



Encuentro
de JÓVENES
INVESTIGADORES

DESARROLLO DE UN BIOINSUMO CON ACCIÓN FUNGICIDA FRENTE A SCLEROTINIA SCLEROTIORUM

Zurbriggen, Abril

Laboratorio de Ingeniería Ambiental (FICH-UNL)

Director: Seluy, Lisandro Gabriel

Codirectora: Benzzo, María Teresita

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: bioinsumos, biocontrol, *Sclerotinia sclerotiorum*.

INTRODUCCIÓN

El cambio climático, la degradación de los recursos naturales y la contaminación ambiental requieren de un cambio profundo en los procesos productivos hacia un desarrollo sustentable. Así mismo, el crecimiento de la población mundial, sumado al aumento de la longevidad, plantea la demanda creciente y sostenida de alimentos, no sólo en términos de cantidad sino también de calidad (OCDE/FAO, 2019; Hodson de Jaramillo et al., 2019).

El empleo de productos biológicos a base de microorganismos benéficos (MPCV, ACB) para el control de enfermedades a campo contribuye a una forma de producción sustentable. Así, la aplicación de bioinsumos está sustentada en la necesidad de reducir el uso de productos químicos que contaminan el medio ambiente provocando, además, el desarrollo de biotipos de resistencia (RAM) ligado a los efectos sobre la salud de las personas (Droby et al., 2016). Por otra parte, ofrecen ciertas ventajas tales como una mayor seguridad en su manejo, no se acumulan en la cadena alimenticia, son biodegradables y pueden multiplicarse en el ambiente aumentando sus efectos benéficos.

Desde hace una década, el mercado de bioinsumos registra un crecimiento mundial en torno al 15% anual (Rodríguez et al., 2019). Las diferentes formulaciones microbianas deben ser eficaces contra los microorganismos patógenos específicos, además de mantener su viabilidad durante un período de tiempo considerable, resistir las condiciones de almacenamiento en el campo y ser fáciles de manipular y aplicar. En Argentina, el pasado 15 de mayo, se presentó el Proyecto de Resolución que crea la categoría de "Bioinsumo" en materia de autorización y comercialización de

Título del proyecto: DESARROLLO DE UN BIOINSUMO CON ACCIÓN FUNGICIDA FRENTE A SCLEROTINIA SCLEROTIORUM

Instrumento: PEICID-2022-064

Año convocatoria: 2022

Organismo financiador: ASaCTel

Director: Seluy, Lisandro Gabriel



insumos/productos de uso agrícola. La nueva ley reemplazará las actuales resoluciones 345/1994, 350/1999, 264/2011 y 594/2015. De esta forma, los bioinsumos comerciales deberán registrarse cumplimentando los estándares de calidad e inocuidad ambiental que establezca la nueva ley.

El presente trabajo centra su estudio en la zona denominada cinturón verde de la ciudad de Santa Fe. Esta área comprende una importante superficie de producción frutihortícola donde varios cultivos de importancia económica son susceptibles al patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal de la “podredumbre blanca”. La particularidad de este patógeno es que puede persistir en el suelo hasta por más de 20 años, con una viabilidad promedio del 90%, gracias a la formación de estructuras de resistencia llamadas esclerocios, que funcionan como inóculo (Granados, 2005). Esta enfermedad representa un desafío puesto que las prácticas como la rotación de cultivos no resultan eficaces, no existen variedades resistentes y el combate químico no es siempre factible pues se requieren dosis elevadas que no aseguran una adecuada cobertura de los sitios de infección. La enfermedad se desarrolla a una temperatura de 16-20°C principalmente en suelos con alta humedad, ya que este es un factor de predisposición que favorece el desarrollo de la infección (Carranza, 2006). Luego, la zona de estudio favorece el desarrollo y permanencia de la enfermedad provocando pérdidas superiores al 60 % en los cultivos de mayor importancia económica, tales como lechuga, brócoli, coliflor y repollo.

OBJETIVOS

El objetivo general persigue formular un producto con actividad biocontrol frente a *S. sclerotiorum*. Se pretende evaluar las primeras etapas de desarrollo de un bioinsumo, que involucran la validación *in vitro* del efecto biocontrol sobre un aislamiento nativo de *S. sclerotiorum*, proveniente de muestras de lechuga y brócoli infectadas producidas en la zona de estudio.

METODOLOGÍA

Microorganismos empleados:

Se utilizó como fitopatógeno sujeto a biocontrol, una cepa de *S. sclerotiorum*, aislada de muestras de plantas de lechuga con síntomas de la enfermedad, proveniente de la zona de estudio.

Como ACB se utilizaron *Bacillus subtilis subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas mendocina*, *Streptomyces* sp. y *Trichoderma asperellum*, todos aislamientos nativos de una enmienda biológica comercial; *Pseudomonas* sp. (origen: nódulos de melilotus) y *Azospirillum brasilense* (cepa de referencia B4469). La selección de estos antagonistas se realizó en base a ensayos anteriores realizados por el grupo de trabajo y por estar reportadas en la bibliografía específica. Todos los microorganismos se encuentran disponibles en el cepario del GPBIA-FICH-UNL. Los cultivos bacterianos y los hongos se reactivaron siguiendo los pasos que implican confirmación de pureza y viabilidad, utilizando los medios de cultivo correspondientes (Agar Nutritivo; Agar Cetrimide; Agar NFb; Agar Papa Dextrosa) seguido del estudio macro y microscópico.

Ensayos in vitro

La actividad antifúngica *in vitro* se evaluó mediante dos metodologías: enfrentamiento dual (biocontrolador-patógeno) y medio envenenado.



Enfrentamiento dual:

Se utilizaron placas de Petri (10 cm de diámetro) con PDA, incubadas en cámara de plantas con fotoperíodo natural (12 h luz/12 h oscuridad), por duplicado. Se sembraron el patógeno y su antagonista a 1,5 cm de distancia del borde de la placa, en puntos equidistantes entre ellos. Para los hongos, se dispuso un disco de 5 mm de diámetro, mientras que las bacterias se sembraron mediante una única estría de 4 cm de longitud. Se procedió de igual forma para la placa Control de *S. sclerotiorum* (sin la bacteria u hongo biocontrolador). Para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), se siguió el protocolo de Ezziyani (2004a, 2004b), donde se registra el valor del radio de la colonia en el Control (R1) y el radio de la placa experimental (R2) con el biocontrolador. Luego, se aplicó la fórmula $(R1-R2)/R1 \times 100\%$. Simultáneamente, se asignó un valor al antagonismo observado o *Grado antagónico*, en función de los siguientes criterios: 0 (ninguna invasión de la superficie del patógeno), 1 (invasión de $\frac{1}{4}$ de superficie del patógeno), 2 (invasión de $\frac{1}{2}$ de superficie del patógeno) y 3 (invasión total de superficie del patógeno), entendiendo como superficie el área cubierta por el crecimiento del patógeno.

Medio envenenado:

Mediante el método de medio envenenado (Lipińska et al., 2016), se determinó la actividad antifúngica *in vitro* frente a *S. sclerotiorum*, utilizando los sobrenadantes libres de células (SLC) de cultivos líquidos de *B. subtilis subtilis* y *Pseudomonas* sp. La concentración de los SLC fue de 30 % v/v respecto al volumen de medio PDA/placa. Se sembró un esclerocio de *S. sclerotiorum* en cada placa de Petri conteniendo el medio envenenado, por duplicado. Paralelamente se realizó un Control del fitopatógeno con 30%v/v de agua estéril. Todas las placas fueron incubadas en las mismas condiciones que el enfrentamiento dual, en cámara de plantas. Periódicamente se midieron los diámetros del crecimiento del fitopatógeno y se estimó la actividad fungistática de acuerdo a la siguiente fórmula: $I = (K-A)/K \times 100$; donde "I" es la razón de inhibición (%), "K" el diámetro de la colonia fúngica en la placa control y "A" el diámetro de la colonia fúngica en la placa experimental.

Proliferación de biocontroladores:

Una de las características principales de calidad que debe cumplimentar un bioinsumo es un título elevado del microorganismo benéfico o funcional que se declara en el producto. Teniendo en cuenta este parámetro, se evaluó la proliferación de los microorganismos que demostraron mejor desempeño en cuanto a su efecto biocontrol sobre el patógeno *S. sclerotiorum*. Para *Pseudomonas* sp. se utilizó el medio "Pseudomonas F" modificado (peptona de caseína 10 g/L; peptona de carne 10 g/L; sulfato de magnesio 1,5 g/L; fosfato dipotásico 1,5 g/L; glicerol 10 mL/L; pH 7,2), mientras que *B. subtilis subtilis* se cultivó en caldo nutritivo sin ninguna modificación. Las condiciones de incubación para ambos microorganismos fueron: aerobiosis, 28°C y agitación orbital a 100 rpm durante 54 horas. Se realizó un muestreo en línea con el proceso para evaluar el crecimiento microbiano, mediante la determinación del valor de la absorbancia a 480 nm. Esto permitió estimar la concentración en UFC/mL analizando así las posibles estrategias de optimización para alcanzar un mayor título.

CONCLUSIONES

Los microorganismos *T. asperellum*, *B. subtilis subtilis* y *Pseudomonas* sp. mostraron el mejor desempeño *in vitro* sobre *S. sclerotiorum*, en los ensayos de enfrentamiento dual.



Los SLC de *B. subtilis subtilis* y *Pseudomonas* sp., evidenciaron un 100% y 80% de I (razón de inhibición) respectivamente, a los 5 días de incubación, manteniéndose dicha inhibición hasta los 7 días para el caso de *B. subtilis subtilis*. Finalmente, las curvas de crecimiento de *B. subtilis subtilis* y *Pseudomonas* sp., en los medios de referencia, sirven como punto de partida para la optimización de la proliferación de los mencionados agentes biocontroladores.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Carranza Z. (2006). Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizógenos del Estado de Hidalgo más competentes en medio de cultivo sólido. Tesis de grado para optar al título de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.

Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D. y Haissam Jijakli, M (2016). The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology* 122, 22–29.

Ezziyani, M., Sánchez, C. P., Ahmed, A. S., Requena, M. E. y Castillo, M. E. C. (2004a). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). In *Anales de biología* (No. 26, pp. 35-45). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia.

Ezziyani, M., Sánchez, C. P., Requena, M. E., Rubio, L. y Castillo, M. E. C. (2004b). Biocontrol por *Streptomyces rochei*-Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. In *Anales de Biología* (No. 26, pp. 61-68). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia.

Granados M. (2005). Pudrición blanca de la cebolla, una enfermedad difícil de combatir. *Rev. Agronomía Costarricense*. 29(2):143-56.

Hodson de Jaramillo, E., Henry, G. y Trigo, E. (2019). Bioeconomy New Framework for Sustainable Growth in Latin America. Editorial Pontificia Universidad Javeriana: Bogota, Colombia.

Lipińska, L., Klewicki, R., Klewicka, E., Kołodziejczyk, K., Sójka, M. y Nowak, A. (2016). Antifungal Activity of *Lactobacillus* sp. Bacteria in the Presence of Xylitol and Galactosyl-Xylitol. *BioMed Res Int* 2016.

OCDE/FAO (2019), OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2019-2028, OECD Publishing, París/Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Roma.

Rodríguez, A. G., Rodrigues, M. y Sotomayor, O. (2019). Towards a sustainable bioeconomy in Latin America and the Caribbean: elements for a regional vision. Serie Recursos Naturales y Desarrollo N°193 Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL).

