

Universidad Nacional de La Plata



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

Trabajo Final

CONTROL BIOLÓGICO DE *Bipolaris sorokiniana*, PATÓGENO DE CEBADA TRANSMITIDO POR SEMILLAS, CON *Trichoderma harzianum*

Alumno: Ferraris, Nicolás

Legajo N°: 25954/0

DNI: 34.593.258

Correo electrónico: ferrarisnico89@gmail.com

Teléfono: (0221)-15-3091407

Directora: Esp. Ing. Agr. Cecilia Abramoff

Codirectora: Dra. Ing. Agr. Marina Stocco

Fecha de entrega: 23/02/2018

ÍNDICE

RESUMEN.....	03
INTRODUCCIÓN.....	04
Objetivos.....	10
Hipótesis.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
Determinación del porcentaje de infección y aislamientos de <i>Bipolaris sorokiniana</i> en cebada.....	11
Caracterización morfo cultural de <i>Bipolaris sorokiniana</i>	12
Ensayos <i>in vitro</i> para determinar la actividad antagonista de <i>Trichoderma</i> sp.....	13
Actividad biocontroladora de <i>Trichoderma</i> sp. frente a <i>B. sorokiniana</i> en plantas de cebada.....	14
RESULTADOS.....	16
Determinación del porcentaje de infección y aislamientos de <i>Bipolaris sorokiniana</i> en cebada.....	16
Caracterización morfo cultural de <i>Bipolaris sorokiniana</i>	17
Ensayos <i>in vitro</i> para determinar la actividad antagonista de <i>Trichoderma</i> sp.....	19
Actividad biocontroladora de <i>Trichoderma</i> sp. frente a <i>B. sorokiniana</i> en plantas de cebada.....	21
DISCUSIÓN.....	26
CONCLUSIÓN.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30
ANEXO.....	34
Tablas.....	34
Fotos.....	38

RESUMEN

El control biológico es una de las alternativas dentro del Manejo Integrado de Enfermedades para reducir el uso de productos fitosanitarios. El uso de organismos benéficos es la forma más empleada de biocontrol. En el presente trabajo se evaluó el porcentaje de infección natural en semillas de cebada con *Bipolaris sorokiniana* (patógeno que se transmite por semillas) y se determinó *in vitro* y en bioensayos la capacidad antagonista de seis cepas de *Trichoderma harzianum*. Además, se comprobó la capacidad del biocontrolador de promover el crecimiento de las plantas de cebada. Para los ensayos *in vitro* se realizaron cultivos duales, evaluando la inhibición y/o reducción del desarrollo del patógeno. En los bioensayos se determinó la reducción de la severidad de la enfermedad (en raíz, cuello y hojas) y el aumento de la biomasa total. Como resultado se observó que los porcentajes de infección natural de las semillas de cebada de las partidas analizadas fueron inferiores al 5 %. En las pruebas *in vitro*, la cepa Th 5cc fue la que presentó los mejores resultados como antagonista, aunque no se diferenció estadísticamente del resto de las cepas. En los bioensayos, la cepa Th 123 se destacó por reducir la severidad en raíz y cuello, con valores de 72,5 % y 63,9 %. Otra de las cepas que sobresalió fue Th 8, que presentó reducción de severidad en raíz en un 71,5 % y en primera hoja un 72,27 %. Las plantas tratadas con la cepa Th 118 presentaron un 25% más de peso que el testigo sano. De acuerdo con estos resultados, la utilización de cepas de *T. harzianum* como una alternativa biológica para el control de patógenos transmitidos por semilla y como promotoras del crecimiento de plantas de cebada, es factible en un programa de Manejo Integrado de Enfermedades.

INTRODUCCIÓN

La cebada es el cuarto cultivo en importancia en volumen producido, luego del maíz, el arroz y el trigo, según la FAO (2010). El 85% de la producción mundial se utiliza como forrajera y el resto es destinado a la industria cervecera. Por el contrario, en Argentina el principal destino de la cebada es la industria maltero-cervecera. En los últimos años, se ha incrementado la superficie destinada al cultivo de cebada, siendo la provincia de Buenos Aires la principal productora con el 93% de la superficie nacional. El promedio de superficie cultivada con cebada cervecera en los últimos años (campaña 2004 – 05 a 2014 – 15) en Argentina fue de 769.472 ha/año, con una producción media de 2.479.544 Tn/año y un rendimiento medio de 3.370 Kg/ha. (Boccardo *et al.*, 2015). La expansión del cultivo se debe básicamente a tres factores: cuestiones de manejo (ya que la cebada libera los lotes con anterioridad al trigo, permitiendo la temprana implantación de soja de segunda), genotipos disponibles en la actualidad en el mercado con rendimientos similares al trigo y su mayor facilidad de comercialización con respecto al trigo.

A la expansión del cultivo, se sumaron importantes progresos en la obtención de cultivares de alto potencial de rendimiento, de buena calidad comercial del grano (grano uniforme), de buen tamaño y buena calidad maltera-cervecera (Tomaso, 2004). Sin embargo, los progresos se ven afectados por la pérdida en la producción agrícola (tanto en cosecha como en poscosecha y en cultivos intensivos como en extensivos) que causan las enfermedades producidas por microorganismos fitopatógenos, tales como bacterias, nematodos u hongos. Dentro de los fitopatógenos, los hongos son uno de los principales grupos por la diversidad de especies existentes y por las pérdidas que originan (Benítez *et al.*, 1998; Papavizas, 1985). En este sentido, las principales enfermedades de la cebada son: la roya de la hoja, roya amarilla, mancha en red, mancha borrosa, escaldadura, oídio, carbón volador, el enanismo amarillo, el mosaico estriado (virosis), la espiga negra y el tizón bacteriano (bacteriosis) (Cátedra de Cerealicultura, 2014).

Algunas de estas enfermedades pueden ser transmitidas a través de la semilla, debido a que una gran proporción de patógenos pueden ser transportados por la misma y sobrevivir en ella por largos periodos de tiempo. Como ejemplo se pueden citar los reportes de Pereyra *et al.* (2011) quienes encontraron de 10 a 11 años de sobrevivencia de *B. sorokiniana* sobre semillas. Por lo tanto, la sanidad de la semilla merece especial consideración, y así también otros atributos que determinan su calidad, como los factores genéticos, físicos y fisiológicos (Neergaard, 1977). Los patógenos de semilla pueden ser llevados con, sobre o dentro de la misma y en condiciones ambientales favorables pueden ser transmitidos para causar enfermedades en la plántula en desarrollo o en la planta adulta. En algunas enfermedades el patógeno ataca la plántula en germinación afectando su establecimiento y, por tanto, el de la población del cultivo. La sola presencia de un patógeno en la semilla no asegura directamente la transmisión a las plántulas. La transmisión es afectada por el nivel de infección en la semilla, susceptibilidad y grado de resistencia del cultivo y condiciones del ambiente, particularmente humedad y temperatura (Singh & Mathur, 2004). Dentro de los agentes patógenos que pueden asociarse a las semillas, los hongos representan el mayor grupo seguidos por bacterias y en menor proporción virus y nematodos.

Para el cultivo de cebada, los patógenos citados que se transmiten con más eficacia por semilla son *Drechslera teres* (agente causal de la mancha en red), *Bipolaris sorokiniana* (agente causal de la mancha borrosa) y *Fusarium graminearum* (agente causal de la Fusariosis de la espiga y del tizón de la plántula en trigo y cebada).

Dentro de los hongos patógenos asociados a la semilla, la presente investigación hace hincapié en *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. (Anamorfo), teleomorfo *Cochliobolus sativus* (Ito & Kurib.) Drechler ex Dastur. Este patógeno está ubicado taxonómicamente en el Reino Fungi, subdivisión Ascomicotina, clase Loculoascomicetes, orden Pleosporales y familia Pleosporaceae. Se caracteriza por

presentar micelio y esporas marrón oliváceas. Sus conidios o esporas asexuales son de paredes gruesas, de forma elíptica o fusoidal. Su forma ascógena tiene pseudotecios negros, globosos, ostiolados, con un pico setoso y pseudoparáfisis. Es un patógeno importante de cebada que produce variados síntomas en cada una de las partes de un hospedante susceptible. Puede ser transportado en la semilla donde causa "escudete negro". En ese caso, si no se inhibe la germinación, puede manifestarse como "tizón de la plántula". En las plantas que sobreviven puede presentarse la "podredumbre del pie" o "podredumbre radical", mostrando una marcada decoloración alrededor de la base del tallo y a veces atizonamiento en el follaje. Cuando *B. sorokiniana* ataca la parte aérea, aparecen en las hojas manchas muy variables en tamaño y forma; son más evidentes después de espigazón y más frecuentes en las hojas basales. Esta expresión se conoce como "mancha borrosa de la hoja" y es una lesión marrón oscura que algunas veces presenta el centro un poco más claro (Sisterna, 2014; Melo Reis *et al.*, 1999).

El Manejo Integrado de Enfermedades es un conjunto de técnicas y tecnologías orientadas a la disminución de la incidencia de las enfermedades a niveles que se consideren tolerables y no necesariamente a su erradicación, tratando de regular y reducir a los organismos fitopatógenos. Entre estas técnicas se encuentran el manejo cultural, los cultivos de cobertura, la solarización, el control genético, el control biológico y el uso de agroquímicos en casos puntuales, entre otras (Mónaco, 2014).

Hasta el momento, el uso de fungicidas curasemillas constituye una de las técnicas más aplicadas para el control de patógenos de tipo necrotróficos. La manera tradicional de combatir las diferentes enfermedades se basa en el empleo de productos fitosanitarios (control químico), los cuales se caracterizan por una elevada eficacia y gran rapidez en el control, pero también por ser tóxicos inespecíficos que eliminan, junto con los organismos fitopatógenos, otros organismos benéficos (Mónaco, 2014). Este método no debe ser empleado como una medida de control aislada, sino que debe formar parte de un conjunto de estrategias tendientes a lograr

la disminución de los patógenos por debajo de los niveles que causan perjuicio económico. El avance del mejoramiento genético de la cebada cervecera en el país (control genético), no ha sido tan exitoso como para que sea una alternativa viable, ya que desmejora la calidad industrial.

Los inconvenientes que presenta el control químico se han incrementado en los últimos años, debido al cambio en los sistemas de cultivo (monocultivos, labranza reducida para los cultivos extensivos y manejo en invernáculo para los intensivos). Los productos químicos manifiestan pérdida de efectividad debido a que los fitopatógenos generan resistencia a los mismos por las altas dosis y la frecuencia de aplicación, principalmente a los fungicidas sistémicos. Muchas veces, estos productos químicos tienen problemas, por riesgos toxicológicos, por contaminación de los alimentos y del suelo y por su persistencia en el agua. Todo esto sumado a una mayor concientización social frente al creciente deterioro del medio ambiente que supone la utilización masiva de productos fitosanitarios, ha generado un gran interés en la búsqueda de sistemas de control alternativos (Benítez *et al.*, 1998; Homby, 1990; Chet *et al.*, 1997).

El método de control biológico es una posible alternativa al uso indiscriminado de los productos fitosanitarios, no presentando los efectos negativos en el ambiente como el control químico. Según Cook & Baker (1983) el control biológico, o biocontrol, es la reducción de la densidad de inóculo o de la actividad de un patógeno ya sea en estado activo o latente, como resultado de la acción de uno o más organismos denominados antagonistas. De acuerdo con Matta (1985), un antagonista es aquel microorganismo saprobio capaz de interferir en el ciclo de vida de los patógenos vegetales.

El control biológico se puede realizar mediante prácticas culturales que creen condiciones ambientales favorables para la acción de los antagonistas; mejorando genéticamente la capacidad del huésped para activar a los antagonistas naturales; mejorando genéticamente el potencial antagónico de los biocontroladores y mediante la introducción masiva de antagonistas, razas no patógenas u otros organismos

benéficos. Los costos de control biológico resultan menores y su eficiencia mayor respecto al uso de otras prácticas de control tradicionales, pues, aunque los antagonistas actúan en forma más lenta y en menor escala, su acción puede ser más estable y duradera que el control químico; en este caso, el efecto es temporal y se requieren aplicaciones continuas para lograr una protección adecuada de las plantas (Mónaco, 2014). Sin embargo, el control biológico tiene una serie de restricciones, limitaciones y requerimientos que deben conocerse: los organismos de control son mucho más sensibles a las condiciones ambientales que los productos químicos y tienen algunas limitaciones ecológicas, como su inactivación en el suelo por competencias con otros organismos o por efecto de sustancias químicas, como antibióticos o agroquímicos. Para su uso correcto, requieren de muy buen conocimiento de su biología, su ecología y su mecanismo de acción sobre los organismos que controlan. Además, es más interesante favorecer con prácticas adecuadas, el desarrollo de especies antagonistas nativas bien adaptadas al ambiente, en lugar de realizar la introducción masiva de antagonistas foráneos, los cuales pueden no adaptarse correctamente en este nuevo ambiente.

Los mecanismos de acción de los agentes de control biológico con base en la ecología microbiana incluyen acción directa sobre el patógeno a través de la antibiosis, competencia por nutrientes o nichos y parasitismo o lisis del agente patógeno. El otro mecanismo es indirecto y opera por alteración de la fisiología de la planta aumentando su capacidad de resistencia al ataque del patógeno, lo cual se denomina protección sistémica o resistencia inducida. Asimismo, algunos hongos y bacterias rizosféricas pueden promover el crecimiento de la planta, fortaleciendo sus sistemas naturales de defensa (Mónaco, 2014).

Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Papavizas *et al.*,

1982; Papavizas *et al.*, 1990). Actúan sobre una amplia variedad de hongos patógenos foliares y del suelo. Esto ha permitido que se empleen con éxito en cultivos a campo y bajo cubierta. *Trichoderma* spp. pertenece al Reino Fungi, Phylum Ascomycota, Subphylum Pezizomycotina; Clase Sordariomycetes (antes Pyrenomycetes), Orden Hipocreales, Familia Hipocreaceas, caracterizados por presentar los conidióforos ramificados asemejándose a un arbusto con forma piramidal; las células conidiógenas se denominan fiálides, poseen “forma de botella”, son angostas en la base, luego se ensanchan y terminan en un cuello largo y estrecho; los conidios son globosos a subglobosos u ovoides, con la pared normalmente lisa.

Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno son fundamentalmente de tres tipos: competencia directa por el espacio o por los nutrientes (Harman & Kubicek, 1998; Homby, 1990; Chet e Ibar., 1994; Chet *et al.*, 1997; Belanger *et al.*, 1995), producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil (Harman & Kubicek, 1998; Homby, 1990; Chet, 1987; Chet *et al.*, 1997) y parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre el hongo fitopatógeno (Harman & Kubicek, 1998; Chet *et al.*, 1997). Durante el micoparasitismo, el antagonista localiza al patógeno y se enrolla alrededor de las hifas de éste, provocando su muerte. Estos tres mecanismos no son excluyentes, sino que actúan sinérgicamente. La importancia relativa de cada uno de ellos depende de cada pareja de antagonista-patógeno y de las condiciones ambientales (Harman & Kubicek, 1998; Chet *et al.*, 1997; Belanger *et al.*, 1995). Sumado al efecto biocontrolador, se ha comprobado que la inoculación con *Trichoderma harzianum* aporta otros beneficios a las plantas. Como ejemplo, podemos mencionar que a través de la descomposición de materia orgánica libera nutrientes en formas disponibles para las plantas. Asimismo, presenta actividad solubilizadora de fosfatos, por lo cual se utiliza frecuentemente como un organismo biofertilizante en diferentes productos comerciales. Por otra parte, promueve el crecimiento y desarrollo de los cultivos produciendo metabolitos que estimulan los procesos de desarrollo vegetal. *Trichoderma* spp. tiene la capacidad de

multiplicarse en el suelo y colonizar las raíces de las plantas liberando hormonas de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas), que estimulan la germinación y el desarrollo de las plantas. Se ha reportado la producción de ácido 3-indol acético (AIA), sustancia que actúa como hormona vegetal favoreciendo el desarrollo del sistema radical, entre otros beneficios (Valencia *et al.*, 2005). Las sustancias producidas por *T. harzianum* promueven el desarrollo de los tejidos meristemáticos primarios en las partes jóvenes de la planta, acelerando su reproducción celular y logrando que se desarrollen más rápido (Ferraris *et al.*, 2016).

En el caso del tratamiento de semillas con *Trichoderma*, se emplea para el control de hongos fitopatógenos, con los objetivos de disminuir la infestación natural acompañante de las mismas, y darles protección en el nicho, al ser sembradas. Esta variante es muy utilizada por ser rápida, de fácil realización y economizar tiempo y recursos. En el proceso, es importante tener en cuenta la textura de las semillas y la incorporación de un adherente, para asegurar su recubrimiento con la dosis recomendada del producto (Martínez *et al.*, 2013).

El objetivo del presente trabajo es demostrar que las cepas de *Trichoderma harzianum* seleccionadas por su eficiencia en el control de patógenos de la semilla, tienen acción biofungicida sobre *Bipolaris sorokiniana*, patógeno de cebada transmitido por la semilla, y evidenciar con bioensayos específicos que estas cepas actúan como promotoras del crecimiento de las plantas de cebada por generar un aumento de la biomasa radicular y foliar.

OBJETIVOS

Evaluar la acción biofungicida de seis cepas de *Trichoderma harzianum* sobre *Bipolaris sorokiniana*, patógeno de cebada transmitido por la semilla.

Demostrar con bioensayos específicos el impacto generado por las cepas de *Trichoderma harzianum* con acción biocontroladora, a través del aumento significativo del crecimiento y desarrollo en plantas de cebada.

HIPÓTESIS

La inhibición y/o reducción del desarrollo del patógeno de cebada (*Bipolaris sorokiniana*) transmitido por la semilla, es factible con la utilización de cepas de *Trichoderma harzianum*, de reconocida actividad biocontroladora.

Las cepas de *Trichoderma harzianum* seleccionadas actúan como promotoras del crecimiento de las plantas de cebada, por generar un aumento de la biomasa radicular y foliar.

MATERIALES Y METODOS

Determinación del porcentaje de infección y aislamientos de *Bipolaris sorokiniana* en cebada

A partir de cuatro muestras de semillas de cebada (variedad Scarlet) provenientes de la provincia de Buenos Aires, se realizó la técnica de sanidad en semilla descrita por Melo Reis *et al.* (1999), para luego determinar el porcentaje de infección natural de *Bipolaris* sp.

Se analizaron, por cada una de las muestras, 400 semillas y se procedió a realizar la desinfestación o pretratamiento de las mismas en 4 repeticiones de 100. Para ello, se llevó a cabo el lavado de las semillas con agua potable de red, dejándola correr en forma continua durante 5 minutos, con el fin de eliminar impurezas que se encontrasen de forma accidental en su superficie. Posteriormente, trabajando en condiciones de esterilidad bajo flujo laminar, se desinfectaron las semillas con una solución de hipoclorito de sodio al 5% v/v, sumergiéndolas durante 5 minutos. Luego se realizó un enjuague de 5 minutos con agua destilada estéril con el fin de remover los residuos del desinfectante. Por último, se procedió al secado de las semillas colocándolas cuidadosamente con una pinza esterilizada sobre papel absorbente (Foto 1, anexo).

Una vez que las semillas estuvieron limpias, desinfectadas y secas se colocaron en cajas de Petri, debidamente esterilizadas, con medio de cultivo Agar Papa Glucosado 2% (APG 2%). Se sembraron 16 cajas de Petri con 25 semillas cada una, que fueron a incubación durante 7 días en cámara de cría con condiciones controladas de luz (fotoperiodo de luz negra para inducir esporulación de los hongos) y temperatura (20 °C +/- 2°C). Luego se procedió a la identificación visual de las colonias de *Bipolaris sorokiniana* formadas alrededor de las semillas, que presentaban características típicas de dicho hongo como lo describe Sisterna (2014). Para la confirmación de la identificación de *B. sorokiniana*, se realizaron preparaciones montadas en portaobjetos que fueron examinadas con el microscopio. Las colonias se

repicaron con ansa flameada y se colocaron sobre un portaobjeto con líquido de montaje (lactofenol con azul de Amman), de modo de poder visualizar las diferentes estructuras del hongo y realizar así su identificación, siguiendo la descripción de Melo Reis *et al.* (1999). A partir de la identificación visual de las colonias de *B. sorokiniana* se determinó el porcentaje de infección de las semillas con dicho patógeno. Los datos se analizaron estadísticamente con ANOVA para un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

Se obtuvo una colección de *B. sorokiniana* a partir de las colonias identificadas. Para ello, se repicó con un ansa previamente flameada en mechero y se sembró en medio de cultivo APG 2% en tubos de ensayos a modo de “pico de flauta”.

Caracterización morfocultural de *Bipolaris sorokiniana*

Se evaluó la tasa de crecimiento diario de las colonias midiendo su desarrollo sobre medio de cultivo APG 2%, hasta que cubrieron las caja de Petri en gran parte de su diámetro (momento en el que se estabilizó dicho crecimiento) (Foto 2, anexo). Con una regla milimetrada, se midieron dos diámetros perpendiculares de las colonias para calcular el valor promedio entre ambas medidas. Paralelamente, se determinó la coloración de las colonias y del medio de cultivo a través de la carta de colores de Rayner (1970). Por cada aislamiento se realizaron 3 repeticiones.

Para realizar este ensayo, se sembró un taco circular de APG cubierto de micelio y esporas (provenientes de 3 aislamientos al azar de la colección de *B. sorokiniana*) en el centro de las cajas de Petri, a temperatura ambiente para su desarrollo. Por último, se midieron 50 conidios de cada uno de los tres aislamientos en microscopio óptico con un ocular graduado y un aumento de 40x. De cada conidio se tomaron las medidas de sus diámetros perpendiculares y se determinó el número de pseudoseptos. El valor medio del largo y ancho de los conidios de cada aislamiento fue afectado por un factor de corrección para lograr el resultado final en μm .

Ensayos *in vitro* para determinar la actividad antagonista de *Trichoderma harzianum*

Selección de las cepas de T. harzianum

Se utilizaron 6 cepas de *T. harzianum* (Th 2, Th 8, Th 123, Th 160, Th 5cc y Th 118) (Stocco *et al.*, 2011), conservadas en el Banco Micológico del CIDEFI por el método del papel de filtro descrito por Stocco *et al.* (2010). Fueron seleccionadas por presentar niveles elevados de actividad enzimática (endoquitinasa, β 1,3 glucanasa y proteasas) (Stocco *et al.*, 2014), por reducir en más de un 90% los parámetros de severidad de la mancha de la hoja en trigo (*Zymoseptoria tritici*) (Stocco *et al.*, 2016) y por mantener su capacidad biocontroladora en condiciones de campo frente a esta enfermedad (Cordo *et al.*, 2012).

Preparación de cultivos puros de T. harzianum

A partir de las seis cepas seleccionadas de *T. harzianum*, se sembró en cajas de Petri (con medio de cultivo sólido APG 2%), un trozo de aproximadamente 1 cm de longitud del papel de filtro con el hongo conservado. Por último, los cultivos se llevaron a cámara de cría con condiciones controladas de luz y temperatura.

Cultivos duales

Se sembró un taco circular de APG cubierto de micelio y esporas de *B. sorokiniana*, en el centro de cajas de Petri (con APG 2%), el cual fue rodeado con 4 tacos circulares de APG cubiertos de micelio y esporas del antagonista, a modo de aristas de un cuadrado. Se realizaron 3 repeticiones por cada cepa de *T. harzianum* y, simultáneamente, se cultivó *B. sorokiniana* (3 repeticiones) como testigo.

Se midió la tasa de crecimiento diaria de las colonias de cada pareja patógeno-antagonista tomando en cuenta los dos diámetros perpendiculares y promediando su valor. Se dio por finalizado el ensayo cuando los testigos cubrieron completamente el diámetro de la caja. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante análisis de la varianza no paramétrico.

La determinación de la capacidad inhibidora de hongos antagonistas frente al crecimiento de hongos fitopatógenos se hizo utilizando la fórmula de índice de inhibición por competencia de sustrato (I_c) de Rojas (2000). Para ello, se tomó la medida de la distancia recorrida por el hongo fitopatógeno en presencia del antagonista (D_p) y la distancia recorrida en ausencia del antagonista (D_{tp}).

$$I_c = \frac{D_{tp} (cm) - D_p (cm)}{D_{tp} (cm)}$$

Actividad biocontroladora de *T. harzianum* frente a *B. sorokiniana* en plantas de cebada.

Se evaluó la acción biocontroladora de las mismas 6 cepas de *T. harzianum* utilizadas en los cultivos duales, en plantas de cebada. Se realizó a través de la reducción de los parámetros de severidad e incidencia de la enfermedad. Todos los tratamientos fueron comparados con un testigo (semillas inoculadas con el patógeno y sin aplicación del antagonista). Además, se determinó el desarrollo de las plantas a través del peso fresco total en estado de plántula (2 hojas), comparando estos resultados con los obtenidos a partir de un control (plántulas que provenían de semillas sanas sin peletear).

Preparación del inóculo de *B. sorokiniana*

Para la preparación del inóculo, con la finalidad de utilizar a las semillas de cebada como fuente nutritiva del patógeno, se las colocó humedecidas dentro de botellas de vidrio de 500 mL de volumen hasta llenar $\frac{3}{4}$ de las mismas. Luego, se esterilizaron 2 veces en autoclave. Se colocó, dentro del recipiente que contenía las semillas, una porción de agar colonizado por *B. sorokiniana* y se llevó a incubación durante 10 días en cámara de cría a 20°C con 12 horas de luz/oscuridad. Una vez colonizadas, las semillas se utilizaron como fuente de inóculo. (Foto 3, anexo).

Recubrimiento de las semillas con las cepas de *T. harzianum*

La aplicación del antagonista se realizó utilizando la técnica del recubrimiento (peleteado) descrita por Stocco *et al.* (2015). El primer paso fue la producción del inóculo de las cepas seleccionadas de *T. harzianum*, que fueron cultivadas en cajas de Petri con APG 2% e incubadas con fotoperiodo de 12 horas de luz/oscuridad a 20 °C +/- 2 °C durante 15 días. El segundo paso fue la obtención de una suspensión de conidios a partir de cada cepa. Para esto, las cajas de Petri con los cultivos de los antagonistas fueron inundadas con 5 mL de agua destilada estéril y se raspó la superficie del medio de cultivo con una varilla de vidrio estéril. Posteriormente, se filtró la suspensión a través de dos mallas tramada estéril sobre un vaso de precipitado. Para determinar la concentración de conidios de las suspensiones de cada cepa de *T. harzianum*, se utilizó la cámara de Neubauer. Para ello, se tomó una muestra de la suspensión con una pipeta de Pasteur y se colocó una gota sobre la cámara de conteo. Para cuantificar los conidios, se enfocó el área cuadrículada con el objetivo de 10x y luego con el de 40x, ajustándose a una concentración de 1×10^7 conidios/mL. Por último, se colocaron las semillas de cebada en 90 mL de Agar-agua al 2,5% con 10 mL de la suspensión de conidios de cada cepa y una gota de un tensioactivo, agitándolas a 120 rpm (en agitador magnético) durante 20 minutos (Foto 4, anexo). Luego de filtrar el líquido, las semillas se secaron sobre papel secante durante 24 hs.

Ensayo en plántula

En bandejas de germinación (speedling) de 50 celdas con un sustrato (mezcla de tierra negra y vermiculita), se sembró en cada celda una semilla peleteada con las cepas del antagonista junto al inóculo del patógeno. Para el testigo se sembraron semillas sin peletear junto con el inóculo del patógeno. El testigo sano consistió en sembrar sólo semillas de cebada desinfectadas previamente.

Las bandejas se mantuvieron sobre mesadas, dentro del edificio de la FCA y F (Aula Terapéutica Vegetal), hasta que las plántulas desplegaron totalmente la segunda

hoja. Diariamente se regaron y se registraron las temperaturas (máximas y mínimas) y la humedad ambiental (máxima y mínima). De esta manera se controló que las condiciones ambientales fueran las adecuadas para el desarrollo, tanto de las plántulas como de la enfermedad (Foto 5, anexo).

El diseño experimental realizado fue al azar con cinco repeticiones de cada tratamiento. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante análisis de la varianza con el programa InfoStat.

RESULTADOS

Determinación del porcentaje de infección y aislamientos de *Bipolaris sorokiniana* en cebada

De las 400 semillas de cada muestra se identificaron las colonias de *B. sorokiniana*, a partir de sus características típicas: tonalidades marrones oliváceas oscuras, presencia de tuff y formación de una capa de micelio aterciopelada, que varía de gris oscuro a negro, con abundante esporulación y márgenes ondulados a irregulares (Sisterna, 2014) (Foto 6, anexo). Para corroborar esta determinación, se observaron las estructuras del hongo en microscopio óptico, teniendo en cuenta la descripción realizada por Melo Reis *et al.* (1999): conidios color pardo oliva oscuro y de forma curva, recta, fusiforme o elipsoidal, estrechándose hacia los extremos redondeados, de paredes lisas y cicatriz basal prominente y con tres a diez septos (Foto 7, anexo). Una vez identificadas, se determinó el porcentaje de infección en las cuatro muestras.

Los resultados obtenidos en los ensayos de porcentaje de infección de *B. sorokiniana* en las cuatro muestras de cebada mostraron diferencias significativas utilizando el análisis de la varianza (ANOVA) (Tabla 1, anexo).

La muestra N° 2 se diferenci6 estadisticamente respecto al resto de las partidas analizadas, presentando el mayor valor de infecci6n natural (Figura 1). No obstante, estos valores para *B. sorokiniana* son bajos, no superando el 5 % en ninguna de las muestras. Esto indicaría que, para las partidas seleccionadas, la incidencia de la enfermedad transmitida por la semilla no es de consideraci6n.

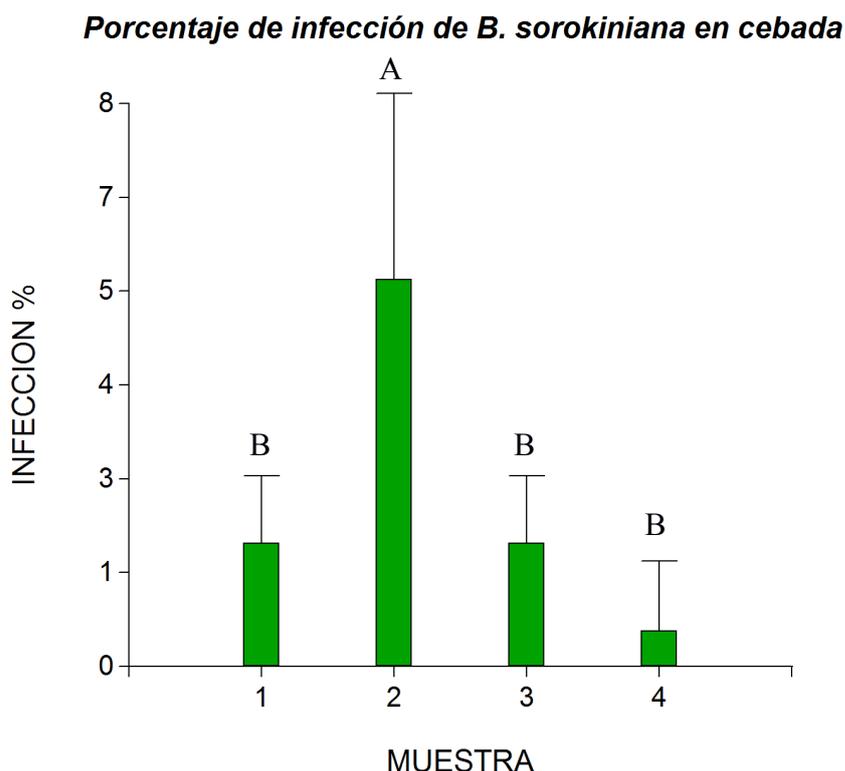


Figura 1. Porcentaje de infecci6n natural con *B. sorokiniana* en 4 muestras de semillas de cebada.

Se logró una colecci6n de 16 aislamientos de *B. sorokiniana*, proveniente de las colonias encontradas en las semillas. Posteriormente, se seleccionaron 3 que fueron utilizados para el resto de los ensayos. Se guardaron a 4°C para su conservaci6n.

Caracterizaci6n morfocultural de *Bipolaris sorokiniana*

Se evalu6 la tasa de crecimiento diario de las colonias de *B. sorokiniana* midiendo su desarrollo sobre APG 2% hasta que, a los 16 días, lograron cubrir las cajas de Petri desde la siembra del pat6geno. No se encontraron diferencias entre las

cepas 1 y 2 (Bs1 y 2) en cuanto a tiempo y diámetro de las colonias. En cambio, la cepa 3 (Bs3) no logró cubrir las cajas de Petri completamente en ese tiempo, mostrando valores inferiores de diámetro durante la duración del ensayo (Figura 2).

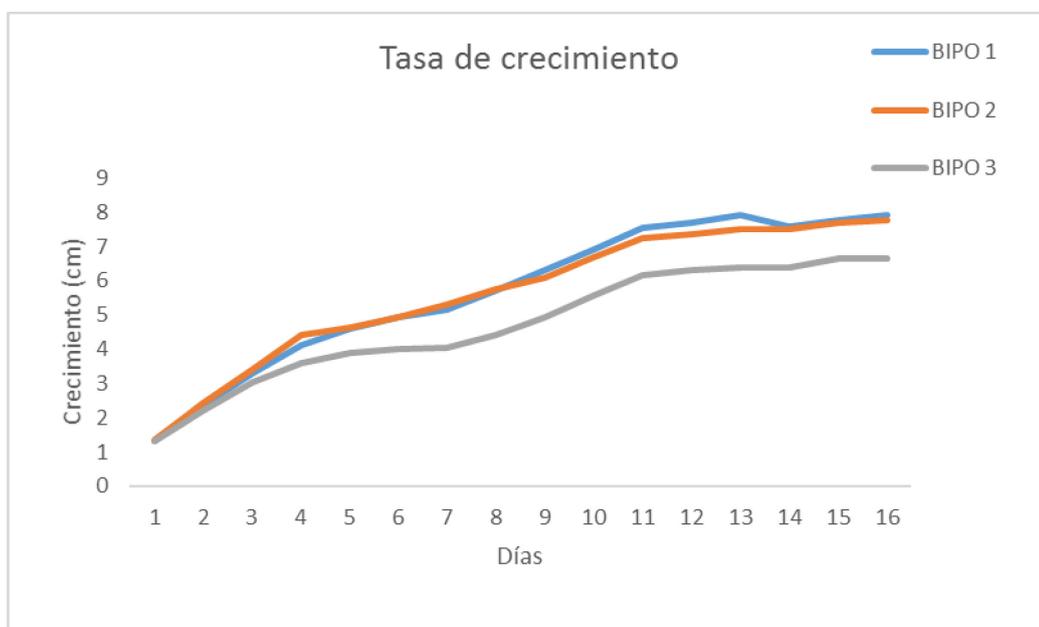


Figura 2. Tasa de crecimiento de las colonias de *B. sorokiniana* provenientes de 3 aislamientos.

Durante 4 días consecutivos se registró la coloración de las colonias utilizando la tabla de Rayner (1970) (Foto 8, anexo). En el primer y segundo día de observación, hubo diferencia de color entre los 3 aislamientos de *B. sorokiniana* analizados: gris oliváceo para Bs1, oliváceo para Bs2 y negro oliváceo para Bs3. En el tercer y cuarto día de análisis sólo presentó diferencia de color en el halo central el aislamiento Bs1 (gris oliváceo); el resto de los aislamientos (Bs2 y 3) presentaron idéntica coloración (negro oliváceo) (Tabla 2, anexo).

Los conidios de *B. sorokiniana* presentaron un ancho medio de 9,9 μm , una longitud media de 27,3 μm y un promedio de 4-5 septos para cada una de las cepas estudiadas. Estas características muestran diferencias respecto a las descritas por Sisterna (2014), quien reporta dimensiones de conidios que oscilan entre 17-28 μm x 40-120 μm y de 3-12 pero comúnmente de 6-10 tabiques.

Ensayos *in vitro* para determinar la actividad antagonista de *Trichoderma harzianum*

La duración del ensayo fue de tres días debido a que, entre el segundo y el tercer día, la tasa de crecimiento del patógeno (Bs1) disminuyó hasta mantenerse invariable, momento en el que se observó la mayor capacidad inhibitoria de las cepas de *T. harzianum* (Foto 9, anexo).

Se analizaron los datos estadísticamente, comparando el crecimiento del patógeno junto a cada una de las 6 cepas del antagonista y un testigo sólo con *B. sorokiniana*. Con el análisis de la varianza (ANOVA), se pudo determinar que los resultados de competencia esperados se dieron con mayor intensidad al tercer día de iniciado el ensayo. En el día 1 y el día 2, los resultados no arrojaron diferencias significativas entre los tratamientos, presentando un valor de $p=0,3041$ y un valor $p=0,8779$, respectivamente, siendo estos mayores al valor de referencia $p=0,05$ (Tabla 3 y 4 anexo). Esto significa que, para ambos días analizados, ningún tratamiento se destacó respecto a los demás. Para el día 3, se realizó un análisis de la varianza no paramétrico, dado que los datos no cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad (Tabla 5, anexo). El testigo presentó el mayor diámetro de crecimiento de las colonias. El tratamiento Th 160 no se diferenció del testigo (presentan letras iguales). El resto de los tratamientos (Th 118, Th 123, Th 2, Th 5cc y Th 8), se diferenciaron del testigo presentando valores de crecimiento menores que este (Figura 3). No obstante, el tratamiento Th 5cc se destacó como el mejor antagonista debido a que logró el menor crecimiento de la colonia del patógeno.

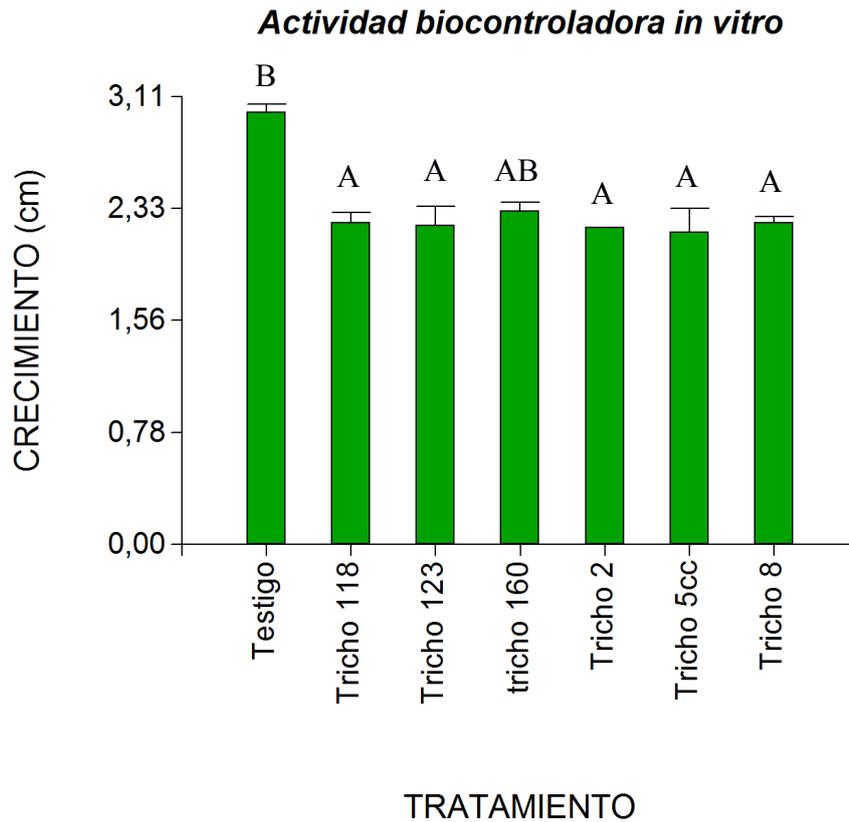


Figura 3. Crecimiento de *B. sorokiniana* con distintas cepas de *T. harzianum*, al tercer día de comenzado el ensayo, revelando la capacidad de inhibición del antagonista.

Debido a que los resultados de competencia esperados entre *Bipolaris* y *Trichoderma* se dieron con mayor intensidad en el tercer día, con los datos obtenidos se determinó la capacidad inhibitoria mediante la fórmula de inhibición por competencia de sustrato (Ic) (Rojas, 2000). Los valores de Ic obtenidos muestran que el tratamiento Th 160 fue el que presentó el menor índice de inhibición por sustrato. Contrariamente, el tratamiento Th 5cc se destacó por el mayor valor de Ic, lo que significa que es la cepa de mejor comportamiento (Figura 4).

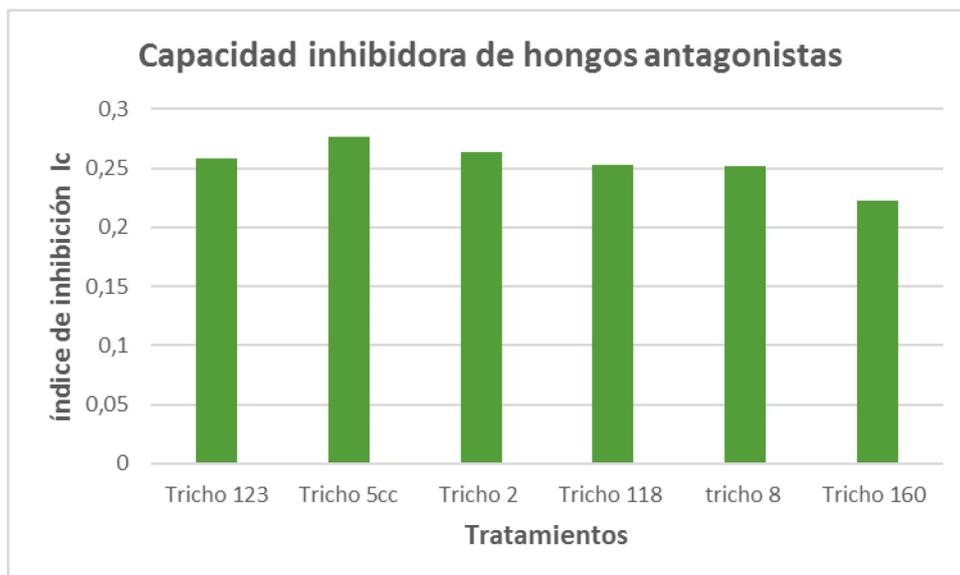


Figura 4. Efecto de cepas de *T. harzianum* sobre el crecimiento de *B. sorokiniana*.

Actividad biocontroladora de *Trichoderma* sp. frente a *B. sorokiniana* en plantas de cebada

Para los bioensayos en plántula, los resultados se analizaron estadísticamente con el análisis de la varianza (ANOVA). Se evaluaron el peso total y la severidad de la enfermedad en la raíz, cuello, primera hoja y segunda hoja.

Para la variable peso total, los tratamientos estudiados presentaron un valor de $p=0,0007$, menor al valor de referencia $p=0,05$, lo que sugiere que existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Tabla 6, anexo). De acuerdo con la prueba LSD de Fisher el tratamiento Th 118 presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo y al resto de los tratamientos, destacándose por tener un 25% más de peso que el testigo (Figura 5).

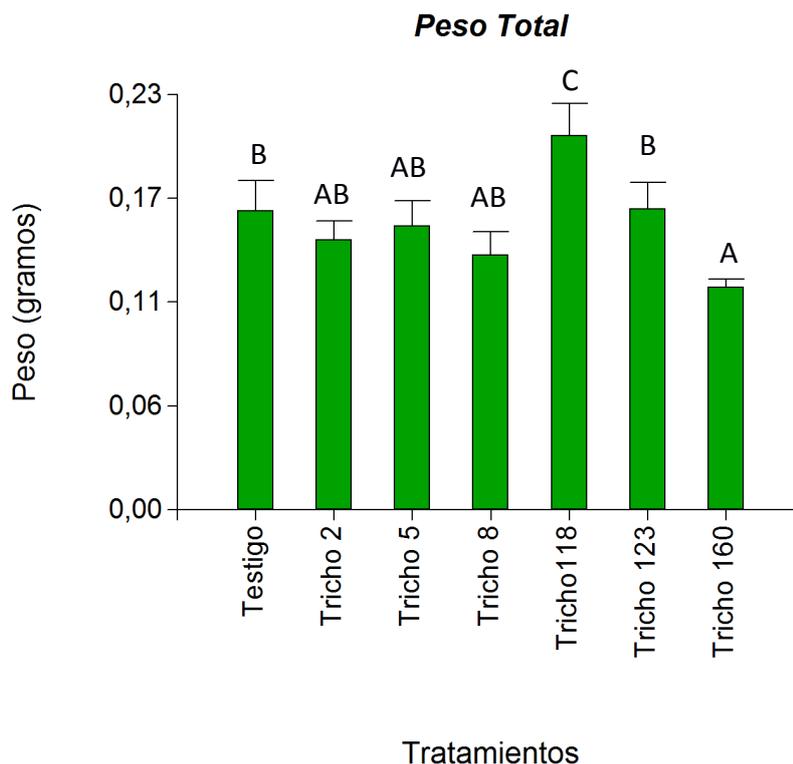


Figura 5. Efecto de las cepas de *T. harzianum* sobre la variable peso total.

Para la determinación de las variables severidad de la enfermedad en la raíz, cuello, primera y segunda hoja, se tuvieron en cuenta los resultados del tratamiento “testigo + *Bipolaris*”.

Considerando la variable porcentaje de **severidad de la raíz**, el valor obtenido $p=0,0012$, menor al valor de referencia $p=0,05$, indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Tabla 7, anexo). De acuerdo con la prueba LSD de Fisher, los tratamientos Th 123 y Th 8 presentan diferencias estadísticamente significativas con el testigo inoculado con *B. sorokiniana*, destacándose por tener un 72,5 % y 71,5 % menor de severidad, respectivamente. La cepa 118 presentó el mayor valor de severidad, no diferenciándose del testigo (Figura 6).

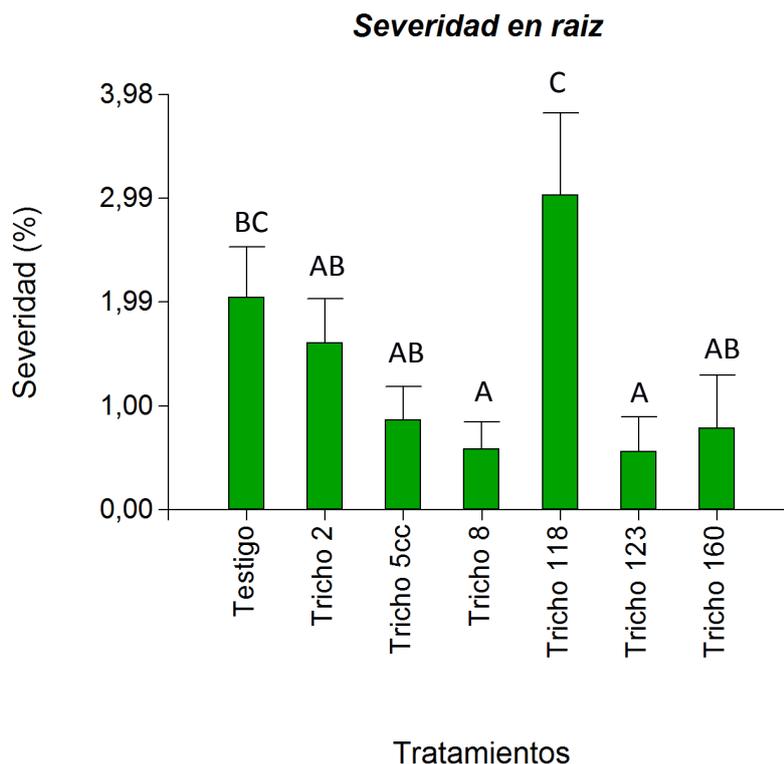


Figura 6. Efecto de cepas de *T. harzianum* sobre la variable severidad (%) en la raíz.

Considerando los resultados del análisis de la varianza para la variable porcentaje de **severidad del cuello**, el valor obtenido $p=0,0075$, menor al valor de referencia $p=0,05$, sugiere que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Tabla 8, anexo). De acuerdo a la prueba LSD de Fisher, los tratamientos Th 2, Th 5cc y Th 123 se destacaron por presentar menor severidad que el testigo inoculado con *B. sorokiniana* (83,2%, 78,5% y 63,9% respectivamente) (Figura 7).

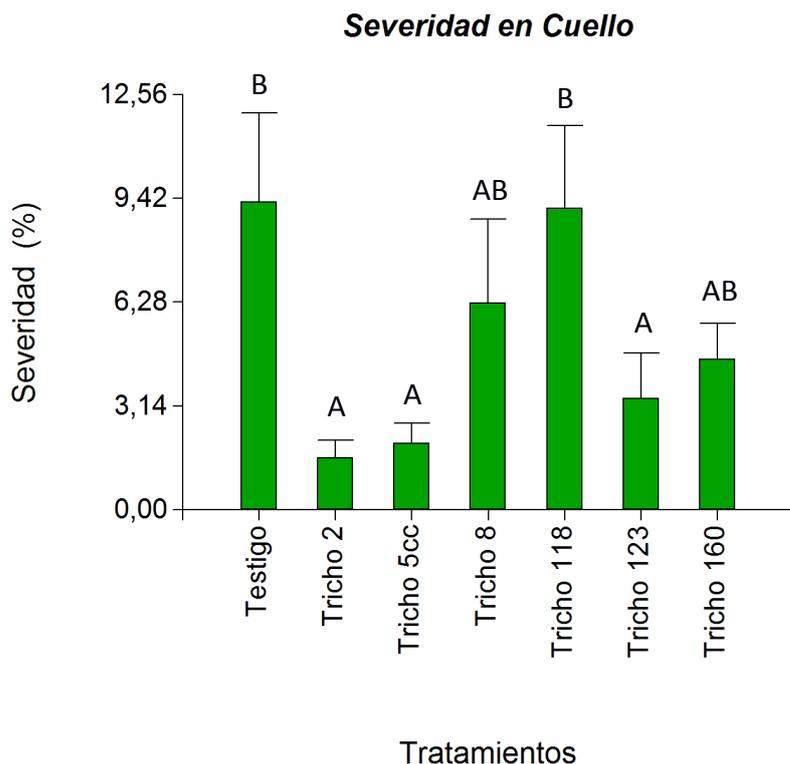


Figura 7. Efecto de cepas de *T. harzianum* sobre la variable severidad (%) en cuello.

Considerando los resultados del análisis de la varianza para la variable porcentaje de **severidad para la primera hoja**, el valor $p=0,7853$ fue mayor al valor de referencia $p=0,05$, lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Tabla 9, anexo). Sin embargo, se observó una tendencia a la reducción de la enfermedad por parte de la cepa Th 8 que redujo en un 72,27 % la severidad en primera hoja (Figura 8).

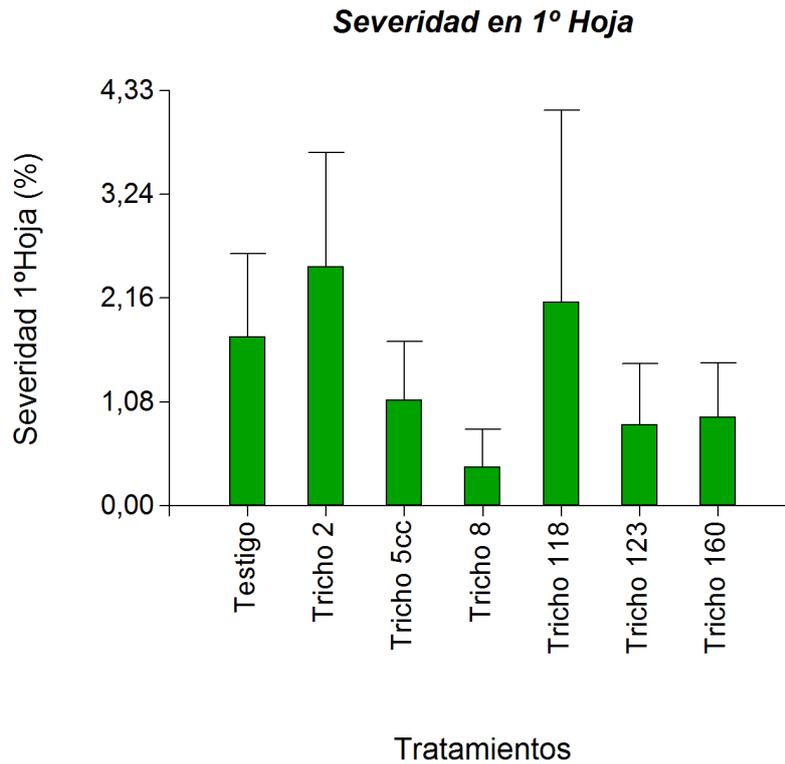


Figura 8. Efecto de cepas de *T. harzianum* sobre la variable severidad (%) en la primera hoja.

Considerando los resultados del análisis de la varianza para la **severidad en la segunda hoja**, los tratamientos no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí, dado que el valor $p=0,1515$ fue mayor al valor de referencia $p=0,05$ (Tabla 10, anexo). En la Figura 9 se observa que el testigo inoculado presentó un bajo nivel de enfermedad, lo que imposibilitó compararlo con el resto de los tratamientos.

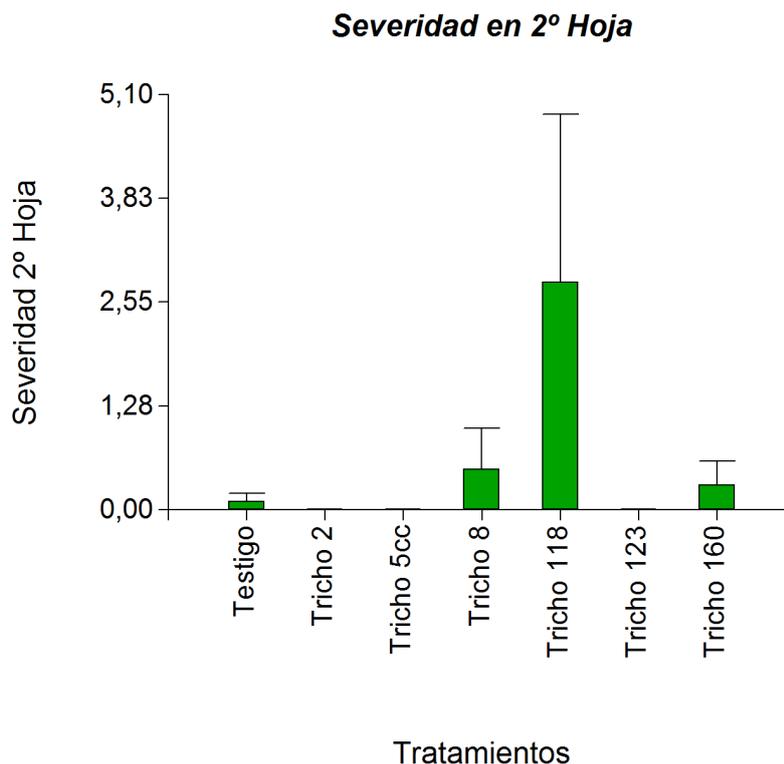


Figura 9. Efecto de cepas de *T. harzianum* sobre la variable severidad (%) en la segunda hoja.

DISCUSIÓN

En este estudio, los resultados de porcentaje de infección natural de *B. sorokiniana* en semillas de cebada de las muestras analizadas, presentaron valores de infección natural muy bajos (no mayores al 5 %), en relación con los citados por Stewart *et al.* (2002). Estos autores, en un relevamiento realizado durante tres campañas desde 1990 a 1993 en Uruguay, encontraron que el porcentaje de infección en lotes de semillas de cebada varió entre un 14 y un 41%. Esto podría deberse a diversos factores asociados a las condiciones ambientales imperantes durante la implantación, desarrollo y cosecha del cultivo de cebada, al manejo del rastrojo previo a la siembra, a las condiciones del cultivo antecesor y a las condiciones de postcosecha, entre otros.

Con respecto a la caracterización morfocultural de los tres aislamientos de *B. sorokiniana* seleccionados, se evidenciaron las características típicas descritas por Sisterna (2014) y Melo Reis *et al.* (1999). Las colonias presentaron tonalidades marrones oliváceas oscuras, presencia de tuff, formación de micelio aterciopelado con abundante esporulación y márgenes ondulados a irregulares. En microscopio óptico se observaron conidios color pardo oliva oscuro y de forma curva, recta, fusiforme o elipsoidal, estrechándose hacia los extremos redondeados, de paredes lisas y cicatriz basal prominente, con tres a diez septos. Estos datos son análogos a los mencionados por Warham *et al.* (1996). En cuanto a las medidas de ancho, largo y cantidad de tabiques de los conidios, presentaron diferencias con las citadas por Sisterna (2014), pero coincidencia con los resultados obtenidos por Warham *et al.* (1996).

Con respecto al biocontrol *in vitro* de *B. sorokiniana* con las 6 (seis) cepas seleccionadas de *T. harzianum*, se pudo demostrar en este trabajo a través de la técnica del cultivo dual, un claro efecto antagónico para cinco de las cepas utilizadas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ezziyyani *et al.* (2004), quienes estudiaron y confirmaron la actividad antifúngica *in vitro* de *T. harzianum* frente al patógeno *Pytophthora capsici*. Resultados similares fueron mencionados por otros autores, como por ejemplo Agamez Ramos *et al.* (2008), quienes utilizaron la técnica de cultivos duales con aislamientos de *Trichoderma* sp. frente a los patógenos *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp. Martínez *et al.* (2013) evaluaron la competencia frente a *Rhizoctonia solani* en condiciones *in vitro*, demostrando que *Trichoderma* sp. es un excelente competidor por espacio y recursos nutricionales. Asimismo, Perelló *et al.* (1994, 1997), reportaron el antagonismo de *T. harzianum* y *Gliocladium roseum* frente a *Zymoseptoria tritici* mediante cultivos duales *in vitro*. Posteriormente, estos autores confirmaron la capacidad biocontroladora en ensayos de invernáculo. Finalmente, cabe mencionar la concordancia también con los resultados obtenidos por Mónaco *et*

al. (2004), quienes encontraron reducciones de hasta 71% frente a *B. sorokiniana* *in vitro*.

En los bioensayos en plántula de cebada, se demostró que sólo una cepa de *T. harzianum* (Th 118) se destacó por aumentar en un 25% el peso total con respecto al testigo; esto la destacaría como una promisoría promotora del crecimiento, ayudando a una implantación más rápida y homogénea de las plántulas de cebada. De esta manera, las plantas resultarían más vigorosas, capaces de alcanzar una mejor expresión de su potencial genético. Resultados similares fueron reportados por Carletti (2000) en Luján, aplicando *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Bacillus* spp., *Bradyrhizobium* spp. y *Pseudomonas* spp. en plantas de cebada. De la misma forma, Stocco *et al.* (2009) encontraron que dos cepas de *T. harzianum* (Th 5 y Th 4) aumentaron el peso seco aéreo y de la raíz respectivamente, en plantas de trigo inoculadas con *Z. tritici*. En consecuencia, se obtuvieron plantas más robustas, que generaron reducción en la severidad de la enfermedad.

Por último, se estudió la severidad de la enfermedad causada por el patógeno *B. sorokiniana* sobre raíz, cuello, primera y segunda hoja de plántulas de cebada. Con los resultados obtenidos se constató que la cepa Th 123 se destacó por reducir la severidad en raíz y cuello, con valores de 72, 5 % y 63, 9 %. Otra de las cepas que sobresalió fue Th 8, que presentó reducción de severidad en raíz en un 71, 5 % y en primera hoja un 72,27 %. Estas dos cepas serían las más factibles de utilizarse como biocontroladoras, ya que presentaron altos valores de reducción en más órganos de la planta. Estos resultados concuerdan con los aportes de Cordo *et al.* (2007), quienes determinaron en ensayos en invernáculo, que la cepa de *T. harzianum* (Th5) generaba una respuesta bioquímica sistémica sobre plantas de trigo, reduciendo la infección producida por *Z. tritici*. Perelló *et al.* (2001), reportaron la reducción de la severidad de la mancha amarilla en plantas de trigo con cepas de *Trichoderma* spp., concluyendo que la utilización de cepas de *T. harzianum* como tratamientos en semillas son los más

efectivos. Sin embargo, existen estudios donde las plantas tratadas con *Trichoderma* spp. no presentaron una reducción de la severidad cuando fueron inoculadas con *B. sorokiniana* y *Alternaria alternata* en ensayos en invernáculo (Mónaco *et al.*, 2004).

Por lo tanto, la utilización de cepas de *T. harzianum* como una alternativa biológica para el control de patógenos transmitidos por semilla y como promotoras del crecimiento de plantas de cebada, es factible en un programa de manejo integrado de enfermedades. Las distintas técnicas a emplear teniendo en consideración al manejo integrado de enfermedades se deben concentrar en la reducción del inóculo de un patógeno para alcanzar la sustentabilidad de la actividad agrícola. Una de estas alternativas viables podría incluir a biocontrol con microorganismos de suelo.

CONCLUSIÓN

En los ensayos de antagonismo *in vitro* no se destacó ningunas de las cepas estudiadas; la mayoría presentaron valores similares de capacidad de inhibición del patógeno.

La utilización de las cepas Th 123 y 8 redujeron el desarrollo de *Bipolaris sorokiniana* en plántulas de cebada

Existe una relación directa entre la utilización de cepas de *T. harzianum* sobre semillas y la promoción del crecimiento de las plantas de cebada, atribuible a un aumento de la biomasa radicular y foliar.

BIBLIOGRAFIA

Agamez Ramos E., J. Barrera Violeth, Oviedo Zumaqué L. 2008. Evaluación del antagonismo y multiplicación de *Trichoderma* sp. en sustrato de plátano en medio líquido estático. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. 9 pp.

Belanger R, Dufour N, Caron J, Benhamou N. 1995. Chronological events associated with the antagonistic properties of against *Trichoderma harzianum* evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. *Botrytis cinerea: Indirect Biocontrol Sci Technol*; 5: 41-54.

Benítez T., Delgado-Jarana J., Rincón A., Trichoderma Rey M., Limón M.C. 1998. Biofungicidas: as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. In: Pandalai SG (Ed.) Recent Research Developments in Microbiology. Trivandrum, India, Research Signpost 2: 129-150.

Boccardo M., Severina I., Giubergia J. P., Aimar F., Salinas A. 2015. Evaluación del comportamiento productivo y de calidad comercial de cebada cervecera (*Hordeum distichum*) bajo riego suplementario en la Provincia de Córdoba. Informe INTA EEA Manfredi.

Carletti, S. 2000. Use of plant growth-promotion rhizobacteria in plant micropropagation. Proceedings 5th International PGPR Workshop. P. 21

Cátedra de Cerealicultura de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP. 2014. Material de circulación interna. Cebada cervecera.

Chet I. & Ibar J. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochem Biotechnol*; 48: 37-43.

Chet I. 1987. *Trichoderma*. Application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: Chet I. (Ed.) Innovative approaches to plant disease control. New York, Wiley and Sons: 137-160.

Chet I., Ibar J., Hadar I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow DT & Söderström B (Eds.) *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*, New York, Springer Verlag: 165-192.

Cook R. & Baker K. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul: The American Phytopathological Society. 539 pp.

Cordo C., Mónaco C., Segarra C., Simón M.R., Mansilla Y.A., Perelló A., Kripelz N., 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. XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Potrero de los Funes. San Luis. Poster. Octubre 2012.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL [Infostat - Software estadístico](http://www.infostat.com.ar)

Ezziyyani M., C. Perez Sanchez, A. Sid Ahmed, M. E. Requena, M. E. Candela. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo, Murcia, España. Anales de Biología 26. 11 pp.

FAO. 2010. FAOSTAT Crops Production Database. Disponible en: www.faostat.fao.org. Ultimo acceso: marzo de 2015.

Ferraris, N., M. Stocco, G. Lampugnani, S. Zuluaga, C. Cordo, C. Mónaco, Abramoff C.. 2016. Potencial uso de cepas de *Trichoderma harzianum* como promotoras del crecimiento de plantas de cebada. VIII Congreso Nacional de Trigo. VI Simposio de cereales de siembra Otoño-Invernal. II reunion del Mercosur. Pergamino, Buenos Aires.

Harman G.E & Kubicek C.P. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. London, Taylor and Francis.

Homby D. (Ed.). 1990. Biological control of soil-borne plant pathogens. Oxford, CAB International.

Martínez B., Infante D., Reyes Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos Rev. Protección Veg. 28 (1): 1–11.

Matta A. 1985. Lotta biologica, quale strategia? La difesa delle piante 2: 95-98.

Melo Reis, E.; Barreto, D.; Carmona, M. 1999. Patología de semillas en cereales de invierno. Gráfica Condal. Buenos Aires. (94 p.)

Mónaco, C. 2014. Principios de manejo ecológico de enfermedades de cultivos. En: Agroecología. Bases teóricas para el diseño y manejo de agroecosistemas sustentables. S. J. Sarandón, & C. C. Flores (Coordinadores). 1a de. - La Plata: Universidad Nacional de La Plata, 2014, pp. 314-338.

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

Neergaard 1977. Seed pathology.2 v.London.macmillan. Press.1187pp.

Papavizas G.C. 1985. *Gliocladium* and *Trichoderma* Biology, ecology, and potential for biocontrol. Annu Rev Phytopathol; 23: 23-54.

Papavizas G.C., Lewis J.A., Abd-El Moity 1982. *Trichoderma harzianum* Evaluation of new biotypes offer tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. Phytopathology; 72: 126-132.

Papavizas G.C., Roberts D.P., Kim K.K. 1990. Development of mutants of *Gliocladium virens* tolerant to benomyl. Can J Microbiol; 36: 484-489.

Perelló A., Cordo C., Mónaco C. 1994. *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium roseum*: antagonistic agents introduced to wheat phylloplane for biological control of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*). Fourth International Workshop on Septoria of cereales. July 4-7. Plant Breeding and Acclimatization Institute, Radzikow, Poland.

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. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 104: 588-598.

Perelló A., Simón M.R., Arambarri A.M., Cordo C. 2001. Greenhouse screening of the resident microflora for control leaf spots of wheat (*Triticum aestivum* L.) .Phytoparasitica 29:341.351.

Pereyra, S., Díaz de Ackermann, M., German, S. Cabrera, K. 2011. Manejo de enfermedades en trigo y cebada. Montevideo (UY): INIA. INIA Serie Técnica, 189. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria), Uruguay. 172 pp.

Rayner R. 1970. A Mycological colour chart Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey & British Mycological Society.

Rojas D. M. 2000. Antagonismo in vitro de hongos aislados de turbas de semilleros frente a *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Pythium aphanidermatum* y *Rhizoctonia solani*. Proyecto Monográfico Fin de Carrera, Universidad de Almería, Almería, Spain.

Singh D. & Mathur S. 2004. Histopathology of seed borne infection. p 154

Sisterna M. 2014 Enfermedades fúngicas de la lámina foliar y tallos. En: Cordo C. y Sisterna M. Enfermedades del trigo. Avances científicos en la Argentina La Plata Argentina: EDULP, 2014-p. 518

Stewart S., Pereyra S., Díaz de Ackermann M. 2002. Manchas foliares de trigo y cebada bajo siembra directa: Conceptos y estrategias de control. Disponible en <http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/le/pol/2002/informe-32.pdf>. Último acceso: enero de 2018.

Stocco M., Consolo F., Mónaco C., Kripelz N., Salerno G., Cordo C. 2014. Mecanismos de acción enzimáticas de cepas biocontroladoras de *Trichoderma harzianum* 3º Congreso Argentino de Fitopatología. 1, 2 y 3 de junio de 2014. Tucumán, Argentina. P 447.

Stocco M., Mansilla A., Mónaco C., Segarra C., Lampugnani G., Abramoff C., Marchetti M., Kripelz N., Cordo C. Consolo V. 2015. Native isolates of *Trichoderma harzianum* inducing resistance to *Zymoseptoria tritici*, on wheat plants. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 50 (3), 291-301.

Stocco M., Mónaco C., Abramoff C, Lampugnani G., Salerno G., Kripelz N., Cordo C. Consolo V. 2016. Selection and characterization of Argentine isolates of *Trichoderma harzianum* for effective biocontrol of *Septoria* leaf blotch of wheat. World J Microbiol Biotechnol 32:49 2-10

Stocco M., Mónaco C., Cordo C. 2010. A comparison of preservation methods for *Trichoderma harzianum* cultures. Revista Iberoamericana de Micología, 27 (4): 213.

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 y 2 de octubre de 2009. Termas de Río Hondo. Santiago del Estero. Protección Vegetal Pp 89.

Stocco M., Mónaco C., Lampugnani G., Abramoff C., Kripelz N., Laporte G., Segarra C., Consolo F., Cordo C. 2011. Banco Micológico de especies de Trichoderma. 2º Congreso Argentino de Fitopatología. 1, 2 y 3 de junio de 2011. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. P 392.

Tomaso, J.C. 2004. Cebada cervecera en Argentina. IDIA XXI: 210 -216.

Valencia H., Sánchez J., Valero N. 2005. Producción de ácido indolacético por microorganismos solubilizadores de fosfato presentes en la rizósfera de *Espeletia grandiflora* y *Calamagrostis effusa* del Páramo el Granizo. pp. 177-193. En: Bonilla, M. (ed.). Estrategias adaptativas de plantas de páramo y del bosque altoandino en la cordillera oriental de Colombia. Bogotá.

Warham, E. J., L. D. Butler, Sutton B. C. 1996. Seed Testing of Maize and Wheat: A Laboratory Guide. Ed. CIMMYT. México, DF (México). pp. 43-44.

ANEXO

Tablas

Tabla 1. Análisis de la varianza del porcentaje de infección natural con *B. sorokiniana* en diferentes muestras de semillas de cebada con un nivel de significancia de 0,05. Test de Fisher (LSD) donde las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
INFECCION %	16	0,66	0,57	66,02

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	56,25	3	18,75	7,63	0,0041
MUESTRA	56,25	3	18,75	7,63	0,0041
Error	29,50	12	2,46		
Total	85,75	15			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,41560

Error: 2,4583 gl: 12

MUESTRA	Medias	n	E.E.	
2	5,50	4	0,78	A
3	1,75	4	0,78	B
1	1,75	4	0,78	B
4	0,50	4	0,78	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla2. Color de las colonias de *B. sorokiniana* según la tabla de Rayner (1970).

Día de medición	Aislamiento Bipolaris (Bs1)	Aislamiento Bipolaris (Bs2)	Aislamiento Bipolaris (Bs3)
1º	Gris oliváceo*	Oliváceo**	Negro oliváceo***
2º	Gris oliváceo	Oliváceo	Negro oliváceo
3º	<u>Halo interior:</u> Negro oliváceo. <u>Halo central:</u> Gris oliváceo <u>Halo periférico:</u> Negro oliváceo.	Negro oliváceo	Negro oliváceo
4º	<u>Halo interior:</u> Negro oliváceo. <u>Halo central:</u> Gris oliváceo <u>Halo periférico:</u> Negro oliváceo.	Negro oliváceo	Negro oliváceo

* (Sheet 8; V Four-Times Greyed Series)

** (Sheet 5; III Twice -Greyed Series)

*** (Sheet 8; V Four-Times Greyed Series)

Tabla 3. Análisis de la varianza para los valores de crecimiento de *B. sorokiniana* frente a diferentes cepas de *T. harzianum* en el primer día de evaluación.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CRECIMIENTO Día 1	21	0,36	0,09	6,28

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,05	6	0,01	1,34	0,3041
TRATAMIENTO	0,05	6	0,01	1,34	0,3041
Error	0,10	14	0,01		
Total	0,15	20			

Tabla 4. Valores de crecimiento de *B. sorokiniana* frente a diferentes cepas de *T. harzianum* para el segundo día de evaluación.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CRECIMIENTO Día 2	21	0,14	0,00	8,24

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,07	6	0,01	0,38	0,8779
TRATAMIENTO	0,07	6	0,01	0,38	0,8779
Error	0,42	14	0,03		
Total	0,48	20			

Tabla 5. Análisis de la varianza no paramétrico con los valores de crecimiento de *B. sorokiniana* frente a diferentes cepas de *T. harzianum* en el tercer día de evaluación, utilizando la prueba de Kruskal Wallis.

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H
p						
CRECIMIENTO Día 3	Testigo	3	3,00	0,10	3,00	8,82
						0,1753
CRECIMIENTO Día 3	Th 118	3	2,23	0,13	2,25	
CRECIMIENTO Día 3	Th 123	3	2,22	0,23	2,20	
CRECIMIENTO Día 3	Th 160	3	2,32	0,10	2,35	
CRECIMIENTO Día 3	Th 2	3	2,20	0,00	2,20	
CRECIMIENTO Día 3	Th 5cc	3	2,17	0,29	2,00	
CRECIMIENTO Día 3	Th 8	3	2,23	0,08	2,25	

Trat.	Medias	Ranks
Th 5cc	2,17	7,33 A
Th 2	2,20	8,00 A
Th 123	2,22	9,00 A
Th 8	2,23	9,83 A
Th 118	2,23	10,00 A
Th 160	2,32	12,83 A
Testigo	3,00	20,00 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 6. Análisis del peso fresco total (g) de plántulas de cebada tratadas con diferentes cepas de *T. harzianum*.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso total	399	0.06	0.05	59.91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.21	7	0.03	3.68	0.0007
Tratamiento	0.21	7	0.03	3.68	0.0007
Error	3.26	391	0.01		
Total	3.47	398			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.03595

Error: 0.0083 gl: 391

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Trichoderma 160	0.12	50	0.01	A
Trichoderma 8	0.14	50	0.01	A B
Trichoderma 2	0.15	50	0.01	A B
Trichoderma 5	0.15	50	0.01	A B
Test sano	0.16	50	0.01	B
Trichoderma 123	0.16	49	0.01	B
Trichoderma 118	0.20	50	0.01	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0.05)

Tabla 7. Análisis del porcentaje (%) de severidad de la enfermedad causada por *B. sorokiniana* en la raíz de plántulas de cebada tratadas con diferentes cepas de *T. harzianum*.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% raíz	350	0.06	0.05	248.88

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	255.47	6	42.58	3.78	0.0012
Tratamiento	255.47	6	42.58	3.78	0.0012
Error	3864.00	343	11.27		
Total	4119.47	349			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1.32034

Error: 11.2653 gl: 343

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Trichoderma 123	0.56	50	0.47	A
Trichoderma 8	0.58	50	0.47	A
Trichoderma 160	0.78	50	0.47	A B
Trichoderma 5	0.86	50	0.47	A B
Trichoderma 2	1.60	50	0.47	A B
Test + Bipolaris	2.04	50	0.47	B C
Trichoderma 118	3.02	50	0.47	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0.05)

Tabla 8. Análisis del porcentaje (%) de severidad de la enfermedad causada por *B. sorokiniana* en el cuello de plántulas de cebada tratadas con diferentes cepas de *T. harzianum*.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% cuello	350	0.05	0.03	252.08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3037.11	6	506.19	2.98	0.0075
Tratamiento	3037.11	6	506.19	2.98	0.0075
Error	58225.94	343	169.75		
Total	61263.05	349			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=5.12536

Error: 169.7549 gl: 343

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Trichoderma 2	1.56	50	1.84	A
Trichoderma 5	2.00	50	1.84	A
Trichoderma 123	3.36	50	1.84	A
Trichoderma 160	4.56	50	1.84	A B
Trichoderma 8	6.26	50	1.84	A B
Trichoderma 118	9.12	50	1.84	B
Test + Bipolaris	9.32	50	1.84	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0.05)

Tabla 9. Valores de porcentaje (%) de severidad de la enfermedad causada por *B. sorokiniana* en la primer hoja de plántulas de cebada tratadas con diferentes cepas de *T. harzianum*.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% H1	350	0.01	0.00	530.73

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	167.83	6	27.97	0.53	0.7853
Tratamiento	167.83	6	27.97	0.53	0.7853
Error	18095.62	343	52.76		
Total	18263.45	349			

Tabla 10. Valores de porcentaje (%) de severidad de la enfermedad causada por *B. sorokiniana* en el la segunda hoja de plántulas de cebada tratadas con diferentes cepas de *T. harzianum*.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% H2	350	0.03	0.01	1084.24

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	311.71	6	51.95	1.58	0.1515
Tratamiento	311.71	6	51.95	1.58	0.1515
Error	11265.50	343	32.84		
Total	11577.21	349			

Fotos



Foto 1. Semillas de cebada limpias y desinfectadas, secándose sobre papel absorbente, bajo flujo laminar.

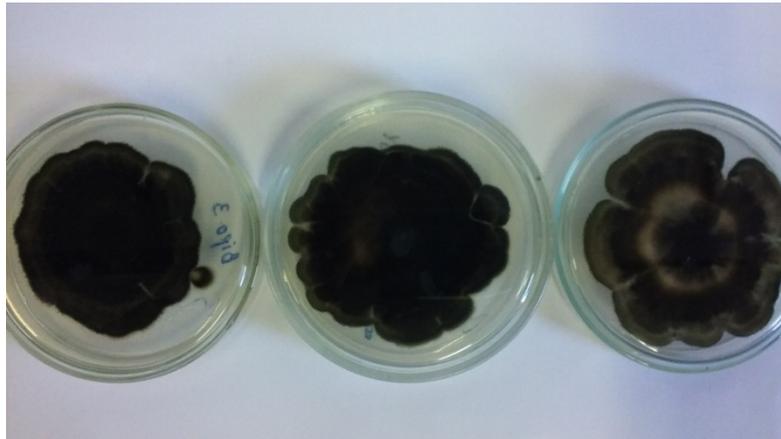


Foto 2. Crecimiento de las colonias de *B. sorokiniana* en APG 2%.



Foto 3. Semillas de cebadas colonizadas con el patógeno, como fuente de inóculo.



Foto 4. Semillas de cebada en proceso de peleteado con *T. harzianum* dentro del agitador magnético.



Foto 5. Plántulas de cebada en speedling con sustrato de germinación, provenientes de semillas peleteadas con distintas cepas de *T. harzianum* junto al inóculo de *B. sorokiniana*.



Foto 6. Colonia típica de *Bipolaris sorokiniana*.

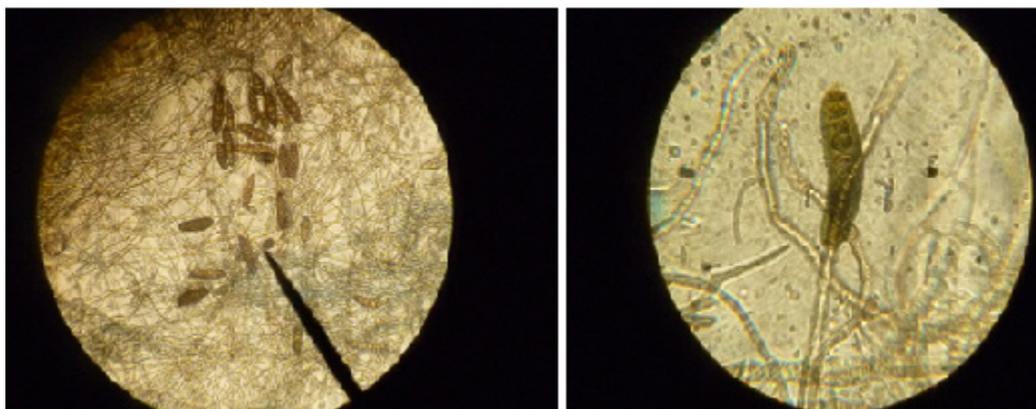


Foto 7. Conidios de *B. sorokiniana*. Se pueden observar los pseudoseptos.

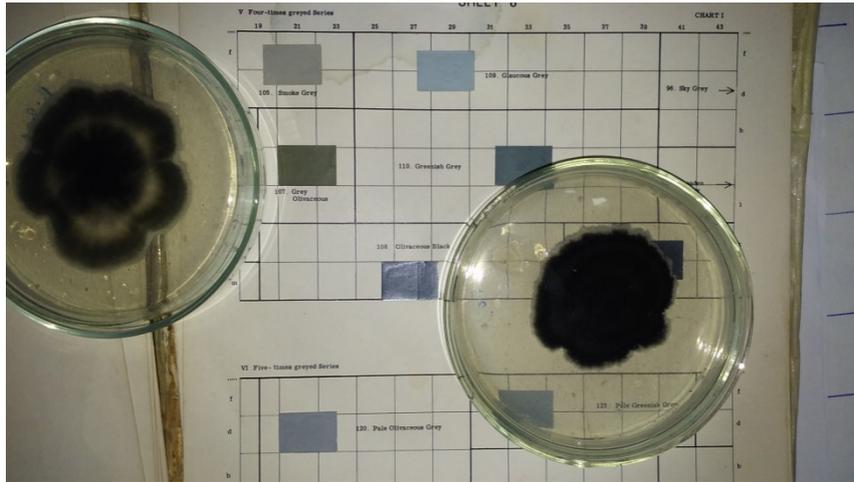


Foto 8. Determinación del color de las colonias de *B. sorokiniana* con la carta de Rayner (1970).

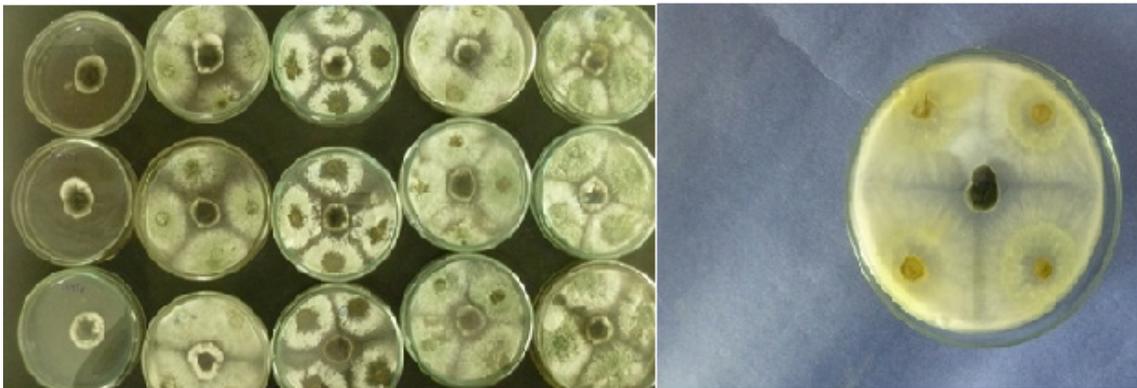


Foto 9. Determinación de la capacidad inhibitoria de las cepas de *T. harzianum*.