

CONTROL BIOLÓGICO DE LA FUSARIOSIS DE LA ESPIGA DE TRIGO Y CEBADA

Pereyra, S.¹; Garmendia, G.²; Cabrera, M.²; Vero, S.²; Pianzola, M.²; Dill-Macky, R.³

RESUMEN

La fusariosis de la espiga de trigo y cebada es una enfermedad devastadora a nivel mundial y ha sido epidémica en el Cono Sur de América del Sur en la última década. Actualmente ninguna práctica de manejo de la enfermedad es por sí efectiva y el control biológico podría ser una herramienta más en el manejo integrado de la fusariosis de la espiga. En Uruguay desde 2003, se vienen llevando a cabo trabajos con el fin de determinar la efectividad del uso de agentes de biocontrol aplicados en espigas o en rastrojos de trigo en reducir la infección o la producción de inóculo primario de *Gibberella zea* (*Fusarium graminearum*), respectivamente. Los resultados preliminares indican la potencialidad de la aplicación de *Trichoderma harzianum* en reducir la producción de peritecios de *G. zea* en el rastrojo. Es necesario contar con mayor información para poder integrar al control biológico en el manejo de la fusariosis de la espiga.

PALABRAS CLAVE: Fusariosis de la espiga, trigo, control biológico, rastrojo, *Fusarium graminearum*, *Gibberella zea*.

SUMMARY

BIOLOGICAL CONTROL OF FUSARIUM HEAD BLIGHT OF WHEAT AND BARLEY

Fusarium head blight is a devastating disease of wheat and barley worldwide and has been epidemic in the South America's Southern cone for the past decade. Currently, available control measures are only partially effective and biological control could be an additional tool in an integrative approach to manage Fusarium head blight. In Uruguay, since 2003, studies have been conducted to determine the effectiveness of biocontrol agent applied to wheat spikes or to wheat residues to reduce infection or inoculum production of *Gibberella zea*, respectively. Preliminary results indicate that there is a potential to biologically reduce the perithecial production of *G. zea* with the application of *Trichoderma harzianum* to wheat residue. At this time, however, it is evident that considerably more research is needed to integrate biological control into Fusarium head blight management.

KEY WORDS: Fusarium head blight, wheat, biocontrol, crop residues, *Fusarium graminearum*, *Gibberella zea*.

INTRODUCCIÓN

La fusariosis de la espiga (FE) es una enfermedad devastadora de trigo y cebada en las regiones húmedas y sub-húmedas del mundo. En las últimas dos décadas ha causado pérdidas significativas en los países del Cono Sur de América del Sur y en particular en Uruguay representa una de las principales limitantes para la producción

de trigo y cebada. En la última década, han ocurrido epidemias moderadas a severas cada dos a tres años (Pereyra & Díaz de Ackermann, 2003). Las pérdidas de rendimiento de grano producidas por esta enfermedad pueden llegar hasta 30% en condiciones de epidemias severas y cultivares muy susceptibles (Díaz de Ackermann & Kohli, 1997). Sin embargo, el aspecto más relevante es la producción de micotoxinas por parte de los hongos causales de la enfermedad.

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), La Estanzuela, Ruta 50 km11 C.C.39173, 70000, Colonia, URUGUAY

²Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Flores 2124, Montevideo, URUGUAY

³Departamento de Fitopatología, Universidad de Minnesota, 1991 Upper Buford Circle, Saint Paul, MN 55108, U.S.A.

La FE puede estar causada por una o más especies del género *Fusarium*. En Uruguay, la especie predominante asociada a FE en trigo y cebada es *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch, anamorfo: *Fusarium graminearum* (Schwabe), (Boerger, 1928; Boasso, 1961; Pritsch, 1995; Pereyra *et al.*, 2004a). *Gibberella zeae* es capaz de sobrevivir saprofiticamente en los rastrojos de trigo, cebada, maíz, sorgo, y otras gramíneas (Costa Neto, 1976; Sutton, 1982; Reis, 1988; Pereyra *et al.*, 2004b) y por tanto, estos constituyen la vía de supervivencia y fuente de inóculo más importante.

En la actualidad, las medidas disponibles de control no son altamente efectivas en prevenir el desarrollo de la FE. Sólo se ha encontrado resistencia parcial (Mesterházy, 1997) y hasta el momento se han incorporado niveles moderados de resistencia en cultivares comerciales. Si bien existen fungicidas suficientemente efectivos, su uso está limitado porque el momento óptimo para la aplicación frecuentemente coincide con condiciones de precipitaciones, costo y la preocupación de residuos en el producto final. El beneficio potencial de la rotación con cultivos no susceptibles es menor debido al amplio rango de huéspedes de *G. zeae*. Mientras el enterrado del rastrojo promueve su descomposición y disminuye la producción de inóculo primario al impedir la producción de peritecios y ascosporas y su dispersión (Khong & Sutton, 1988; Dill-Macky and Jones, 2000; Pereyra *et al.*, 2004c), la siembra directa es una práctica más atractiva a los productores ya que ofrece ventajas de conservación de suelos y costos de energía menores. El uso de agentes de control biológico provee una estrategia adicional para un enfoque de manejo integrado de la FE.

El objetivo de esta presentación es brindar información relacionada al control biológico de la FE de trigo y cebada y al estado de avance de esta práctica en Uruguay.

ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA FUSARIOSIS DE LA ESPIGA

Las estrategias de control biológico de la FE dependerán de aquellos momentos más débiles en el ciclo de vida de *G. zeae*. En este sentido existen dos enfoques: el uso de antagonistas aplicados a las espigas a antesis para reducir la infección (Perondi *et al.*, 1996; Stockwell *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2001; Schisler *et al.*, 2002; Luz *et al.*, 2003) y el tratamiento de los rastrojos para reducir los niveles de inóculo primario (Fernández, 1992; Bujold *et al.*, 2001).

Aplicación a la espiga

La aplicación de antagonistas al momento de antesis puede impedir o retardar la germinación de las esporas de *G. zeae* en el sitio de infección de la espiga (Luz *et al.*, 2003). Debido a que la ventana de vulnerabilidad a la infección es relativamente corta, desde floración al estado de grano lechoso-masa blanda, una aplicación del agente de biocontrol en la espiga a o justo antes de antesis podría ser eficiente.

En este tipo de trabajo, en Brasil, Estados Unidos y Canadá se han aislado microorganismos capaces de reducir la incidencia y severidad de la FE así como también el contenido de toxina deoxinivalenol (DON) (Perondi *et al.*, 1996; Khan *et al.*, 2001). Los microorganismos con los que han logrado los mejores resultados han sido bacterias (*Bacillus amiloquefaciens*, *B. subtilis*, *Pantoea agglomerans*) (Luz *et al.*, 2003; Gilbert & Fernando, 2005) y levaduras de los géneros *Cryptococcus* y *Sporobolomyces* (Stockwell *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 2001; Schisler *et al.*, 2002; Luz *et al.*, 2003). Se han logrado las mejores eficiencias de control reduciendo la severidad de FE a campo en 50-67% así como también las pérdidas de rendimiento en grano en más de 700 kg por ha (Luz, 2003). En trabajos orientados a evaluar la aplicación de agentes de biocontrol junto con fungicidas eficientes (*i.e.*: tebuconazol) en el marco de un manejo integrado de la enfermedad, se han logrado eficiencias de control de FE de hasta 86% y disminución en el contenido de DON hasta del 25% (Bergstrom 2000; Stockwell *et al.*, 2000).

En Uruguay, se están llevando a cabo trabajos donde a partir de la zafra 2005 se aislarán cepas de microorganismos colonizando anteras de trigo, y se seleccionarán aquellas con la capacidad de crecer en presencia de colina, betaína y tartato.

Aplicación al rastrojo

El uso de agentes de biocontrol que afectan la supervivencia saprofitica de *G. zeae* y/o reducen cuantitativamente el inóculo primario (peritecios y ascosporas) es una propuesta original donde se han realizado escasos trabajos (Fernandez, 1992; Bujold *et al.*, 2001). La FE es una enfermedad monocíclica donde la principal fuente de inóculo son los rastrojos infestados sobre la superficie del suelo. En las condiciones de Uruguay, *G. zeae* es capaz de sobrevivir en rastrojo de trigo o cebada por dos años y en rastrojo de maíz hasta por tres años (Pereyra & Díaz de Ackermann, 2003; Pereyra, 2005) (Figura 1). En consecuencia, el uso de antagonistas adaptados a las condiciones de

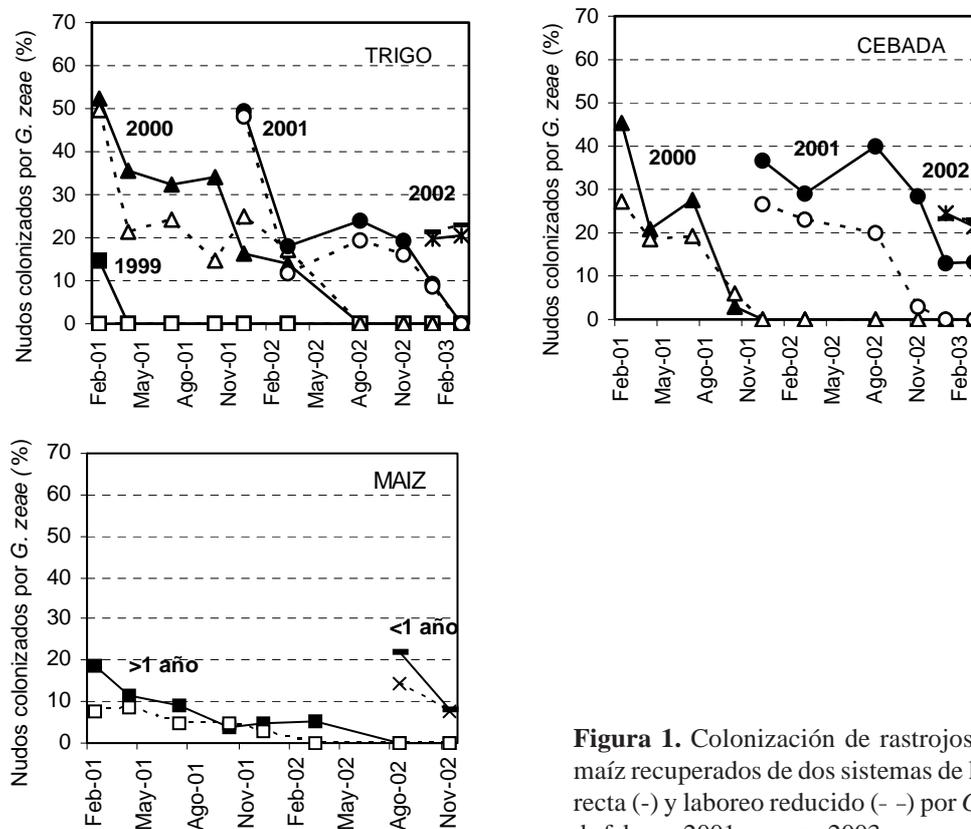


Figura 1. Colonización de rastrojos de trigo, cebada y maíz recuperados de dos sistemas de laboreo: siembra directa (-) y laboreo reducido (- -) por *Gibberella zeae* desde febrero 2001 a marzo 2003.

post-cosecha, capaces de reducir el nivel de inóculo inicial en los rastrojos, podría ser una herramienta útil en el manejo integrado de la FE.

Existen antecedentes que mediante la aplicación de *Microsphaeropsis* sp. a los rastrojos de trigo y maíz, es posible disminuir la producción de ascosporas *in vitro* en estos rastrojos. A campo, si bien no se detectó un efecto en el patrón de maduración de peritecios, se vio un efecto significativo de aplicar *Microsphaeropsis* sp. en el número de peritecios producidos (Bujold *et al.*, 2001).

En Uruguay se evaluó en una primera etapa el efecto de la aplicación de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn y *Trichoderma harzianum* Rifai comercialmente disponibles en Estados Unidos y en Uruguay, en la colonización del rastrojo por *G. zeae* y en la producción de peritecios y ascosporas. Se llevaron a cabo dos experimentos en condiciones semicontroladas donde se aplicaron *B. subtilis*, cepa GBO3 de Estados Unidos (Kodiak®) a 0.05 g/m², 4.6x10¹⁰ ufc/g, *T. harzianum* cepa KRL-AG2 de Estados Unidos (T-22®) a 2 y 5 g/m², 1x10⁷ ufc/g y *T. harzianum* cepa L1 (Trichosoil®) a 2 y 5 g/m², 1x10⁷ ufc/g, y cepas B y C de Uruguay a 5 g/m², 1x10⁷ ufc/g a rastrojo de trigo natu-

ralmente infectado con *G. zeae* (83% de los nudos colonizados). En el Cuadro 1 se presentan los resultados de la colonización del rastrojo por cada uno de los agentes de biocontrol en el tiempo. Ninguno de los tratamientos tuvo un efecto significativo en reducir la colonización del rastrojo por *G. zeae*. Sin embargo, los rastrojos inoculados con *T. harzianum*, T-22® (2 y 5 g/m²) y *T. harzianum*, Trichosoil® (5 g/m²) presentaron una significativamente ($P < 0.05$) menor producción de peritecios por mm² de rastrojo, a los tres meses de aplicar estos antagonistas (Figura 2). En este caso, la menor producción de peritecios de *G. zeae* estuvo en parte explicada por una ausencia de aquellos estados de madurez categoría 1 de la escala de Paulitz que corresponde a inicios de peritecios (Figura 3).

En una segunda etapa se aislaron y seleccionaron, según distintas características, cepas nativas de *Trichoderma* para control biológico de *G. zeae* en rastrojos. Se aislaron 16 cepas de *Trichoderma* spp. de rastrojo de trigo y cebada provenientes de diferentes puntos del país. Las cepas aisladas fueron identificadas fenotípicamente a nivel de género. Se estudió su capacidad antagonista *in vitro* frente a cepas de *G. zeae* seleccionadas (ver ítem Selección de

Cuadro 1. Colonización del rastrojo de trigo (nudos) por *B. subtilis* (Kodiak®) a 0.05 g/m² y *T. harzianum* (T-22® y Trichosoil®) a 2 g/m² y 5 g/m² a los 31, 65, 92, 148 y 177 días luego de la aplicación del agente de biocontrol.

Colonización de nudos por <i>B. subtilis</i> (%)					Colonización de nudos por <i>T. harzianum</i> (%)				
31	65	92	148	177	31	65	92	148	177
36.7 b ¹	46.7a	20.0b	20.0b	40.0a	10.0 c	6.7 d	0.0 b	0.0 b	0.0
86.7a	53.3a	93.3a	46.7a	36.7a	0.0 c	0.0 d	0.0 b	0.0 b	0.0
0.0 c	0.0 b	0.0 c	0.0 bc	0.0 b	66.7 b	60.0 c	26.7 a	20.0 a	13.3
0.0 c	0.0 b	0.0 c	0.0 bc	0.0 b	86.7ab	60.0 c	33.3 a	33.3 a	21.7
0.0 c	0.0 b	0.0 c	0.0 bc	0.0 b	73.3 b	86.7 b	26.7 a	20.0 a	13.3
0.0 c	0.0 b	0.0 c	0.0 bc	0.0 b	93.3 a	100.0 a	31.7 a	33.3 a	26.7
0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0014	0.0392	n.s.

¹ Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes al $P=0.05$ según estadístico de máxima verosimilitud (Chi-cuadrado). La colonización del rastrojo de trigo (nudos) previo a la aplicación del agente de biocontrol fue 20% por *Bacillus* spp. y 0% por *Trichoderma* spp.

² T. h.: *Trichoderma harzianum*.

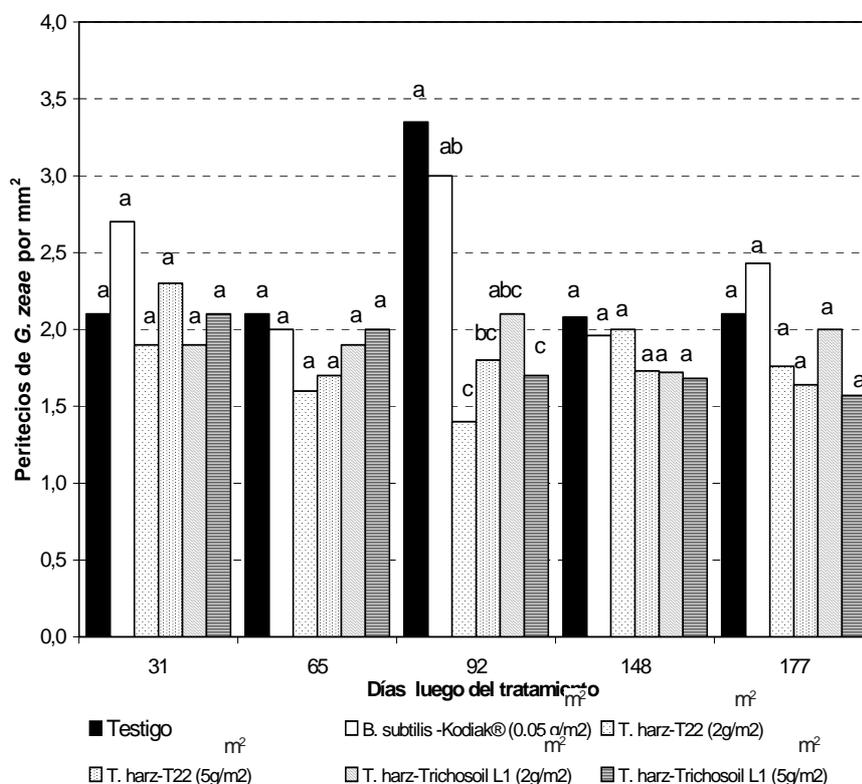


Figura 2. Efecto de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* en el número de peritecios de *Gibberella zeae* en el rastrojo de trigo. Los valores dentro de cada muestreo seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según test de MDS al $P=0.05$.

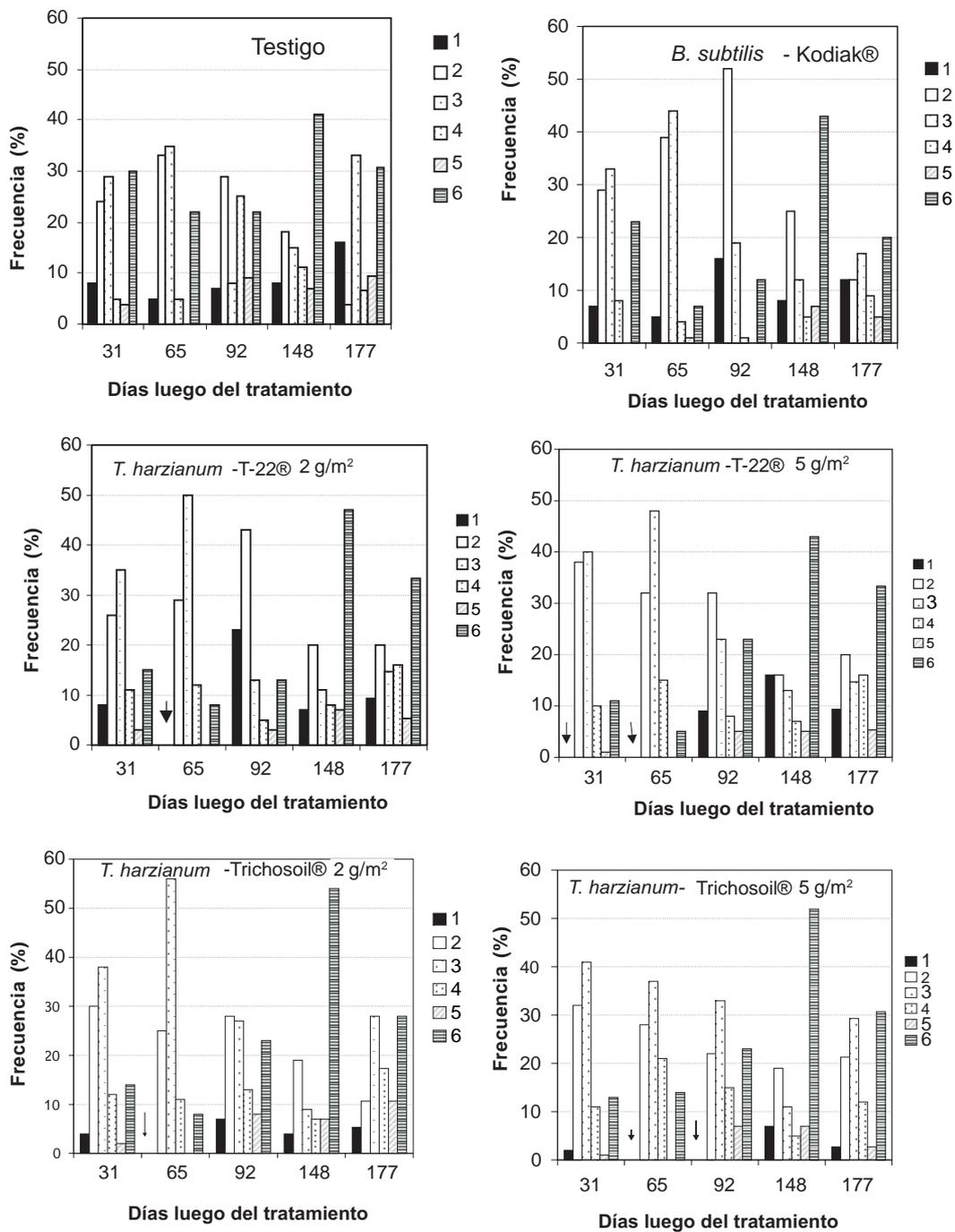


Figura 3. Frecuencias (%) de los estados de madurez de los peritecios de *G. zeae* para cinco tratamientos de biocontrol con *Bacillus subtilis*-Kodiak®, *Trichoderma harzianum*-T22® y *T. harzianum*-Trichosoil® y para el testigo sin tratar en cinco momentos de muestreo (31, 65, 92, 148 y 177 días luego del tratamiento) según la escala de Paulitz (Bujold *et al.*, 2001) donde 1: peritecios de color beige, inmaduros, 2: peritecios de color azul claro, inmaduros, 3: peritecios negro-azulados sin ascas ni ascosporas, 4: peritecios negro-azulados con ascas pero sin ascosporas maduras, 5: peritecios negro-azulados con ascas y con ascosporas maduras, y 6: peritecios negro-azulados sin ascas o vacías o con ascosporas arrugadas o abultadas.

la cepa de patógeno a controlar) mediante cultivos duales de los antagonistas y del patógeno en placas de agar papa-dextrosa (PDA). Se comparó visualmente y se determinó inhibición del crecimiento de los aislamientos de *G. zeae* por parte de los antagonistas comparado con las placas control (placas sembradas solamente con las cepas del patógeno).

Se determinó además la capacidad de producir celulasas, quitinasas y β -1,3-glucanasas. La actividad celulasa se analizó según Zaldívar *et al.* (2001) con el fin de determinar la capacidad del antagonista de degradar el rastrojo y utilizarlo como fuente de carbono. La actividad exoquitinasa se determinó utilizando p-nitrofenil-N-acetil β -D-glucosamina como sustrato siguiendo técnica descrita por Mahadevan & Crawford (1996). La actividad β -1,3-glucanasa se determinó según método de Castoria *et al.* (1997). Estas dos últimas enzimas intervienen en la degradación de paredes celulares de hongos, por lo cual elevados niveles de producción indicarían una mayor capacidad del antagonista de actuar como micoparásito del patógeno. Se determinó además, la sensibilidad *in vitro* al herbicida glifosato, de uso convencional que se aplicaría en conjunto con el antagonista seleccionado. Con la cepa seleccionada se realizarán ensayos de biocontrol en rastrojo.

Selección de la cepa de patógeno a controlar

Se analizaron 22 muestras de trigo provenientes de un muestreo a nivel nacional durante la zafra 2001-2002 y 2002-2003 de donde se aislaron 70 cepas del género *Fusarium*. Las cepas aisladas fueron identificadas genotípicamente mediante el uso de primers específicos para especie y caracterizadas molecularmente (Waalwijk *et al.*, 2003). Se estudió la resistencia *in vitro* a fungicidas de uso convencional, la capacidad de producción de DON *in vitro*, y el grado de colonización de rastrojos evaluando la producción de peritecios y ascosporas [número de peritecios por m² de rastrojo de trigo y estado de madurez según escala de Paulitz (Bujold *et al.*, 2001)].

Para llevar a cabo los ensayos de control biológico en rastrojo se seleccionó la cepa que produjo el mayor número de peritecios en rastrojo colonizado. Se trata de una cepa con niveles medios de sensibilidad a los fungicidas evaluados (tebuconazol, imazalil y tiabendazol). Para realizar los ensayos de control biológico en flor se utilizará como patógeno la cepa que presente mayores niveles de agresividad en planta y que sea capaz de producir altos niveles de DON.

CONSIDERACIONES FINALES

El control biológico representa una alternativa adicional en un enfoque de manejo integrado de la FE, tanto mediante la aplicación de antagonistas en la espiga para impedir la infección como en el rastrojo para interferir en la producción de inóculo primario de la enfermedad. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que es necesario contar con mayor información que incluya conocer el modo de acción de los agentes de biocontrol, el momento óptimo para la aplicación de los mismos, aspectos ecológicos del patógeno y antagonista, formulación más adecuada según la estrategia objetivo y la compatibilidad de la aplicación con otras prácticas de producción de los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

- BERGSTROM, G. C. 2000. NCR-184 State Report New York 2000. Pag. 327-329 in: Proc. 2000 National Fusarium Head Blight Forum, 10-12 December 2000, Erlanger, KY.
- BOASSO, C. 1961. Estado fitosanitario de los cultivos de trigo de la reciente cosecha. Boletín Informativo 854:7.
- BOERGER, A. 1928. Observaciones sobre agricultura, quince años de trabajos fitotécnicos en Uruguay. Montevideo. 436p.
- BUJOLD, I.; PAULITZ, T.C. & CARISSE, O. 2001. Effect of *Microsphaeropsis* sp. on the production of perithecia and ascospores of *Gibberella zeae*. Plant Dis. 85:977-984.
- CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G. & DE CICCO, V. 1997. β -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against post-harvest diseases. Postharvest Biology and Technology 12:293-300.
- COSTA NETO, J. P. DA. 1976. Lista de fungos sobre gramíneas (capins e cereais) no Rio Grande do Sul. [List of fungi on gramineous species in Rio Grande do Sul, Brazil]. Revista da Faculdade de Agronomia. UFRGS 1:43-78.
- DÍAZ DE ACKERMANN, M. & KOHLI, M. M. 1997. Research on *Fusarium* head blight of wheat in Uruguay. Pages 13-18 in: *Fusarium* head scab: Global status and future prospects. H. J. Dubin, L. Gilchrist, J. Reeves, and A. McNab, eds. CIMMYT, DF, México.
- DILL-MACKY, R. & JONES, R. 2000. The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. Plant Dis. 84:654-660.
- FERNÁNDEZ, M. R. 1992. The effect of *Trichoderma harzianum* on fungal pathogens infesting wheat and black oat straw. Soil Biol. Biochem. 24:1031-1034.

- GILBERT, J. & FERNANDO, W. G. D. 2004. Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae*/*Fusarium graminearum*. Can. J. Plant Pathol. 26:464-472.
- KHAN, N. I.; SCHISLER, D. A.; BOEHM, M. J.; SLININGER, P. J. & BOTHAST, R. J. 2001. Selection and evaluation of microorganisms for biocontrol of Fusarium head blight of wheat incited by *Gibberella zeae*. Plant Dis. 85:1253-1258.
- KHONGA, E. B. & SUTTON, J. C. 1988. Inoculum production and survival of *Gibberella zeae* in maize and wheat residues. Can. J. Plant Pathol. 10:232-239.
- LUZ, W. C. DA.; STOCKWELL, C. A. & BERGSTROM, G. C. 2003. Biological control of *Fusarium graminearum*. Pages 381-394 in: Fusarium head blight of wheat and barley. K. Leonard and W. Bushnell, eds. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN.
- MAHADEVAN, B. & CRAWFORD, D. L. 1996. Purification of chitinase from the biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. Enzyme Microb. Technol. 20:489-493.
- MESTERHÁZY, Á. 1997. Methodology of resistance testing and breeding against Fusarium head blight in wheat and results of selection. Cereal Res. Commun. 25:631-637.
- PEREYRA, S. & DÍAZ DE ACKERMANN, M. 2003. Manejo de la fusariosis de la espiga. Pag. 1-15 in: 5ta Jornada Nacional de Manejo y Calidad del Trigo. Mesa del Trigo. Mercedes, Uruguay.
- PEREYRA, S. A.; DILL-MACKY, R. & CASTRO, M. 2004a. *Fusarium* species present in wheat and barley grains in Uruguay. Pag. 488 in: Second International Symposium on Fusarium Head Blight, Vol. 2. Orlando, EEUU.
- PEREYRA, S. A.; DILL-MACKY, R. & GARCÍA, M. 2004b. Survival of *Gibberella zeae* and inoculum contribution of diverse plant species in prevalent crop rotations in Uruguay. Pag. 489-492 in: Second International Symposium on Fusarium Head Blight, Vol. 2. Orlando, EEUU.
- PEREYRA, S. A.; DILL-MACKY, R. & SIMS, A. L. 2004c. Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. Plant Dis. 88:724-730.
- PEREYRA, S. A. 2005. Epidemiological and ecological studies of pathogenic Fusaria causing Fusarium head blight of wheat and barley in Uruguay and prospects for control. PhD thesis, University of Minnesota. 137p.
- PERONDI, N. L.; LUZ, W. C. DA & THOUMAS, R. 1996. Controle microbiológico da giberela do trigo. [Biological control of Fusarium head blight of wheat]. Fitopatol. Bras. 21:243-249.
- PRITSCH, C. 1995. Variabilidad patogénica en *Fusarium* spp. agente causal del golpe blanco del trigo. [Pathogenic variability of *Fusarium* spp. causal agent of wheat scab]. FPTA-INIA. Informe final 79p.
- REIS, E. M. 1988. Doenças do trigo III. Giberela. [Wheat diseases III. Fusarium head blight]. Segunda edição. São Paulo, Brazil.
- SCHISLER, D. A.; KHAN, N. I.; BOHEM, M. J. & SLININGER, P. J. 2002. Greenhouse and field evaluation of biological control of Fusarium head blight on durum wheat. Plant Dis. 86:1350-1356.
- STOCKWELL, C. A.; LUZ, W. C. DA & BERGSTROM, G. C. 1997. Biocontrol of wheat scab with microbial antagonists. Phytopathology 87:S94.
- STOCKWELL, C. A.; LUZ, W. C. DA & BERGSTROM, G. C. 2000. Identification of bioprotectants for control of *Gibberella zeae*. Pages 114-117. In: 2000 National Fusarium head blight Forum (proc.), 10-12 December 2000, Erlanger, KY.
- SUTTON, J. C. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. Can. J. Plant Pathol. 4:195-209.
- WAALWIJK C.; KASTELEIN P.; DE VRIES I.; KERÉNYI Z.; VAN DER LEE T.; HESSELINK T.; KÖHL J. & KEMA G. 2003. Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. European Journal of Plant Pathology. 109:743-754.
- ZALDÍVAR, M; VELÁZQUEZ, J.C.; CONTRERAS, I. & PÉREZ, L.M. 2001. *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. Electronic Journal of Biotechnology [online]. Vol. 2, no. 3. Disponible en: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol4/issue3/full/7/> ISSN 0717-3458.