

Caracterización de mecanismos de antagonismo en aislamientos de *Trichoderma Persoon*

Sandoval MC¹⁻², Casacchia Sassone LR¹⁻³, Ruiz CS¹

¹ Cátedra de Fitopatología FCA-UNLZ, ² IIPAAS, ³ Becario EVC.

Introducción

Uno de los agentes de control biológico más estudiados a nivel mundial es *Trichoderma spp* un microorganismo fúngico del cual se ha demostrado que posee capacidad para interferir en los procesos vitales de distintos patógenos. (Martínez *et al.*, 2013). Entre los numerosos ejemplos exitosos de su aplicación puede citarse el control de *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* agentes causales de podredumbres y marchitamientos en cultivos intensivos (Guédez *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2013). Su acción contra patógenos de semillas, raíz y órganos aéreos en cultivos intensivos ha sido estudiada por Amein *et al.* (2011), y Mancini y Romanazzi (2014), entre otros. Para las patologías enumeradas se obtuvieron productos comerciales a base de *Trichoderma* denominados biopreparados (Aquino *et al.*, 2008; Chiriboga *et al.*, 2015). En Argentina, se han realizado numerosas investigaciones en el campo disciplinar del control biológico. Estas investigaciones fueron recopiladas en la amplia revisión realizada sobre el tema por Betiol *et al.* (2014).

Trichoderma posee tanto actividad antagonista como estimuladora del crecimiento vegetal. La capacidad antagonista está relacionada con la especificidad de la cepa y de sus modos de acción. Esto es, pueden existir aislamientos que sean más eficientes para el control de un patógeno y no de otro, lo cual hace necesaria la evaluación de la especificidad (Martínez *et al.*, 2008). Motivo por el cual durante el proceso de selección de aislamientos promisorios para el control de un patógeno determinado es importante estudiar los mecanismos relacionados con dicho control. Estos mecanismos incluyen: antibiosis, competencia (por espacio y nutrientes), micoparasitismo y, desactivación de enzimas de los patógenos, entre otros (Harman, 2000).

A partir de estos antecedentes, se realizó el presente trabajo con el objetivo de caracterizar cinco cepas de *Trichoderma* a partir de la detección de mecanismos de control biológico en pruebas de antagonismo *in vitro* con *Alternaria alternata* (Fr) Keissl, agente causal del manchado foliar en salvia (*Salvia officinalis* L.) (Sandoval y Noelting, 1999; Madia y Gaetan, 2007)

Materiales y Métodos

Patógeno

La cepa *A. alternata* utilizada en el estudio proviene de hojas de salvia sintomáticas (manchado foliar). Para la obtención del inóculo para las pruebas de laboratorio se procedió a cultivar el hongo en tubos en un medio de cultivo de agar papa glucosado (APG) al 2% p/v y en caldo de papa glucosado (CPG) al 2% p/v.

Antagonista

Se utilizaron tres cepas de *Trichoderma* y dos de *T. harzianum* mantenidas por sucesivos repiques en APG, la procedencia de cada una de las cepas se detalla en la Tabla 1.

Pruebas de antagonismo: Se realizaron mediante la aplicación de: i) la técnica de "cultivo dual" la cual consistió en la siembra en el centro de placas Petri, con medio APG (2%), de una sección de 5 mm de cultivo del patógeno enfrentada a una sección del antagonista de igual tamaño y distanciadas 4 cm una de la otra. Las placas cubiertas con film transparente fueron incubadas durante 8 días a una temperatura de 22°C. Los testigos consistieron en la siembra en forma individual de *A. alternata* y *Trichoderma*. Durante el período de incubación fue medido el diámetro de las colonias de los microorganismos en estudio, con el objetivo de evaluar el efecto del antagonista sobre las colonias del patógeno. Además, se realizaron observaciones macro y microscópicas de la zona de interacción entre el patógeno y el antagonista y del tipo de estructura fúngica en el caso de las pruebas de metabolitos volátiles, filtrado de cultivo y discos; ii) técnica de detección de metabolitos volátiles, consistió en la siembra de cada par de microorganismos en estudio en la misma placa de Petri conteniendo APG (2%) en la base y la tapa de la misma. El antagonista fue sembrado en la base y el patógeno en la tapa de la placa. Las condiciones de incubación y el procedimiento de medición del diámetro de colonias fueron idénticos a los descritos para cultivo dual; y iii) método de discos, se emplearon cultivos líquidos de los aislamientos de *Trichoderma*, desarrollados durante cinco días en medio caldo de papa glucosado (CPG 2%). Luego de determinar el crecimiento de estos cultivos en CPG (2%) con un hematocímetro se ajustó la concentración $\geq 2 \times 10^8$ conidios/micelio/mL. De estos cultivos se obtuvo una suspensión libre de estructuras fungosas por filtrado, en condiciones de asepsia, con papel Whatman N° 4 con la cual se impregnaron discos de papel de filtro (0,5 mm de diámetro). Una vez secos los discos fueron colocados en número de cinco en cajas de Petri conteniendo APG (2%). Todas las placas fueron previamente sembradas con un cultivo puro del patógeno empleando el método de estrías en superficie. El procedimiento utilizado para estimar la acción inhibitoria consistió en la observación de la presencia o ausencia de halos (de inhibición), en la periferia de los discos impregnados con la solución. Como tratamiento testigo, se utilizaron discos de papel de filtro sumergidos solamente en el medio líquido antes de colocarlos en las cajas sembradas con el patógeno. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. El análisis efectuado a los datos correspondientes al diámetro de colonias del patógeno y los antagonistas, consistió en la realización del análisis de la varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Tuckey (significancia de medias) al 5 % de probabilidades empleando el programa Statistk.

Resultados y discusión

En el caso de los cultivos duales, se observó la presencia de efecto antagónico sobre el crecimiento de las colonias del patógeno (Tabla 1). La reducción en el diámetro de las colonias del patógeno mediada por los aislamientos del antagonista fue estadísticamente significativa con los cinco aislamientos probados y la reducción fue mayor para tres de los aislamientos aloctónos.

Tabla 1. Diámetro de colonias de *A. alternata* (patógeno de salvia) en cultivo individual y dual con cinco aislamientos de *Trichoderma*.

Antagonista + patógeno	Procedencia	Diámetro de colonias (cm) Valores Promedio ⁽¹⁾ ±DS	Halos de inhibición
Testigo (<i>A. alternata</i>)		4,60±0,12 a	-
<i>Trichoderma</i> 1	Rizoplano ⁽²⁾ salvia	2,86±0,05 b	+
<i>T. harzianu</i> 1	Filoplano ⁽²⁾ salvia	2,43±0,55 b	+
<i>T.harzianu</i> 2	Filoplano romero	0,86±0,01 c	+
<i>Trichoderm</i> 2	Sustratos cultivo	0,79±0,04 c	+
<i>Trichoderm</i> 3	Filoplano albahaca	0,78±0,05 c	+

⁽¹⁾Valores promedio seguidos de igual letra en la misma columna no difieren estadísticamente al nivel 5% de probabilidad.

⁽²⁾ Microambiente en la superficie de la raíz y la hoja, respectivamente

Mecanismos involucrados en el antagonismo. En los cultivos duales de *A. alternata* y los cinco aislamientos del antagonista ensayados se observó que a partir del segundo día de incubación y en ausencia de contacto entre los micelios de ambos microorganismos, se desarrolló una zona de inhibición del crecimiento (halo de inhibición) y un cambio en el color del medio de cultivo. Estas modificaciones son características del mecanismo denominado antibiosis (Mukherjee *et al.*, 2006), que podría deberse a la excreción de metabolitos secundarios en el medio de cultivo (Hernández Mendoza *et al.*, 2015). Además, en los cultivos duales de los aislamientos *T. harzianum* 2 y *Trichoderma* 3 el antagonista impidió el desarrollo de *A. alternata* al formar una barrera conformada por micelio y abundante esporulación en el sitio de contacto al quinto día de la prueba, indicando antagonismo por competencia de sustrato. Finalmente, la observación de preparaciones de estructuras fúngicas del patógeno cercanas a la zona de interacción con los antagonistas, exceptuando los aislamientos *Trichoderma* 1 y *T. harzianum* 1, permitió la identificación de modificaciones consistentes con adelgazamiento de hifas, lo cual indica la presencia de micoparasitismo (Hernández Mendoza *et al.*, 2015).

Mientras que, los resultados alcanzados en la prueba de detección de metabolitos volátiles mostraron resultados positivos en la disminución del diámetro de colonias del patógeno sólo en cultivo con el aislamiento *T. harzianum* 1 (Tabla2). Finalmente, en la prueba de discos los cinco aislamientos probados evidenciaron la presencia de halos de inhibición, indicando la acción del mecanismo antagónico de antibiosis (Tabla 2). Este resultado confirmaría que el mecanismo de antibiosis observado utilizando la técnica de

INVESTIGACIÓN

Sandoval *et al.*

Caracterización de mecanismos [...]

cultivo dual se debe a la excreción de metabolitos secundarios en el medio de cultivo (Harman, 2000; Mukherjee *et al.*, 2006).

Tabla 2. Diámetro de colonias de *A. alternata* (patógeno de salvia) en cultivo individual y dual (técnica de metabolitos volátiles) y presencia de halos de inhibición (método de discos) con cinco aislamientos de *Trichoderma*.

Antagonista + patógeno	Procedencia	Diámetro de colonias (cm) Valores Promedio (¹) ±DS(²)	Halos de inhibición (³)
Testigo (<i>A. alternata</i>)		5,00±1,86 a	-
<i>Trichoderma</i> 1	Rizoplano salvia	4,93±1,07a	+
<i>T. harzianu</i> 1	Filoplano salvia	3,30±0,51 b	+
<i>T. harzianu</i> 2	Filoplano romero	4,80±0,94 a	+
<i>Trichoderm</i> 2	Sustratos cultivo	4,60±1,17ab	+
<i>Trichoderm</i> 3	Filoplano albahaca	4,63±0,62ab	+

(¹)Valores promedio seguidos de igual letra en la misma columna no difieren estadísticamente al nivel 5% de probabilidad.

(²) Técnica de metabolitos volátiles. (³)Método de discos

Consideraciones finales

Los aislamientos de *Trichoderma* y *T. harzianum* ensayados poseen capacidad antagonista sobre el crecimiento de *A. alternata* en condiciones *in vitro*. Los dos aislamientos con mayor efecto antagónico pueden considerarse alóctonos, dado que fueron aislados de filoplano y sustratos de cultivo de otras especies aromáticas medicinales.

El conocimiento acerca de los distintos mecanismos de antagonismo de los aislamientos ensayados es útil para evaluar la inclusión de estos aislamientos en las siguientes etapas del plan de control biológico. Se destaca la capacidad de micoparasitismo detectada en los aislamientos *T. harzianum* 2 y *Trichoderma* 2 y 3, dada su aplicación potencial en el control del patógeno en condiciones de cultivo a campo.

Bibliografía

Amein T, Al WS, Wikstrom M, Koch E., Schmitt A, Sthepan D, Jahn M, Tinivella F, Gullino M L, Forsberg G, Werner S, van del Wolf J, Groot SRC. 2011. "Evaluation on non-chemical seed treatment methods for control of *Alternaria brassicicola* on cabbage seeds". *J. Plant Dis. Protec.* 118: 214-221

INVESTIGACIÓN

Sandoval *et al.*

Caracterización de mecanismos [...]

Aquino Martínez JD, Vázquez García LM, Reyes BJ. 2008. "Biocontrol *in Vitro* e *in vivo* de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans. con hongos antagonistas nativos de la zona florícola de Villa Guerrero Estado de México". *Revista Mexicana de Fitopatología*. 26 (2): 127-137.

Bettiol Wagner, Rivera MC, Mondino P, Montealegre A, Jaime R, Colmenárez V, Yelitza C. (ed). 2014. *Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe*, Facultad de Agronomía. Universidad de la República, Montevideo.

Chiriboga H, Gómez G, Garcés K. 2015. *Protocolos para formulación y aplicación del bio insumo: Trichoderma spp para el control biológico de enfermedades*. IICA, Paraguay

Guédez C, Cañizalez L, Castillo C, Olivar R. 2012. "Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate". *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 32: 44-49

Harman GE. 2000. "Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22". *Plant Dis*. 84: 377-393

Madia M, Gaetan S. 2007. "Síntomas en órganos aéreos producidos por patógenos fúngicos identificados en especies aromáticas y medicinales en la Argentina". *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromáticas* 6 (6): 409-410

Mancini V, Romanazzi G. 2014. "Seed treatments to control seedborne fungal pathogens of vegetable crops". *Pest Management Sci*. 70(6): 860-868

Martínez B, Reyes Y, Infante D, González E, Baños H, Cruz A. 2008. "Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz". *Rev. Protección Veg.* 23(2):118-125.

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

Mendoza JLH, Pérez MIS, Prieto JMG, Velásquez JDQ, Olivares JGG, Langarica HRG. 2015. "Antibiosis of *Trichoderma* spp strains native to northeastern Mexico against the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*". *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4): 1093–1101. <http://doi.org/10.1590/S1517-838246420120177>

Mukherjee M, Horwitz BA, Sherkhane PD. 2006. "A secondary metabolite biosynthesis cluster in *Trichoderma virens* evidence from analysis of genes under expressed in a mutant of defective in morphogenesis and antibiotic production". *Current Genet.*;50:193–202.

Sandoval M.C, Noelting MC. 1999. "Determinación de agentes causales de necrosis, marchitamiento podredumbre de especies aromáticas". *Lib de Res. III Congreso Latinoamericano de Micología*. Caracas. (Res) pág. 114