

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

Dinámica de la población nativa de *Trichoderma* spp. en agricultura sin laboreo

por

Héctor Andrés Villar Peculio

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de Magister
en Ciencias Agrarias opción Ciencias
Vegetales

PAYSANDÚ
URUGUAY
(Noviembre 2013)

Tesis aprobada por el tribunal integrado por: PhD. Silvia Pereyra, PhD. Oswaldo Ernst, y PhD. Sandra Lupo, el 5 de noviembre de 2013. Autor: Andrés Villar. Director: Carlos Pérez

Dedico este trabajo a mi familia, que con su apoyo incondicional mantuvieron siempre presente mis ganas de seguir adelante, y siempre (sin tener muy claro de que se trata esto) se interesaron al respecto.

También dedico este trabajo a Carlos Pérez por ser el autor ideológico de este proyecto y el precursor de mi participación en él.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Carlos Pérez por el apoyo brindado a lo largo de todo el proceso de la maestría. Agradezco también a: Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por la financiación del proyecto de investigación. Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por su aporte a través de las becas de Iniciación a la investigación y Becas para Posgrados Nacionales. Comisión Coordinadora del Interior (CCI) por la financiación de instancias de aprendizaje como cursos y pasantías. Se agradece también a Lidia Bentancor y a la familia Cáceres por su hospitalidad en los períodos que realicé cursos en Montevideo. También agradezco a los funcionarios de la Estación Mario A. Cassinoni que participaron en el proyecto de investigación, y a Paula Conde por su colaboración a través del entrenamiento sobre la técnica de cuantificación de *Trichoderma* spp.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	VII
SUMMARY.....	VIII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. DESCRIPCIÓN DE LA PROBLEMÁTICA.....	1
1.1.1. <u>Importancia de la agricultura en Uruguay</u>	1
1.1.2. <u>Problemática sanitaria en respuesta a los cambios en la agricultura</u>	1
1.1.3. <u>Aumento del uso de fungicida</u>	2
1.1.4. <u>Principales enfermedades causadas por patógenos necrótrofos</u>	2
1.1.5. <u>Estrategias de manejo disponibles y sus condicionantes asociadas a la realidad agrícola actual</u>	3
1.2. EL CONTROL BIOLÓGICO.....	4
1.3. MANEJO DE PATÓGENOS A TRAVÉS DE MICROORGANISMOS BIOCONTROLADORES.....	5
1.3.1. <u>Interrupción de la fase parasítica de los patógenos</u>	5
1.3.2. <u>Interrupción de la fase saprofítica de los patógenos</u>	7
1.3.3. <u>Efectos efímeros del control biológico: posibles causas</u>	7
1.3.4. <u>Un nuevo enfoque para levantar las limitantes del control biológico</u>	8
1.4. <u>TRICHODERMA COMO AGENTE DE BIOCONTROL</u>	10
1.5. PLANTEO DE LA PROPUESTA.....	11

2. <u>CARATERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE LA POBLACIÓN NATIVA DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. EN SISTEMAS AGRÍCOLAS</u>	13
2.1. RESUMEN.....	14
2.2. SUMMARY.....	15
2.3. INTRODUCCIÓN.....	16
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
2.4.1. <u>Colección de <i>Trichoderma</i> en estudio</u>	18
2.4.2. <u>Identificación molecular de <i>Trichoderma</i></u>	19
2.4.3. <u>Caracterización de la capacidad antagónica de <i>Trichoderma</i></u>	22
2.4.4. <u>Análisis estadístico</u>	24
2.5. RESULTADOS.....	24
2.5.1. <u>Colección de <i>Trichoderma</i> en estudio</u>	24
2.5.2. <u>Identificación de <i>Trichoderma</i></u>	25
2.5.3. <u>Caracterización de la capacidad antagónica de <i>Trichoderma</i></u>	36
2.6. DISCUSIÓN.....	42
2.7. AGRADECIMIENTOS.....	48
2.8. BIBLIOGRAFÍA.....	49
3. <u>EFFECTO DE LOS CULTIVOS SOBRE LA POBLACIÓN NATIVA DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. EN AGRICULTURA SIN LABOREO</u>	55
3.1. RESUMEN.....	56
3.2. SUMMARY.....	57
3.3. INTRODUCCIÓN.....	58
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
3.4.1. <u>Sitio experimental</u>	60
3.4.2. <u>Condiciones climáticas</u>	60

3.4.3. <u>Muestreo de rastrojo</u>	61
3.4.4. <u>Muestreo de suelo</u>	61
3.4.5. <u>Cuantificación de la población de <i>Trichoderma</i> spp. en suelo y rastrojo</u>	62
3.4.6. <u>Determinación de las propiedades químicas del suelo</u>	62
3.4.7. <u>Análisis estadístico</u>	63
3.5. RESULTADOS.....	63
3.5.1. <u>Condiciones climáticas</u>	63
3.5.2. <u>Población de <i>Trichoderma</i> spp. en los rastrojos de cada cultivo</u>	64
3.5.3. <u>Población de <i>Trichoderma</i> spp. en los rastrojos de cada secuencia de cultivos</u>	66
3.5.4. <u>Relación entre las propiedades químicas del suelo y la población de <i>Trichoderma</i> spp.</u>	72
3.6. DISCUSIÓN.....	73
3.7. AGRADECIMIENTOS.....	81
3.8. BIBLIOGRAFÍA.....	81
4. <u>DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES</u>	88
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	90
6. <u>ANEXOS</u>	99
6.1. ANEXO 1.....	99

RESUMEN

En la última década han aumentado los problemas sanitarios causados por patógenos necrótrofos en los sistemas agrícolas de Uruguay, debido fundamentalmente al aumento en la presión de inóculo asociado a la siembra directa. En este escenario urge buscar nuevas alternativas de manejo que permitan reducir la presión de inóculo presente en el rastrojo. El objetivo de este estudio fue evaluar posibilidad de manejar las poblaciones nativas de *Trichoderma*, e identificar ambientes que favorezcan altas poblaciones de este antagonista. Para ello en primera instancia se indentificaron las cepas de una colección de *Trichoderma* obtenida desde un experimento de largo plazo de rotaciones de cultivos en siembra directa. La identificación se realizó mediante técnicas moleculares basadas en la región ITS (espaciador transcrito interno, por sus siglas en inglés) del ADN ribosomal. Luego, se tomaron cepas representativas de cada grupo taxonómico, y se evaluó la capacidad antagónica de las mismas frente a *Drechslera tritici-repentis* y *Bipolaris sorokiniana*, mediante pruebas de antagonismo *in-vitro*. Posteriormente, se determinó el efecto de los cultivos sobre la población nativa de *Trichoderma* spp. en el experimento arriba mencionado. La evolución de la población nativa de *Trichoderma* en las distintas rotaciones analizadas se determinó mediante muestreos de rastrojo y suelo, durante tres años, y siembra de diluciones en medio de cultivo semi-selectivo para *Trichoderma*. Los resultados indican la presencia de especies representantes de 11 grupos taxonómicos de *Trichoderma*, existiendo un claro predominio de dos de ellos. Todas las cepas analizadas lograron altos niveles de inhibición de ambos patógenos mostrando diferencias inter-específicas e intra-específicas. Los rastrojos de cebada fueron los que presentaron mayor densidad poblacional de *Trichoderma* spp. La población de *Trichoderma* spp. fue consistentemente mayor en otoño que en primavera. Estos resultados confirman la presencia de antagonistas de *B. sorokiniana* y *D. tritici-repentis* naturalmente presentes en sistemas agrícolas, y establecen la posibilidad de manejar la población nativa de *Trichoderma* spp. a través de los componentes de las secuencias de cultivos, e identificar ambientes más propicios ante eventuales inoculaciones de *Trichoderma*.

Palabras clave: antagonismo, control biológico, enfermedades, patógenos necrótrofos, rotación de cultivos

POPULATION DYNAMICS OF NATIVE *Trichoderma* spp. IN NO-TILL AGRICULTURE

SUMMARY

Field crop diseases caused by primarily by necrotrophic pathogens have increased in the last decade in Uruguay, mainly associated to the adoption of no-till systems. In this scenario, the exploration of new technologies is needed to reduce the inoculum density of those pathogens surviving on crop debris. The aim of this study was to evaluate the ability to manage the native population of *Trichoderma* and to identify conducive environments to high populations of this important antagonist. First, a set of strains obtained from a long-term experiment with different crop rotation systems under no-till practice, were identified based on the ITS (Internal Transcribed Spacer) region of the ribosomal DNA. Then, the antagonistic capacity of representative strains from different taxa was tested against *Drechslera tritici-repentis* and *Bipolaris sorokiniana*. The native population of *Trichoderma* spp. was determine over 3-years period by plating dilutions obtained from soil and straw samples of different crops collected twice a year, in fall and spring, respectively. Eleven taxonomic groups of *Trichoderma* were found on the studied experiment, with a clear dominance of two of them. Interestingly, all strains achieved high levels of inhibition of both pathogens showing differences inter-specific and intra-specific. Barley crop debris showed the highest population density of *Trichoderma* spp. overall crops debris tested. The population of *Trichoderma* spp. was consistently higher in fall samples than in springs. These results confirm the presence of antagonists of *B. sorokiniana* and *D. tritici-repentis* in agricultural systems, and confirm the ability to manage the native population of *Trichoderma* spp. by specific crops in the sequence, indicating the possibility to identify conducive environments for high populations of *Trichoderma* to warranty eventual inoculations of this important microorganism.

Keywords: antagonism, biological control, diseases, necrotrophic pathogens, crop rotation

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DESCRIPCIÓN DE LA PROBLEMÁTICA

1.1.1. Importancia de la agricultura en Uruguay

La agricultura uruguaya a lo largo de las últimas décadas ha ganado peso relativo en la economía nacional dado por una coyuntura de precios en el mercado internacional muy favorable para los distintos productos agrícolas. Esto ha dejado como resultado una expansión sustancial del área sembrada con cultivos agrícolas extensivos. En el año 2000 la superficie agrícola fue de 341901 hectáreas, mientras que para el año 2012 esa superficie aumentó a 1227900 hectáreas, un incremento del 360 % (DIEA, 2011; DIEA 2001). Asimismo, en ese período el producto bruto interno (PBI) agrícola registró una evolución muy por encima del resto de los sectores agropecuarios, inclusive el ganadero (rubro históricamente con mayor participación en el PBI global de Uruguay). Así, en los últimos años por primera vez el valor de las exportaciones de los productos derivados de la agricultura superó al obtenido por concepto de ventas de productos ganaderos.

1.1.2. Problemática sanitaria en respuesta a los cambios en la agricultura

El aumento en importancia de la agricultura ha sido producido mediante un proceso de modificaciones muy dinámico en su estructura productiva. En primer lugar, se ha experimentado una fuerte intensificación de la producción donde varios sistemas de rotación con pasturas se han cambiado a sistemas de producción de agricultura continua. En el año 2000 las praderas representaban aproximadamente un 45 % del total de la superficie de invierno, mientras que en el año 2010 ocuparon solo el 6,5 % del total (DIEA, 2011), evidenciando un claro divorcio entre la agricultura y la producción ganadera. Por otro lado, dentro de los cultivos extensivos que se siembran en Uruguay, el trigo ha sido históricamente el principal cereal sembrado. En la última década, este cultivo ha incrementado fuertemente su participación, alcanzando 553 mil hectáreas en la zafra 2010, un 80 % del total sembrado con cultivos de invierno. Situación similar a la del cultivo de soja, el cual ha aumentado en forma explosiva en la última década pasando de casi 30 mil hectáreas en la zafra 2001/02 a más de 883 mil hectáreas en la zafra 2011/12 y representando más del 80 % del área de verano (DIEA, 2012). Esta evolución diferencial de los cultivos se deriva en un alto porcentaje del área agrícola donde el cultivo a sembrar se enfrenta a chacras con un alto

nivel de rastrojos infectados. A su vez se ha incrementado el porcentaje del área en siembra directa, alcanzándose en el invierno 2007 al 80 % del área total (DIEA, 2008). En estos sistemas sin laboreo, la permanencia del rastrojo en superficie, base de la sustentabilidad de estos sistemas, brinda sustrato para la supervivencia de patógenos necrótrofos capaces de obtener alimento de tejido muerto, y generar inóculo para los cultivos siguientes (Díaz y Stewart, 1997; Reis *et al.*, 1992). El efecto acumulado de los factores mencionados explica la situación agrícola actual, donde las problemáticas sanitarias causadas por patógenos rastrojo-dependientes han aumentado sustancialmente.

1.1.3. Aumento del uso de fungicidas

Un claro indicador del impacto que estos cambios han tenido sobre la problemática sanitaria es el aumento sustancial del uso de fungicidas, con el concomitante impacto económico y ambiental que esto implica. Los datos recogidos por la DGSA-MGAP (2010) son contundentes reflejando esta realidad. En el año 2000 el tebuconazol era el principal fungicida utilizado en la agricultura extensiva, representando el 13 % del total de fungicidas importados al país. En el año 2009 la importación de tebuconazol incrementó 21 veces con respecto al año 2000. Cuando se incluyen en el cálculo las nuevas formulas de principios activos importados cuyo uso principal es en sistemas agrícolas (Kresoxim-metil + epoxiconazol, Trifloxystrobin + tebuconazol, Azoxystrobin + ciproconazol, Pyraclostrobin + epoxiconazol, entre otros), la cantidad de fungicidas importados aumentó 34 veces con respecto al 2000 (Pérez *et al.*, 2011). El área agrícola se cuadruplicó en dicho período, por lo cual la mayor importación de fungicidas no sólo se vio aumentada por una mayor área agrícola, sino que además ha habido un aumento en su intensidad de uso (i.e. mayor cantidad de fungicida importado por unidad de área sembrada). Este aumento en la importación de fungicidas refleja sin dudas la mayor importancia relativa de las problemáticas sanitarias causadas por patógenos necrótrofos en la agricultura actual.

1.1.4. Principales enfermedades causadas por patógenos necrótrofos

Existen claras evidencias de patógenos necrótrofos causando epifitias devastadoras en la agricultura del Uruguay. Tal fue el caso de la fusariosis de la espiga en cultivos de invierno (causada principalmente por *Gibberella zeae*) en las zafra 1993, 1996, 2001 y 2002 y el cancro del girasol (causado por *Diaporthe helianthi*) en las zafra del 2003 hasta el 2007

(Stewart, 2005; Díaz *et al.*, 2002). A su vez, existe un grupo de patógenos necrotróficos que sin causar epifitias devastadoras, reducen significativamente el rendimiento y la calidad de los granos. Este es el caso de las manchas foliares en trigo y cebada, donde se destacan la mancha bronceada (*Pyrenophora tritici repentis*) y mancha de la hoja (*Septoria tritici*) en trigo, mancha en red (*Pyrenophora teres*) y escaldadura (*Rhynchosporium secalis*) en cebada, y la mancha borrosa (*Bipolaris sorokiniana*) en ambos cultivos. Por otro lado, en soja se ha observado principalmente la presencia de patógenos que integran el complejo de “enfermedades de fin de ciclo”, como el “tizón de la hoja” causada por *Cercospora kikuchii*, “mancha marrón” causada por *Septoria glycines*, “antracnosis” causada por *Colletotrichum truncatum*, “tizón del tallo y de la vaina” causado por *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*. Y en maíz el “tizón norteño” causado por *Exserohilum turcicum*. Anualmente, estos grupos de patógenos afectan negativamente la rentabilidad de los cultivos, ya sea por pérdidas directas (efecto sobre el rendimiento y calidad) así como por pérdidas indirectas (costo del tratamiento químico utilizado para su control) (Díaz *et al.*, 1996).

1.1.5. Estrategias de manejo disponibles y sus condicionantes asociadas a la realidad agrícola actual

Si se pretende aprovechar un escenario de precios de granos favorable (como el actual) alargando la fase agrícola de una rotación, la presión de inóculo primario de los patógenos asociados al rastrojo se vuelve la principal limitante (Pérez *et al.*, 2009; Rees, 1987), acentuándose este problema en los sistemas bajo siembra directa. Frente a esta situación es clara la necesidad de utilizar semilla libre de inóculo, cultivares resistentes y fundamentalmente rotar los cultivos, intercalando especies no susceptibles. Sin embargo, ya sea debido al reducido menú de cultivos (para la producción de granos) con que cuentan los productores agrícolas para elegir la especie a sembrar, así como a la fuerte presión que ejercen los mercados, el tiempo mínimo de rotación con cultivos no susceptibles al patógeno problema no siempre puede ser respetado. Según información nacional, para el caso del trigo, es necesario un tiempo mínimo de dos años sin ese cereal para lograr reducir la cantidad de inóculo en el rastrojo, de manera que esta fuente de inóculo no sea la desencadenante de epidemias (Pérez *et al.*, 2009). En este sentido, se debería sembrar trigo

en un año de cada tres, un lapso de tiempo, tal vez un tanto excesivo, teniendo en cuenta las limitantes planteadas anteriormente.

A estas condicionantes del manejo sanitario de los cultivos asociadas a la realidad agrícola actual, se suma otra limitante de manejo: la capacidad de algunos patógenos para infectar a más de un cultivo. El caso más elocuente en este sentido lo representa *Gibberella zeae*, el cual puede infectar a trigo, cebada, maíz y sorgo, pero también están presentes en nuestros patosistemas otros patógenos con esa capacidad, entre ellos se destacan *Bipolaris sorokiniana* (puede infectar trigo, cebada y sorgo) y *Exserohilum turcicum* (infecta maíz y sorgo).

1.2. EL CONTROL BIOLÓGICO

Frente a esta coyuntura, surge la necesidad de explorar nuevas herramientas que permitan reducir la presión de inóculo de los patógenos asociados a los rastrojos. No quedan dudas que para un manejo efectivo y sustentable de las enfermedades se debe apelar a los efectos acumulados de las distintas estrategias de manejo disponibles.

En este sentido, el control biológico es una herramienta que ha sido muy poco explorada en sistemas agrícolas, y que integrada al resto de las alternativas de manejo, podría tener un aporte significativo a esta problemática.

Es necesario diferenciar el concepto de “control biológico” del de “control natural”. Este último es un fenómeno que sucede en las poblaciones de organismos sin la intervención del hombre y que incluye además de enemigos naturales la acción de los factores abióticos del medio. Por otro lado, Baker y Cook (1974) definen al control biológico (en un sentido fitopatológico) como la “reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedador o del antagonista, o por la introducción masiva de uno o más antagonistas”. Posteriormente, la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos en 1987 (NAS, 1987) lo definen como la “utilización de organismos naturales o modificados, genes o productos génicos, para reducir los efectos de organismos indeseables, y para favorecer organismos útiles para el hombre, tales como cultivos, árboles, animales y microorganismos beneficiosos”. Ambas definiciones se resumen en el control de los patógenos utilizando las

actividades de otros organismos. A pesar que son muchas las maneras con las cuales puede ser llevado a la práctica, la utilización de microorganismos mediante su introducción masiva a un patosistema determinado ha sido la herramienta más utilizada para manejar biológicamente a las enfermedades.

1.3. MANEJO DE PATÓGENOS A TRAVÉS DE MICROORGANISMOS BIOCONTROLADORES

1.3.1. Interrupción de la fase parasítica de los patógenos

Específicamente, en cultivos extensivos el uso de biocontroladores ha sido considerado en varios países para controlar distintas enfermedades. En el caso de cereales de invierno existen varios antecedentes de búsqueda y evaluación de agentes de biocontrol que pudieran ser aplicados a la espiga para minimizar la Fusariosis de la espiga (causada por *Fusarium* spp.). Diamond y Cooke (2003) obtuvieron una reducción del 60 % de la infección causada por *Fusarium culmorum* mediante la aplicación de *Phoma betae* a las espigas de trigo en condiciones controladas. Por su parte Khan *et al.* (2004) evaluaron distintas levaduras y encontraron que una cepa de *Cryptococcus nodaensis* aplicada a la espiga permitía reducir hasta un 60 % los niveles de enfermedad en condiciones de campo.

Perelló *et al.* (2009) y Perelló *et al.* (2008) observaron reducciones en la severidad e incidencia de la septoriosis (causada por *Septoria tritici*) y mancha amarilla del trigo (causada por *Drechslera tritici repentis*) por la aplicación a campo de *Trichoderma*. Logrando disminuciones de la incidencia y severidad de septoriosis, de 40 y 70 %, respectivamente en relación al testigo sin la inclusión de *Trichoderma*. Asimismo, se registraron reducciones significativas en un rango entre 16 y 35 % de la severidad de mancha amarilla en relación al tratamiento sin *Trichoderma*. En algunos casos mediante el uso de *Trichoderma* se logró igualar la eficiencia de control del tratamiento con fungicida (56 % de eficiencia de control).

Por su parte, Salehpour *et al.* (2005) en trabajos de laboratorio observaron la alta capacidad en inhibir el crecimiento de *Bipolaris sorokiniana* de las cepas de *Trichoderma* evaluadas. A nivel de invernáculo, en algunos tratamientos, donde las semillas fueron sumergidas en suspensiones con conidios de cepas de *Trichoderma* y los suelos fueron tratados con este antagonista, se lograron reducciones significativas de la infección de *Bipolaris sorokiniana*.

Estas son evidencias alentadoras ya que muestran la potencial contribución de algunos agentes de biocontrol frente a la problemática planteada. Sin embargo, dichos resultados no fueron consistentes para todas las condiciones de evaluación de los experimentos (variaron según el año y cultivar evaluado). Aunado a esto, los autores mencionan la necesidad de investigar aún más sobre los fenómenos que rigen el antagonismo en condiciones de campo debido a las complejas interacciones entre el huésped, el patógeno y los antagonistas en esas condiciones. En esta línea, Perelló *et al.* (2003) ya habían evaluado el efecto de la aplicación foliar de distintas cepas de *Trichoderma* en condiciones de invernáculo, encontrando que varias de ellas lograban reducir el porcentaje de severidad de mancha amarilla en hojas de trigo. Sin embargo, en la mayoría de los casos ocurrieron descensos importantes en la población de las cepas de *Trichoderma* inoculadas después de la aplicación, lo cual posiblemente se acentúe en condiciones de campo donde las condiciones ambientales son más hostiles, resultando en efectos efímeros, de baja eficiencia y/o inconsistentes. Estos resultados han sido frecuentes cuando se han aplicado agentes biocontroladores a un ambiente donde naturalmente no habitan o no se encuentran al nivel poblacional necesario para ser efectivos.

La efectividad de manejo de las enfermedades a través de microorganismos antagonistas se ve afectada especialmente cuando no se tiene un claro conocimiento de su dinámica poblacional. Esto trae consigo una serie de inconvenientes en su aplicación, sobre todo si se compara con los métodos químicos de control. El éxito de su aplicación requiere entonces, mayores conocimientos de la biología de los organismos implicados, tanto del agente patógeno como de los antagonistas utilizados.

Teniendo en cuenta que el motor del antagonismo es el crecimiento mismo de los antagonistas, es necesario trabajar en ambientes donde ellos puedan mantener elevadas densidades poblacionales. Los microorganismos benéficos raramente son encontrados en niveles poblacionales elevados sobre la superficie de los órganos aéreos de las plantas vivas, ya que ese es un ambiente inhóspito, principalmente por la escasa oferta de alimento. Por el contrario, en ese sitio los patógenos pueden ingresar a los tejidos de las plantas y alimentarse de ellos. Esta ventaja competitiva determina que en esos ambientes difícilmente logren ser inhibidos directamente por los antagonistas. Por esto, sería más apropiado lograr que la

inhibición se produzca en un ambiente donde el antagonista tenga mayor capacidad de proliferación, y por lo tanto pueda competir eficazmente por el nicho.

1.3.2. Interrupción de la fase saprofítica de los patógenos

Se han realizado varios trabajos que han evaluado la posibilidad de aplicar hongos saprofíticos a los residuos de cultivos con el objetivo de reducir el inóculo primario durante la fase saprofítica de los patógenos (Bujold *et al.* 2001; Fernandez, 1992a; Fernandez, 1992b). El control biológico a través de la interrupción de la etapa saprofítica de los patógenos presenta dos grandes ventajas a destacar. En primer lugar, la principal fuente de inóculo de los patógenos necrótrofos proviene de los residuos infectados que quedan en la superficie del suelo. En segundo lugar y como principal atributo es que al igual que esos patógenos, son varios los microorganismos con capacidad de utilizar a los rastrojos de los cultivos como fuente de alimento.

En este sentido Bujold *et al.* (2001) encontró una reducción significativa en la formación de peritecios de *Gibberella zeae* y en la producción de ascosporas en aquellos tratamientos donde *Microsphaeriosis* spp. fue aplicado sobre el rastrojo. Similares resultados fueron encontrados por Fernandez (1992a) y Fernandez (1992b) al aplicar *Trichoderma harzianum* sobre rastrojo de trigo y soja.

En Uruguay, a partir del 2003, Silvia Pereyra (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) La Estanzuela) junto a su grupo de investigación comenzaron a explorar la posibilidad de aplicar agentes de biocontrol tales como *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* disponibles comercialmente en Estados Unidos y Uruguay. Los resultados obtenidos mostraron la potencialidad de esta herramienta para disminuir la presión de inóculo generada en los rastrojos. Sin embargo el impacto no fue el esperado ya que los efectos de los tratamientos que redujeron la densidad de inóculo, no lograron mantenerse en el tiempo, resultando en una situación sanitaria similar a la de los tratamientos sin biocontroladores (Pereyra *et al.*, 2005).

1.3.3. Efectos efímeros del control biológico: posibles causas

Diversas razones explican la falta de consistencia de estos resultados, pero la principal razón ha sido atribuida a la falta de adaptabilidad de los agentes de biocontrol al “nuevo” ambiente

donde se los quiere introducir (Hoitink y Boehm, 1999). En el caso publicado por Pereyra *et al.* (2005), probablemente debido a que las cepas evaluadas no fueron aisladas del patosistema en el cual fueron analizadas.

Por esta razón, Cabrera (2009) inicia una nueva línea de trabajo que incluyó el aislamiento de cepas de *Trichoderma* spp. a partir de rastrojo de trigo proveniente de chacras de sistemas agrícolas de Uruguay, la identificación de todas las cepas obtenidas, y la caracterización de las mismas. Con los resultados de esta caracterización se logró seleccionar cinco cepas de *Trichoderma* que fueron posteriormente evaluadas *in vitro* por su capacidad de inhibir la producción de peritecios de *Gibberella zeae* sobre rastrojo de trigo. Las cinco cepas lograron disminuir significativamente la producción de peritecios sobre el rastrojo de trigo. Incluso una de las cepas (TmE de *Trichoderma atroviride*) logró inhibir la formación de peritecios hasta un 85% respecto al testigo.

Estos resultados permiten visualizar la existencia de una población nativa de microorganismos (adaptados a los “patosistemas problema”) con capacidad de inhibir el crecimiento y reducir la cantidad de inóculo de patógenos que causan pérdidas económicas importantes. Sin embargo, a nivel de producción, no parecen tener un efecto inhibitorio evidente sobre el inóculo en el rastrojo. Por alguna razón el “ambiente” no le está permitiendo al agente controlador alcanzar los niveles poblacionales necesarios para controlar al patógeno y por tal motivo este continúa siendo un problema para el cultivo.

1.3.4. Un nuevo enfoque para levantar las limitantes del control biológico

Los microorganismos requieren carbono como fuente de energía, y distintas fuentes de carbono pueden favorecer a unos microorganismos más que a otros (Bailey y Lazarovits, 2003). En este sentido, las plantas tienen un fuerte impacto en la composición y actividad de la comunidad microbiana del suelo y juegan un rol preponderante en la dinámica de los patógenos presentes en el suelo y en el rastrojo (Bailey y Lazarovits, 2003; Hoitink y Boehm, 1999). Abundante información demuestra la posibilidad de mejorar la acción de los antagonistas indígenas presentes en el suelo mediante el tipo, la cantidad y la frecuencia de nutrientes aportados a los antagonistas mediante la rotación de cultivos o el uso de abonos verdes (Pérez *et al.*, 2008; Bailey y Lazarovits, 2003; Hagn *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 2003;

Weller *et al.*, 2002; Lazarovits, 2001; Doran y Zeiss, 2000; Knudsen *et al.*, 1999; Bossio *et al.*, 1998).

Pérez *et al.* (2008) demostraron la posibilidad de incrementar las poblaciones bacterianas del suelo, específicamente especies de streptomycetes, y así reducir las unidades infectivas de *Fusarium graminearum*, mediante la incorporación al suelo de distintos abonos verdes. Los resultados encontrados muestran que la utilización de abonos verdes (en este caso sorgo-sudangrass y trigo sarraceno), aumentó la densidad poblacional de las bacterias totales del suelo, incluso antes de la incorporación de los mismos. El aumento de la densidad bacteriana total, estuvo asociado a un incremento en la densidad streptomycetes antagonistas, y dentro de ellos los que presentaban mayor intensidad de antagonismo. Estos microorganismos, antibiótico-resistentes y con habilidad de producir antibióticos se ven favorecidos en ambientes de alta competencia (dada por el aumento en la disponibilidad de nutrientes). No obstante esto, es claro que el sistema de producción agrícola de Uruguay está fuertemente asociado a la siembra sin laboreo, por lo cual la incorporación de abonos verdes y de los rastrojos de los cultivos al suelo no tiene cabida, debido a la imposibilidad de laborear el mismo. Por esta razón, en sistemas sin laboreo, el manejo de las poblaciones indígenas de microorganismos benéficos debe ser gestionado sin roturar el suelo.

Si bien la rotación de cultivos es una de las medidas de manejo de enfermedades más antiguas, recientemente se le ha dado un nuevo enfoque a la misma. Históricamente esta medida de manejo fue enfocada a la siembra de cultivos no susceptibles pensando en que los patógenos que sobreviven en el rastrojo y en el suelo se mueran por inanición ante la falta del sustrato (cultivo en cuestión). Sin embargo, un enfoque más reciente apunta a la rotación de cultivos tendientes a incrementar las poblaciones de organismos benéficos que pueden tener un efecto antagónico sobre los patógenos en cuestión (Weller *et al.*, 2002; Vilich y Sikora, 1998). Así, varios estudios han demostrado que la secuencia de cultivos tiene un efecto significativo sobre la composición de la comunidad microbiana del suelo y que la elección de los cultivos a sembrar puede contribuir a incrementar la población de microorganismos antagonistas que reducen las poblaciones de patógenos tanto en el rastrojo como en el suelo (Pérez *et al.*, 2008; Peters *et al.*, 2003; Mazzola, 2001; Bossio *et al.*, 1998). Esto se debe a que las poblaciones microbianas nativas que normalmente se encuentran en niveles

poblacionales bajos, pueden incrementar su densidad poblacional como respuesta a un aumento en su capacidad competitiva en presencia de determinados cultivos (Bailey y Lazarovits, 2003; Luz *et al.*, 2003; Hoitink y Boehm, 1999), obteniéndose un incremento poblacional selectivo a favor de ciertos antagonistas.

Vargas Gil *et al.* (2008) mostraron un efecto significativo de los cultivos sobre la población de microorganismos benéficos en el suelo: actinomicetes, *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp. Estos microorganismos fueron encontrados en mayor cantidad en ambientes bajo siembra directa y cuando el maíz era el cultivo antecesor al muestreo. Observándose en esos ambientes los niveles más bajos de enfermedades en maní (tizón del maní causado por *Sclerotinia minor* y la pudrición de raíz por *Fusarium solani*). Mostrando esto, una clara asociación entre el incremento de la población de antagonistas mediante la rotación de cultivos y la reducción del nivel de enfermedad en ese patosistema. Teniendo en cuenta que la problemática sanitaria la genera principalmente el inóculo en los rastrojos que quedan en la superficie del suelo, se debería fomentar aquellos microorganismos que aún siendo residentes del suelo, presenten capacidad de trasladarse y colonizar al rastrojo que está en superficie.

1.4. TRICHODERMA COMO AGENTE DE BIOCONTROL

Hay un diverso grupo de hongos residentes naturales del suelo que mediante la diseminación de esporas y el crecimiento micelial pueden colonizar al rastrojo y antagonizar al patógeno allí presente. *Trichoderma* es un hongo que normalmente habita los suelos y rastrojos no sólo de Uruguay sino del mundo. El potencial de las especies del género *Trichoderma* como agentes de biocontrol de enfermedades fue reconocido ya en la década de 1930 (Howell, 2003). Desde allí, se ha comprobado sus efectos antagónicos frente a especies de *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Armillaria*, *Colletotrichum*, *Verticillium*, *Venturia*, *Endothia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizopus*, *Diaporthe* y *Fusicladium* (entre otros) (Howell, 2003; Wells, 1988). Además, ha mostrado ser muy eficiente en el biocontrol de *Gibberella zeae* (Cabrera, 2009). Su gran capacidad como antagonista ha estado asociada básicamente a tres mecanismos: competición, liberación de antibióticos y micoparasitismo (Tronsmo y Hjeljord, 1998). El ser un microorganismo cosmopolita y ubicuo, el contar con distintos mecanismos de acción que le permiten tener un efecto antagónico ante un amplio

rango de patógenos, han ubicado a *Trichoderma* en la mira de quienes buscan agentes biocontroladores para la agricultura.

Las poblaciones de *Trichoderma* spp. han mostrado tener una gran respuesta a la secuencia de cultivos, como ha sido documentado por Hagn *et al.* (2003), Bulluck *et al.* (2002), Causin *et al.* (1995), y Lipps y Deep (1991). A su vez, los sistemas en siembra directa contribuyen a incrementar las poblaciones fúngicas del suelo. En este sentido, Beare *et al.* (1993) encontró que las poblaciones fúngicas del suelo fueron más abundantes en sistemas sin laboreo, donde *Trichoderma* estuvo entre los grupos taxonómicos predominantes en dichos suelos. Resultados similares fueron encontrados por Vargas Gil *et al.* (2008) donde una mayor población de *Trichoderma* spp. fue encontrada en sistemas sin laboreo y luego del cultivo de maíz en comparación con soja y maní. Esto concuerda con lo expresado por Gao *et al.* (2007) quienes encontraron mayor densidad poblacional y actividad de *Trichoderma* favorecidas por la presencia de sustratos con mayor relación carbono/nitrógeno (relaciones de 80/1). Estos resultados indican dos puntos fundamentales, en primer lugar, el microambiente generado por los sistemas sin laboreo favorece la densidad poblacional de *Trichoderma* en comparación a sistemas con laboreo convencional, y en segundo lugar el cultivo instalado en el suelo en cuestión tiene un efecto significativo sobre la densidad poblacional de este hongo.

1.5. PLANTEO DE LA PROPUESTA

En esta línea, varios grupos de investigación han comenzado a trabajar en el manejo de las poblaciones microbianas del suelo mediante distintas medidas de manejo como tipo de laboreo, siembra de distintas especies vegetales, fertilizaciones, entre otras, de modo de obtener un incremento paulatino de la densidad poblacional de los organismos benéficos que sea como resultado de un microambiente más hospitalario y que ejerza una presión de selección a favor de los antagonistas. Este enfoque ha permitido obtener resultados más consistentes y duraderos en relación al manejo tradicional de las inoculaciones (Berg *et al.*, 2005; Wiggins y Kinkel, 2005; Mazzola *et al.*, 2001).

Una de las limitantes que han encontrado los sucesivos intentos de control biológico mediante inoculaciones es que el agente de biocontrol inoculado no siempre encuentra un microambiente favorable para su proliferación, resultando en efectos efímeros. Desde una perspectiva ecológica, aún cuando se realicen inoculaciones con cepas microbianas nativas

del sitio donde se está utilizando, las poblaciones del agente inoculado se enfrentan a ambientes hostiles que naturalmente evitaron su presencia en altas densidades (Garret, 1970). La premisa para encarar este trabajo es que la efectividad del antagonismo queda definida no solo por la capacidad del antagonista para inhibir al patógeno, sino que también por un microambiente que le permita mantener su densidad poblacional a un nivel donde pueda ejercer su actividad como antagonista y lograr así una reducción significativa y consistente de la presión de inóculo de los patógenos. Por lo tanto, identificar los ambientes de producción que favorecen la proliferación y el establecimiento de *Trichoderma* spp., sería una buena estrategia para aumentar la efectividad del antagonismo de sus poblaciones nativas y la consistencia de las inoculaciones a nivel de campo.

Actualmente existe muy escaso conocimiento acerca de la capacidad antagónica de las distintas especies de *Trichoderma* que están presentes en los sistemas agrícolas. Así, la identificación de las especies colectadas y la evaluación de la capacidad antagónica de los distintos aislamientos de *Trichoderma* obtenidos, permitirá tener una primera aproximación acerca de su potencial antagónico, así como determinar la frecuencia de las distintas especies encontradas.

No existen antecedentes nacionales sobre el manejo de las poblaciones indígenas de *Trichoderma* en busca de reducir los niveles poblacionales de los distintos patógenos que afectan la agricultura uruguaya. Por tal motivo, el presente trabajo plantea estudiar la dinámica de las poblaciones nativas de *Trichoderma* spp. en sistemas agrícolas de Uruguay. Para esto se cuenta con un experimento instalado en el año 1999 en la Estación Experimental Mario A. Cassinoni, donde se están evaluando cuatro secuencias de cultivos en siembra directa continua. Tanto el diseño experimental como la antigüedad del experimento, permitirán una evaluación no sólo del impacto de la secuencia, sino también del impacto de cada cultivo sobre la población de *Trichoderma* en el suelo y en el rastrojo.

2. Caracterización de la capacidad antagónica de la población nativa de *Trichoderma* spp. en sistemas agrícolas¹

Villar Andrés¹, Vero Silvana², Pereyra Silvia³, Altier Nora³, De Lucas Florencia¹, Pérez Carlos¹

¹Estación Experimental Mario A. Cassinoni. Facultad de Agronomía-UdelaR

²Facultad de Química-UdelaR

³Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Dirección Postal: EEMAC, Ruta 3, km 363, Paysandú. CP. 60000

Correo electrónico: hvillar@fagro.edu.uy

¹ Este capítulo fue realizado siguiendo las instrucciones de la revista *Agrociencia Uruguay*

2.1. Resumen

En la última década la agricultura en Uruguay ha transitado un proceso de fuertes cambios que han derivado en un aumento de problemas sanitarios causados por patógenos necrótrofos. Por otro lado, se ha demostrado la posibilidad de reducir las enfermedades causadas por estos patógenos mediante el manejo de microorganismos benéficos. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antagónica de la población nativa de *Trichoderma* frente a *Drechslera tritici-repentis* y *Bipolaris sorokiniana*, y determinar la densidad relativa de distintos grupos taxonómicos de *Trichoderma* en suelo y rastrojo. Para esto, se obtuvo una colección de cepas nativas de *Trichoderma* de un experimento con distintas rotaciones de cultivos agrícolas en siembra directa. Las cepas fueron identificadas mediante el análisis filogenético basado en la región del ITS (espaciador transcrito interno) del ADN ribosomal. La capacidad antagónica de *Trichoderma* fue determinada mediante cultivos duales, las pruebas de compuestos volátiles y compuestos difusibles. Los resultados muestran que fueron identificados once grupos taxonómicos de *Trichoderma*. Donde, tanto en el suelo como en el rastrojo, hubo un claro predominio de los grupos “*T. harzianum*” y “Rufa A” en el suelo y rastrojo. Por otra parte, todas las cepas lograron altos niveles de inhibición de *B. sorokiniana* y *D. tritici-repentis*, mostrando diferencias inter-específicas e intra-específicas. Estos resultados confirman la presencia de antagonistas de *B. sorokiniana* y *D. tritici-repentis* en sistemas agrícolas, y que probablemente mediante el logro de elevadas poblaciones de esos antagonistas se podría disminuir el inóculo de estos patógenos en los rastrojos.

Palabras claves: antagonismo, control biológico, *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera tritici-repentis*

2.2. Summary

Over the last decade the agriculture in Uruguay had several changes that have led to an increase in diseases caused by necrotrophic pathogens. On the other hand, the deployment of beneficial microorganisms has demonstrated to be useful to reduce diseases caused by these pathogens. The aim of this study was to evaluate the antagonistic capacity of the native population of *Trichoderma* against *Drechslera tritici-repentis* and *Bipolaris sorokiniana*, and to determine the relative density of different taxonomic groups of *Trichoderma*. This study was based on a collection of native strains of *Trichoderma* obtained from an experiment with different crop rotations under no-till system. The strains were identified by phylogenetic analysis based on the ITS (Internal Transcribed Spacer) region of the ribosomal DNA. The antagonistic capacity was determined by dual culture, volatile and diffusible compounds. Eleven *Trichoderma* taxa were identified. There was a clear predominance of strains identified as "*T. harzianum*" and "Rufa A". Interestingly, all strains achieved high levels of inhibition of *B. sorokiniana* and *D. tritici-repentis*, showing inter-specific and intra-specific differences. These results confirm the presence of antagonists of *B. sorokiniana* and *D. tritici-repentis* in agricultural systems, with high potential to reduce the inoculum density of these pathogens surviving on crop debris.

Key words: antagonism, biological control, *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera tritici-repentis*

2.3. Introducción

La agricultura extensiva ha crecido aceleradamente en la última década en Uruguay (DIEA, 2012; DIEA, 2011; DIEA, 2008; DIEA, 2001). En ese período se ha dado un proceso de cambios en su estructura de producción que ha derivado en un aumento de los daños causados por patógenos rastrojo dependientes. Esto ha resultado en un fuerte incremento en la utilización de fungicidas, con el concomitante impacto económico y ambiental que eso genera (Pérez *et al.*, 2011).

En estos nuevos sistemas agrícolas, algunas medidas de manejo de gran impacto sobre patógenos necrótrofos como por ejemplo la rotación de cultivos, está condicionada tanto por la coyuntura actual de mercado, como por el reducido menú de cultivos y el amplio rango de huéspedes de algunos patógenos (Pérez *et al.*, 2011; Pereyra *et al.*, 2005). En este contexto, el control biológico mediante el uso de microorganismos benéficos, es una herramienta que puede contribuir en el manejo integrado de estas enfermedades.

En este sentido, especies del género *Trichoderma* han sido vastamente mencionadas por la literatura por su capacidad antagónica frente a un variado grupo de patógenos causales de epifitas de importancia económica a nivel mundial (Cabrera, 2009; Perelló *et al.*, 2009; Perelló *et al.*, 2008; Salehpour *et al.*, 2005). *Trichoderma* es un hongo ubicuo que habita tanto en los suelos, como en los rastrojos de sistemas agrícolas (Pereyra *et al.*, 2012; Vargas Gil *et al.*, 2008). Se ha demostrado que distintas estrategias tendientes a generar ambientes que favorezcan elevada densidad poblacional de *Trichoderma* pueden lograr un efecto inhibitorio sobre los patógenos. Fernandez (1992a) inoculando rastrojos de trigo con *Trichoderma* logró reducciones significativas del inóculo de *Gibberella zeae* y *Cochliobolus sativus*. A su vez, Fernandez (1992b) obtuvo reducciones de la unidades infectivas de *Gibberella zeae*,

Glomerella glycines y *Macrophomina phaseolina* por la aplicación de *Trichoderma* en el rastreo de soja. Resultados similares fueron demostrados por Pereyra *et al.* (2005) realizando aplicaciones de *Trichoderma* sobre rastreo de trigo colonizado por *Gibberella zeae*, y determinaron una reducción en la cantidad de inóculo producido por el patógeno sobre el rastreo inoculado. Sin embargo, estos efectos fueron efímeros, debido probablemente a que las cepas evaluadas no fueron aisladas del patosistema en el cual se introdujeron, sino que fueron utilizadas cepas de *Trichoderma harzianum* comercialmente disponibles.

Varias razones explican la falta de consistencia de estos resultados, pero la principal razón ha sido atribuida a la falta de adaptabilidad de los agentes de biocontrol al “nuevo” ambiente donde se los quiere introducir (Hoitink y Boehm, 1999). Así, un nuevo enfoque apunta al manejo de la población de los antagonistas nativos. En esta línea, Cabrera (2009) encontró varias cepas de *Trichoderma* con capacidad de reducir la presión de inóculo de *Gibberella zeae* colonizando naturalmente rastreos de cultivos de trigo provenientes de la región agrícola de Uruguay, demostrando la potencialidad de ese género.

Por otra parte, dentro del género *Trichoderma* spp. pueden existir sustanciales diferencias en la capacidad de inhibir a los patógenos. Se han constatado diferencias significativas entre diferentes especies de *Trichoderma*, así como también diferencias entre cepas de la misma especie frente a un patógeno (Perelló *et al.*, 2003; Cabrera, 2009). Asimismo, una cepa de *Trichoderma* puede tener una capacidad antagónica muy específica, inhibiendo eficientemente a un patógeno y no a otro (Howell, 2003; Dennis y Webster, 1971).

Actualmente existe información limitada acerca de las distintas especies de *Trichoderma* que están presentes en los sistemas agrícolas de Uruguay (Cabrera, 2009). Por tal motivo, el

objetivo de este trabajo fue determinar la densidad relativa de los distintos grupos taxonómicos de *Trichoderma* presentes en el suelo y en el rastrojo de cultivos agrícolas. Así como evaluar la capacidad antagónica de la población nativa de *Trichoderma* frente a *Drechslera tritici-repentis* y *Bipolaris sorokiniana*.

2.4. Materiales y métodos

2.4.1. Colección de Trichoderma en estudio

El estudio se basó en una colección de cepas nativas de *Trichoderma* obtenidas de un experimento que contiene distintas rotaciones de cultivos sembrados sin laboreo, establecido en 1999 en la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC), Paysandú, Uruguay. Dicho experimento representa cuatro rotaciones comúnmente utilizadas a nivel de producción: i) Secuencia 1- trigo-soja-trigo-soja..., ii) Secuencia 2- trigo-soja-cebada-girasol-trigo..., iii) Secuencia 3- trigo-soja-cebada-sorgo-avena-maíz-trigo..., iv) Secuencia 4- trigo-soja-cebada-girasol-avena con lotus-lotus-trigo...El diseño experimental es en bloques completos con parcelas al azar con tres repeticiones. Las parcelas son de 10 m de ancho por 30 m de largo, con 3 m de separación entre parcelas y 10 m entre bloques. Los cultivos son manejados como cultivos comerciales, con densidad de siembra, fertilización, y manejo de plagas de acuerdo a lo requerido por cada cultivo. No se aplica ningún fungicida en el experimento, de modo que las poblaciones microbianas sean alteradas únicamente por la secuencia de cultivos.

Las cepas de *Trichoderma* fueron obtenidas de rastrojos y suelo provenientes de distintas rotaciones del experimento, y aisladas de muestras colectadas en la primavera 2009 y otoño 2010. Las cepas de *Trichoderma* spp. fueron originalmente aisladas siguiendo el método

propuesto por Vargas Gil *et al.* (2009) con modificaciones. Brevemente, se tomó una submuestra de 10 g de rastrojo y de suelo, y se diluyó en 150 ml y 100 ml de suero fisiológico estéril en Erlenmeyer, respectivamente. Luego se agitó durante 30 minutos a 200 rpm en un agitador orbital (Felisa^R, Guadalajara). Posteriormente se tomó una alícuota de 1 ml de dicha suspensión, y se realizó una dilución seriada en 9 ml de suero fisiológico estéril, para lograr diluciones de 1/10 y 1/100. Una alícuota de 300 µl de cada dilución se sembró en placas con medio selectivo para *Trichoderma* (Williams *et al.*, 2003). Se sembraron cuatro placas por dilución. Estas fueron incubadas a 25 °C en oscuridad, y luego de seis días se identificaron las colonias de *Trichoderma* spp. en las placas de Petri, las cuales fueron repicadas individualmente a nuevas placas.

Para lograr captar la mayor variabilidad genética de la población de *Trichoderma* se realizó un proceso de caracterización morfológica que comenzó al momento de la identificación de las colonias creciendo en el medio de cultivo selectivo para *Trichoderma*. Allí, se agruparon y cuantificaron las colonias por similitud morfológica, y de cada grupo se tomó al azar una colonia mediante el repicado de puntas de hifa de modo de asegurar la presencia única del genotipo de la colonia repicada. Cada una de estas cepas fue transferida a placas de Petri conteniendo medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar, Oxoid), generando así cultivos puros de todas ellas. Estos fueron crecidos en incubadora a 25 °C, y a los siete días fueron nuevamente agrupados por similitud morfológica. Luego, se seleccionaron cepas representativas de los distintos grupos para su posterior análisis genético.

2.4.2. Identificación molecular de *Trichoderma*

Con las cepas seleccionadas en la etapa anterior se realizó un proceso de identificación molecular mediante la amplificación y secuenciación de la región del ITS (espaciador

transcrito interno, por sus siglas en inglés) del ADN ribosomal (ITS1-ITS2). Para obtener las secuencias se extrajo ADN genómico de todas las cepas. Desde el ADN extraído se amplificó la región intergénica entre la subunidad 28S y 18S del ADNr (ITS1- subunidad 5.8S-ITS2). Las secuencias de este operon fueron alineadas con secuencias de las especies de *Trichoderma* disponibles en diferentes bancos de datos y analizadas filogenéticamente.

Para la extracción del ADN las cepas de *Trichoderma* fueron sembradas en medio de cultivo. PDA e incubadas durante 5 días a 25 °C. En ese momento fue extraído el micelio con un bisturí estéril y trasladado a tubos de Eppendorf de 1,5 mL. Estos tubos conteniendo bolillas de vidrio y tierra de Diatamaceous fueron puestos en vortex por 30 segundos. Una vez rotas las paredes de las células se utilizó el método CTAB para la extracción del ADN (Murray y Thompson, 1980).

La amplificación de la región del ITS del ADN ribosomal se realizó siguiendo el protocolo descrito por Kubicek *et al.* (2003). El PCR fue realizado en 25 µL de volumen total, utilizando 0,5 µL de cada primer ITS1 e ITS4 10 µM (sintetizados por Eurofins MWG Operon), 0,10 µL de Taq polimerasa 0,5 U (Fermentas), 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM (Fermentas), 2,5 µL de cada solución de dNTP 2,0 mM (Fermentas), 2,5 µL de buffer de amplificación (Fermentas), y 1,0 µL de ADN (de aproximadamente 100 ng). La mezcla de reacción fue sometida a 5 minutos de desnaturalización a 95 °C, seguida de 35 ciclos de 1,5 minutos de desnaturalización a 95 °C, 2 minutos de hibridación a 55 °C, 2 minutos de extensión a 72 °C, para finalizar con una extensión de 10 minutos a 72 °C. Los productos de PCR se analizaron en gel de agarosa al 1,0 % obteniéndose un amplicon de aproximadamente 600 pares de bases.

Los productos de la amplificación fueron secuenciados por Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Una vez obtenidas las secuencias, se compararon con las bases de datos GenBank (NCBI),

utilizando el programa BLAST y con la base de datos del ISTH utilizando TrichoBLAST (www.isth.info/tools/blast/ verificado el 31/7/13) (Kopchinskiy *et al.*, 2005). Las especies con mayor similitud a las cepas nativas fueron incluidas en el análisis filogenético junto con otras publicadas por Druzhinina *et al.* (2005). El alineamiento de las secuencias fue realizado on-line utilizando la estrategia E-INS-i en el programa MAFFT versión 6 (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/online/server/>, verificado el 31/7/2013) (Kato *et al.*, 2005).

El análisis filogenético fue realizado en dos etapas. En primera instancia se realizó el análisis usando dos especies de referencia por grupo taxonómico (Clade/Sección) de *Trichoderma*. Luego de obtenidos los grupos taxonómicos en los cuales quedaron incluidas las cepas, se realizó el análisis filogenético para cada grupo por separado. Para esta etapa fueron agregadas además secuencias de especies de las bases de datos GenBank (NCBI) e ISTH que no se encontraban en el trabajo de Druzhinina *et al.* (2005) (Anexo 1).

El análisis filogenético se realizó usando PAUP Versión 4.0b10 para los análisis neighbor-joining (NJ) y máxima parsimonia (MP) (Swofford, 2002). El mejor modelo para el análisis NJ fue determinado en Modeltest versión 3.7 (Posada y Crandall, 1998) donde el modelo GTR+I+G fue seleccionado en base al criterio de información Akaike (AIC, por sus siglas en inglés). Los espacios vacíos generados en el alineamiento fueron considerados datos perdidos y todos los caracteres fueron tratados como desordenados y de igual peso. Cuando fueron encontrados ligaduras se rompieron al azar. El análisis de MP fue realizado usando la opción de búsqueda heurística con adición simple de taxones, y la bisección y reconexión de árboles (TBR, por su sigla en inglés) como el algoritmo de intercambio de rama. Los niveles de confianza de los nodos de las ramas de los árboles fueron determinados por análisis de 1000 réplicas "bootstrap" (Hillis y Bull, 1993)

2.4.3. Caracterización de la capacidad antagónica de *Trichoderma*

Se evaluó la capacidad antagónica de las distintas cepas de *Trichoderma* frente a dos de los principales patógenos de cultivos agrícolas en Uruguay, *Drechslera tritici repentis* y *Bipolaris sorokiniana*. Se utilizó una cepa de cada patógeno, la DTR 60 de *Drechslera tritici repentis* y B5.01.008 de *Bipolaris sorokiniana*, ambas pertenecientes a la colección del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) La Estanzuela. Ambas cepas están caracterizadas como muy agresivas por su capacidad de producir enfermedad.

La capacidad de inhibir el crecimiento de los patógenos de las distintas cepas de *Trichoderma* se evaluó mediante tres métodos: i) cultivos duales ii) prueba de compuestos volátiles, iii) prueba de compuestos difusibles.

Fueron evaluadas 23 cepas de *Trichoderma* frente a ambos patógenos. Para evaluar las diferencias inter e intra-específicas se tomaron al azar más de una cepa de las especies/grupos de mayor predominio. Siendo mayor el número de cepas en función de la frecuencia de cada especie y del grado de resolución de los grupos formados en el análisis filogenético. Se evaluó solo una cepa de las especies menos predominantes.

En la prueba de cultivos duales se colocaron sobre una placa de PDA (Potato dextrose agar) un disco de micelio del patógeno y un disco de micelio de *Trichoderma*, a 4,5 cm de distancia entre ambos y equidistantes del borde de la placa. Ambos discos fueron de 5 mm de diámetro y provenían de cultivos de 48 horas de crecimiento a 25 °C en PDA. Como testigo se colocó en una placa un disco de cada patógeno creciendo sólo. Las placas se incubaron a 25 °C y se midió el radio de las colonias de los patógenos a los 10 días para comparar el crecimiento

de los mismos en el cultivo dual respecto a la placa control. En esta prueba fueron realizadas cinco repeticiones de cada tratamiento frente a ambos patógenos.

La prueba de evaluación de compuestos volátiles antifúngicos fue realizada en base a lo descrito por Cabrera (2009). Se sembró un disco de 5 mm con el patógeno en el centro de una placa de Petri conteniendo medio de cultivo PDA, y un disco de micelio con *Trichoderma* en otra placa también con igual medio de cultivo. Tanto la cepa de *Trichoderma* como la del patógeno provenían de cultivos de 48 horas de crecimiento. Las placas sin sus tapas, fueron enfrentadas, selladas con film e incubadas a 25 °C. La mitad conteniendo al patógeno fue situada arriba de modo de evitar que las esporas de *Trichoderma* (de fácil dispersión) cayeran sobre la placa del patógeno. Una placa con medio de cultivo PDA sobre otra sola con el patógeno se sembró como testigo. A los tres, seis y 10 días se determinó el radio de las colonias del patógeno en cuestión. Fueron realizadas tres repeticiones para cada tratamiento.

La prueba de compuestos difusibles antifúngicos solubles fue llevada a cabo según la metodología de Agrawal *et al.* (1977), con modificaciones descrita por Cabrera (2009). Las distintas cepas de *Trichoderma* fueron sembradas en matraces conteniendo 50 ml de medio YES (extracto de levadura 2,0 %, sacarosa 15 %). Estas fueron incubadas siete días a 25 °C, sin agitación. Al final de este lapso el sobrenadante del cultivo fue filtrado con filtros con poros de 0,45 µm (Millipore®), para obtener un filtrado libre de unidades formadoras de colonias de *Trichoderma*. El mismo fue incorporado a igual volumen de PDA con doble concentración de agar y fue vertido en placas de Petri. Sobre estas placas se sembró luego un disco de micelio de 5 mm de diámetro del patógeno y se incubó a 25 °C. Como testigo se realizaron placas incorporando igual volumen de medio YES pero sin inocular con *Trichoderma*. A los siete días

se midió el diámetro de las colonias de los patógenos. La inhibición se expresó como el porcentaje de reducción del crecimiento de las colonias en las placas conteniendo los diferentes filtrados, con respecto a los tratamientos sin los filtrados de *Trichoderma*. Se realizaron tres repeticiones de los tratamientos para cada uno de los patógenos.

El diseño experimental de las tres pruebas fue en bloques completos al azar donde el bloque fue determinado por la ubicación de las placas en la incubadora. Los tratamientos están representados por las cepas de *Trichoderma*, incluyendo el tratamiento testigo sin la presencia del mismo. La capacidad antagónica de *Trichoderma* fue expresada como el porcentaje de reducción de la colonia del patógeno con respecto al testigo sin *Trichoderma*.

2.4.4. Análisis estadístico

El análisis de la varianza se realizó utilizando el paquete estadístico Infostat versión 2011 (Di Rienzo *et al.*, 2011). Cuando el análisis permitió rechazar la hipótesis nula, se procedió a la separación de medias por Tukey ($P < 0.05$). La regresión lineal entre dos variables fue estimada por medio del método de estimación de Mínimos cuadrados.

2.5. Resultados

2.5.1. Colección de *Trichoderma* en estudio

Fueron aisladas 570 cepas de la población de *Trichoderma* habitando los rastrojos, y 462 de los suelos bajo estudio. A partir de ellas, se formaron 33 y 26 grupos por similitud morfológica de las cepas aisladas de rastrojo y suelo, respectivamente.

2.5.2. Identificación de *Trichoderma*

Las 59 cepas nativas analizadas (33 de rastrojo y 26 de suelo, Cuadro 1) pertenecieron a cinco grandes grupos (Clades/Secciones) de *Trichoderma*. La alineación de las cepas en estudio con las de referencia rindió un alineamiento de 700 caracteres totales, de los cuales 118 fueron constantes, 357 fueron parsimonia-no informativos, y 225 fueron parsimonia-informativos. Se obtuvieron 1000 árboles más parsimoniosos con largo de 1128, un CI=0,738, y RI=0,912 (Figura 1). El árbol obtenido por NJ presentó similar topología.

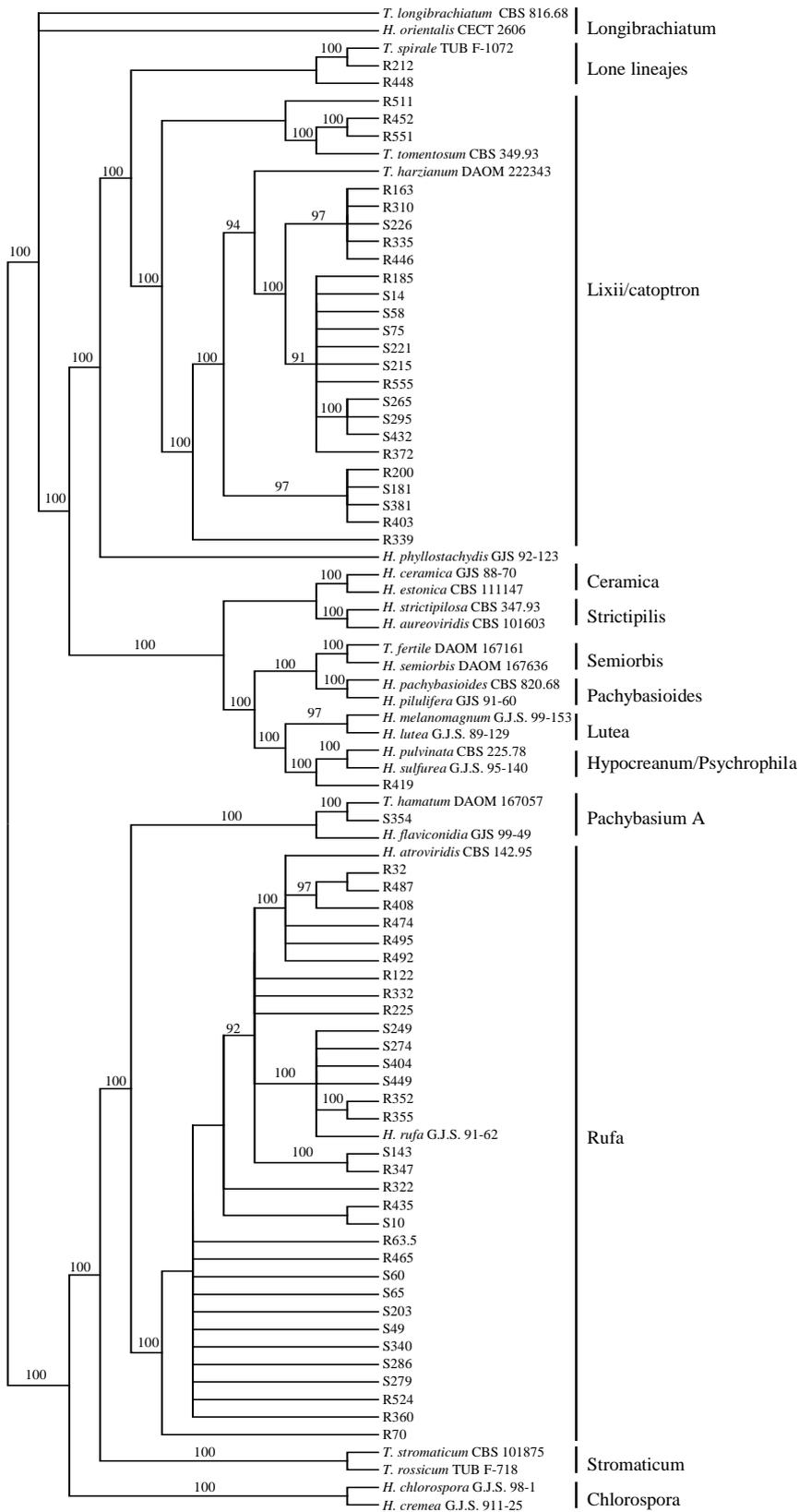


Figura 1: Uno de los 1000 árboles más parsimoniosos obtenidos por máxima parsimonia con todas las secuencias de las cepas en estudio y dos especies de referencia por Clade de *Trichoderma* basado en la región del ITS del ADN ribosomal. Los niveles de “bootstrap” de los nodos fueron determinados por análisis de 1000 replicas. Sólo se presentan los valores mayores a 75. A la derecha se indica el nombre de cada clade.

De las 59 cepas analizadas, 24 formaron parte de Lixii-Captoptron Clade, por lo cual se pobló dicho clade con las distintas especies que lo integran, para lograr mayor definición. En este caso, la alineación de las cepas con las de referencia resultó en un alineamiento de 557 caracteres totales, de los cuales 361 fueron constantes, 73 fueron parsimonia-no informativos, y 93 fueron parsimonia-informativos. Se obtuvieron cinco árboles más parsimoniosos con largo de 254, CI=0,795, y RI=0,826 (Figura 2). El árbol obtenido por NJ presentó similar topología. Dentro de este clade, 16 cepas formaron un grupo filogenéticamente más cercano a las cepas de referencia de *Trichoderma harzianum*, y tres se agruparon con *Trichoderma tomentosum*. Debido a la evidencia de diferencias robustas con las cepas de referencia, estas cepas fueron denominadas “*T. harzianum*” y “*T. tomentosum*”. Otras cinco cepas generaron un grupo genéticamente distinto al resto de las especies de referencia del Clade. Este fue denominado subgrupo “Lixii”.

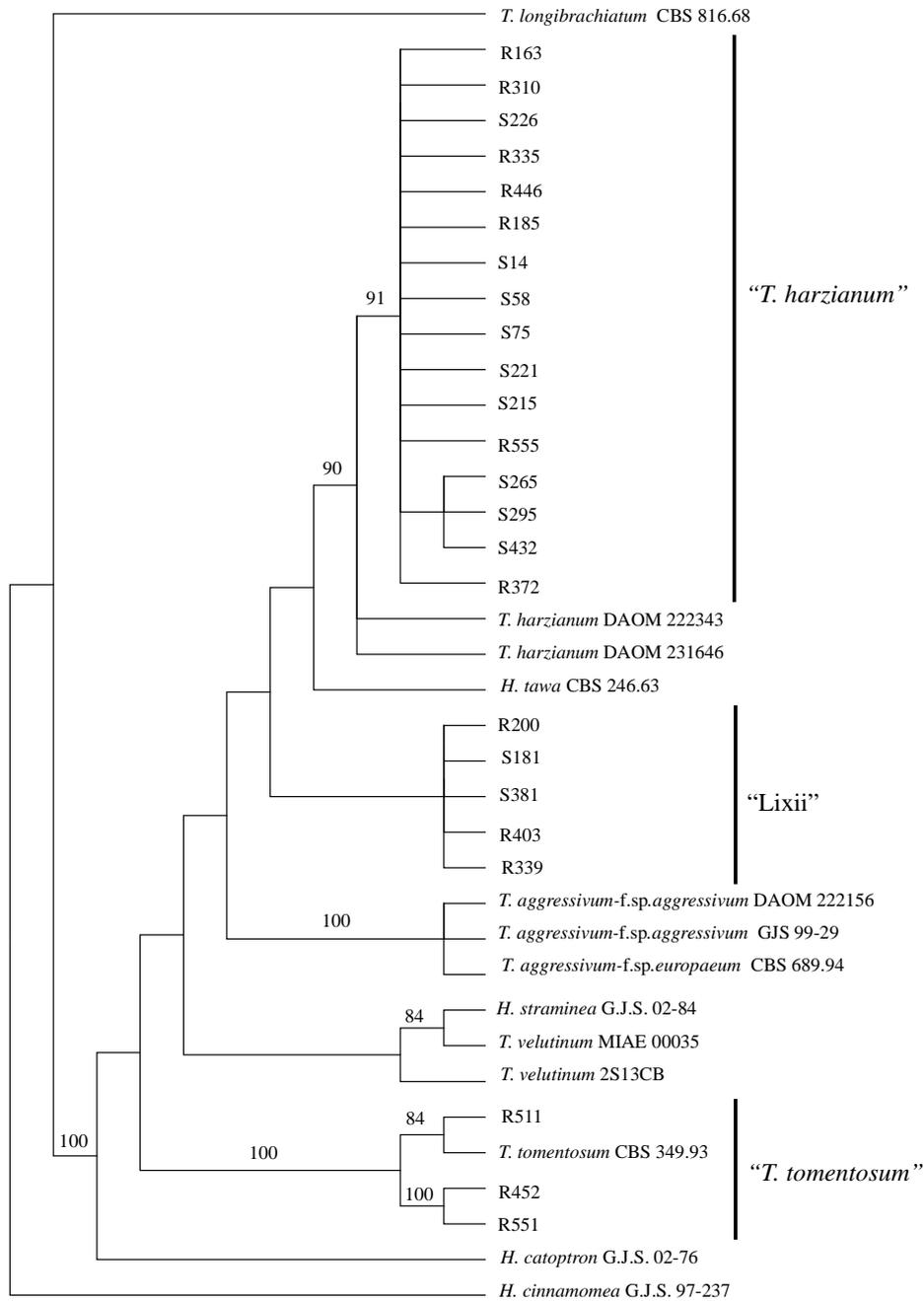


Figura 2: Uno de los cinco árboles más parsimoniosos obtenidos por máxima parsimonia con las secuencias de las cepas en estudio y especies de referencia del Clade Lixii de *Trichoderma* basado en la región del ITS del ADN ribosomal. Los niveles de confianza de los nodos de las ramas del árbol fueron determinados por análisis de 1000 replicas "bootstrap".

Trichoderma longibrachiatum fue utilizada como especie fuera del grupo. Sólo se presentan los valores mayores a 75.

Otras 31 cepas se agruparon en el Rufa Clade. La alineación de estas con las de referencia rindió un alineamiento de 540 caracteres totales, de los cuales 382 fueron constantes, 136 fueron parsimonia-no informativos, y 22 fueron parsimonia-informativos. Se obtuvieron 36 árboles más parsimoniosos con largo de 181, un CI=0,950, y RI=0,899 (Figura 3). El árbol obtenido por NJ presentó similar topología. Seis de las 31 cepas se encuentran en un subgrupo con las cepas de referencia de *Hypocrea atroviridis/Trichoderma atroviride*. Dentro de este, cuatro corresponden a *Hypocrea atroviridis*, mientras que la otras dos se diferenciaron de esta especie. A su vez, dos cepas agruparon con la cepa de referencia de *T. erinaceum*. Por otro lado, dentro del clade se formaron dos subgrupos de cepas nativas que no agruparon con ninguna de las cepas de referencia. Estos fueron identificados como subgrupo "Rufa A" y subgrupo "Rufa B", los cuales quedaron conformados por 14 y 9 cepas, respectivamente (Figura 3).

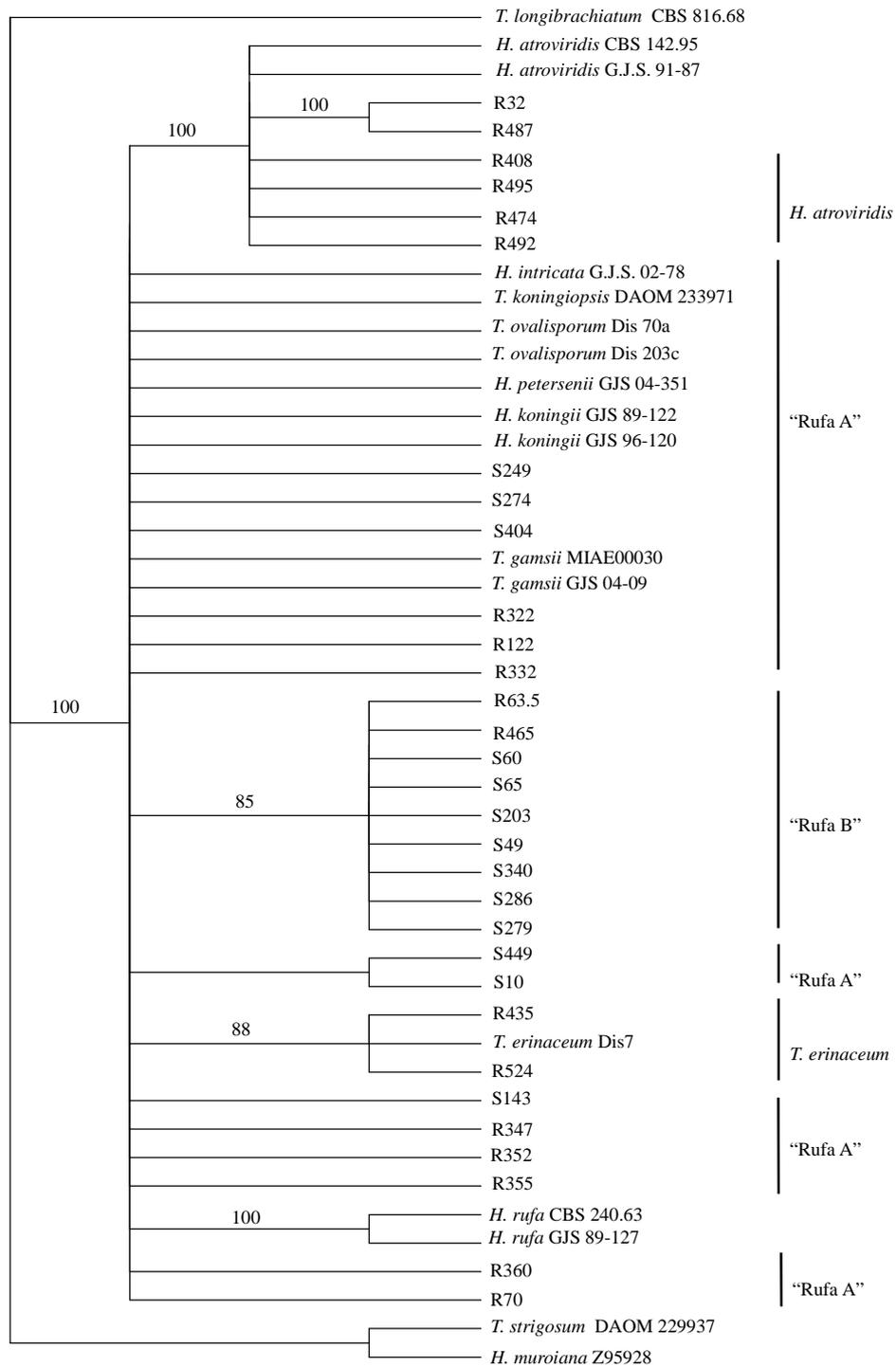


Figura 3: Uno de los 36 árboles más parsimoniosos obtenidos por máxima parsimonia con las cepas nativas y cepas de las especies de referencia del Clade Rufa de *Trichoderma* basado en la región del ITS del ADN ribosomal. Los niveles de confianza de los nodos de las ramas

del árbol fueron determinados por análisis de 1000 replicas "bootstrap". *T. longibrachiatum* fue utilizada como "outgroup". Sólo se presentan los valores mayores a 75.

Las cepas R212 y S448 pertenecieron al taxón Lone Lineajes. La alineación de estas con las de referencia rindió un alineamiento de 969 caracteres totales, de los cuales 319 fueron constantes, 79 fueron parsimonia-no informativos, y 571 fueron parsimonia-informativos. Se obtuvo 1 árbol más parsimonioso con largo de 1491, un CI=0,771, y RI=0,784 (Figura 4). R212 agrupó con las cepas de *Trichoderma spirale*, mientras que S448 lo hizo con *Hypocrea Phyllostachydis*. Ambas cepas agruparon con las cepas de *Trichoderma spirale*. La cepa S354 correspondió a la Sección *Pachybasium* y dentro de ésta a *Trichoderma hamatum* (Figura 5). La alineación de esta cepa con las de referencia rindió un alineamiento de 512 caracteres totales, de los cuales 373 fueron constantes, 88 fueron parsimonia-no informativos, y 51 fueron parsimonia-informativos. Se obtuvo 1 árbol más parsimonioso con largo de 186, un CI=0,855, y RI=0,735. El árbol obtenido por NJ presentó similar topología. Por último, la cepa R419 perteneció a *Trichoderma brevicompactum*, en el taxón Lutea Clade (Figura 6). Aquí, la alineación con las cepas de referencia rindió un alineamiento de 641 caracteres totales, de los cuales 430 fueron constantes, 153 fueron parsimonia-no informativos, y 58 fueron parsimonia-informativos. Se obtuvieron 2 árboles más parsimoniosos con largo de 277, CI=0,895, y RI=0,842. El árbol obtenido por NJ presentó similar topología.

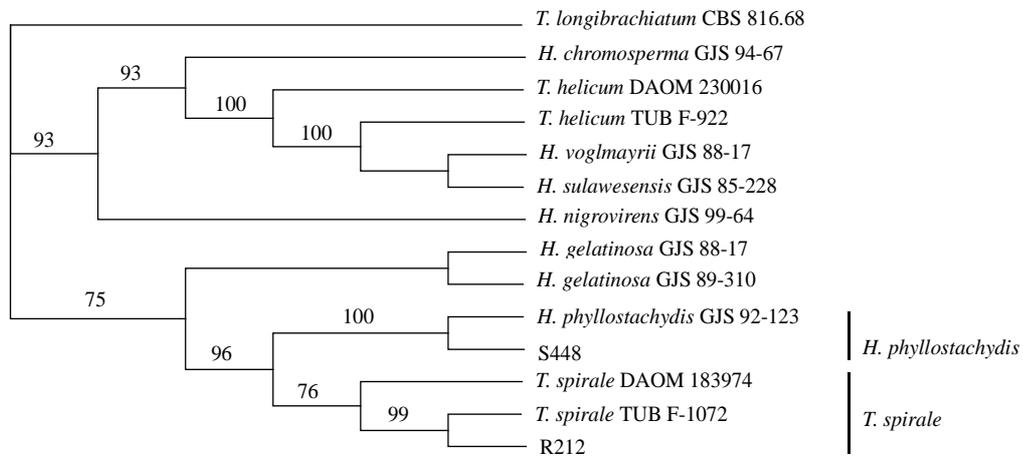


Figura 4: Árbol más parsimonioso obtenido por máxima parsimonia basado en la región del ITS del ADN ribosomal de cepas nativas y cepas de las especies de referencia del Clade Lone Lineajes de *Trichoderma*. Los niveles de confianza de los nodos de las ramas del árbol fueron determinados por análisis de 1000 replicas "bootstrap". *T. longibrachiatum* fue utilizada como "outgroup". Sólo se presentan los valores mayores a 75.

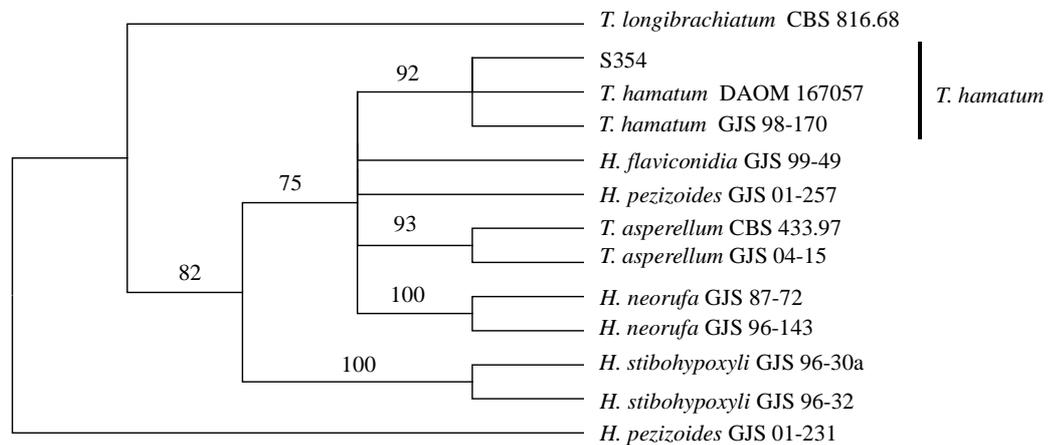


Figura 5: Árbol más parsimonioso obtenido por máxima parsimonia basado en la región del ITS del ADN ribosomal de cepas nativas y cepas de las especies de referencia del Clade Pachybasium A de *Trichoderma*. Los niveles de confianza de los nodos de las ramas del

árbol fueron determinados por análisis de 1000 replicas “bootstrap”. *T. longibrachiatum* fue utilizada como “outgroup”. Sólo se presentan los valores mayores a 75.

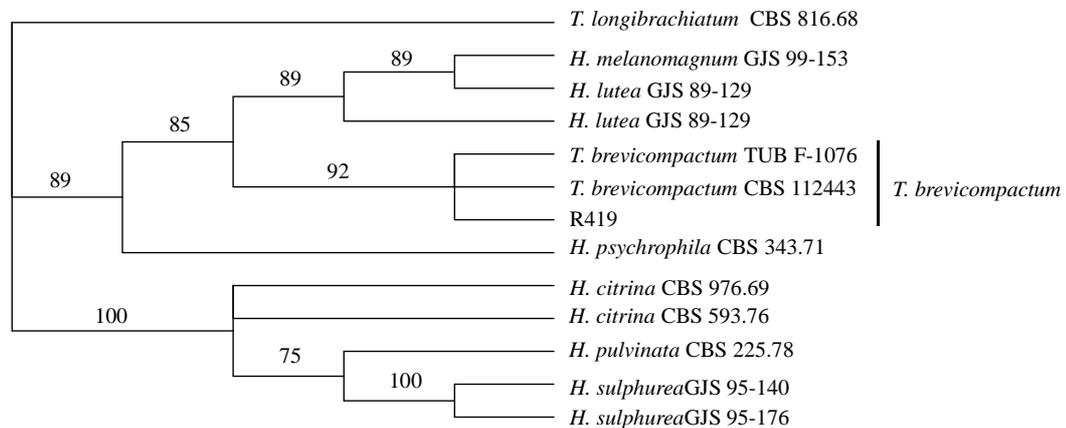


Figura 6: Uno de los dos árboles más parsimoniosos obtenidos por máxima parsimonia basado en la región del ITS del ADN ribosomal de cepas nativas y cepas de las especies de referencia del Clade Lutea e Hypocreaum y Psychrophila de *Trichoderma*. Los niveles de confianza de los nodos de las ramas del árbol fueron determinados por análisis de 1000 replicas “bootstrap”. *T. longibrachiatum* fue utilizada como “outgroup”. Sólo se presentan los valores mayores a 75.

“*T. harzianum*”, “Lixii”, “Rufa A” y “Rufa B” fueron encontrados en el suelo y en el rastrojo. *Trichoderma spirale*, *T. erinaceum*, *H. atroviridis* *T. brevicompactum* y “*T. tomentosum*”, fueron aisladas solo del rastrojo, mientras que *H. phyllostachydis* y *Trichoderma. hamatum* fue solo encontrada en suelo (Figura 7). “Rufa A” y “*T. harzianum*” fueron aisladas con mayor frecuencia del suelo y del rastrojo. Estas dos representaron 68 y 51 % de las cepas aisladas del rastrojo y del suelo respectivamente, siendo “Rufa A” la de mayor frecuencia. Tanto “Rufa B” como “Lixii” prevalecieron más en el suelo que en el rastrojo. De las especies que se aislaron del suelo y el rastrojo, *T. spirale* fue la de menor predominio. Las especies que se

encontraron solo en uno de los dos ambientes, representaron un bajo porcentaje del total de las colonias aisladas.

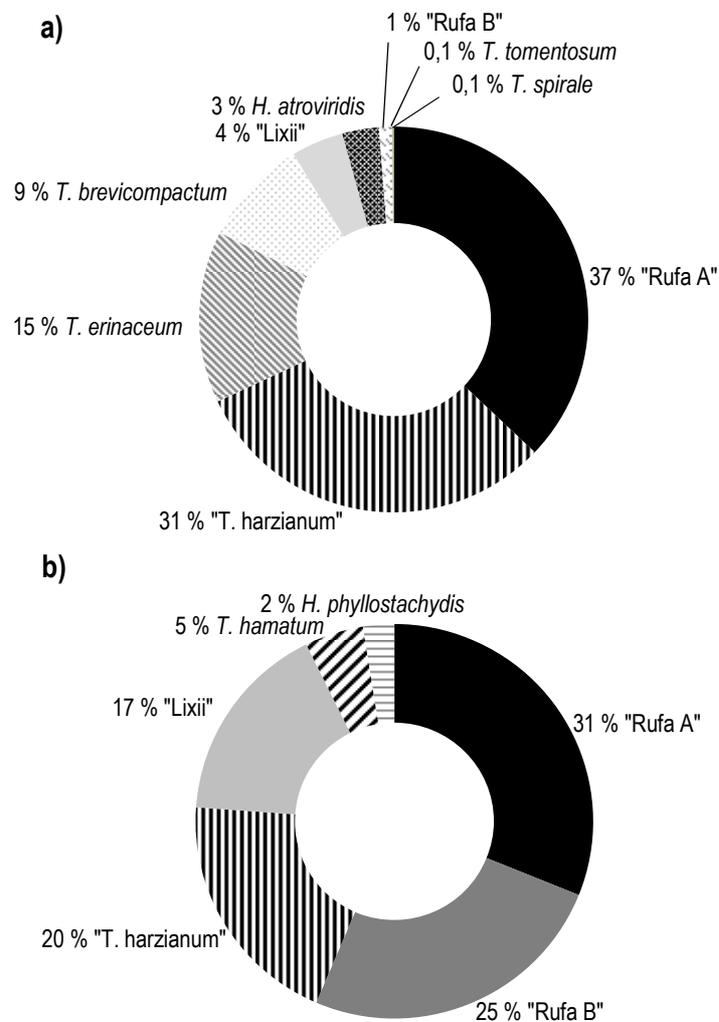


Figura 7: Frecuencia de recuperación de las especies de *Trichoderma* (expresadas como número de colonias de cada especie/total de colonias de *Trichoderma* cuantificadas en el medio de cultivo selectivo, expresado en porcentaje) en a) el rastrojo y b) en el suelo de las secuencias agrícolas

Cuadro 1: Identificación (ID) y sustrato de donde fueron recuperadas las cepas nativas ordenadas según grupo taxonómico de *Trichoderma*

ID	Sustrato	Grupo taxonómico	ID	Sustrato	Grupo taxonómico
R310	Rastrojo	" <i>T. harzianum</i> "	S10	Suelo	"Rufa A"
R185	Rastrojo	" <i>T. harzianum</i> "	S143	Suelo	"Rufa A"
R335	Rastrojo	" <i>T. harzianum</i> "	R352	Rastrojo	"Rufa A"
R446	Rastrojo	" <i>T. harzianum</i> "	R355	Rastrojo	"Rufa A"
R163	Rastrojo	" <i>T. harzianum</i> "	S274	Suelo	"Rufa A"
R372	Rastrojo	" <i>T. harzianum</i> "	S404	Suelo	"Rufa A"
R555	Rastrojo	" <i>T. harzianum</i> "	S249	Suelo	"Rufa A"
S215	Suelo	" <i>T. harzianum</i> "	S449	Suelo	"Rufa A"
S221	Suelo	" <i>T. harzianum</i> "	R474	Rastrojo	<i>H. atroviride</i>
S265	Suelo	" <i>T. harzianum</i> "	R487	Rastrojo	<i>H. atroviride</i>
S58	Suelo	" <i>T. harzianum</i> "	R495	Rastrojo	<i>H. atroviride</i>
S226	Suelo	" <i>T. harzianum</i> "	R32	Rastrojo	<i>H. atroviride</i>
S75	Suelo	" <i>T. harzianum</i> "	R408	Rastrojo	<i>H. atroviride</i>
S14	Suelo	" <i>T. harzianum</i> "	R492	Rastrojo	<i>H. atroviride</i>
S295	Suelo	" <i>T. harzianum</i> "	S181	Suelo	"Lixii"
S432	Suelo	" <i>T. harzianum</i> "	R200	Rastrojo	"Lixii"
R465	Rastrojo	"Rufa B"	R339	Rastrojo	"Lixii"
R63-5	Rastrojo	"Rufa B"	R403	Rastrojo	"Lixii"
S65	Suelo	"Rufa B"	S381	Suelo	"Lixii"
S49	Suelo	"Rufa B"	R452	Rastrojo	" <i>T. tomentosum</i> "
S203	Suelo	"Rufa B"	R551	Rastrojo	" <i>T. tomentosum</i> "
S340	Suelo	"Rufa B"	R511	Rastrojo	" <i>T. tomentosum</i> "
S286	Suelo	"Rufa B"	R435	Rastrojo	<i>T. erinaceum</i>
S60	Suelo	"Rufa B"	R524	Rastrojo	<i>T. erinaceum</i>
S279	Suelo	"Rufa B"	R419	Rastrojo	<i>T. brevicompactum</i>
R332	Rastrojo	"Rufa B"	S354	Suelo	<i>T. hamatum</i>
R347	Rastrojo	"Rufa B"	R212	Rastrojo	<i>T. spirale</i>
R122	Rastrojo	"Rufa B"	S448	Suelo	<i>H. phillostachydis</i>
R70	Rastrojo	"Rufa A"			
R322	Rastrojo	"Rufa A"			
R360	Rastrojo	"Rufa A"			

2.5.3. Caracterización de la capacidad antagónica de *Trichoderma*

La especie *H. atroviridis* estuvo representada con mayor número de cepas en la evaluación debido al alto grado de resolución de este grupo en el análisis filogenético y a su reconocido desempeño como agente de control biológico en varios patosistemas. El número de cepas en los siguientes grupos se determinaron en función de su predominancia. Así, "Rufa A" tuvo seis cepas en evaluación, "*T. harzianum*" tres cepas, *T. erinaceum* y "Lixii" dos cepas y las demás especies una cepa cada una. El atraso en la identificación de las cepas de *T. brevicompactum* e *H. phyllostachidis* no permitió evaluar su capacidad antagónica.

Todas las cepas de *Trichoderma* evaluadas lograron inhibir significativamente el crecimiento de *D. tritici-repentis* (Figura 9) y *B. sorokiniana* (Figura 10) en cultivos duales ($P < 0,05$). En esta prueba el crecimiento de *D. tritici-repentis* fue inhibido entre 73 y 85 %, mientras que para *B. sorokiniana* la reducción osciló entre 61 y 74 %. La inhibición por la producción de compuestos volátiles se situó dentro de un rango de 20 y 40 % para *B. sorokiniana*, y 0 y 21 % para *D. tritici-repentis*. Mientras que los compuestos difusibles antifúngicos producidos por las cepas de *Trichoderma* lograron inhibiciones del crecimiento de *B. sorokiniana* y *D. tritici-repentis* de hasta el 92 % y 100 %, respectivamente. Sin embargo, existieron cepas como la S75 que no inhibieron a ninguno de los patógenos a través de sus compuestos difusibles (Figura 8 y 9).

Existieron diferencias significativas del orden de 10 % de inhibición de *D. tritici-repentis* producidas por las distintas cepas de *Trichoderma* en cultivos duales (Figura 8a). A su vez, la inhibición promedio de *D. tritici-repentis* por la producción de compuestos volátiles fue de 11 %, existiendo diferencias significativas entre las cepas (Figura 8b). Por otra parte, los compuestos difusibles producidos por las cepas R524 y R474 lograron inhibir el 100% del

crecimiento de *D. tritici-repentis*, siendo estadísticamente superiores al resto de las cepas, inclusive las de su especie. Las cepas de *H. atroviride* lograron como mínimo un 31 % de inhibición de *D. tritici-repentis*, mientras que el resto excepto las cepas de *T. erinaceum* no superaron el 30 % de inhibición a través de compuestos difusibles antifúngicos (Figura 8c).

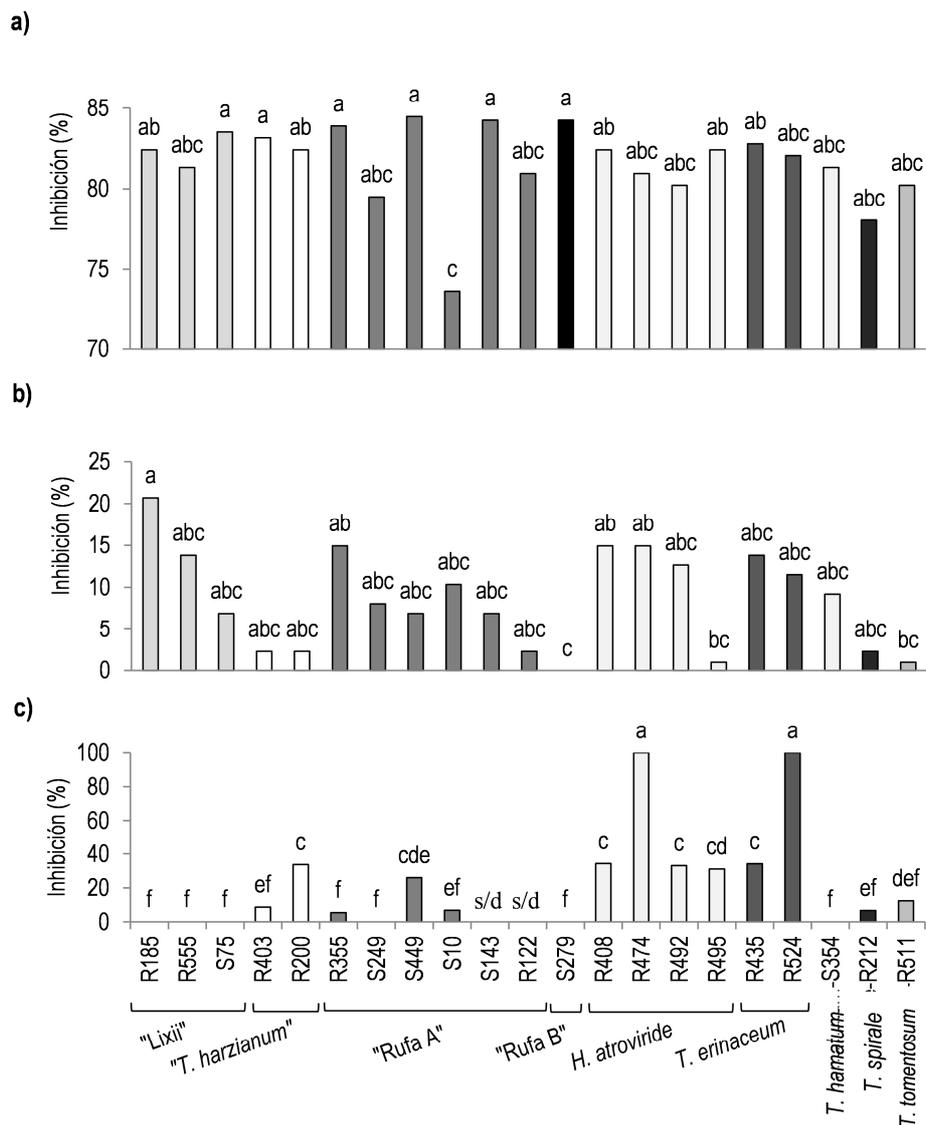


Figura 8: Inhibición del crecimiento (%) de *Drechslera tritici-repentis* según cepa de *Trichoderma* para las pruebas de a) cultivos duales, b) compuestos volátiles y c) compuestos

difusibles antifúngicos. Barras con distinta letra representan medias que difieren significativamente entre sí ($P < 0,05$). s/d: sin dato

Las cepas S143, S249 y S279 en cultivos duales obtuvieron inhibiciones de *B. sorokiniana* de aproximadamente 73 %. Estas fueron 10 % superiores a las logradas por R200, R408, S354, y R435. Asimismo, fue significativamente diferente la inhibición de las cepas R474 y R408 de *H. atroviridis*. El resto de las cepas no difirieron significativamente de ninguna de las anteriores (Figura 9a).

La inhibición de *B. sorokiniana* por la liberación de compuestos volátiles fue en promedio 30 %, no existiendo diferencias significativas entre las cepas (Figura 9b). Por otro lado, las cepas de *H. atroviridis* a través de sus compuestos difusibles lograron las más altas reducciones del crecimiento del patógeno (Figura 9c). Dentro de esta especie existieron diferencias entre las cepas de hasta 60 % de inhibición (cepa R474 vs. R495). Los máximos logrados por las demás cepas fueron iguales a los mínimos obtenidos por las cepas de *H. atroviridis*.

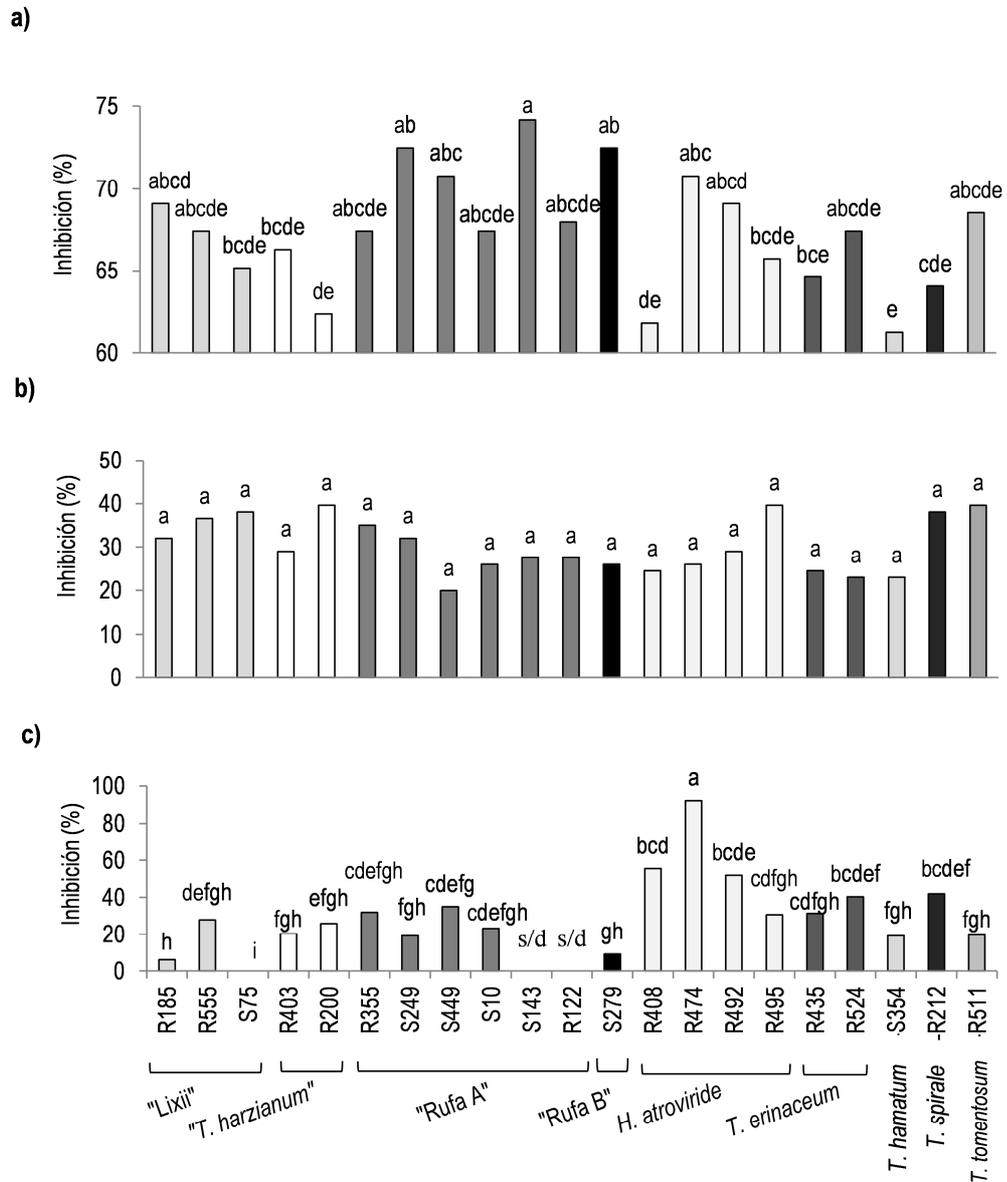


Figura 9: Inhibición del crecimiento (%) de *Bipolaris sorokiniana* según cepa de *Trichoderma* para las pruebas de a) cultivos duales, b) compuestos volátiles y c) compuestos difusibles antifúngicos. Barras con distinta letra representan medias que difieren significativamente entre sí ($P < 0,05$) s/d: sin dato

Existió una regresión lineal significativa ($R^2=0,61$, $P < 0,05$) entre la inhibición del crecimiento de ambos patógenos producida por los compuestos difusibles de *Trichoderma*. Esta

asociación fue más alta para las cepas de *H. atroviridis* ($R^2=0,79$) y sustancialmente más baja pero significativa para el resto de las cepas ($R^2=0,25$). Por otra parte, no hubo relación entre estas variables en cultivos duales ($R^2=0,007$) y en la prueba de compuestos volátiles ($R^2=0,01$) (Figura 10).

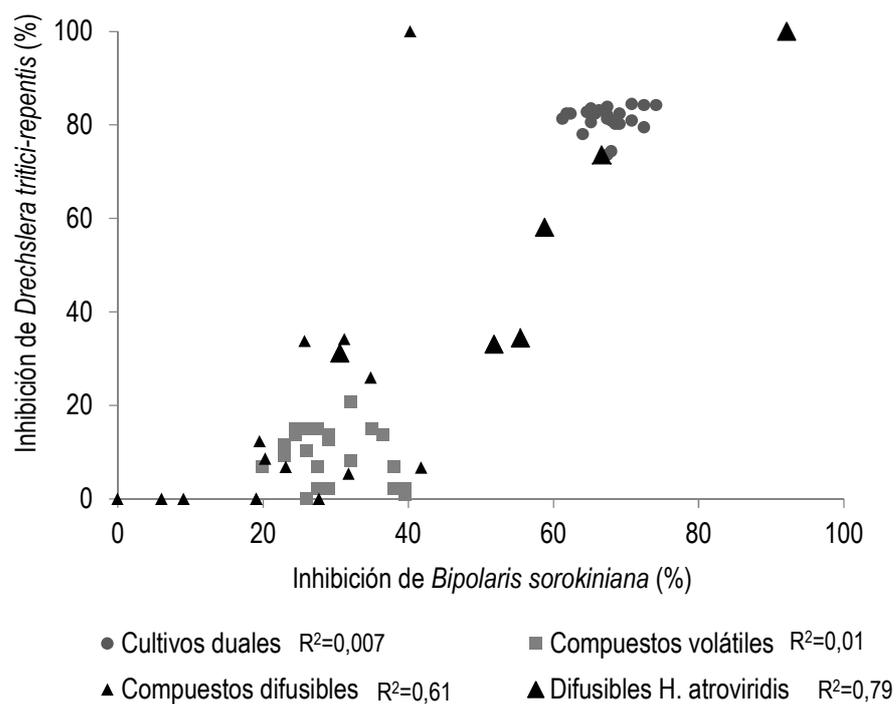


Figura 10: Inhibición del crecimiento (%) de *Drechslera tritici-repentis* en relación a la inhibición de *Bipolaris sorokiniana* para las pruebas de cultivos duales, compuestos volátiles y compuestos difusibles antifúngicos. La regresión lineal se estimó por medio del método de mínimos cuadrados ($P<0,05$).

La regresión lineal entre las variables para los valores de la prueba de compuestos difusibles fue significativa ($P<0,05$). Por otro lado, no fue significativa la relación entre la inhibición de ambos patógenos en cultivos duales, y la inhibición por la producción de compuestos volátiles y difusibles ($P<0,05$) (Figura 11).

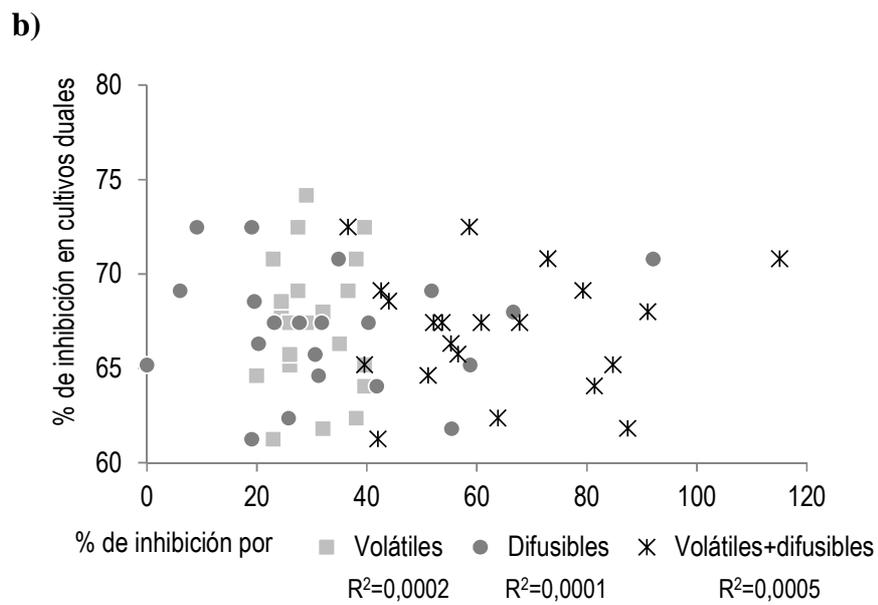
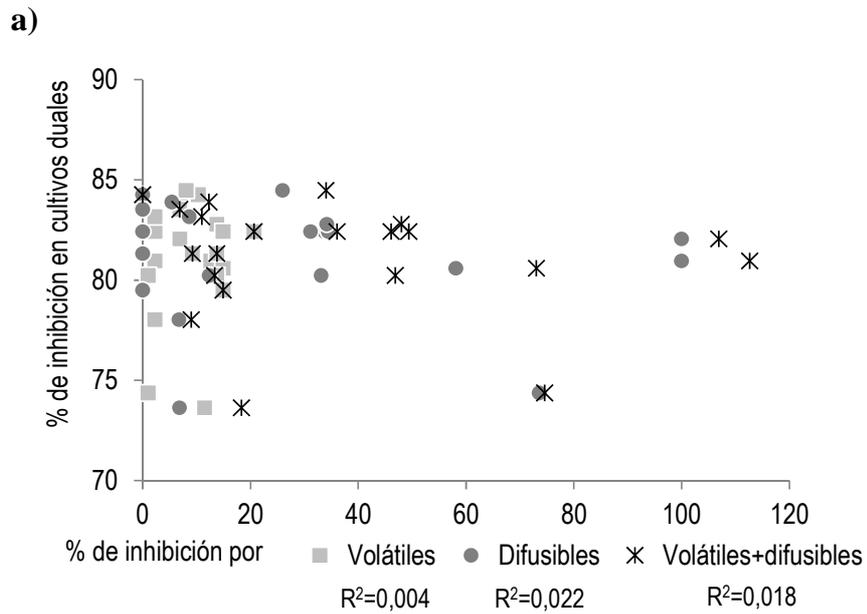


Figura 11: Inhibición en cultivos duales en función de la inhibición por compuestos volátiles, compuestos difusibles antifúngicos, y la combinación de ambos para a) *Drechslera tritici-repentis* y b) *Bipolaris sorokiniana*. La combinación de ambos mecanismos de acción se calculó haciendo la suma de la inhibición producida por cada uno de ellos.

2.6. Discusión

Se encontró gran diversidad de especies en la población nativa de *Trichoderma* en estudio, donde once grupos taxonómicos estuvieron representados. Sin embargo, tanto en el suelo, como en el rastrojo hubo un claro predominio de dos grupos taxonómicos, “*T. harzianum*” y el grupo identificado en este estudio como “Rufa A”. Aún más relevante fue el resultado obtenido en las pruebas de antagonismo, donde todas las cepas lograron altos niveles de inhibición de *Bipolaris sorokiniana* y *Drechslera tritici-repentis*. Mostrando además grandes diferencias intra-específicas e inter-específicas. Estos resultados confirman la presencia de antagonistas de *Bipolaris sorokiniana* y *Drechslera tritici-repentis* en el suelo y en el rastrojo, y que probablemente altas poblaciones de estos antagonistas podrían aportar a disminuir el inóculo generado por estos patógenos en los rastrojos. No obstante esto, para alcanzar elevados y estables niveles poblacionales que logren la expresión del antagonismo, las estrategias inóculativas deberían incluir cepas de las especies con mayor frecuencia en el ambiente a ser inoculados (Hoitink y Boehm, 1999).

La diversidad de especies de *Trichoderma* encontradas en este estudio coincide con otros estudios similares realizados previamente por otros autores. Liu *et al.* (2008) identificaron diez especies de *Trichoderma* colonizando suelos de Carolina de Norte (U.S.A.). Migheli *et al.* (2009) obtuvieron resultados similares, identificando 15 especies de *Trichoderma* a partir de muestras de suelo de la isla de Cerdeña-Italia. Al igual que Zachow *et al.* (2009) en un estudio realizado en la pequeña isla de Tenerife (Islas Canarias). En estos trabajos también se identificaron *T. erinaceum*, *T. tomentosum*, *T. spirale*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, y *H. atroviride*.

Tanto *T. harzianum*, como *H. atroviridis* han sido descritas también por Kubicek *et al.* (2008) Druzhinina *et al.* (2005), y Harman *et al.* (2004) como especies de distribución mundial y como agente de control biológico en varios patosistemas. En Uruguay, Cabrera (2009) aisló cepas nativas de estas dos especies con capacidad antagónica frente a *Gibberella zea* colonizando rastrojos de trigo. Tanto Zachow *et al.* (2009), como Migheli *et al.* (2009) encontraron prevalentemente especies de amplia distribución mundial (como por ejemplo *T. harzianum*, *H. atroviridis* y *T. gamsii*), y no especies endémicas de esas islas. Esto determina un importante flujo genético de las poblaciones de *Trichoderma* entre las regiones. Lo que sugiere que es alta la probabilidad que los grupos de cepas no identificadas y de mayor prevalencia pertenezcan a una de estas. Teniendo en cuenta la cercanía en el análisis filogenético, las cepas de "Rufa A" probablemente pertenezcan a *T. gamsii* y/o a *T. koningiopsis*. Siendo mayor la probabilidad de que se trate de *T. koningiopsis*, ya que la misma fue la especie predominante en el estudio realizado por Cabrera (2009) a partir de rastrojos de trigo en Uruguay. Estos supuestos no corresponden para las cepas pertenecientes a "*T. harzianum*" y "Rufa B", ya que los valores de bootstrap las separan de todas las especies de referencia evaluadas. Escapa al alcance de este estudio la completa identificación de aquellas cepas que no se pudieron identificar completamente, pero es indiscutible la necesidad de incluir otros genes en el análisis filogenético para completar la identificación e incluso confirmar si algunos de estos grupos representan nuevas especies de *Trichoderma* aún no descritas.

Dentro de la población nativa de *Trichoderma* spp. se encontró una predominancia diferencial de las especies que la componen. Tanto en el suelo como en el rastrojo hubo un claro predominio de dos grupos de cepas, "Rufa A" y "*T. harzianum*". Evidentemente, estos grupos presentan ventajas adaptativas y competitivas que le permiten prevalecer en el suelo y en el

rastrojo de distintos cultivos agrícolas (Pérez *et al.* 2008; Peters *et al.*, 2003; Hoitink y Boehm, 1999).

Por otra parte, actualmente *T. aggressivum* f. sp *europaeum* y *T. aggressivum* f. sp *aggressivum* son dos formas singulares de una especie que fue previamente descrita como *T. harzianum* (Muthumeenakshi *et al.*, 1998), las cuales son causantes de grandes pérdidas en la producción de hongos comestibles (Hatvani *et al.*, 2007; Samuels *et al.*, 2002). Ninguna de las cepas nativas evaluadas perteneció a esta especie, así como tampoco se encontraron cepas pertenecientes a *T. longibrachiatum* e *Hypocrea orientalis*, dos especies que han sido vinculadas a infecciones localizadas y sistémicas en personas inmunodeprimidas o en pacientes dializados (Druzhinina *et al.*, 2008; Antal *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos en este estudio evidencian la capacidad de estas cepas nativas de *Trichoderma* de inhibir a dos patógenos de gran importancia para la agricultura, mediante dos de sus principales mecanismos de acción como antagonista, liberación de compuestos volátiles y difusibles antifúngicos.

Varios compuestos volátiles han sido reportados como responsables de la actividad antifúngica de *Trichoderma*. Entre ellos se pueden citar compuestos aromáticos simples, pironas, terpenos volátiles e isocianatos. El 6-pentyl-2H-pyran-2-ona (una pirona) es uno de los compuestos volátiles más conocidos asociado con el aroma a coco característico de este género (Kubicek *et al.*, 2008). En este estudio, en la prueba de compuestos volátiles, existieron diferencias en la inhibición de *D. tritici-repentis* en función de la cepa de *Trichoderma* evaluada. Cabrera (2009) evaluando 16 cepas nativas encontró resultados similares frente a *Gibberella zeae*. La inhibición de *Gibberella zeae* mencionada por Cabrera (2009) osciló en un rango de 2 a 41 %, donde los máximos fueron sustancialmente mayores

a los alcanzados en el presente estudio frente *D. tritici-repentis* (21 %). Para *Bipolaris sorokiniana* la inhibición por la producción de compuestos volátiles no mostró variaciones significativas entre las cepas, lográndose en promedio 30 % de inhibición. Los valores obtenidos en este trabajo fueron similares a los reportados por Cabrera (2009) para *G. zea*, pero sustancialmente menores a los descritos por Salehpour *et al.* (2005) para *B. sorokiniana*. En este último trabajo, los valores de inhibición oscilaron entre 67 y 98 %, existiendo diferencias significativas entre las cepas de *Trichoderma* evaluadas.

Vale remarcar que en medio de cultivo YES se potencia la producción de metabolitos secundarios de los hongos (Paterson y Bridge, citado por Cabrera, 2009). Por lo tanto, la inhibición registrada en la prueba de compuestos difusibles puede considerarse como un indicativo de la actividad antifúngica potencial de cada cepa frente a ambos patógenos mediante este mecanismo de acción. En este sentido, las cepas de *H. atroviride* fueron las que produjeron compuestos difusibles con mayor actividad antifúngica ante ambos patógenos. Así, la cepa R474 logró el 92 y 100 % de inhibición de *B. sorokiniana* y *D. tritici-repentis*, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los publicados por Cabrera (2009), donde las cepas de *H. atroviride* se destacan en ese sentido, logrando inhibir hasta el 80 % del crecimiento de *Gibberella zea*.

Los compuestos volátiles producidos por las cepas de *Trichoderma* no lograron inhibiciones similares en ambos patógenos. Sin embargo, la acción antagónica de los compuestos difusibles fue menos patógeno-específica. En este sentido, las cepas de *H. atroviridis* fueron las que produjeron compuestos difusibles con mayor capacidad de inhibir a ambos patógenos. Existiendo además diferencias significativas entre cepas de la misma especie. *H. atroviridis* es una especie con reconocida capacidad de producir péptidos antifúngicos con

actividad antimicrobiana, especialmente contra bacterias Gram + y hongos (Schuhmacher *et al.*, 2007). Se conocen más de 300 péptidos de este tipo producidos por diferentes especies de *Trichoderma*. Estos, reciben el nombre de peptaiboles y hay ciertos tipos característicos de determinadas especies. Para *T. atroviride* se han descrito varios tipos como las atroviridinas y neatroviridinas. Aunque Neuhoof *et al.* (2007) afirman que el perfil de peptaiboles es característico de cada cepa, lo cual explicaría las diferencias intra-específicas. Por otra parte, en este trabajo existieron cepas como R185 y S75 que no lograron inhibir a los patógenos a través de sus compuestos difusibles. Sin embargo, estas dos cepas lograron altas inhibiciones de los patógenos en cultivos duales, lo que muestra que presentarían otros mecanismos de acción suficientemente potentes como para igualar (en esa prueba) a las cepas que produjeron compuestos difusibles de alto poder antifúngico.

En cultivos duales, los resultados obtenidos fueron similares a los publicados por Perelló *et al.* (2003) frente a *D. tritici-repentis*, donde todas las cepas de *Trichoderma* evaluadas lograron inhibir significativamente al patógeno. Los porcentajes de inhibición del patógeno reportados por Perelló *et al.* (2003) fueron en promedio 20 % inferiores a los obtenidos en este trabajo (60 % vs. 80 %). Al mismo tiempo Salehpour *et al.* (2005) evaluaron cuatro cepas de *Trichoderma* (dos de *T. viride* y dos de *T. harzianum*) y cuantificaron inhibiciones de *B. sorokiniana* en cultivos duales de 50 % en promedio (de todas las cepas), 17 % menor al obtenido en este trabajo.

En el presente estudio no fue significativa la regresión lineal entre la inhibición de *D. tritici-repentis* y *B. sorokiniana* en cultivos duales, y la inhibición por la producción de compuestos volátiles y difusibles. Esto indicaría que las cepas de *Trichoderma* evaluadas utilizaron otros u otros mecanismos de acción para inhibir a los patógenos en esa prueba. En este sentido, el

género *Trichoderma* posee además de la liberación de compuestos antifúngicos, dos mecanismos claves para inhibir a los patógenos, competencia por espacio y nutrientes y micoparasitismo (Howell, 2003; Tronsmo y Hjeljord, 1998).

La inhibición del patógeno en cultivos duales es una de las pruebas más utilizadas para estudiar la capacidad biocontroladora de un hongo. Este método ha tenido un uso extendido en programas de control biológico debido al volumen de información que brinda en relación a su sencillez y bajo costo. Sin embargo debe tenerse en cuenta que el mismo aporta solamente resultados indicativos, y no definitivos. No perdiendo de vista esto, es factible esperar que los resultados en cultivos duales se expresen también en condiciones menos controladas. Al respecto, Cabrera (2009) concluyó que las cepas que inhibieron en mayor grado la producción de peritecios de *G. zeae*, fueron las que mostraron mayor antagonismo en el cultivo dual.

Por otro lado, tanto Salehpour *et al.* (2005), como Perelló *et al.* (2003) encontraron en cultivos duales mayores diferencias intra que inter-específicas en la capacidad antagónica de *Trichoderma*, lo que concuerda con los resultados del presente estudio. A su vez, todas las cepas presentaron altos niveles de inhibición en cultivos duales, lo que determinaría que elevar la población nativa de *Trichoderma* spp. permitiría generar ambientes supresivos frente a los dos patógenos.

Sin embargo, existieron diferencias en la frecuencia de las especies en el suelo y el rastrojo que determinan que el manejo de la población de *Trichoderma* no debe apuntar a un incremento general, sino que debe estar dirigido a aquellas especies más adaptadas y competitivas. Esto, bajo la premisa que el logro de niveles poblacionales elevados y estables

de estos grupos, incrementaría la consistencia de los resultados del antagonismo a nivel de campo (Hoitink y Boehm, 1999).

Los resultados de este estudio permiten comprender la composición de la población nativa de *Trichoderma* en un sistema agrícola del litoral oeste de Uruguay. Esto constituye un insumo fundamental para futuros trabajos que busquen manejar las poblaciones de *Trichoderma* con el objetivo de reducir el efecto de las enfermedades en la producción de cultivos. La continuidad de esta línea de investigación debería incluir el estudio de la evolución de la densidad poblacional de *Trichoderma* spp. en las diferentes secuencias de cultivos a través del tiempo. Esto, bajo la hipótesis que la efectividad del antagonismo queda definida no solo por la capacidad del antagonista para inhibir al patógeno, sino además por un ambiente que le permita mantener su densidad poblacional a un nivel donde pueda ejercer su actividad como antagónica.

2.7. Agradecimientos

Se agradece a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por la financiación del proyecto de investigación. A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por su aporte a través de las becas de Iniciación a la investigación y Becas para Posgrados Nacionales. A la Comisión Coordinadora del Interior (CCI) por la financiación de instancias de aprendizaje como cursos y pasantías. A los funcionarios de la Estación Mario A. Cassinoni que participaron en el proyecto de investigación.

2.8. Bibliografía

- Agrawal SC, Khare MN, Agrawal PS. 1977. Biological Control of *Sclerotium rolfsii* causing collar rot of lentil. *Indian Phytopathology*, 30:176-179.
- Antal Z, Varga J, Kredics L, Szekeres A, Hatvani L, Manczinger L, Vágvölgyi C, Nagy E. 2006. Intraspecific mitochondrial DNA polymorphism within the emerging filamentous fungal pathogen *Trichoderma longibrachiatum*. *Journal of Medical Microbiology*, 55:31–35.
- Cabrera M, 2009. Control biológico de la fusariosis del trigo [Tesis de Maestría]. Montevideo: Facultad de Ciencias-Universidad de la República. Pp. 90
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2012. Encuesta Agrícola “Primavera-Verano 2011” [En línea]. Consultado en junio 2013. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,114,O,S,0,MNU;E;31;2;MNU;,>
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2011. Encuesta Agrícola “Primavera 2011” [En línea]. Consultado en junio 2013. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,114,O,S,0,MNU;E;31;2;MNU;,>
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2008. Encuesta Agrícola “Primavera 2007” [En línea]. Consultado en junio 2013. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,114,O,S,0,MNU;E;31;2;MNU;,>
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2001. SIEMBRA DIRECTA: Su aplicación en el área de cultivos de secano. Año agrícola 2000/01. [En línea]. Consultado en junio 2013. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,114,O,S,0,MNU;E;31;2;MNU;,>

- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. 2011. InfoStat versión 2011[En línea]. 30 de julio de 2013. Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: www.infostat.com.ar
- Druzhinina IS, Komon-Zelazowska M, Kredics L, Hatvani L, Antal Z, Belayneh T, Kubicek CP. 2008. Alternative reproductive strategies of *Hypocrea orientalis* and genetically close but clonal *Trichoderma longibrachiatum*, both capable of causing invasive mycoses of humans. *Microbiology*, 154:3447–3459.
- Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Komoj M, Bissett J, Szakacs G, Kubicek CP. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*, 42:813–828.
- Fernandez M. 1992a. The effect of *Trichoderma harzianum* on fungal pathogens infecting wheat and black oat straw. *Soil Biology & Biochemistry*, 24:1031-1034
- Fernandez, M. 1992b. The effect of *Trichoderma harzianum* on fungal pathogens infecting soybean residues. *Soil Biology & Biochemistry*, 24: 1031-1029.
- Harman G, Howell C, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology*, 2(1):43–56
- Hatvani L, Antal Z, Manczinger L, Szekeres A, Druzhinina IS, Kubicek CP, Nagy A, Nagy E, Vágvölgyi C, Kredics L. 2007. Green mold diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. are caused by related but phylogenetically different *Trichoderma* species. *Phytopathology* 97:532-537.

- Hillis DM y Bull JJ. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42:142-152.
- Hoitink H y Boehm M. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology* 37:427-446. 14
- Howell CR. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease* 87: 1-8
- Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T. 2005. MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) version 5: Improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*, 33: 511-518.
- Kopchinskiy A, Komon M, Kubicek CP, Druzhinina IS. 2005. TrichoBLAST: A multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. *Mycological Research*, 109(06):658-660.
- Kubicek CP, Komon-Zelazowska M, Druzhinina IS. 2008. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *Journal of Zhejiang University Science*, 9(10):753-763.
- Kubicek CP, Bissett J, Druzhinina I, Kulling-Gradinger C, Szakacs G. 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology*, 38:310-319.
- Liu B, Glenn D, Buckley K. 2008. *Trichoderma* communities in soils from organic, sustainable, and conventional farms, and their relation with Southern blight of tomato. *Soil Biology & Biochemistry*, 40:1124–1136.
- Migheli Q, Balmas V, Komoń-Zelazowska M, Scherm B, Fiori S, Kopchinskiy AG, Kubicek CP, Druzhinina IS. 2009. Soils of a Mediterranean hot spot of biodiversity and endemism

- (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-European, invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. *Environmental Microbiology*, 11(1):35–46.
- Murray MG y Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8: 4321–4325.
- Muthumeenakshi S, Brown AE, Mills PR. 1998. Genetic comparison of the aggressive weed mould strains of *Trichoderma harzianum* from mushroom compost in North America and the British Isles. *Mycological Research*, 102:385-390.
- Neuhof T, Dieckmann R, Druzhinina IS, Kubicek CP, Von Döhren H. 2007. Intact-cell MALDI-TOF mass spectrometry analysis of peptaibol formation by the genus *Trichoderma/Hypocrea*: can molecular phylogeny of species predict peptaibol structures?. *Microbiology*, 153:3417-3437.
- Perelló A, Moreno M, Mónaco C, Simón M, Cordo C. 2009. Biological control of *Septoria tritici* blotch on wheat by *Trichoderma* spp. under field conditions in Argentina. *BioControl*, 54:113–122
- Perelló A, Moreno V, Mónaco C, Simón MR. 2008. Effect of *Trichoderma* spp. isolates for biological control of tan spot of wheat caused *Phyrenophora tritici-repentis* under field conditions in Argentina. *Biological Control*, 53:895-904.
- Perelló A, Mónaco C, Simón MR, Sisterna M, Dal Bello G. 2003. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. *Crop Protection*. 22:1099–1106
- Pereyra S, Ríos A, Zerbino S. 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: Actividades de Difusión N° 674. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) La Estazuela. 101-105 pp.
- Pereyra S, Garmendia G, Cabrera M, Vero S, Pianzzola M, Dill-Macky, R. 2005. Control biológico de la fusariosis de la espiga de trigo y cebada. *Agrociencia Uruguay*, 9:337-343
- Pérez CA, Hoffman E, Viega L, Villar HA, Ernst O. 2011. Manejo de enfermedades en sistemas agrícolas: mitos y realidades. En: II Simposio Nacional de Agricultura. 29 y 30 setiembre; 2011; Paysandú, Uruguay. Pp. 119-131
- 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
- Peters R, Sturz A, Carter M, Sanderson J. 2003. Developing disease-suppressive soils through crop rotation and tillage management practices. *Soil & Tillage Research* 72:181-192.
- Posada D y Crandall KA. 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14:817-818.
- Salehpour M, Etebarian H, Roustaei A, Khodakaramian G, Aminian H. 2005. Biological Control of Common Root Rot of Wheat (*Bipolaris sorokiniana*) by *Trichoderma* Isolates. *Plant Pathology Journal* 4(1): 85-90.
- Samuels GJ, Dodd SL, Gams W, Castlebury LA, Petrini O. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 94:146–170.
- Schuhmacher R, Stoppacher N, Zeilinger S. 2007. Peptaibols of *Trichoderma atroviride*: screening, identification, and structure elucidation by liquid chromatography-tandem

mass spectrometry. En: Méndez-Vilas A. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. pp. 609-617

Swofford DL. 2002. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10a [En línea]. 28 de Julio de 2013. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Disponible en: <http://www.sinauer.com/catalog/software-video/paup-phylogenetic-analysis-using-parsimony-and-other-methods-4-0-beta.html>

Tronsmo A y Hjeljord L. 1998. Biological control with *Trichoderma* species. En: Boland G, David L. [Eds.] Plant-Microbe interactions and biological control. Marcel Dekker, Inc. USA (United States of America). pp 111-126.

Vargas Gil S, Pastor S, March GJ. 2009. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. *Micobiological Research*, 164: 196-205.

Vargas Gil S, Meriles JM, Haro R, Casini C, March GJ. 2008. Crop rotation and tillage systems as a proactive strategy in the control of peanut fungal soilborne diseases. *BioControl*, 53: 685-698

Williams J, Clarkson JM, Mills PR, Cooper RM. 2003. A Selective Medium for Quantitative Reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* Compost. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (7): 4190–4191

Zachow C, Berg C, Müller H, Meincke R, Komon-Zelazowska M, Druzhinina IS, Kubicek CP, Berg G. 2009. Fungal biodiversity in the soils/rhizospheres of Tenerife (Canary Islands): relationship to vegetation zones and environmental factors. *The ISME (International Society for Microbial Ecology) Journal*, 3: 79-92.

3. Efecto de los cultivos sobre la población nativa de *Trichoderma* spp. en agricultura sin laboreo²

Villar Andrés¹, Ernst Oswaldo¹, Cadenazzi Mónica¹, Vero Silvana², Pereyra Silvia³, Altier Nora³, Chouhy Diego¹, Langone Fabrizio¹, Pérez Carlos¹

¹Estación Experimental Mario A. Cassinoni. Facultad de Agronomía-UdelaR

²Facultad de Química-UdelaR

³Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Dirección Postal: EEMAC, Ruta 3, km 363, Paysandú. CP. 60000

Correo electrónico: hvillar@fagro.edu.uy

² Este capítulo fue realizado siguiendo las instrucciones de la revista *Agrociencia Uruguay*

3.1. Resumen

La agricultura en Uruguay ha experimentado un fuerte proceso de cambios que han significado un aumento de las problemáticas sanitarias causadas por patógenos necrotróficos. Diversos trabajos muestran que mediante el manejo de microorganismos benéficos es posible reducir el impacto de las enfermedades. En base a esto, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de los cultivos sobre la población de *Trichoderma* spp. en suelo y en rastrojo, en un sistema agrícola sin laboreo. El monitoreo de la población de *Trichoderma* spp. se realizó en un experimento con cuatro secuencias de cultivos. Se realizaron muestreos de rastrojo y suelo en primavera y otoño, durante tres años consecutivos (primavera 2009-otoño 2012). La densidad poblacional de *Trichoderma* spp. fue determinada mediante el método de dilución y recuento en placa. A su vez fueron determinadas cinco propiedades químicas del suelo de cada tratamiento. Los resultados muestran que los rastrojos de cebada fueron los que presentaron mayor densidad poblacional de *Trichoderma* spp. Por otra parte, la población de *Trichoderma* spp. mostró una marcada variación estacional, incrementando en otoño en relación a primavera. Los tratamientos evaluados no tuvieron efecto sobre las propiedades químicas de los suelos, ni hubo una asociación entre estas y la población de *Trichoderma* spp. Estos resultados establecen la posibilidad de manejar la población nativa de *Trichoderma* spp. mediante los componentes de las secuencias de cultivos, y permitieron identificar ambientes más propicios para el mantenimiento de altas poblaciones de *Trichoderma*, indicando mejores ambientes para eventuales inoculaciones de este antagonista.

Palabras claves: control biológico, dinámica poblacional, rotación de cultivos

3.2. Summary

Agriculture in Uruguay has experienced a strong process of changes that have meant an increase in crop diseases caused by necrotrophic pathogens. Several studies show that by managing beneficial microorganisms is possible to reduce the impact of disease. Based on this, the objective of this study was to determine the effect of field crops on the population of *Trichoderma* spp. in soil and straw under no-till farming system. The population of *Trichoderma* spp. was monitored in an experiment with four different crop sequences. Samples of soil and crop debris were taken in spring and fall, over three consecutive years (spring 2009-fall 2012). The population density of *Trichoderma* spp. was determined by dilutions with plate counts method. In addition, soil chemical properties were determined for each treatment. Barley debris showed the highest population density of *Trichoderma* spp. Moreover, the population of *Trichoderma* spp. showed a marked seasonal variation, being consistently higher in fall than in spring. Soil chemical properties were not affected by the treatment, and no association was found between these parameters and the population of *Trichoderma* spp. These results confirm the ability to handle the native population of *Trichoderma* spp. through the components of the crop sequences and indicate conducive environment to support higher populations of *Trichoderma* were inoculations of this antagonist might have higher chances of success.

Key words: biological control, population dynamics, crop rotation

3.3. Introducción

En Uruguay, la agricultura ha experimentado en la última década un fuerte proceso de intensificación productiva, reducción del menú de cultivos sembrados y adopción generalizada de la siembra directa (DIEA, 2012; DIEA, 2011; DIEA, 2008; DIEA, 2001). Esto ha resultado en un aumento significativo de las problemáticas sanitarias causadas por patógenos necrotróficos, lo que se ha derivado en el incremento en el uso de fungicidas (DGSA-MGAP, 2010), con el consecuente impacto económico y ambiental que esto conlleva. En estos sistemas, el reducido menú de cultivos, la fuerte presión que ejercen los mercados y el amplio rango de huéspedes de algunos patógenos, condicionan algunas medidas de fuerte impacto para el manejo de las enfermedades (Pérez *et al.*, 2011; Pereyra *et al.*, 2005).

En este contexto, surge la necesidad de generar información que contribuya al desarrollo de un manejo sustentable de las enfermedades. En este sentido, el control biológico es una herramienta que ha sido poco explorada en sistemas agrícolas extensivos, y que puede reducir el impacto de las enfermedades en el marco de un manejo integrado de las mismas.

Diversos trabajos muestran que la introducción masiva de biocontroladores en espigas y hojas de trigo lograron reducir el desarrollo de las enfermedades causadas por *Fusarium graminearum*, *Septoria tritici*, *Bipolaris sorokiniana* y *Drehslera tritici repentis* (Perelló *et al.*, 2009; Perelló *et al.*, 2008; Salehpour *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2004; Diamond y Cooke, 2003). Por otra parte, la aplicación de agentes de biocontrol al rastrojo ha resultado en la reducción de la presión de inóculo de algunos patógenos de importancia económica (Pereyra *et al.*, 2005; Bujold *et al.*, 2001; Fernandez, 1992a; Fernandez, 1992b). Pese a esto, una constante en este tipo de enfoques ha sido la falta de adaptabilidad de los agentes de biocontrol al

patosistema introducido, y la ausencia de un ambiente que permita la expresión del antagonismo, resultando en efectos efímeros y/o inconsistentes de las aplicaciones.

En base a estas limitantes, en este trabajo se plantea el desarrollo de ambientes supresivos, que mediante elevadas poblaciones de microorganismos benéficos logren suprimir el desarrollo de epidemias (Hoitink y Boehm, 1999). Para lograr esto se propone trabajar con poblaciones de biocontroladores nativos (adaptados a los patosistemas), y en ambientes donde su densidad poblacional es elevada, ya que allí es mayor la probabilidad de éxito de las inoculaciones (Kinkel *et al.* 2011; Cabrera, 2009; Pérez *et al.*, 2008).

Trichoderma es un género de hongos que habita naturalmente los suelos y que mediante la diseminación de esporas y el crecimiento micelial puede colonizar al rastrojo y antagonizar los microorganismos allí presentes. Especies dentro de este género han mostrado ser eficientes biocontroladores de un amplio grupo de patógenos de importancia económica (Cabrera, 2009; Perelló *et al.*, 2009; Perelló *et al.*, 2008; Howell, 2003; Wells, 1988). A su vez, se ha demostrado la potencialidad de manejar la población de *Trichoderma* spp. en el suelo mediante la secuencia de cultivos (Hagn *et al.*, 2003; Bulluck *et al.* 2002; Causin *et al.*, 1995; Lipps y Deep, 1991), y mediante cambios en las propiedades químicas de los suelos (Vargas Gil *et al.*, 2008). Sin embargo, no existen antecedentes nacionales sobre la dinámica poblacional de *Trichoderma* spp. en el rastrojo.

Por lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo determinar el efecto de la rotación de cultivos sobre la población de *Trichoderma* spp. que habita el suelo y los rastrojos en un sistema de agricultura continua en siembra directa, y comprender qué componentes permiten el mantenimiento de altas poblaciones nativas de *Trichoderma*

3.4. Materiales y métodos

3.4.1. Sitio experimental

El monitoreo de la población de *Trichoderma* se realizó en un experimento que contiene distintas rotaciones de cultivos sembrados sin laboreo, establecido en 1999 en la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC), Paysandú, Uruguay. Dicho experimento cuenta con las siguientes secuencias: i) Secuencia 1- trigo-soja-trigo-soja..., ii) Secuencia 2- trigo-soja-cebada-girasol-trigo..., iii) Secuencia 3- trigo-soja-cebada-sorgo-avena-maíz-trigo..., iv) Secuencia 4- trigo-soja-cebada-girasol-avena con lotus-lotus-trigo... Estas secuencias de distintos largos de rotación y compuestas de distintas especies botánicas permiten evaluar la población de *Trichoderma* en diversos microambientes. A su vez, con el objetivo de eliminar el efecto año, el experimento cuenta con 10 tratamientos donde todos los cultivos de las cuatro secuencias están presentes todos los años.

El experimento cuenta con un diseño experimental de bloques completos con parcelas aleatorizadas con tres repeticiones. Las parcelas son de 10 m x 30 m, con 3 m de separación entre parcelas y 10 m entre bloques. Los cultivos son manejados como cultivos comerciales, con densidad de siembra, fertilización, y manejo de plagas de acuerdo a lo requerido por cada cultivo. Cabe destacar que no se aplica ningún fungicida en el experimento, de modo de que las poblaciones microbianas sean alteradas únicamente por la secuencia de cultivos.

3.4.2. Condiciones climáticas

Las determinaciones de lluvia y temperatura fueron obtenidas de la estación meteorológica de la EEMAC (estación meteorológica automática VANTAG2 PRO2 L.R.), ubicada a 500 m del experimento.

3.4.3. *Muestreo de rastrojo*

Se realizaron muestreos de los rastrojos de cada tratamiento en dos momentos del año (primavera y otoño), durante tres años consecutivos (primavera 2009-otoño 2012). Las muestras de rastrojo se colectaron mediante la utilización de cuadros de muestreo de 50 cm x 50 cm, realizando cinco lanzamientos al azar por parcela y colectando todo el rastrojo que se encontraba en la superficie del suelo y que quedaba ubicado dentro del cuadro. Se procedió a secar el rastrojo en estufa de aire forzado (FANEM^R, Sao Pablo) a 40 °C durante 24 horas, y se determinó el peso seco del mismo.

Para el caso de los muestreos de primavera 2011 y otoño 2012, de las muestras compuestas por rastrojos de las distintas especies vegetales de cada tratamiento, se seleccionó el componente principal constituido por el rastrojo del último cultivo cosechado, y se cuantificó el mismo expresado como porcentaje del peso total de la muestra. De esta forma, en las muestras colectadas en otoño predominaba el cultivo de invierno último, y en las de primavera predominaba el rastrojo del cultivo de verano. Ambos rastrojos tuvieron al momento de ser colectados aproximadamente seis meses de descomposición en el campo. Las muestras fueron conservadas en bolsas de papel a temperatura ambiente, en un ambiente seco y oscuro.

3.4.4. *Muestreo de suelo*

Al momento de muestrear el rastrojo, se tomaron muestras de suelo para los muestreos de primavera 2009 a otoño 2011. Las muestras de suelos fueron colectadas con calador desde los 5 cm superficiales del suelo (profundidad de 0 a 5 cm). Veinte muestras se colectaron en cada parcela, y mezcladas en una misma bolsa de modo de tener una muestra compuesta.

Las muestras fueron conservadas en bolsas de plástico en heladera a 4 °C hasta su procesamiento.

3.4.5. Cuantificación de la población de *Trichoderma* spp. en suelo y rastrojo

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 tomó una submuestra de 10 g de rastrojo o de suelo, según el caso, y se diluyó en 150 ml y 100 ml de suero fisiológico estéril en Erlenmeyer, respectivamente. Luego se agitó durante 30 minutos a 200 rpm en un agitador orbital (Felisa^R, Guadalajara). Posteriormente se tomó una alícuota de 1 ml de dicha suspensión, y se realizó una dilución seriada en 9 ml de suero fisiológico estéril, diluciones de 1/10 y 1/100. Una alícuota de 300 µl de cada dilución se sembró en placas con medio selectivo para *Trichoderma* (Williams *et al.*, 2003). Se sembraron dos placas por dilución, y se realizó una repetición en el tiempo, totalizando 4 placas por dilución. Las mismas fueron incubadas a 25 °C en oscuridad, y luego de 6 días se contó el número total de colonias de *Trichoderma* spp. por placa, y expresadas en unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de suelo o rastrojo según correspondiera.

3.4.6. Determinación de las propiedades químicas del suelo

Se tomó una submuestra de las muestras de suelo de todas las unidades experimentales colectadas en el otoño 2011, y fueron enviadas al laboratorio del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) La Estanzuela donde se realizaron los análisis de Nitrógeno total (N) (por combustión a 900 °C y posterior detección de N₂ por conductividad térmica) y Potasio (K) en solución de acetato de amonio a pH 7 y emisión atómica. Los análisis de materia orgánica (MO), pH y Fósforo (P) fueron realizados en el laboratorio de

suelos y agua de la Estación Experimental Mario A. Cassinoni. 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. El P Bray se calculó a través de la técnica BRAY N°1 (Bray y Kurtz, 1945).

3.4.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante un modelo lineal generalizado, con distribución Poisson mediante el paquete estadístico SAS (Versión 8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Cuando el análisis permitió rechazar la hipótesis nula, se procedió a la separación de medias por Tukey ($P=0,05$).

3.5. Resultados

3.5.1. Condiciones climáticas

Las condiciones climáticas previas a cada uno de los muestreos fueron diferentes (Figura 1). Los períodos previos al muestreo 1 (M1), 2 (M2) y 6 (M6) fueron los más húmedos, seguido por los meses previos al muestreo 4 (M4) y 5 (M5), y por último la estación previa al muestreo 3 (M3). Las condiciones térmicas presentaron una diferencia muy leve con respecto al promedio histórico en los períodos anteriores a los seis muestreos. La temperatura aumentó antes de los muestreos de primavera, oscilando en un rango de 20 a 22 °C en los meses del muestreo. Mientras que hacia el otoño (en los tres años) la temperatura descendió, situándose entre 15 y 18 °C al momento de los muestreos.

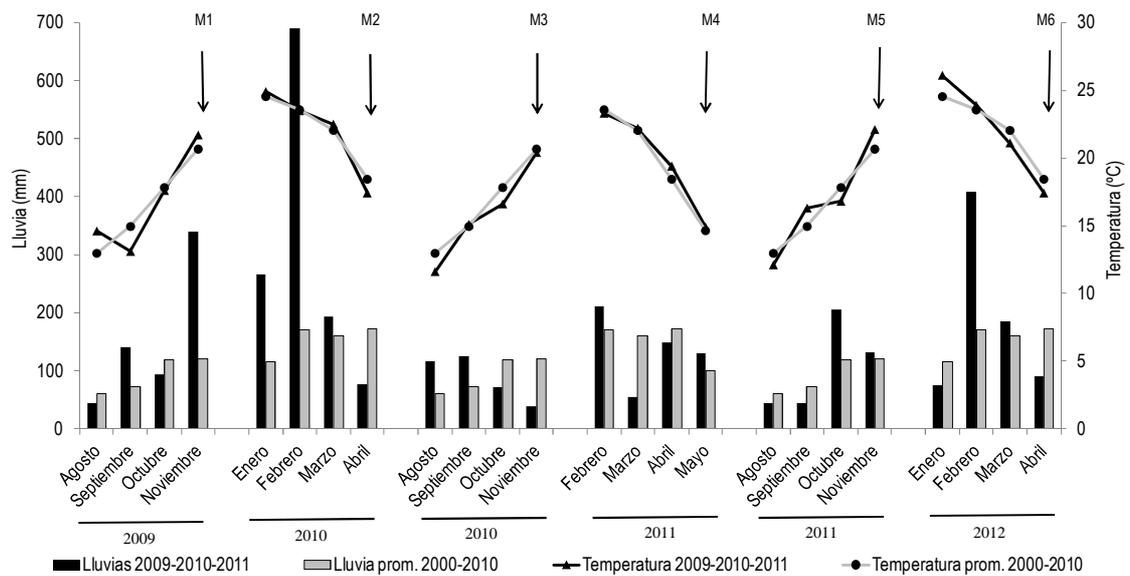


Figura 1: Temperatura y lluvias en los años 2009, 2010, 2011 y 2012, y temperatura y lluvias promedio del período 2000-2010 cuatro meses antes del muestreo según mes durante los años de evaluación.

3.5.2. Población de *Trichoderma* spp. en los rastrojos de cada cultivo

Trichoderma spp. fueron recuperadas de todos los rastrojos de los cultivos analizados. La cebada fue el componente botánico que significativamente presentó mayor población de *Trichoderma* spp. (Figura 2). No obstante esto, se encontraron diferencias significativas en la densidad poblacional entre los rastrojos de cebada pertenecientes a distintas secuencias de cultivos (Figura 3). La población de *Trichoderma* spp. fue más elevada en el rastrojo de cebada de la secuencia 3, mientras que la secuencia 4 fue la que presentó los menores niveles poblacionales, siendo esta similar a la población observada en los cultivos de verano. Por otra parte, a excepción del rastrojo de trigo y avena de la secuencia 2 y 4, respectivamente, los rastrojos de los demás cultivos de invierno se ubicaron en una situación intermedia entre los rastrojos de cebada y de los cultivos de verano. Siendo estos últimos,

junto con los rastrojos aportados por las praderas de lotus los que presentaron menor población de *Trichoderma* spp.

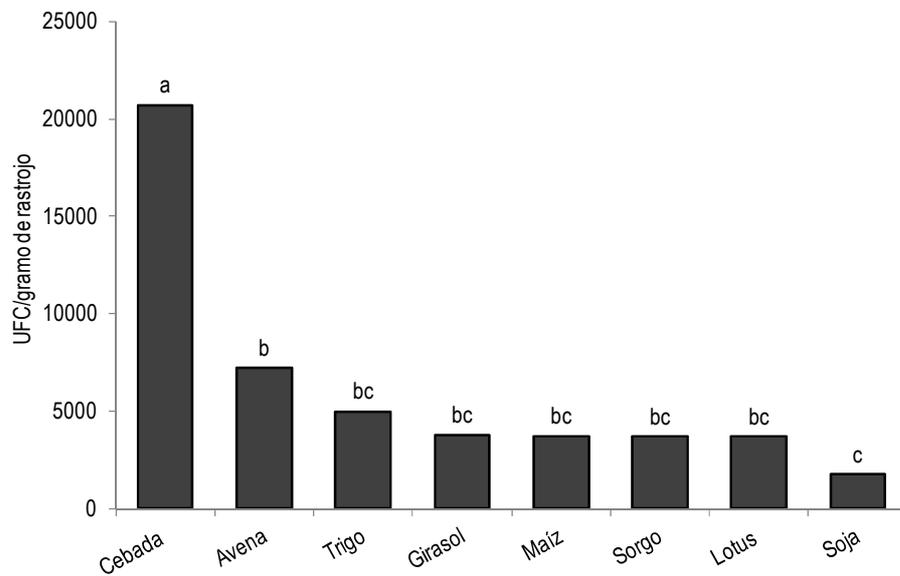


Figura 2: Densidad poblacional de *Trichoderma* spp. en los rastrojos de cada cultivo. Datos correspondientes al muestreo de primavera 2011-otoño 2012. Barras con distinta letra representan medias que difieren significativamente entre sí ($P < 0,05$). Las comparaciones entre las medias fueron realizadas a partir de contrastes ortogonales.

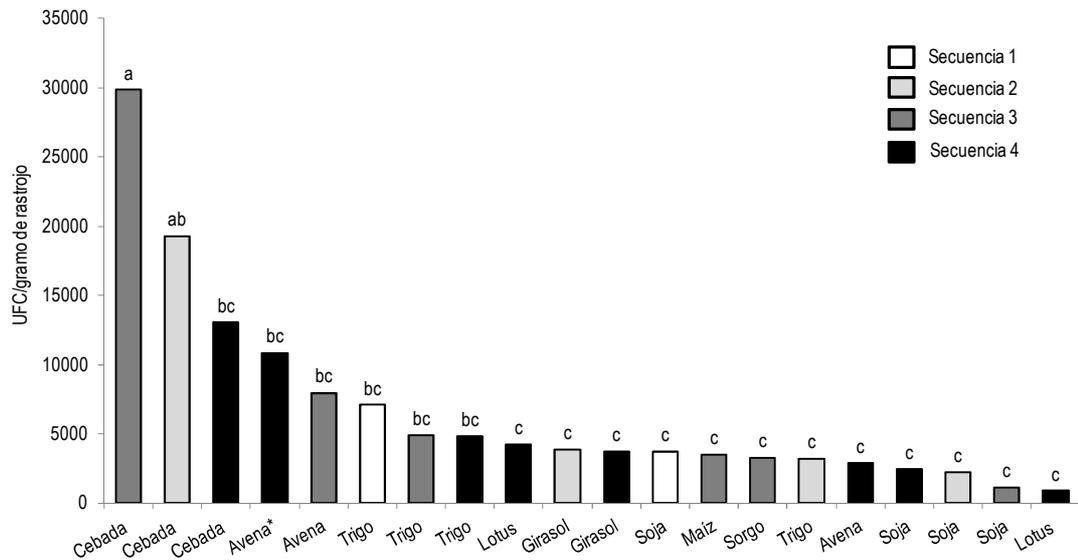


Figura 3: Densidad poblacional de *Trichoderma* spp. en el rastrojo de cada cultivo según la secuencia. Datos correspondientes al muestreo de primavera 2011-otoño 2012. Barras con distinta letra representan medias que difieren significativamente entre sí ($P < 0,05$). Avena*: rastrojo de avena de 18 meses de descomposición perteneciente a la rotación que al momento del muestreo se encontraba con lotus. Debido a que el rastrojo aportado por las praderas en ese momento fue muy bajo se tomó el rastrojo de avena por ser el que predominó allí.

3.5.3. Población de *Trichoderma* spp. en los rastrojos de cada secuencia de cultivos

La población de *Trichoderma* spp. fue mayor cuando en los rastrojos predominaron los cultivos de invierno (muestreo de otoño 2010 y 2011), en relación a los cultivos de verano (muestreo de primavera 2009 y 2010) (Figura 4).

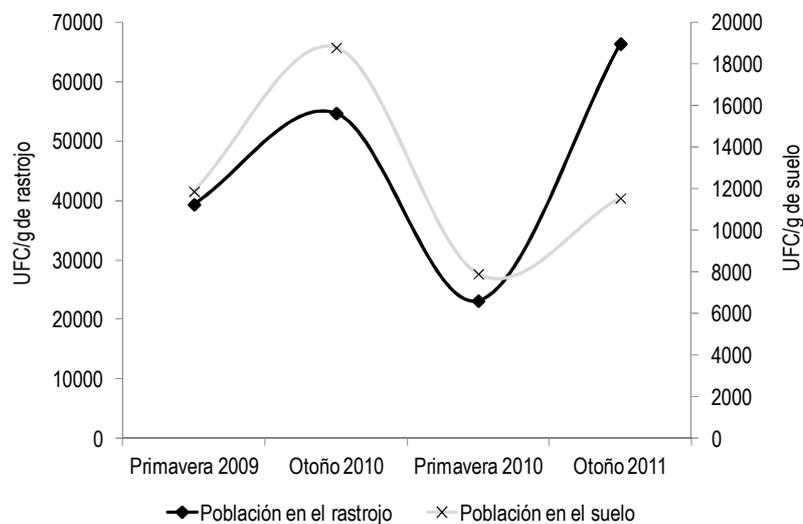


Figura 4: Densidad poblacional de *Trichoderma* spp. promedio de todos los tratamientos en el rastrojo y en el suelo según estación del año

Sólo se detectó un efecto significativo del tratamiento sobre la población de *Trichoderma* spp. en el muestreo de otoño 2010. En este caso, la población de *Trichoderma* fue mayor en el rastrojo con predominancia de cebada + soja, en relación al rastrojo de avena + girasol y lotus + lotus, todos de la misma secuencia, mientras el resto de los tratamientos presentaron niveles poblacionales intermedios (Figura 5). El resto de los tratamientos mostraron una densidad poblacional intermedia no difiriendo de ninguno de los tratamientos anteriormente mencionados.

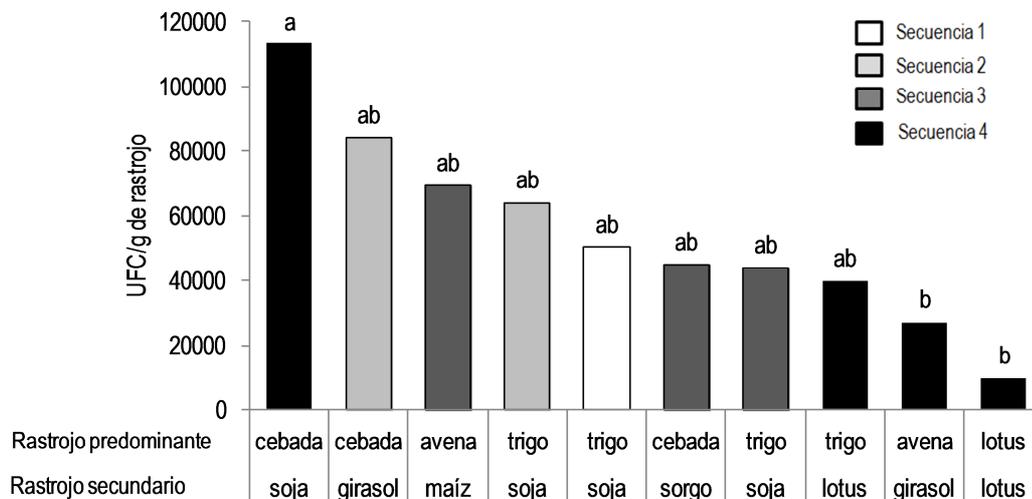


Figura 5: Densidad poblacional de *Trichoderma* spp. en el rastrojo predominante en otoño 2010. Barras con letras distintas difieren significativamente entre sí ($P < 0.05$)

Por otro lado, *Trichoderma* spp. fue detectada también en el suelo de todas las rotaciones evaluadas. La evolución de la población de *Trichoderma* spp. en el suelo fue similar a su evolución en el rastrojo, difiriendo de esta última en el otoño 2011 donde la densidad poblacional fue similar a la de la primavera 2009 (Figura 4).

En este caso, la población de *Trichoderma* spp. en el suelo fue significativamente afectada por los tratamientos en la primavera 2009 y en el otoño de 2011 (Cuadro 1). En la primavera 2009 en el tratamiento 3 la población de *Trichoderma* spp. fue significativamente superior a la población en el tratamiento 2, 7 y 10. Mientras que en otoño 2010 la cantidad de inóculo de *Trichoderma* spp. fue mayor en el tratamiento 9 en comparación con el tratamiento 4, 7 y 8. La densidad poblacional de *Trichoderma* spp. en el resto de las rotaciones estuvo en niveles intermedios no difiriendo de los tratamientos anteriores en ninguna de las dos estaciones de muestreo.

Tanto en el otoño 2011, como en la primavera 2009 la cebada estuvo entre los últimos tres cultivos que antecedieron al muestreo en los tratamientos donde la población de *Trichoderma* spp. fue significativamente mayor.

Cuadro 1: Densidad poblacional de *Trichoderma* spp. en el suelo (UFC/g) según secuencia, rotación de cultivos y estación del año

Secuencia	Rotación	Primavera 2009			Otoño 2011		
		Antecesoros	UFC/g		Antecesoros	UFC/g	
1	1	sj/tr/sj	9343	ab	tr/sj/tr	10183	ab
2	2	sj/tr/gr	4123	b	ce/gr/tr	14738	ab
	3	gr/ce/sj	15636	a	tr/sj/ce	9897	ab
3	4	so/ce/mz	10666	ab	av/sj/tr	8838	b
	5	mz/av/gr	2378	b	tr/so/ce	13212	ab
	6	gr/tr/so	9947	ab	tr/mz/av	10688	ab
4	7	gr/av/lo	6118	b	lo/lo/tr	8293	b
	8	lo/lo/lo	7525	ab	lo/gr/ce	7527	b
	9	lo/Tr/sj	8064	ab	ce/sj/av	19978	a
	10	sj/ce/gr	5796	b	av/lo/lo	12314	ab

Referencias: sj:soja, gr: girasol, mz: maíz, so: sorgo, tr: trigo, ce: cebada, av: avena, lo: lotus.

Valores con letras diferentes difieren significativamente entre filas ($P < 0,05$)

Por otra parte, la densidad poblacional de *Trichoderma* spp. en el rastrojo en el otoño 2010 tuvo una correlación significativa con la densidad poblacional en el suelo cuantificada en el otoño 2011 ($R^2=0,47$) (Figura 6).

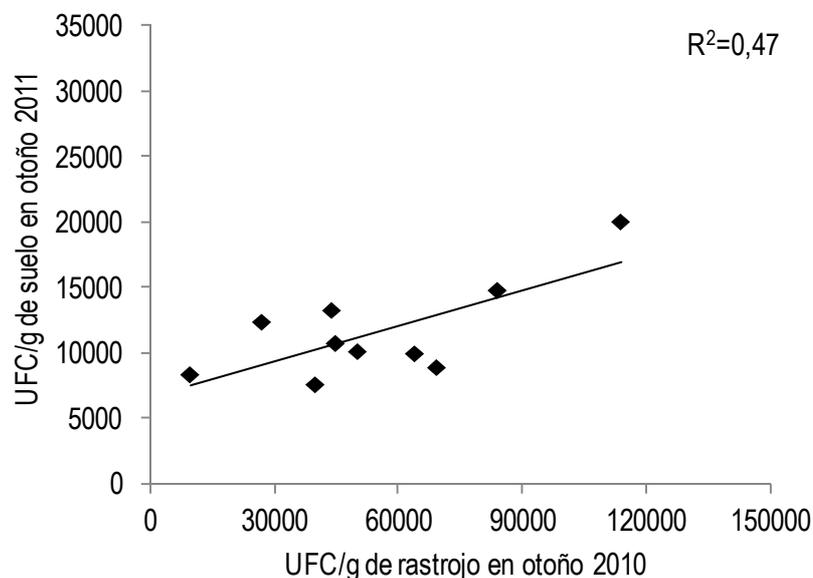


Figura 6: Densidad poblacional de *Trichoderma* spp. en el suelo en el otoño 2011 en función de la densidad poblacional en el rastrojo en el otoño 2010. El coeficiente de determinación (R^2) fue significativo ($P < 0,05$)

Respecto a la variación estacional de la densidad poblacional de *Trichoderma* spp en el suelo y en el rastrojo según la secuencia, en las secuencias 2 y 3 la población de otoño aumenta en relación a la de primavera (Figura 7). Esta tendencia no fue así en la secuencia 1, con monocultivo trigo/soja. En esta última, las densidades poblacionales fueron menos variables entre estaciones, logrando niveles sustancialmente inferiores a los máximos alcanzados en las otras tres secuencias (Figura 7a).

Un comportamiento similar se observó en la fase con lotus de la secuencia 4, con niveles poblacionales bajos y constantes (Figura 7d). En esta secuencia la población de *Trichoderma* spp. aumentó en el rastrojo inmediatamente luego de comenzar la fase agrícola, y posteriormente (luego de un año y medio de comenzada esa fase) empezó a incrementarse la población en el suelo.

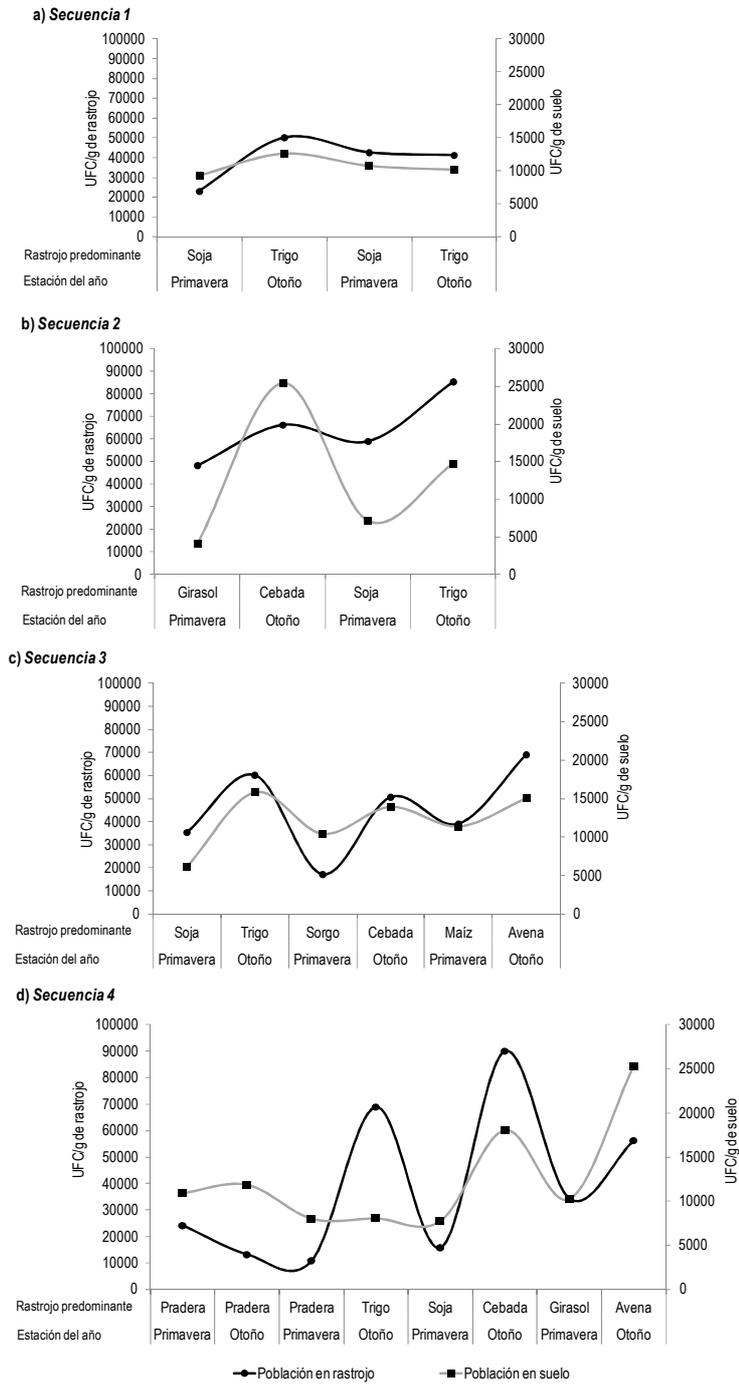


Figura 7: Evolución de la densidad poblacional de *Trichoderma* spp. en el suelo y en el rastrojo en función del rastrojo predominante y la estación del año según la secuencia de cultivos

3.5.4. Relación entre las propiedades químicas del suelo y la población de *Trichoderma spp.*

No hubo correlación significativa entre las poblaciones de *Trichoderma spp.* en el suelo y las propiedades químicas del mismo estimadas a través del contenido de materia orgánica (MO), de fósforo (P), de potasio (K), pH del suelo (pH), relación carbono/nitrógeno (C/N), y porcentaje de nitrógeno total (%N) (Figura 8).

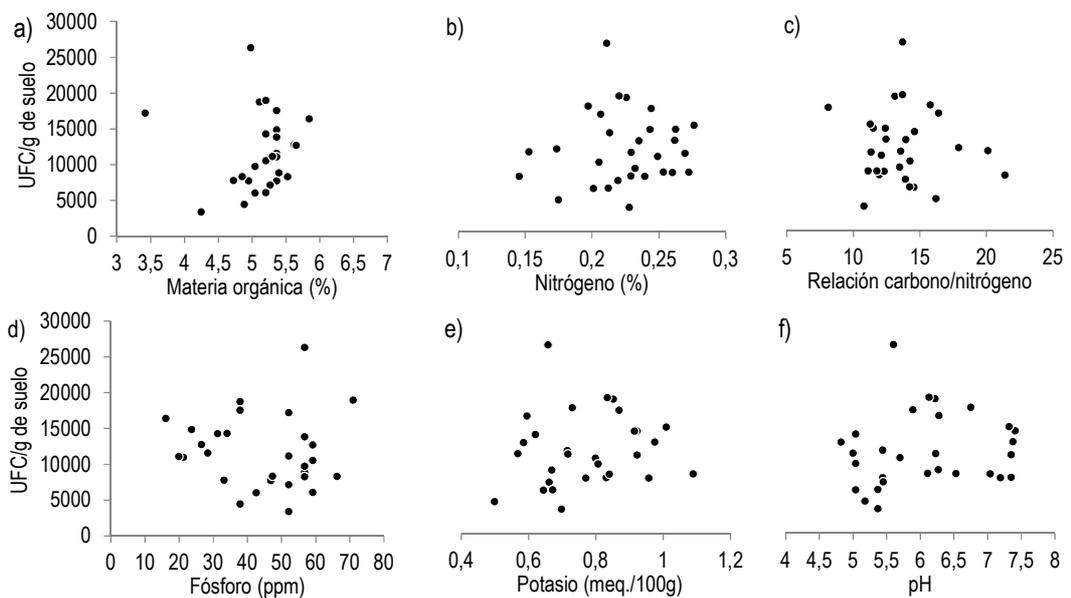


Figura 8: Densidad poblacional de *Trichoderma spp.* en el suelo en el otoño 2011 en función del contenido de a) MO, b) %N, c) C/N, d) P, e) K, y f) pH del suelo

A su vez, tampoco se detectó un efecto significativo de los distintos tratamientos sobre las propiedades químicas mencionadas (Cuadro 2). El contenido de MO promedio fue de 5,2 %, el de P 44,2 ppm, el pH del suelo 6,1, el contenido de nitrógeno promedio 0,22 %, el de K 0,78 meq/100g de suelo y la relación C/N promedio 13,7.

Cuadro 2: Propiedades químicas del suelo del sitio experimental. Contenido de Materia orgánica (MO), Fósforo (P), potasio (K), pH del suelo (pH), relación C/N y porcentaje de nitrógeno (%N) del suelo según tratamiento de cada secuencia. Muestreo realizado en otoño 2011.

Secuencia	Tratamiento	MO (%)	P (ppm)	pH	%N	K(meq/g)	C/N
1	1	5,3	43,4	6,0	0,20	0,85	16,0
2	2	5,2	47,3	6,7	0,22	0,84	13,8
	3	5,3	47,7	6,6	0,25	0,81	16,0
3	4	5,2	37,1	5,8	0,20	0,66	15,9
	5	5,3	38,8	6,0	0,21	0,75	15,0
	6	5,3	42,1	5,7	0,24	0,80	12,9
4	7	5,2	52,1	6,7	0,24	0,86	12,4
	8	5,2	53,7	5,4	0,22	0,70	13,6
	9	5,2	39,5	6,4	0,24	0,84	12,7
	10	4,5	40,1	5,8	0,23	0,72	11,8
	<i>Promedio</i>	5,2	44,2	6,1	0,22	0,78	13,7
	<i>DMS</i>	1,27	33,0	2,4	0,10	0,52	8,6
	<i>C.V. (%)</i>	8,4	25,5	13,3	15,4	22,6	21,5

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para ninguno de los parámetros ($P < 0,05$)

3.6. Discusión

Los diferentes cultivos evaluados generaron un impacto diferencial sobre las poblaciones nativas de *Trichoderma* spp. presentes en el suelo y en el rastrojo del sitio experimental. Esto

determina la posibilidad de manejar la población nativa de *Trichoderma* spp a través de los componentes de las secuencias de cultivos, y a su vez identificar ambientes propicios para el mantenimiento de altas poblaciones de *Trichoderma* ante eventuales inoculaciones inundativas con este agente de biocontrol.

A lo largo de los años la investigación se ha concentrado en las comunidades microbianas benéficas del suelo para el control de enfermedades (Kinkel *et al.*, 2011), existiendo actualmente escasa información sobre la población de *Trichoderma* en los rastrojos de los cultivos. En este sentido, Gao *et al.* (2007) encontraron mayor densidad poblacional y actividad de *Trichoderma* favorecidas por la presencia de sustratos con relaciones carbono/nitrógeno similares a las de los rastrojos de cebada, avena y trigo (tan altas como 80/1). En concordancia con los resultados de este trabajo, Pereyra *et al.* (2012) muestran que los rastrojos de cebada presentaron mayores niveles de colonización de *Trichoderma* spp. que otros cultivos extensivos, inclusive que otros cultivos de invierno como raigrás y trigo.

Al mismo tiempo, los resultados del presente estudio indican que existieron diferencias significativas en la densidad poblacional de *Trichoderma* spp. entre los rastrojos de cebada correspondiente a distintas secuencias, lo que demuestra que existió también un efecto de la secuencia de cultivos más allá del impacto individual de los mismos. Al respecto, Pereyra *et al.* (2012) también encontraron que los rastrojos de cebada colectados de sistemas en agricultura continua presentaban mayor densidad poblacional de *Trichoderma* spp. que aquellos provenientes de sistemas agrícolas con praderas. Estas diferencias generadas por los cultivos antecesores posiblemente están definidas por la población inicial de *Trichoderma* spp. en el momento en que los rastrojos de cebada comenzaron a descomponerse. Siendo menor la población en la cebada de la secuencia 4 probablemente debido al efecto depresivo

que mostró la pradera de *Lotus corniculatus* sobre la población del hongo, tanto en suelo como en rastrojo.

Sin embargo, cuando se cuantificó la población en el conjunto de rastrojos de cada secuencia, el tratamiento con predominancia de rastrojo de cebada de la secuencia 4 (la secuencia que incluye lotus) tuvo los mayores niveles de *Trichoderma* spp. Esto se explica por el peso relativo del rastrojo de cebada sobre el rastrojo total entre las tres secuencias con este cultivo. En la secuencia 4 fue donde el rastrojo de cebada tuvo mayor predominio, en contraste con la secuencia 2 y 3 donde el rastrojo de los cultivos de verano (con menor población de *Trichoderma* spp.) representaron un porcentaje mayor del total del rastrojo presente. No obstante esto, los rastrojos de cebada mostraron consistentemente ser los que más favorecieron a *Trichoderma* spp.

En relación a esto, los máximos niveles poblacionales de *Trichoderma* spp. registrados en otoño en la secuencia 3 fueron sustancialmente menores a los encontrados en las secuencias 2 y 4. En estas dos últimas secuencias el rastrojo de los cultivos de invierno tuvo mayor representación en el rastrojo total, tanto en otoño como en primavera, debido a la menor participación en las muestras del girasol y la soja en relación al sorgo y al maíz.

Asimismo, las poblaciones de *Trichoderma* spp. en el suelo tuvieron una respuesta significativa a los tratamientos. Varios autores han demostrado que las densidades poblacionales de *Trichoderma* spp. en el suelo responden a distintas prácticas de manejo, inclusive a la rotación de cultivos (Vargas Gil *et al.*, 2008; Bulluck *et al.*, 2002; Causin *et al.*, 1995; Lipps y Deep, 1991). Vargas Gil *et al.* (2008) encontraron mayor población de *Trichoderma* spp. luego del cultivo de maíz en comparación con soja y maní. Resultados similares fueron reportados por Larkin (2003). Estos autores adjudican el incremento de la

población del hongo al aumento en el contenido de materia orgánica del suelo por la inclusión de gramíneas C4 en la rotación. Estos resultados contrastan a los obtenidos en este trabajo ya que aquí el contenido de materia orgánica del suelo no se vio modificado por los distintos cultivos de la rotación. Sin embargo se constató una regresión lineal significativa entre la densidad poblacional de *Trichoderma* spp. en el rastrojo en el otoño 2010 y su nivel poblacional en el suelo en otoño 2011. Esto significaría que en las condiciones de este estudio una parte de la variabilidad de la densidad poblacional de *Trichoderma* spp. en el suelo estuvo definida por el nivel poblacional en el rastrojo de los cultivos de la secuencia. Lo cual demuestra un efecto directo de los cultivos más allá de las propiedades químicas del suelo. En este sentido, en los tratamientos donde la población de *Trichoderma* spp. en el suelo fue significativamente mayor tanto en otoño 2011, como en primavera 2009, la cebada estuvo entre los últimos tres cultivos que antecedieron al muestreo.

Varios trabajos han mostrado la respuesta de las comunidades fúngicas del suelo, y específicamente *Trichoderma* spp., a cambios en las propiedades químicas de los suelos (Vargas Gil *et al.*, 2008; Chavez, 2006; Larkin, 2003; Rabeendran, 2000). Vargas Gil *et al.* (2008) encontraron mayor población de *Trichoderma* en aquellos suelos donde el contenido de materia orgánica, nitrógeno total, fósforo y relación C/N fue más elevado. En base a esto, el efecto de las distintas secuencias sobre la población de *Trichoderma* spp. en el suelo se podría lograr a través de su impacto sobre la dinámica de nutrientes y la materia orgánica del suelo (Vargas Gil *et al.*, 2008; Dolan *et al.*, 2006; Morón, 2003). Sin embargo en este trabajo no fue encontrado un efecto de las distintas secuencias de cultivos sobre las propiedades químicas de los suelos. Probablemente debido a que todas las secuencias evaluadas son sistemas agrícolas en siembra directa sin barbechos, donde solo se cosecha el grano y se

adicionan fertilizantes en función de la necesidad de los cultivos, lo cual determina un importante aporte de carbono y de nutrientes año tras año. Esto pudo mitigar las diferencias esperables en el carbono orgánico y el nitrógeno total producidas por la presencia de gramíneas C4 y la pastura de lotus en las secuencias (Morón, 2003). Estos resultados resaltan el impacto directo de los cultivos como fuente de carbono sobre el inóculo de *Trichoderma* spp. en el suelo.

Por otra parte, existió una marcada variación estacional de la población de *Trichoderma* spp. mostrando un incremento en el otoño en relación a la primavera tanto en el suelo como en el rastrojo. Resultados similares encontraron Hagn *et al.* (2003), donde las especies predominantes de *Trichoderma* en el suelo fueron aisladas en su mayoría en otoño.

Bien es sabido que el crecimiento de los hongos es gobernado principalmente por dos factores, temperatura y humedad (Moore y Landecker, 1996). Las condiciones hídricas afectan las actividades de este hongo, en especial la germinación de las esporas, el crecimiento del tubo polínico, y el crecimiento micelial (Kredics *et al.*, 2003; Moore y Landecker, 1996). Para evaluar el efecto de estos factores se consideró el régimen pluviométrico y térmico cuatro meses antes de los muestreos. Este período de tiempo se consideró prudente para determinar el efecto acumulado del crecimiento del hongo en los periodos previos a los muestreos. Un periodo de tiempo mayor sería excesivo teniendo en cuenta que los rastrojos predominantes tienen seis meses de descomposición, y un periodo de tiempo menor posiblemente no considere eventos climáticos que expliquen la evolución del hongo.

Wong *et al.* (2002) muestran que la colonización por *T. konongii* y la reducción de las estructuras de *Fusarium pseudograminearum* en rastrojos de trigo fue mayor en suelos húmedos (-0,3 y -0,03 MPa) que en suelos secos (-50 MPa). Sin embargo Moore y Landecker (1996) mencionan que el crecimiento de este hongo puede verse limitado en suelos con exceso de humedad debido a que la aireación del suelo y por ende el suministro de oxígeno es limitado en esos casos. En definitiva, esto sugiere que altos contenidos de humedad, mientras no limiten el intercambio gaseoso, favorecen el crecimiento y actividad de *Trichoderma*.

Los resultados aquí obtenidos indican que la densidad poblacional de *Trichoderma* spp. en el suelo fue más elevada después del período donde se registraron mayor cantidad lluvias (otoño 2010), en comparación con el resto de las estaciones evaluadas. Inclusive que la misma estación al año siguiente, la cual presentó además similar evolución de la temperatura previa al muestreo. Mostrando así un efecto que puede haber sido directo sobre el crecimiento del hongo en el suelo, y/o a través del lavado del inóculo en el rastrojo por excesos de lluvia (1227 mm en otoño 2010 vs. 545 mm en otoño 2011).

El lavado del rastrojo provocado por ese exceso de lluvia probablemente explique la menor densidad poblacional de *Trichoderma* spp. promedio en el rastrojo en otoño 2010 en relación al otoño 2011. Asimismo las densidades poblacionales tanto en el suelo como en rastrojo en la primavera 2009 fueron mayores que la primavera 2010. Estas diferencias posiblemente estén explicadas por el déficit hídrico registrado en octubre y noviembre de 2010, en comparación con las lluvias ocurridas en los mismos meses del año 2009.

Por otra parte, la temperatura óptima de *Trichoderma* spp. varía entre sus especies pero al igual que la mayoría de los hongos se desarrolla en un rango de temperaturas mesofílicas

que oscila en la mayoría de los casos entre 15 y 30 °C (Nampoothiri *et al.*, 2004; Kredics *et al.*, 2003). En este sentido, Cabrera (2009) muestra que la temperatura óptima de crecimiento para la mayoría de las cepas nativas de *T. koningiopsis* y *T. atroviride* de Uruguay estuvo entre 25 y 28 °C. Mostrando también que las cepas nativas tienen la capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas, las cuales oscilaron entre 10 y 35 °C. En los tres años de evaluación, la temperatura promedio en los últimos dos meses previos a los muestreos tanto de primavera como de otoño fue similar (aproximadamente 20 °C). La temperatura aumentó antes de los muestreos de primavera, oscilando en un rango de 20 a 22 °C en los meses del muestreo. Mientras que hacia el otoño la temperatura descendió, situándose entre 15 y 18 °C al momento de los muestreos.

Estos resultados muestran que hubo un efecto del clima sobre la población nativa de *Trichoderma* spp.. Sin embargo el efecto clima no estaría explicando el aumento de su población en otoño, ya que las condiciones ambientales en esa estación no fueron siempre más favorables para *Trichoderma* que las registradas en las primaveras evaluadas. El incremento de la población de *Trichoderma* spp. en otoño posiblemente esté más asociado a la predominancia de los rastrojos de los cultivos de invierno en esa estación, principalmente cebada y avena.. Esto explicaría porque en los otoños de la secuencia 1 y de la fase pradera de la secuencia 4 (donde no hay o hay muy poco rastrojo de esos dos cultivos) la densidad poblacional de *Trichoderma* spp. es igual o más baja que en los rastrojos colectados en primavera. No obstante esto, debido a que la evolución de la temperatura fue diferente en primavera que en otoño, no es posible descartar completamente un efecto de esta variable sobre la evolución de *Trichoderma* spp.

De cualquier manera, estos resultados permiten identificar ambientes más hospitalarios para *Trichoderma* spp. que dieron como resultado altos niveles poblacionales del hongo. Donde la estación del año a través de la composición botánica del rastrojo, así como las condiciones hídricas, son factores a tener en cuenta para el manejo de la población de *Trichoderma* spp. En el marco de una estrategia inoculativa con cepas nativas de *Trichoderma*, los resultados aquí obtenidos evidencian que en otoño, en años con un régimen hídrico promedio, y con secuencias de cultivos donde predomina el rastrojo de cebada serían los ambientes más indicados para lograr altos y estables niveles poblacionales de *Trichoderma* spp. Este enfoque ha permitido obtener resultados más consistentes y duraderos en relación al manejo tradicional de las inoculaciones (Berg *et al.*, 2005; Wiggins y Kinkel, 2005; Mazzola *et al.*, 2001), bajo la premisa que el problema no es la falta de microorganismos antagonistas sino la falta de un ambiente que mantenga elevadas sus densidades poblacionales y actividades relacionadas al control biológico (Vargas Gil *et al.*, 2008).

Esta línea de investigación constituye un insumo clave para futuros trabajos que busquen reducir el efecto de las enfermedades en la producción de cultivos, a través del manejo de las poblaciones de *Trichoderma*. Este estudio describe por primera vez, para las condiciones de Uruguay, la densidad de la población salvaje de *Trichoderma* en el suelo y en el rastrojo, así como su variación estacional. En este sentido, los resultados obtenidos en este estudio permiten identificar ambientes que naturalmente favorecen altas poblaciones de *Trichoderma*, donde es esperable obtener una mayor respuesta a las inoculaciones de este agente de biocontrol. La cuantificación del impacto de la inoculación sobre la sanidad de los cultivos es necesaria para poder estimar el verdadero alcance del control biológico en estos sistemas.

3.7. Agradecimientos

Se agradece a: Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por la financiación del proyecto de investigación. Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por su aporte a través de las becas de Iniciación a la investigación y Becas para Posgrados Nacionales. Comisión Coordinadora del Interior (CCI) por la financiación de instancias de aprendizaje como cursos y pasantías. A los funcionarios de la Estación Mario A. Cassinoni que participaron en el proyecto de investigación. A Paula Conde por su colaboración a través del entrenamiento sobre la técnica de cuantificación de *Trichoderma* spp.

3.8. Bibliografía

- Beare M, Pohlad B, Wright D, Coleman D. 1993. Residue placement and fungicide effects on fungal communities in conventional and non-tillage soils. *Soil Science Society of American Journal*, 57:392-399.
- Berg, G., Zachow, C., Lottman, J., Gotz, M., Costa, R., Smalla, K. 2005. Impact of plant species and site on rhizosphere-associated fungi antagonist to *Verticillium dahliae* Kleb. *Applied and Environmental Microbiology* 71:4203-4213.
- Bray, R. H. y Kurtz, L. T. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* 59:39-45
- Bujold I, Paulits T, Carisse O. 2001. Effect of *Microsphaeropsis* sp. on the production of perithecia and ascospores of *Giberella zeae*. *Plant Disease*, 85:977-984.
- 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.

- Cabrera M, 2009. Control biológico de la fusariosis del trigo [Tesis de Maestría]. Montevideo: Facultad de Ciencias-Universidad de la República. Pp. 90
- Causin R, D'Ambra V, Montecchio L. 1995. Effetto di residui colturali di diversa natura sulla popolazione di *Trichoderma* sp. naturalmente presente in un terreno. *Informatore Fitopatologico*, 45: 55-57.
- Chavez M. 2006. Producción de *Trichoderma* sp. y evaluación de su efecto en cultivo de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) [Tesis de grado] Bogotá: Facultad de Ciencias. Pp. 113
- Dennis C y Webster J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. *British Mycological Society*, 57: 25-39.
- Diamond H y Cooke B. 2003. Preliminary studies on biological control of *Fusarium* ear blight complex of wheat. *Crop Protection*, 22:99-107.
- DGSA-MGAP (Dirección General Servicios Agrícolas-Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca), 2010. Importación de Productos Fitosanitarios 2010. Resumen estadístico ejercicio 2010 [En línea]. Consultado en julio 2011. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/dgssaa/DivAnalisisDiagnostico/DAYD_PROFIT_ESTADISTICA.htm
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2012. Encuesta Agrícola "Primavera-Verano 2011" [En línea]. Consultado en junio 2013. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,114,O,S,0,MNU;E;31;2;MNU;..>

- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2011. Encuesta Agrícola “Primavera 2011” [En línea]. Consultado en junio 2013. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,114,O,S,0,MNU;E;31;2;MNU;,.>
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2008. Encuesta Agrícola “Primavera 2007” [En línea]. Consultado en junio 2013. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,114,O,S,0,MNU;E;31;2;MNU;,.>
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2001. SIEMBRA DIRECTA: Su aplicación en el área de cultivos de secano. Año agrícola 2000/01. [En línea]. Consultado en junio 2013. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,114,O,S,0,MNU;E;31;2;MNU;,.>
- Dolan MS, Clapp CE, Allmaras RR, Baker JM, Molina JAE. 2006. Soil organic carbon and nitrogen in a Minnesota soil as related to tillage residue and nitrogen management. *Soil Science Society of American Journal*, 89:221–231
- Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Komoj M, Bissett J, Szakacs G, Kubicek CP. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*, 42:813–828.
- Fernandez M. 1992a. The effect of *Trichoderma harzianum* on fungal pathogens infecting wheat and black oat straw. *Soil Biology & Biochemistry*, 24:1031-1034
- Fernandez, M. 1992b. The effect of *Trichoderma harzianum* on fungal pathogens infecting soybean residues. *Soil Biology & Biochemistry*, 24: 1031-1029.

- Gao L, Sun MH, Liu XZ, Che YS. 2007. Effect of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycological Research*, 111:87-92.
- Hagn A, Pritsch K, Schloter M, Munch, C. 2003. Fungal diversity in agricultural soil under different farming management systems, with special reference to biocontrol strains of *Trichoderma* spp. *Biology and Fertility of Soils*, 38:236-244.
- Hoitink H y Boehm M. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology*, 37:427-446. 14
- Howell CR. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*, 87: 1-8
- Khan NI, Schisler DA, Boehm MJ, Lipps PE, Slininger PJ. 2004. Field testing of antagonists of *Fusarium* head blight incited by *Gibberella zeae*. *Biological Control*, 29:245-255.
- Kinkel L, Bakker M, Shlatter D. 2011. A Coevolutionary Framework for Managing. *Annual Review of Phytopathology*, 49:47–67.
- Kredics L, Antal Z, Manczinger L, Szekeres A, Kevei F, Nagy E. 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology and Biotechnology*, 41: 37-42
- Larkin RP. 2003. Characterization of soil microbial communities under different potato cropping systems by microbial population dynamics, substrate utilization, and fatty acid profiles. *Soil Biology & Biochemistry*, 35:1451–1466

- Lipps PE y Deep I. 1991. Influence of tillage and crop rotation on yield, stalk rot, and recovery of *Fusarium* and *Trichoderma* spp. from corn. *Plant Disease*, 75:828-833.
- Mazzola M, Granatstein D, Elfving D, Mullinix K. 2001. Suppression of specific apple root pathogens by *Brassica napus* seed meal amendment regardless of glucosinolate content. *Phytopathology*, 91:673-679.
- Moore y Landecker E. 1996. *Fundamentals of the fungi*. New Jersey: Prentis Hall. 574 pp.
- Morón A. 2003. Principales contribuciones del experimento de rotaciones cultivos-pasturas de (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) La Estanzuela en el área de fertilidad de suelos (1963-2003). Serie Técnica 134. p 1-8
- Nampoothiri K, Baiju T, Sandhya C, Sabu A, Szakacs C, Pandey A. 2004. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*, 39:1583-1590
- Perelló A, Moreno M, Mónaco C, Simón M, Cordo C. 2009. Biological control of *Septoria tritici* blotch on wheat by *Trichoderma* spp. under field conditions in Argentina. *BioControl*, 54:113-122
- Perelló A, Moreno V, Mónaco C, Simón MR. 2008. Effect of *Trichoderma* spp. isolates for biological control of tan spot of wheat caused *Phyrenophora tritici-repentis* under field conditions in Argentina. *Biological Control*, 53:895-904.
- Pereyra S, Ríos A, Zerbino S. 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: *Actividades de Difusión N° 674*. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) La Estanzuela. 101-105 pp.

- Pereyra S, Garmendia G, Cabrera M, Vero S, Pianzola M, Dill-Macky, R. 2005. Control biológico de la fusariosis de la espiga de trigo y cebada. *Agrociencia*, 9:337-343
- Pérez CA, Hoffman E, Viega L, Villar HA, Ernst O. 2011. Manejo de enfermedades en sistemas agrícolas: mitos y realidades. En: II Simposio Nacional de Agricultura. 29 y 30 setiembre; 2011; Paysandú, Uruguay. Pp. 119-131
- 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
- Peters R, Sturz A, Carter M, Sanderson J. 2003. Developing disease-suppressive soils through crop rotation and tillage management practices. *Soil & Tillage Research*, 72:181-192.
- Salehpour M, Etebarian H, Roustaei A, Khodakaramian G, Aminian H. 2005. Biological Control of Common Root Rot of Wheat (*Bipolaris sorokiniana*) by *Trichoderma* Isolates. *Plant Pathology Journal*, 4(1): 85-90.
- Rabeendran N. 2000. Biological control of Sclerotinia diseases of vegetables [Tesis de doctorado]. Canterbury Lincoln University. pp 185.
- Vargas Gil S, Pastor S, March GJ. 2009. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. *Micobiological Research*, 164: 196-205.
- Vargas Gil S, Meriles JM, Haro R, Casini C, March GJ. 2008. Crop rotation and tillage systems as a proactive strategy in the control of peanut fungal soilborne diseases. *BioControl*, 53: 685-698

- Walkley A y Black IA. 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.
- Wells, H. 1988. Trichoderma as a biocontrol agent. En: Mukerji, K, Garg K. [Eds.] Biocontrol of plant diseases. Volume 1. CRC Press. USA. pp. 71-82.
- Wiggins B y Kinkel L. 2005. Green manures and crop sequences influence alfalfa root rot and pathogen inhibitory activity among soil-borne streptomycetes. Phytopathology, 95:178-185.
- Williams J, Clarkson JM, Mills PR, Cooper RM. 2003. A Selective Medium for Quantitative Reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* Compost. Applied and Environmental Microbiology, 69 (7): pp. 4190–4191
- Wong W, Mead JA, Croff MC. 2002. Effect of temperature, moisture, soil type and *Trichoderma* species on the survival of *Fusarium pseudograminearum* in wheat straw. Australasian Plant Pathology, 31:253-257

4. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Una gran diversidad de especies en la población nativa de *Trichoderma* fue encontrada en este estudio, donde once grupos taxonómicos fueron identificados. Sin embargo, tanto en el suelo, como en el rastrojo hubo un claro predominio de los grupos taxonómicos identificados como “*T. harzianum*” y “Rufa A”. Aún más relevante fue el resultado obtenido en las pruebas de antagonismo, donde todas las cepas lograron altos niveles de inhibición de *Bipolaris sorokiniana* y *Drechslera tritici-repentis*, mostrando además diferencias intra-específicas e inter-específicas.

Por otro lado, los diferentes cultivos evaluados generaron un impacto diferencial sobre las poblaciones nativas de *Trichoderma* spp. presentes en el suelo y en el rastrojo del sitio experimental. En este sentido, los rastrojos de cebada fueron los que presentaron mayores niveles de colonización de *Trichoderma* spp. Por otro lado, se constató una regresión lineal significativa entre la densidad poblacional de *Trichoderma* spp. en el rastrojo en el otoño 2010 y su nivel poblacional en el suelo en otoño 2011. Aunado a esto, no se encontró una asociación entre las propiedades químicas del suelo y la densidad poblacional de *Trichoderma* spp., lo que acentúa el impacto directo de los cultivos sobre población del hongo y no a través de las propiedades químicas de los suelos. Así, la cebada fue uno de los cultivos antecesores en aquellos tratamientos donde las poblaciones de *Trichoderma* spp. fueron mayores en el suelo.

Por otra parte, existió una marcada variación estacional de la población de *Trichoderma* spp. mostrando un incremento en el otoño en relación a la primavera tanto en el suelo como en el rastrojo.

Estos resultados confirman la presencia de antagonistas de *B. sorokiniana* y *D. tritici-repentis* en el suelo y en el rastrojo, y que probablemente altas poblaciones de estos antagonistas podrían aportar a disminuir el inóculo generado por estos patógenos en los rastrojos.

En el marco de una estrategia inoculativa con cepas nativas de *Trichoderma*, los resultados aquí obtenidos evidencian que en otoño, en años con un régimen hídrico promedio, y con secuencias de cultivos donde predomina el rastrojo de cebada serían los ambientes más indicados para lograr altos y estables niveles poblacionales de *Trichoderma* spp. Para lograr esto además se deberían incluir cepas de las especies con mayor frecuencia en los

ambientes a ser inoculados (Hoitink y Boehm, 1999). Este enfoque ha permitido obtener resultados más consistentes y duraderos en relación al manejo tradicional de las inoculaciones (Berg *et al.*, 2005; Wiggins y Kinkel, 2005; Mazzola *et al.*, 2001), bajo la premisa que el problema no es la falta de microorganismos antagonistas sino la falta de un ambiente que mantenga elevadas sus densidades poblacionales y actividades relacionadas al control biológico (Vargas Gil *et al.*, 2008).

Este estudio describe por primera vez, para las condiciones de Uruguay, la densidad de la población nativa de *Trichoderma* en el suelo y en el rastrojo, su variación estacional, su composición taxonómica, así como su potencial como antagonista frente a patógenos de importancia económica. Esta línea de investigación constituye un insumo clave para futuros trabajos que busquen reducir el efecto de las enfermedades en la producción de cultivos, a través del manejo de las poblaciones de *Trichoderma*. Su continuación evaluando el impacto de la inoculación sobre la sanidad de los cultivos es necesaria para poder estimar el verdadero alcance del control biológico en estos sistemas.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal SC, Khare MN, Agrawal PS. 1977. Biological Control of *Sclerotium rolfsii* causing collar rot of lentil. *Indian Phytopathology*, 30:176-179.
- Antal Z, Varga J, Kredics L, Szekeres A, Hatvani L, Manczinger L, Vágvölgyi C, Nagy E. 2006. Intraspecific mitochondrial DNA polymorphism within the emerging filamentous fungal pathogen *Trichoderma longibrachiatum*. *Journal of Medical Microbiology*, 55:31–35.
- Bailey K y Lazarovits G. 2003. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil and Tillage Reserch*, 72:169-180
- Baker KF y Cook RJ. 1974. *Biological Control of Plant Pathogens*. San Francisco-USA: CRC Press. Freeman 442 p.
- Beare M, Pohlád B, Wright D, Coleman D. 1993. Residue placement and fungicide effects on fungal communities in conventional and non-tillage soils. *Soil Science Society of American Journal*, 57:392-399.
- Berg G, Zachow C, Lottman J, Gotz M, Costa R, Smalla K. 2005. Impact of plant species and site on rhizosphere-associated fungi antagonist to *Verticillium dahliae* Kleb. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:4203-4213.
- Bossio D, Scow K, Gunapala N, Graham K. 1998. Determinants of soil Microbial Communities: Effects of Agricultural Management, Season, and Soil Type on Phospholipid Fatty Acid Profiles. *Microbial Ecology*, 36:1-12
- Bray RH y Kurtz LT. 1945. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science Society of American Journal*, 59:39-45
- Bujold I, Paulits T, Carisse O. 2001. Effect of *Microsphaeropsis* sp. on the production of perithecia and ascospores of *Giberella zae*. *Plant Disease*, 85:977-984.
- 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.
- Cabrera M, 2009. Control biológico de la fusariosis del trigo [Tesis de Maestría]. Montevideo: Facultad de Ciencias-Universidad de la República. Pp. 90

- Causin R, D'Ambra V, Montecchio L. 1995. Efecto de residuos colturales de diversa naturaleza sobre la población de *Trichoderma* sp. naturalmente presente en un terreno. *Informatore Fitopatologico*, 45: 55-57.
- Chavez M. 2006. Producción de *Trichoderma* sp. y evaluación de su efecto en cultivo de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) [Tesis de grado] Bogotá: Facultad de Ciencias. Pp. 113
- Dennis C y Webster J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. *British Mycological Society*, 57: 25-39.
- Diamond H y Cooke B. 2003. Preliminary studies on biological control of *Fusarium* ear blight complex of wheat. *Crop Protection*, 22:99-107.
- Díaz M, Pereyra S, Stewart S, Mieres J, 2002. Fusariosis de la espiga en trigo y cebada. Hoja de Divulgación N° 79. Marzo 2002. pp. 66
- Díaz, M, Stewart, S. 1997. Enfermedades de trigo y cebada en siembra directa en Uruguay. In: VII Congreso Nacional de Ingeniería Agronómica. Jornada de Siembra Directa. Montevideo. pp.67-70.
- Díaz M, Pereyra S, Stewart S. 1996. Manejo de las enfermedades en trigo y cebada bajo siembra directa. En: Siembra Directa pp. 27-31.
- DGSA-MGAP (Dirección General Servicios Agrícolas-Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca), 2010. Importación de Productos Fitosanitarios 2010. Resumen estadístico ejercicio 2010 [En línea]. Consultado en julio 2011. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/dgssaa/DivAnálisisDiagnostico/DAYD_PROFIT_ESTADISTICA.htm
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2012. Encuesta Agrícola "Primavera-Verano 2011" [En línea]. Consultado en junio 2013. Disponible en: [http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,114,O,S,0,MNU;E;31;2;MNU;,"](http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,114,O,S,0,MNU;E;31;2;MNU;,)
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2011. Encuesta Agrícola "Primavera 2011" [En línea]. Consultado en junio 2013. Disponible en: [http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,114,O,S,0,MNU;E;31;2;MNU;,"](http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,114,O,S,0,MNU;E;31;2;MNU;,)
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2008. Encuesta Agrícola "Primavera 2007" [En línea]. Consultado en junio 2013. Disponible en: [http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,114,O,S,0,MNU;E;31;2;MNU;,"](http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,114,O,S,0,MNU;E;31;2;MNU;,)

- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2001. SIEMBRA DIRECTA: Su aplicación en el área de cultivos de secano. Año agrícola 2000/01. [En línea]. Consultado en junio 2013. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hqxpp001.aspx?7,5,114,O,S,0,MNU;E:31;2;MNU;>
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. 2011. InfoStat versión 2011[En línea]. 30 de julio de 2013. Grupo InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: www.infostat.com.ar
- Dolan MS, Clapp CE, Allmaras RR, Baker JM, Molina JAE. 2006. Soil organic carbon and nitrogen in a Minnesota soil as related to tillage residue and nitrogen management. *Soil Science Society of American Journal*, 89:221–231
- Doran J y Zeiss M. 2000. Soil health and sustainability: managing the abiotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, 15:3-11
- Druzhinina IS, Komon-Zelazowska M, Kredics L, Hatvani L, Antal Z, Belayneh T, Kubicek CP. 2008. Alternative reproductive strategies of *Hypocrea orientalis* and genetically close but clonal *Trichoderma longibrachiatum*, both capable of causing invasive mycoses of humans. *Microbiology*, 154:3447–3459.
- Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Komoj M, Bissett J, Szakacs G, Kubicek CP. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*, 42:813–828.
- Fernandez M. 1992a. The effect of *Trichoderma harzianum* on fungal pathogens infecting wheat and black oat straw. *Soil Biology & Biochemistry*, 24:1031-1034
- Fernandez, M. 1992b. The effect of *Trichoderma harzianum* on fungal pathogens infecting soybean residues. *Soil Biology & Biochemistry*, 24: 1031-1029.
- Gao L, Sun MH, Liu XZ, Che YS. 2007. Effect of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycological Research*, 111:87-92.
- Garret, S. 1970. Pathogenic root-infecting fungi. Cambridge: Cambridge University Press. 294 p.
- Hagn A, Pritsch K, Schloter M, Munch, C. 2003. Fungal diversity in agricultural soil under different farming management systems, with special reference to biocontrol strains of *Trichoderma* spp. *Biology and Fertility of Soils*, 38:236-244.

- Harman G, Howell C, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology*, 2(1):43–56
- Hatvani L, Antal Z, Manczinger L, Szekeres A, Druzhinina IS, Kubicek CP, Nagy A, Nagy E, Vágvölgyi C, Kredics L. 2007. Green mold diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. are caused by related but phylogenetically different *Trichoderma* species. *Phytopathology* 97:532-537.
- Hillis DM y Bull JJ. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42:142-152.
- Hoitink H y Boehm M. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology*, 37:427-446. 14
- Howell CR. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*, 87: 1-8
- Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T. 2005. MAFFT version 5: Improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*, 33: 511-518.
- Khan NI, Schisler DA, Boehm MJ, Lipps PE, Slininger PJ. 2004. Field testing of antagonists of Fusarium head blight incited by *Gibberella zeae*. *Biological Control*, 29:245-255.
- Kinkel L, Bakker M, Shlatter D. 2011. A Coevolutionary Framework for Managing. *Annual Review of Phytopathology*, 49:47–67.
- Knudsen I, Debosz K, Hockenhull J, Jensen D, Elmholt S. 1999. Suppressiveness of organically and conventionally managed soils towards brown foot rot of barley. *Applied Soil Ecology*, 12:61-72
- Kopchinskiy A, Komon M, Kubicek CP, Druzhinina IS. 2005. TrichoBLAST: A multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. *Mycological Research*, 109(06):658-660.
- Kredics L, Antal Z, Manczinger L, Szekeres A, Kevei F, Nagy E. 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology and Biotechnology*, 41: 37-42
- Kubicek CP, Komon-Zelazowska M, Druzhinina IS. 2008. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *Journal of Zhejiang University Science*, 9(10):753-763.

- Kubicek CP, Bissett J, Druzhinina I, Kulling-Gradinger C, Szakacs G. 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology*, 38:310-319.
- Larkin RP. 2003. Characterization of soil microbial communities under different potato cropping systems by microbial population dynamics, substrate utilization, and fatty acid profiles. *Soil Biology & Biochemistry*, 35:1451–1466
- Lazarovits G. 2001. Management of soil-borne plant pathogens with organic soil amendments: a disease control strategy salvaged from the past. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23:1-7.
- Lipps PE y Deep I. 1991. Influence of tillage and crop rotation on yield, stalk rot, and recovery of *Fusarium* and *Trichoderma* spp. from corn. *Plant Disease*, 75:828-833.
- Liu B, Glenn D, Buckley K. 2008. *Trichoderma* communities in soils from organic, sustainable, and conventional farms, and their relation with Southern blight of tomato. *Soil Biology & Biochemistry*, 40:1124–1136
- Luz W, Stockwell C, Bergstrim G. 2003. Biocontrol of *Fusarium graminearum*. En: Leonard, K, Bushnell. W. *Fusarium* Head Blight of wheat and barley. APS Press USA. pp. 381-394.
- Mazzola M, Granatstein D, Elfving D, Mullinix K. 2001. Suppression of specific apple root pathogens by *Brassica napus* seed meal amendment regardless of glucosinolate content. *Phytopathology*, 91:673-679.
- Migheli Q, Balmas V, Komoń-Zelazowska M, Scherm B, Fiori S, Kopchinskiy AG, Kubicek CP, Druzhinina IS. 2009. Soils of a Mediterranean hot spot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-European, invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. *Environmental Microbiology*, 11(1):35–46.
- Moore y Landecker E. 1996. *Fundamentals of the fungi*. New Jersey: Prentis Hall. 574 pp.
- Morón A. 2003. Principales contribuciones del experimento de rotaciones cultivos-pasturas de Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) La Estanzuela en el área de fertilidad de suelos (1963-2003). Serie Técnica 134. p 1-8
- Murray MG y Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8: 4321--4325.

- Muthumeenakshi S, Brown AE, Mills PR. 1998. Genetic comparison of the aggressive weed mould strains of *Trichoderma harzianum* from mushroom compost in North America and the British Isles. *Mycological Research*, 102:385-390.
- Nampoothiri K, Baiju T, Sandhya C, Sabu A, Szakacs C, Pandey A. 2004. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*, 39:1583-1590
- National Academy of Sciences (NAS). 1987. Research briefings 1987. Report of the research briefing panel on biological control in managed ecosystems. National Academy Press, Washington, DC. Pp. 68
- Neuhof T, Dieckmann R, Druzhinina IS, Kubicek CP, Von Döhren H. 2007. Intact-cell MALDI-TOF mass spectrometry analysis of peptaibol formation by the genus *Trichoderma/Hypocrea*: can molecular phylogeny of species predict peptaibol structures?. *Microbiology*, 153:3417-3437.
- Perelló A, Moreno M, Mónaco C, Simón M, Cordo C. 2009. Biological control of *Septoria tritici* blotch on wheat by *Trichoderma* spp. under field conditions in Argentina. *BioControl*, 54:113–122
- Perelló A, Moreno V, Mónaco C, Simón MR. 2008. Effect of *Trichoderma* spp. isolates for biological control of tan spot of wheat caused *Phyrenophora tritici-repentis* under field conditions in Argentina. *Biological Control*, 53:895-904.
- Perelló A, Mónaco C, Simón MR, Sisterna M, Dal Bello G. 2003. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. *Crop Protection*. 22:1099–1106
- Pereyra S, Ríos A, Zerbino S. 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: *Actividades de Difusión N° 674*. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) La Estazuela. 101-105 pp.
- Pereyra S, Garmendia G, Cabrera M, Vero S, Pianzola M, Dill-Macky, R. 2005. Control biológico de la fusariosis de la espiga de trigo y cebada. *Agrociencia Uruguay*, 9:337-343
- Pérez CA, Hoffman E, Viega L, Villar HA, Ernst O. 2011. Manejo de enfermedades en sistemas agrícolas: mitos y realidades. En: *II Simposio Nacional de Agricultura*. 29 y 30 setiembre; 2011; Paysandú, Uruguay. Pp. 119-131

- Pérez C, Carameso L, Fros D, Cadenazzi M, Ernst O. 2009. Manejo sanitario en sistemas sin laboreo; agrónomos o nutricionistas? En: Primer Simposio Nacional de Agricultura de Secano; 17 y 18 noviembre; 2009; Paysandú, Uruguay. pp. 141-160.
- 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
- Peters R, Sturz A, Carter M, Sanderson J. 2003. Developing disease-suppressive soils through crop rotation and tillage management practices. *Soil & Tillage Research*, 72:181-192.
- Posada D y Crandall KA. 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14:817-818.
- Salehpour M, Etebarian H, Roustaei A, Khodakaramian G, Aminian H. 2005. Biological Control of Common Root Rot of Wheat (*Bipolaris sorokiniana*) by Trichoderma Isolates. *Plant Pathology Journal*, 4(1): 85-90.
- Samuels GJ, Dodd SL, Gams W, Castlebury LA, Petrini O. 2002. Trichoderma species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 94:146–170.
- Schuhmacher R, Stoppacher N, Zeilinger S. 2007. Peptaibols of *Trichoderma atroviride*: screening, identification, and structure elucidation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. En: Méndez-Vilas A. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. pp. 609-617
- Rabeendran N. 2000. Biological control of Sclerotinia diseases of vegetables [Tesis de doctorado]. Canterbury Lincoln University. pp 185.
- Reis EM, Santos HP, Lhamby JC, Blum MC. 1992. Effect of soil management and crop rotation on the control of leaf blotches of wheat in southern Brazil. En: Congreso Interamericano de Siembra Directa; Villa Giordino, Argentina. pp 217-236.
- Rees EM. 1987. Effects of tillage practices on foliar diseases. En: Cornish PS and Pratley JE. *Tillage Melbourne and Sydney*. Inkata Press. p. 318-334.
- Stewart S. 2005. La *Phomopsis* o cancro del tallo del girasol. *Revista Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) N°2*, pp. 20-22

- Swofford DL. 2002. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10a [En línea]. 28 de Julio de 2013. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Disponible en: <http://www.sinauer.com/catalog/software-video/paup-phylogenetic-analysis-using-parsimony-and-other-methods-4-0-beta.html>
- Tronsmo A y Hjeljord L. 1998. Biological control with *Trichoderma* species. En: Boland G, David L. [Eds.] Plant-Microbe interactions and biological control. Marcel Dekker, Inc. United States of America (USA). pp 111-126.
- Vargas Gil S, Pastor S, March GJ. 2009. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. *Micobiological Research*, 164: 196-205.
- Vargas Gil S, Meriles JM, Haro R, Casini C, March GJ. 2008. Crop rotation and tillage systems as a proactive strategy in the control of peanut fungal soilborne diseases. *BioControl*, 53: 685-698
- Vilich V, Sikora R. 1998. Diversity in soilborne microbial communities: a tool for biological system management of root health. En: Boland, G y David, L. [eds.]. Plant-Microbe interactions and biological control. Marcel Dekker, Inc. USA. pp. 1-14.
- Walkley A y Black IA. 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.
- Weller D, Raaijmakers J, McSpadden B, Tomashow L. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40:309-348
- Wells, H. 1988. *Trichoderma* as a biocontrol agent. En: Mukerji, K, Garg K. [Eds.] *Biocontrol of plant diseases*. Volume 1. CRC Press. USA. pp. 71-82.
- Wiggins B y Kinkel L. 2005. Green manures and crop sequences influence alfalfa root rot and pathogen inhibitory activity among soil-borne streptomycetes. *Phytopathology*, 95:178-185.
- Williams J, Clarkson JM, Mills PR, Cooper RM. 2003. A Selective Medium for Quantitative Reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* Compost. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (7): pp. 4190–4191

- Wong W, Mead JA, Croff MC. 2002. Effect of temperature, moisture, soil type and *Trichoderma* species on the survival of *Fusarium pseudograminearum* in wheat straw. *Australasian Plant Pathology*, 31:253-257
- Zachow C, Berg C, Müller H, Meincke R, Komon-Zelazowska M, Druzhinina IS, Kubicek CP, Berg G. 2009. Fungal biodiversity in the soils/rhizospheres of Tenerife (Canary Islands): relationship to vegetation zones and environmental factors. *The ISME Journal*, 3: 79-92.

6. ANEXOS

6.1. ANEXO 1

Cuadro 1: Nombre y número de accesión en Genbank para la región del ITS del ADN ribosomal de las cepas de las especies de referencia de *Trichoderma* utilizadas en el análisis filogenético

Taxón	Cepa	Nº de accesión Genbank
I-Lixii/Catoptron Clade		
<i>H. lixii/T. harzianum</i>	DAOM 222343	AY605735
<i>H. lixii/T. harzianum</i>	DAOM 231646	AY605723
<i>H. atrogelatinosa</i>	G.J.S. 95-159	AF275332
<i>H. atrogelatinosa</i>	GJS 00-162	DQ023302
<i>H. catoptron/T. catoptron</i>	G.J.S. 02-76	AY737766
<i>H. cinnamomea/T. cinnamomeum</i>	G.J.S. 97-237	AY737759
<i>H. straminea/T. stramineum</i>	G.J.S. 02-84	AY737765
<i>H. tawa</i>	CBS 246.63	AF400258
<i>T. aggressivum f. europaeum</i>	CBS 689.94	FJ442606
<i>T. aggressivum f. aggressivum</i>	DAOM 222156	AF456924
<i>T. aggressivum f. aggressivum</i>	GJS 99-29	AF345950
<i>T. tomentosum</i>	CBS 349.93	AF149869
<i>T. velutinum</i>	2S13CB	FJ861466
II-Virens Clade		
<i>H. crassa/T. crassum</i>	CBS 336.93	AF011946
<i>H. virens/T. virens</i>	GLi 39	AF099005
III-Semiorbis Clade		
<i>H. semiorbis</i>	DAOM 167636	AY737758
<i>T. fertile</i>	DAOM 167161	AF400260
IV-Strictipilis Clade		
<i>H. aureoviridis</i> var. <i>Macrospora</i>	CBS 101603	AY865631

Continuación del Cuadro 1

Taxón	Cepa	Nº de accesión Genbank
<i>H. strictipilosa/T. strictipilis</i>	CBS 347.93	AF400263
V-Stromaticum Clade <i>T. rossicum</i> <i>T. stromaticum</i>	TUB F-718 CBS 101875	AF149857 AF098287
VI-Lutea Clade <i>H. lutea</i> <i>H. melanomagnum</i>	G.J.S. 89-129 G.J.S. 99-153	AY737773 AY737770
VII-Ceramica Clade <i>H. estonica/T. estonicum</i> <i>H. ceramica/T. ceramicum</i>	CBS 111147 G.J.S. 88-70	AY737767 AY737764
VIII-Chlorospora Clade <i>H. surrotunda/T. surrotundum</i> <i>H. sinuosa/T. sinuosum</i>	G.J.S. 88-73 G.J.S. 91-125	AY737769 AY737771
IX-Pachybasioides Clade <i>H. pilulifera/T. piluliferum</i> <i>H. pachybasioides/T. polysporum</i>	G.J.S. 91-60 CBS 820.68	Z48813 Z48815
X-Hypocreanum and Psychrophila Clades <i>H. sulfúrea</i> <i>H. pulvinata</i>	G.J.S. 95-140 CBS 225.78	AF487659 AY865636
XI-Lone lineages <i>H. chromosperma/T. chromospermum</i> <i>H. gelatinosa/T. gelatinosum</i> <i>H. gelatinosa/T. gelatinosum</i> <i>H. nigrovirens</i>	G.J.S. 94-67 GJS 88-17 G.J.S. 93-10 G.J.S. 99-64	AY737774 AY737775 AF487667 AY737777

Continuación del Cuadro 1

Taxón	Cepa	Nº de accesión Genbank
<i>H. phyllostachydis</i> / <i>T. phyllostachydis</i>	G.J.S. 92-123	AY737755
<i>H. sulawesensis</i>	G.J.S. 85-228	AY737753
<i>H. voglmayrii</i>	CBS 117711	DQ086142
<i>T. helicum</i>	TUB F-922	AF486020
<i>T. helicum</i>	DAOM 230016	DQ083022
XII-Rufa Clade		
<i>H. atroviridis</i> / <i>T. atroviride</i>	CBS 142.95	AY380906
<i>H. atroviridis</i> / <i>T. atroviride</i>	G.J.S. 98-134	AF456919
<i>T. intricatum</i>	GJS 02-78	EU264002
<i>T. intricatum</i>	GJS 97-88	EN TRICHOBLAST
<i>H. koningii</i>	GJS 89-122	AY380902
<i>H. koningii</i>	GJS 96-120	DQ109536
<i>H. petersenii</i>	GJS 04-351	DQ323440
<i>H. petersenii</i>	GJS 99-48	AY380898
<i>H. rufa</i>	CBS 240.63	AY380907
<i>H. rufa</i>	GJS 89-127	X93980
<i>T. erinaceum</i>	DAOM 230019	DQ083009
<i>T. erinaceum</i>	DIS 7	DQ109534
<i>T. gamsii</i>	GJS 04-09	DQ315459
<i>T. gamsii</i>	MIAE00030	HM176560
<i>T. koningiopsis</i>	DAOM233971	EU280131
<i>T. koningiopsis</i>	GJS 93-20	DQ313140
<i>T. ovalisporum</i>	Dis 70a	AY380897
<i>T. ovalisporum</i>	Dis 203c	DQ315458
<i>T. strigosum</i>	CBS 348.93	NR_103571
<i>T. strigosum</i>	DAOM 229937	EU280030
XIII-Section Pachybasium "A"		
<i>H. pezizoides</i>	GJS 01-231	AF545564
<i>H. flaviconidia</i>	G.J.S. 99-49	DQ023301
<i>H. neorufa</i>	G.J.S. 87-72	AF487656
<i>H. neorufa</i>	G.J.S. 96-143	AF487672
<i>H. pezizoides</i>	GJS 01-257	DQ000632
<i>H. stilbohypoxyli</i>	GJS 96-30a	AY380916
<i>H. stilbohypoxyli</i>	GJS 96-32	AY380915
<i>T. asperellum</i>	CBS 433.97	AY380912
<i>T. asperellum</i>	GJS 04-15	GU198311

Continuación del Cuadro 1

Taxón	Cepa	Nº de accesión Genbank
<i>T. hamatum</i>	DAOM 167057	Z48816
<i>T. hamatum</i>	GJS 98-170	DQ109530
XIV-Section Longibrachiatum		
<i>T. longibrachiatum</i>	CBS 816.68	Z31019
<i>H. orientalis</i>	CECT 2606	X93929