

CONTROL BIOLÓGICO DE LA MANCHA DE LA HOJA DEL TRIGO CON ESPECIES DEL GÉNERO *TRICHODERMA*

Stocco, M.^{1,2,*}; Consolo, F.^{2,4}; Mónaco, C.^{1,3}; Kripelz, N.^{1,3};
Salerno, G. L.^{2,4}; Cordo, C.^{1,3}

¹ CIDEFI, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. Calle 60 y 119, La Plata; ² CONICET; ³ CICBA, Buenos Aires; ⁴ FIBA, Viejtes 3103, Mar del Plata.

* marinastocco343@yahoo.com.ar

RESUMEN

El objetivo de esta presentación es demostrar que el biocontrol de la mancha de la hoja del trigo es posible con la aplicación de *Trichoderma* spp. en diferentes modalidades. Se presenta una revisión de los bioensayos en invernáculo para seleccionar las mejores cepas de *Trichoderma* spp. como reductoras de la severidad de la enfermedad. Los resultados obtenidos motivaron experimentos en condiciones de campo, evaluando el efecto de dos cepas de *Trichoderma* spp. en el desarrollo de la enfermedad y en la ganancia del rendimiento de trigo.

Palabras clave: biocontrol, septoriosis del trigo, rendimiento.

ABSTRACT

The objective of this presentation is to demonstrate that the biocontrol of the Septoria leaf blotch is possible on wheat with the application of *Trichoderma* spp. on different modalities. A review of bioassays in greenhouse to select the best strains of *Trichoderma* spp. that reduce the severity of the disease is presented. The results obtained led to experiments under field conditions, evaluating the effect of two strains of *Trichoderma* spp. as a biofungicide, considering the reduction of the disease severity and the gain of the wheat yield.

INTRODUCCIÓN

El género *Trichoderma* forma parte de un grupo de hongos de vida libre, de reproducción asexual, que interactúan con raíces, suelo y filoplano. Las poblaciones de este hongo muestran un alto nivel de variabilidad genética. Pro-

ducen un amplio rango de sustancias antibióticas y parasitan otros hongos. También compiten con otros microorganismos por exudados que estimulan la germinación de propágulos de patógenos de plantas en el suelo. Además, inhiben o degradan pectinasas y otras enzimas que son esenciales para los hongos patógenos de plantas que penetran la superficie de las hojas. Pueden inducir resistencia sistémica o localizada a una gran variedad de patógenos de plantas. Entre las enfermedades foliares de los cereales, la mancha de la hoja del trigo (MHT), causada por *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Shroeter, in Cohn (anamorfo *Septoria tritici* Rob.et Desm.) es una enfermedad causante de importantes pérdidas de rendimiento (Annone *et al.* 1991, Simón *et al.* 1996). El mejoramiento orientado a la resistencia es la medida más económica de control; los tratamientos químicos y las prácticas culturales se suman para un manejo integrado (Jacobsen y Blackman 1993). Los compuestos químicos controlan las enfermedades de los cultivos, aunque favorecen el desarrollo de patógenos resistentes a los fungicidas. El control biológico se considera ventajoso por disminuir los riesgos para el medioambiente.

Los antecedentes sobre agentes de biocontrol para enfermedades foliares de los cereales en Argentina citan a los hongos como alternativa (Dal Bello *et al.* 1998, Perelló *et al.* 2001). La combinación de los antagonistas con niveles reducidos de productos químicos (control integrado) también disminuyen las enfermedades de manera similar al tratamiento tradicional (Monte 2001, Jaque *et al.* 2008). Todos estos trabajos se refieren a la reducción de la severidad de las lesiones producidas por *Bipolaris sorokiniana* (Dal Bello *et al.* 1998), *Pyrenophora tritici-repentis* (Perelló *et al.* 2009), *Mycosphaerella graminicola* (Cordo *et al.* 2007, Perelló *et al.* 2009) en trigo, aunque poco se conoce sobre la manera en que influye el biocontrol en el rendimiento.

El objetivo de esta publicación es demostrar que el biocontrol de la mancha de la hoja del trigo es posible con la aplicación de *Trichoderma* spp. en diferentes modalidades. Se presenta una revisión de los distintos experimentos cuyos resultados motivaron la aplicación del agente biocontrolador bajo condiciones de campo, evaluando su influencia en el desarrollo de la enfermedad y en la ganancia del rendimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

BIOENSAYOS EN INVERNÁCULO

El primer paso para realizar estudios de actividad biocontroladora sobre un patógeno comienza con la selección de cepas del organismo antagonista, que en nuestro caso es *Trichoderma* spp. Para ello se recolectaron muestras de suelo de toda la región triguera argentina: de la Región I, Santa Fe; de la II Norte, Pergamino; de la II Sur, Los Hornos, Bragado; de la III, Paraná; de

la IV, Lobería; de la V Norte, Manfredi y la V Sur, Bordenave (Figura 1). El muestreo de modo jerárquico se realizó de la rizosfera de trigo. Cada muestra fue acondicionada y conservada en la heladera a 4 °C. Luego de la recolección se realizaron los aislamientos de las cepas de *Trichoderma* spp., mediante la técnica de dilución en placas, utilizando el medio de cultivo selectivo para el género. Las cepas fueron conservadas mediante la técnica de papel de filtro descripta por Stocco *et al.* 2010. Se realizaron ensayos biológicos en invernáculo, mediante inoculaciones artificiales del patógeno sobre plántulas provenientes de semillas peleteadas con el agente biocontrolador (Cordo *et al.* 2007). Para cada localidad se ensayaron 30 cepas de *Trichoderma* spp. Se evaluó el potencial antagonista por la reducción del área necrosada y de la superficie cubierta con picnidios, para las hojas 1° y 2°, cuando las plantas de trigo de un cultivar susceptible (Buck Guapo) se inocularon con una mezcla de 2 cepa virulenta de *S. tritici*. Los porcentajes de necrosis y de cobertura picnidial se analizaron por ANOVA, comparando sus medias con el test de LSD para un nivel de significancia del 5%. Se seleccionaron las cepas que redujeron un 50% o más de la necrosis y/o de la cobertura picnidial con respecto al testigo.

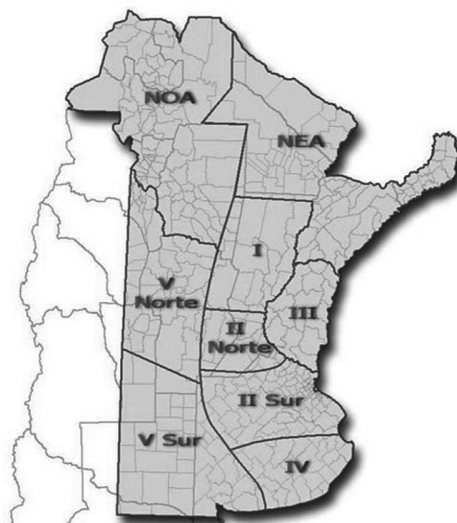


Figura 1. Regiones Trigueras argentinas. SINAVIMO.

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y VARIABILIDAD GENÉTICA DE *TRICHODERMA HARZIANUM*

Para la identificación de la especie *T. harzianum* se aplicó la técnica de PCR con los *primers* (cebadores) ITS1, ITS4. Para analizar la variabilidad ge-

nética entre los diferentes aislamientos de la especie, se utilizaron 12 *primers* de ISSR y 4 *primers* de UP-PCR (Consolo *et al.* 2011).

EXPERIMENTOS BAJO CONDICIONES DE CAMPO

Se utilizaron semillas de trigo del cultivar Buck 55CL2 (moderadamente susceptible al patógeno). Las cepas de *S. tritici* provinieron de las localidades 9 de Julio (FALP9J008) y Pla (FALPLA008) (Buenos Aires). Para la inoculación, los conidios obtenidos en agar extracto de malta se suspendieron en agua destilada, ajustando la concentración a 1×10^6 esporas ml^{-1} .

Para producir inóculo de *Trichoderma* spp., tanto para el peleteado como para la aplicación aérea, se utilizaron las cepas Th5cc y Th118. El ensayo se realizó en la Estación Experimental J. Hirschhorn, en Los Hornos (La Plata). Se evaluó el efecto biocontrolador de las cepas solas y en combinación con un fungicida comercial (mezcla de Azoxystrobin-Ciproconazole, a dosis recomendada) sobre la severidad de la mancha de la hoja del trigo y su efecto sobre el rendimiento. Se implementaron diferentes técnicas de aplicación, en tres estadios fenológicos (plántula, macollaje, espigazón), según los siguientes tratamientos: plantas testigo inoculadas con el patógeno; plantas provenientes de semillas peleteadas con las cepas de *T. harzianum* e inoculadas con *S. tritici*; plantas provenientes de semilla peleteada y pulverizadas en hoja con suspensión de *T. harzianum*, 24 horas antes que la inoculación con *S. tritici* o combinando una suspensión de *T. harzianum* aplicada con 24h de anticipación y fungicida aéreo en mitad de la dosis, aplicado 7 días antes de la inoculación con el patógeno y testigos, con aplicaciones de fungicida en plántula, plántula y macollaje, plántula, macollaje y espigazón y sólo espigazón e inoculados con *S. tritici*. Se cuantificó el control a través de la disminución de la severidad y los parámetros de rendimiento. Se realizaron tres evaluaciones durante el desarrollo del cultivo: inicio de encañazón (GS31), espigazón (GS59) y grano pastoso (GS82). Los valores medios de severidad y del rendimiento y sus componentes se analizaron por ANOVA para parcelas divididas. Las medias se compararon mediante el test LSD ($P=0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

BIOENSAYOS EN INVERNÁCULO

Las siguientes cepas de *Trichoderma* spp. integran el Banco micológico que se ofrece en el CIDEFI, recomendándolas por su efecto significativamente reductor de los parámetros de severidad. En la Tabla 1 se presentan las cepas de *Trichoderma* spp., destacadas por reducir el 50% o más de la necrosis de la 1° hoja de trigo.

Tabla 1. Cepas biocontroladoras de *Trichoderma* spp. de las diferentes regiones trigueras argentinas

Cepas de <i>Trichoderma</i> spp	73	80	90	92	107	114	123	129	131	140
% de reducción de la necro.	50	50	50	50	52	50	90	75	65	68
Cepas de <i>Trichoderma</i> spp	141	160	162	168	170	172	181	206	221	229
% de reducción de la necro.	75	92	65	50	58	65	64	71	70	70

En gris se destacan las cepas que produjeron simultáneamente una importante reducción de los dos parámetros de la severidad.

Las cepas destacadas por reducir el 50 % o más de la cobertura picnidial producidas por *S. tritici* en 1° hoja de trigo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas biocontroladoras de *Trichoderma* spp. de las diferentes Regiones trigueras argentinas.

Cepas de <i>Trichoderma</i> spp	92	104	107	123	129	131	140	151	160	162
% de reducción de la necro.	71	72	71	92	70	70	70	70	70	78
Cepas de <i>Trichoderma</i> spp	165	168	170	172	177	181	182	210	229	
% de reducción de la necro.	76	86	96	90	70	80	80	70	80	

En gris se destacan las cepas que produjeron simultáneamente una importante reducción de los dos parámetros de la severidad.

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y VARIABILIDAD GENÉTICA DE *TRICHODERMA HARZIANUM*

La identificación basada en las secuencias de ITS reveló que, de un total de 77 cepas estudiadas, el 50% correspondieron a *T. harzianum*.

En la Figura 2 se observa el dendrograma UPGMA basado en el índice de similitud Dice (SD) que ilustra la relación genética entre las 20 cepas de *T. harzianum* de dos de las 8 localidades de la región triguera argentina.

Para un coeficiente de similitud del 73%, se han determinado 3 grandes grupos. El primer *cluster* (a) se encontró integrado por 7 cepas de *T. harzianum*, 6 de Los Hornos y 1 de Bragado. El segundo grupo (b) cuenta con 4

cepas, 3 pertenecen a Bragado y 1 cepa a Los Hornos. Por último, el tercer gran grupo (c) está constituido por 6 cepas de *T. harzianum*, de las cuales 3 fueron aisladas de Los Hornos y 3 de Bragado. También se puede observar que existen 3 cepas 28, 17b y 4 que no se encuentran dentro de los tres grandes *clusters*. Este dendrograma se verá modificado con la incorporación al análisis del resto de las cepas estudiadas.

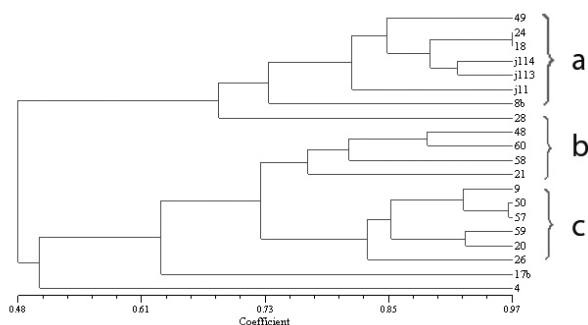


Figura 2. Dendrograma UPGMA basado en el índice de similitud de Dice.

EXPERIMENTOS BAJO CONDICIONES DE CAMPO

En la Tabla 3 se presentan los valores promedio de severidad para los 3 estadios evaluados.

Tabla 3: Medias de Severidad por *S. tritici* en 2ºhoja (GS31), 5ºhoja (GS59) y hoja bandera (HB) y bandera-1 (HB-1)(GS82) en un ensayo con diferentes tratamientos.

Tratamientos	Severidad (% de necrosis)e	Severidad (% de necrosis)	Severidad (% de necrosis)
	Encañazón (GS31)	Espigazón (G59)	Grano pastoso (GS 82)
Testigo	60,8c	82,3a ^a	83,2 ab
<i>Tr. pell</i> + <i>S.t</i>	58,6c	78,1a ^a	46,9 d
<i>Tr. Pell</i> + <i>Tr. aer maco</i> + <i>S.t</i>	58,6c	68,8a	61,7 c
<i>Tr. pell</i> + <i>Tr. aer mac</i> + <i>Tr. aer espig.</i> + <i>S.t</i>	58,6c	68,8a	87,3 a
<i>Tr pell</i> + <i>FF ½ d plant</i> + <i>St</i>	45,2b	73,0a	66,5 bc
<i>Tr pell</i> + <i>FF ½ d mac</i> + <i>Tr aer mac</i> + <i>St</i>	45,2b	79,8a	73,8 abc

<i>Tr</i> pell + <i>FF</i> ½ d mac, espig + <i>Tr</i> aer mac, espig + <i>St</i>	45,2b	79,8a	86,1 a
<i>FF</i> plant + <i>St</i>	35,6a ^a	61,9b	87,3 a
<i>FF</i> plant, mac + <i>St</i>	35,6a ^a	64,1b	78,0 abc
<i>FF</i> plant, mac, espig + <i>St</i>	35,6a	64,1b	47,0 d
<i>FF</i> espig + <i>St</i>	35,6a	64,1b	84,2 ab

St.: *Septoria tritici*; *Tr. pell.*: *Trichoderma* spp. peleteada en semilla; *Tr. aer mac.*: *Trichoderma* spp. aérea aplicada en macollaje; *Tr.aer.espig*: *Trichoderma* spp. aplicada en espigazón; *FF*: fungicida foliar dosis recomendada; *FF.1/2d.*: fungicida foliar aplicado en media dosis de lo recomendado.

En el estado de grano pastoso, los menores valores de severidad se presentaron con tres aplicaciones de fungicida foliar (en plántula, macollaje y espigazón). No obstante, estos valores fueron comparables a la aplicación de *Trichoderma* sólo como *pellet* en la semilla, sin recibir otras aplicaciones o una aplicación aérea de *Trichoderma* en macollaje, como un refuerzo a la aplicación del antagonista en la semilla. Estos resultados están relacionados con las demostraciones experimentales de Segarra *et al.* (2002), Cordo *et al.* (2007). Como *Trichoderma* spp. no estuvo presente en las hojas de las plantas inoculada con el patógeno que crecían a partir de semillas peleteadas con el mismo biocontrolador, la estimulación de la actividad proteolítica, a través de la serin-proteasa en el fluido intercelular de las hojas asintomáticas, debió ser considerada como una respuesta sistémica inducida. Constituye uno de los mecanismos bioquímicos de la defensa en la planta propuestas por Hanson & Howell (2004).

Los valores de rendimiento obtenidos con la aplicación del fungicida foliar en los estadios de macollaje y espigazón son equiparables a los obtenidos con sólo el peleteado de la semilla con *Trichoderma*, superando levemente el rendimiento promedio, con una ganancia de 278.5 kg ha⁻¹; no obstante, el tratamiento que recibió un refuerzo aéreo del biocontrolador en macollaje fue el que mayor ganancia produjo, con 426.5 kg ha⁻¹ más que el rendimiento promedio. El rendimiento también se vio incrementado cuando a la plántula proveniente de la semilla peleteada con el antagonista se le aplicó media dosis del fungicida foliar con una ganancia de 234.5 kg ha⁻¹. Los tratamientos con aplicación del fungicida y/o el biocontrolador redujeron la severidad, aumentando el rendimiento debido al mantenimiento de la actividad fotosintética del follaje durante el llenado del grano (Pepler *et al.* 2005). El n° de espigas m⁻² y el peso de 1.000 granos fueron mayores con los tratamientos combinados (*pellet* y aérea), comparados con el testigo enfermo. Además, con sólo el peleteado de la semilla con el antagonista se obtuvieron valores altos en el n°

de espigas m^{-2} , semejantes a una única aplicación de fungicidas en el estadio de espigazón y con una aplicación aérea del antagonista como refuerzo del peleteado. En cuanto al peso de mil granos, la aplicación de *Trichoderma* solamente a la semilla arrojó valores semejantes a la aplicación combinada del antagonista y media dosis de fungicida aéreo en todos los estadios. Al inducir una protección hasta el inicio de la floración, se favoreció una mayor acumulación de fotosintatos con el consiguiente aumento de la biomasa. Hay un período prolongado (desde inicio de encañazón hasta cerca de la antesis) con severidad disminuida que define mayor n° de espigas planta⁻¹ y, por lo tanto, por m^{-2} . Fállico *et al.* (2007), combinando aplicaciones en diferentes estadios y en el suelo como un biofertilizante, mejoró la biomasa de un trigo de ciclo largo, aumentando el n° de plantas m^{-2} y el rendimiento entre un 8 y el 19% con respecto al testigo sin tratar y del 10% con respecto al tratado con fungicida. Tanto para la severidad como en el rendimiento y sus parámetros, las diferencias en la tolerancia de los conidios de *Trichoderma* spp. a las condiciones microclimáticas (temperatura, luz ultravioleta, escasa humedad) que caracterizan a la aplicación en espigazón explicarían la falta de protección que observó Perelló *et al.* (2009) en repetidas ocasiones.

CONCLUSIONES

Se destaca la importancia de la selección previa de las cepas de *Trichoderma* en ensayos en invernáculo, para corroborar su capacidad biofungicida en posteriores experimentos a campo. Para esta última condición, al menos dos aplicaciones (peleteado en semilla y una aplicación aérea en macollaje) no sólo disminuyó la severidad hasta grano pastoso, sino que también aumentó el rendimiento en $kg\ ha^{-1}$.

BIBLIOGRAFIA

- Annone J., O. Calzadori, H. Polidoro and H. Conta. 1991. Efecto de la mancha de la hoja causada por *Septoria tritici* sobre el rendimiento. INTA EEA Pergamino. Informe N° 122, 4 pp.
- Consolo F.V., C.I. Mónaco, C.A. Cordo and G.L. Salerno. 2011. Characterization of novel *Trichoderma* spp. Isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28:1389-1398.
- Cordo C., C. Mónaco, C. Segarra, M.R. Simón Y.M., Mansilla, A. Perelló, N. Kripelz, D. Bayo and R.D. Conde. 2007. *Trichoderma* spp. as elicitors of wheat plant defense responses against *Septoria tritici*. *Biocontrol Science and Technology* 17:687-698.
- Dal Bello G., M. Sisterna, M.R. Simón and C.I. Mónaco. 1998. Control Biológico del tizón de la plántula del trigo causado por *Bipolaris sorokiniana*. Congreso argentino de control biológico de las enfermedades de las plantas. Buenos Aires.

- Fálico L. and C. Varaschini. 2007. Experiencia de implantación de trigo con microorganismos incorporados a la siembra. Jornada de actualización en enfermedades de trigo. Insitituto Fitotécnico de Santa Catalina, FCAyF, UNLP. 47-49 pp.
- Hanson L.E. and C.R. Howell. 2004. Elicitors of plant defense responses from biological control strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 94:171-176.
- Jacobsen B. and P. Blackman. 1993. Biological and cultural plant disease control, alternatives and supplements to chemical in IPM systems. *Plant Disease* 77:311-315.
- Jeque F.A., Simón M.R., C. Cordo, C. Mónaco. 2008. Control biológico de la mancha de la hoja del trigo con *Trichoderma harzianum*. VII Congreso Nacional de trigo. V Simposio Nacional de Siembra Otoño-Invernal, I encuentro del MERCOSUR. Santa Rosa, La Pampa. PV26.
- Monte E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology* 4:1-4.
- Pepler S., M. Gooding, K. Ford, R. Ellis and S. Jones. 2005. Delaying senescence of wheat with fungicides has interacting effects with cultivar on grain sulphur concentration but not with sulphur yield or nitrogen sulphur ratios. *European Journal of Agronomy* 22:405-416
- Perelló A, M.R. Simón, C. Cordo and A.M. Arambarri. 2001. Greenhouse screening of the saprophytic resident microflora for control leaf spots of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Phytoparasitica* 29:341-351.
- Perelló A, V. Moreno, C. Mónaco, M.R. Simón and C. Cordo. 2009. Biological control of *Septoria tritici* blotch of wheat by *Trichoderma* spp under field conditions in Argentina. *Bio-Control* 54:113-122.
- Segarra C., C. Casalongue, M. Pinedo, C. Cordo and D. Conde. 2002. Changes in wheat leaf extracellular proteolytic activity after infection with *Septoria tritici*. *Journal of Phytopathology* 150:105-111.
- Simón M.R., A. Perelló, C. Cordo and H. Arriaga. 1996. Influencia de la infección tardía de *Septoria tritici* Rob. Ex Desm. Sobre el peso de mil granos y algunos parámetros de calidad en *Triticum aestivum* L. *Investigación Agraria* 11:161-171.
- Stocco M, C.I. Mónaco and C. Cordo. 2010. A comparison of preservation methods for *Trichoderma harzianum* cultures. *Revista Iberoamericana de Micología* 27 (4):213.
- <http://www.sinavimo.gov.ar/articulo/sistema-de-vigilancia-en-el-cultivo-de-trigo>