

TRABAJO

MICROBIOMA ENDOSFÉRICO EN *Eucalyptus sp.* Y SU POTENCIAL ACCIÓN BIOCONTROLADORA FREnte A ORGANISMOS PATÓGENOS EN EL CULTIVO

ENDOSPHERIC MICROBIOME IN *Eucalyptus sp.* AND ITS POTENTIAL BIOCONTROLLER ACTION AGAINST PATHOGENIC ORGANISMS IN CULTIVATION

Ayme Denise Flores Maidana¹, José Catacata¹ y Nancy Sivila¹

¹*Cátedra de Fitopatología. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Jujuy. Alberdi N° 47. San Salvador de Jujuy (4600).

*Autor para correspondencia:
fitopatologia@fca.unju.edu.ar

Licencia:

[Licencia Creative Commons](#)

Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional

Período de Publicación:

Julio 2020

Historial:

Recibido: 02/07/2019

Aceptado: 10/04/2020

RESUMEN

Argentina cuenta con 1.200.00 ha de bosques cultivados de las cuales 11.432 ha corresponden a plantaciones de eucaliptos en la provincia de Jujuy. Las enfermedades que afectan a este cultivo, por lo general, lo hacen en las etapas de almácigo y vivero. Una de las alternativas para su control es el uso de biocontroladores, tal como microorganismos endófitos. Estos producen metabolitos bioactivos que modifican los mecanismos de defensa de su hospedante. El objetivo de este trabajo fue aislar organismos endofíticos de hojas de *Eucalyptus sp.* y determinar su potencial como agentes de control biológico frente a fitopatógenos en cultivos. Para ello se tomaron muestras de hojas asintomáticas, las que se desinfectaron y sembraron en el medio agar-papa-glucosado. Fueron identificados nueve géneros de hongos: *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Pestalotia* sp., *Guignardia* sp. y *Cercospora* sp. Se logró aislar *Bacillus* sp. como bacteria endófita. Se eligieron *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. para la evaluación *in vitro* frente *Alternaria* sp. aislada como patógeno del cultivo. Los mejores porcentajes de inhibición de crecimiento radial (PICR) se alcanzaron con *Bacillus* sp. 81.10% seguido de *Trichoderma* sp. con 43.94%.

Palabras claves: *Eucalyptus*, organismos endófitos, biocontroladores

SUMMARY

Argentina has 1,200.00 ha of cultivated forests of which 11,432 ha correspond to eucalyptus plantations in the province of Jujuy. Diseases that affect this crop usually do so in its nursery bed and nursery stages. One of the alternatives for its control is the use of biocontrollers, such as endophyte microorganisms, which produce bioactive metabolites that modify the defense mechanisms of their host. The objective of this work was to isolate endophytic organisms from *Eucalyptus* sp. Leaves and to determine their potential as biological control agents against phytopathogens in the crop. For this purpose, samples of asymptomatic leaves were taken, disinfected and sown in potato-glucose-agar medium. Nine fungal genera were

identified: *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Pestalotia* sp., *Guignardia* sp. and *Cercospora* sp. *Bacillus* sp. was isolated as endophytic bacteria. *Trichoderma* sp. and *Bacillus* sp. were chosen for in vitro evaluation against *Alternaria* sp. isolated as culture pathogen. The best percentages of inhibition of radial growth (PIRG) were achieved with *Bacillus* sp. 81.10% followed by *Trichoderma* sp. with 43.94%.

Keywords: biocontrollers, *Eucalyptus*, endophytic organisms.

INTRODUCCIÓN

Argentina cuenta aproximadamente con 1.200.000 ha de bosques cultivados, conformados casi exclusivamente por especies exóticas, el 25 % de la superficie corresponde a plantaciones de eucaliptos (Beale y Ortiz, 2013). De acuerdo al inventario Nacional de Plantaciones Forestales la superficie implantada es de aproximadamente 313.869 ha y la principal zona productiva se encuentra en la Mesopotamia. En la provincia de Jujuy la superficie forestada con eucalipto llega a 11.432 ha, principalmente en el departamento de Palpalá y la zona de La Almona (Ortiz, 2015). Las especies que se destacan son *Eucalyptus grandis* y *E. saligna*; en menor medida *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. viminalis* y *E. globulus*. La producción se destina a la fabricación de papel, madera para aserradero, carpintería, postes, construcción de pallets y cajones, entre otros usos (Beale y Ortiz, 2013). Así mismo podemos encontrar otras especies tal como *E. torelliana* utilizada en cortinas rompevientos.

Las enfermedades que afectan a este cultivo por lo general lo hacen en almácigos y viveros mientras que en las plantaciones no hay grandes problemas de enfermedades. Algunos fitopatógenos que afectan al cultivo son: "tizón bacteriano" (*Xanthomonas axonopodis*), "viruela" (*Phaeoseptoria eucalypti*), "antracnosis" (*Colletotrichum* sp.), "mancha foliar tardía" (*Cylindrocladium scoparium*) y "manchas foliares" (*Cercospora eucalypti*) (Alcoba, Bejarano y Catacata, 2005; Quintana y Bejarano, 2017).

El uso frecuente de fitosanitarios favorece el desarrollo de resistencia en los patógenos que se desea controlar, lo cual conlleva a incrementar la cantidad aplicada o frecuencia de aplicación. Por este motivo se plantea el uso de organismos biocontroladores como una alternativa al control

químico, que resulte más inocua y amigable con el medio ambiente (Romero, Crosara y Baraibar, 2008).

Los microorganismos endófitos tales como hongos o bacterias pueden, durante parte o todo su ciclo de vida, invadir tejidos vegetales vivos causando infecciones asintomáticas (Gamboa Gaitán, 2006). Establecen una estrecha relación con la planta, siendo capaces de producir metabolitos bioactivos, así como modificar los mecanismos de defensa de su hospedante, permitiendo e incrementando la supervivencia de ambos organismos, constituyendo de esta manera una nueva vía para la obtención de diversos precursores o moléculas novedosas de utilidad en la agricultura (Sánchez-Fernández y otros, 2013). Sbravatti (2013) aisló de *Eucalyptus benthamii* unos hongos endófitos que fueron usados para el control de *Botrytis cinerea*, siendo *Trichoderma* sp. el endófito con mayor potencial para el control, seguido de *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp.

El objetivo de este trabajo fue aislar organismos endófitos de hojas de *Eucalyptus* sp. y determinar su potencial como agentes de control biológico frente a fitopatógenos del cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

La recolección de hojas asintomáticas y con presencia de síntomas se realizó en plantaciones comerciales, viveros y fincas ubicados en las localidades de Yala, El Ceibal, La Almona, Arrayanal y Calilegua, las cuales se conservaron a 4 °C hasta su procesamiento en el Laboratorio de Fitopatología y en el Centro de Investigación en Sanidad Forestal (CISFO) de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Jujuy (FCA-UNJu)

Aislamiento de endófitos

Para el aislamiento de microorganismos endófitos se siguió el método de Zhang, Wei & Wang (2012). Cada muestra consistió en 25 hojas asintomáticas que fueron lavadas con agua y solución detergente. Se cortaron en pequeños trozos, los cuales fueron desinfectados con alcohol 70% durante tres minutos seguido de enjuagues con agua destilada estéril. Los trozos de hojas se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo agar papa glucosado al 2 % (APG), realizándose cinco repeticiones por muestra. Se incubó a 28 °C durante siete días. Las colonias observadas se repicaron en medio de cultivo APG e incubaron por siete días. Los hongos endófitos fueron caracterizados e identificados tanto macro como microscópicamente. Para la identificación de bacterias endófitas se purificaron en Agar Nutritivo y APG (Agar Papa Glucosado) para observaciones macroscópicas de forma, color y borde de la colonia, se realizaron tinciones de Gram y de Endosporos, y prueba de Catalasa.

Aislamiento de patógenos

Las hojas con síntomas necróticos fueron desinfectadas superficialmente con alcohol 70 %, enjuagadas con agua destilada estéril, cortadas en pequeños fragmentos, nuevamente enjuagadas sucesivas veces con agua destilada estéril y colocada en cajas de Petri con medio de cultivo APG llevándose a incubación por 7 días a 28 °C. Las observaciones fueron realizadas periódicamente a los efectos de repicar las colonias en medio de cultivo APG para su identificación macro y microscópica.

Evaluación de la interacción *in vitro* de los organismos endófitos aislados frente a patógenos presentes en el cultivo

La evaluación de la capacidad antagónica *in vitro* se efectuó por medio de la técnica de cultivos duales, que consiste en colocar en un extremo de la caja de Petri con medio de cultivo APG un disco de 5 mm de diámetro del patógeno y en el otro extremo un disco de 5 mm de diámetro con el organismo promisorio para el control, quedando aproximadamente a 3 cm de distancia entre ellos. Para el testigo se sembró en el centro de las cajas de Petri un disco de 5 mm de diámetro con el patógeno. Se llevó a incubación por 7 días a 25°C, periódicamente se midió los diámetros de las colonias del patógeno en los cultivos duales y en

las cajas testigo. El efecto antagónico se evalúo por medio del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) a 7 días de incubación, el cual se calculó mediante la siguiente fórmula propuesta por Ezziyyani, Pérez Sánchez, Sid Ahmed, Requena y Candela (2004): $PICR = (R1-R2)/R1 \times 100$; siendo R1 el crecimiento radial del patógeno testigo y R2 el crecimiento radial del patógeno en los tratamientos en cultivo dual (Bell, Wells y Markham 1982).

RESULTADOS

Aislamiento de endófitos fúngicos

A los 7 días de incubación del total de las muestras se obtuvieron catorce colonias de hongos, de las cuales fueron clasificadas nueve, el resto no desarrolló estructuras reproductivas que permitieran identificarlas. Los géneros que se encontraron con mayor frecuencia fueron *Penicillium* sp. y *Alternaria* sp. En menor frecuencia se encontraron *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Pestalotia* sp., *Guignardia* sp. y *Cercospora* sp. (Tabla 1) (Figura 1, 2 y 3). El aislamiento de estos hongos en las hojas sanas indica su condición endofítica o latente

Tabla 1. Frecuencia de hongos endófitos aislados de hojas de *Eucalyptus* sp. y total de géneros aislados por muestra.

HONGOS AISLADOS	MUESTRAS					FRECUENCIA %
	1	2	3	4	5	
<i>Alternaria</i> sp.	✓	✓				16,66
<i>Cercospora</i> sp.					✓	8,33
<i>Fusarium</i> sp.				✓		8,33
<i>Guignardia</i> sp.					✓	8,33
<i>Penicillium</i> sp.	✓	✓	✓			25
<i>Pestalotia</i> sp.					✓	8,33
<i>Phytophthora</i> sp.			✓			8,33
<i>Rhizoctonia</i> sp.	✓					8,33
<i>Trichoderma</i> sp.				✓		8,33
*TG	3	2	2	2	3	100%

*TG: Total de géneros aislados por muestras.

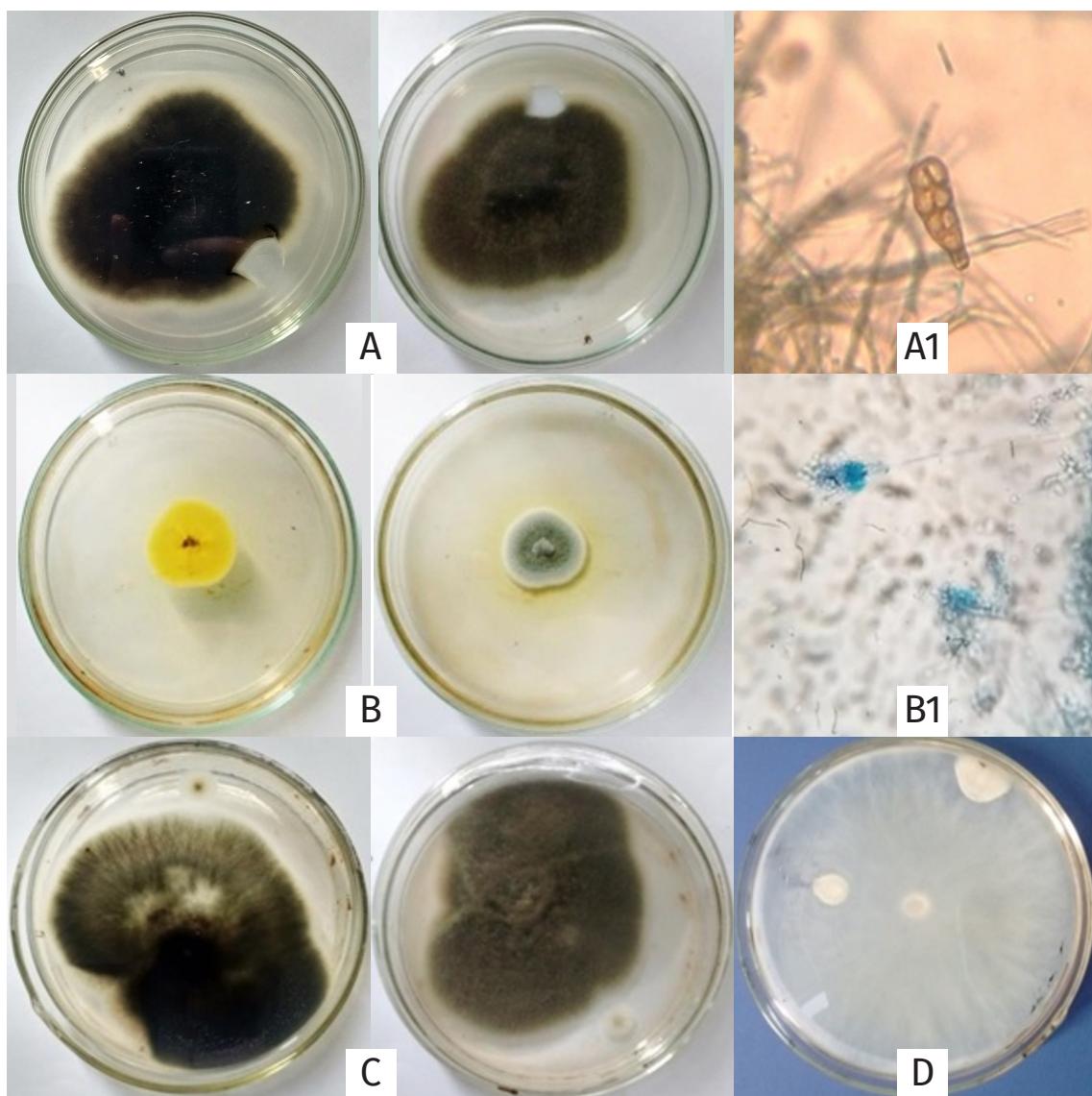


Figura 1. Caracterización macro y microscópica: **A:** *Alternaria* sp. (Frente y reverso); **A1:** Conidios de *Alternaria* sp; **B:** *Penicillium* sp. (Frente y reverso); **B1:** Estructura microscópica de *Penicillium* sp.; **C:** *Rhizoctonia* sp. (Frente y reverso); **D:** *Phytophthora* sp.

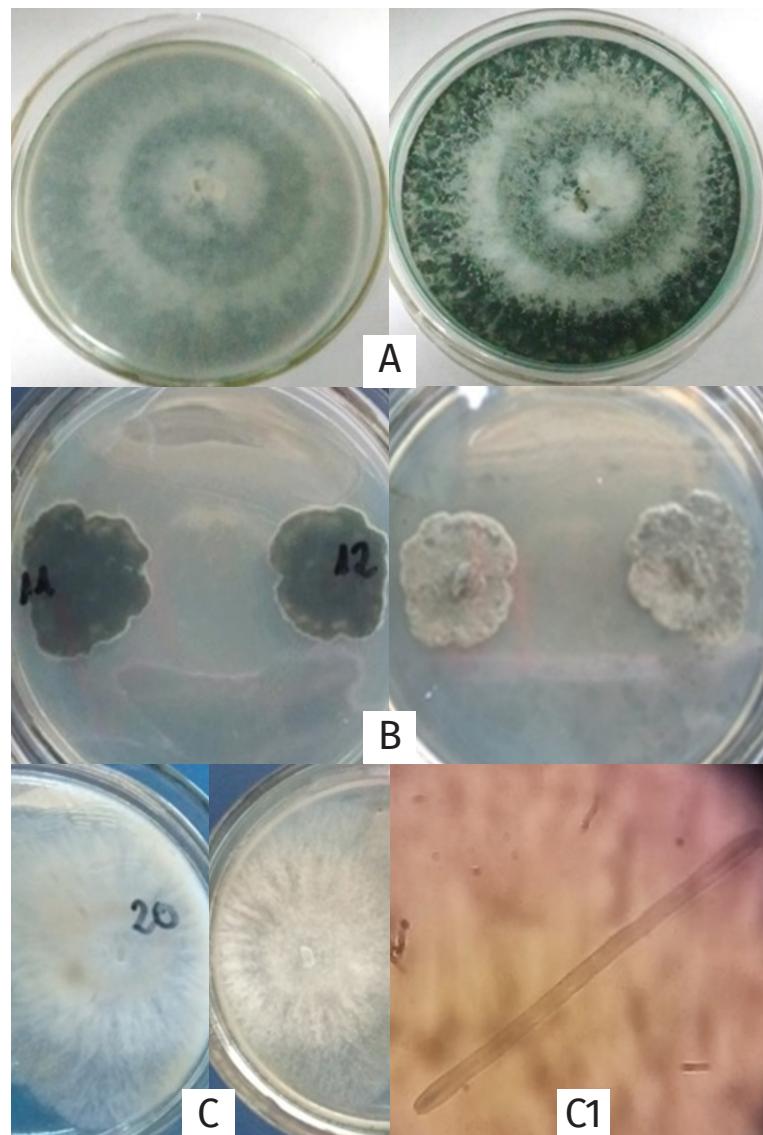


Figura 2. Caracterización macro y microscópica: **A:** *Trichoderma* sp. (Frente y reverso); **B:** *Guignardia* sp. (Frente y reverso); **C:** *Cercospora* sp. (Frente y reverso); **C1:** Conidios de *Cercospora* sp.

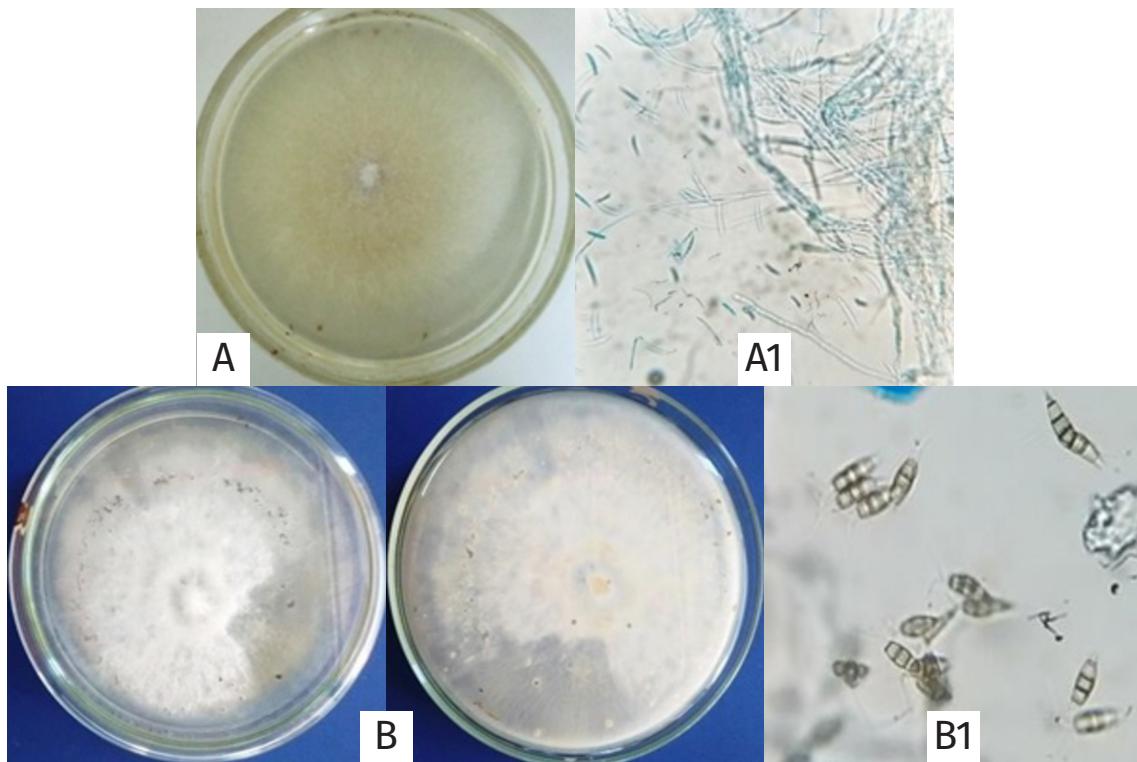


Figura 3. Caracterización macro y microscópica: **A:** *Fusarium* sp.; **A1:** Conidios de *Fusarium* sp.; **B:** *Pestalotia* sp. (Frente y reverso), puntos negros corresponden a las acérvulas; **B1:** Conidios de *Pestalotia* sp.

Asilamiento de bacterias endófitas

Las colonias bacterianas desarrolladas se identificaron como *Bacillus* sp., por presentar endosporos y dar positivas la tinción Gram y reacción de Catalasa (Figura 4). Estas colonias se caracterizan por ser blanquecinas, grandes, extendidas e irregulares (Layton, Maldonado, Monroy, Corrales y Sánchez, 2011).



Figura 4. Colonia de *Bacillus* sp.

Asilamiento de organismos patógenos en el cultivo

Se lograron identificar tres patógenos en las hojas que presentaron síntomas necróticos localizados. En las hojas de plantas de vivero se observaron manchas marrones correspondiente a *Alternaria* sp. (Pérez Vera, Yáñez Morales, Alvarado Rosales, Cibrián Tovar y García Díaz 2005) (Figura 5).

En plantas adultas se observaron manchas bacterianas causadas por *Xanthomonas* sp. (Figura 6) las cuales se caracterizan por ser amarillas de forma irregular rodeadas de un halo aceitoso, pueden confluir, necrosarse y secarse (Quintana y Bejarano, 2017) y manchas foliares causadas por *Pestalotia* sp. (Figura 7) en donde se observa lesiones necróticas con bordes definidos y múltiples acérvulos negros (Pérez-Vera y otros, 2005).



Figura 5- A. Hojas de eucalipto con lesiones en círculos concéntricos color marrón de donde se aisló *Alternaria* sp. B: Cultivo puro de *Alternaria* sp.



Figura 6. Hojas de eucalipto con manchas amarillas de forma irregular con centro necrótico, síntoma de *Xanthomonas* sp. (Tizón bacteriano).



Figura 7- A. Hoja de eucalipto con lesiones necróticas y múltiples acérvulos de *Pestalotia* sp.; B: Detalle de acérvulas en la colonia de *Pestalotia* sp., masas mucilaginosas de color negro que contiene los conidios.

Capacidad antagónica *in vitro* en cultivos duales

Los resultados del PICR usando como antagonista *Trichoderma* sp. fue de 43.94 % (Figura 8) (Figura 10), mientras el valor más alto de inhibición frente al patógeno lo obtuvo *Bacillus* sp. con 81.10%. (Figura 9) (Figuras 11-12).

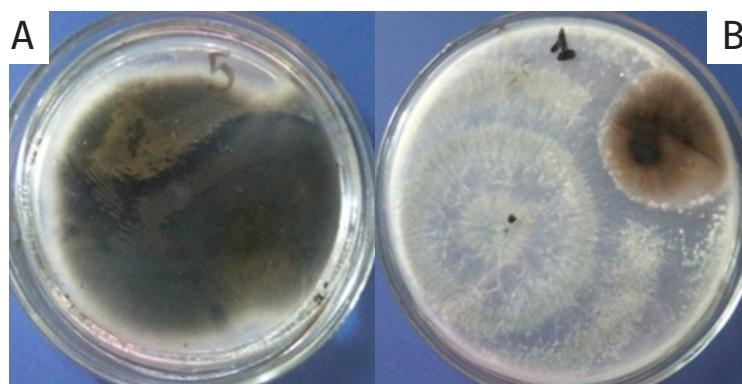


Figura 8. Tratamientos al 6^{to} día de incubación. **A:** Colonia de *Alternaria* sp cubriendo la totalidad de la caja de Petri.; **B:** Avance de *Trichoderma* sp. sobre *Alternaria* sp. efecto inhibidor.

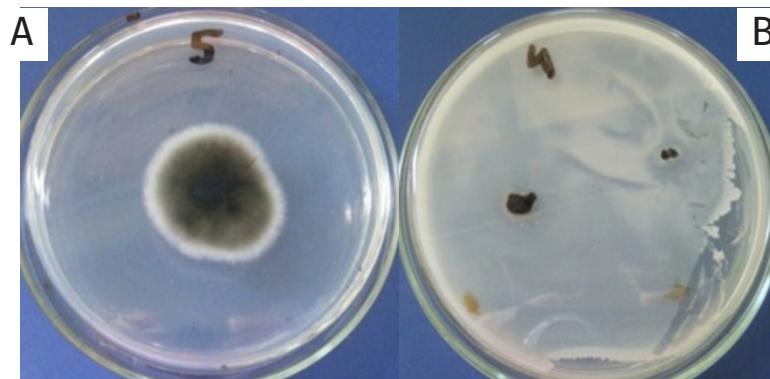


Figura 9. Tratamientos al 3^{er} día de incubación. **A:** Colonia de *Alternaria* sp. (Testigo); **B:** Efecto inhibidor de *Bacillus* sp. (Antagónico) contra *Alternaria* sp.

Trichoderma sp. vs Aleternaria sp.

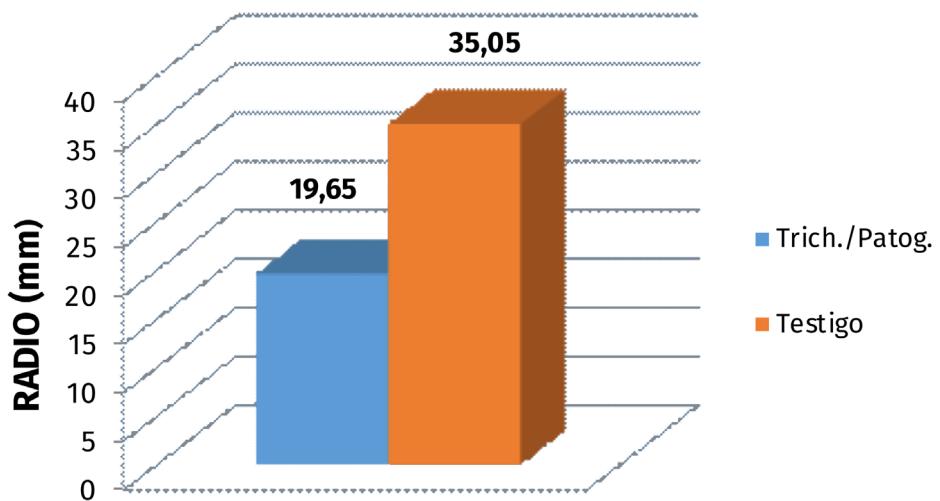


Figura 10. Valores medios de los radios (mm) obtenidos de *Alternaria* sp. en el tratamiento Testigo y en el tratamiento contra *Trichoderma* sp.

Bacillus sp. vs Alternaria sp.

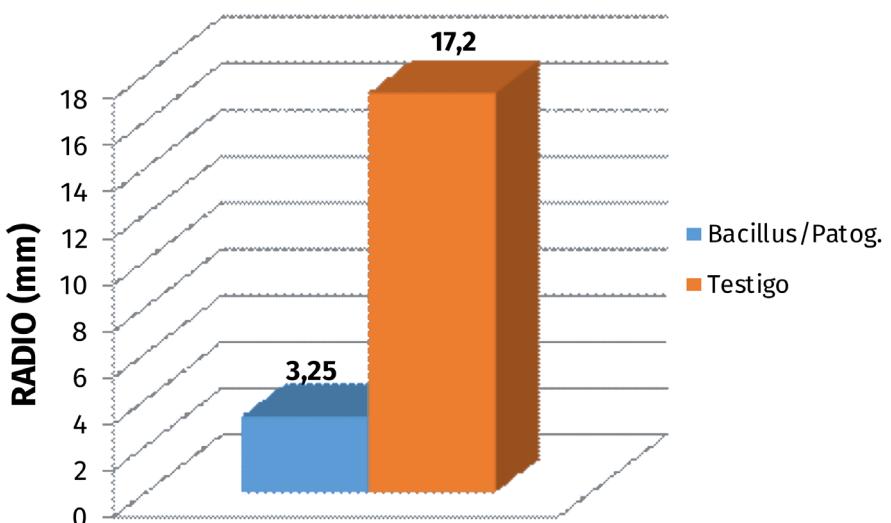


Figura 11. Valores medios de los radios (mm) obtenidos de *Alternaria* sp. en el tratamiento Testigo y en el tratamiento contra *Bacillus* sp.

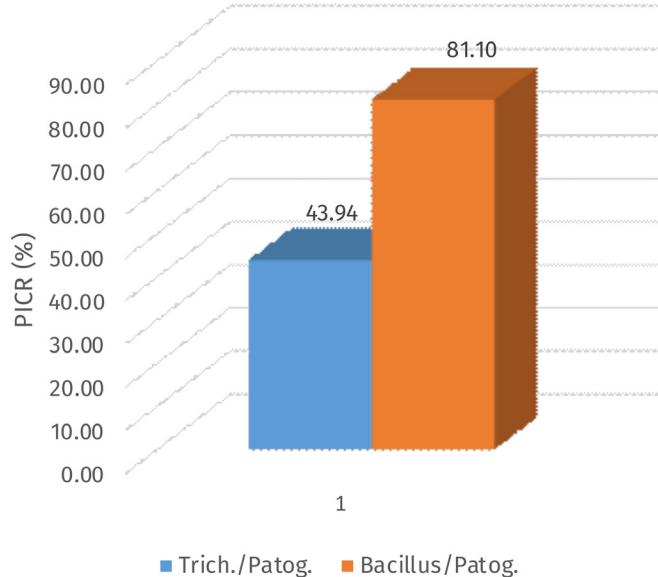


Figura 12. Porcentaje Inhibitorio del Crecimiento Radial (PICR %) de la colonia *Alternaria* sp. en cultivos duales.

CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió conocer la diversidad de organismos que interactúan en el microbioma endosférico en las hojas de eucalipto, que es capaz de crecer en medios artificiales como el APG, y su importancia como fuente de organismos para su uso en control biológico, en un contexto sustentable del cultivo e inocuo para el medio ambiente.

De los organismos aislados y reconocidos por su capacidad como biocontroladores se destacaron *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. ambos por su capacidad de rápido crecimiento en cultivos *in vitro* frente a *Alternaria* sp., patógeno que puede ocasionar defoliaciones tempranas en vivero.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcoba, N., Bejarano, N. y Catacata, J. (2005). Enfermedades de los cultivos de Jujuy y Salta diagnosticadas en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Jujuy. Cátedra de Fitopatología. Universidad Nacional de Jujuy.
- Beale, I. y Ortiz, E.C. (2013). El Sector Forestal Argentino - Bosques Implantados. *Revista de Divulgación Técnica Agrícola y Agroindustrial*, (41), 1-6.
- Bell, D. K., Wells, H. D. & Markham, C. R. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* Species against six fungal plant pathogens. *Ecology and Epidemiology*, 72(4), 379-382.
- Ezziyyani, M., Pérez Sánchez, C., Sid Ahmed, A., Requena, M. E. y Candela, M. E. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología* (26), 35-45.
- Gamboa Gaitán, M. A. (2006). Hongos Endófitos Tropicales: Conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana*, (11), 3-20.
- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales, L. C. y Sánchez, L. C. 2011. *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *NOVA*, 9(15), 177-187.
- Ortiz, G. (2015). Caracterización y perspectivas de la Foresto Industria en la Provincia de Jujuy. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. MAGyP, Unidad para el Cambio Rural. UCAR
- Pérez Vera, O. A., Yáñez Morales, M. de J., Alvarado-Rosales, D., Cibrián-Tovar, D. y García-Díaz, S. E. (2005). Hongos asociados a eucalipto, *Eucalyptus grandis* Hill: Maid. *Agrociencia*,

39(3), 311-318.

Zhang, Q., Wei, X. & Wang, J. (2012). Phillyrin produced by *Colletotrichu gloeosporioides*, an endophytic fungus isolated from *Forsythia suspense*. *Fitoterapia*, 83(8), 1500-1505.

Quintana, S. y Bejarano, N. (2017). Sanidad Forestal en Jujuy. Centro de Investigación en Sanidad Forestal CISFO (FCA-UNJu), Unidad para el Cambio Rural UCAR.

Romero, G., Crosara, A. y Baraibar, A. (2008). *Trichoderma harzianum*: Un biocontrol y biopromotor en vivero de especies forestales. *Ciencia e investigación forestal-Instituto Forestal-Chile*, 14(2), 335-345.

Sánchez Fernández, R. E., Sánchez Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K. M., Ulloa Benítez, A., Armendáriz Guillén, B., García Méndez, M.C. y Macías Rubalcava, M.L. (2013). Hongos endófitos: Fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en Agricultura y Medicina. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 16(2), 132-146.

Sbravatti Junior, J. A. (2013). *Seleção de fungos endofíticos para o controle biológico de Botrytis cinerea Pers.: Fr Em mudas de Eucalyptus benthamii Maiden et Cambage* (tesis de maestría). Universidade Federal do Paraná, Brasil.

PAGINAS WEB CONSULTADAS

Forestales-Inventario nacional de plantaciones forestales por superficie. (2018). Datos Agroindustriales. Recuperado de <https://datos.agroindustria.gob.ar/dataset/>



Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional