

COMPARACIÓN *IN VITRO* DE CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* sp. COMO CONTROLADOR BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea*

C.Villalpando¹, B. Murillo¹, S.R. Zapata¹, E.E.F. Guerrero¹, C. Mónaco²

(¹) Fitopatología. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Salta. (²) CIDEFI. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata.

Tel. 0387-4255481 – Fax 0387- 4255455 e-mail: rzapata@unsa.edu.ar

Recibido 11/08/16, aceptado 07/10/16

RESUMEN: En el contexto de una agricultura sustentable el uso de los biocontroladores en el manejo sanitario de plagas es una herramienta muy importante para disminuir la aplicación de agroquímicos que resultan perjudiciales para la salud humana y el medio ambiente. Bajo esta perspectiva este trabajo evaluó en condiciones de laboratorio la capacidad antagonista de aislamientos nativos de *Trichoderma* sp. frente al hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Para ello se trabajó con 11 cepas sobre las que se evaluó competencia por sustrato, hiperparasitismo, y accionar *in situ* y a distancia a través de la producción de metabolitos. Todas las cepas evaluadas mostraron capacidad inhibitoria sobresaliendo Cepa cátedra por su mejor accionar conjunto.

Palabras clave: *Botrytis cinerea*, *Trichoderma* sp., biocontrolador, frutilla.

INTRODUCCIÓN

La necesidad de producir grandes cantidades de alimentos ha llevado al hombre a emplear cada vez mayor cantidad de agroquímicos de síntesis para satisfacer esta demanda. Esto provoca la degradación de los ambientes, la alteración del equilibrio dinámico de los ecosistemas terrestres y acuáticos con la consiguiente pérdida de biodiversidad, el uso poco racional de los suelos y del agua, la aparición de patógenos resistentes, el surgimiento de nuevas plagas, la acumulación de residuos tóxicos, la eliminación de enemigos naturales y de microorganismos responsables de la degradación de la materia orgánica y del control biológico, además de la persistencia de estos productos en el ambiente y en los alimentos. Ésta situación ha llevado a los investigadores a buscar alternativas en el manejo sanitario de los cultivos (Zapata *et al*, 2012).

La agricultura orgánica se caracteriza por la aplicación de técnicas que evitan el uso de fertilizantes y plaguicidas sintéticos con el propósito de obtener una producción agropecuaria limpia y sostenible. En este contexto las plagas deben ser controladas por medio de prácticas que equilibren e incrementen la nutrición del suelo y produzcan un alto grado de actividad biológica. Ello involucra procedimientos culturales que incluyan abonos verdes, control biológico, y control mecánico para romper el ciclo de la plaga. Uno de ellos es la aplicación de *Trichoderma* sp., hongo biocontrolador y promotor de crecimiento de plantas (Zapata *et al*, 2012). Su utilización resulta una herramienta importante, de bajo costo y de alta eficacia para el control biológico de patógenos de plantas (Endara Borja *et al*, 2009). Es ampliamente usado en agricultura debido a su habilidad para colonizar sustratos rápidamente, inducir resistencia sistémica adquirida en plantas, promover el crecimiento vegetal y poseer actividad antagonista contra un amplio rango de hongos patógenos entre los que se puede citar a *Botrytis cinerea* Pers., causante de enfermedades importantes en diversos cultivos (Cruzat y Ionannidis, 2008).

Las enfermedades causadas por *B. cinerea* figuran entre las más comunes y están ampliamente difundidas en hortalizas, ornamentales, frutales y otros cultivos en el mundo. También son importantes en la producción en invernaderos. Causan tizones de inflorescencias y pudriciones de

diversos órganos, denominados “moho gris”, produciendo pérdidas considerables en cosecha, almacenamiento, transporte y comercialización. Este hongo perdura en el suelo en forma de esclerocios (estructura de resistencia) o de micelio, el cual se desarrolla sobre restos de plantas en proceso de descomposición (Agrios, 2005; Ángel, 2007).

Existen numerosas investigaciones que avalan el comportamiento de *Trichoderma* como controlador de hongos fitopatógenos. En cuanto a *B. cinerea*, Arcos Plazas (2011) evaluó cepas nativas de *Trichoderma* spp. en el biocontrol de este hongo en cultivo de rosas. Realizó pruebas de antagonismo observando parasitación de las hifas del patógeno, lisis de material fúngico y antibiosis. Bogumil *et al* (2013) compararon 52 aislamientos de *Trichoderma* seleccionados por su actividad antagonista contra *B. cinerea*; comprobando que todos los aislamientos testeados restringieron el crecimiento de las colonias del moho gris entre 45 y 78% y que más del 60% de los aislamientos mostraron una capacidad de inhibición entre 61 y 75%. Merchán-Gaitán *et al* (2014) evaluaron el efecto de dos cepas de *T. harzianum* en el control de *B. cinerea* y la calidad del fruto en frutilla, observaron que el antagonista cubrió al patógeno y no permitió su dispersión hacia otras partes de la planta, similar a lo reportado por Guédez *et al* (2009).

Miller *et al* (2015) determinaron que cepas nativas de *Trichoderma* sp. y de *Bacillus subtilis* resultaron eficaces controladores de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*, por sus capacidades de producción de metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles.

En este contexto, en este trabajo se evaluó en condiciones de laboratorio la capacidad antagonista de aislamientos nativos de *Trichoderma* sp. frente al hongo fitopatógeno *B. cinerea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Naturales en la Universidad Nacional de Salta trabajando con 11 cepas de *Trichoderma* sp, dos cedidas por la Universidad Nacional de La Plata (LP4 y LP5) y las restantes obtenidas a partir de muestras de suelo.

El aislamiento se realizó utilizando la técnica de diluciones sucesivas y posterior siembra de 3 repeticiones de cada dilución en cajas de Petri con medio de Martin (Sarasola y Rocca de Sarasola, 1975). Se llevó a estufa de cultivo a $25 \pm 2^\circ$ C por aproximadamente 5 días. Una vez desarrolladas las colonias, se procedió a la identificación de las mismas.

El hongo patógeno a emplear fue aislado a partir de frutos de frutilla (*Fragaria x Ananassa*) con moho gris, empleando técnicas convencionales de laboratorio usando agar papa glucosado (APG) como medio de cultivo.

La evaluación de la capacidad antagónica se efectuó por medio de la técnica de cultivos duales; en cajas de Petri con APG se sembraron enfrentados 2 discos de 5 mm de diámetro, uno proveniente de colonias del patógeno y el otro del biocontrolador. Las cajas se incubaron en oscuridad a $25 \pm 2^\circ$ C durante 6 días.

Los cultivos duales se utilizaron para evaluar competencia por sustrato e hiperparasitismo midiendo dos variables: ubicación en la escala de clases de Bell *et al* (1982) y crecimiento radial evaluado a través de la fórmula de porcentaje de inhibición del crecimiento de Royse y Ries (1978).

Escala de Bell: consta de 5 clases

1. el antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno;
- 2.

3. el antagonista llega a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo;
4. el antagonista y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno parece dominar al otro;
5. el patógeno sobrepasa al crecimiento del antagonista colonizando tres cuartas partes de la caja de Petri;
6. el agente fitopatógeno llega a cubrir totalmente la caja de Petri.

Fórmula de Royse y Ries:

$$\% I = ((R2-R1)/R2) \times 100$$

Donde:

% I= porcentaje de inhibición

R1: distancia entre el punto del inóculo del fitopatógeno y el borde de la colonia medida en dirección del inóculo del biocontrolador.

R2: crecimiento de la colonia del fitopatógeno medido en dirección del radio máximo.

La antibiosis se evaluó a través de la producción de metabolitos volátiles y metabolitos no volátiles. El primer parámetro estima la capacidad fungistática y de actuar a distancia del biocontrolador, para ello se enfrentaron dos fondos de caja de Petri con APG; en el centro de la inferior se sembró un disco de 5 mm de colonia de la cepa de *Trichoderma* sp. Se incubó 4-5 días a 25 ± 2 °C; luego se sembró sobre la tapa superior un disco de 5 mm de la colonia del patógeno. El Testigo estuvo constituido por dos fondos de cajas enfrentadas con medio de cultivo sobre uno de los cuales se depositó un disco del patógeno.

El segundo parámetro mide la capacidad del biocontrolador de actuar *in situ*. En este caso el fondo de una caja de Petri con APG se cubrió con papel celofán previamente esterilizado sobre el cual se sembró un disco de 5 mm de colonia de la cepa de *Trichoderma* sp. para los tratamientos y para el Testigo se colocó un disco de 5 mm de APG. A los 4 días se retiró el celofán y se sembró un disco de 5 mm de colonia del patógeno sobre el medio de cultivo, tanto en Testigo como en los tratamientos.

Cada prueba se trabajó con 5 repeticiones por tratamiento usando un diseño completamente aleatorizado (DCA). El experimento continuó hasta que las colonias Testigo alcanzaron el borde de la caja. Se calculó la superficie promedio de la colonia Testigo y se determinó el porcentaje de inhibición o reducción de las colonias del patógeno aplicadas con el biocontrolador con respecto al Testigo sin tratar.

Los resultados se analizaron mediante una prueba de comparación de medias (Tukey 5%) utilizando el programa estadístico Infostat.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con respecto a los cultivos duales, considerando la escala de Bell, se observó que *B. cinerea*, fue totalmente colonizado por *Trichoderma* sp., tal como se muestra en el Cuadro 1, en concordancia con los datos obtenidos por Merchán-Gaitán *et al* (2014) y Guédez *et al* (2009).

CEPAS	Grados/patógeno
Cepa 1	1
Cepa cátedra	2
SS	2
Frutilla	2
Compost cátedra	1
LP4	1
LP5	1
Invernadero	1
campo + guano	2
Campo + compost	1
Compost Terceros	1

Cuadro 1: Comportamiento de las cepas de *Trichoderma sp* según las clases de Bell.

En cuanto al crecimiento radial, se observó que todas las cepas inhibieron el crecimiento del patógeno (Figura 1), en concordancia con lo expuesto por Arcos Plazas (2011), siendo las de mejor comportamiento “Cepa cátedra” (46%), “SS” (42%) e “Invernadero” (36%), tal como se muestra en el Cuadro 2, a pesar que mostraron valores inferiores a los indicados por Bogumil *et al* (2013).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% Inhib	55	1,00	1,00	1,82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6206,76	10	620,68	2204,87	<0,0001
CEPAS	6206,76	10	620,68	2204,87	<0,0001
Error	12,39	44	0,28		
Total	6219,14	54			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,14035

Error: 0,2815 gl: 44

CEPAS	Medias	n	
LP4	10,81	5	A
LP5	15,17	5	B
Compost cátedra	17,39	5	C
Campo + compost	27,27	5	D
Cepa 1	27,27	5	D
Campo + guano	30,95	5	E
Frutilla	31,25	5	E
Invernadero	35,89	5	F
Compost Terceros	37,50	5	G
SS	41,77	5	H
Cepa cátedra	45,94	5	I

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Cuadro 2: Capacidad de inhibición por competencia por sustrato de las cepas del biocontrolador

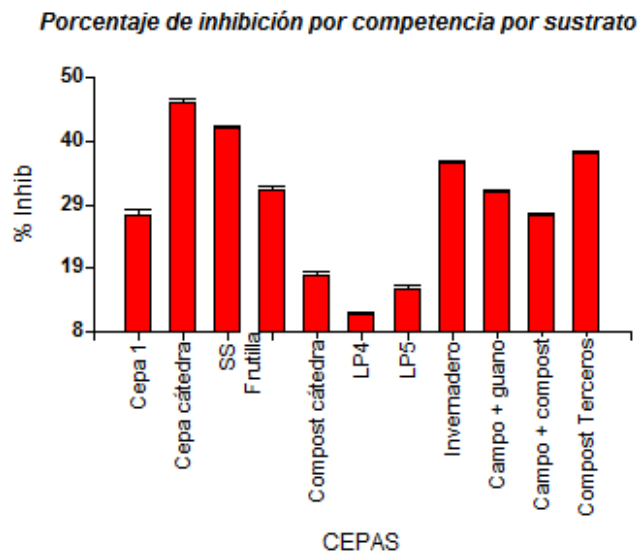


Figura 1: Porcentaje de inhibición por competencia por sustrato de las cepas

En las pruebas de metabolitos volátiles, que muestran el efecto antibiótico a distancia del biocontrolador, las colonias Testigo se desarrollaron completamente a las 72 hs., tiempo durante el cual la cepa que mejor comportamiento mostró fue “Frutilla” con 78 % de inhibición, al igual que “Compost Terceros” (78 %), mientras que la que menos inhibió fue “Campo+guano” con un 39 % (Cuadro 3). En la Figura 2 se observa que todas las cepas estudiadas inhibieron el crecimiento del patógeno.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% Inibicion	55	0,98	0,98	2,76

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7557,66	10	755,77	228,65	<0,0001
Cepas	7557,66	10	755,77	228,65	<0,0001
Error	145,43	44	3,31		
Total	7703,09	54			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,90757

Error: 3,3053 gl: 44

Cepas	Medias	n	
campo + guano	38,72	5	A
Cepa 1	47,74	5	B
SS	65,20	5	C
Campo + compost	65,20	5	C
LP5	65,20	5	C
Invernadero	67,97	5	C
Cepa cátedra	72,13	5	D
Compost cátedra	73,17	5	D
LP4	73,45	5	D
Frutilla	77,91	5	E
Compost Terceros	77,91	5	E

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Cuadro 3: Capacidad de inhibición por antibiosis a distancia de las cepas del biocontrolador

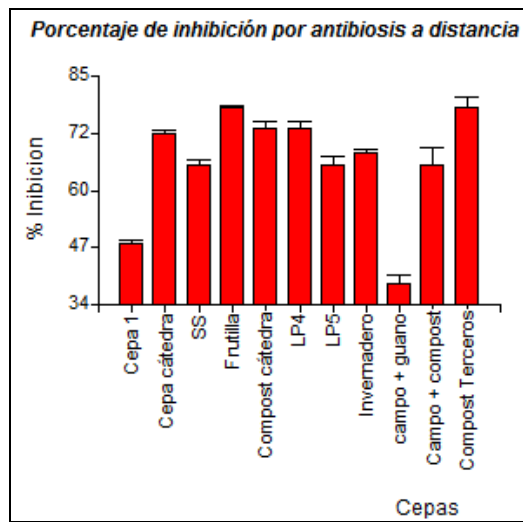


Figura 2: porcentaje de inhibición por antibiosis a distancia

En el ensayo de metabolitos no volátiles (antibiosis *in situ*), la colonización de las cajas de Petri con medio de cultivo se produjo a las 72 hs. de sembrados los discos del patógeno. Se pudo observar que la cepa con mayor acción inhibitoria fue “Cepa cátedra” con 93 %, seguida por “Campo+compost” (92 %) (Cuadro 4). Asimismo en la Figura 3 se observa que todas las cepas probadas tienen una capacidad inhibitoria *in situ* superior al 65 %.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%I	55	0,69	0,62	6,45

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2982,35	10	298,23	9,97	<0,0001
Cepas	2982,35	10	298,23	9,97	<0,0001
Error	1316,37	44	29,92		
Total	4298,72	54			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=11,75606

Error: 29,9176 gl: 44

Cepas	Medias	n	
Compost cátedra	68,44	5	A
campo + guano	77,59	5	A B
Cepa 1	79,79	5	A B C
Invernadero	80,71	5	B C D
Frutilla	81,71	5	B C D
LP5	88,64	5	B C D E
Compost Terceros	88,64	5	B C D E
SS	90,05	5	C D E
LP4	90,75	5	C D E
Campo + compost	92,06	5	D E
Cepa cátedra	93,76	5	E

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Cuadro 4: Capacidad inhibitoria por antibiosis *in situ* de las cepas del biocontrolador

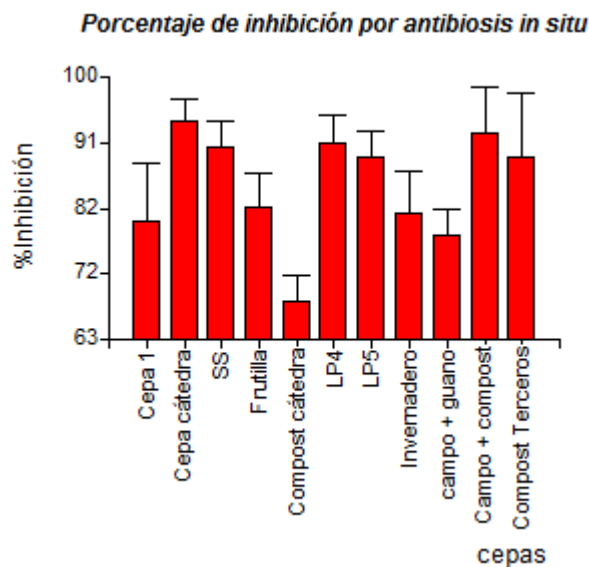


Figura 3: Porcentaje de inhibición por antibiosis in situ de las cepas del biocontrolador

Los resultados obtenidos en las pruebas de antibiosis *in situ* y a distancia coinciden con los mencionados por Miller *et al* (2015) para hongos de suelo.

CONCLUSIÓN

Las once cepas de *Trichoderma sp.* lograron inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea* por lo que pueden ser usadas para el manejo del patógeno.

Considerando las distintas acciones como biocontrolador, la Cepa cátedra es la que mostró el comportamiento más uniforme siendo promisorio para ser considerada en aplicaciones en suelo, hojas y frutos. Para tratamientos de suelo, por su óptima acción a distancia, se destacan las cepas Frutilla y Compost Terceros mientras que Campo+compost, por su efecto antibiótico *in situ*, mostró potencial para ser usada en aplicaciones foliares y en frutos precosecha y poscosecha.

Por el accionar de las distintas cepas es recomendable probar la mezcla de las mismas.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (2005). Plant Pathology. Department of Plant Pathology. University of Florida. EUA.
- Ángel, M.L. (2007). *Botrytis cinerea* Pers. Bases epidemiológicas y control. Fungicides Andean Region Bayer S.A.
- Arcos Plazas, M.D. (2011). Obtención y evaluación de cepas nativas de *Trichoderma spp.* en el biocontrol de *Botrytis cinerea* en el cultivo de rosas. Escuela Politécnica Del Ejército. Sangolquí – Ecuador.
- Bell, D.K.; Wells, H.D. and Markham, C.R. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology. Vol.72. Págs. 379-382.
- Bogumił, A.; Sas Paszt, L.; Lisek, A.; Trzcíński, P. and Harbuzov, A. (2013). Identification of new *Trichoderma* strains with antagonistic activity against *Botrytis cinerea*. Folia Horticulturae. Vol.25, N° 2. Pág.123-132.
- Cruzat, R. and Ionannidis, D. (2008). Resultados y lecciones en biocontrol de enfermedades fungosas con *Trichoderma spp.* Proyecto de innovación en las regiones de O'Higgins y del Maule. Chile.

- Endara Borja, M. A. (2009). Reproducción del hongo *Trichoderma harzianum* (biofungicida) aprovechando desechos agroindustriales (residuos de papa, tamo de frejol, bagazo de caña). Tesis de grado. Universidad Técnica del Norte, Ibarra- Ecuador.
- Guédez, C., Cañizález, L., Castillo, C. y Olivar, R. 2009. Efecto antagonístico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología; 29:34-38
- Merchán-Gaitán, J.B.; Ferrucho, R.L.; Álvarez-Herrera, J.G. (2014). Efecto de dos cepas de *Trichoderma* en el control de *Botrytis cinerea* y la calidad del fruto en fresa (*Fragaria* sp.) Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas - Vol. 8 - No. 1 - pp. 44-56.
- Miller, M.; Zapata, S.R.; Murillo, B.; Guerrero, E.; Mónaco, C. y Cordo, C. 2015. Comparación de *Trichoderma* spp. y *Bacillus subtilis* como biocontroladores sobre hongos habitantes del suelo y de la rizosfera. Acta de Resúmenes XXXVIII Reunión de Trabajo de la Asociación Argentina de Energías Renovables y Ambiente. ASADES Vol 3:91.
- Royse, D.J. & Ries, S.M. 1978. The influence of ungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. Phytopath. 68: 603-607.
- Sarasola, A.A. y Rocca de Sarasola, M.A. (1975). Fitopatología Curso moderno. Tomo IV. Ed. Hemisferio Sur.
- Zapata, R.; Quiroga, M.; Murillo, B.; Agüero, D.; Lisi, B. y Mena, P. (2012). *Trichoderma* spp. biocontrolador y promotor de crecimiento: una alternativa al uso de agroquímicos en cultivos intensivos. Avances en energías renovables y medio ambiente. Vol.16.

ABSTRACT: In sustainable agriculture context, to work with biocontrol agents in pest management is a very important tool to reduce the application quantity of agrochemicals which are harmful to human health and environment. This work evaluated, in laboratory, antagonistic capacity of *Trichoderma* sp wild strain against *Botrytis cinerea* fungus. Eleven strains were proved by substrate competition, hyperparasitism, and *in situ* and at distance activity through metabolites production. All strains tested showed inhibitory capacity standing out for its best behavior Cepa cátedra.

Palabras clave: *Botrytis cinerea*, *Trichoderma* sp., biocontrol agent, strawberry.