J. 1994. Biological Control of Fungal Pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 48: 37–43.

Citron, C. A., Riclea, R., Brock N. L. & Dickschat, J.S. 2011. Biosynthesis of acorane sesquiterpenes by *Trichoderma*. *Journal of Royal Society of Chemistry Advances* 1: 290–297

Clavijo, A. & Cotes, A.M. 1998. Evaluación de la actividad quitinasa en procesos de control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate, mediante fitoinvigorización de semillas en presencia de *Trichoderma koningii*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 1: 58–66.

Cliquet, S. & Scheffer, R.J. 1996. Biological control of damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* using *Trichoderma* spp. applied as industrial film coatings on seeds. *European Journal of Plant Pathology* 102: 247–255.

Coley-Smith, J.R., Ridout, C.J., Mitchell, C.M. & Lynch, J.M., 1991. Control of bottom rot disease of lettuce (*Rhizoctonia solani*) using preparations of *Trichoderma viride*, *T. harzianum* or tolclofos methyl. *Plant Pathology* 40: 359–366.

Collins, R.P. & Halim, A.F. 1972. Characterization of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride* (Pers.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20: 437–438.

Combet, E.; Henderson, J.; Eastwood, D.C. & Burton, K.S. 2006. Eight-carbon volatiles in mushrooms and fungi: properties, analysis, and biosynthesis. *Mycoscience* 47: 317–326.

Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., & López-Bucio, J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and

promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149(3): 1579-1592.

Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Beltrán-Peña, E., Herrera-Estrella, A., & López-Bucio, J. 2011. *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal and camalex independent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Signaling & Behavior* 6: 1554–1563.

Contreras-Cornejo, H. A., Ortiz-Castro, R. & López-Bucio, J. 2013. Promotion of Plant Growth and the Induction of Systemic Defence by *Trichoderma*: Physiology, Genetics and Gene Expression. En *Trichoderma Biology and applications* (Eds.) Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Singh U. S. Mukherjee, M. & Schmoll, M. CAB International. 173-194 pp.

Cook, R.J. & Veseth, R.J. 1991. *Wheat health management*, APS Press, St. Paul. Minnesota.

Cooney, J.M., Lauren, D.R. & Di Menna, M.E. 2001 Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 522–526.

Cordo, C.A., Monaco, C.I., Segarra, C.I., Simon, M.R., Mansilla, A.Y., Perelló, A.E, Kripelz, N.I., Bayo, D. & Conde, R.D. 2007. *Trichoderma* spp. as elicitors of wheat plant defense responses against *Septoria tritici*. *Biocontrol Science and Technology* 17: 687–698.

Cordo, C., Simón, M.R., Stocco, M., Lampugnani, G., Abramoff, C., Kripelz, N., Mónaco, C. 2012. Aplicaciones de *Trichoderma harzianum* y su efecto sobre las curvas de progreso de la Septoriosis del trigo y el rendimiento. In Abstract of XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Section F93.

Cuellas, M. & Fernández, R. 2012. *Trichoderma* spp.: su efecto para el control de *Phytophthora* spp., en un cultivo de gerbera. Resúmenes XXXV Congreso Argentino de Horticultura.

Dal Bello, G.M., Mónaco, C.I. & Sisterna, M.N. 1994. Efecto de *Trichoderma* spp. sobre el control del tizón de la plántula en trigo ocasionada por *Bipolaris sorokiniana*. *Fitopatologia Brasileira* 19: 394–400.

Dal Bello, G.M., Mónaco, C. I. & Simón, M.R. 2002. Biological control of seedling blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* with beneficial rhizosphere microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 627–636.

Dal Bello, G. M. Mónaco C. I., Sisterna M. N. & Nico A. I. 2008. Relationship between an In Vitro and Greenhouse Assay for Biological Control of *Bipolaris sorokiniana*-Induced Seedling Blight of Wheat. *Biological Agriculture & Horticulture* 26: 103-119

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D.J. 2012. Model Test 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.

de Jonge, R., van Esse, H.P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M.H., & Thomma, B.P., 2010. Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* 329(5994):953-5

Deadman, M.L. & Cooke, B.M. 1987. Effects of net blotch on growth and yield of spring barley. *Annals of Applied Biology* 110: 33–425.

Delgado-Sanchez, P., Ortega-Amaro, M.A., Rodriguez-Hernandez, A.A., Jimenez-Bremont, J.F. & Flores, J. 2010. Further evidence from the effect of fungi on breaking *Opuntia* seed dormancy. *Plant Signaling & Behavior* 5: 1229–1230.

---

Demain, A. L., Fang, A., 2000. The natural functions of secondary metabolites. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 69: 1–39.

Dennis, C. & Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1): 41-48.

Di Rienzo, J.A., A.W. Guzmán, and F. Casanoves. 2002. “A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree.” *Journal of agricultural, biological, and environmental statistics* 7(2): 129–142.

Djonovic´, S., Pozo, M. J., Dangott, L. J., Howell, C. R. & Kenerley, C.M. 2006. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. 19: 838–853.

Drechsler, C. 1923. Some graminicolons species of *Helminthosporium*. I. *Journal of Agricultural research* 24(8): 641-739.

Druzhinina, I. & Kubicek, C.P. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters?. *Journal of Zhejiang University Science* 6: 100–112.

Druzhinina, I.S., Komon´-Zelazowska, M., Kredics, L., Hatvani, L., Antal, Z., Belayneh, T. & Kubicek, C.P. 2008. Alternative reproductive strategies of *Hypocrea orientalis* and genetically close but clonal *Trichoderma longibrachiatum*, both capable of causing invasive mycoses of humans. *Microbiology* 154: 3447–3459.

Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P. Komoń-Zelazowska M., Mulaw, T. B. & Bissett J. 2010. The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of

hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. *BMC Evolutionary Biology* 10 (1): 1-14

Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V. & Kubicek, C.P. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology* 9: 749–759.

Druzinina, I.S.; Komon-Zelazowska, M.; Ismaiel, A.; Jaklitsh, W.; Mullaw, T.; Samuels, G.J. & Kubicek, C.P. 2012. Molecular phylogeny and species delimitation in the Section Longibrachiatum of *Trichoderma*. *Fungal Genetics and Biology* 49: 358–368.

Dyngle, J.M. 1957. Life history studies in the genus *Hypocrea* Fr. *Transactions and Proceedings of the Royal Society of New Zealand* 84: 689–693.

Elad, Y., Chet I. & Katan, J. 1980. *Trichoderma harzianum*: A Biocontrol Agent Effective Against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70: 119–121.

Elad, Y.; Chet, I & Henis, I. 1981. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* sp. from soil. *Phytoparasitica* 71: 59–67.

Elad, Y., Chet, I., Boyle, P., & Henis, Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*-scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology*, 73(1): 85-88.

Elad, Y. 1996. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *European Journal of Plant Pathology* 102: 719–732.

Elad, Y. & Kapat, A. 1999. Role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocotrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 105: 177–189.

Elad, Y. 2000. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection* 19: 709–714.

El-Hasan, A., Walker, F. & Buchenauer, H. 2008. *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-pentyl-alpha-pyrone suppress fusaric acid produced by *Fusarium moniliforme*. *Journal of Phytopathology* 156: 79–87.

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

Engstrom, K. Brishmmar, S. Svensson, C. & Bengtsson, M. 1993. Anthraquinones from some *Drechslera* species and *Bipolaris sorokiniana*. *Mycological Research* 97 (3): 381-384.

Forcelini, C.A. & Reis, E.M. 1990. Efeito do tratamento de sementes de cevada com fungicidas no controle e desenvolvimento da mancha reticulada da folha causada por *Helminthosporium teres*. *Fitopatologia Brasileira* 12: 83–87.

Gams, W., Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Kubicek, C.P., Harman, G.E. (Eds.). *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor & Francis, London, pp 3–25.

Ghisalberti, E.L., Sivasithamparam, K., 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology & Biochemistry* 23: 1011–1020.

Goloboff, P., Farris, J. & Nixon, K. 2003. T.N.T: Tree analysis using new technology. Program and documentation, available from the authors, and at <http://www.zmuc.dk/public/phylogeny>

Guindon, S. & Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696–704.

Gullino, L.M. 1992. Integrated control of diseases in closed systems in the sub-tropics. *Pest Management Science* 36: 335–340.

Hadar, Y., Harman, G.E. & Taylor, A.G. 1984. Evaluation of *Trichoderma koningii* and *T. hartzianum* from New York soil for biological control of seed rot caused by *Pythium* spp. *Phytopathology* 74: 106–110.

Hajieghrari, B., Torabi-Giglou, M., Mohammadi, M.R. & Davari, M. 2008. Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic Fungi. *African Journal of Biotechnology* 7: 967–972.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95–98.

Harman, G. E. 1992. Development and benefits of rhizosphere competent fungi for biological control of plant pathogens. *Journal of Plant Nutrition* 15: 835–843.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews in Microbiology* 2: 43–56.

Harman, G.E. 2006. Overview of mechanism and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96: 190–194.

Harman, G.E. 2011a. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytologist* 189: 647–649.

Harman, G.E. 2011b. *Trichoderma* – not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica* 39: 103–108.

Harman, G.E., Herrera-Estrella, A.H., Horwitz, B.A. & Lorito, M. 2012. Special issue: *Trichoderma* – from basic biology to biotechnology. *Microbiology* 158: 1–2.

Hatvani, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., Nagy, A., Nagy, E., Vágvölgyi, C. & Kredics, L. 2007. Green mold diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. are caused by related but phylogenetically different *Trichoderma* species. *Phytopathology* 97: 532–537.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158: 17–25.

Herrera-Estrella, A. & Casas-Flores, S. 2011. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *European Journal of Plant Pathology* 131: 15–26.

Herrero-Garcia, E., Garzia, A., Cordobesa, S., Espeso, E.A. & Ugalde, U. 2011. 8-Carbon oxylipins inhibit germination and growth, and stimulate aerial conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biology* 115: 393–400.

Heydari, A. & Pessarakli, M. 2010. A Review on Biological Control of Fungal Plant Pathogens Using Microbial Antagonists. *Journal of Biological Sciences* 10: 273–290.

Howell, C. R. 1998. The role of antibiosis in biocontrol. In: Harman, G. E. and Kubicek, C.P. (Eds.). *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor and Francis, London. pp. 173–184.

Howell, C.R. 2006 Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology* 96: 178–180.

Hubbell, S.P., Wiemer, D.F. & Adejare, A. 1983. An antifungal terpenoid defends a neotropical tree (*Hymenaea*) against attack by fungus-growing ants (*Atta*). *Oecologia* 60: 321–327.

Hughes, S. J. 1958. Revisiones hyphomycetum aliquot cum appendice de nominibus rejiciendis. *Canadian Journal of Botany* 36(6): 727-836.

Humphris, S.N., Bruce, A., Bultjens, E. and Wheatley, R.E. 2002. The effects of volatile microbial secondary metabolites on protein synthesis in *Serpula lacrymans*. *FEMS Microbiology Letters* 210: 215–219.

Inbar, J., Abramsky, M., Cohen, D. & Chet, I. 1994. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. *European Journal of Plant Pathology* 100: 337–346.

Inbar, J.A., Menendez, A., Chet, I., 1996. Hyphal interaction between *Trichoderma* inositol-phosphoceramides from *Trichoderma viride* induce defense responses in cultured rice cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73: 74–78.

Inoue, Y., Shiraishi, A., Hada, T., Hirose, K., Hamashima, H. & Shimada, J. 2004. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiology Letters* 237: 325–331.

Istifadah, N.& McGee, P. A. 2006. Endophytic *Chaetomium globosum* reduces development of tan spot in wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Australasian Plant Pathology* 35: 411–418

Ito, S. 1930. On some new ascigerous stages of the species of *Helminthosporium* in cereals, *Proceedings of the Imperial Academy. Tokyo*, 6: 352–355.

Jacobs, K. A., & Rehner, S. A. 1998. Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia* 90 (4): 601-610.

Jacobson, E.S. 2000. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 708–717.

Jaklitsch, W.M. Samuels G. J., Dodd S. L., Lu, BS. & Druzhinina I. S. 2006. *Hypocrea rufa*/*Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies in Mycology* 55: 135–177.

Jaklitsch, W.M. 2009. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Studies in Mycology* 63: 1–91.

Jordan, V.W.L. 1981. Etiology of barley net blotch caused by *Pyrenophora teres* and some effects on yield. *The Plant Pathology Journal* 30: 77–87.

Kanjanamaneesathian, M., Phetcharat, V, Pengnoo, A. & Upawan, S. 2003. Use of *Trichoderma harzianum* cultured on ground mesocarp fibre of oil-palm as seed treatment to control *Pythium aphanidermatum*, a causal agent of damping-off of Chinese kale seedling. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 825–829.

Karolev, N., Rav David, D. & Elad, Y. 2008. The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma*-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Biological Control* 53: 667–682.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S. & Thierer, T. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647–1649.

- Keiper, F., Grcic, M., Capio, E. & Wallwork, H. 2008. Diagnostic microsatellite markers for the barley net blotch pathogens *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* and *Pyrenophora teres* f. *teres*. *Australasian Plant Pathology* 37: 428–430.
- Kenneth, R. 1962. On the taxonomy, morphology and geographic origin of *Pyrenophora teres* and allied species. *Bulletin of the Research Council of Israel* 11: 55–82.
- Khan, T.N. 1988. Relationship between net blotch (*Drechslera teres*) and losses in grain yield of barley in Western Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 38: 671–679.
- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R. & Takabayashi, J. 2007. Volatile 1-octen-3-ol induces a defensive response in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of General Plant Pathology* 73: 35–37.
- Kovats, E. 1965. Gas chromatographic comparison of organic substances in the retention index system. *Advances in Chromatography* 1: 229–247.
- Kramer, R., & Abraham, W. R. 2012. Volatile sesquiterpenes from fungi: what are they good for?. *Phytochemistry Reviews*, 11(1):15-37.
- Kredics, L., Antal, Z., Dóczy, I., Manczinger, L., Kevei, F. & Nagy, E. 2003. Clinical importance of the genus *Trichoderma*. A review. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 50: 105–117.
- Klein, D. & Eveleigh, D.E. 1998. Ecology of *Trichoderma*. En *Trichoderma* and *Gliocladium*. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics. Eds. Kubicek, C. P. & Harman G. E. Taylor & Francis Ltd. 57-69 pp.
- Kubicek, C.P. 2012. Molecular phylogeny and species delimitation in the Section Longibrachiatum of *Trichoderma*. *Fungal Genetics and Biology* 49: 358–368.

- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Börner, T., & Guého, E. 1999. Molecular reidentification of human pathogenic *Trichoderma* isolates as *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma citrinoviride*. *Medical mycology* 37(1): 25-33.
- Kullnig-Gradinger, C.M., Szakacs, G. & Kubicek, C.P. 2002. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigen approach. *Mycological Research* 106: 157–167
- Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G., & Brakhage, A. A. 2003. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology* 38: 143–158.
- Leisova, L., Kucera, L. & Minarikova, V. 2005. AFLP-based PCR markers that differentiate spot and net forms of *Pyrenophora teres*. *Plant Pathology* 54: 66–73.
- Leonard, K. J., & Suggs, E. G. 1974. *Setosphaeria prolata*, the ascigerous state of *Exserohilum prolatum*. *Mycologia*, 281-297.
- Lewis, J.A. & Papavizas, G.C. 1985. Effect of micelial preparations of *Trichoderma* and *Gliocladium* on population of *Rhizoctonia solani* and the incidence of Damping-Off. *Phytopathology* 75: 812–817.
- Lewis, J. A. & Lumsden, R. D. 2001. Biocontrol of damping-of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. *Crop Protection* 20(1):49-56.
- López-Mondéjar, R., Ros, M., Pascual, J.A. 2011. Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. *Biological Control* 56: 59–66.

Louw, J. P. J., Crous, P.W. Holz, G. 1996. Relative importance of the barley net blotch pathogens *Pyrenophora teres* f. *teres* (net-type) and *P. teres* f. *maculata*. African Plant Protection, 2(2): 89-95.

Lumsden, R. & Papavizas, G. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens. American Journal of Alternative Agriculture. 3(2-3): 98–101.

Luz, W.C. 1982. Diagnose das doenças da cevada no Brasil. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 24p. (EMBRAPA-CNPT. Circular Técnica, 2).

Macias-Rubalcava, M.L., Hernandez-Bautista, B.E., Oropeza, F., Duarte, G., Gonzalez, M.C., Glenn, A.E., Hanlin, R.T. & Anaya, A.L. 2010. Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodor yucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. Journal of Chemical Ecology 36: 1122–1131.

Martinez, A., Obertello, M., Pardo, A., Ocampo, J. A., & Godeas, A. 2004. Interactions between *Trichoderma pseudokoningii* strains and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. Mycorrhiza, 14(2): 79-84.

Mastouri, F., Björkman, T. & Harman, G.E. 2010. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. Biological Control 100: 1213–1221.

Mathre, D.E. 1997. Compendium of barley diseases. 2nd ed. APS Press. St. Paul, MN. 90p.

Mathre, D.E. 1982. Compendium of barley diseases. St. Paul: American Phitopathological Society, 78 p.

Mathys, J., De Cremer, K., Timmermans, P., Van Kerckhove, S., Lievens, B., Vanhaecke, M., Cammue, B.P.A. & De Coninck, B. 2012. Genome-wide characterization of ISR

induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma hamatum* T382 against *Botrytis cinerea* infection. *Frontiers in Plant Science* 3: 1–25.

Mayden, R.L. 1997. A hierarchy of species concepts: The delovement in the saga of the species problem. In: Claridge M.F., Dawah H.A. and Wilson M.R. (Eds.). *Species: The Units of Biodiversity*. . Chapman and Hall, London. pp. 381–424.

McDonald, W.C. & Buchannon, K.W. 1964. Barley yield reductions attributed to net blotch infection. *Canadian Plant Disease Survey* 44:118.

Mc Donald, B.A. & Linde C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40: 349–379.

McIntyre, M., Nielsen, J., Arnau, J., Brink, V.H., & Hansen, K. 2004. Proceedings of the 7th European Conference on Fungal Genetics. Copenhagen, Denmark.

MClean, L.S., Howlett, B.J. & Hollaway, G.J. 2009. Spot form of net blotch, caused by *Pyrenophora teres* f. *maculata*, is the most prevalent foliar disease of barley in Victoria, Australia. *Australasian Plant Pathology* 39: 46–49.

Mc Quilken, M.P., Halmer, P. & Rhodes, D.J. 1998. Application of microorganisms to seeds. In: Burgess, H.D. (Ed.), *Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 255–285.

Michereff, S.J., Silveira, N.S.S., Reis, A., & Mariano, R.L.R. 1994. Epiphytic bacteria antagonistic to *Curvularia* leaf spot of yam. *Microbial Ecology* 28: 101–110.

Migheli, Q., Balmas, V., Komon'-Zelazowska, M., Scherm, B., Fiori, S., Kopchinskiy, A.G., Kubicek, C.P. & Druzhinina, I.S. 2009. Soils of a Mediterranean hot spot of

biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-European, invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. *Environmental Microbiology* 11: 35–46.

Minerdi, D., Bossi, S., Maffei, M.E., Gullino, M.L. & Garibaldi, A. 2011 *Fusarium oxysporum* and its bacterial consortium promote lettuce growth and expansion A5 gene expression through microbial volatile organic compound (MVOC) emission. *FEMS Microbiology Ecology* 76: 342–351.

Ministerio de Agricultura de la Nación (MAGyP) [http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/informe Cebada junio 2016](http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/informe/Cebada_junio_2016).

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405–410.

Mónaco, C., Sisterna, M., Perello, A. & Dal Bello, G. 2004. Preliminary studies on biological control of the blackpoint complex of wheat in Argentina. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 285–290.

Mónaco, C., Rollán, M.C., Lampugnani, G. Arteta, N., Abramoff, C., Aprea, A. Ronco, L., Larrán, S. Stocco, M. y Dal Bello, G. 2006 Control biológico de la podredumbre del tallo del tomate causada por *Botrytis cinérea*. Resúmenes Jornada de Enfermedades en Cultivo Bajo Cubierta. 80-81 pp.

Moya, P. & Sisterna M. 2012. Estudios preliminares de biocontrol de “mancha en red” de la cebada, con cepas de *Trichoderma* spp. Ensayos *in vitro*. *Revista Sanidad de semillas* 6 (22): 49-51

Moya, P. & Sisterna, M. 2014. Inhibición del crecimiento de *Drechslera teres* por volátiles producidos por *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*. Libro de Resúmenes del 3er Congreso Argentino de Fitopatología. 397 p.

Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., & Kenerley, C.M., 2012. Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective. *Microbiology* 158: 35–45.

Mukherjee, P.K.; Horwitz B.A. Singh U.S. Mukherjee M. Schmoll M. 2013. *Trichoderma* in Agriculture, Industry and Medicine: An Overview. In: Mukherjee, P.K. et al. (Eds.). *Trichoderma: Biology and Applications*. CAB International. pp. 1–10.

Neegaard, P. 1979. *Seed Pathology*, vol. I and II. Revised Edition, Mac Millan Press, London, 1191 pp.

Nemcovic, M., Jakubikova, L., Viden, I. & Farkas, V. 2008. Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp. *FEMS Microbiology Letters* 284: 231–236.

Neumann, B. & Laing, M. 2006. *Trichoderma*: an ally in the quest for soil system sustainability. In: Uphoff, N.T. (Ed.), *Biological Approaches to Sustainable Soil Systems*. CRC, Taylor and Frances, New York, pp. 491–500.

Nirenberg, H.I. 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der Fusarium-Sektion Liseola. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 169: 1–117.

Nisikado, Y. 1928. Studies on the *Helminthosporium* diseases of Gramineae in Japan, *Berichte des Ohara Instituts für Landwirtschaftliche Biologie, Okayama Universität* 4: 111–126.

Nist. National Institute of Standards and Technology. PC version 2.0 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, software. Gaithersburg: NIST, 2008.

Park, M.S., Bae, K.S. & Yu, S.H. 2006. Two new species of *Trichoderma* associated with green mold of oyster mushroom cultivation in Korea. *Mycobiology* 34: 111–113.

- Perazzolli, M., Dagostin, S., Ferrari, A., Elad, Y. & Pertot, I. 2008. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. *Biological Control* 47: 228–234.
- Perelló, A. Mónaco, C. Cordo, C. 1997. Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium roseum* in controlling leaf blotch of wheat (*Septoria tritici*) under *in vitro* and greenhouse conditions. *Journal of Plant Diseases and Protection* 104 (6): 588-598,
- Perelló, A., Mónaco, C., Simón, M.R., Sisterna, M. & Dal-Bello, G. 2003. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. *Crop Protection* 22: 1099–1106.
- Perelló, A.E., Mónaco, C.I., Moreno, V. Cordo, C.A. & Simón, M.R. 2006. The effect of *Trichoderma harzianum* and *T. koningii* on the control of tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) and leaf blotch (*Mycosphaerella graminicola*) of wheat under field conditions in Argentina. *Biocontrol Science and Technology* 16: 803–813.
- Pereyra, S. 1996. Estrategias para el control químico de enfermedades en cebada. Boletín de divulgación N° 57. INIA, La Estanzuela. 20 p
- Pereyra, S.; Stewart, S.; Díaz, M. 2005. Manual para la identificación de enfermedades en cereales de invierno. 2ª ed. INIA Uruguay. Boletín de Divulgación N° 61.
- Pereyra, S. & Germán, S. 2010. Manchas foliares en cebada: reconocimiento, epidemiología y estrategias de manejo.. En: Seminario de Actualización Manejo de Enfermedades en Trigo y Cebada. Serie Actividades de difusión N. 618. INIA. pp.121–137.
- Persoon, C.H. 1794. Dispositio methodica fungorum. Römer's neues Magazin Botanische 1: 81–128.

Piening, L. 1968. Development of barley net blotch from infested straw and seed. *Canadian Journal of Plant Science* 48: 623–625.

Pill, W. G., Collins, C. M., Goldberger, B., & Gregory, N. 2009. Responses of non-primed or primed seeds of ‘Marketmore 76’ cucumber (*Cucumis sativus* L.) slurry coated with *Trichoderma* species to planting in growth media infested with *Pythium aphanidermatum*. *Scientia horticultrae*, 121(1): 54-62.

Polizzi, V., Adams, A., Picco, A.M., Adriaens, E., Lenoir, J., Van Peteghem, C., De Saeger, S., & De Kimpe, N. 2011. Influence of environmental conditions on production of volatiles by *Trichoderma atroviride* in relation with the sick building syndrome. *Build Environ* 46: 945–954.

Rau, D., Attene, G., Brown, A.H.D. Nanni, L., Maier, F. J., Balmas, V., Saba, E., Schäfer, W., Papa, R. 2007. Phylogeny and evolution of mating-type genes from *Pyrenophora teres*, the causal agent of barley “net blotch” disease. *Current Genetics* 51: 377–392.

Rayner, R.W. 1970. A mycological color chart. Commonwealth Mycological Institute. Key, Surrey and British mycological society.

Rehner, S.A. & Samuels, G.J. 1995. Molecular systematics of the Hypocreales: a teleomorph gene phylogeny and the status of their anamorphs. *Canadian Journal of Botany* 73: 816–823.

Reís E.M. 1991. Mancha en red de la cebada. Biología, epidemiología y control de *Drechslera teres*. Serie Técnica N° 3 Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria INIA. Montevideo, Uruguay.

Reis, E.M.; Barreto D. & Carmona, M. 1999. Patógenos de Semillas de Cereales de Inverno. Buenos Aires. Gráfica Condal S.R.L. Buenos Aires.

Reis, E.M., Casa Trezzi, R., Carmona, M.A. 2001. Elementos para el manejo de enfermedades En: Sarandón S.J (Ed.). AGROECOLOGIA: El camino para una agricultura sustentable”. Ediciones Científicas Americanas, La Plata, Argentina. pp. 275–308.

Reyes, Y.; Martínez B. & Infante, D. 2008. Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rizoctonia* sp. Rev. Protección Vegetal 23: 112–117.

Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological papers 116: 1–56.

Roberts, D.P., Lohrke, M.M., Meyer, S.L.F., Buyer, J.S., Bowers, J.H., Baker, C.J., Li, W., de Souza, J.T., Lewis, J.A., & Chung, S. 2005. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. Crop Protection 24: 141–155.

Rodríguez-Kabana, R., Kelly, W.D., Curl, E.A. 1978. Proteolytic activity of *Trichoderma viridae* in mixed culture with *Sclerotium rolfsii* in soil. Canadian Journal of Microbiology 24: 487–490.

Salas-Marina, M.A., Silva-Flores, M.A., Uresti-Rivera, E.E., Castro-Longoria, E., Sriram, S., Manasa, S.B., & Savitha, M.J. 2009. Potential use of elicitors from *Trichoderma* in induced systemic resistance for the management of *Phytophthora capsici* in red pepper. Biological Control 23: 449–456.

Salas-Marina, M.A., Silva-Flores, M.A., Uresti-Rivera, E.E., Castro-Longoria, E., Herrera-Estrella, A. & Casas-Flores, S. 2011. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. European Journal of Plant Pathology 131: 15–26.

Samuels, G.J. & Lodge, D.J. 1996. Three species of *Hypocrea* with stipitate stromata and *Trichoderma anmorphs*. Mycologia 88: 302–315.

Samuels, G. J., Dodd, S. L., Gams, W., Castlebury, L. A., & Petrini, O. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 94(1): 146-170.

Samuels, G. J. 2004. *Trichoderma* a guide to identification and biology. USDA Washington, DC (EUA). 40 p

Samuels, G.J., Dodd, S., Lu, B.-S., Petrini, O., Schroers, H.J., & Druzhinina, I.S. 2006a. The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology* 56: 67–133.

Samuels, G.J., S, Roosman, A. Chaverri, P. Overton, B. & Poldma, K.. 2006b. *Hipocreales* of the Southeastern United States: An identification guide. *CBs Biodiversity Series* 4: 1-145.

Samuels, G.J., Suarez, C., Solis, K., Holmes, K.A., Thomas, S.E., Ismaiel, A. and Evans, H.C. 2006 c. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America. *Mycological Research* 110, 381–392.

Samuels, G.J. & Ismaiel, A. 2009. *Trichoderma evansii* and *T. lieckfeldtia*: two new *T. hamatum*-like species. *Mycologia* 101: 142–156.

Samuels, J., Ismaiel, A., Mulaw, T. B., Szakcs, G., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P. & Jaklitsch, W.M. 2012 .The *Longibrachiatum* Clade of *Trichoderma*: a revision with new species. *Fungal Diversity* 55:77–108

Sanchez, V., Rebolledo, O., Picaso R.M., Cárdenas, E., Córdova, J., González, O., & Samuels, G. J. 2007. *In vitro* antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. *Mycopathologia* 163:49–58.

Sánchez, A.D, Barrera, V., Reybet, G.E., & Sosa, M.C. 2015. Biocontrol con *Trichoderma* spp. de *Fusarium oxysporum* causal del “mal de almácigos” en pre y post emergencia en cebolla. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata 114: 61–70.

Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: pp.5463–5467.

Segarra, C.I., Casalongue, C.A. Pinedo, M.L. Cordo, C. & Conde R.D. 2002. Changes in wheat leaf extracellular proteolytic activity after infection with *Septoria tritici*. Phytopathology 150: 105–111.

Seidl, V., Song, L., Lindquist, E., Gruber, S., Koptchinskiy, A., Zeilinger, S., Schmoll, M., Martínez, P., Sun, J., Grigoriev, I., Herrera-Estrella, A., Baker, S.E, & Kubicek, C.P. 2009. Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. BMC Genomics 10: 567.

Shalini Narayan, K.P., Lata, A.S., & Kotasthane, A.S. 2006. Genetic relatedness among *Trichoderma* isolates inhibiting a pathogenic fungi *Rhizoctonia solani*. African Journal of Biotechnology 5: 580–584.

Shipton, W.A. 1966. Effect of net blotch infection of barley on grain yield and quality. Australian journal of experimental agriculture and animal husbandry 6: 437–440.

Shoemaker, R.A. 1955. Biology, cytology, and taxonomy of *Cochliobolus sativus*. Canadian Journal of Botany 33(6): 562-576,

Shoemaker, R. A. 1959. Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated from “*Helminthosporium*”. Canadian Journal of Botany 37(5): 879-887.

Shoemaker, R.A. 1962. *Drechslera* Ito. Canadian Journal of Botany 40:809–836.

Shoresh, M., Harman, G.E., & Mastouri, F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology* 48: 21–43.

Schuster, A. & Schmoll, M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 787–799.

Sivanesan, A. 1987. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. Wallingford, UK. CAB International. Mycological Papers 158.

Smedergård-Petersen, V. 1971. *Pyrenophora teres* f. *maculata* f. nov. and *Pyrenophora teres* f. *teres* on barley in Denmark. In: Yearbook Roy. Vet. Agric. Univ., Copenhagen 124-144 pp.

Sreenivasaprasad, S. & Manibhushanrao, K. 1990. Antagonistic potential of *Gliocladium virens* and *Trichoderma longibrachiatum* to phytopathogenic fungi. *Mycopathologia* 109: 19–26.

Sriram, S., Manasa, S. B., & Savitha, M. J. 2009. Potential use of elicitors from *Trichoderma* in induced systemic resistance for the management of *Phytophthora capsici* in red pepper. *Journal of Biological Control*, 23(4): 449-456.

Steyaert, J.M., Weld, R.J., & Stewart, A. 2010. Ambient pH intrinsically influences *Trichoderma* conidiation and colony morphology. *Fungal Biology* 114: 198–208.

Stocco, M., Mónaco, C., Kripelz, N., Segarra, C., Lampugnani, G., Abramoff, C., Laporte, G. Arteta, N., & Cordo, C. 2009. Mecanismo de acción de *Trichoderma* spp. para el biocontrol de la Septoriosis del trigo. XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. 30 de septiembre, 1-2 de octubre. Santiago del Estero. Argentina. pp 89.

- Stocco, M.C., Mónaco, C.I., Abramoff, C., Lampugnani, G., Salerno, G., Kripelz, N., Cordo, C.A. & Consolo, V.F. 2016. Selection and characterization of Argentine isolates of *Trichoderma harzianum* for effective biocontrol of Septoria leaf blotch of wheat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R. & Schuhmacher, R. 2010. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Microbiological Methods* 81:187–193.
- Strobel, G., Singh, S.K., Riyaz-Ul-Hassan, S., Mitchell, A.M., Geary, B., & Sears, J. 2011. An endophytic/pathogenic *Phoma* sp. from creosote bush producing biologically active volatile compounds having fuel potential. *FEMS Microbiology Letters*. 320: 87–94.
- Szabó, M., Csepregi, K., Gálber, M., Virányi, F. & Fekete, C. 2012. Control plant-parasitic nematodes with *Trichoderma* species and nematode-trapping fungi: The role of chi18-5 and chi18-12 genes in nematode egg-parasitism *Biological Control* 63: 121–128.
- Talavera, G. & Castresana, J. 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology* 56: 564–577.
- Taylor, A.G., & Harman, G.E., 1990. Concepts and technologies of selected seed treatments. *Annual Review of Phytopathology* 28: 321–340.
- Taylor, A.G., Harman, G.E., & Nielsen, P.A. 1994. Biological seed treatments using *Trichoderma harzianum* for horticultural crops. *Hort Technology* 4: 105–109.
- Thrane, U., Poulsen, S. B., Nirenberg, H. I., & Lieckfeldt, E. 2001. Identification of *Trichoderma* strains by image analysis of HPLC chromatograms. *FEMS microbiology letters* 203(2): 249-255.

Tomasso, J.C. 2004. Cebada cervecera en la Argentina. En cebada, centeno y avena. 210-216 Idiia XXI.

Tulasne, L.R., & Tulasne, C. 1865. *Selecta Fungorum Carpologia*. Vol 3. Fussy Paris.

Uchiyama, R., Aoki, K., Sugimoto, H., Taka, N., Katayama, T., Itonori, S., Suita, M., Che, Kumagai F.S., H., & Yamamoto, K. 2009. Phosphocholine-containing glycosyl inositol-phosphoceramides from *Trichoderma viride* induce defense responses in cultured rice cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73(1): 74-78.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Barbetti, M.J., Li, H., Woo, S.L., & Lorito, M. 2008 a. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72: 80–86.

Vinale, F. Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L. & Lorito, M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. 2008 b. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1–10

Wakulinski, W., Kachlicki, P., Sobiczewski, P., Schollenberger, M., Zamorski, C.Z., Lotocka, B. & Sarova, J. 2003. Catenarin Production by Isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler and its Antimicrobial Activity. *Journal of Phytopathology* 151: 74–79.

Warcup, J. H. 1950. The soil-plate method for isolation of fungi from soil. *Nature* 166: 117 – 118.

Warren, R.A. & Ryder, M.H. 2005. Biological control of take-all disease of cereals using formulations of *Trichoderma* species. *Shandong Science* 8(3): 107-112.

Wheatley, R.E. 2002. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 357–364.

Wheatley, R.E. 2008. The role of soil microbial volatile products in community functional interactions. In: Karlovsky, P. (ed.). *Secondary Metabolites in Soil Ecology*. Springer, Berlin, Heidelberg, Germany, pp. 269–288.

Wijayawardene, N.N. Crous, P.W. Kirk, P.M., Hawksworth, D.L., Boonmee, S., Braun, U., Dai, D., D'souza, M. J., Diederich, P., Dissanayake, A., Doilom, M., Hongsanan S.

Jones, E. B. G., Groenewald, J. Z., Jayawardena, R., Lawrey, J. D., Liu, J.k., Lücking, R., Madrid, H., Manamgoda, D. S., Muggia, L., Nelsen, M. P., Phookamsak, R., Suetrong, S., Tanaka, K., Thambugala, K. M., Wanasinghe, D. N., Wikee, S., Zhang, Y., Aptroot, A. Ariyawansa, H. A., Bahkali, A. H., Bhat, D. J., Gueidan, C., Chomnunti, P., De Hoog, G. S., Knudsen, K., Li, W. J., McKenzie, E. H. C., Miller, A. N., Phillips, A. J. L., Piątek, M., Raja, H. A., Shivas, R. S., Slippers, B., Taylor, J. E., Tian, Q., Wang, Y., Woudenberg, J. H. C, Cai, L., Jaklitsch, W. M., &Hyde, K. D. 2014. Naming and outline of Dothideomycetes–2014 including proposals for the protection or suppression of generic names. *Fungal Diversity* 69: 1–55.

Williams, K.J., Smyl, C., Lichon, A., Wong, K.Y., &Wallwork, H. 2001. Development and use of an assay based on the polymerase chain reaction that differentiates the pathogens causing spot form and net form of net blotch of barley. *Australasian Plant Pathology*: 37–44.

Wolcan, S., Mónaco, C. Lori, G. 1998. Selección de microorganismos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en Argentina. Resúmenes 1er Congreso Argentino de Control Biológico de Enfermedades de las Plantas. P. 32.

Yedidia, I., Benhamou, N., & Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1061–1070.

Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y. and Chet, I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant Soil 235: 235–242.

Zhang, G., & Berbee, M. L. 2001. Pyrenophora phylogenetics inferred from ITS and glyceradehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. Mycologia 93 (6): 1048-1063.

Zeilinger, S.& Schuhmacher, R.. 2013. Volatile Organic Metabolites of *Trichoderma* spp.: Biosynthesis, Biology and Analytics. En *Trichoderma Biology and applications* (Eds.) Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Singh U. S.Mukherjee, M. & Schmoll, M. CAB International.10-42 pp.