

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EFFECTO DE LA SECUENCIA DE CULTIVOS EXTENSIVOS SOBRE LAS  
POBLACIONES NATIVAS DE TRICHODERMA SPP. EN SISTEMAS DE  
AGRICULTURA CONTINUA SIN LABOREO**

**por**

**Fabrizio LANGONE  
Diego CHOUHY**

**TESIS presentada como uno de  
los requisitos para obtener el  
título de Ingeniero Agrónomo.**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2014**

Tesis aprobada por:

Director: \_\_\_\_\_

Ing. Agr. (M.Sc., Ph.D.) Carlos Pérez

\_\_\_\_\_

Ing. Agr. Oswaldo Ernst

\_\_\_\_\_

Ing. Agr. (M.Sc., Ph.D.) Silvia Pereyra

Fecha: 24 de octubre de 2014

Autores: \_\_\_\_\_

Fabrizio Andrés Langone Vettorazzi

\_\_\_\_\_

Diego Chouhy Amorim

## **AGRADECIMIENTOS**

A todas aquellas personas que han hecho posible y nos han apoyado en este trabajo, en especial a nuestro director de tesis, Ing. Agr. Carlos Pérez por darnos la oportunidad de trabajar con él y por su apoyo incondicional y disposición para que podamos realizar este trabajo al igual que el Ing. Agr. Andrés Villar que también colaboró en todo momento. Por otro lado el agradecimiento también a nuestras familias y amigos que han estado siempre durante todo el proceso de formación de esta carrera.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PAGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS .....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
1.1 OBJETIVOS .....	2
1.1.1 <u>Objetivo general</u> .....	2
1.1.2 <u>Objetivos específicos</u> .....	2
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	3
2.1 CARACTERÍSTICAS DE LA AGRICULTURA URUGUAYA.....	3
2.2 IMPORTANCIA DE LA SANIDAD EN CULTIVOS EXTENSIVOS.....	4
2.2.1 <u>Patógenos</u> .....	4
2.2.2 <u>Alternativas de manejo</u> .....	5
2.3 POSIBILIDADES DEL CONTROL BIOLÓGICO EN CULTIVOS EXTENSIVOS. ANTECEDENTES Y LIMITANTES .....	6
2.4 <i>TRICHODERMA</i> COMO ORGANISMO BENÉFICO .....	7
2.4.1 <u>Clasificación taxonómica</u> .....	7
2.4.2 <u>Biología de <i>Trichoderma</i> spp</u> .....	8
2.4.3 <u>Mecanismos de biocontrol de <i>Trichoderma</i></u> .....	9
2.4.4 <u>Factores que afectan el desarrollo de <i>Trichoderma</i></u> .....	12
2.5 FACTORES QUE AFECTAN LAS POBLACIONES MICROBIANAS....	13
3 <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	17
3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL EXPERIMENTO.....	17
3.2 MUESTREO DE SUELO Y RASTROJO .....	17
3.3 CUANTIFICACIÓN DE POBLACIONES DE <i>TRICHODERMA</i> .....	18
3.3.1 <u>Cuantificación de las poblaciones de <i>Trichoderma</i> presentes en                 el suelo</u> .....	19
3.3.2 <u>Cuantificación de poblaciones de <i>Trichoderma</i> presentes en                 rastrajo</u> .....	20
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> .....	21
4.1 CARACTERIZACIÓN CLIMÁTICA.....	21

4.2 EFECTO DE LAS SECUENCIAS DE CULTIVO SOBRE LAS POBLACIONES DE <i>TRICHODERMA</i> EN EL SUELO .....	24
4.3 EFECTO DE LAS SECUENCIAS DE CULTIVO SOBRE LAS POBLACIONES DE <i>TRICHODERMA</i> EN EL RASTROJO .....	26
4.4 EFECTO DE LA ROTACIÓN SOBRE LAS POBLACIONES DE <i>TRICHODERMA</i> EN EL SUELO .....	27
4.4.1 <u>Primavera 2010</u> .....	27
4.4.2 <u>Otoño 2011</u> .....	28
4.4.3 <u>Comparación de la población de <i>Trichoderma</i> entre estaciones de muestreo</u> .....	29
4.5 EFECTO DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL SUELO SOBRE LAS POBLACIONES DE <i>TRICHODERMA</i> .....	31
4.6 EFECTO DE LA ROTACIÓN SOBRE LAS POBLACIONES DE <i>TRICHODERMA</i> EN EL RASTROJO.....	32
4.6.1 <u>Primavera 2010</u> .....	32
4.6.2 <u>Otoño 2011</u> .....	32
4.7 EFECTO DE LOS CULTIVOS SOBRE LAS POBLACIONES DE <i>TRICHODERMA</i> EN RASTROJO Y SUELO .....	34
4.7.1 <u>Efecto de los cultivos antecesores sobre las poblaciones de <i>Trichoderma</i> en el suelo</u> .....	34
4.7.2 <u>Efecto del cultivo antecesor sobre las poblaciones de <i>Trichoderma</i> en el rastrojo</u> .....	36
4.8 DISCUSIÓN .....	38
5. <u>CONCLUSIONES</u> .....	41
6. <u>RESUMEN</u> .....	42
7. <u>SUMMARY</u> .....	43
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	44
9. <u>ANEXOS</u> .....	52

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Formulación del medio selectivo para <i>Trichoderma</i> .....	19
2. <i>P</i> -valor del análisis por contrastes ortogonales de la población de <i>Trichoderma</i> en el suelo de primavera y otoño .....	25
3. <i>P</i> -valor del análisis por contrastes ortogonales de la población de <i>Trichoderma</i> en rastrojo de primavera y otoño .....	26
4. Valores de los diferentes parámetros medidos en el suelo según los diferentes tratamientos.....	31
5. Correlación y <i>p</i> -valor de las poblaciones de <i>Trichoderma</i> con los diferentes parámetros medidos en el suelo .....	31
6. Significancia de los contrastes entre las poblaciones de <i>Trichoderma</i> en el suelo según el antecesor de invierno 2009. Muestras de primavera 2010 .....	35
7. Significancia de los contrastes entre las poblaciones de <i>Trichoderma</i> en el suelo según el antecesor de invierno 2009. Muestras de otoño 2011 .....	35
8. Contrastes entre cultivos de invierno y su correspondiente <i>P</i> -valor en suelo. Muestras de otoño.....	36
9. Contrastes entre cultivos de verano y su correspondiente <i>p</i> -valor en rastrojo. Muestras de primavera .....	37
Figura No.	
1. Placa de Petri con colonias de <i>Trichoderma</i> creciendo en medio selectivo.....	20
2. Precipitaciones y temperatura registradas entre enero 2010 y marzo 2011 en comparación con el promedio histórico. ....	21

3. Lluvias registradas tres meses previo al muestreo de primavera 2010 en comparación con registros históricos del 2000 al 2010 .....	22
4. Temperatura registradas tres meses previo al muestreo de primavera 2010 en comparación con registros históricos del 2000 al 2010 .....	23
5. Lluvias registradas tres meses previo al muestreo de otoño 2011 en comparación con registros históricos del 2000 al 2010.....	23
6. Temperaturas registradas tres meses previo al muestreo de otoño 2011 en comparación con registros históricos del 2000 al 2010 .....	24
7. Población de <i>Trichoderma</i> en suelo (ufc/g suelo) en primavera 2010 según las diferentes secuencias .....	25
8. Población de <i>Trichoderma</i> en suelo (ufc/g suelo) en otoño 2011 según las diferentes secuencias .....	26
9. Población de <i>Trichoderma</i> en rastrojo (ufc/g rastrojo) en primavera según las diferentes secuencias. ....	27
10. Población de <i>Trichoderma</i> en el suelo (ufc/g suelo) según los diferentes tratamientos en la primavera 2010 .....	28
11. Población de <i>Trichoderma</i> en el suelo (ufc/g suelo) según los diferentes tratamientos en el otoño 2011.....	29
12. Población de <i>Trichoderma</i> en el suelo (ufc/g suelo) según los diferentes tratamientos y estación de muestreo (otoño y primavera). ....	30
13. Correlación entre las poblaciones de <i>Trichoderma</i> en el suelo (ufc/g suelo) de primavera y las de otoño, promedio de los tratamientos.....	30
14. Población de <i>Trichoderma</i> en el rastrojo (ufc/g rastrojo) según los diferentes tratamientos (muestreo de primavera 2010) .....	32

15. Población de <i>Trichoderma</i> en el rastrojo (ufc/g rastrojo) según los diferentes tratamientos (muestreo de otoño 2011).....	33
16. Población de <i>Trichoderma</i> en el rastrojo (ufc/g rastrojo) según los diferentes tratamientos y estación de muestreo (otoño y primavera) .....	34
17. Poblaciones promedio de <i>Trichoderma</i> en el suelo (ufc/g suelo) según anteuúltimo antecesor (muestras de primavera) y antepenúltimo antecesor (muestras de otoño) .	36
18. Poblaciones promedio de <i>Trichoderma</i> en el rastrojo (ufc/gr rastrojo) según ultimo antecesor en muestras de primavera y otoño .....	38

## 1. INTRODUCCIÓN

Históricamente la agricultura en Uruguay ha tenido un rol significativo pero secundario en dimensión económica frente al sector pecuario a través de los años desde que se incorporó en el país hace aproximadamente un siglo. Sin embargo en la última década la agricultura ha tomado un protagonismo importante frente a otros rubros debido al incremento de los precios de los granos entre otros factores, lo cual tuvo como consecuencia un incremento en el área sembrada y en la intensificación de la misma (Arbeletche y Gutiérrez, 2010).

En la coyuntura actual, la agricultura es realizada en un 90% en siembra directa con doble cultivo anual, con un gran predominio de la rotación trigo-soja, y con una tendencia de alargar la fase agrícola (MGAP. DIEA, 2010). Esta intensificación de la agricultura sumada al incremento del área en siembra directa ha generado algunas problemáticas desde el punto de vista sanitario debido a la permanencia del rastrojo en superficie.

Si bien la permanencia del rastrojo en superficie es clave para la sustentabilidad del sistema (Ernst y Siri, 2000), indirectamente también trae acarreado la sobrevivencia de patógenos necrotróficos en la chacra. Esto es un problema mayor si lo que se quiere es alargar la fase agrícola o eliminar la pastura de la rotación, ya que se tiene la limitante de tener pocas opciones a la hora de elegir el cultivo a sembrar.

Por lo tanto, esta situación hace que los cultivos se desarrollen en ambientes con alta presión de inóculo de microorganismos necrotróficos, dentro de los cuales muchos se conocen por haber causado epifitas importantes (Díaz et al. 2002) y esto puede verse reflejado en el incremento significativo en el uso de fungicidas registrado en los últimos años (Pérez et al., 2011). Estos cambios recientes en la agricultura hacen la necesidad de buscar nuevas alternativas para mitigar este problema. Si bien la rotación de cultivos y el uso de cultivares resistentes son una de las herramientas más sustentables para lograr disminuir el riesgo de infección en un sistema de agricultura intensiva (Stewart et al., 2004), estas medidas están teniendo limitantes para poder ser implementadas en la actualidad.

Históricamente la rotación de cultivos se basó, desde el punto de vista sanitario, en reducir el sustrato del patógeno en el suelo por medio de la utilización de cultivos no

susceptibles de manera que el patógeno muera por inanición. Un enfoque más reciente apunta a utilizar la rotación de cultivos para incrementar las poblaciones de microorganismos benéficos presentes en el suelo que tengan un efecto antagónico sobre los patógenos (Weller et al. 2002, Mazzola 2004, Pérez et al. 2008).

Dentro de estos organismos benéficos, uno que ha demostrado tener un comportamiento antagónico frente a una gran variedad de fitopatógenos es *Trichoderma* spp. Especies de este género se encuentran en todo tipo de suelos y rastrojo, presentando diferentes mecanismos de acción como antagonista. A su vez, las poblaciones de este microorganismo han mostrado una gran respuesta a la secuencia de cultivos (Lipps y Deep 1991, Bulluck et al. 2002, Hagn et al. 2003), esta característica permite visualizar un futuro promisorio para el uso de microorganismos en la agricultura uruguaya, lo cual es uno de los motivos de este trabajo de tesis.

Por lo tanto, este estudio se basa en la hipótesis principal de que la densidad poblacional de *Trichoderma* spp. puede ser manejada por la secuencia de cultivos elegida.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo general

Reducir el impacto de las enfermedades de cultivos extensivos en siembra directa mediante la elección de secuencias de cultivos que favorecen las poblaciones nativas de *Trichoderma* spp. naturalmente presentes en el suelo.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la secuencia de cultivos sobre las poblaciones de *Trichoderma* spp. en el suelo.
- Determinar el efecto de la secuencia de cultivos sobre las poblaciones de *Trichoderma* spp. en los rastrojos de los cultivos sembrados.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS DE LA AGRICULTURA URUGUAYA

A través de los años los sistemas de producción agrícola han experimentado grandes cambios en el país, tanto en superficie sembrada como también en la tecnología utilizada. Hasta la década del 70' el sistema dominante en la agricultura uruguaya fue el cultivo continuo con laboreo, el cual se fue sustituyendo por la rotación con pasturas, hasta que en los años 90 toda la agricultura de granos terminó haciéndose en rotación con praderas, y comenzaba a incorporarse cada vez más el uso de la siembra directa como una nueva alternativa (Ernst, 2003).

Sin embargo, en la última década, la agricultura en el país ha atravesado cambios importantes en el incremento del área y en su intensificación. Los precios en el mercado internacional han llevado a un proceso de expansión e intensificación de la agricultura, en donde se ha generado que varios sistemas de rotación con pasturas hayan cambiado a sistemas de producción de agricultura continua. Estos cambios son de tal magnitud, que para el 2010/11 se sembraron casi 600 000 ha de cultivos de invierno con solo un 5% de praderas asociadas, a diferencia del año 2000/01 en donde el área sembrada de cultivos de invierno era solo de 200 000 ha, con un 45% de praderas asociadas. Sumado a esto, se ha incrementado la producción bajo forma de siembra directa, la cual ha alcanzado casi el 90% del área en invierno 2008 y aún mayor en el área de verano 2009 (MGAP. DIEA, 2010). Estos factores han inducido cambios en la dinámica de las poblaciones de patógenos y las problemáticas asociadas a estos últimos (Pérez et al., 2009).

El incremento de la siembra directa ha favorecido a la ocurrencia de enfermedades asociadas al rastrojo en los cultivos extensivos debido a que el mismo queda en la superficie del suelo. A su vez, la intensificación agrícola en el uso del suelo hace que el problema se agrave aún más al extender la fase agrícola, o hasta en algunos casos eliminar la fase pastura (Pérez et al., 2009).

## 2.2 IMPORTANCIA DE LA SANIDAD EN CULTIVOS EXTENSIVOS

Los cambios en la agricultura de los últimos años han resultado en un aumento de la importancia relativa de las enfermedades, evidenciado por un aumento masivo en el uso de fungicidas en los últimos años.

La importación de fungicidas en el 2000 fue de 6348 kg/año de principio activo, esto determinaba un valor de importación de U\$S 3.3 millones. Para el año 2010 este valor se incrementó a U\$S 18.9 millones, con un total de importación de fungicidas de 212154 kg/año de principio activo. Si bien este incremento en el uso de fungicidas va acompañado por una expansión en el área agrícola, las dimensiones son desiguales. Mientras el área agrícola paso de 400000 ha en el 2000 a 1600000 ha en el año 2010 (4 veces más), la importación de fungicidas aumento 33 veces (Pérez et al., 2011).

### 2.2.1 Patógenos

Los patógenos de cultivos extensivos pueden ser agrupados en dos grupos de microorganismos con estrategias alimenticias diferentes. Según sus requerimientos nutricionales, se puede clasificar a estos patógenos en biótrofos y necrótrofos. Los primeros son aquellos que tienen solo una fase parasítica, son parásitos obligados y dependen de la planta viva para nutrirse. Los segundos son parásitos facultativos, tienen dos fases en su ciclo de vida, una fase parasítica sobre su huésped vivo y otra saprofítica donde son capaces de seguir alimentándose de la planta después de su senescencia (Stewart et al., 2004). Estos últimos son los que se han beneficiado más por el sistema de agricultura actual.

Varios patógenos han causado epifitas importantes en la agricultura uruguaya, como es el caso de la fusariosis de la espiga en cultivos de invierno (causada principalmente por *Gibberella zae*) y el cancro del girasol (causado por *Diaporthe helianthi*) (Díaz et al., 2002). Otros no han tenido impactos tan espectaculares pero sí se encuentran afectando el rendimiento y calidad de grano, como es el caso de las manchas foliares en trigo y cebada. Dentro de este grupo se encuentran la mancha de la hoja (*Zymoseptoria tritici*) y mancha amarilla (*Pyrenophora triticirepentis*) en trigo, y la mancha en red (*Pyrenophora teres*) y escaldadura (*Rhynchosporium secalis*) en cebada, mientras que *Bipolaris sorokiniana* afecta a ambos cultivos causando mancha marrón en trigo y mancha borrosa en cebada (Stewart et al., 2001).

### 2.2.2 Alternativas de manejo

Existen varias alternativas de manejo para disminuir las diferentes enfermedades necrotróficas que afectan la producción de cultivos. Entre ellas se encuentran el laboreo convencional, la rotación de cultivos, el control químico, el uso de cultivares resistentes, semilla libre de inóculo, entre otras.

Cuando en Uruguay los sistemas predominantes eran con laboreo convencional y en rotación con pasturas, estos patógenos, principalmente los necrotróficos no generaban demasiados problemas, ya que el efecto de arar la tierra enterraba el rastrojo reduciendo así el número de estructuras reproductivas en superficie. Además quedan expuestos a un mayor ataque de la actividad microbiana aumentando la tasa de descomposición del rastrojo (Pereyra, 1996). Sumado a esto, el ciclo con pastura aportaba el tiempo necesario para que se dé la descomposición de la mayor parte del rastrojo, provocando así que los patógenos mueran por inanición.

En la actualidad, los sistemas de la agricultura continua bajo siembra directa dependen en gran medida de la cantidad de rastrojo que quede en superficie. Sin embargo, el rastrojo también es clave para la sobrevivencia de los patógenos necrótrofos. Esto se evidencia por el aumento en la importancia de las epidemias de manchas foliares y fusariosis de la espiga y están directamente asociadas a la cantidad de rastrojo en superficie (Stewart et al. 2001, Pereyra y Dill-Macky 2008). Además, a lo anterior se agrega que escasa la variabilidad de cultivos que pueden ser utilizados en la rotación. La intensificación agrícola, junto con las pocas alternativas de cultivos, y el incremento de la siembra directa han generado un fuerte impacto en la dinámica de los patógenos asociados a los rastrojos (Pérez et al., 2009).

Las demás alternativas como el control químico, semilla libre de inóculo y resistencia genética, entre otras, contribuyen a un manejo integrado de las enfermedades pero no solucionan por sí solas el problema de raíz. La mayor limitante es la alta presión de inóculo por la escasa rotación, por lo cual si se quiere acortar la rotación es necesario buscar una forma de reducir el inóculo en el rastrojo.

## 2.3 POSIBILIDADES DEL CONTROL BIOLÓGICO EN CULTIVOS EXTENSIVOS. ANTECEDENTES Y LIMITANTES

A raíz de lo anteriormente mencionado se ha generado la necesidad de buscar nuevas alternativas de manejo que permitan minimizar el impacto de las enfermedades sobre la producción. En este marco el control biológico aparece como una alternativa posible mediante el agregado de microorganismos benéficos, los cuales tendrían un efecto antagónico frente a los microorganismos patógenos. Sin embargo, si bien se han obtenido resultados positivos con el uso de microorganismos benéficos en condiciones controladas, los resultados a nivel de campo son inconsistentes (Perelló et al. 2003, Pereyra et al. 2005).

Una de las problemáticas de esta alternativa es la falta de adaptabilidad de los agentes de biocontrol al “nuevo” ambiente donde se las quiere introducir. Perelló et al. (2003) estudiaron la supervivencia de *Trichoderma* spp. en plantas de trigo en cinco momentos diferentes después de la inoculación de la misma, y observó la disminución significativa de las unidades formadoras de colonias (ufc)/unidad de superficie foliar a medida que pasaron los días. Pereyra et al. (2005) analizaron el efecto de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* en el número de peritecios de *Gibberella zeae* en el rastrojo de trigo y encontró efectos efímeros, ya que el nuevo ambiente no les permitía expresar su potencial antagónico.

Hay numerosos factores que reducen el crecimiento y el establecimiento de los agentes de biocontrol al introducirlos al ecosistema suelo. Por lo tanto, conocer la dinámica poblacional de la microflora del suelo nativo es crucial para la implementación de estrategias de control para un sistema de producción agrícola sostenible, sobre todo si los microorganismos tienen un papel en la sanidad de los cultivos y la productividad (Vargas Gil et al., 2007).

Por lo tanto, una posible alternativa para levantar esta limitante sería seleccionar antagonistas nativos que estén naturalmente presentes en el patosistema o ambiente. Tal es el caso de *Trichoderma* spp., que durante muchos años han sido conocidos como potenciales agentes de control biológico de enfermedades de plantas causadas por muchos patógenos fúngicos transmitidos por el suelo (Papavizas, 1985). Son hongos presentes en suelo y rastrojo, con efecto antagónico ante un amplio rango de patógenos, con capacidad de descomponer el rastrojo, y que cuenta con diferentes mecanismos de acción como antagonista.

En este sentido, Cabrera (2009) seleccionó cepas de *Trichoderma* spp. naturalmente presentes en el rastrojo de trigo proveniente de chacras de distintas partes del país y demostró que en nuestros sistemas de producción viven microorganismos con muy buena capacidad antagónica. Por tanto, aun cuando hay especies del género *Trichoderma* presentes en el rastrojo deben existir algunos factores ambientales que no permiten que se expresen en la magnitud deseada.

## 2.4 TRICHODERMA COMO ORGANISMO BENÉFICO

El género *Trichoderma* ha sido estudiado durante mucho tiempo entre otras cosas por su ubicuidad, facilidad de aislamiento y cultivo, rápido crecimiento en muchos sustratos, control de amplio rangos de patógenos, acción como micoparásito y alta competencia por alimento y espacio.

Este hongo fue descrito por primera vez hace 200 años por los micólogos como un gasteromiceto y un siglo después fue clasificado como género entre los hongos filamentosos. Su habilidad como antagonista solo fue descubierta hace 50 años y sus propiedades y actividades biológicas son cada vez más usadas en la agricultura actual (Villegas, 2005).

### 2.4.1 Clasificación taxonómica

Las especies de *Trichoderma* en su gran mayoría son clasificadas como hongos imperfectos en lo que en muchos casos no se conoce su estado sexual (Howell, 2003). Cuando el estado perfecto está presente, se clasifica dentro de los hongos Ascomycetes en el género *Hypocrea*. La taxonomía tradicional está basada en las diferencias morfológicas, principalmente en el aparato de esporulación asexual según Rifai (1969), aunque en la actualidad se están empleando técnicas moleculares para la identificación y clasificación de las especies. Como consecuencia de esto, el número de especies del género *Trichoderma* que se han podido diferenciar, ha aumentado.

- Reino MYCETAE (Hongo superior)
- División EUMYCOTA
- Subdivisión DEUTEROMYCOTINA

- Clase HYPHOMYCETES
- Orden HYPHALES (MONILIALES)
- Género *Trichoderma*

(adaptado de Agrios, 1995).

#### 2.4.2 Biología de *Trichoderma* spp.

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* están mundialmente presentes y son fácilmente aisladas del suelo, madera en descomposición y en otras formas de materia orgánica. Esta amplia distribución junto con su plasticidad ecológica están relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos (Infante et al., 2009).

Las colonias tienen rápido crecimiento y las esporas (conidios) presentan un color verde característico del género. El reverso de las colonias es incoloro, amarillento, verde-amarillento, y muchas especies producen clamidosporas, esporas de resistencia, que se forman por engrosamiento de la pared de las células del micelio (Howell, 2003). El micelio es fino visto al microscopio y ralo en su mayoría, los conidióforos son ramificados, asemejándose a un árbol pequeño. Estos últimos se observan como penachos compactados que forman anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal. Estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies (Infante et al., 2009).

Las diferentes especies de *Trichoderma* se caracterizan por tener un rápido crecimiento miceliar y una elevada producción de esporas que ayuda en la colonización de diferentes sustratos y del suelo. También pueden producir antibióticos antifúngicos, enzimas extracelulares, ser competidores contra hongos patógenos, promover el crecimiento de plantas, e inducir resistencia (Ziman et al., 1996). Además compiten muy bien por nutrientes, son microparasitos muy activos y son competidoras muy eficientes en la rizosfera (Papavizas, 1985).

El potencial de *Trichoderma* como agente de biocontrol fue descrito por primera vez en 1930 por Richard Weindling y con el correr de los años se ha sumado gran cantidad de investigadores de todo el mundo en el tema (Howell, 2003).

En los 80' Baker en la Universidad de Colorado y Chet en Israel demostraron que cepas de *Trichoderma harzianum* tenían la habilidad de promover el crecimiento de las plantas y que este efecto estaba aparentemente separado de su habilidad como biocontrolador (Kubicek y Harman, 1998). Como biocontrolador, las especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos y parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos (Yedidia et al. 1999, Ezziyyani et al. 2003). Esto ha llevado a su uso en la producción comercial para muchos cultivos en EEUU, con mezclas de especies del mismo género en otros países (Howell, 2003).

#### 2.4.3 Mecanismos de biocontrol de *Trichoderma*

El biocontrol por parte de las especies de *Trichoderma* puede ocurrir a través de diferentes mecanismos. Puede ser por efectos indirectos ejerciendo competencia ya sea por nutrientes o por espacio, antibiosis (producción de metabolitos), modificando las condiciones ambientales o mediante la producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal y de una forma directa por microparasitismo (Benítez, 2004).

##### Competencia

La competencia se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás (Infante et al., 2009).

*Trichoderma* está adaptado a colonizar agresivamente los sustratos y en condiciones adversas para sobrevivir, principalmente en forma de clamidosporas. Debido a la riqueza de enzimas que posee, tiene una gran cantidad de sustratos sobre los que puede crecer, una alta velocidad de crecimiento y abundante esporulación, lo que hace que sea muy eficiente como saprófito y como agente de control biológico (Hjeljord, citado por Infante et al., 2009)

El efecto fungistático es importante en la competencia, y es el resultado de la presencia de diferentes metabolitos producido por los organismos. Por lo que un buen

antagonista es capaz de superar este efecto y sobrevivir en condiciones adversas. Las especies de *Trichoderma* son naturalmente resistentes a muchos compuestos tóxicos incluyendo fungicidas, herbicidas y pesticidas tales como DDT, y compuestos fenólicos (Chet et al., 1997), lo que hace que sean excelentes antagonistas.

La causa de muerte más común de los microorganismos es la inanición, la competencia por nutrientes limitantes resulta en un control biológico de hongos fitopatógenos, antagonistas y micoparásitos (Chet et al., 1997). *Trichoderma* tiene una mayor capacidad de movilizar y utilizar nutrientes del suelo en comparación con otros organismos. Esto se debe a su capacidad para obtener moléculas de ATP a partir de diferentes azúcares abundantes en la rizósfera como celulosa, quitina y glucanos (Chet et al., 1997)

### Micoparasitismo

El micoparasitismo es la capacidad de un organismo de degradar y asimilar hongos, y es uno de los atributos que caracterizan a las especies de *Trichoderma*, es considerado el mejor mecanismo de control biológico de distintas enfermedades fúngicas provocadas por patógenos del suelo. Actúa sobre estructuras inactivas, como esclerocios o hifas inactivas (Campbell, 1989).

El ataque de un hongo a otro es un proceso complejo y comprende una secuencia de eventos, comienza con el reconocimiento, ataque, penetración y posterior muerte del hongo. Las especies de *Trichoderma* pueden ejercer un control directo por el amplio rango de parasitismo de hongos, detectándolos y creciendo sobre ellos (Benítez et al., 2004).

Durante el proceso de micoparasitismo las especies de *Trichoderma* crecen quimiotrópicamente hacia el hospedante, luego se adhieren a las hifas del mismo enrollándose en ellas muchas veces, y en ocasiones las penetran. En estados más tardíos del proceso parasítico se observa la degradación de las paredes celulares del hospedante (Carsolio et al., citados por Infante et al., 2009).

El crecimiento quimiotrópico de *Trichoderma* hacia su hospedero es estimulado por moléculas procedentes del mismo, que se desconocen. Las únicas que se han detectado hasta ahora son aminoácido y azúcares, por lo que no se cree que la inducción sea específica del hospedero (Chet y Baker, 1981).

Se cree que el comienzo del proceso se da a partir de la liberación en bajas cantidades de glucanasas, quitinasas y proteasas por parte de *Trichoderma*, que como resultado degradan las paredes celulares del patógeno. Esto hace que este último libere oligómeros que inducen al ataque del antagonista. Posteriormente *Trichoderma* envuelve al patógeno y libera metabolitos que facilitan la entrada de las hifas en la luz del hospedero, para asimilar el contenido de la pared (Benítez et al., 2004).

### Antibiosis

La antibiosis refiere a la producción de sustancias por parte de un organismo, las cuales son tóxicas para otros microorganismos. Las especies de *Trichoderma* producen compuestos difusibles de bajo peso molecular y antibióticos que inhiben el crecimiento de otros organismos. Según Vero y Mondino (1999), es deseable que la antibiosis no sea el principal mecanismo de acción de un antagonista. Esto se debe a que existe el riesgo de que aparezcan cepas del patógeno resistentes al antibiótico.

Las cepas de *Trichoderma* también producen metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden la colonización por parte de microorganismos antagonizados. Algunos de estos metabolitos son antibióticos, alantoinas, ácido harzianico, ácido heptédico, 6 pentyl  $\alpha$  pirona, gliovirina, glisoperonas, massoilactona, peptaiboles, tricholinas, viridina y otros que están siendo estudiados (Howell et al., 1998).

### Inactivación de enzimas del patógeno

Elad y Kapat, citados por Howel (2003), descubrieron que proteasas producidas por *Trichoderma harzianum* inactivan la acción de enzimas hidrolíticas producidas por *Botrytis cinerea*, por tanto destruyen su capacidad para actuar sobre células vegetales. De igual modo, Sharon et al., citados por Howel (2003), demostraron que estas proteasas también actúan como controlador de *Meloidogyne javanica*, un nematodo que afecta a las plantas de tomate.

### Resistencia inducida

La resistencia inducida refiere a la activación de mecanismos de defensa en la planta, cambios morfológicos y bioquímicos, inducidos por otro organismo. Esto lleva a una resistencia sistémica inducida en toda la planta.

*Trichoderma* es capaz de colonizar raíces, promover el crecimiento de las plantas e inducir la activación de mecanismos de defensa naturales de las mismas, mejorando la resistencia de los cultivos a las enfermedades (Segarra et al., citados por Jiménez et al., 2012). Esto se debe a su capacidad para sintetizar e inducir enzimas y potenciar la expresión de los genes de defensa para un posterior ataque de un patógeno (Pozo et al., citados por Jiménez et al., 2012).

#### 2.4.4 Factores que afectan el desarrollo de *Trichoderma*

##### Requerimientos nutricionales de *Trichoderma harzianum*

*Trichoderma harzianum* es un hongo aerobio obligado y al ser saprófito del suelo, usa un amplio rango de compuestos como fuentes de carbono y nitrógeno.

Éste se desarrolla mejor con L-alanina, L-aspartico, ácido L-glutámico y ácido casamino como fuentes de nitrógeno. El desarrollo sobre  $\text{NH}_4^+$  fue considerablemente superior que sobre  $\text{NO}_3^+$ ; en tanto que algunos aislamientos de *Trichoderma hamatum* y *Trichoderma koningii* fueron incapaces de usar  $\text{NO}_3^+$ . Las mejores fuentes de carbón fueron: dextrosa, fructosa, manosa, galactosa, xylosa, ribosa y celobiosa. Todos los aislamientos estudiados descomponen rápidamente la celulosa (Danielson y Davey, 1973).

##### Humedad

La presencia de humedad y el riego mejora las condiciones de vida de muchos microorganismos entre los cuales *Trichoderma* no es la excepción. Estos hongos pasan de un estado latente a uno activo y se desarrollan óptimamente hasta en un 60 % de plena capacidad del suelo de retención de humedad. A porcentajes mayores de saturación, la colonización y sobrevivencia disminuyen por la baja disponibilidad de oxígeno (Villegas, 2005).

Dentro del género *Trichoderma*, las diferentes especies difieren en los requerimientos de los contenidos de humedad. Algunas especies están adaptadas a condiciones de excesiva humedad como es el caso de *Trichoderma hamatum* y *Trichoderma pseudokoningii*, mientras que otras necesitan niveles de humedad moderados en el suelo para un buen desarrollo (Danielson y Davey, 1973).

## pH

Hay pocos estudios detallados del efecto del pH sobre el crecimiento del hongo en sus medios naturales, pero usualmente el crecimiento óptimo está dentro del rango 4 a 6.5 y solamente pocas especies toleran un pH menor a 3 (Kubicek y Harman, 1998). La respuesta de los conidios a los nutrientes es también afectada por el pH, siendo mayor la germinación bajo condiciones ácidas que neutras; mientras que la formación de los conidios parece no estar influenciada por cambios en el pH entre 2.2 y 7.6 (Danielson y Davey, 1973)

Según Villegas (2005), las especies de *Trichoderma* se ven favorecidas por condiciones de pH ácido, donde su población se incrementa por una mayor formación de conidióforos, por la germinación de conidios y por menor competencia con microorganismos como actinomicetos y bacterias que se encuentran limitados por la acidez.

## Temperatura

La influencia de la temperatura sobre el crecimiento parece ser un fenómeno adaptativo. Las especies originarias de climas cálidos tienen temperaturas óptimas mayores (Danielson y Davey, 1973). En un trabajo realizado por Danielson y Davey (1973), se aislaron 16 cepas de diferentes especies, las cuales presentaron un rango de temperaturas máximas entre 28° a 42 °C, con un rango de temperaturas óptimas de 22° a 34 °C. Una de las cepas aisladas de *Trichoderma harzianum*, registró un buen crecimiento aún a los 7 °C, tolerando una temperatura máxima para su desarrollo de 32 °C y mostrando una temperatura óptima de 27 °C.

## 2.5 FACTORES QUE AFECTAN LAS POBLACIONES MICROBIANAS

El tipo de suelo, las medidas de manejo, las diferentes especies cultivadas e incluso el genotipo utilizado tienen una influencia considerable en la composición de las comunidades microbianas del suelo (Mazzola, 2004). Las prácticas de manejos de cultivos como la rotación de cultivos, tipo de labranza, fertilización, entre otras, influyen en los procesos ecológicos que afectan a las comunidades microbianas que participan en la supresión de organismos patógenos que viven en el suelo y rastrojo. Por lo tanto,

conociendo los mecanismos biológicos que operan, existe la capacidad de controlar la población de una comunidad microbiana residente a través de las prácticas agronómicas adecuadas (Mazzola, 2004).

En el suelo conviven una gran cantidad y diversidad de microorganismos, los cuales interactúan de diferentes maneras entre sí. Dependiendo de los microorganismos que participen, esta interacción puede ser positiva o negativa. Esta última es la que buscamos promover mediante el manejo de los cultivos a los efectos de que las comunidades microbianas tengan un efecto negativo sobre los organismos patógenos (Lockwood, 1988).

Los microorganismos requieren de carbono como fuente de energía, y distintas fuentes de carbono pueden favorecer a unos microorganismos más que a otros (Bailey y Lazarovits 2003, Gao et al. 2007). El tipo de labranza y la secuencia de cultivos determinan la cantidad, calidad y forma en que el carbono retorna al suelo, e influyen sobre los factores que intervienen en su procesamiento, dentro de los cuales el más importante es la microflora edáfica (Vargas Gil et al., 2003). La cantidad y calidad de residuos que se incorporan al suelo en general son los factores que tendrán mayor efecto sobre la dinámica de la materia orgánica, a igualdad de las demás condiciones generales de manejo, por lo tanto también sobre los microorganismos a los que esta se encuentra asociada. Esto genera una mayor diversidad de microorganismos y una mayor competencia entre los mismos, lo que hace que se vea disminuida la probabilidad de surgimiento o incremento en la intensidad de enfermedades causadas por patógenos que habitan en el suelo o que cumplen parte de su ciclo en el rastrojo (Vargas Gil et al., 2003).

Según Larkin (2008) el establecimiento y la persistencia de los agentes de biocontrol puede depender de muchos factores, pero una rotación de cultivos eficaz es aparentemente importante. Es así que surge un nuevo enfoque de la rotación de cultivos en la búsqueda de una herramienta de control de patógenos necrotróficos.

Históricamente, la rotación de cultivos como herramienta se ha basado en la supresión del sustrato nutricional (rastrojo del cultivo susceptible) de los microorganismos patógenos, de esta manera se logra que estos mueran por inanición reduciendo el inóculo en la chacra. Lograr esto con rotación de cultivos es cada vez más difícil por las limitantes existentes en la coyuntura actual de la agricultura uruguaya mencionadas anteriormente. Sin embargo, este nuevo enfoque tiene como objetivo

utilizar la rotación de cultivos como promotor de microorganismos benéficos que logren tener un efecto antagónico hacia los microorganismos patógenos presentes en el suelo y rastrojo.

Según Dick, citado por Vargas Gil et al. (2007), la rotación de cultivos tiene efectos notables sobre los factores bióticos del suelo. Larkin (2008) evaluó diferentes enmiendas con microorganismos benéficos en conjunto con diferentes rotaciones de cultivos y monocultivo de papa. Los resultados indicaron que hay un efecto significativo de las rotaciones en la efectividad del uso de las enmiendas. Vargas Gil et al. (2008), observaron que la mayor cantidad de actinomicetos, *Trichoderma* spp., y *Gliocladium* spp. se registraron cuando el maíz era el cultivo antecesor. Las poblaciones de biocontroladores registradas cuando cultivos de maní o soja se sembraron a continuación de maíz, fueron superiores a las registradas cuando se sembró a continuación de estas leguminosas. El rastrojo de maíz estaría favoreciendo el contenido de materia orgánica del suelo, que es uno de los factores determinantes de las mayores poblaciones de biocontroladores. Por el contrario, el bajo volumen de rastrojos aportados por soja o maní, tienen un efecto negativo sobre las poblaciones.

Estudios realizados por Kirkegaard et al. (2004), dieron como resultado que los niveles de población de *Trichoderma* spp. eran consecuentemente más altos en trigos seguidos de brassicas (canola) que seguido de garbanzo o trigo. Según Lipps y Deep (1991), Beare et al. (1993), Bulluck et al. (2002), Hagn et al. (2003), los microorganismos pertenecientes al género *Trichoderma* spp. han demostrado que poseen una gran respuesta a la secuencia de cultivos, en especial en sistemas de siembra directa.

Según de Luca y Keeney, citados por Vargas Gil et al. (2007), el laboreo promueve la liberación y degradación de la materia orgánica previamente protegida, contribuyendo a la reducción a largo plazo en la biomasa microbiana del suelo y de la materia orgánica. Los factores bióticos de calidad en la superficie del suelo están inversamente relacionados con la intensidad de la labranza. Wacha et al. (1979) concluyeron que la población de *Trichoderma* spp. se incrementó con la labranza reducida. Resultados similares obtuvieron Meng et al. (2010) aunque no encontraron diferencias significativas. Estas observaciones son consistentes con los resultados mostrados antes por Steinkellner y Langer (2004). Estudios de Meriles et al. (2009), en los cuales indicaron que la respiración microbiana del suelo, la biomasa y la actividad fueron mayores bajo siembra directa que bajo laboreo reducido y que las poblaciones de *Trichoderma* y *Gliocladium* se vieron reducidas bajo los tratamientos que estaban bajo monocultivo de soja.

También los parámetros químicos del suelo pueden afectar las poblaciones microbianas del suelo. Vargas Gil et al. (2007) encontró correlaciones positivas entre los diferentes parámetros químicos del suelo (MO, N total, C/N, pH y P) y las poblaciones de *Trichoderma* del suelo.

En Uruguay los antecedentes recientes fueron generados por INIA. Pereyra et al. (2012) estudiaron el efecto de la secuencia de cultivos sobre la dinámica de los patógenos de trigo y cebada dependientes del rastrojo y comunidades benéficas en agricultura de secano bajo siembra directa. Entre sus resultados observaron que *Trichoderma* spp. se encontraba presente en todos los restos de cultivos estudiados, en los cuales los rastrojos con mayores porcentajes de colonización fueron los de cebada, raigrás y trigo. Los rastrojos de leguminosas, girasol y maíz presentaron menores valores en promedio respecto a las gramíneas antes citadas. Además, concluyeron que la colonización de los rastrojos provenientes de la agricultura continua fue significativamente ( $P > 0.0017$ ) mayor (32.2%) que la registrada en los rastrojos de la rotación cultivo-pastura (24 %).

Debido a lo promisorio de los resultados observados a nivel nacional e internacional, y a la limitada información local disponible, es que se plantea este trabajo sobre la hipótesis de que es posible manejar las poblaciones nativas de *Trichoderma* mediante la elección de los cultivos a integrar la rotación.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL EXPERIMENTO

Este estudio se efectuó en la Estación Experimental Dr. Mario Cassinoni (EEMAC), localizada sobre Ruta 3 en el km 363 del Departamento de Paysandú. El área de estudio estuvo basada en un experimento instalado desde 1999 en el potrero No. 36 de dicha estación, sobre un suelo Brunosol Eútrico Típico del grupo Coneat 11.3, correspondiente a la Unidad San Manuel de la carta de suelos a escala 1:1.000.000.

El diseño del ensayo es en bloques con parcelas al azar con tres repeticiones. Las parcelas son de 10 x 30 m separadas por 3 m entre si y 10 m entre bloques, haciendo un total de 3 bloques con 10 parcelas cada uno. Cada una de las parcelas corresponde a un tratamiento o rotación, y a su vez estos tratamientos conforman las 4 secuencias de cultivos.

Las secuencias de cultivos del ensayo son las siguientes:

- trigo-soja-trigo...
- trigo-soja-cebada-girasol-trigo...
- trigo-soja-cebada-sorgo-avena-maíz-trigo...
- trigo-soja-cebada-girasol-avena con lotus-lotus-trigo...

El experimento se lleva a cabo en siembra directa, y los cultivos son manejados como comerciales, con densidad de siembra, fertilización, y manejo de plagas de acuerdo a lo requerido por cada cultivo. Es importante destacar que no se realizan aplicaciones de fungicidas en el experimento, de modo que las poblaciones microbianas sean alteradas únicamente por la secuencia de cultivos.

#### 3.2 MUESTREO DE SUELO Y RASTROJO

Se tomaron muestras de suelo y rastrojo en primavera 2010 (15 de noviembre rastrojo y suelo) y en otoño 2011 (29 de marzo rastrojo; 1ero de junio suelo). En el caso de muestreo de suelo se tomaron 20 muestras por parcela con calador de 2.5 cm diámetro a 5 cm de profundidad y se mezclaron en una misma bolsa, conformando una

muestra compuesta por parcela. Las muestras fueron conservadas en bolsas plásticas en heladera a 8°C hasta su procesamiento.

Para las muestras de rastrojo se utilizaron cuadrantes de 50 x 50 cm, y se realizaron entre tres y cinco lanzamientos al azar por parcela, colectándose todo el rastrojo presente en la superficie del suelo dentro del cuadrante.

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en los laboratorios de la EEMAC. Para las muestras de rastrojo se determinó el peso seco de las mismas. Para las muestras de suelo, se determinó el porcentaje de humedad gravimétrica mediante diferencias de peso húmedo y seco. También se realizaron análisis de pH, materia orgánica, P y N total. El contenido de materia orgánica se estimó a través del método Walkley-Black (Walkley y Black, 1934). El pH fue calculado en una solución de cloruro de potasio 1 N y en agua destilada y el P Bray se calculó a través de la técnica BRAY No. 1 (Bray y Kurtz, 1945). Los análisis de nitrógeno total (N), se realizó en INIA La Estanzuela (por combustión a 900 °C y posterior detección de N<sub>2</sub> por conductividad térmica) y potasio (K) (en solución de acetato de amonio a pH 7 y emisión atómica).

### 3.3 CUANTIFICACIÓN DE POBLACIONES DE *TRICHODERMA*

La densidad poblacional de *Trichoderma* spp. en suelo y rastrojo en cada muestra fue determinada siguiendo el método propuesto por Vargas Gil et al. (2009) con modificaciones. Se utilizó el medio de cultivos semiselectivo de Williams et al. (2003).

Cuadro No. 1. Formulación del medio selectivo para *Trichoderma* .

<b>Producto</b>	<b>g/litro</b>
Rosa de bengala	0.150
MgSO <sub>4</sub> (anhidro)	0.200
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.900
KCl	0.150
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1
Glucosa	3
Agar	20
PCNB Quintoceno	0.2
Estreptomocina	0.09
Propamocarb [722g/litro]	1.2 (ml)
Cloramfenicol	0.250

Fuente: Williams et al. (2003)

La formulación del medio se realiza en dos etapas. Los componentes especificados en el cuadro son diluidos en agua destilada para luego ser esterilizados en autoclave. Los antibióticos y fungicidas son agregados luego del autoclavado cuando el medio alcanza una temperatura cercana a 50°C.

### 3.3.1 Cuantificación de las poblaciones de *Trichoderma* presentes en el suelo

Para la cuantificación en suelo se tomaron 10 g de cada muestra y se diluyeron en matraces con 100 ml de suero fisiológico y una gota de jabón líquido, para luego llevarlas a un agitador orbital durante 30 minutos. De estos matraces se extrajo 1 ml de la suspensión y se diluyó en 9 ml de suero fisiológico en tubos de ensayo logrando una dilución  $\times 10^{-1}$ , luego de esta última se extrajo 1 ml de la suspensión para diluirlo en un nuevo matraz con 9 ml de suero fisiológico logrando una dilución de  $\times 10^{-2}$  con la cual se realizaron las siembras.

A partir de los primeros resultados de estas dos diluciones se decidió utilizar solo la dilución  $\times 10^{-2}$  para las siguientes lecturas ya que a nivel  $\times 10^{-1}$  se tornaban dificultosas por el excesivo crecimiento de *Trichoderma ssp*.

Las siembras se hicieron en placas de Petri con el medio selectivo anteriormente descrito, en las que se sembró un volumen de 0.6 ml de suspensión por placa y se

realizaron dos repeticiones por muestra. Posteriormente, las placas fueron incubadas por seis días a 25°C en oscuridad. Luego de dicho periodo se realizó un conteo de colonias de *Trichoderma* y, la densidad fue expresada en unidades formadoras de colonias por gramo de suelo.



Figura No. 1. Placa de Petri con colonias de *Trichoderma* creciendo en el medio selectivo.

### 3.3.2 Cuantificación de poblaciones de *Trichoderma* presentes en rastrojo

Para la cuantificación de las muestras de rastrojo se realizó el mismo procedimiento que para las muestras de suelo, a diferencia que los 10 g de rastrojo se suspendieron en matraces con 150 ml de suero fisiológico, y que la cantidad de solución usada en la siembra fue de 0.3 ml por placa.

Se tomaron en cuenta todas las precauciones necesarias de laboratorio para evitar la contaminación con otros microorganismos en todo el procesamiento y manipulación de las muestras.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 CARACTERIZACIÓN CLIMÁTICA

Teniendo en cuenta el efecto que ejercen las condiciones climáticas sobre la población de *Trichoderma* se analizaron las precipitaciones y la temperatura desde enero 2010 a marzo 2011 contrastandolo con los datos histórico desde el año 2000 al 2010 según los registros de la Estación meteorológica de la EEMAC.

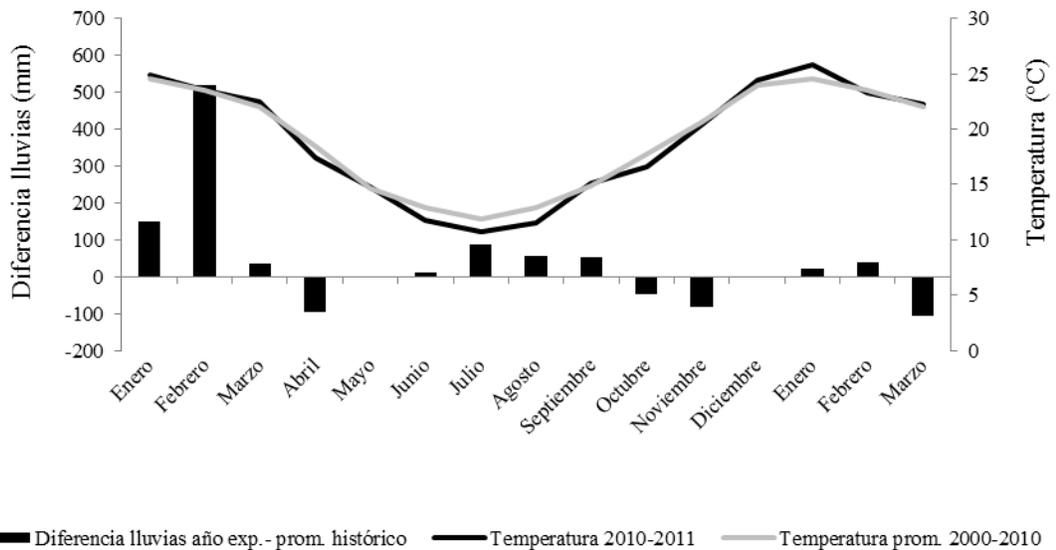


Figura No. 2. Lluvias y temperatura registradas entre enero 2010 y marzo 2011 en comparación con el promedio histórico.

En el periodo analizado llovieron un total de 2381 mm, esto es un 36 % más que el promedio histórico (1742 mm). Estas diferencias se explican en su mayoría por las altas precipitaciones registradas en enero y febrero de 2010. En cuanto a la temperatura

en líneas generales se mantuvo dentro del promedio histórico aunque el invierno del 2010 fue en promedio 2° C más frío.

Para la estación de muestreo de primavera 2010, tres meses previos a la toma de muestras se registraron un total 312 mm de lluvia, un 25% más que el promedio histórico.

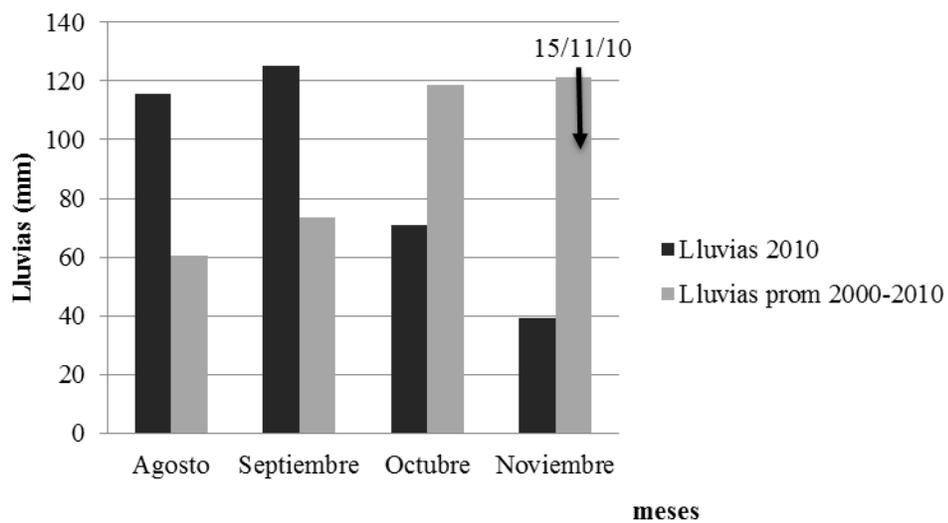


Figura No. 3. Lluvias registradas tres meses previo al muestreo de primavera 2010 en comparación con registros históricos del 2000 al 2010. Flecha indica fecha de muestreo.

En cuanto a la temperatura se puede observar que se mantuvo similar al promedio histórico pasando de 12 °C en agosto a 20 °C en noviembre.

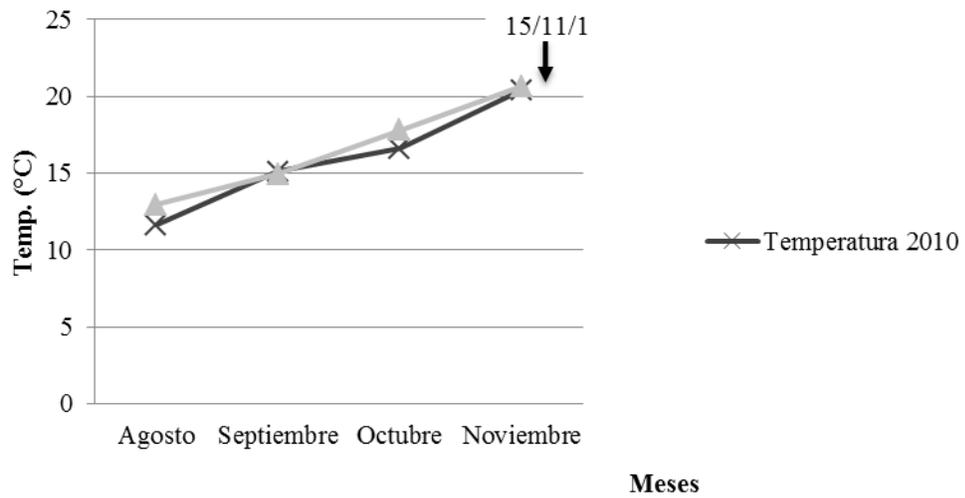


Figura No. 4. Temperaturas medias registradas tres meses previo al muestreo de primavera 2010 en comparación con registros históricos del 2000 al 2010. Flecha indica fecha de muestreo.

Para la estación de otoño 2011, las precipitaciones de enero y febrero fueron en promedio 173 mm, un 22 % superior al promedio histórico y luego en marzo totalizaron 55 mm, la tercera parte de los registros históricos.

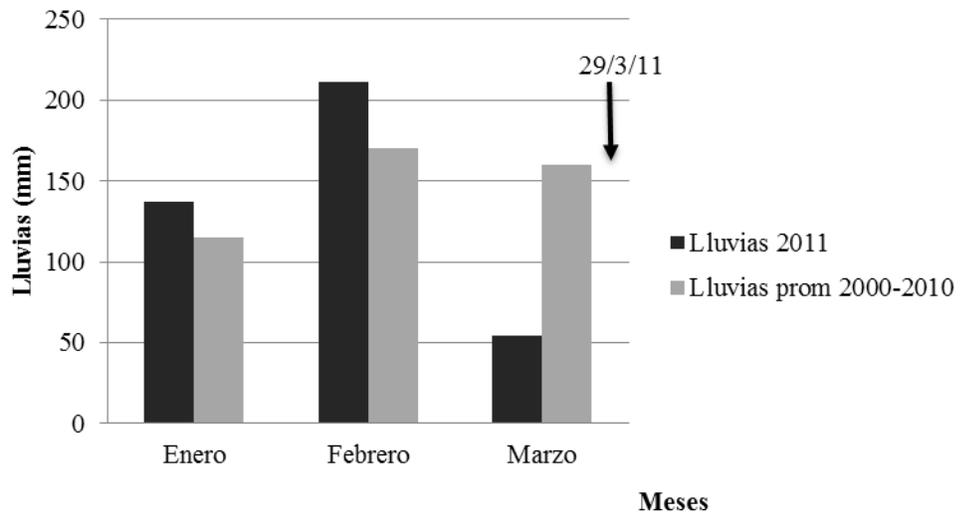


Figura No. 5. Lluvias registradas tres meses previo al muestreo de otoño 2011 en comparación con registros históricos del 2000 al 2010. Flecha indica fecha de muestreo.

En cuanto a la temperatura, al igual que para la primavera se mantuvo dentro del promedio, si bien hubo un enero un poco más caluroso en el 2011 los meses siguientes fueron similares al promedio histórico.

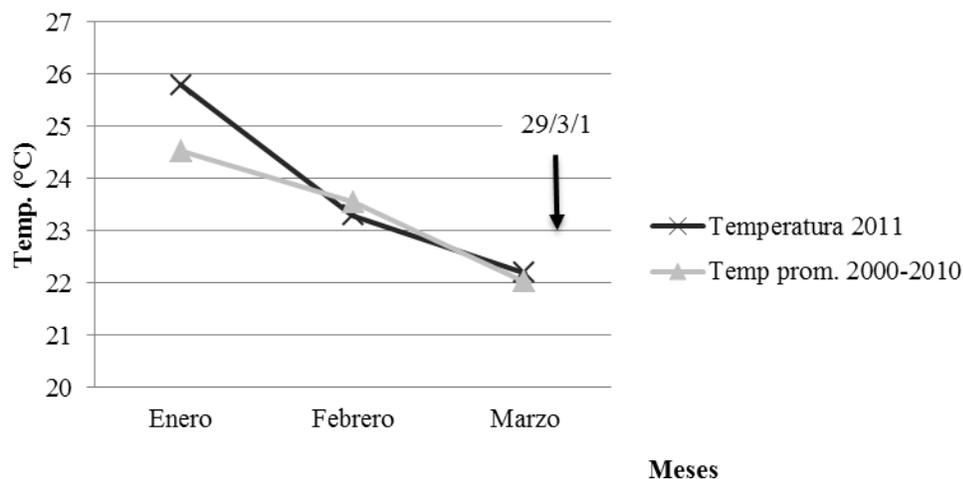


Figura No. 6. Temperaturas medias registradas tres meses previo al muestreo de otoño 2011 en comparación con registros históricos del 2000 al 2010. Flecha indica fecha de muestreo.

#### 4.2 EFECTO DE LAS SECUENCIAS DE CULTIVO SOBRE LAS POBLACIONES DE *TRICHODERMA* EN EL SUELO

La población de *Trichoderma* en el suelo fue afectada significativamente por la secuencia de cultivos (Cuadro No. 2). En el muestreo de primavera, la población de la S4 fue la que presentó los mayores niveles poblacionales, significativamente mayores que los observados en la S3, mientras que las restantes secuencias presentaron densidades intermedias (Figura No. 7).

Cuadro No. 2. Valor de  $P$  del análisis por contrastes ortogonales de la población de *Trichoderma* en el suelo de primavera y otoño (significancia  $P \leq 0.05$ ).

Contrastes de secuencias	p-valor	
	primavera	otoño
S1 vs. S2	0.786	0.207
S1 vs. S3	0.561	0.675
S1 vs. S4	0.409	0.241
S2 vs. S3	0.273	0.244
S2 vs. S4	0.495	0.783
S3 vs. S4	<b>0.039</b>	0.279

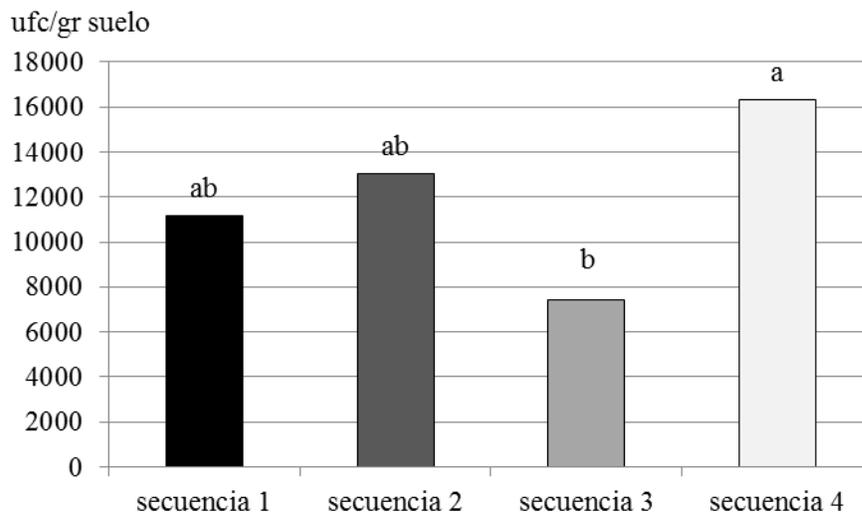


Figura No. 7. Población de *Trichoderma* en suelo (ufc/g suelo) en primavera 2010 según las diferentes secuencias. Medias con distinta letra difieren significativamente (Contrastes;  $P=0.05$ ,  $CV=154$ ).

En el otoño siguiente, la población de *Trichoderma* en el suelo se mantuvo en niveles similares a los de primavera (aprox. 12000 ufc/g de suelo). En este caso, no se detectó un efecto significativo de la secuencia sobre la población de *Trichoderma* en el suelo, desapareciendo las diferencias encontradas en primavera (Figura No. 8).

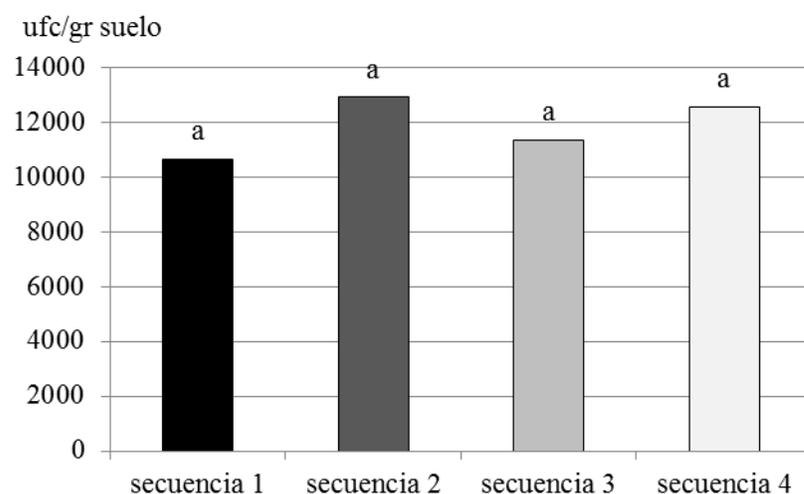


Figura No. 8. Población de *Trichoderma* en suelo (ufc/g suelo) en otoño 2011 según las diferentes secuencias. Medias con distinta letra difieren significativamente (Contrastes;  $P=0.05$ ,  $CV=41$ ).

#### 4.3 EFECTO DE LAS SECUENCIAS DE CULTIVO SOBRE LAS POBLACIONES DE *TRICHODERMA* EN EL RASTROJO

Similar a lo observado en el suelo, al analizar el efecto de la secuencia de cultivos sobre la población de *Trichoderma* en el rastrojo, el efecto de la secuencia fue significativo únicamente en primavera 2010, no encontrándose diferencias en las poblaciones de otoño 2011 (Cuadro No. 3).

Cuadro No. 3.  $P$ -valor del análisis por contrastes ortogonales de la población de *Trichoderma* en rastrojo de primavera y otoño (significancia  $P \leq 0.05$ ).

Contrastes de secuencias	p-valor	
	primavera	otoño
<b>S1 vs. S2</b>	<b>0.014</b>	0.132
<b>S1 vs. S3</b>	<b>0.049</b>	0.252
<b>S1 vs. S4</b>	<b>0.002</b>	0.137
<b>S2 vs. S3</b>	0.394	0.564
<b>S2 vs. S4</b>	0.14	0.859
<b>S3 vs. S4</b>	<b>0.008</b>	0.638

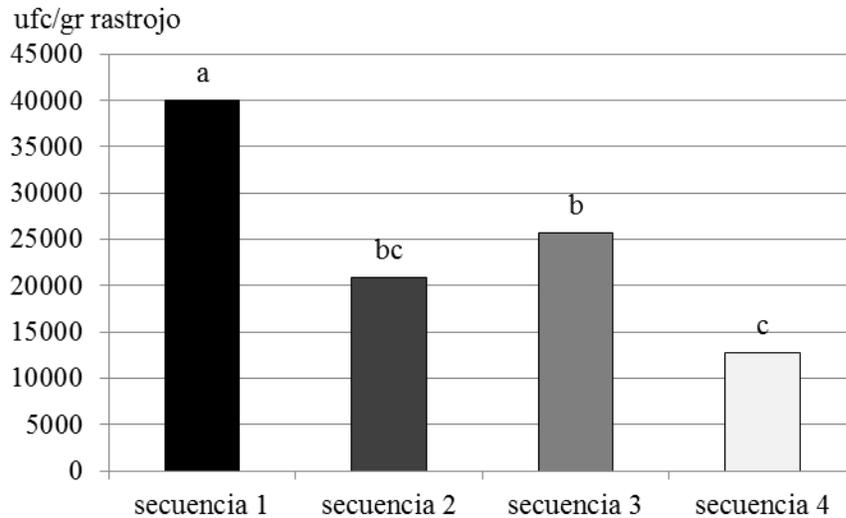


Figura No. 9. Población de *Trichoderma* en rastrojo (ufc/g rastrojo) en primavera según las diferentes secuencias. Medias con distinta letra difieren significativamente ( $P=0.05$ ;  $CV=103$ ).

La población de *Trichoderma* en el rastrojo fue menor en primavera que en otoño (21000 y 64051 ufc/g de rastrojo, respectivamente). Pese a los menores niveles poblacionales promedio, fue en primavera donde se observó efecto significativo de la secuencia. Al contrario de lo observado en el suelo, la población promedio de la S4 fue la menor de todas las secuencias (Figura No. 9).

#### 4.4 EFECTO DEL CULTIVO ANTECESOR SOBRE LAS POBLACIONES DE *TRICHODERMA* EN EL SUELO

##### 4.4.1 Primavera 2010

El T9 fue el que presentó la mayor población de *Trichoderma* en el suelo, mientras que los tratamientos 4, 5 y 8 fueron los de menor nivel poblacional. El resto de los tratamientos tuvieron un nivel poblacional intermedio, no difiriendo de los anteriores (Figura No. 10).

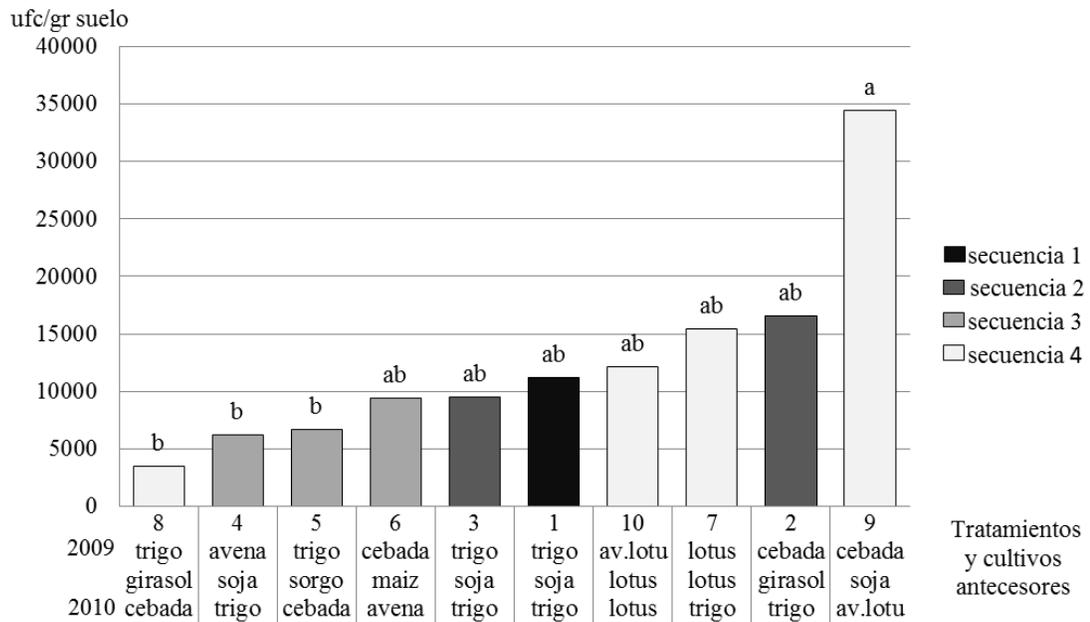


Figura No. 10. Población de *Trichoderma* en el suelo (ufc/g suelo) según los diferentes tratamientos en la primavera 2010. Medias con distinta letra presentan diferencias significativas (Tukey; P=0.05; CV= 154%).

Por lo tanto la rotación con predominancia de rastrojo de cebada y soja fue la que presentó los mayores niveles de *Trichoderma* en el suelo en primavera.

#### 4.4.2 Otoño 2011

En relación a la población observada en primavera 2010 la población de *Trichoderma* en otoño 2011 fue muy similar (Figura No. 11).

Coincidiendo con los resultados obtenidos en primavera el T9 es el que presentó mayor densidad poblacional de *Trichoderma* en el suelo, aunque en este caso sólo el T2 presentó niveles poblacionales similares. El resto de los tratamientos tuvieron significativamente menor densidad poblacional que el T9. Los T7 y T8 tuvieron los menores niveles de poblacionales, mientras que el resto de los tratamientos mostraron densidades intermedias (Figura No. 11).

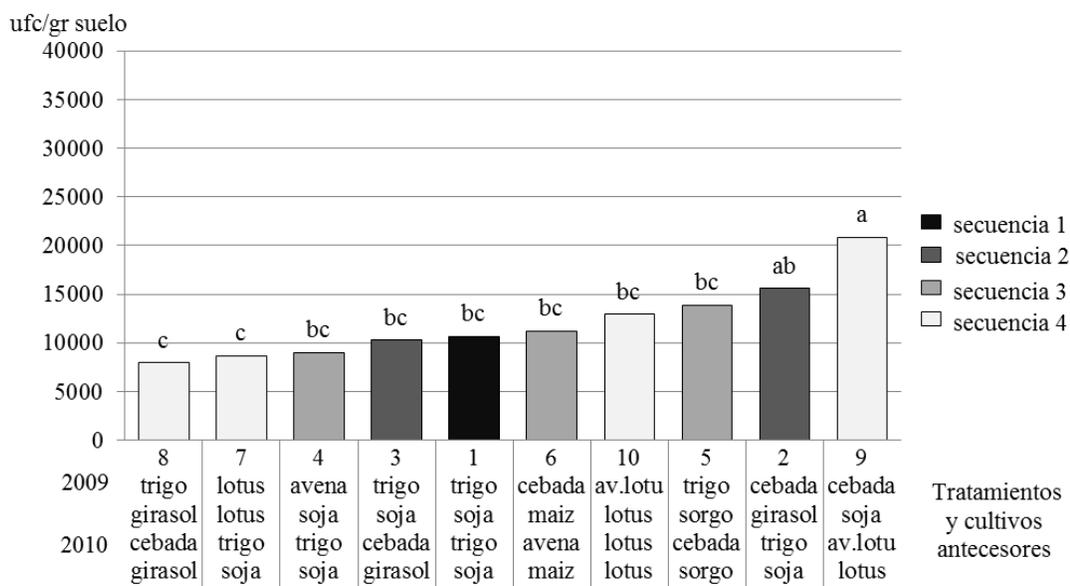


Figura No. 11. Población de *Trichoderma* en el suelo (ufc/g suelo) según los diferentes tratamientos en el otoño 2011. Medias con distinta letra presentan diferencias significativas (Tukey;  $P=0.05$ ;  $CV= 41\%$ ).

Por lo tanto, al igual que en primavera, la rotación en la cual al momento del muestreo predominaba el rastrojo de cebada, soja y avena fue la que presentó los mayores niveles de *Trichoderma* en el suelo en otoño, a diferencia que al momento de tomar las muestras (29 marzo) la mayor parte de rastrojo era de avena.

#### 4.4.3 Comparación de la población de *Trichoderma* entre estaciones de muestreo

Si bien existe variación entre los mismos tratamientos tanto en el muestreo de primavera como de otoño, las mismas no difieren significativamente. Los niveles de la población de *Trichoderma* tendieron a mantenerse estables en el suelo entre las dos estaciones (Figura No. 12). No se encontró un efecto significativo de la interacción Tratamiento-Estación de muestreo ( $P = 0.39$ ).

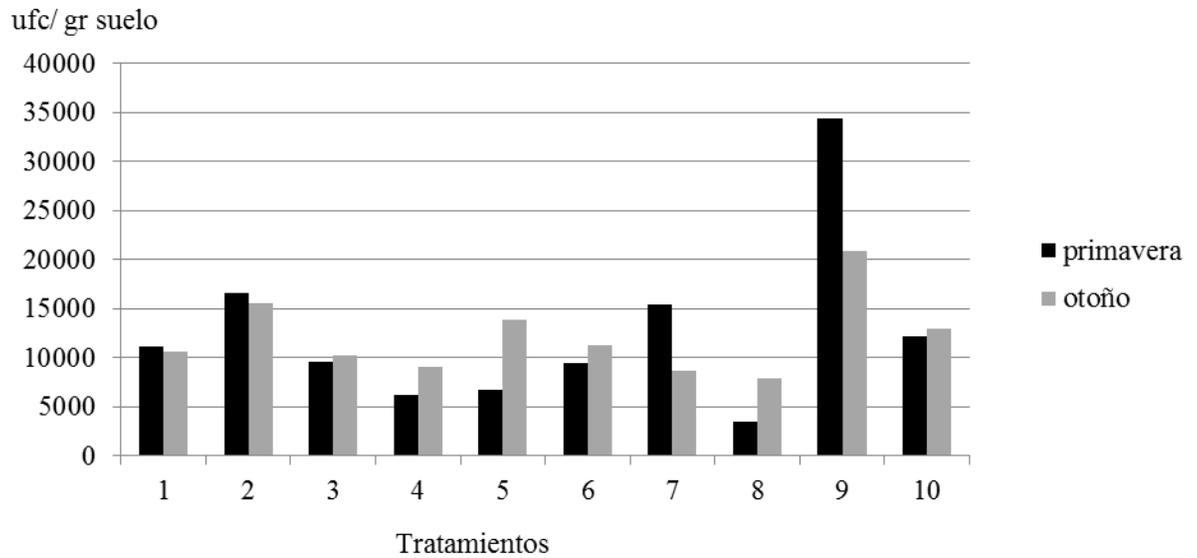


Figura No. 12. Población de *Trichoderma* en el suelo (ufc/g suelo) según los diferentes tratamientos y estación de muestreo (otoño y primavera). Las medias no difirieron significativamente entre sí ( $P=0.39$ ,  $CV= 116\%$ ).

Se encontró una alta correlación de la población de *Trichoderma* en el suelo presente en la primavera 2010 y otoño 2011 ( $P=0.0034$ , Figura No. 13).

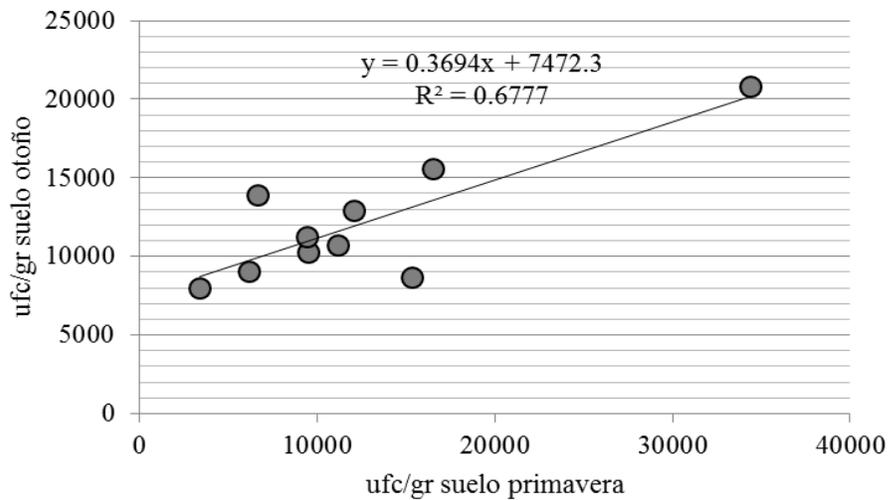


Figura No. 13. Relación entre las poblaciones de *Trichoderma* en el suelo (ufc/g suelo) de primavera y las de otoño, promedio de los tratamientos ( $P=0.0034$ ).

#### 4.5 EFECTO DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL SUELO SOBRE LAS POBLACIONES DE *TRICHODERMA*

Cuadro No. 4. Valores de los diferentes variables medidos en el suelo según los diferentes tratamientos y su correspondiente *P*-valor y CV (significancia  $P \leq 0.05$ ).

	MO (%)	P (ppm)	pH	N total (%)	K (meq/100gr)
<b>T1</b>	5.3	43.4	6.0	0.20	0.9
<b>T2</b>	5.2	47.3	6.7	0.22	0.8
<b>T3</b>	5.3	47.7	6.6	0.25	0.8
<b>T4</b>	5.2	37.1	5.8	0.20	0.7
<b>T5</b>	5.3	38.8	6.0	0.21	0.8
<b>T6</b>	5.3	42.1	5.7	0.24	0.8
<b>T7</b>	5.2	52.1	6.7	0.24	0.9
<b>T8</b>	5.2	53.7	5.4	0.22	0.7
<b>T9</b>	5.2	39.5	6.4	0.24	0.8
<b>T10</b>	4.5	40.1	5.8	0.23	0.7
<b>p-valor</b>	0.78	0.7	0.44	0.71	0.41
<b>CV</b>	7.8	31	13.2	12.3	17.5

No se encontró correlación estadísticamente significativa entre las variables del suelo analizadas y la población de *Trichoderma* en ninguna de las dos estaciones (Cuadro No. 5).

Cuadro No. 5. Correlación y *p*-valor de las poblaciones de *Trichoderma* con los diferentes parámetros medidos en el suelo.

	MO		P		Ph	
	R <sup>2</sup>	p-valor	R <sup>2</sup>	p-valor	R <sup>2</sup>	p-valor
<b>Primavera</b>	0.0036	0.75	0.0163	0.5	0.0014	0.85
<b>Otoño</b>	0.0025	0.79	0.0038	0.75	0.0301	0.36
	N		K			
	R <sup>2</sup>	p-valor	R <sup>2</sup>	p-valor		
<b>Primavera</b>	1.00E-05	0.99	0.0184	0.48		
<b>Otoño</b>	0.007	0.66	0.0047	0.72		

## 4.6 EFECTO DE LA ROTACIÓN SOBRE LAS POBLACIONES DE *TRICHODERMA* EN EL RASTROJO

### 4.6.1 Primavera 2010

Los T1 y T4 mostraron poblaciones significativamente mayores a los T7 y T8, mientras que el resto de los tratamientos tuvieron niveles poblacionales intermedios (Figura No. 14).

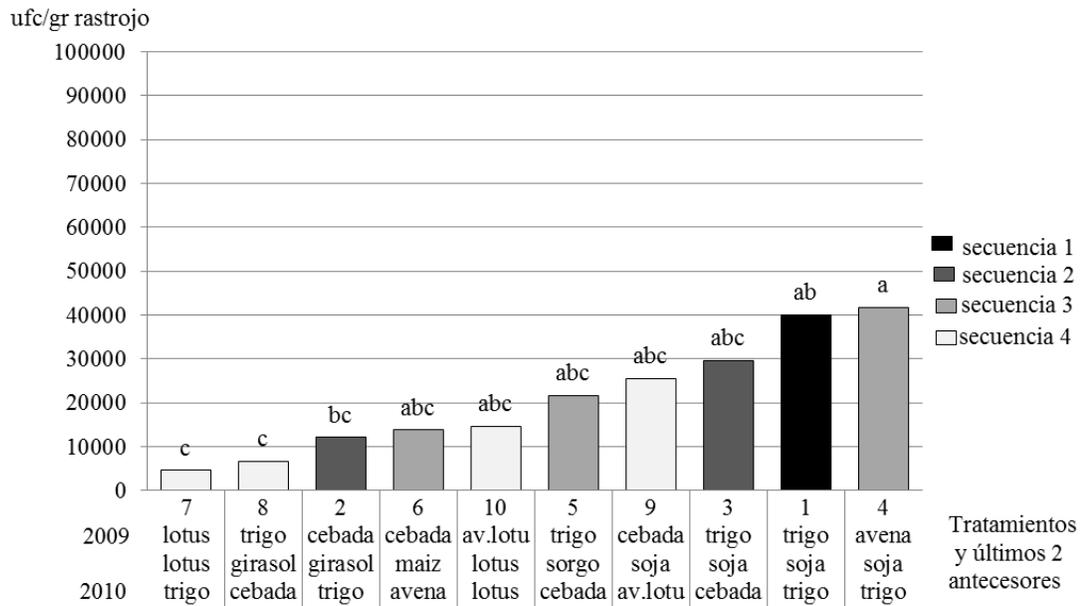


Figura No. 14. Población de *Trichoderma* en el rastrojo (ufc/g rastrojo) según los diferentes tratamientos (muestreo de Primavera 2010). Medias con distinta letra presentan diferencias significativas (Tukey;  $P=0.05$ ; CV= 103%).

### 4.6.2 Otoño 2011

En relación a la población de *Trichoderma* en el rastrojo en el otoño 2011, en promedio la misma fue mayor que la observada en primavera 2010 (21000 vs. 64052 ufc/g de rastrojo, para primavera y otoño respectivamente).

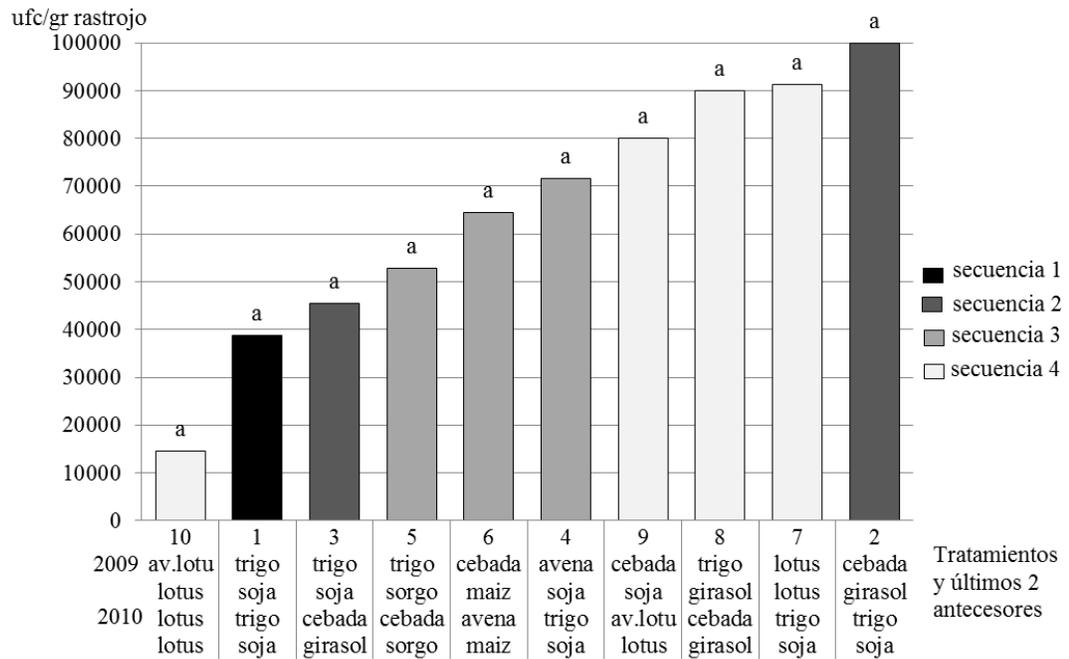


Figura No. 15. Población de *Trichoderma* en el rastrojo (ufc/g rastrojo) según los diferentes tratamientos (muestreo de otoño 2011). Medias con distinta letra presentan diferencias significativas (Tukey; P=0.05; CV= 99%).

Si bien la población varía según los tratamientos, no existen diferencias estadísticamente significativas, debido a la gran variación existente dentro de los tratamientos, expresado en un elevado coeficiente de variación (Figura No. 15).

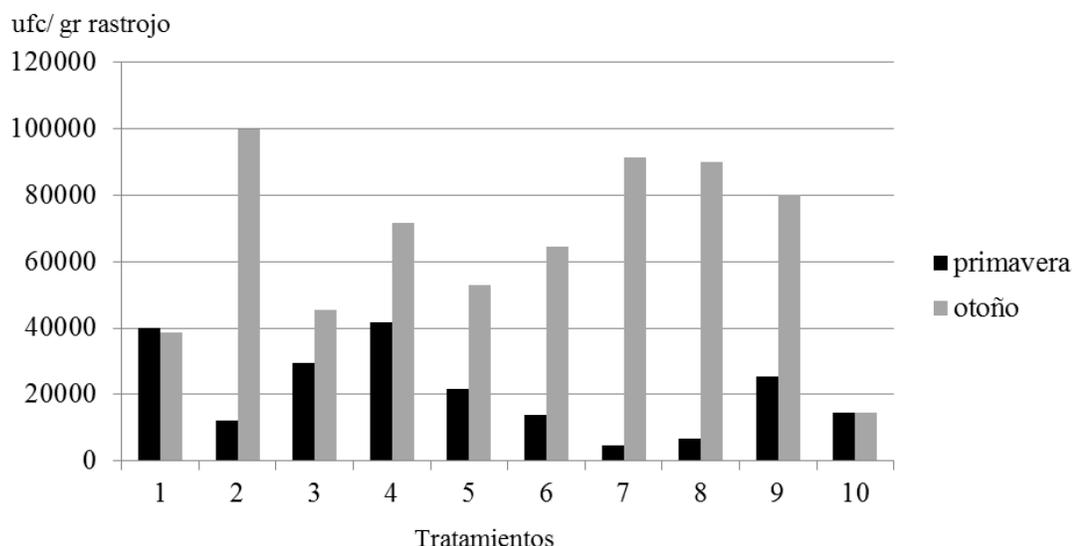


Figura No. 16. Población de *Trichoderma* en el rastrojo (ufc/g rastrojo) según los diferentes tratamientos y estación de muestreo (otoño y primavera).

A diferencia de lo observado para la población de *Trichoderma* en el suelo, no se encontró una correlación significativa entre la población en el rastrojo observada en primavera y en otoño ( $r^2 = 0.15$ ;  $P=0.26$ ). En cambio en este caso sí se observó un efecto significativo de la interacción Tratamiento-Estación ( $P= 0.0014$ ), lo cual indica que la población de *Trichoderma* en el rastrojo de cada tratamiento depende de la estación en que se muestrea, o sea, depende del rastrojo predominante.

#### 4.7 EFECTO DE LOS CULTIVOS SOBRE LAS POBLACIONES DE *TRICHODERMA* EN RASTROJO Y SUELO

##### 4.7.1 Efecto de los cultivos antecesores sobre las poblaciones de *Trichoderma* en el suelo

Se contrastaron los promedios de los grupos de tratamientos que compartían el mismo anteúltimo y el antepenúltimo cultivo antecesor para ver el efecto de los mismos en las poblaciones de *Trichoderma* spp.

Cuadro No. 6. Significancia de los contrastes entre las poblaciones de *Trichoderma* en el suelo según el antecesor de invierno 2009. Muestras de primavera 2010.

<b>Contrastes antecesor de invierno 2009</b>	<b>P-valor</b>
<b>trigo vs. cebada</b>	<b>0.0041</b>
<b>trigo vs. avena</b>	0.76
<b>trigo vs. lotus</b>	0.21
<b>cebada vs. avena</b>	<b>0.033</b>
<b>cebada vs. lotus</b>	<b>0.0053</b>
<b>avena vs. lotus</b>	0.36

En todos los casos la cebada como cultivo antecesor mostró diferencias significativas en los niveles poblacionales de *Trichoderma* frente a los otros cultivos en los contrastes realizados, y a su vez no existen diferencias significativas de los demás cultivos entre sí (Cuadro No. 6, Figura No. 17). Para el caso de las muestras de otoño 2011 se observaron similares resultados (Cuadro No. 7, Figura No. 17).

Cuadro No. 7. Significancia de los contrastes entre las poblaciones de *Trichoderma* en el suelo según el antecesor de invierno 2009. Muestras de otoño 2011.

<b>Contrastes de antecesor de invierno 2009</b>	<b>P-valor</b>
<b>trigo vs. cebada</b>	<b>0.0001</b>
<b>trigo vs. avena</b>	0.763
<b>trigo vs. lotus</b>	0.222
<b>cebada vs. avena</b>	<b>0.0006</b>
<b>cebada vs. lotus</b>	<b>0.0001</b>
<b>avena vs. lotus</b>	0.18

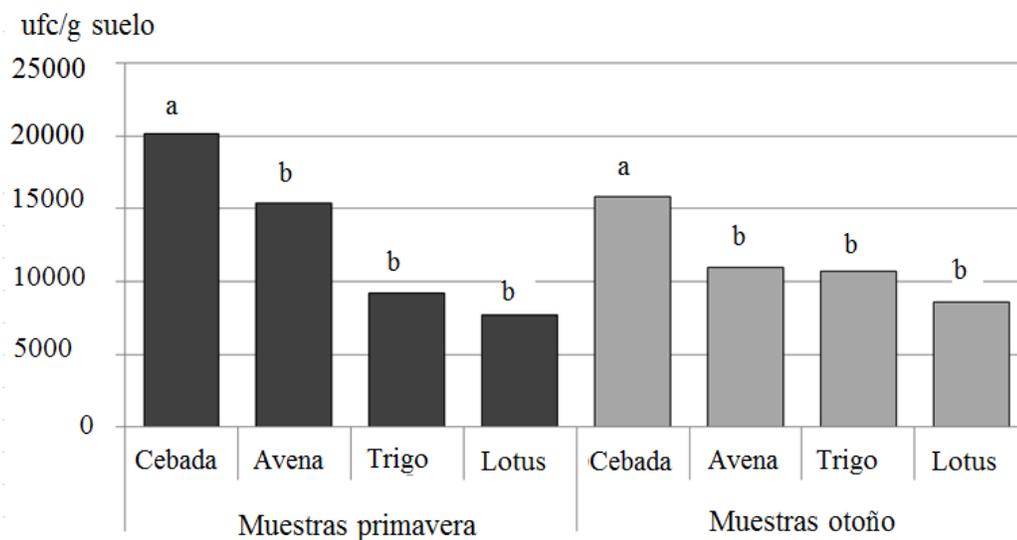


Figura No. 17. Poblaciones promedio de *Trichoderma* en el suelo (ufc/g suelo) según anteuúltimo antecesor (muestras de primavera) y antepenúltimo antecesor (muestras de otoño).

#### 4.7.2 Efecto del cultivo antecesor sobre las poblaciones de *Trichoderma* en el rastreo

Para rastreo se contrastaron los promedios de los grupos de tratamientos que compartían el mismo cultivo antecesor para ver el efecto de estos en las poblaciones de *Trichoderma* spp.

Cuadro No. 8. Contrastes entre cultivos de invierno y su correspondiente *P*-valor en suelo. Muestras de otoño (significancia  $P \leq 0.05$ ).

Contrastes de cultivos invierno 2010	p-valor
trigo vs. cebada	0.44
trigo vs. avena	0.84
trigo vs. lotus	<b>0.0036</b>
cebada vs. avena	0.63
cebada vs. lotus	<b>0.024</b>
avena vs. lotus	<b>0.011</b>

Todos los cereales de invierno se vieron diferenciados estadísticamente con el lotus (Cuadro No. 8). Se observó una clara superioridad en los niveles poblacionales de *Trichoderma* en los cereales de invierno sobre en lotus (Figura No. 18).

Cuadro No. 9. Contrastes entre cultivos de verano y su correspondiente p-valor en rastrojo. Muestras de primavera (significancia  $P \leq 0.05$ ).

<b>Contrastes de cultivos verano 2009-2010</b>	<b>p-valor</b>
soja vs. sorgo	0.08
soja vs. girasol	<b>0.0001</b>
soja vs. lotus	<b>0.0001</b>
soja vs. maíz	<b>0.0041</b>
sorgo vs. girasol	0.11
sorgo vs. lotus	0.12
sorgo vs. maíz	0.37
girasol vs. lotus	0.97
girasol vs. maíz	0.56
lotus vs. maíz	0.59

El rastrojo de cultivo de soja mostró diferencias significativas con los demás cultivos de verano a excepción del cultivo de sorgo, con el cual si tomamos un 95% de confianza no muestra diferencias significativas (Cuadro No. 9). Las densidades poblacionales de *Trichoderma* fueron superiores en los rastrojos de soja en comparación con los de maíz, lotus y girasol (Figura No. 18).

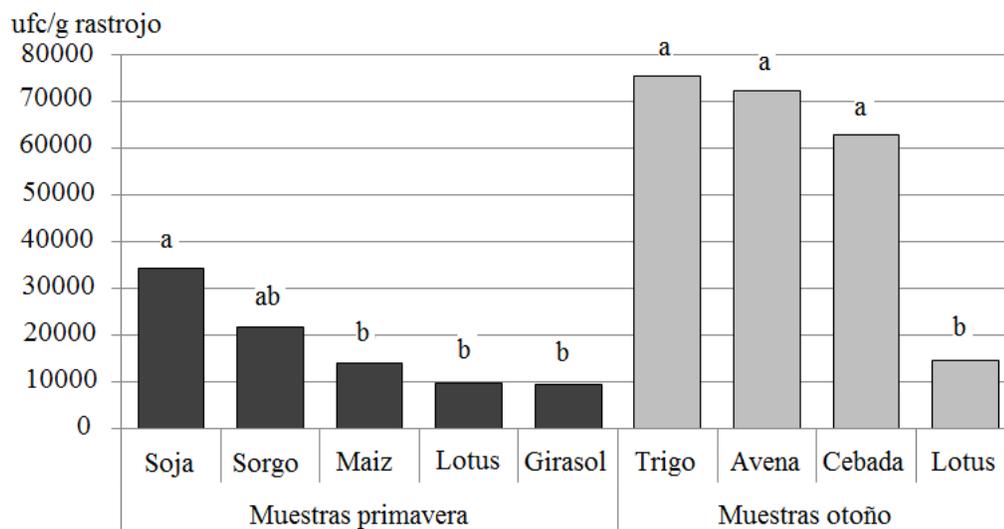


Figura No. 18. Poblaciones promedio de *Trichoderma* en el rastrojo (ufc/gr. rastrojo) según último antecesor en muestras de primavera y otoño.

#### 4.8 DISCUSIÓN

El presente estudio permitió cuantificar las poblaciones de *Trichoderma* en suelo y rastrojo bajo el efecto de diferentes rotaciones agrícolas.

Las rotaciones de cultivos agrícolas afectaron la dinámica poblacional de *Trichoderma* con mayor impacto en rastrojo que en suelo. Estos resultados son consistentes con la bibliografía revisada (Lipps y Deep 1991, Beare et al. 1993, Bulluck et al. 2002, Hagn et al. 2003, Dick, citado por Vargas Gil et al. 2007, Larkin 2008).

No obstante, la evolución de la población de *Trichoderma* en el suelo se mostró más estable que en el rastrojo, con menor variación entre los muestreos de primavera y otoño. Si bien no se encontró correlación significativa en las poblaciones en el rastrojo entre ambas estaciones, para el caso de las poblaciones en el suelo, aquellos tratamientos con altas poblaciones en primavera mostraron poblaciones igualmente altas en otoño.

En este sentido, el rastrojo parece ser la fuerza motriz de las poblaciones de *Trichoderma*, mientras que el suelo “alimenta” su población con los propágulos.

generados principalmente en el rastrojo, pero con fluctuaciones suavizadas por el propio ambiente edáfico, físico, químico y biológico.

La predominancia de rastrojos de cereales de invierno resultó en mayores poblaciones, incluso mayores que la observada en los rastrojos de verano. Estos resultados no coinciden con los mencionados por Vargas Gil et al. (2008). Estos autores concluyeron que las poblaciones más altas de microorganismos en suelo se registraron cuando el maíz era el cultivo antecesor. En nuestro estudio el tratamiento con maíz como antecesor no mostro diferencias significativas con los demás tratamientos, e incluso presentó significativamente menor población que el cultivo de soja, que fue el rastrojo predominante de verano que resultó en mayor población.

La mayor densidad poblacional de *Trichoderma* en los rastrojos de invierno en relación a los de verano coincide con los resultados obtenidos por Pereyra et al. (2012), quienes concluyeron que *Trichoderma* spp. se encontraban en mayor densidad en rastrojos de cebada, trigo y raigrás, y en menor proporción en rastrojos de leguminosas, girasol y maíz.

Los resultados aquí obtenidos también confirman los antecedentes nacionales respecto al efecto de la incorporación de pastura sobre las poblaciones de *Trichoderma*. Los tratamientos con predominancia de rastrojos de Lotus fueron los que mostraron las menores densidades poblacionales. Pereyra et al. (2012), concluyeron que aquellos sitios que venían de varios años de cultivos registraron mayores poblaciones de *Trichoderma* que los que venían de pastura. No se encontró correlación significativa entre los niveles poblacionales de *Trichoderma* en el suelo con los niveles de MO del mismo, a diferencia de los resultados obtenidos por Vargas Gil et al. (2008). Con los demás componentes analizados (pH, P, K y N total) tampoco se encontró ninguna correlación.

Una explicación posible de que estos resultados no hayan mostrado alguna correlación significativa puede ser debido a que los niveles de los componentes analizados varían muy poco entre las diferentes muestras como es el caso del % MO, en donde los datos de los análisis variaron en no más de un 1% en su mayoría. Esta reducida variación podría no llegar a afectar en forma significativa las densidades poblacionales de *Trichoderma*. Otra causa podría deberse a los altos niveles registrados en algunos componentes, como en el caso del P, donde los niveles analizados en las diferentes muestras fueron muy altos en su mayoría, y donde las densidades poblacionales podrían no responder a cambios en esos niveles. Con respecto al pH tampoco se

encontró correlación con las densidades poblacionales de *Trichoderma*, sin embargo algunos autores demostraron que las poblaciones se veían favorecidas a pH bajos (Villegas, 2005).

En base a estos estudios la rotación que más estaría beneficiando a la población de *Trichoderma* sería cebada-soja ya que ambos cultivos como antecesores determinaron mayores niveles poblacionales en suelo y rastrojo. La cebada presentó los mayores niveles poblacionales de *Trichoderma* en rastrojo al igual que los demás cereales de invierno, sin embargo al pasar el tiempo el efecto generado en el suelo sobre las poblaciones fue significativamente mayor en la cebada con respecto a los demás cereales de invierno. Por lo tanto rotaciones que incluyan ambos cultivos en su secuencia podrían aumentar la probabilidad de éxito de la capacidad antagónica de *Trichoderma*, e incluso generar un ambiente favorable para la realización de inoculaciones con este biocontrolador.

Los resultados aquí obtenidos remarcan el impacto de la agricultura sobre las poblaciones microbianas, en este caso sobre *Trichoderma*. Esta información, y comprensión de la dinámica de la población nativa de este tipo de microorganismos es fundamental para estimar su potencialidad de uso como controlador de patógenos de cultivos. Estos resultados indican que hay ambientes más favorables que otros para mantener poblaciones elevadas de *Trichoderma*. La correcta identificación e interpretación de estos factores se vuelve fundamental para lograr una mayor aproximación al éxito del uso de microorganismos biocontroladores en cultivos extensivos.

## 5. CONCLUSIONES

Las rotaciones de cultivos agrícolas afectó significativamente la dinámica poblacional de *Trichoderma* tanto en suelo como en rastrojo.

Las secuencias de cultivos con agricultura continua favorecieron los niveles poblacionales de *Trichoderma* en el rastrojo a diferencia de las secuencias que rotan con pasturas en donde las poblaciones se vieron disminuidas.

La cebada como cultivo antecesor tuvo un efecto positivo sobre las densidades poblacionales de *Trichoderma* presentes en el suelo.

No se encontró ninguna correlación entre diferentes propiedades químicas del suelo (MO, P, K, N total y pH) y los niveles poblacionales de *Trichoderma* del suelo.

Existe un efecto importante del cultivo antecesor sobre las poblaciones de *Trichoderma*. Los cereales de invierno resultaron en mayores niveles poblacionales, mientras se observó una menor población en rastrojos de cultivos de verano y lotus.

Pese a la limitada precisión del método de cuantificación de la población utilizado en este experimento, evidenciada por el alto coeficiente de variación de las variables estudiadas, fue posible detectar diferencias significativas entre los tratamientos, lo que indica la importancia que tiene la rotación sobre la dinámica de *Trichoderma*.

## 6. RESUMEN

En la coyuntura actual, la agricultura uruguaya transcurre por un proceso de intensificación, con una adopción generalizada de la siembra directa y con un claro predominio del trigo y la soja. Esto ha generado un incremento de la problemática sanitaria causada por patógenos necrótrofos que sobreviven en los rastrojos, lo cual se ve reflejado en un aumento importante en el uso de fungicidas. Esta situación ha generado la necesidad de buscar nuevas alternativas de manejo que permitan minimizar el impacto de las enfermedades sobre la producción. A nivel internacional varios estudios han demostrado que es posible manejar la población de microorganismos benéficos mediante la secuencia de cultivos. Entre ellos *Trichoderma*, un hongo ubicuo que se encuentra naturalmente en los suelos y rastrojos en nuestro país, y que ha demostrado ser un biocontrolador de una gran diversidad de patógenos. Este estudio se basa en la hipótesis principal de que la densidad poblacional de *Trichoderma* spp. puede ser manejada por la secuencia de cultivos elegida. El objetivo de este trabajo fue identificar las secuencias de cultivos agrícolas y los componentes de las mismas que favorecen las poblaciones nativas de *Trichoderma* spp. en sistemas en siembra directa. El estudio se realizó en un experimento instalado en la EEMAC desde 1999, con cuatro secuencias con los principales cultivos extensivos sembrados en Uruguay. Se cuantificó la población de *Trichoderma* spp. presente en suelo y rastrojo de cada rotación. Los muestreos fueron realizados en la primavera 2010 y el otoño 2011, y la cuantificación se realizó mediante el método de dilución y recuento en placa. Los resultados obtenidos muestran que las rotaciones de cultivos tienen un marcado efecto sobre la población nativa de *Trichoderma* spp. Existe un efecto importante del cultivo antecesor sobre las poblaciones de *Trichoderma* spp. presentes en el rastrojo. A su vez se observa un incremento en las poblaciones de *Trichoderma* spp. sobre rastrojos de cereales de invierno, y un menor nivel de población en rastrojos de cultivos de verano. También se observó un aumento de la población de *Trichoderma* spp. en el suelo cuando predominaban los rastrojos de cebada. En base a los resultados se puede concluir que es posible manejar las poblaciones de antagonistas modificando el ambiente donde se encuentran naturalmente, lo cual es muy importante para generar nuevas alternativas de manejo sustentables que busquen reducir el inóculo de patógenos mediante el uso de estos agentes de biocontrol.

Palabras clave: Control biológico; *Trichoderma* spp.; Rotación de cultivos.

## 7. SUMMARY

Agricultural systems in Uruguay have gone through a process of intensification, where wheat and soybean crops are predominant, and no till cultivated. These changes have led to an increase in diseases problems caused by necrotrophic pathogens. Thus, there is a need for new management alternatives that minimize the impact of diseases on production. Several studies have shown that it is possible to manage the population of beneficial microorganisms by crop sequence. *Trichoderma*, a ubiquitous fungus that occurs naturally in soil and stubble, has exceptional biocontrol activity of a wide variety of pathogens. Our research tested the hypothesis that the population density of *Trichoderma* spp. can be handled by the chosen crop sequence. The aim of this study was to identify the sequences of crops that might favor the native populations of *Trichoderma* spp. in no till systems. This study was conducted in the Experiment Station Dr Mario A. Casinonni (EEMAC), in a long term experiment established in 1999, with four sequences with major field crops grown in Uruguay. The population of *Trichoderma* spp. was quantified in stubble and soil. Sampling was conducted in the spring 2010 and autumn 2011, and quantification was performed by the method of dilution and plate count. Results show that crop rotations had a marked effect on the native population of *Trichoderma* spp. There was a significant effect of the preceding crop on populations of *Trichoderma* spp. inhabiting the stubble with higher populations of *Trichoderma* spp. on small grain crops stubble, and lower in summer crop stubble. An increase in the population of *Trichoderma* spp. in soil was evident when barley stubble was present. Based on the results here obtained antagonists populations may be altered by changing their environment which is the first step to generate new alternatives of diseases management, to reduce the inoculum of pathogens and minimize the impact of these diseases on crop production.

Keywords: Biological control; *Trichoderma* spp.; Crop rotation.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G. N. 1995. Fitopatología. 2<sup>a</sup>. ed. Mexico, Limusa. 277 p.
2. Arbeletche, P.; Gutiérrez, G. 2010. Crecimiento de la agricultura en Uruguay; exclusión social o integración económica en redes. Pampa. Revista Interuniversitaria de Estudios Territoriales. no. 6: 113-138.
3. Bailey, K.; Lazarovits, G. 2003. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. Soil Tillage Research. 72:169-180.
4. Beare, M.; Coleman, D.; Pohlard, B.; Wright, D. 1993. Residue placement and fungicide effects on fungal communities in conventional and no-tillage soils. Soil Science Society of American Journal. 57: 392–399.
5. Benítez, T.; Rincón, A.; Limón, M.; Codón, A. 2004. Biocontrol of mechanism of *Trichoderma* strains. International Microbiology. 7: 249-260.
6. Bray, R.; Kurtz, L. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. Soil Science Society of American Journal. 59:39-45.
7. Bulluck, L.; Brosius, M.; Evanylo, G.; Ristaino, J. 2002. Organic and synthetic fertility amendments influence soil microbial, physical and chemical properties on organic and conventional farms. Applied Soil Ecology. 19:147–160.
8. Cabrera, M. 2009. Control biológico de la fusariosis del trigo. Tesis de Maestría en Biotecnología. Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias. 68 p.
9. Campbell, R. 1989. Biological control of microbial plants pathogen. Cambridge, Cambridge University. 281 p.
10. Chet, I.; Baker, R. 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. Phytopathology. 71: 286-290.

11. \_\_\_\_\_.; Inbar, J.; Hadar, I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow, D. T. ed. The Mycota IV; environmental and microbial relationships. Berlin, GE, Springer. pp. 165–184.
12. Danielson, R.; Davey, C. 1973a. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 5 (5): 485-494.
13. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 1973b. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. *Soil Biology and Biochemistry*. 5 (5): 505-515.
14. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 1973c. Effects of nutrients and acidity on phialospore germination of *Trichoderma* in vitro. *Soil Biology and Biochemistry*. 5 (5): 517-524.
15. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 1973d. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil Biology and Biochemistry*. 5 (5): 495-504.
16. Díaz, M.; Pereyra, S.; Stewart, S.; Mieres, J. 2002. Fusariosis de la espiga en trigo y cebada. INIA. Hoja de Divulgación no. 79. pp. 2-4.
17. Ernst, O.; Siri-Prieto, G. 2000. Impact of crop-pasture rotation with conventional tillage and no till systems on soil quality and crop yield in Uruguay. In: International Soil Tillage Research and Organization (15<sup>th</sup>., 2000, Forth Worth, TX). Proceedings. s.n.t. s.p.
18. \_\_\_\_\_. 2003. Uruguayizando argentineses. *Cangüé*. no. 24:27 - 30.
19. Ezziyyan, I.; Requena, M.; Pérez, C.; Egea, C.; Candela, M. 2003. Mecanismos de biocontrol de la “tristeza” del pimiento (*Capsicum annum* L.) por microorganismos antagonistas. In: Reunión de la Sociedad Española (15<sup>a</sup>.), Congreso Hispano Luso de Fisiología Vegetal (8<sup>o</sup>., 2003, Palma de Mallorca). Actas. s.n.t. s.p.

20. Gao, L.; Sun, M.; Liu, X.; Che, Y. 2007. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycological Research*. 111:87-92.
21. Hagn, A.; Pritsch, K.; Schloter, M.; Munch Jean, CH. 2003. Fungal diversity in agricultural soil under different farming management systems, with special reference to biocontrol strains of *Trichoderma* spp. *Biology Fertility Soils*. 38:236–244.
22. Howell, C. 1998. The role of antibiosis in biocontrol. In: Harman, G. E.; Kubicek, C. P. eds. *Trichoderma* and *Gliocladium*. London, UK, Taylor and Francis. cap. 2, pp. 173-184.
23. \_\_\_\_\_. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases; the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. 87(1): 4-10.
24. Infante, D.; Martínez, B.; González, N.; Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista Protección Vegetal*. 24 (1): 14-21.
25. Jie, M.; Xu, Y.; Shuxian, L.; Chunjie, L.; Xingyi, Z.; Dekun, D.; Pengyin, C. 2010. Soybean growth and soil microbial populations under conventional and conservational tillage systems. *Journal of Crop Improvement*. 24:337–348.
26. Jiménez, M.; Asdrubal, A.; Ulacio, D. 2012. Evaluation of *Trichoderma* spp. and Acibenzolar-S-Methyl (Bion®) as resistance inducers in Garlic (*Allium sativum* L.) against white rot *Sclerotium cepivorum* Berk. Under controlled conditions. *Journal of Selva Andina Research Society*. 3 (1):14-25.
27. Kirkegaard, J.; Simpfendorfer, S.; Holland, J.; Bambach, R.; Moore, K.; Rebetzke, G. 2004. Effect of previous crops on crown rot and yield of durum and bread wheat in northern NSW. *Australian Journal of Agricultural Research*. 55: 321–334.

28. Kubicek, C.; Harman, G. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. London, UK, Taylor and Francis. v. 1, 278 p.
29. Larkin Rovert, P. 2008. Relative effects of biological amendments and crop rotations on soil microbial communities and soilborne diseases of potato. *Soil Biology and Biochemistry*. 40 (6): 1341–1351.
30. Lipps, P.; Deep, I. 1991. Influence of tillage and crop rotation on yield, stalk rot, and recovery of *Fusarium* and *Trichoderma* spp. from corn. *Plant Disease*. 75 (8): 828-833.
31. Lockwood, J. 1988. Evolution of concepts associated with soilborne plant pathogens. *Annual Review Phytopathology*. 26:93-121.
32. \_\_\_\_\_. 1990. Relation of energy stress to behaviour of soilborne plant pathogens and to disease development. *In*: Hornby, D. ed. *Biological control of soilborne plant pathogens*. Wallingford, UK, CABI. pp. 197–214.
33. Mazzola, M. 2004. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. *Annual Review Phytopathology*. 42: 35–59.
34. Meriles, J.; Vargas Gil, S.; Conforto, C.; Figoni, G.; Lovera E.; March, G.; Guzmán, C. 2009. Soil microbial communities under different soybean cropping systems; characterization of microbial population dynamics, soil microbial activity, microbial biomass, and fatty acid profiles. *Soil and Tillage Research*. 103 (2): 271–281.
35. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2010. Área sembrada por modalidad de siembra; año agrícola 2008-2009.(en línea). Anuario estadístico 2010: s.p. Consultado 15 set. 2012. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,352,O,S,0,MNU;E;2;16;10;6;MNU;>

36. Papavizas, G. 1985. *Trichoderma* and gliocladium; biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*. 23: 23-54.
37. Perello, A.; Monaco, C.; Sisterna, M.; Dal bello, G. 2003 Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for Tan Spot of wheat in Argentina. *Crop Protection*. 22:1099-1106.
38. Pereyra, S. 2005. Epidemiological and ecological studies of pathogenic Fusaria causing Fusarium head blight of wheat and barley in Uruguay and prospects for control. PhD. Thesis. St. Paul, Minnesota, USA. University of Minnesota. 137 p.
39. \_\_\_\_\_; Dill-Macky, R. 2008. Colonization of the residues of diverse plant species by *Gibberella zeae* and their contribution to Fusarium head blight inoculum. *Plant Disease*. 92: 800-807.
40. \_\_\_\_\_; Ríos, A.; Zerbino, M. 2012. Efecto de la secuencia de cultivos sobre la dinámica de los patógenos de trigo y cebada dependientes del rastrojo y comunidades benéficas en agricultura de secano en siembra directa. In: Seminario de Cierre del Proyecto INIA 2004 (2012, Las Brujas, Canelones, UY). Uso de la biodiversidad para la evaluación del impacto de la intensificación agrícola y el diseño de agroecosistemas sustentables. Montevideo, INIA. pp. 101-105 (Actividades de Difusión no. 674).
41. Pérez, C.; Dill-Macky, R.; Kinkel, L. 2008. Management of soil microbial communities to enhance populations of *Fusarium graminearum*-antagonists in soil. *Plant and Soil*. 302:53-69.
42. \_\_\_\_\_; Carameso, L.; Fros, D.; Cadenazzi, M.; Ernst, O. 2009. Manejo sanitario en sistemas sin laboreo; ¿agrónomos o nutricionistas? In: Simposio Nacional de Agricultura (1º., 2009, Paysandú, UY). Trabajos presentados. Montevideo, Universidad de la República. pp. 141-160.

43. \_\_\_\_\_.; Hoffman, E.; Viega, L.; Villar, H.; Ernst, O. 2011. Manejo de enfermedades en sistemas agrícolas; mitos y realidades. In: Simposio Nacional de Agricultura (2o., 2011, Paysandú, UY). Trabajos presentados. Paysandú, Uruguay, s.e. pp. 119-131.
44. Rifai, M. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Micological Paper*. 116:1156.
45. Steinkellner, S.; Langer, I. 2004. Impact of tillage on the incidence of *Fusarium* spp. in soil. *Plant and Soil*. 267:13–22.
46. Stewart, S.; Pereyra, S.; Díaz, M. 2001. Manchas foliares de trigo y cebada en siembra directa.; conceptos y estrategias de control. (en línea). Montevideo, INIA. s.p. (Documento on-line no. 036). Consultado 3 set. 2012. Disponible en <http://www.inia.org.uy/online/site/publicacion-ver.php?id=698>
47. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 2004. El efecto de la intensificación agrícola en las enfermedades de los cultivos. (en línea). In: Simposio Sustentabilidad de la Intensificación Agrícola en el Uruguay (2004, Mercedes). Resúmenes. Montevideo, INIA. pp. 19-24 (Actividades de Difusión no. 365). Consultado 10 dic. 2012. Disponible en <http://www.inia.org.uy/online/site/publicacion-ver.php?id=973>
48. Vargas Gil, S.; March, G.; Casini, C.; Pastor, S.; Benitez, G.; Haro R. 2003. Efecto de las labranzas y rotaciones sobre las poblaciones de biocontroladores y las enfermedades por hongos del suelo en maní. In: Jornada Nacional de Maní (18a., 2003, Córdoba). Memorias. s.n.t. pp. 18-19.
49. \_\_\_\_\_.; Meriles, J.; Haro, R.; Casini, C.; March, G. 2007. Crop rotation and tillage systems as a proactive strategy in the control of peanut fungal soilborne diseases. *BioControl*. 53: 685–698.

50. \_\_\_\_\_.; Haro, R.; Oddino, C.; Kearney, M.; Zuza, M.; Marinelli A.; March, G. 2008. Crop management practices in the control of peanut diseases caused by soilborne fungi. *Crop Protection*. 27:1-9.
51. \_\_\_\_\_.; Pastor, S.; March, G. 2009. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. *Micobiological Research*. 164: 196-205.
52. Vero, S.; Mondino, P. 1999. Control biológico postcosecha; medidas para conservar fruta y hortalizas. *Horticultura Internacional*. 7 (26): 29 - 36.
53. Villegas, M. 2005. *Trichoderma* Pers.; características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. (en línea). Villavicencio, Colombia, Orius Biotecnología. s.p. Consultado 5 nov. 2012. Disponible en [http://www.oriusbiotecnologia.com/index.php?option=com\\_k2&view=item&layout=item&id=53](http://www.oriusbiotecnologia.com/index.php?option=com_k2&view=item&layout=item&id=53)
54. Wacha, A.; Tiffany, L. 1979. Soil fungi isolated from fields under different tillages and weed-control regimes. *Mycologia*. 71:1215-1226.
55. Walkley, A.; Black, I. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining organic carbon in soils; effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. *Soil Science Society of American Journal*. 63:251-263.
56. Weller, D.; Raaijmakers, J.; Mcspadden, B.; Tomashow, L. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review Phytopathology*. 40:309-348.
57. Williams, J.; Clarkson, J.; Mills, P.; Cooper, R. 2003. A selective medium for quantitative reisolation of *Trichoderma harzianum* from agaricus bisporus compost. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (7): 4190 – 4191.

58. Yedidia, I.; Benhamou, N.; Chet, I. 1999. Induction of defense in cucumber plants (*Cucumis sativus L.*) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:1061-1070.
59. Ziman, G.; Elad, Y.; Chet, I. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology*. 86: 1225-1260.

## 9. ANEXOS

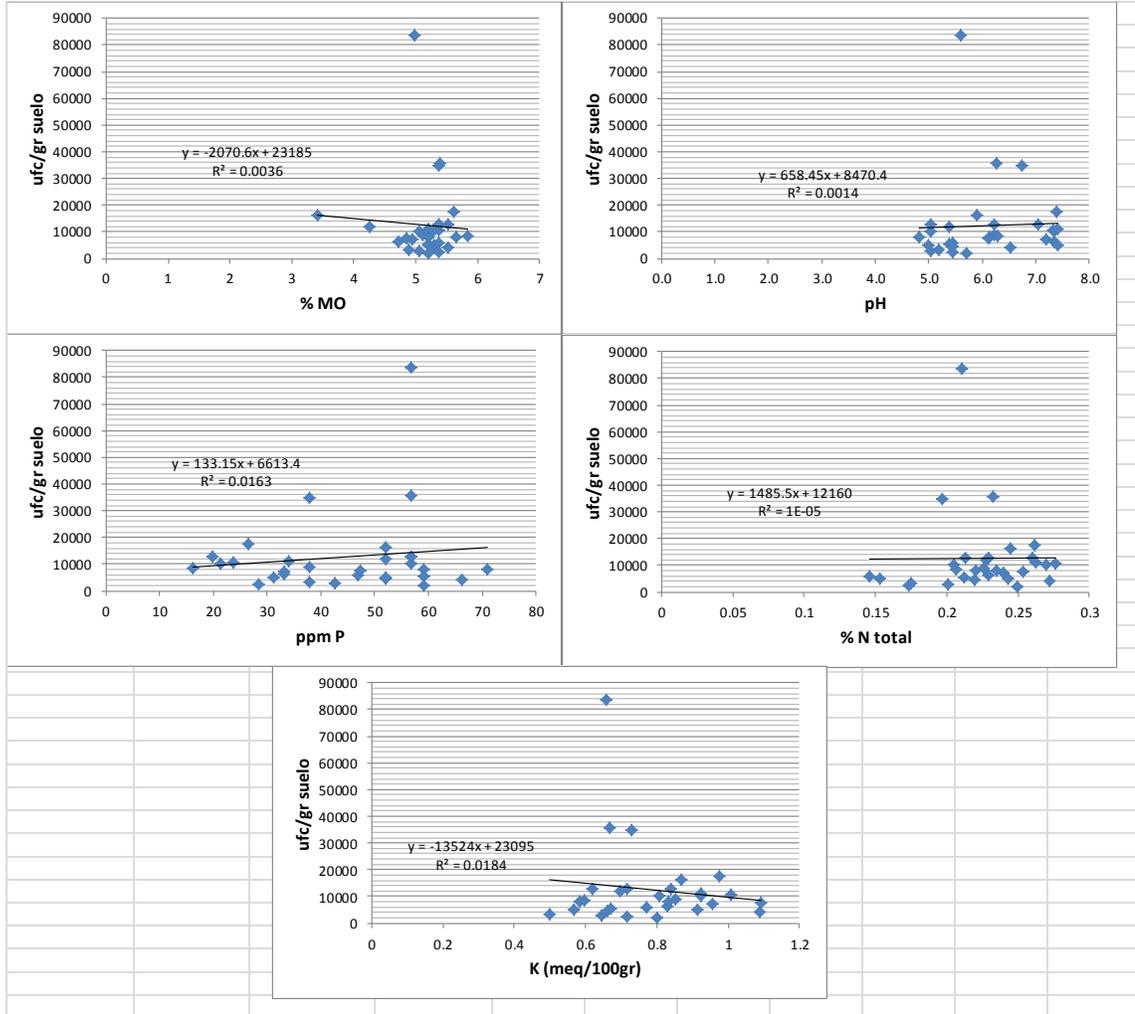


Figura No. 1. Correlaciones entre población de *Trichoderma* (ufc/g suelo) y los diferentes componentes del suelo analizados (MO, P, pH, Ntotal y K) en primavera.

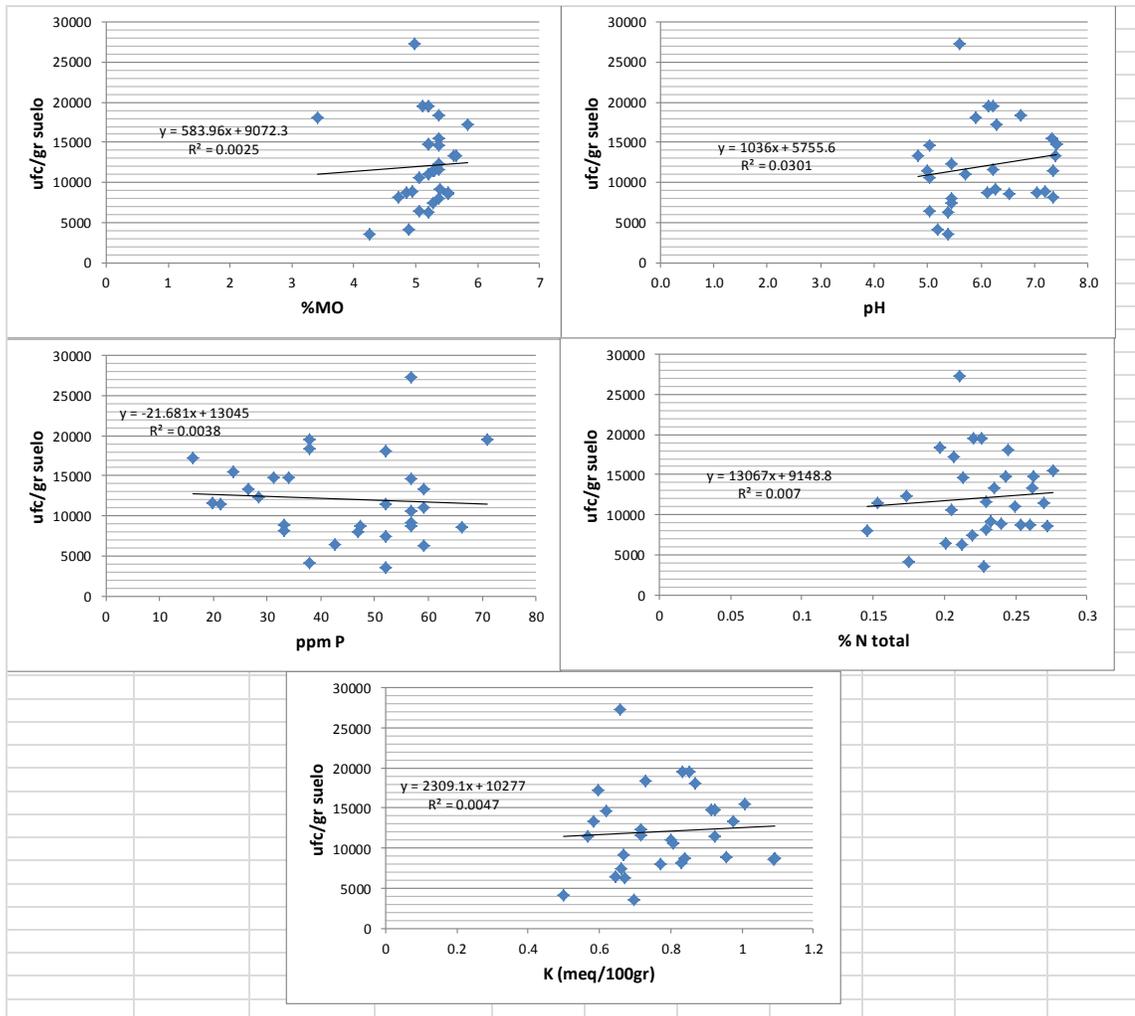


Figura No. 2. Correlaciones entre población de *Trichoderma* (ufc/g suelo) y los diferentes componentes del suelo analizados (MO, P, pH, Ntotal y K) en otoño.