

Artículo científico

Aislamiento e identificación de antagonistas asociados al parasitismo de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* en la provincia de Tucumán, Argentina

Isolation and identification of antagonists associated with parasitism on *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia in Tucumán province, Argentina

E. Allori Stazonelli^{1, 2*}; M. G. Yasem de Romero¹; L. D. Ploper^{1, 2, 3}

¹ Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. Florentino Ameghino S/N, El Manantial (T4104AUD), Tucumán, Argentina. *E-mail: enzo_0387@hotmail.com

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

³ Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres. Tucumán, Argentina.

Resumen

En el Noroeste Argentino, la producción de poroto representa una importante actividad agrícola. Uno de los problemas sanitarios más complejos en el cultivo es provocado por *Sclerotinia sclerotiorum*, un hongo capaz de producir esclerocios que juegan un importante rol en el ciclo de la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue el aislamiento e identificación de antagonistas nativos asociados al parasitismo de esclerocios de *S. sclerotiorum* en la provincia de Tucumán, Argentina. Para el aislamiento se implementó la técnica del esclerocio trampa en 3 regiones agrológicas de la provincia y se colectaron esclerocios parasitados naturalmente. Se obtuvieron 59 aislamientos de los esclerocios trampa y 3 de esclerocios colectados en centros de comercialización de frutas y verduras. En la región del Pedemonte se aislaron la mayor cantidad de antagonistas, específicamente el 76 % del total. De acuerdo al análisis de las secuencias de la región ITS1-ITS2 y de la región que codifica para el gen del factor de elongación -1 α (*tefl* α), se observó que la distribución de las especies de *Trichoderma* no es homogénea entre los suelos de las regiones evaluadas. Las especies de *Trichoderma* que predominaron fueron *T. atroviride* y *T. koningiopsis*, ambas pertenecientes a la sección *Trichoderma*, clado viride mientras que solo se identificó un aislamiento de la especie *T. longibrachiatum* y uno de la especie *T. afroharzianum*.

Palabras clave: Aislamiento; Identificación; Esclerocio; *Trichoderma*.

Abstract

In Northwestern Argentina, bean production constitutes a major agricultural activity. One of the most complex phytosanitary problems affecting this crop is caused by *Sclerotinia sclerotiorum*, a fungus capable of producing sclerotia that play an important part in the disease cycle. The aim of this work was to isolate and identify native antagonists associated with parasitism on *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia in Tucumán province, Argentina. The antagonists were isolated using the sclerotia bait technique, and by retrieving them from naturally parasitized sclerotia, in three agrologic regions in the province. Fifty nine isolates were obtained using sclerotia as baits and 3 were recovered from collected sclerotia at fruit and vegetable commercialization centers. Most of the antagonists, specifically 76% of them, were isolated in the foothills region (called "Pedemonte"). The analysis of sequences of the ITS1-ITS2 region and that of the region coding for the translation elongation factor -1 α gen (*tefl* α) revealed that *Trichoderma* species do not have a homogeneous distribution in the soil types of the evaluation sites. The prevalent *Trichoderma* species were *T. atroviride* and *T. koningiopsis*, both of which belong to the *Trichoderma* sect., viride clade. Only one isolate of the *T. longibrachiatum* species was identified, as well as one of *T. afroharzianum*.

Keywords: Isolation; Identification; Sclerotia; *Trichoderma*.

Introducción

En el Noroeste Argentino (NOA), la producción

de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) representa una importante actividad agrícola regional, destinándose en su mayor parte a la exportación. Se estima

Recibido 19/06/17; Aceptado 26/09/17.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

que la superficie sembrada en el país en la campaña 2016 fue de 270.000 ha, de las cuales 100.000 ha corresponden a poroto negro, 120.000 ha a poroto blanco y 50.000 ha a otros colores (Vizgarra *et al.*, 2016).

Uno de los problemas sanitarios más complejos, causante de graves pérdidas en el cultivo, es provocado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (Ascomycotina). Este hongo ocasiona importantes daños en un amplio rango de hospedantes, infectando a más de 408 especies, 278 géneros y 75 familias de plantas en todo el mundo, incluyendo cultivos de importancia y numerosas malezas (Boland y Hall, 1994). Este patógeno produce esclerocios que juegan un importante rol en el ciclo de la enfermedad ya que pueden permanecer viables por largos períodos de tiempo, lo que dificulta su control.

El empleo de microorganismos como agentes de control biológico (ACB) para el control de las enfermedades de las plantas es la base del biocontrol de los fitopatógenos (Hermosa *et al.*, 2004). El aislamiento apropiado y la selección de los posibles antagonistas determinarán las posibilidades de éxito en el biocontrol. Sabiendo que en la comunidad microbiana existe una gran diversidad de microorganismos, se debe definir cómo aislar y seleccionar los más apropiados para los objetivos propuestos (Bettiol y Morandi, 2009).

Si bien es posible encontrar agentes efectivos de control biológico en forma azarosa, se puede establecer una estrategia de búsqueda que permita aumentar las posibilidades de éxito y simplifique el largo camino a recorrer hasta disponer de un producto comercial. Así, se considera mayor la probabilidad de hallar antagonistas en aquellos lugares en donde, coincidiendo la presencia del patógeno, la planta hospedante y el ambiente favorable al desarrollo de la enfermedad, ésta no ocurre. En dichas regiones, es posible que esté funcionando algún tipo de biocontrol natural (García-Garza *et al.*, 1997; Mondino y Vero, 2006).

Debido a que numerosos ACB tienen capacidad de ser parásitos de los patógenos de plantas, es factible realizar búsquedas de antagonistas a partir de colonias o estructuras del patógeno colonizadas; es decir, utilizar al patógeno como cebo para capturar antagonistas. Por ejemplo, esclerocios de *S. sclerotiorum* pueden ser enterrados en el suelo durante un lapso de tiempo determinado y luego retirados y sembrados en placas de Petri o colocados en cámara húmeda de donde se aíslan cepas

antagonistas (Mondino y Vero, 2006). Esta técnica denominada “esclerocio trampa” ha sido utilizada con éxito en la búsqueda de antagonistas con capacidad para destruir esclerocios por numerosos autores (Zizzerini y Tosi, 1985; Mónaco *et al.*, 1998; Menéndez y Godeas, 1995; García-Garza *et al.*, 1997; Silveira *et al.*, 2001).

La identificación precisa de los microorganismos empleados es fundamental y por ello, se debe llegar a una identificación a nivel de especie o en algunos casos a nivel de subespecie. De esta forma se descartarán aquellas cepas que pertenezcan a especies que hayan sido caracterizadas como patógenos humanos, animales o vegetales o con conocida acción antagónica sobre otros microorganismos benéficos. Por ejemplo, las especies *Trichoderma asperellum* y *T. longibrachiatum* han sido reportadas como agentes de biocontrol contra diferentes hongos fitopatógenos (Verma *et al.*, 2007). Sin embargo, la utilización de *T. longibrachiatum* ha sido cuestionada ya que su uso puede representar un serio peligro para la salud humana por comportarse como patógeno de pacientes inmunodeprimidos (Chouaki *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2007).

La ubicación taxonómica de las especies de *Trichoderma* resulta engorrosa cuando se tienen en cuenta solo aspectos morfológicos (Martínez *et al.*, 2013). La variabilidad de las características morfológicas de las especies de *Trichoderma* hace que su clasificación sea difícil. No obstante, con el desarrollo de técnicas moleculares, la sistemática de este género ha avanzado sustantivamente en los últimos años y es debido a este avance que la importancia de los métodos morfológicos ha disminuido paulatinamente (Kullnig *et al.*, 2001; Druzhinina *et al.*, 2005).

Dentro de las técnicas moleculares se encuentra, la secuenciación de determinadas regiones del genoma y posterior comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en bancos de datos de libre acceso. De esta forma se puede asignar una especie a esa secuencia. Los métodos de biología molecular permiten caracterizar aún más las cepas seleccionadas, llegando en algunos casos a conseguir marcadores moleculares que permiten distinguir esa cepa de otras de la misma especie. Esto permite seguir el destino de la cepa biocontroladora en aplicaciones de uso y a su vez, es de fundamental importancia a la hora de patentar las cepas (Mondino y Vero, 2006).

El objetivo del presente trabajo fue el aisla-

miento de antagonistas asociados al parasitismo de esclerocios del patógeno *S. sclerotiorum* en la provincia de Tucumán, Argentina, y la identificación de los mismos de acuerdo a sus características morfológicas, tasa de crecimiento y el análisis de las secuencias de la región ITS1-ITS2 y de la región que codifica para el gen del factor de elongación -1 α (*tefl* α).

Materiales y métodos

Aislamiento de los posibles antagonistas nativos

Los posibles antagonistas nativos fueron aislados a partir de esclerocios parasitados naturalmente colectados en centros de comercialización de frutas y verduras de la provincia y también utilizando la técnica del esclerocio trampa (Zizzerini y Tosi, 1985; Mónaco *et al.*, 1998; Menéndez y Godeas, 1995; García-Garza *et al.*, 1997; Silveira *et al.*, 2001) a campo.

Sitios de aislamiento

Para el aislamiento de los posibles antagonistas en campo, se seleccionaron sitios de muestreo en las regiones del Pedemonte húmedo y perhúmedo (localidades de El Manantial y San Isidro de Lules), en la Llanura Chaco Pampeana seca subhúmeda (localidad de Monte Redondo) y en la Cuenca de Tapia-Trancas (localidad de Tapia), descritas por Zuccardi y Fadda (1985). Estos sitios fueron elegidos por presentar muy baja o nula incidencia de la enfermedad, a pesar de que los hospedantes susceptibles estaban presentes (García-Garza *et al.*, 1997; Mondino y Vero, 2006) y por presentar diferentes características agrológicas entre los mismos, siendo sitios prometedores para el aislamiento de diferentes antagonistas.

Multiplicación de esclerocios para la técnica del esclerocio trampa

En condiciones de laboratorio se produjeron esclerocios de las cepas del fitopatógeno a utilizar posteriormente como trampa, empleando como sustrato raíces de zanahoria (*Daucus carota* L.). Se trabajó con 9 cepas del fitopatógeno (LPS01, CAST3S04, TRAS06, LUL1S07, CORS08, LUL2S10, LAS11, TUCS13 y CAR1S14) que pertenecen al cepario de la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la

Universidad Nacional de Tucumán (FAZ, UNT), aisladas previamente de diferentes hospederos afectados por la enfermedad en las provincias de Tucumán, Salta, Corrientes y Catamarca. Para la multiplicación de los esclerocios se partió de esclerocios almacenados a 4 ± 2 °C de los aislamientos de *S. sclerotiorum*, los cuales previa desinfección superficial fueron sembrados sobre medio de cultivo APG (Agar Papa Glucosado) al 2 % acidificado con ácido láctico (pH= 4 a 5) e incubados a 20 ± 2 °C durante 5 días con un régimen de 12 horas de luz día.

Por otro lado, se lavaron raíces de zanahoria con agua corriente y se cortaron en cubos de 1 cm de lado. Los trozos fueron lavados dos veces con agua limpia y remojados durante 30 minutos en una solución de 500 mg de cloranfenicol por litro de agua. Se llenaron parcialmente Erlenmeyers de 500 ml con 200 g de cubos de raíces de zanahoria y se esterilizaron en autoclave por 20 min a 121 °C y 1 atm de presión. Después de enfriado, se inoculó dicho sustrato con tres discos de micelio de 1cm de diámetro del borde de las colonias de *S. sclerotiorum* de 5 días de edad crecidas en medio APG al 2 % acidificado con ácido láctico (pH= 4 a 5). Los Erlenmeyers se incubaron a 20 ± 2 °C, con un régimen de 12 horas de luz día. Pasadas 5 semanas, los esclerocios fueron cosechados, lavados bajo agua corriente, secados al aire durante dos días y almacenados a 4 ± 2 °C hasta su utilización.

Implementación de la técnica del esclerocio trampa

La técnica del esclerocio trampa se llevó a cabo en las localidades seleccionadas. Se emplearon bolsas de nylon de malla fina de 1 mm de sección, las que fueron enterradas en el suelo a una profundidad de 5 a 10 cm. En cada bolsa se colocaron 5 esclerocios de cada cepa de *S. sclerotiorum* bolsas identificadas con distintos colores de acuerdo a la cepa que contenían. Se realizaron 4 repeticiones por lugar de muestreo, llegando a un total de 20 esclerocios de cada cepa patógena por sitio. Luego de dos semanas, las bolsas fueron retiradas y los esclerocios fueron lavados con agua corriente y secados durante 2 días a temperatura ambiente.

Procesamiento de los esclerocios colectados

Los esclerocios colectados en centros de comercialización de frutas y verduras, así como los

previamente empleados como trampa, fueron lavados con agua corriente y posteriormente fueron desinfectados superficialmente, por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante 4 min seguido de cuatro inmersiones en agua destilada estéril para evitar el efecto residual del desinfectante. Los esclerocios desinfectados fueron sembrados en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con medio de cultivo APG al 2 % acidificado con ácido láctico (pH = 4 a 5) e incubados a 25 ± 2 °C con 12 horas de luz día. Entre los 5 y 7 días de incubación se realizaron aislamientos a partir de las colonias fúngicas que se desarrollaron sobre la superficie de los esclerocios y en el medio circundante. Los aislamientos obtenidos se sembraron sobre medio de cultivo APG al 2 % acidificado con ácido láctico (pH= 4 a 5) y se incubaron a 25 ± 2 °C hasta que las colonias se desarrollaron. Luego, los aislamientos fueron repicados a tubos de ensayos con medio APG al 2 % acidificado con ácido láctico (pH= 4 a 5) tubos en pico de flauta para evitar contaminaciones y conservados a 4 ± 2 °C hasta su utilización.

Realización de cultivos monospóricos

Para garantizar que se estuviera trabajando con un único microorganismo, se hicieron cultivos monospóricos de cada aislamiento. Para ello, se realizaron diluciones seriadas, las cuales se sembraron en placas de Petri con medio de cultivo AA (agar agua) al 2 % acidificado con ácido láctico (pH = 4 a 5) y se incubaron durante 24 h a 25 ± 2 °C. Luego, se procedió a separar, bajo microscopio óptico (40x), un único conidio con la ayuda de una aguja, en condiciones de asepsia en cámara de flujo laminar. El conidio se colocó en placas de Petri con medio de cultivo APG al 2 % acidificado con ácido láctico y se incubó a 25 ± 2 °C durante 96 h. Se realizaron 4 cultivos monospóricos de cada aislamiento, los cuales fueron incorporados al cepario de la Cátedra de Fitopatología de la FAZ, UNT.

Extracción de ADN para la región ITS1-ITS2

Partiendo de los cultivos monospóricos realizados en el apartado anterior, se realizó la extracción y purificación del ADN de cada cepa para la obtención de las secuencias de la región ITS1-ITS2. En el laboratorio de Biotecnología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Na-

turales de la Universidad Nacional de Misiones se extrajo el ADN de los aislamientos a partir de fragmentos de micelio extraídos del borde de colonias jóvenes crecidas en medio extracto de malta durante 5 días a 27 °C. El micelio fue lavado dos veces con 1 ml de solución TRIS-HCl 0.1 M, EDTA 0,02 M en frío y centrifugado a 12000 rpm por 3 min. Posteriormente el micelio fue triturado con varilla de vidrio estéril en presencia de 1 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 1,5 M, EDTA 50 mM pH 8, Proteinasa K, 0,1mg/ml, β -mercaptoetanol 10 mM, SDS 2 %) y digerido a 60 °C por 1 h agitando en vórtex cada 10 min. El ADN fue purificado a partir del sobrenadante de esta digestión utilizando cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), por dos veces, y acetato de potasio 3 M por una vez. Posteriormente el ADN fue precipitado con isopropanol 100 %, lavado con etanol 70 % frío, centrifugado a 12000 rpm por 5 min, secado a temperatura ambiente y resuspendido en agua destilada libre de nucleadas y almacenado a -20 °C.

Amplificación de la región ITS1-ITS2

Se amplificó la región ITS1– 5,8S–ITS2 del ADN ribosómico utilizando los cebadores descritos por White *et al.* (1990). Los cebadores utilizados fueron: ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG; ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC. La PCR se llevó a cabo en 20 μ l de volumen final conteniendo Buffer 1X, cloruro de magnesio 2,5 mM, dNTPs 200 μ M, 10 μ M de cada cebador, Taq polimerasa 0,5 U. El programa de amplificación utilizado contó de una etapa de desnaturalización a 94 °C durante 4 min seguido de 35 ciclos de amplificación (40 s a 94 °C, 40 s a 50 °C y 40 s a 72 °C), y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 2 %.

Extracción de ADN para el gen del factor de elongación -Ia (tef1a)

En el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química, de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, se realizó la extracción y purificación del ADN de cada cepa, para lo cual estas fueron sembradas en 10 ml de medio líquido YES (Extracto de levadura 2 %, sacarosa 15 %) e incubadas durante 10 días a 25 °C. El micelio obtenido fue extraído del medio de cultivo con una

pinza estéril y posteriormente secado presionándolo entre hojas de papel esterilizadas. Aproximadamente 40 mg de micelio seco, fueron colocados en un tubo eppendorf de 2 ml y molidos en presencia de nitrógeno líquido, usando una varilla de vidrio. Se agregaron 500 µl de buffer de lisis con SDS y se incubó 30 min a 65 °C. Se agregó un volumen de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1) y se centrifugó durante 10 min a 10.000 rpm. Se separó el sobrenadante a un nuevo eppendorf de 1,5 ml estéril (aprox. 300 µl). Se agregaron 150 µl de NaCl 1M y 150 µl acetato de sodio 3M. Se precipitó con un volumen de isopropanol frío (aprox. 600 µl) y se invirtió el tubo suavemente 2 o 3 veces. Se incubó 30 min a -20 °C. Se centrifugó 10 min a 10.000 rpm y se descartó el sobrenadante, obteniendo un pellet de ADN el cual fue secado a 45 °C y resuspendido en 50 µl de agua miliQ.

Amplificación del gen del factor de elongación -1α (tef1α)

A partir del ADN total se amplificó parte del gen que codifica para el factor de elongación de la traducción-1α, que comprende la totalidad del cuarto intrón y parte del cuarto y quinto exón. Para la amplificación se usaron los cebadores EF1-728F: 5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3' (Carbone y Kohn, 1999) y Tef1 rev: 5'-GC-CATCCTTGGAGATACCAGC-3' (Samuels *et al.*, 2002). Reacciones de 25 µl se llevaron a cabo utilizando 2,5 µl de buffer 10X (Invitrogen), 0,75 µl de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen), 0,2 µl de cada primer, 0,15 U de Taq polimerasa (Invitrogen), 1 µl de mezcla de desoxinucleótidos de concentración 5 mM (Invitrogen), 1 µl de solución de ADN (aproximadamente 20 ng) y agua miliQ para completar el volumen final de reacción. La mezcla de reacción fue sometida a desnaturalización durante 2 min a 94 °C seguida por 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C y 1 min a 72 °C, y una elongación final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron analizados en gel de agarosa al 0,8 %. Los primeros utilizados fueron sintetizados por Macrogen Inc. (Seúl, Corea).

Análisis de secuencias

Los productos de amplificación de ambas regiones fueron purificados y secuenciados por Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias fueron comparadas para determinar su grado de identidad

y similitud con secuencias tipo para cada especie depositadas en la bases de datos de GENBANK (NCBI), utilizando el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Se tomó como criterio para identificar los aislamientos a nivel de especie un porcentaje mayor o igual al 99 % al contrastar las secuencias obtenidas con las cepas tipo presentes en bases de datos. Además las secuencias obtenidas, que presentaron una similitud de 99 % o superior, fueron depositadas en la base de datos de GENBANK (NCBI).

Resultados

Aislamiento de cepas antagonistas nativas

De la totalidad de esclerocios trampa (720) se obtuvieron 59 aislamientos de posibles antagonistas, y de los esclerocios colectados en centros de comercialización de frutas y verduras se obtuvieron 3 aislamientos más (Tabla 1).

En la región del Pedemonte se obtuvieron la mayor cantidad de aislamientos, llegando a un total de 45, lo que representó el 76 % de los aislamientos realizados con la técnica del esclerocio trampa. En esta región, en la localidad de San Isidro de Lules, departamento Lules, se obtuvieron 10 aislamientos en cultivos de hortalizas bajo cubierta, mientras que en el predio de Finca El Manantial de la FAZ, UNT, en la localidad de El Manantial, se obtuvieron 25 aislamientos. En esta última localidad, se obtuvo la mayor cantidad de aislamientos en sitios que presentaron abundante vegetación, tanto nativa como implantada y poco perturbada por la acción del hombre. Se aislaron 8 posibles antagonistas del suelo de un lote implantado con eucaliptus, 8 de un lote implantado con coníferas, 5 de los márgenes de plantaciones de limón y caña de azúcar y 3 de lotes hortícolas experimentales.

En la región de la Llanura Chaco Pampeana seca subhúmeda, se aislaron 8 posibles antagonistas, 3 de lotes cultivados con pasturas, 2 de lotes con pasturas naturales y 3 de lotes experimentales de poroto y soja de la subestación Monte Redondo perteneciente a la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes, en el departamento Cruz Alta. Esto representó el 14 % de la totalidad de los aislamientos obtenidos.

Por último, en la región de la Cuenca de Tapiá-Trancas, en la localidad de Tapiá, departamento de Tafi Viejo, fue donde se obtuvo el menor número de aislamientos. Se colectaron 6 aislamientos que

Tabla 1. Identificación molecular de los aislamientos empleando la región ITS1-ITS2 y el gen que codifica para el factor de elongación -1 α (*tefla*). En la tabla se detallan los números de acceso en la base de datos de GENBANK de los aislamientos y el porcentaje de identidad obtenido de la comparación con cepas tipo de especies del género *Trichoderma*.

Cepa	N° de acceso ITS/ <i>tefla</i>	ITS1-ITS2				<i>tefla</i>			
		Especie más cercana	Cepa tipo/ N° de acceso	Identidad (%)	Especie más cercana	Cepa tipo / N° de acceso	Identidad (%)		
MRT35	KR014869/ KY272067	<i>T. atroviride</i>	CBS142.95/ AF456917	99	<i>T. atroviride</i>	CBS 142.95/ AF456891	99		
MRT36	KR014859/ KY436411	<i>T. atroviride</i>	CBS142.95/ AF456917	100	<i>T. atroviride</i>	CBS 142.95/ AF456891	99		
MRT37	KR014860/ KY436412	<i>T. atroviride</i>	CBS142.95/ AF456917	100	<i>T. atroviride</i>	CBS 142.95/ AF456891	99		
MRT 40	KR014861/ KY436413	<i>T. atroviride</i>	CBS142.95/ AF456917	100	<i>T. atroviride</i>	CBS 142.95/ AF456891	100		
LULT44	KR014856/ KY436414	<i>T. atroviride</i>	CBS142.95/ AF456917	100	<i>T. atroviride</i>	CBS 142.95/ AF456891	99		
LULT43	KR014855/ KY436415	<i>T. atroviride</i>	CBS142.95/ AF456917	100	<i>T. atroviride</i>	CBS 142.95/ AF456891	100		
TPT02	KR014866/ KY436416	<i>T. atroviride</i>	CBS142.95/ AF456917	100	<i>T. atroviride</i>	CBS 142.95/ AF456891	100		
TPT05	KR014870	<i>T. atroviride</i>	CBS142.95/ AF456917	99	<i>T. atroviride</i>	CBS 142.95/ AF456891	98		
POST18	KR014862/ KX603782	<i>T. atroviride</i>	CBS142.95/ AF456917	100	<i>T. atroviride</i>	CBS 142.95/ AF456891	99		
POST19	KR014863	<i>T. atroviride</i>	CBS142.95/ AF456917	99	<i>T. atroviride</i>	CBS 142.95/ AF456891	97		
POST20	KR014864/ KX603781	<i>T. atroviride</i>	CBS142.95/ AF456917	100	<i>T. atroviride</i>	CBS 142.95/ AF456891	99		
LULT47	KR014858	<i>T. koningiopsis</i>	CBS119075/ NR131281	100	<i>T. koningiopsis</i>	GJS 93-20/ DQ284966	97		
TPT01	KR014865	<i>T. koningiopsis</i>	CBS119075/ NR131281	100	<i>T. koningiopsis</i>	GJS 93-20/ DQ284966	96		
FAZT08	KP780260	<i>T. koningiopsis</i>	CBS119075/ NR131281	100	<i>T. koningiopsis</i>	GJS 93-20/ DQ284966	96		
FAZT31	KR014854	<i>T. koningiopsis</i>	CBS119075/ NR131281	100	<i>T. koningiopsis</i>	GJS 93-20/ DQ284966	97		
TPT03	KR014867/ KY436417	<i>T. afroharzianum</i>	CBS124620/ NR137304	99	<i>T. afroharzianum</i>	GJS 04-186/ FJ463301	99		
FAZT29	KP903299/ KY436418	<i>T. longibrachiatum</i>	CBS816.68/ EU401556	99	<i>T. longibrachiatum</i>	ATCC18648/ AY937412	100		

correspondieron al 10 % de los aislamientos obtenidos con la técnica del esclerocio trampa. Se aislaron 3 posibles antagonistas de los márgenes de lotes con cultivos hortícolas, 2 de lotes no cultivados y uno de parcelas implantadas con lechuga.

Además, se evidenció que los esclerocios trampa de la cepa TRAS06 fueron los más susceptibles a ser parasitados por los antagonistas nativos. Con los esclerocios trampa de dicha cepa patógena se aislaron, aproximadamente, el 25 % del total de los posibles antagonistas (Figura 1).

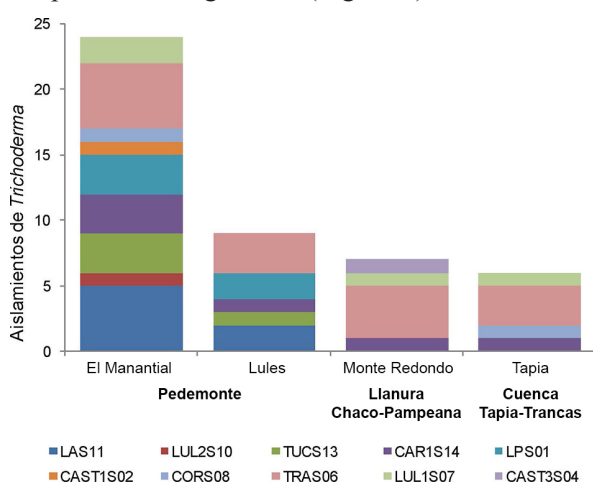


Figura 1. Número de aislamientos de posibles antagonistas obtenidos en cada sitio de muestreo y con cada una de las cepas de *Sclerotinia sclerotiorum* empleadas como esclerocio trampa en cada caso.

De los posibles antagonistas aislados, se seleccionaron 17 por sus características promisorias como ACB (Allori Stazonelli *et al.*, 2014), para ser identificados de acuerdo a sus características morfológicas, tasa de crecimiento y mediante técnicas moleculares.

Identificación de los posibles antagonistas de acuerdo a su morfología y tasa de crecimiento

Los posibles antagonistas aislados a partir de esclerocios parasitados presentaron características propias del género *Trichoderma* (Rifai, 1969; Samuel *et al.*, 1996; Barnett y Hunter, 1999). Los aislamientos produjeron colonias algodonosas de color blanco al inicio, las que se tornaron verde rápidamente a medida que transcurrió el período de incubación presentando bordes regulares de crecimiento radial uniforme. En cuanto a su caracterización morfológica se observó que el micelio estaba compuesto por hifas hialinas, septadas, ramificadas y de paredes lisas. Se observaron clamidosporas intercalares, principalmente globosas, de

paredes lisas, incoloras y de 6 a 12 μm de diámetro. Los conidióforos se encontraron ramificados, terminando en fiálides con forma de botella. Se observaron conidios ovoides de 2,8 a 3,2 x 2,3 a 2,8 μm aproximadamente, de color verde pálido, que se acumulaban en el extremo de cada fiálide para formar una cabeza conidial globosa.

Según la tasa o radio de crecimiento observada, el único aislamiento que pudo crecer a 37 °C fue FAZT29, el cual cubrió la totalidad de la superficie de la caja de Petri a las 72 h, no presentando conidios verdes ni pigmentos en el medio de cultivo. A 35 °C y 72 h de incubación todos los aislamientos estudiados mostraron crecimiento. FAZT29 completó la totalidad de la superficie de la caja de Petri produciendo conidios de color verde y pigmentos de color amarillo pálido en el medio de cultivo, TPT03 presentó un crecimiento promedio de 35 mm de radio aproximadamente mientras que el resto de los aislamientos evaluados no se diferenciaron de acuerdo a su crecimiento; en estos casos el radio observado no superó los 3 mm y tampoco se presentaron conidios ni pigmentaciones en el medio de cultivo. Según lo observado se pudieron diferenciar a los aislamientos FAZT29 y TPT03 del resto.

Identificación molecular de los aislamientos de Trichoderma

Como resultado de la comparación de las secuencias de ADN correspondientes a la región ITS1-ITS2 de los aislamientos en estudio con las cepas tipo depositadas en las bases de datos de GENBANK, se pudo observar que de los aislamientos provenientes de esclerocios colectados en los mercados de frutas y verduras se identificaron 3 cepas como *T. atroviride* y de los aislamientos obtenidos con la técnica del esclerocio trampa se identificaron 14 cepas en total, 8 como *T. atroviride*, 4 como *T. koningiopsis*, 1 como *T. longibrachiarum* y 1 como *T. afroharzianum* (Tabla 1). De acuerdo a los resultados obtenidos, 15 cepas fueron ubicadas en la sección Trichoderma, clado Viride; 1 en la sección Pachybasium, clado Harzianum y 1 en la sección Longibrachiatum, clado Longibrachiatum.

Al comparar las secuencias de ADN correspondientes al gen del factor de elongación -1 α (*tef1 α*) de los aislamientos en estudio con las cepas tipo depositadas, solo se pudo identificar correctamente 11 aislamientos, ya que los demás aislamientos

no alcanzaron el 99 % de identidad establecido como el porcentaje mínimo de similitud al compararlas con las cepas tipo más cercanas en la base de datos. Como resultado se obtuvo que, a partir de los esclerocios colectados en los mercados de frutas y verduras se identificaron 2 cepas como *T. atroviride* y de los aislamientos obtenidos con la técnica del esclerocio trampa se identificaron 9 cepas en total, 7 como *T. atroviride*, 1 como *T. longibrachiarum* y 1 como *T. afroharzianum* (Tabla 1). Por lo tanto, 9 secuencias fueron ubicadas en la sección Trichoderma clado Viride, 1 en la sección Pachybasium clado Harzianum y 1 en la sección Longibrachiatum clado Longibrachiatum.

Discusión

Los posibles antagonistas aislados en las diferentes zonas de muestreo pertenecieron en su mayoría a especies de la sección Trichoderma clado Viride, las cuales podrían estar más asociadas que otras al parasitismo de esclerocios de *S. sclerotiorum* en los suelos de la región. Resultados semejantes fueron obtenidos recientemente por Braithwaite *et al.* (2017) quienes estudiaron la diversidad de especies de *Trichoderma* en los suelos de Nueva Zelanda haciendo el primer reporte para una región templada del hemisferio sur. Dicha similitud pondría de manifiesto que a similares latitudes y condiciones climáticas las especies de *Trichoderma* que predominan en los suelos serían semejantes, aunque para confirmar esta hipótesis es necesario un muestreo de mayores dimensiones y no solo abocado al parasitismo de esclerocios de *S. sclerotiorum* en nuestra región.

Por otro lado, Hermosa *et al.* (2004) analizaron un grupo de 69 cepas de *Trichoderma* de diferentes procedencias y advirtieron que más de la mitad de las mismas fueron agrupados en la sección Pachybasium, mientras que en este trabajo solo un aislamiento se agrupó en dicha sección. Esta diferencia podría deberse a que los aislamientos analizados en este trabajo fueron obtenidos a partir de esclerocios parasitados por lo tanto, las especies que no colonizan estas estructuras de resistencia no podrán ser aisladas. Además, cabe destacar, que los aislamientos de este trabajo fueron obtenidos de lugares próximos al sitio donde se desean aplicar (provincia de Tucumán) a diferencia de los estudiados por Hermosa *et al.* (2004) quienes identificaron cepas provenientes de diversos países y no de una región en particular.

La técnica de aislamiento mediante esclerocios trampa fue efectiva en la captura de numerosos hongos capaces de parasitar esclerocios de *S. sclerotiorum*, presentándose como un método rápido y eficiente para la obtención de una gran cantidad de antagonistas del patógeno como lo demostraron Zizzerini y Tosi (1985), Mónaco (1998), Menéndez y Godeas (1995), García-Garza *et al.* (1997) y Silveira *et al.* (2001). Además esta técnica permite realizar una primera selección de posibles ACB habitantes del suelo ya que solo los que presenten la capacidad de parasitar las estructuras de resistencia del patógeno *S. sclerotiorum* serán aislados (Mondino y Vero, 2006).

El número de aislamientos y las especies obtenidas con el empleo de dicha técnica fue dispar entre los sitios de muestreo. Se observó que el número de aislamientos obtenidos estuvo relacionado a las características agrológicas de cada sitio y que el número de aislados se redujo en las regiones con menores precipitaciones anuales. Cabe destacar que en la región del Pedemonte, caracterizada por precipitaciones anuales superiores a los 1000 mm y un balance hídrico positivo (Zuccardi y Fadda, 1985) fue donde se obtuvo una mayor cantidad de aislamientos y entre los cuales se aislaron cepas identificadas como *T. koningiopsis* mediante el análisis de la región ITS1-ITS2. En las regiones más secas, tanto en la Llanura Chaco Pampeana, la cual presenta precipitaciones entre los 750 y 650 mm y un déficit hídrico de 200 a 350 mm, como en la Cuenca de Tapia-Trancas, donde la precipitación media anual es de 400 a 500 mm y existe un déficit hídrico permanente durante todo el año (Zuccardi y Fadda, 1985), se obtuvo una menor cantidad de aislamientos y se aislaron cepas de *T. atroviride*. Esta situación podría estar relacionada a las características propias de cada especie y a su afinidad por sitios que tengan mayor o menor humedad y en consecuencia diferentes cantidades de materia orgánica o restos vegetales.

Al evaluar la tasa o radio de crecimiento de los posibles antagonistas, se observó que únicamente el aislamiento FAZT29 creció a 37 °C, característica no deseable al momento de seleccionar un posible antagonista ya que este podría tratarse de un patógeno de humanos. Además, el análisis molecular realizado confirmó que dicho aislamiento pertenece a la especie *T. longibrachiatum* que se encuentra citada en la literatura como patógena en humanos (Chouaki *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2007).

Conclusiones

La técnica del esclerocio trampa resultó efectiva en la captura de numerosos antagonistas capaces de parasitar esclerocios de *S. sclerotiorum*.

Las características medioambientales de los sitios influyeron en la cantidad y en la especie de los aislamientos obtenidos, demostrando que la distribución de las especies de *Trichoderma* no es homogénea en los suelos de la provincia.

Se identificaron solo cuatro especies del género *Trichoderma* con capacidad para parasitar esclerocios de *S. sclerotiorum* en los suelos de la provincia evaluados, destacándose en número las especies *T. atroviride* y *T. koningiopsis* perteneciente a la sección *Trichoderma* clado *Viride*.

Las cepas aisladas e identificadas en el presente trabajo serán el objeto de posteriores estudios donde se evaluarán sus características como agentes de control biológico de *S. sclerotiorum* en cámara de cría y en parcelas experimentales en campo.

Agradecimientos

Agradecemos al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Secretaría de Ciencia, Arte e Innovación Tecnológica de la UNT (SCAIT) y a la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la UNT.

Referencias bibliográficas

Alabouvette C., Steinberg C. (2006). The soil as a reservoir for antagonists to plant diseases. En: An Ecological and Societal Approach to Biological Control. Eilenberg, J., Hokkanen, H.M.T. (Eds). Springer, Países Bajos. Pp 123-144.

Allori Stazzonelli E., Yasem de Romero M., Ploper L.D. (2014). Evaluación de antagonistas nativos para el manejo de *Sclerotinia sclerotiorum*. 3° Congreso Argentino de Fitopatología. 4-6 de junio, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. Resumen N°: M-HyS-3. Página: 320.

Barnett H.L., Hunter B.B. (1999). Illustrate genera of imperfect fungi. American Phytopathological Society, Estados Unidos.

Bettiol W., Morandi M.A. (2009). Biocontrole de Doenças de plantas: uso e perspectiva. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Brasil.

Boland G.J., Hall R. (1994). Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian Journal of Plant Pathology 16: 93-108.

Braithwaite M., Johnston P.R., Ball S.L., Nourozi F.,

Hay A.J., Shoukouhi P., Chomic A., Lange C., Ohkura M., Nieto-Jacobo M.F., Cummings N.J., Bienkowski D., Mendoza-Mendoza A., Hill R.A., McLean K.L., Stewart A., Steyaert J.M., Bissett J. (2017). *Trichoderma* down under: species diversity and occurrence of *Trichoderma* in New Zealand. Australasian Plant Pathology 46: 11-30.

Carbone I., Kohn L.M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous Ascomycetes. Mycology 91: 553-556.

Chouaki T., Lavarde V., Lachaud L., Raccurt C.P., Hennequin C. (2002). Invasive infections due to *Trichoderma* species: report of 2 cases, findings of *in vitro* susceptibility testing, and review of the literature. Clinical Infectious Diseases 35 (11): 1360-1367.

Druzhinina I., Kopchinskiy A., Komon M., Bissett J., Szakács G., Kubicek C.P. (2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. Fungal Genetics and Biology 42: 813-828.

García-Garza J.A., Reeleder R.D., Paulitz T.C. (1997). Degradation of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by fungus Ghats (*Bradysia coprophila*) and the biocontrol fungi *Trichoderma* spp. Soil Biology and Biochemistry 29 (2): 123-129.

Hermosa M.R., Keck E., Chamorro I., Rubio B., Sanz L., Vizcaino J.A., Grondona I., Monte E. (2004). Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. Mycological Research 108 (8): 897-906.

Kullnig C.M., Krupica T., Woo S.L., Mach R.L., Rey M., Benítez T. (2001). Confusion abounds over identities of *Trichoderma* biocontrol isolates. Mycological Research 105 (7): 770-772.

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

Menéndez A.B., Godeas A.M. (1995). Capacidad antagonista de algunos micoparásitos de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, presentes en la región de Pergamino, Argentina. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata 71: 67-72.

Mónaco C.I., Rollán M.C., Nico A.I. (1998). Efecto de micoparásitos sobre la capacidad reproductiva de *Sclerotinia sclerotiorum*. Revista Iberoamericana de Micología 15: 81-84.

Mondino P., Vero S. (2006). Control biológico de patógenos de plantas. Facultad de Agronomía- Unidad de Educación Permanente, Uruguay.

Papavizas G.C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology 23: 23-54.

Rifai M.A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Papers 116: 1-56.

Samuels G.J. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycological Research 100: 925-935.

Samuels G.J., Dodd S.L., Gams W., Castlebury L.A.,

- Petrini O. (2002). *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94: 146-170.
- Sánchez V., Rebolledo O., Picaso R.M., Cárdenas E., Córdova J., González O., Samuels G.J. (2007). *In vitro* antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. *Mycopathologia* 163: 49-58.
- Silveira A.C., Gepp V., Perez E. (2001). Aislamiento y selección de hongos antagonistas de *S. sclerotiorum*. 7° Reunión de Controle Biológico de Fitopatógenos. Embrapa Uva e Vinho. 26-27 de noviembre. Brasil. P. 95.
- Verma M., Brar S.K., Tyagi R.D., Surampalli R.Y., Valéro J.R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp. Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37 (1): 1-20.
- Vizgarra O.N., Espeche C.M., Ploper L.D. (2016). Manual Técnico del Cultivo del Poroto para el Noroeste Argentino. Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres Tucumán, Argentina.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: PCR Protocols: a guide to methods and applications. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds.). Academic Press, Estados Unidos. Pp. 315-322.
- Zizzerini A., Tosi L. (1985). Antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology* 34: 415-421.
- Zuccardi R.B., Fadda G. (1985). Bosquejo Agrológico de la provincia de Tucumán. Miscelánea N°26.