



## A1-193 Potenciales agentes de biocontrol de las principales enfermedades de poscosecha del Kiwi en Argentina.

María Gabriela Ducid<sup>1</sup>, Cecilia Mónaco<sup>1,2</sup> y Analía Perelló<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Fac. Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP), <sup>2</sup> Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI). gaducid@agro.unlp.edu.ar, cecilia.monaco7@gmail.com, anaperello2@yahoo.com.ar

### Resumen

El objetivo de este trabajo fue identificar enfermedades del fruto de Kiwi en poscosecha, conocer sus agentes causales y disponer de métodos de control alternativos que minimicen el uso de agroquímicos. El uso de microorganismos antagonistas ofrece una alternativa complementaria de escasos antecedentes y no explorada en Argentina. Se identificaron enfermedades fúngicas a partir de frutos enfermos y se seleccionaron potenciales antagonistas desde la micoflora asociada al filoplano, fruto y suelo del cultivo de kiwi. La capacidad antagónica se evaluó in vitro. Se identificaron como agentes causales de podredumbres a *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* y *Pestalotiopsis* sp. Los antagonistas seleccionados fueron *Epicoccum nigrum* y *Trichoderma harzianum*. Las cepas de *T. harzianum* presentaron efecto antagónico reduciendo significativamente la expresión de la enfermedad. Existen hongos saprobios que pueden utilizarse en el manejo integrado de enfermedades del kiwi.

**Palabras-clave:** antagonistas; podredumbre; *Botrytis cinerea*; *Alternaria alternata*; *Pestalotiopsis* sp.

### Abstract

There is little information about diseases of Kiwi fruit in postharvest. It is necessary to know their causal agents and alternative control methods to minimize the use of agrochemicals. Antagonistic microorganisms offer a complementary alternative to analyze. The objectives of this study were to identify postharvest diseases and select antagonists to be used as biocontrol agents. Microorganisms were isolated from diseased fruits and pathogenicity tests were performed. Potential antagonists were selected from micoflora associated to phyloplane, fruit and soil cultivation. The antagonistic capability was assessed in vitro. *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, and *Pestalotiopsis* sp. were identified as causal agents of kiwi rot. *Epicoccum nigrum* and three strains of *Trichoderma harzianum* were selected as antagonists to perform biocontrol bioassays under in vitro conditions. *T. harzianum* strains tested showed antagonistic effect when compared with the controls. This saprophytes fungi could be used into an integrated kiwi diseases management.

**Keywords:** antagonists; decay; *Botrytis cinerea*; *Alternaria alternata*; *Pestalotiopsis* sp

### Introducción

El kiwi es una planta trepadora originaria de las montañas de China. Su cultivo se extendió hacia el resto del mundo alcanzando en Argentina una notable producción en los últimos 20 años (Eliseche, 2007). Entre las adversidades fitosanitarias que afectan el cultivo, la detección de la podredumbre gris del fruto, ocasionada por *Botrytis cinerea* en nuestra zona de producción (Perelló & Mónaco, 2006, comunicación personal) resalta la importancia del relevamiento de enfermedades en Argentina y de disponer de métodos para su control dada la escasa información al respecto. Si bien el uso de agroquímicos ha permitido obtener

incrementos sustanciales en la producción, sus efectos adversos están impactando de manera significativa la sostenibilidad de la agricultura (Rosello Caselles, 2003; Lorito et al., 2010). Dentro de este contexto, el uso de microorganismos antagonistas como posibles agentes de biocontrol ofrece una alternativa complementaria dentro del manejo integrado de las enfermedades del cultivo cuya eficacia no ha sido probada en kiwi (Adaskaveg et al., 2002). Se plantearon como objetivos de este trabajo: 1) identificar las enfermedades de postcosecha de las zonas productoras de la Provincia de Buenos Aires, 2) seleccionar antagonistas para las mismas desde la micoflora asociada al filoplano, fruto y al suelo proveniente del cultivo de kiwi; 3) determinar la capacidad antagónica de los aislamientos in vitro.

### Metodología

Se recolectaron 100 frutos y 100 hojas de Kiwi en tres establecimientos ubicados en Provincia de Buenos Aires, en las localidades de Sierra de Los Padres, Etcheverry y Lisandro Correa. Se siguieron las técnicas fitopatológicas de rutina para aislar e identificar microorganismos saprobios y patógenos (Godeas, 1992). Se realizaron pruebas de patogénesis de las enfermedades detectadas. Se aislaron cepas fúngicas de *Trichoderma* spp provenientes de suelo de cultivo de kiwi a partir de diluciones del mismo en medio TSM (*Trichoderma* Selective Medium) (Elad & Chet, 1983).

Se seleccionaron cuatro potenciales antagonistas y se probó su efecto sobre los patógenos aislados a través de cultivos duales de acuerdo a lo propuesto por Faifer & Bertini (1988). Se realizaron 10 repeticiones de cada combinación. La unidad experimental fue la placa de Petri. Los datos obtenidos se evaluaron utilizando la fórmula de Índice de inhibición del crecimiento micelial (IICM) de la colonia propuesta por Perelló et al. (2001). Los datos fueron analizados estadísticamente con Infostat por análisis de la varianza y la significancia de las diferencias entre los tratamientos se determinó usando el test de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### Resultados y discusiones

Se obtuvieron 416 cepas fúngicas de las tres localidades pertenecientes al Phylum Ascomycota, Clases Sachcaromycetes (levaduras), Hyphomycetes y Coelomycetes. Géneros como *Alternaria* sp., *Epicoccum* sp., *Botrytis* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., y diferentes micelios hialinos estériles se presentaron con diferente abundancia. De las especies aisladas *B. cinerea*, *A. alternata* y *Pestalotiopsis* sp. fueron causantes de enfermedades del kiwi. *Botrytis cinerea* es citado como el patógeno más relevante en el mundo por las pérdidas significativas que origina en postcosecha (Michailides & Elmer, 2000; Pyke et al., 1994). Por su parte, *Alternaria alternata* y *Pestalotiopsis* sp. fueron las especies de mayor abundancia en este relevamiento. Por lo antedicho, estos 3 hongos fueron seleccionados para las pruebas de biocontrol con microorganismos antagonistas nativos y foráneos.

Entre los microorganismos saprobios nativos que fueron aislados en este ensayo, *Epicoccum nigrum* fue seleccionado para los ensayos de biocontrol. El fundamento de su elección se basa en el hecho de haber sido aislado en las tres localidades analizadas y por existir antecedentes promisorios previos de su efectividad en kiwi y otros cultivos en postcosecha (Franicevic, 1993). Del suelo proveniente de las tres localidades se aislaron entre 3000 y 3500 unidades formadoras de colonias por gramo de suelo de *Trichoderma* spp. La especie fue identificada como *T. harzianum* en todos los casos. De estos aislamientos se seleccionaron tres cepas para probar su efectividad en los ensayos de antagonismo in vitro (Th2, Th4 y Th7), ya que la mayoría de las investigaciones en

biocontrol de enfermedades en postcosecha de kiwi y otros frutos se centra en el empleo de especies del género *Trichoderma* (Dubos, 1992; Pyke et al., 1994). Existen referencias que señalan que las aplicaciones en postcosecha de *T. viride* en heridas de kiwi redujeron significativamente la podredumbre ocasionada por el patógeno (Harvey et al., 1991; Hill, 1992).

El análisis factorial de la varianza para los valores de Índice de Inhibición Micelias (IIM) de cada patógeno demostró que existen diferencias significativas entre los tratamientos, los días de medición y la interacción Tratamiento x tiempo. Esto significa que el efecto antagónico sobre los patógenos fue diferente según el paso de los días y del antagonista evaluado. De acuerdo a estos resultados, se realizó una interpretación de cada día del ensayo por separado (Tabla 1). Se consideró antagonista efectivo aquel que superó el 50% de inhibición, es decir tuvo un índice de inhibición mayor a 2.

**TABLA 1.** Índice de inhibición de *B. cinerea*, *A. alternata* y *Pestalotiopsis* sp. en los diferentes tratamiento con los potenciales antagonistas.

Patógeno	Antagonista	Día 2	Día 4	Día 6
<b><i>B. cinerea</i></b>	<i>E. nigrum</i>	0,90 b	1,39 ab	1,74 a
	Th2	1,64 c	1,53 b	2,52 b
	Th4	0,58 a	1,17 a	1,93 a
	Th7	0,80 ab	1,46 ab	2,39 b
<b><i>A. alternata</i></b>	<i>E. nigrum</i>	0,98 b	0,97 a	1,19 a
	Th2	0,95 ab	1,00 a	1,50 c
	Th4	0,86 ab	1,21 b	1,24 ab
	Th7	0,75 a	0,96 a	1,44 bc
<b><i>Pestalotiopsis</i> sp.</b>	<i>E. nigrum</i>	0,98 a	1,14 a	1,39 a
	Th2	1,02 a	1,08 a	1,66 b
	Th4	0,80 b	1,07 a	1,57 b
	Th7	0,82 b	1,03 a	1,61 b

IIM: Índice de inhibición; Letras distintas significan diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre microorganismos según día analizado (dentro de cada columna).

Los tipos de interacciones entre patógenos y antagonistas difirieron de manera particular según cada caso. *E. nigrum* no presentó efecto antagónico, ya que no logró en ningún caso superar el crecimiento del patógeno ya sea cubriendo o rodeándolo. La cepa Th2 en todos los casos presentó mayor habilidad para competir y dominar a los patógenos bajo las condiciones experimentales probadas. La interacción que establece es de dominancia por contacto, con posterior crecimiento de la especie dominante sobre las especies inhibidas. Las cepas Th4 y Th7, a diferencia de la cepa Th2, dominaron e inhibieron el crecimiento de los 3 patógenos, pero rodeando los mismos en lugar de cubrirlos con su micelio y conidios.

Cada interacción patógeno-antagonista en particular, mostró variaciones en la efectividad de control ejercida según los parámetros analizados en este ensayo: inhibición del crecimiento micelias del patógeno, tipo de interacción micelias producida y/o alteraciones morfológicas producidas en el micelio. Las interacciones fúngicas juegan un papel importante determinando que especies dominarán el ecosistema de las plantas y/o frutos almacenados bajo condiciones ambientales determinadas (Magan & Lacey, 1984). Por otra parte, muchas

veces, las mejores condiciones en las que se desarrolla un hongo, no son aquellas en las que crece mejor, sino aquellas en las que presenta una mayor competencia frente a otros hongos (Magan & Lacey, 1984; Harman, 2004).

En el caso de los resultados aquí descriptos la capacidad antagonista manifestada por las 3 cepas de *T. harzianum* es variable. En general, este hongo se destaca por inhibir las colonias de los patógenos con los que interactuó ya sea por sobrepasarlas en crecimiento o por rodearlas e impedir su normal desarrollo. La capacidad antagonista de *T. harzianum* dependió además, de la especificidad de la cepa aislada. De acuerdo con lo señalado por Acevedo & Arcia (1988), algunos aislamientos pueden ser más eficientes para el control de un patógeno que para otro; de tal manera que esa especificidad deberá ser medida, y en caso de tener situaciones de este tipo, Arcia (1995) recomienda usar mezclas de cepas antagonistas, a fin de controlar las poblaciones patógenas. Según este mismo autor, la especificidad puede llegar a ser tan alta que aislamientos de un mismo lugar geográfico pero de diferentes sitios de una misma planta, pueden tener diferente agresividad y virulencia. En este trabajo se destaca particularmente la cepa Th2 por su mayor efectividad de biocontrol frente a los patógenos de kiwi ensayados. Este dato es de interés en el contexto de la importancia de buscar antagonistas efectivos en cada área geográfica. Mihuta-Grimm y Rowe (1986) demostraron que de 255 aislamientos obtenidos de diferentes lugares, sólo el 15% de los mismos fueron efectivos en el control de *Rhizoctonia*; indicaron igualmente, que las cepas aisladas del mismo lugar son más efectivas que las introducidas. Arcia (1995) señala que en general, el mejor aislamiento es aquel que proviene de la misma zona, si bien pueden proceder de otras fuentes relacionadas, o no relacionadas. Varios antecedentes coinciden en señalar la efectividad de aislar antagonistas del fruto a fin de reunir una colección de antagonistas efectivos frente a diversos patógenos de postcosecha (Acevedo, 1989; Bautista y Acevedo, 1993; Lo et al., 1996). Por su parte, las tres cepas ensayadas de *Trichoderma*, procedieron de suelos donde crecían plantas de kiwi, lo que hace suponer su adaptación al medio. Respecto al origen de la cepa de *E. nigrum* empleada, el filoplano es una excelente fuente de antagonistas que comparte parte de la microflora residente en frutos además de otros microorganismos (Hernández et al., 1998; McAllister et al., 1994). *Epicoccum* sp. produce varias sustancias fitotóxicas tales como Flavipirina y Epicorazina B que inhiben la germinación de *Botrytis allii* (Mallea et al., 1991). En este ensayo, la cepa empleada produjo en APG abundantes pigmentos con colores que varían desde amarillo pálido al naranja-rojizo y que tiñeron intensamente tanto el haz como el reverso del medio de cultivo. Dichos pigmentos son conocidos por su efecto antifúngico e inhibición del crecimiento de otros hongos patógenos (Mallea et al., 1991) y podrían ser los responsables de las alteraciones observadas en *A. alternata* en contacto con este antagonista.

## Conclusiones

En el cultivo de kiwi en Argentina se identificaron enfermedades tales como la podredumbre ocasionada por *Botrytis cinerea*, otras nuevas determinadas localmente, tales como la podredumbre por *Alternaria alternata*, y enfermedades de etiología aún incierta, tal es el caso de *Pestalotiopsis* sp. Existe un grupo de hongos saprobios aislados del filoplano, fruto y suelo del kiwi que presentó efectos antagónicos con los microorganismos patógenos evaluados. Dichos microorganismos y/o sus metabolitos, pueden ser aprovechados para el manejo integrado de enfermedades del kiwi en el marco de una agricultura de bajo impacto ambiental que integra el uso de biocontroladores naturales al empleo de agroquímicos.

## Referencias bibliográficas

- Adaskaveg JE, H Förster, & NF Sommer (2002). Principles of postharvest pathology and management of decays of edible horticultural crops. in: Postharvest Technology of Horticultural Crops, 4th ed.. A. Kader, ed. University of California DANR Publ. 3311, Oakland, CA. 163-195 pp.
- Arcia, A. M. (1995). Uso de Antagonistas en el Control de Fitopatógenos del Suelo. En: Curso sobre Control Microbial de Insectos Plagas y Enfermedades en Cultivos. Trabajo Mimografiado, presentado en seminario en la Universidad Centro Occidental (UCLA). Barquisimeto - Venezuela. 20 pp.
- Bautista, L. & R. Acevedo (1993). Antagonismo In vitro de dieciseis aislamientos de *Trichoderma* sp. vs. *Sclerotium cepivorum*. (Resumen). Fitopatol. Venez. 6(2): 54.
- Dubos, B. (1992). Biological control of *Botrytis*: state of the art. In Verhoeff, K., Malathrakis, N.E. and Williamson, B. (eds), Recent advances in Botrytis research. Pudoc Scientific Publishers, Wageningen. 169-178 pp.
- Elad, Y. & I. Chet (1983). Improved selective media for isolation of *Trichoderma* spp. or *Fusarium* spp. Phytoparasitica 11(1): 55-58.
- Eliseche, A. (2007). Tesis de grado de la Carrera de Licenciatura en Administración Agraria. Título: El negocio del kiwi en el cinturón verde de Mar del Plata. Profesores: Sergio Costantino y Carlos Iorio. Universidad CAECE.
- Faifer, G. & M.D. Bertini (1988). Interactions between epiphytes and endophytes from phyllosphere of *Eucalyptus vitaminalis* III. Nova Hedwigia 47: 219-229.
- Franicevic, S.C. (1993). Biological control of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* on kiwifruit. Ph. D Thesis, School of Biological Sciences, University of Auckland.
- Godeas, A. M. (1992). Estudios de descomposición en plantaciones de *Pinus taeda* III. Sucesión fúngica. Bol. Soc. Argent. Bot., vol. 28 (1-4): 151-157.
- Harman G., R. Howell, A. Viterbo, I. Chet & M. Lorito (2004). *Trichoderma* species. Opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews. Microbiology 2: 43-56
- Harvey, I.C., N.B. Pyke, P. Elmer & R. Balasubramanian (1991). The biological control of *Botrytis* stem end rot of kiwifruit. 2nd International Kiwifruit Symposium, New Zealand. (Poster).
- Hernández, J. F. Isea, A. Arcia & R. Santos (1998). Primer Reporte del Control Biológico in vitro de *Dothiorella dothidea*. (Resumen). XLIV Reunión Anual de la Sociedad Interamericana de Horticultura Tropical. Barquisimeto – Venezuela.
- Hill, R.A. (1992). Can kiwifruit diseases be controlled biologically? Proceedings of the 4th National Kiwifruit Conference (supplement).
- Lacey, J. & N. Magan (1991). Fungi relationships in cereal grains: their occurrence and water and temperature. En: Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Chelkowski J (Ed.). Elsevier. Amsterdam. 77-118 pp.
- Lo, C., E. Nelson, C. Hayes & G. Harman (1998). Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. Phytopathology 88(2):129-136.
- Lorito M., S. Woo, G. Harman & E. Monte (2010). Translational research on *Trichoderma* from omics to the field. Annu. Rev. Phytopathol 48: 395-417.
- Magan, N. & J. Lacey (1984). Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. Trans. Brit. Mycol. Soc. 82: 83-93.
- Mallea, M., D. Pesando, P. Bernard & B. Khoualalen (1991). Comparison between antifungal and antibacterial activities of several strains of *Epicoccum purpurascens* from the Mediterranean area Mycopathologia 115: 83-88.
- Mcallister, C., I. García-Romero, A. Godeas & J. Ocampo (1994). Interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*: Effects on plant growth, arbuscular mycorrhizas and the saprophyte inoculants. Soil Biology & Biochemistry 26(10): 1363-1367.
- Michailides, T.J. & G. Elmer (2000). *Botrytis* Gray Mold of Kiwifruit Caused by *Botrytis cinerea* in the United States and New Zealand. Plant Disease 84 (3): 208-223.
- Mihuta-Grimm, L. & C. Rowe (1986). *Trichoderma* spp. as biocontrol agents of *Rhizoctonia* damping-off of radish in organic soil and comparison of four delivery systems. Phytopathology 76(3):306-312.
- Perelló, A.E., M.R. Simón, M.N. Sisterna, C.A. Cordo & A.M. Arambarri (2001). Microflora of wheat (*Triticum aestivum* L.) in Buenos Aires Province (Argentina) and its possible significance in



- biological control of foliar pathogens. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und pflanzenschutz (Journal of Plant Diseases and Protection) 108: 459-471.
- Pyke, N.B., P.A.G. Elmer, K.G. Tate, P.N. Wood, L.H. Cheah, I.C. Harvey, K.S.H. Boyd-Wilson & R. Balasubramanian (1994). Biological control of *Botrytis cinerea* in kiwifruit: problems and progress. Biological fruit production: contributed papers. The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand Ltd. Edited by Howard Wearing, Hort Research, Clyde Research Centre.
- Rosello Caselles, J. (2003). Capacidad antagonista de *Penicillium oxalicum* Currie & Thom y *Trichoderma harzianum* Rifai frente a diferentes agentes fitopatógenos. Estudios ecofisiológicos. (Tesis de Doctorado – Universidad Politécnica de Valencia). Identificador universal: <http://hdl.handle.net/10251/2905>.