

# **Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe**

## **Editores**

**Wagner Bettiol  
Marta C. Rivera  
Pedro Mondino  
Jaime R. Montealegre  
Yelitza C. Colmenárez**





# **Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe**

## **Editores**

Wagner Bettiol, Marta C. Rivera, Pedro Mondino,  
Jaime R. Montealegre A., Yelitza C. Colmenárez

2014

## Capítulo 17

# Control biológico de enfermedades de plantas en Uruguay

**Pedro Mondino<sup>1</sup>, Nora Altier<sup>2</sup>, Silvana Vero<sup>3</sup>, Silvia Pereyra<sup>4</sup>,  
Claudine Folch<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>*Cátedra de Fitopatología, Departamento de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo.* <sup>2</sup>*Protección Vegetal. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. (INIA). Estación Experimental Wilson Ferreira Aldunate, Las Brujas, Canelones.* <sup>3</sup>*Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química. Universidad de la República (UdelaR), Uruguay.* <sup>4</sup>*Protección Vegetal. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. (INIA). Estación Experimental La estanzuela. Colonia.* <sup>5</sup>*Técnico en empresa Lage y Cia SA. Camino Carrasco 6348. Montevideo.*

## Introducción

La agricultura convencional basa el control de plagas en el uso de plaguicidas de síntesis química. Estas prácticas generan impactos perjudiciales para el ambiente y la salud, y afectan la biodiversidad natural de los agroecosistemas, afectando los equilibrios biológicos. La intensificación de los sistemas productivos y las crecientes exigencias de los mercados por obtener productos de alta calidad, producidos en forma amigable con el ambiente e inoocuos, requieren el desarrollo de estrategias que atiendan dos objetivos principales: la reducción del uso de plaguicidas, y la utilización de alternativas de bajo costo económico y ambiental. En este marco, durante las dos últimas décadas Uruguay ha generado conocimiento científico para desarrollar e implementar la estrategia de control biológico de enfermedades en la producción agrícola, así como incorporar su enseñanza en la currícula de los programas de educación terciaria y de posgrados.

## Reseña histórica

La evolución del control de enfermedades de los cultivos en Uruguay, al igual que en otros países, ha estado marcada por la aparición y posterior evolución de los fungicidas de síntesis química, ya que estos tuvieron un fuerte

impacto tanto sobre la producción como sobre la investigación y la enseñanza de la fitopatología. Sustancias altamente tóxicas aparecieron en el mercado y fueron utilizadas siguiendo primitivos esquemas de aplicaciones periódicas. Por esos tiempos no se tenía en cuenta la biología de los patógenos, condiciones ambientales o factores de susceptibilidad de la planta. Diversos compuestos arsenicales, mercuriales e insecticidas organoclorados eran aplicados a los cultivos. A modo de ejemplo, en el año 1965 se comercializaban en Uruguay cinco formulaciones de fungicidas mercuriales y seis formulaciones de arsenito de sodio, las cuales eran recomendadas para el control de enfermedades del manzano y de la vid entre otras (Koch 1965), y como insecticida se recomendaba el uso de arseniato de plomo (Fischer 1961). Hoy día la sola mención de esas sustancias nos causa escalofríos.

Con un fuerte impulso comercial, la difusión del uso de los fungicidas se realizó en forma vertiginosa mucho antes de que se conocieran y difundieran los efectos secundarios de estos productos (Machado *et al.* 1992). Su uso indiscriminado trajo como consecuencia problemas tales como la contaminación ambiental y la presencia de residuos en los alimentos. Ejemplos de esto son la acumulación de fungicidas cúpricos en los suelos (Nuñez y Maeso 2010) y la detección de residuos de fungicidas en frutos de tomate, frutillas, manzanas, duraznos entre otros (Gemelli 2006, Maeso *et al.* 2007, Galiotta *et al.* 2010, Nuñez y Maeso 2010).

Otra consecuencia negativa del uso de fungicidas sin la racionalidad debida es la aparición de poblaciones de patógenos resistentes a los principios activos utilizados. Algunos ejemplos son la presencia de cepas de *Penicillium expansum* resistentes a tiabendazole (Schinca *et al.* 2011); de *Venturia inaequalis* resistentes a estrobilurinas y a difenoconazole (Casanova y Celio 2011), de *Botrytis cinerea* resistentes a carbendazim, iprodione y piremetanil (Gepp *et al.* 2012).

Al tiempo que la evidencia científica fue confirmando los efectos negativos del uso irracional de plaguicidas, se incrementó la conciencia en la población en general, demandando soluciones a los problemas ecológicos y exigiendo consumir alimentos de calidad superior. Todo esto sucede en el contexto de un mercado mundial de frutas y hortalizas que comienza a variar sus tradicionales exigencias basadas exclusivamente en la calidad estética de los productos, y agrega nuevas exigencias: los productos deben ser certificados como procedentes de sistemas de producción basados en criterios definidos por el paradigma de la sostenibilidad. Aparece una preocupación por lo que es ambientalmente correcto, socialmente justo y económicamente viable. A estos mercados se les denomina “mercados de calidad diferenciada” (Giacinti 2003).

El concepto de calidad para estos mercados implica que los productos deben presentar ciertos requisitos como sabor, consistencia, punto de madurez, a los que ahora se les agrega la ausencia de residuos tóxicos y la garantía de que la tecnología empleada para su producción proteja al medio ambiente y no sea perjudicial para la salud de los trabajadores agrícolas.

Para dar respuesta a esas demandas, el control de las enfermedades de plantas se debe implementar en complejos sistemas de manejo integrado. Estos sistemas utilizan el conocimiento generado sobre la biología de los patógenos, sobre la epidemiología y sobre las relaciones planta-patógeno-ambiente, para

el diseño de estrategias racionales de control. En ellos se priorizan medidas preventivas y se recurre al uso de variedades resistentes, métodos culturales y métodos biológicos, de forma de minimizar el uso de fungicidas.

En este contexto, el control biológico se plantea como una herramienta necesaria, y no una mera alternativa, para el manejo fitosanitario a través del uso de microorganismos benéficos. La biodiversidad existente en la microflora en contacto con las plantas constituye una fuente de insumos biológicos de utilidad en el manejo de las enfermedades de cultivos. Contribuye a convertir la ventaja comparativa de la riqueza biológica en ventaja competitiva para el desarrollo sostenible y para la obtención de productos diferenciados, contemplando aspectos de calidad e inocuidad. Los avances más recientes en técnicas moleculares y en el conocimiento científico en general, han favorecido el potencial de esta tecnología. Actualmente en Uruguay, diversos grupos llevan adelante investigaciones dirigidas a la búsqueda y selección de microorganismos biocontroladores de patógenos de plantas. Diferentes líneas de investigación han realizado aportes sustanciales a la generación de conocimiento para desarrollar el control biológico de enfermedades de plantas en Uruguay.

## **Microorganismos rizosféricos para el biocontrol de fitopatógenos del suelo**

A partir de 1993, se consolida una línea de trabajo interdisciplinaria, resultado de la conjunción de esfuerzos de tres equipos de investigación [Laboratorio de Ecología Microbiana perteneciente al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC) de la Facultad de Agronomía, Sección Protección Vegetal, Fitopatología, del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA Las Brujas)], y el sector privado. Se llevaron adelante estudios dirigidos al uso de microorganismos rizosféricos para el biocontrol de fitopatógenos del suelo, identificándose cepas bacterianas nativas de *Pseudomonas fluorescens* para el manejo de enfermedades de implantación y la promoción del crecimiento de leguminosas forrajeras (Bajsa *et al.* 2005, Quagliotto *et al.* 2009, Hofte y Altier 2010). A partir de 1994, se llevaron adelante estudios de caracterización de bacterias rizosféricas para el biocontrol de fitopatógenos del suelo, identificándose cepas nativas de *Pseudomonas fluorescens* con capacidad de supresión de enfermedades de implantación, causadas por *Pythium spp.*, en leguminosas forrajeras (Bagnasco *et al.* 1998, Pérez *et al.* 2000, De La Fuente *et al.* 2002, De La Fuente *et al.* 2004, Yanes *et al.* 2004, Bajsa *et al.* 2005, Quagliotto *et al.* 2009, Höfte y Altier 2010, Pérez *et al.* 2010).

## **Importancia de las enfermedades de implantación en las leguminosas forrajeras**

Las pasturas son la base de la producción agropecuaria de Uruguay.

Las leguminosas forrajeras son un componente esencial de las pasturas, siendo utilizadas en los sistemas lecheros, ganaderos intensivos y extensivos, sobre una superficie cercana a los 2 millones de hectáreas (Rebuffo *et al.* 2006). Además de proporcionar un alimento de alta calidad para el ganado, las leguminosas forrajeras son clave para la sustentabilidad de las rotaciones cultivo-pastura, debido a su capacidad de fijar nitrógeno en simbiosis con bacterias del suelo que nodulan la raíz, colectivamente denominadas rizobios. Para capitalizar estas ventajas y lograr una productividad óptima, es necesario asegurar el establecimiento de un stand adecuado de plantas y el desarrollo de sistemas radiculares saludables. Las enfermedades de plántula causadas por patógenos del suelo, fundamentalmente del género *Pythium*, son una de las principales limitantes para el establecimiento de leguminosas. Las condiciones ambientales favorables para el desarrollo de estas enfermedades son las bajas temperaturas del suelo y altos niveles de humedad, lo cual disminuye la velocidad de germinación y reduce la emergencia de plántulas (Altier y Thies 1995, Martin y Loper 1999, Pérez *et al.* 2000). Existen escasos reportes exitosos de manejo por resistencia genética y el uso de fungicidas para el tratamiento de las semillas puede tener efecto adverso sobre los rizobios. Este análisis de situación fue el punto de partida para considerar el control biológico como una opción de manejo.

## Bacterias rizosféricas como agentes de control biológico

A nivel mundial, el uso de microorganismos rizosféricos antagonistas, entre ellos las *Pseudomonas* fluorescentes, se plantea como estrategia para el manejo efectivo de patógenos del suelo que causan enfermedades en diversos cultivos (Martin y Loper 1999, McSpadden Gardener 2007, Weller *et al.* 2002, Weller *et al.* 2007). Sin embargo, la caracterización de bacterias rizosféricas para el control específico de enfermedades en las leguminosas forrajeras no ha recibido el mismo grado de atención, y su uso agronómico sigue siendo un desafío (Villacieros *et al.* 2003, Fox *et al.* 2011).

Por otro lado, la utilización de microorganismos que mejoran el establecimiento en las leguminosas forrajeras y optimizan la fijación del nitrógeno se ha implementado mediante la tecnología de inoculación de semilla con rizobio (Catroux *et al.* 2001). Los altos estándares de calidad de los inoculantes rizobianos se alcanzan mediante la utilización de un soporte de turba estéril, con valores altos de bacterias viables por paquete ( $2 \times 10^9$  rizobia/g turba) (Lupwayi *et al.* 2000). La experiencia existente en Uruguay al respecto constituye un antecedente histórico que el grupo de trabajo capitalizó y utilizó como modelo, a partir de 1994 (Höfte y Altier 2010).

Aislamiento y caracterización fenotípica en el laboratorio y bajo condiciones de crecimiento controladas

Inicialmente, se conformó una colección de *Pseudomonas fluorescens* con 700 cepas bacterianas. Estas fueron aisladas de la rizósfera de plantas de lotus (*Lotus corniculatus*) del campo, recolectadas en diversas regiones agroecológicas de Uruguay. Se llevó a cabo la evaluación *in vitro* del antagonismo contra patógenos y la detección de compuestos antimicrobianos. Se investigó también

la presencia de genes para la biosíntesis de antibióticos. Tres cepas seleccionadas de *Pseudomonas fluorescens* - UP61, UP143 y UP148 - demostraron antagonismo *in vitro* y fueron capaces de proteger al lotus de la infección causada por *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani* *in vivo*, bajo condiciones controladas. Se detectó la producción de ácido cianhídrico y sideróforos fluorescentes como algunos de los factores posiblemente involucrados en su actividad de control biológico (Bagnasco *et al.* 1998). Además de esto, *Pseudomonas fluorescens* UP61 produjo los antibióticos DAPG, pyoluteorina y pyrrolnitrina (De La Fuente *et al.* 2004), mientras que *Pseudomonas fluorescens* UP148 produjo un compuesto antifúngico derivado de la fenazina no descrito anteriormente (Bajsa *et al.* 2005). También se evaluó la interacción de *Pseudomonas fluorescens* UP61, UP143 o UP148 con cepas rizobianas que se utilizan en Uruguay como inoculantes. En condiciones de cámara de crecimiento, la inoculación de las semillas de lotus y de alfalfa con cepas de *Pseudomonas* no afectó a los diferentes parámetros de la simbiosis huésped-rizobio según lo observado en el peso seco de la planta, la velocidad de nodulación, la eficacia en la fijación biológica de N<sub>2</sub> y la colonización de la rizósfera (De La Fuente *et al.* 2002).

Posteriormente se estableció una segunda colección de 702 cepas nativas de *Pseudomonas fluorescens*, aisladas a partir de la rizósfera de plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) del campo. Se desarrolló un experimento *in vivo* en una cámara de crecimiento para detectar la capacidad de las *Pseudomonas fluorescens* de suprimir enfermedades y promover el crecimiento vegetal en el patosistema alfalfa-*Pythium*, bajo condiciones controladas (Yanes *et al.* 2004). Este estudio reveló una amplia respuesta de las cepas aisladas de *Pseudomonas* en cuanto a su capacidad de suprimir enfermedades al verse expuestas a *Pythium debarianum*. El 12% de las cepas que se sometieron a la detección protegieron a las plantas de alfalfa, lo cual resultó en una emergencia de más del 60% en comparación con el 33% registrado en el tratamiento de control no inoculado. Un procedimiento similar, en ausencia del patógeno, se utilizó para evaluar la capacidad de promover el crecimiento de alfalfa de las cepas de *Pseudomonas* seleccionadas, mediante la determinación de la biomasa. Se seleccionaron cinco cepas de *Pseudomonas fluorescens* -  $\alpha$ C119,  $\alpha$ P271,  $\alpha$ P388,  $\alpha$ T633 y  $\alpha$ T688-, las cuales demostraron capacidad de suprimir enfermedades y promover el crecimiento vegetal, para ser estudiadas bajo condiciones de campo (Yanes *et al.* 2004).

## Evaluación de la eficacia de control en ensayos de campo

Por varios años, se llevaron a cabo experimentos en condiciones de campo para evaluar la capacidad de *Pseudomonas fluorescens* UP61, UP143 y UP148 para suprimir enfermedades de plántula en alfalfa y lotus (Pérez *et al.* 2000, Bajsa *et al.* 2005, Quagliotto *et al.* 2009). Diferentes combinaciones de años, ubicaciones y fechas de siembra dieron por resultado veinte ambientes para cada cultivo. Las cepas de *Pseudomonas fluorescens* colonizaron con éxito las raíces de alfalfa y de lotus en densidades adecuadas para la actividad de control biológico. Los resultados demostraron que la inoculación bacteriana de la semilla proporcionó un aumento del 10-13% en la cantidad de plantas de alfalfa establecidas en relación



al control, mientras que en lotus el aumento representó un 6-10% (Quagliotto *et al.* 2009). En presencia de las cepas estudiadas, la biomasa de la parte aérea aumentó un 15-18% en alfalfa y un 6-10% en lotus. Los resultados confirmaron que el efecto positivo sobre el stand inicial de plantas se traduce en un beneficio posterior, favoreciendo el potencial productivo de la pastura.

## Desarrollo de inoculantes bacterianos

Se realizaron ensayos de laboratorio para identificar un medio de cultivo para la adecuada producción de biomasa de las cepas de *Pseudomonas fluorescens* a nivel industrial, mediante la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno disponibles comercialmente. La turba estéril fue evaluada como el soporte para formular el inoculante bacteriano, tal como lo utiliza la tecnología de inoculación con rizobio. Las cepas de *Pseudomonas fluorescens* y de rizobios sobrevivieron a  $10^9$  y  $10^{10}$  UFC/g, respectivamente, en una turba estéril inoculada con cada una de las especies bacterianas, cuando se las almacenó a 4 °C durante un año (Bagnasco *et al.* 1998, De La Fuente *et al.* 2002).

Esta investigación, basada en las fortalezas de la tecnología de inoculación con rizobio ya existente, se enfoca actualmente en el desarrollo comercial y la eficacia agronómica de las cepas de *Pseudomonas* para la supresión de enfermedades en otros cultivos de importancia económica. Actualmente, se está en etapas avanzadas del proceso de registro de un inoculante comercial en base a tres cepas de *P. fluorescens*.

## Biocontrol de enfermedades poscosecha de frutas

Desde el año 1995 se llevan adelante trabajos con el objetivo de desarrollar métodos de control biológico de enfermedades de poscosecha de manzanas y citrus. Esta investigación es llevada adelante en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química, en colaboración con miembros de los grupos disciplinarios de Fitopatología y Poscosecha de la Facultad de Agronomía.

## Características de la poscosecha de frutas

La postcosecha de productos agrícolas se concibe como un conjunto de procesos integrados y secuenciados por los que atraviesa el producto después de la cosecha, en su camino hacia el consumidor y que se encuentra estrechamente vinculado a los sistemas de producción. Es el período que transcurre desde el momento en que los productos son recolectados hasta aquel en el cual son consumidos en estado fresco, preparados o transformados industrialmente.

Los productos hortifrutícolas normalmente requieren de cierto almacenamiento con el fin de equilibrar su oferta y su demanda. La vida de almacenamiento potencial se encuentra predeterminada en gran medida por las características genéticas y metabólicas del producto. Sin embargo los factores de

precosecha, las técnicas de manejo, el momento de la cosecha, los tratamientos poscosecha, la presencia de patógenos y las condiciones de almacenamiento son las que determinan la capacidad real de almacenamiento. Sólo mediante un riguroso control de la temperatura, humedad y atmósfera durante el almacenamiento, es que se puede lograr un producto de buena calidad al final del período, evitando la aparición de fisiopatías y enfermedades que ocasionan pérdidas del producto almacenado. A pesar de maximizar esfuerzos para reducir la susceptibilidad y minimizar las fuentes posibles de entrada de patógenos antes, durante y después de la cosecha, las pérdidas poscosecha en muchos casos siguen siendo significativas.

Parte de estas pérdidas se deben a infecciones con patógenos fúngicos. Las infecciones fúngicas cuyos síntomas se manifiestan durante el almacenamiento poscosecha, pueden ocurrir entre la floración y la maduración del fruto o posteriormente, durante la cosecha y el almacenamiento. En el primer caso, las infecciones pueden permanecer quiescentes hasta que comience la senescencia del fruto durante el almacenamiento, siendo muy difícil controlar la aparición de síntomas mediante técnicas de manejo poscosecha. En el segundo caso, es posible maximizar esfuerzos durante y después de la recolección para evitar la aparición de las podredumbres, las cuales son causadas muchas veces por patógenos de heridas. Es por ello que es de vital importancia minimizar el número de heridas provocadas en la cosecha y tomar medidas para disminuir el inóculo inicial de patógenos.

El control de las enfermedades de poscosecha se ha basado tradicionalmente, en la aplicación de fungicidas de síntesis química, previo al almacenamiento. Sin embargo, en la actualidad, es muy reducido el número de principios activos efectivos autorizados para su uso en esta etapa, debido principalmente a consideraciones toxicológicas. A su vez, se ha constatado la presencia de poblaciones de patógenos resistentes a los fungicidas más comúnmente utilizados (Wozniak 2003, Esterio *et al.* 2007). Por otra parte el uso de fungicidas, está siendo muy cuestionado por el público consumidor, el cual ha incrementado su conciencia acerca de los riesgos a la salud y al medio ambiente que trae consigo. Esto es mayor aún en la poscosecha por su cercanía al consumo. En este contexto, el control biológico en la etapa de poscosecha ha demostrado ser una alternativa promisoriosa, dando lugar a múltiples investigaciones en todo el mundo (Wisniewski *et al.* 2007, Droby *et al.* 2009, Sharma *et al.* 2009).

La poscosecha presenta características favorables para la implementación de medidas de control biológico. En primer lugar, el ambiente se caracteriza por ser confinado y controlado lo cual facilita la aplicación de los productos biológicos y el mantenimiento de los mismos debido a condiciones ambientales fijas. En segundo lugar, el alto valor agregado de los productos cosechados justifica la implementación de medidas de control que en otras circunstancias podrían no ser rentables. Además, en la mayoría de los casos, la aplicación de los agentes de control biológico se realiza utilizando equipos y tecnología idénticos o similares a los usados para la aplicación de fungicidas, por lo cual el cambio en las instalaciones de las plantas de tratamiento poscosecha, no sería drástico ni económicamente excesivo.

En la actualidad existen pocas formulaciones comerciales basadas

en microorganismos biocontroladores para uso en poscosecha. Biosave™ (Ecoscience, EEUU) cuyo ingrediente activo son bacterias identificadas como *Pseudomonas syringae*, es el producto comercial vigente, con mayor antigüedad en el mercado. El producto fue registrado en EEUU y es usado principalmente para enfermedades poscosecha de boniato, papa y manzana (Droby *et al.*, 2009). Otros productos comerciales son Shemer™ y Boniprotect™, basados en una cepa de *Metschnikowia fructicola* y *Aureobasidium pullulans*, respectivamente. Shemer™, que será producido desde este año por Bayer CropScience, fue desarrollado en primera instancia por AgroGreen, Minrav Group, Israel. Este producto presenta actividad probada contra *Botrytis*, *Penicillium*, *Rhizopus*, y *Aspergillus* en frutillas, uvas y citrus (Sharma *et al.* 2009) mientras que Boniprotect™ (bioferm GmbH, Austria) se recomienda para patógenos de heridas (*Penicillium*, *Botrytis*) en manzanas, peras y membrillos. Un nuevo producto, denominado Candifruit™ (Sipcam Inagra S.A., España), basado en una cepa de levadura *Candida sake*, ha sido recientemente lanzado al mercado español para su uso en poscosecha de manzanas (Usall *et al.* 2010).

A pesar de la existencia de productos comerciales, la investigación en la selección y desarrollo de cepas antagonistas nativos debe ser alentada, ya que la implementación de un formulado local potenciaría la industria nacional involucrada, disminuyendo la dependencia con tecnología extranjera.

## El control biológico de poscosecha en Uruguay

En Uruguay se ha trabajado en control biológico de enfermedades de poscosecha de manzanas y citrus. La investigación ha estado centrada en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química, trabajando en conjunto con miembros los grupos disciplinarios de Fitopatología y Poscosecha de la Facultad de Agronomía. Se comenzó trabajando en la búsqueda de microorganismos capaces de inhibir el desarrollo de moho azul causado por *Penicillium expansum* en manzanas Red Delicious a temperatura ambiente. Se logró obtener dos levaduras con buena capacidad antagonista que fueron identificadas como *Candida ciferrii* y *Cryptococcus laurentii*. Se demostró además que el principal mecanismo asociado a su capacidad biocontroladora era la competencia con el patógeno por fuentes de nitrógeno en las heridas de manzana (Vero *et al.* 2002). A continuación el estudio se centró en la búsqueda de antagonistas capaces de impedir el desarrollo de patógenos de poscosecha en manzanas durante el almacenamiento en cámaras de frío, en las cuales la temperatura está entre 0 °C y 1 °C. Para ello se intentó realizar el aislamiento de microorganismos adaptados al crecimiento a bajas temperaturas (psicrotrofos) que fueran capaces de crecer en heridas de manzana, sitio que se intentaba proteger del ataque del patógeno. La estrategia de búsqueda consistió en el aislamiento de microorganismos de la superficie de frutos que hubieran estado almacenados en frío. De esta forma se logró aislar una cepa de *Aureobasidium pullulans* capaz de disminuir en un 70% y 80% la incidencia de moho azul y moho gris, producido por *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*, respectivamente, en heridas de manzanas Red Delicious, almacenadas a 0 °C. Se demostró a su vez, que la cepa biocontroladora producía sideróforos mediante los cuales era

capaz de competir eficazmente con *Botrytis cinerea* en presencia de bajos niveles de hierro. A su vez, se determinó que la cepa seleccionada producía enzimas capaces de degradar paredes del patógeno (quitinasas y beta 1, 3 glucanasas), las cuales podrían colaborar en el biocontrol. Fue importante determinar que el antagonista seleccionado era incapaz de crecer a 37 °C, lo cual implica que es incapaz de colonizar el cuerpo humano causando enfermedad, característica muy importante en un microorganismo que se pretende aplicar sobre fruta. Se determinó también que el antagonista era resistente a los fungicidas tiabendazol e iprodione en concentraciones de uso sobre fruta, permitiendo el planteo de estrategias de uso en conjunto. Sin embargo, se comprobó que el crecimiento de la capa antagonista se veía disminuido cuando era inoculado en heridas de manzana tratadas con imazalil, uno de los fungicidas aceptado por las normas de producción integrada de Uruguay (Scatoni *et al.* 2004), a la concentración de uso recomendada. Se constató además, que cuando la dosis de imazalil utilizada se reducía a la mitad, el crecimiento del antagonista en las heridas de manzanas tratadas se restablecía. Estos resultados permitieron postular que en este caso podría ser viable la aplicación en conjunto del antagonista y el fungicida, siempre que se utilizaran dosis menores del mismo (Vero *et al.* 2009).

Con el objetivo de aislar microorganismos capaces de controlar el desarrollo de moho azul y moho verde, causado por *Penicillium italicum* y *Penicillium digitatum*, en citrus almacenados en frío, se realizó también la búsqueda de microorganismos psicrótrofos (Garmendia *et al.* 2005). Para ello se realizaron aislamientos de la superficie de limones que habían estado en cámara fría durante más de un mes. Se obtuvieron 11 levaduras de las cuales 8 redujeron significativamente la incidencia de ambos patógenos en heridas de naranjas almacenadas a 5 °C, obteniéndose con cinco de ellas niveles de protección iguales o mayores al 80% (Vero *et al.* 2011). La estrategia de aislamiento de microorganismos psicrótrofos para el control de enfermedades poscosecha de fruta almacenada en frío, resultó exitosa tanto en el caso de las manzanas como en el de los citrus. El método propuesto sesgó la selección hacia aquellos microorganismos capaces de crecer en las condiciones en las cuales los productos a proteger serían almacenados. De esa forma se minimizó el número de aislamientos a ensayar en las pruebas de selección sobre fruta, las cuales son muy laboriosas e insumen muchos recursos y tiempo. Con anterioridad, en el trabajo de Wozniak (2003), realizado en la Cátedra de Microbiología, se ensayaron como controladores sobre fruta cerca de 100 microorganismos aislados de superficie de naranjas de diferentes predios al momento de cosecha. Solamente una bacteria y una levadura mostraron una protección moderada de las heridas de naranjas almacenadas en frío, frente al ataque con *Penicillium italicum*. Estos resultados evidencian la importancia de realizar un aislamiento selectivo y una buena selección primaria para obtener buenos resultados en menor tiempo.

Dos de las levaduras seleccionadas por su capacidad biocontroladora en naranjas, también mostraron actividad antagonista frente a *Penicillium expansum* y *Botrytis cinera* en manzana. Las levaduras fueron identificadas a nivel fenotípico y molecular como *Cystofilobasidium infirmominiatum* y *Leucosporidium scottii* (Vero *et al.* 2011). Se demostró que ambos antagonistas eran incapaces de crecer a 37 °C y que su actividad biocontroladora se basaba principalmente en mecanismos de

competencia por nutrientes con el patógeno.

En búsqueda de microorganismos psicrótrofos para el control biológico de enfermedades de manzanas almacenadas en frío, se intentó ensayar la capacidad biocontroladora de aislamientos de muestras provenientes de zonas frías, como la Antártida. Es así que a partir de muestras de suelo y agua provenientes de zonas cercanas a la base antártica uruguaya, se realizaron enriquecimientos en jugo de manzana estéril, incubándolos a bajas temperaturas durante 15 días. De 20 muestras colectadas sólo se obtuvieron cinco levaduras, cuya actividad biocontroladora frente a *Penicillium expansum* fue evaluada en manzana Red Delicious y Pink Lady. Una levadura identificada como *Leucosporidium scotti* At17 fue la que mostró mayores niveles de control, similares a los observados para el antagonista *Cystofilobasidium infirmominiatum* PL1, seleccionado con anterioridad (Vero *et al.* 2013). Fue sorprendente el haber seleccionado la levadura *Leucosporidium scottii*, a partir de muestras de orígenes tan distantes (suelo antártico y superficie de limones almacenados en frío).

La cepa At17 fue resistente a fungicidas de uso en poscosecha de manzana (tiabendazol, imazalil e iprodione) y también a la concentración de uso de difenilamina, que habitualmente forma parte del tratamiento previo al almacenamiento que reciben las manzanas. De acuerdo a dichos resultados la cepa At17 podría ser aplicada en forma conjunta con el tratamiento de difenilamina sin modificar el esquema ni metodología de tratamiento usual en las centrales procesadoras de fruta. La levadura antártica también mostró capacidad de formar biofilms, lo cual facilita su adhesión a superficies y confiere protección frente a compuestos químicos tales como los que surgen del stress oxidativo provocado por la inoculación de las levaduras biocontroladores en las heridas de fruta (Macarasin *et al.* 2010). La resistencia de los microorganismos biocontroladores a dichos compuestos es crucial para lograr una buena colonización de las heridas a proteger (Castoria *et al.* 2003).

La capacidad de las levaduras de resistir a diferentes tipos de stress, tanto oxidativo, como osmótico, térmico o por desecación se puede modificar variando las condiciones de producción de las mismas o por el agregado de aditivos que favorezcan su resistencia en el sitio de acción. El trabajo de Liu *et al.* (2011) demostró que la adición de glicina betaína exógena aumentó la resistencia al stress oxidativo de la levadura *Cystofilobasidium infirmominiatum* PL1, obteniendo mayor nivel de colonización y protección frente a patógenos en heridas de manzana. El trabajo de Labadie (2011) evidenció que las condiciones de cultivo fueron determinantes en el grado de resistencia al stress oxidativo y a los tratamientos de secado por parte de la levadura antagonista *Leucosporidium scotti* At17, de origen antártico. Para determinar las condiciones de producción a mayor escala del antagonista se diseñó un medio de cultivo mineral utilizando glucosa como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno. Fue necesario adicionar extracto de levadura para lograr obtener crecimiento del antagonista. La composición del medio y las condiciones de cultivo se optimizaron mediante diseños factoriales fraccionados y de superficie de respuesta (central compuesto) para lograr mayor producción de biomasa (Labadie *et al.* 2011). A su vez, se optimizaron las condiciones de producción en un medio preparado a base de melaza, subproducto de la industria azucarera. En este caso no fue necesario el agregado de extracto de levadura. La



biomasa obtenida a partir del medio de melaza presentó una mayor resistencia al stress oxidativo *in vitro* y en heridas de manzana y al secado por liofilización.

Los desafíos a futuro se basan en el estudio del potencial biocontrolador de las levaduras seleccionadas en otros patosistemas desarrollados en condiciones de conservación de frío, para determinar el potencial de transferencia a la industria. A su vez será necesario el estudio de la factibilidad de producción en otros subproductos industriales nacionales, tales como el permeado de leche o la glicerina cruda obtenida de la producción de biodiesel, así como las condiciones de escalado para la producción a mayor escala.

Los resultados de las investigaciones realizadas permiten concluir que el control biológico en la etapa poscosecha es posible y que la obtención de agentes de biocontrol es factible siempre que se utilicen los métodos de selección adecuados. La selección es sólo el paso inicial del desarrollo. Los pasos siguientes que involucran la correcta identificación y caracterización del agente, así como el estudio de sus mecanismos de acción y la optimización de su producción en sustratos baratos, son igualmente importantes. Además los estudios de inocuidad y el debido registro de una adecuada formulación del agente de biocontrol son la culminación para obtener un producto comercializable.

## Control biológico de la fusariosis de la espiga de trigo

Esta investigación es llevada adelante en conjunto entre la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química, el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) y la Facultad de Agronomía.

### Características e importancia de la enfermedad

La fusariosis de la espiga (FE) es una enfermedad destructiva en trigo en las regiones húmedas y sub-húmedas del mundo. En las últimas 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 (Díaz de Ackermann y Kohli 1997, Díaz de Ackermann y Pereyra 2011). 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 y Kohli 1997). Sin embargo, el aspecto más relevante es la producción de micotoxinas por parte de los hongos causales de la enfermedad.

La fusariosis de la espiga puede estar causada por una o más especies del género *Fusarium*. En Uruguay, la especie predominante asociada a fusariosis de la espiga en trigo es *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch, anamorfo: *Fusarium graminearum* (Schwabe) (Boerger, 1928, Boasso 1961; Pritsch 1995, Pereyra y Dill-Macky 2010, Umpierrez *et al.* 2011). *Gibberella zeae* es capaz de sobrevivir saprofiticamente en los rastrojos de trigo, cebada, maíz, sorgo y otras gramíneas (Da Costa Neto 1976, Sutton 1982, Reis 1988, Pereyra y Dill-Macky 2008) 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 fusariosis de la espiga. Se ha encontrado resistencia parcial (Mesterházy 1997) y hasta el momento se han incorporado niveles moderados de resistencia en cultivares comerciales a nivel mundial (Kosová *et al.* 2009) y en cultivares de trigo en Uruguay. 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 de fungicidas en el producto final (Díaz de Ackermann y Pereyra 2011). El beneficio potencial de la rotación con cultivos no susceptibles es menor debido al amplio rango de huéspedes de *Gibberella zeae* (Da Costa Neto 1976, Sutton 1982, Reis 1988, Pereyra y Dill-Macky 2008). 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 (Khongá y Sutton 1988, Dill-Macky y Jones 2000, Pereyra *et al.* 2004), la siembra directa es una práctica más atractiva a los productores ya que ofrece ventajas de conservación de suelos y menores costos. El uso de agentes de control biológico provee una estrategia adicional para un enfoque de manejo integrado de la fusariosis de la espiga.

## Estrategias para el control biológico de la fusariosis de la espiga

Las estrategias de control biológico de la fusariosis de la espiga varían en función del ciclo de vida de *Gibberella zeae*. Existen tres estrategias posibles, que a su vez pueden ser complementarias: a) La aplicación de microorganismos antagonistas seleccionados para ser aplicados a las espigas al momento de anthesis (floración) en procura de impedir o reducir la infección (Perondi *et al.* 1996, Stockwell *et al.* 2000, Khan *et al.* 2001, Schisler *et al.* 2002, Luz *et al.* 2003). b) La aplicación de microorganismos antagonistas a los rastrojos con el fin de reducir los niveles de inóculo primario (Fernández 1992, Bujold *et al.* 2001) y c) el incremento de las poblaciones de antagonistas de *Gibberella zeae* naturalmente presentes en los rastrojos mediante medidas de manejo como la rotación de cultivos. En Uruguay se ha enfatizado en estas dos últimas estrategias.

### Aplicación a la espiga

La aplicación de antagonistas al momento de anthesis puede impedir o retardar la germinación de las esporas de *Gibberella 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 o justo antes de anthesis 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 fusariosis de la espiga así como también el contenido de toxina deoxinivalenol (Perondi *et al.* 1996, Khan *et al.* 2001). Los microorganismos con los que han logrado los mejores

resultados han sido bacterias (*Bacillus amiloquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Pantoea agglomerans*) (Luz *et al.* 2003, Gilbert y Fernando 2004) 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 fusariosis de la espiga a campo en 50-67% así como también las pérdidas de rendimiento en grano en más de 700 kg/ha (Luz *et al.* 2003). En trabajos orientados a evaluar la aplicación de agentes de biocontrol junto con fungicidas eficientes en el marco de un manejo integrado de la enfermedad, se han logrado eficiencias de control de fusariosis de la espiga de hasta 86% y disminución en el contenido de deoxinivalenol hasta del 25% (Bergstrom 2000, Stockwell *et al.* 2000).

### Aplicación al rastrojo

El uso de agentes de biocontrol que afectan la supervivencia saprofítica de *Gibberella 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 fusariosis de la espiga es una enfermedad monocíclica donde la principal fuente de inóculo son los rastrojos infestados sobre la superficie del suelo. En las condiciones de Uruguay, *Gibberella zeae* es capaz de sobrevivir en rastrojo de trigo o cebada por dos años y en rastrojo de maíz hasta por tres años (Pereyra y Dill-Macky 2008). En consecuencia, el uso de antagonistas adaptados a las condiciones de campo capaces de reducir el nivel de inóculo inicial en los rastrojos, podría ser una herramienta útil en el manejo integrado de la fusariosis de la espiga.

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* y *Trichoderma harzianum* comercialmente disponibles en Estados Unidos y en Uruguay, en la colonización del rastrojo por *Gibberella zeae* y en la producción de peritecios y ascosporas. Se llevaron a cabo dos experimentos en condiciones semicontroladas donde se aplicaron *Bacillus subtilis*, cepa GBO3 de Estados Unidos (Kodiak®) a 0.05 g/m<sup>2</sup>, 4.6x10<sup>10</sup> ufc/g, *Trichoderma harzianum* cepa KRL-AG2 de Estados Unidos (T-22®) a 2 y 5 g/m<sup>2</sup>, 1x10<sup>7</sup> ufc/g y *Trichoderma harzianum* cepa L1 (Trichosoil®) a 2 y 5 g/m<sup>2</sup>, 1x10<sup>7</sup> ufc/g, y cepas B y C de Uruguay a 5 g/m<sup>2</sup>, 1x10<sup>7</sup> ufc/g a rastrojo de trigo naturalmente infectado con *Gibberella zeae* (83% de los nudos colonizados). Ninguno de los tratamientos tuvo un efecto significativo en reducir la colonización del rastrojo por *Gibberella zeae*. Sin embargo, los rastrojos inoculados con *Trichoderma harzianum* T-22® (2 y 5 g/m<sup>2</sup>) y *Trichoderma harzianum*, Trichosoil® (5 g/m<sup>2</sup>) presentaron una significativamente ( $P<0.05$ ) menor producción de peritecios por mm<sup>2</sup> de rastrojo, a los tres meses de aplicar estos antagonistas. En este caso, la menor producción de peritecios de *Gibberella 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 (Pereyra *et al.* 2005).

En una segunda etapa se aislaron y seleccionaron, según distintas características, cepas nativas de *Trichoderma* para el control biológico de *Gibberella zeae* a partir de rastrojo de trigo. Dieciséis cepas nativas de *Trichoderma* se identificaron molecularmente por secuenciación de dos regiones génicas (ITS1-5.8S rDNA-ITS2 y de una región del gen que codifica para el factor de elongación de la traducción 1 alfa). Se identificaron las especies *Trichoderma koningiopsis*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma longibrachiatum* (Cabrera 2009). Para estimar la potencialidad como agente de biocontrol las cepas fueron caracterizadas por su capacidad de producir distintas enzimas como celulasas, quitinasas y  $\beta$ -1,3-glucanasas así como por su habilidad para inhibir el crecimiento del patógeno en condiciones *in vitro*. Con los resultados de esta caracterización se logró seleccionar cinco cepas de *Trichoderma*, cuatro de *Trichoderma koningiopsis* y una de *Trichoderma atroviride*, que fueron posteriormente evaluadas *in vitro* por su capacidad de inhibir la producción de peritecios de *Gibberella zeae* sobre rastrojo de trigo. Las cinco cepas evaluadas lograron disminuir significativamente la producción de peritecios sobre el rastrojo de trigo, incluso una de las cepas logró inhibir la formación de peritecios hasta un 85% respecto al testigo (Cabrera 2009).

## Manejo de antagonistas mediante distintas secuencias de cultivos

*Trichoderma* es un hongo que normalmente habita los suelos y que ha mostrado tener una gran capacidad antagonista frente a un variado grupo de patógenos y ha mostrado ser eficiente en el biocontrol de *Gibberella zeae* (Cabrera 2009). Sin embargo, desde una perspectiva ecológica, aún cuando se realicen inoculaciones con cepas microbianas nativas del sitio donde se está utilizando, las poblaciones del agente inoculado se enfrentan a ambientes hostiles que naturalmente evitaron su presencia en altas densidades (Garret 1970).

En 2009 se iniciaron estudios que buscan identificar el efecto de distintas medidas de manejo sobre las poblaciones nativas de *Trichoderma*, no sólo con el objetivo de favorecer altas poblaciones indígenas ya presentes allí, sino además para identificar ambientes que favorezcan el desarrollo de *Trichoderma* y de esta forma asegurar un mejor ambiente para realizar las inoculaciones de cepas eficientes para el biocontrol de los principales patógenos de cultivos extensivos, entre ellos, *Gibberella zeae* (Perez y Villar 2011).

## Consideraciones finales

El control biológico representa una alternativa adicional en un enfoque de manejo integrado de la fusariosis de la espiga, 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, en especial la secuencia de cultivos.

## Control biológico de patógenos en hortalizas

La producción de hortalizas en Uruguay es realizada en su gran mayoría por productores familiares, que hacen un uso intensivo del suelo y recurren al uso de fungicidas como principal herramienta de manejo de las enfermedades de sus cultivos. El uso de plaguicidas en cultivos hortícolas se realiza sin las precauciones debidas (Banchemo y Kausas 1989, Navarro y Piña 2006) lo que pone en riesgos a productores, trabajadores y consumidores. A su vez la baja eficiencia en el control químico de algunos patógenos ha obligado al desarrollo de sistemas de manejo integrado de las principales enfermedades. Para ello se han desarrollado trabajos conjuntos entre las cátedras de Horticultura y Fitopatología. Por un lado, el rescate de poblaciones locales de hortalizas mantenidas por los productores ha permitido disponer de variedades adaptas a la zona de producción y con mayores niveles de resistencia. Un ejemplo de ello es la selección de poblaciones locales de cebolla con mayor resistencia a *Botrytis squamosa* (Galván *et al.* 2003). El uso de la solarización mostró ser altamente efectiva en el control de patógenos de suelo (Gepp *et al.* 1999 Gepp *et al.* 2001, Casanova y Tricot 2001). El uso de Propóleos para el control de enfermedades de hortalizas ha sido otra de las líneas de trabajo de este grupo (González *et al.* 2005). Por último, el control biológico de enfermedades de hortalizas ha sido otra de las líneas de trabajo en la búsqueda de herramientas útiles en la implementación de estrategias de manejo integrado, destacándose los trabajos llevados adelante en los patosistemas *Sclerotinia sclerotiorum* - lechuga y *Botrytis squamosa* - cebolla.

## Control Biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* en Lechuga

En todo el mundo los cultivos son afectados por diversos patógenos de suelo, entre los cuales se encuentran hongos, bacterias y nemátodos. Su incidencia en la producción se incrementa a medida que el suelo se usa en forma mas intensa. Varios factores contribuyen a que el control de estos patógenos sea muy dificultoso, entre ellos el hecho de que es muy difícil llegar al patógeno en el perfil del suelo con cualquier sustancia química y que existe una escasez de variedades resistentes. En algunos casos los patógenos poseen un amplio rango de huéspedes, lo cual significa un obstáculo para su manejo mediante rotaciones de cultivos. Tal es el caso de *Sclerotinia sclerotiorum*, un hongo de suelo que provoca pérdidas importantes en numerosos cultivos hortícolas e industriales en el Uruguay (Gepp *et al.* 1998, Gepp 2003). Este hongo afecta numerosos cultivos, produce estructuras de resistencia (esclerotos) que permanecen en el suelo y en determinadas condiciones se reproduce sexualmente mediante apotecios

que liberan ascosporas al aire. La importancia de la podredumbre blanda de las hortalizas y las dificultades existentes para manejarla con las herramientas disponibles llevó a la cátedra de Fitopatología de la Facultad de Agronomía a desarrollar un proyecto con el objetivo de aislar y seleccionar cepas de hongos antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum*. Los trabajos se iniciaron en el año 1999 y habrían de continuar por tres años. La estrategia utilizada fue la de aislar potenciales antagonistas partiendo de los propios esclerotos de *Sclerotinia sclerotiorum* que pudiesen estar parasitados. Se procuró de esta manera dirigir la selección hacia aquellos microorganismos capaces de parasitar esclerotos, estructuras de sobrevivencia de este patógeno. Para ello se utilizaron esclerotos producidos en el laboratorio los que fueron utilizados como cebos o trampas. Grupos de estos esclerotos fueron colocados en la tierra dentro de mallas plásticas por un periodo de tres meses. Posteriormente se retiraron y se procedió a aislar antagonistas (Silveira *et al.* 2001). Se utilizó una estrategia de selección escalonada. Comenzando con técnicas de laboratorio, luego se pasó a técnicas que utilizan trozos de material vegetal para finalmente usar la selección sobre plantas. La selección primaria se realizó *in vitro*, mediante la técnica de cultivos duales. De un total de 130 aislamientos obtenidos se seleccionaron los 56 que mejor controlaron al patógeno. Posteriormente se usó una técnica modificada de Rabendran *et al.* (1998) consistente en colocar un disco de agar con el antagonista sobre uno con *Sclerotinia sclerotiorum* (ambos micelios en contacto) en el centro de una placa de Petri sobre sustrato estéril húmedo y rodeados por tres trozos de pecíolo de repollo o lechuga. Se seleccionaron así 40 aislamientos que lograron evitar la colonización de los trozos de repollo del ataque del patógeno. La mayoría de los aislados resultaron pertenecer al género *Trichoderma* (Silveira *et al.* 2002, Silveira *et al.* 2003).

Con los cinco mejores antagonistas seleccionados se pasó a la etapa de evaluación en planta. Para ello, previamente se debió ajustar la multiplicación de los antagonistas en sustrato de maíz picado grueso y se aplicó una suspensión de esporas ( $10^{-6}$  ufc/ml) a un sustrato estéril en almacigueras, donde se sembró lechuga. Cada celda de la almaciguera se inoculó con un disco de agar con micelio del patógeno y se evaluó el porcentaje de plantas muertas al cabo de 40 días. El trabajo concluyó con éxito y obteniéndose una serie de aislados capaces de disminuir la incidencia de *Sclerotinia sclerotiorum*. El género más encontrado fue *Trichoderma*. No se aisló *Coniothyrium minutans*, un micoparásito de esclerotos que existe en otros continentes y que se ha desarrollado comercialmente.

## Control biológico de la mancha foliar y punta seca de la cebolla ocasionada por *Botrytis squamosa*

El cultivo de cebolla tiene gran importancia socio-económica en nuestro país, debido a que involucra a un gran número de productores en su mayoría familiares. Es una de las cinco hortalizas más cultivadas y el número de productores asciende a 1300 aproximadamente, con una producción anual en el entorno de las 25.500 toneladas (DIEA-DIGEGRA, MGAyP 2010). El 95 a

98% de la producción nacional es llevada a cabo por productores familiares, los cuales en su mayoría cultivan superficies de una o dos hectáreas como valores modales. Durante la etapa de almácigo la mancha foliar y punta seca causada por *Botrytis squamosa* es la mayor limitante a la producción (González *et al.* 1998a). En condiciones favorables esta enfermedad puede ocasionar la destrucción total de los plantines en el almácigo. Su manejo requiere de la integración de diferentes medidas de control. Esta problemática se abordó en conjunto por las cátedras de Horticultura y Fitopatología de la Facultad de Agronomía. Se realizó una selección de poblaciones locales de cebolla evaluándose su resistencia a la mancha foliar y punta seca.

En el año 1997 comenzó la búsqueda y selección de antagonistas y se realizó la primera evaluación a campo de una cepa de *Clonostachys rosea*. La estrategia de búsqueda utilizada en este caso fue la de aislar antagonistas a partir de esclerotos de *Botrytis squamosa* visiblemente parasitados. Mediante la técnica de cultivos duales fue seleccionada la mejor cepa. Inmediatamente se pasó a la etapa de ajuste de la producción de inóculo del antagonista en diferentes sustratos (granos de trigo, afrechillo, granos de maíz enteros, granos de maíz molidos). El mayor rendimiento en producción de conidios de *Clonostachys rosea* se obtuvo sobre granos de trigo previamente esterilizados en autoclave. Los tratamientos consistieron en aplicaciones semanales de *Clonostachys rosea* ( $10^8$  conidios/ml), Iprodione (Rovral) en concentración de 1 g/l, y agua estéril a un almácigo de cebolla. La aplicación de *Clonostachys rosea* presentó menores niveles de enfermedad que el testigo sin tratar (González *et al.* 1998b, Silvera-Pérez *et al.* 1998). Las mayores dificultades encontradas en el desarrollo de métodos de control biológico de enfermedades de hortalizas son la falta de continuidad en el financiamiento de la línea de investigación y la falta de un banco de microorganismos en donde depositar las cepas seleccionadas. Las líneas se discontinuaron y muchas de las cepas promisorias se fueron perdiendo con el correr del tiempo por no estar conservadas en forma apropiada.

## **El primer producto biológico completamente desarrollado en Uruguay que alcanzó la etapa de registro**

La empresa Lage y Cía registra el primer producto biológico en el año 2009 (Registro N° 3087). Se trata de Trichosoil, un fungicida biológico cuyo principio activo es una cepa de *Trichoderma harzianum* de origen nacional. A continuación se presenta la historia de este fungicida actualmente presente en el mercado.

### **Desarrollo del Trichosoil, primer biofungicida registrado en Uruguay**

En la década del 90 no había antecedentes en Uruguay acerca del uso de antagonistas para el control de enfermedades a nivel de campo. Incluso a nivel mundial eran pocos los productos comerciales para control biológico de enfermedades vegetales, si bien había un gran número de trabajos científicos al

respecto, destacándose las referencias del uso de hongos del género *Trichoderma*.

En nuestro país, en años previos, se estaba investigando en el uso de *Trichoderma* para el control de *Sclerotium rolfsii* con buenos resultados de laboratorio. *Sclerotium rolfsii* es un patógeno importante en Uruguay, pues ataca diversos cultivos y es de difícil control (Lupo 1992).

En el año 1991, la empresa Lage y Cía S.A., productora de inoculantes a base de rizobios desde 1960, se interesa en el desarrollo de agentes microbianos de control biológico, aprovechando su experiencia e infraestructura para la producción de microorganismos a gran escala.

Para que un microorganismo pueda transformarse en un producto comercial no sólo debe poseer una buena capacidad antagonista, sino que también tiene que poder producirse de forma económica, en condiciones estandarizadas y a gran escala. Además hay que lograr una formulación que se pueda aplicar fácilmente en el cultivo y que le confiera al producto una sobrevivencia adecuada para permitir su comercialización. Luego de obtener un producto formulado hay que determinar la forma y momento en que se aplicará en el campo, dependiendo del cultivo y el patógeno a controlar; también se deben instrumentar controles de calidad para garantizarle al usuario un producto estandarizado. Por último, se deben completar los trámites de registro ante las autoridades competentes.

Para iniciar los trabajos, Lage y Cía. obtuvo un Proyecto del Fondo de Promoción y Tecnología Agropecuaria (FPTA) de INIA en 1991, con una duración de cuatro años, denominado "Control biológico de hongos de suelo y su aplicación masiva a campo". Las investigaciones se centraron en el control de *Sclerotium rolfsii* en ajo con *Trichoderma*, dados los antecedentes de trabajo en este tema en INIA y Facultad de Ciencias. En Uruguay, *Sclerotium rolfsii* es un patógeno importante en el cultivo de ajo, provocando grandes pérdidas al fin del ciclo del cultivo, fundamentalmente en la calidad del bulbo. En esos años el ajo era un cultivo con perspectivas de exportación, por lo cual las exigencias de calidad eran altas. Las medidas de control químico usadas hasta el momento no eran efectivas, por lo cual había fundadas esperanzas en que la aplicación de productos a base de *Trichoderma* podría ser una alternativa viable para el control de *Sclerotium rolfsii* en un sistema de manejo integrado.

Los objetivos del Fondo de Promoción y Tecnología Agropecuaria Lage-INIA fueron:

- Seleccionar aislamientos de *Trichoderma* con alto poder antagonista.
- Ajustar las condiciones de producción del antagonista.
- Probar soportes para obtener una formulación efectiva y de fácil aplicación.
- Definir dosis y momentos de aplicación para controlar *Sclerotium rolfsii* en ajo.
- Probar la compatibilidad de aislamientos de *Trichoderma* con fungicidas químicos con vistas a utilizarlos en un plan de manejo integrado.

Luego de culminado el proyecto se logró una colección de aislamientos con probada actividad antagonista frente a *Sclerotium rolfsii*, un adecuado sistema de producción de *Trichoderma* y un método de control integrado del patógeno

con fungicidas compatibles.

En los años subsiguientes, Lage y Cía. continuó las investigaciones por su propia cuenta. Seleccionó de la colección un aislamiento de *Trichoderma harzianum* que tenía buenas características como antagonista y para la producción industrial. Con él desarrolló un formulado con posibilidad de ser aplicado a campo y con una aceptable vida útil, que permite su comercialización. (Folch *et al.* 1997).

Los productos para control biológico se utilizan principalmente en cultivos hortifrutícolas que hacen un uso más intensivo de los recursos. En Uruguay este mercado es muy pequeño, por lo cual para lograr comercializar un volumen interesante de un fungicida biológico hay que determinar el espectro de acción del antagonista y ajustar su aplicación en diferentes situaciones productivas. El aislamiento de *Trichoderma harzianum* seleccionado no sólo controla *Sclerotium rolsii* sino que también se probó su efectividad sobre otros patógenos de suelo como *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium*, y algunos foliares como *Botrytis*. También se pudo constatar promoción de crecimiento en los almácigos. Estos patógenos son bastante polífagos y por esta razón se trabajó en varios cultivos, adaptando el uso del producto al sistema de producción. Hay que tener en cuenta que en la década del 90, y aún hoy, los productores no están acostumbrados a usar herramientas biológicas y el control de las enfermedades se realiza mayoritariamente con fungicidas químicos. La inclusión de un fungicida biológico debe estudiarse caso a caso, junto con el productor, analizando el sistema de producción, los patógenos que se presentan y los momentos en que aparecen y las restantes medidas que se utilizan para su control; solamente de esta manera se podrá incluir el agente antagonista en un manejo integrado.

Al obtener un producto formulado (denominado Trichosoil), con un uso definido, se decidió registrarlo en el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MGAP). En el año 2001, cuando se iniciaron los trámites, no existía en Uruguay una legislación que permitiera el registro de productos biológicos para el control de plagas y enfermedades; los únicos formulados microbianos que se podían registrar eran los inoculantes de rizobios. El registro debió hacerse siguiendo la normativa de los productos químicos, con dos serias dificultades: en primer lugar los formularios estaban diseñados para registrar un fungicida químico, y en segundo lugar, las autoridades competentes desconocían las características particulares de un fungicida biológico. Finalmente, en el año 2005, se obtuvo el registro de Trichosoil como plaguicida agrícola, que resultó ser el primer fungicida biológico registrado en Uruguay. Cuando en 2010 venció el registro, Uruguay ya contaba con una normativa para registrar agentes microbianos de control biológico y la renovación se hizo siguiendo los nuevos requisitos.

El desarrollo de agentes microbianos de control biológico es un proceso dinámico. Hay que mejorar las formulaciones para que se adapten a los sistemas productivos, probar la compatibilidad con los nuevos productos químicos que aparecen en el mercado y que puedan utilizarse en un manejo integrado. En la actualidad, el mercado está cada vez más ávido de este tipo de productos y surgen permanentemente nuevos nichos en los que hay que incursionar, incluso en cultivos extensivos, donde hay que buscar formas de aplicación que sean económicamente viables.



## Dificultades encontradas en la investigación en control biológico en Uruguay y nuevas perspectivas

La investigación en control biológico ha estado centrada en el sector público, la Universidad de la República, el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Diversos grupos de investigación han realizado importantes esfuerzos en procura de desarrollar metodologías de control biológico de enfermedades de plantas. A pesar de ello, hasta el momento, un solo producto ha alcanzado la etapa de registro. Se trata de Trichosoil registrado por la empresa Lage y Cia.

Una de las limitantes importantes ha sido la discontinuidad de los fondos recibidos lo que dificulta el establecimiento de equipos de investigación estables. Las prioridades de financiamiento en la actualidad no incluyen entre las temáticas concursables el desarrollo de metodologías de manejo de enfermedades de plantas dirigidos a minimizar el uso de plaguicidas y sus impactos.

Por otra parte existen serias dificultades para transferir los conocimientos generados al sector privado. Muchos microorganismos con alto potencial biocontrolador han quedado en la etapa de selección sin que luego se haya dado paso a la investigación en métodos de producción masiva, desarrollo de un formulado comercial y finalmente uso por parte de los agricultores.

En general, muchas iniciativas completan exitosamente las primeras etapas llegando a establecer colecciones de cepas con alto potencial para ser utilizadas en el desarrollo de un producto biológico, pero al igual que ocurre a nivel mundial, muchas de ellas no logran concretar el desarrollo comercial. Existen dificultades al momento de establecer los términos de transferencia al sector privado de las cepas, como realizar la protección de las mismas, como asegurar el pago de los royalties.

A esto se han sumado las dificultades al momento de proceder al registro, ya que durante años no existió una legislación que permitiese registrar productos biológicos. El registro de un plaguicida biológico siguiendo los protocolos existentes para los fungicidas de síntesis química llevó a que se exigieran análisis innecesarios y se omitieran otros que deberían exigirse a un producto biológico.

Finalmente, en los últimos años, se destrabó el registro de productos biológicos y sin embargo muchos productos no logran alcanzar esta etapa. En ocasiones se ha intentado registrar productos biológicos con serias carencias de investigación y desarrollo. Por ejemplo intentar registrar un producto cuyo agente de biocontrol no está identificado en forma certera. La falta de identificación lleva a otras carencias como la ausencia de pruebas que garanticen su inocuidad. Por otra parte tampoco se han desarrollado protocolos que garanticen la calidad de los productos biológicos.

Si bien existe conocimiento científico generado sobre un número importante de cepas microbianas, el desafío actual es ingresar en la etapa de adopción y uso de productos comerciales. Para ello, se debe dar un salto de escala que implica desarrollar investigación en bioproducción y formulación, en fuerte vinculación con la industria, y contribuir a la armonización del marco normativo vigente.

Actualmente el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), ha realizado esfuerzos para fortalecer las líneas de investigación en bioproducción y desarrollo de producto, incluyendo la multiplicación, el escalado y la fermentación en sustrato líquido o sólido, la formulación y el control de calidad. Con la reciente culminación y puesta en funcionamiento del Laboratorio de Microbiología de Suelos en la Estación Experimental Wilson Ferreira Aldunate, INIA incorpora este antecedente nacional en bioproducción. Esta iniciativa permite potenciar las capacidades ya instaladas del Laboratorio de Bioproducción de Agentes Microbianos de Control Biológico y la Unidad de Biotecnología. La suma de dichas capacidades en áreas temáticas convergentes y con abordajes metodológicos comunes, fortalece el desarrollo de una Plataforma de Bioinsumos de Uso Agrícola en base a Microorganismos Benéficos.

Para la puesta en funcionamiento de dicho laboratorio se priorizó la vinculación tecnológica con grupos internacionales, como AgResearch (Nueva Zelanda), Embrapa (Brasil), USDA Crop Bioprotection Unit (Estados Unidos). En particular, AgResearch trabaja en el desarrollo de Agentes de Control Biológico desde hace más de 20 años, investigación impulsada por una política netamente proteccionista del medio ambiente con una fuerte rentabilidad comercial.

En este mismo sentido se destaca el reciente proyecto de “Instalación de un centro de multiplicación y distribución de agentes microbianos para el control de enfermedades y plagas en horticultura”. En este caso se trata de una iniciativa de un agrupamiento de productores nucleados en la Sociedad Fomento Rural Los Arenales ubicada en el departamento de Canelones.

El proyecto, con apoyo de la Facultad de Agronomía e INIA, procura desarrollar un laboratorio para la producción y comercialización de agentes de control biológico. Para su ejecución se definen diferentes etapas: instalación de laboratorio y salas de multiplicación; capacitación del personal a cargo del laboratorio; producción a escala comercial de los distintos agentes biológicos; capacitación de productores y técnicos del territorio en el uso de esta herramienta; seguimiento y supervisión en predios de referencia que permita ajustar técnicas de aplicación del agente biológico; difusión de los resultados obtenidos a productores y técnicos; y distribución a productores de los agentes de control biológico (González, 2012; Patrón *et al.* 2012).

## La enseñanza del control biológico

En Uruguay, como en la mayoría de los países, el Control Biológico de enfermedades de plantas permaneció relegado durante muchos años. El primer antecedente docente se remonta a 1991, año en que se incluye el tema dentro del curso de fitopatología en la formación de los ingenieros agrónomos. Esta introducción del tema se da en un plano teórico debido a que aún no existen productos comerciales de control biológico en el mercado y por lo tanto no es posible analizar su aplicación en campo ni ejemplificar con datos concretos las formas de manejar enfermedades de plantas mediante la aplicación de biocontroladores. Su inclusión se realizó con el fin de brindar a los futuros profesionales los conocimientos básicos para incorporar esta tecnología en el futuro.



En el año 1999 se dicta el curso “Bases Moleculares en el Control Biológico de Patógenos de Suelo” en el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas. Participaron del mismo como docentes invitados la Dra. Linda Tomashow (USDA, Root Disease and Biological Control Research Unit, Estados Unidos) y el Dr. Philip Lemanceau (INRA, Francia).

A partir del año 2003 se comienza a dictar un curso de posgrado sobre “Control biológico de enfermedades de plantas”. Este curso se continúa dictando en forma bianual para estudiantes de posgrado y ha contado con la asistencia de estudiantes de diferentes países de Latinoamérica. En el año 2006 se publica la primera edición del libro de texto para dicho curso “Control biológico de patógenos de plantas” (Mondino y Vero 2006). En el año 2012 el curso fue seleccionado en la convocatoria de cursos del Centro Argentino Brasileño de Biotecnología (CABBIO).

## La difusión del control biológico y eventos científicos

Tan importante como la enseñanza curricular del control biológico, ha sido la atención dedicada a la promoción de eventos realizados con el objetivo de sensibilizar sobre el uso de microorganismos benéficos en la agricultura. En particular, se destacan una serie de hitos con participación del sector académico, productivo y político, que marcan la relevancia del conocimiento generado en Uruguay, y posicionan al país en un escenario favorable a nivel regional. La organización de dichos eventos ha sido responsabilidad del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), la Universidad de la República (UdelaR) y el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), contando con el apoyo del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), el Programa Cooperativo de Investigación del Cono Sur (PROCISUR), la Sociedad Uruguaya de Fitopatología (SUFIT), Embrapa (Brasil), INTA (Argentina), INIA (Chile), AgResearch (Nueva Zelanda).

- V Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe - V SIRGEALC. RRGG Microbianos. Noviembre 23-25, 2005. Montevideo, Uruguay. Los trabajos presentados fueron publicados en un número especial de la revista Agrociencia (Agrociencia No. 9 vol 3 del año 2005).

- Primer Taller sobre Producción de Agentes Microbianos de Control Biológico. Marzo 21-22, 2006. INIA la Estanzuela, Colonia, Uruguay. El Primer Taller Uruguayo sobre Agentes Microbianos de Control Biológico (AMCB) dejó de manifiesto la existencia de vasto conocimiento generado en el país (Alzugaray y Visnovsky 2006). Permitted sentar las bases de la situación actual de Uruguay en la temática, así como establecer las principales limitantes y demandas del sector científico, de las empresas proveedoras de productos biológicos y de los usuarios finales. Principalmente se enfatizó la necesidad de contar con un marco regulatorio para el registro y utilización de AMCB en el territorio nacional.

- Segundo Taller de Agentes Microbianos de Control Biológico. Setiembre 4-5, 2008. INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay. El Segundo Taller Uruguayo de Agentes Microbianos de Control Biológico se focalizó en analizar y discutir los avances logrados en la prospección, evaluación y eficiencia de control de

agentes microbianos para el control de enfermedades e insectos, con énfasis en los aspectos de formulación, escalado y producción de los AMCB. Así mismo, se desarrolló una discusión sobre “Marco Normativo y Comercialización”, con la participación de destacados investigadores de la región (Brasil, Argentina, Chile) y de países con modelos exitosos (Colombia, Cuba, Israel, Nueva Zelanda), cuyas conclusiones levantan la relevancia de fomentar la integración regional/internacional de los grupos trabajando en el tema de control biológico.

- Tercer Taller de Agentes Microbianos de Control Biológico. Setiembre 4, 2011. Piriápolis, Maldonado, Uruguay. El Tercer Taller Uruguayo de Agentes Microbianos de Control Biológico tuvo como objetivo abordar la temática “Uso y perspectivas de los Agentes Microbianos de Control Biológico en sistemas de producción sustentables”. Se discutieron aspectos de desarrollo y uso de agentes microbianos para el control biológico de insectos plaga y de enfermedades vegetales, así como la importancia de la gestión de las colecciones de cultivos microbianos y su rol en la conservación y uso sustentable del recurso. El taller se realizó al comienzo de la vigésimo quinta Reunión Latinoamericana de Rizobiología (XXV RELAR), tornándose una ocasión para reunir investigadores de la región y sumar capacidades en el área de los recursos genéticos microbianos.

## **Marco normativo para el registro de Agentes de Control Biológico en Uruguay**

Durante muchos años no fue posible registrar productos biológicos para uso agrícola en el Uruguay debido a la inexistencia de una legislación que lo regule. Los intentos de registro se realizaron siguiendo la normativa existente para plaguicidas de síntesis química lo que terminaba imposibilitando el registro.

En la discusión final del Primer Taller de Agentes Microbianos de Control Biológico se arribó a la siguiente conclusión: “Se remarca la falta de un marco normativo que permita la utilización en el país de estos Agentes Microbianos de Control y el desarrollo de productos basados en microorganismos nativos. La elaboración de este marco normativo debería colocarse como una prioridad estratégica, ya que sería un punto de apoyo trascendente para lograr un país productivo, sustentable y natural, y debería ser consensuado por todas las instituciones involucradas en el tema, incluyendo la industria y a los productores agropecuarios” (Primer Taller Uruguayo de Producción de Agentes Microbianos de Control Biológico, 2006).

A partir de entonces la Dirección General de Servicios Agrícolas (MGAP), autoridad competente en la materia, ha trabajado en una propuesta de marco regulatorio aprobándose el 09 de mayo de 2007 el Decreto 170 (Diario Oficial), por el cual el Poder Ejecutivo decreta de interés para la producción agrícola el uso de Agentes de Control Biológico. Dicha propuesta plantea que los Agentes de Control Biológico sean sometidos a Análisis de Riesgo en cuanto a impacto ambiental y salud humana. Por esta razón, la Dirección Nacional de Medio Ambiente (MVOTMA) y la Dirección de Salud Ambiental y Ocupacional (MSP) son parte del sistema.

INIA, a través de la Gerencia de Vinculación Tecnológica, ha realizado un esfuerzo conjunto para la armonización de una estrategia nacional que atienda el registro, control de calidad y uso de productos biológicos, con todos los actores institucionales involucrados (MGAP, MVOTMA, MSP, Consejo Sectorial de Biotecnología, Gabinete Productivo, UdelaR).

El procedimiento vigente para el registro establece pautas para obtener información sobre la eficacia agronómica de los Agentes de Control Biológico. A partir del año 1998 la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Agronomía brinda el servicio de "evaluación de productos biológicos con fines de registro". Diversos formulados nacionales y extranjeros fueron evaluados siguiendo los protocolos exigidos por el MGAP. El primer producto evaluado fue el "MBI 600", un formulado en base a *Bacillus subtilis* recomendado para el control de la podredumbre morena ocasionada por *Monilinia* spp. en duraznos. Los resultados no fueron positivos y la empresa Lage & Cia desistió de registrarlo.

En el año 2005 un segundo producto biológico fue traído a Uruguay por la empresa BILSA. Se trató de Bioderma, un formulado de origen hindú en base a *Trichoderma viride* que se intentó registrar sin éxito. Se realizaron ensayos para evaluar su eficiencia en el control de patógenos de suelo. En este caso se obtuvieron resultados promisorios, pero la ausencia de legislación impidió el registro.

En los años 2007-2008 se realizaron ensayos de evaluación de Nattogro, formulado fabricado por la empresa Microbax, India, consistente en una combinación de diferentes cepas del género *Bacillus* con predominancia de la especie *Bacillus subtilis*. Nattogro fue ingresado en traído a Uruguay por la empresa Benatto (Garmendia *et al.* 2008). Ante la ausencia de una legislación que le permitiera iniciar los tramites de registro la empresa desistió en sus pretensiones de comercializar en Uruguay dicho producto.

A partir del año 2007 y hasta el 2010 se realizan ensayos de evaluación de Zimevit, un producto biológico desarrollado en la cátedra de enología de la Facultad de Química que combina la acción de una cepa de la bacteria *Bacillus subtilis* con una cepa de la levadura *Metschnikowia pulcherrima* para el control de *Botrytis cinerea* en vid (Mondino *et al.* 2012).

## Consideraciones finales

En las últimas dos décadas, Uruguay ha generado conocimiento científico sobre microorganismos benéficos de uso potencial para el control biológico de enfermedades de plantas, alineándose con un escenario favorable a nivel mundial. Hoy se dispone de capacidades institucionales creadas para realizar investigación y de recursos humanos calificados. Así mismo, hay antecedentes de vinculación con el sector industrial para el desarrollo comercial de productos. Esta iniciativa nacional es trascendente para la concreción de tecnologías innovadoras para la agricultura y el logro de un país productivo, sustentable y natural, con el consenso de todos los actores involucrados en el tema. El éxito está condicionado a un fuerte compromiso para la armonización del marco normativo y la instrumentación de políticas de educación y extensión en cuanto al uso de insumos biológicos, con alcance a los diferentes sectores de la sociedad.

## Bibliografía

- Altier N, Thies JA. 1995. Identification of resistance to *Pythium* seedling diseases in alfalfa using a culture plate method. *Plant Disease* 79:341-346.
- Alzugaray R, Visnovsky G. (eds.) 2006. Proceedings of the First Uruguayan Workshop on Bioproduction of Biological Control Agents, Montevideo. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIA. 72pp.
- Bagnasco P, De La Fuente L, Gualtieri G, Noya F, Arias A. 1998. Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biology & Biochemistry* 30:1317-1322.
- Bajsa N, Quagliotto L, Yanes ML, Vaz P, Azziz G, De La Fuente L, Bagnasco P, Davyt D, Pérez C, Ducamp F, Altier N, Arias A. 2005. Selección de *Pseudomonas* fluorescentes nativas para controlar enfermedades de implantación en praderas. *Agrociencia* 9:321-325.
- Banchero ML, Kausas S. 1989. Consecuencias en la salud del uso de agrotóxicos en el área de influencia de la Sociedad de Fomento Rural de Santa Rosa. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad de la República, Montevideo. 234 pp.
- Bergstrom GC. 2000. NCR-184 State Report New York 2000. In: Proc. 2000 National *Fusarium* Head Blight Forum, Erlanger, KY. Pp. 327-329.
- 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. Imprenta Nacional, Montevideo. 436 pp.
- Bujold I, Paulitz TC, Carisse O. 2001. Effect of *Microsphaeropsis* sp. on the production of perithecia and ascospores of *Gibberella zeae*. *Plant Disease* 85:977-984.
- Cabrera M. 2009. Control biológico de la fusariosis del trigo. Tesis de Maestría en Biotecnología. Facultad de Ciencias. Universidad de la República, Uruguay. 90 pp.
- Casanova L, Celio CA. 2011. Determinación de los niveles de resistencia "in vitro" a Trifloxystrobín en poblaciones de *Venturia inaequalis*. Tesis de Grado Facultad de Agronomía. Universidad de la República, Uruguay. 65 pp.
- Casanova S, Tricot D. 2001. Efecto de la solarización sobre malezas y hongos fitopatógenos de suelo en cultivo de lechuga en invernáculo. Tesis de Ingeniero Agrónomo, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay. 80p.
- Castoria R, Caputo L, De Curtis F, De Cicco V. 2003. Resistance of postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: a possible new mechanism of action. *Phytopathology* 93:564-572.
- Catroux G, Hartmann A, Revellin C. 2001. Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant Soil* 230:21-30.
- Da Costa Neto JP. 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.
- De La Fuente L, Quagliotto L, Bajsa N, Fabiano E, Altier N, Arias A. 2002. Inoculation with *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains does not affect the symbiosis between rhizobia and forage legumes. *Soil Biology & Biochemistry* 34:545-548.
- De La Fuente L, Thomashow L, Weller D, Bajsa N, Quagliotto L, Chernin L, Arias A. 2004. *Pseudomonas fluorescens* UP61 isolated from birdsfoot trefoil rhizosphere produces multiple antibiotics and exerts a broad spectrum of biocontrol activity. *European Journal of Plant Pathology* 110:671-681.
- Díaz de Ackermann M, Kohli MM. 1997. Research on *Fusarium* head blight of wheat in Uruguay. En: Dubin HJ, Gilchrist L, Reeves J, McNab A (eds.). *Fusarium* head scab: Global status and future prospects. CIMMYT, DF, Mexico Pp. 13-18

- Díaz de Ackermann M, Pereyra S. 2011. Fusariosis de la espiga de trigo y cebada. En: manejo de enfermedades en trigo y cebada. Pereyra S, Díaz de Ackermann M, Germán S, Cabrera K. (Eds) Serie Técnica N° 189 INIA, Montevideo. Pp. 111-128
- DIEA-DIGEGRRA, MGAyP, 2010. Encuestas Hortícolas 2009 Zonas Sur y Litoral Norte Serie Encuestas N° 290.
- Dill-Macky R, Jones R. 2000. The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Disease* 84:654-660.
- Droby S, Wisniewski M, Macarisin D, Wilson C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology* 52:137-145.
- Esterio M, Auger J, Ramos C, García H. 2007. First report of fenhexamid resistant isolates of *Botrytis cinerea* on grapevine in Chile. *Plant Disease* 91:768.
- Fernandez MR. 1992. The effect of *Trichoderma harzianum* on fungal pathogens infesting wheat and black oat straw. *Soil Biology & Biochemistry* 24:1031-1034.
- Fischer G. 1961. Calendario agropecuario y de jardinería. Almanaque BSE 1961, Montevideo. Pp. 47-50.
- Folch C, Viñas E, Baraibar A. 1997. Control de *Sclerotium rolfsii* con *Trichoderma* y flutolanil en cultivos de ajo. 9 Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Sociedad Uruguaya de Fitopatología. Montevideo. p184
- Fox SL, O'Hara GW, Bräu L. 2011. Enhanced nodulation and symbiotic effectiveness of *Medicago truncatula* when co-inoculated with *Pseudomonas fluorescens* WSM3457 and *Ensifer (Sinorhizobium) medicae* WSM419. *Plant and Soil* 348:245-254.
- Galietta G, Egaña E, Gemelli F, Maeso D, Casco N, Conde P, Nuñez S. 2010. Pesticide dissipation curves in peach, pear and tomato crops in Uruguay. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 45:8:862-867.
- Galvan GA, González PH, Reggio A. 2003. Onion leaf blight caused by *Botrytis squamosa* in Uruguay and the differential response of local cultivars. *Allium Improvement Newsletter* 13:51-54.
- Garmendia, G.; Ferreira, Y.; Casanova, L.; Mondino, P.; Vero, S. 2008. Caracterización de Nattogro y determinación de su inocuidad en la germinación y crecimiento de plántulas de tomate. 2° Taller Uruguayo de Agentes Microbianos de Control Biológico. Colonia, Uruguay.
- Garmendia G, Garat F, De Aurrecoechea I, Vero S. 2005. Levaduras nativas como controladores de enfermedades postcosecha de frutas en Uruguay. *Agrociencia*, 9:327-335.
- Garret SD. 1970. Pathogenic root-infecting fungi. Cambridge University Press. Cambridge. 294 pp.
- Gemelli F. 2006. Residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas frescas. Intendencia Municipal de Montevideo, Comisión administradora del Mercado Modelo. Serie Trabajos técnicos. Montevideo. 25 pp.
- GEPP, V. 2003. Manejo de enfermedades en cultivos hortícolas. In: Rodríguez, A. y García, M. eds. Producción orgánica; aportes para el manejo de sistemas ecológicos en Uruguay. PREDEG/GTZ, Medios editores, Montevideo. p. 231-242.
- Gepp V, Rodríguez J, Silvera-Pérez E, Carriquiri E, Gómez A, Straconi E. 1998. Producción sustentable de hortalizas de hoja en Montevideo. Facultad de Agronomía, IMM. 34 pp.
- Gepp V, Silveira-Perez E, Rodríguez J, Gómez A. 1999. La solarización para el control de *Sclerotinia sclerotiorum*. III Congreso de Agricultura Orgánica del Uruguay y II Encuentro de Producción Orgánica del MERCOSUR, Montevideo. Pp. 23-27.
- Gepp V, Silvera E, Casanova S, Tricot D. 2001. Solarization in the management of lettuce drop (*Sclerotinia* spp.). En: Young CS, Hughes KJD (eds). Proceedings of *Sclerotinia* 2001 - The XI International *Sclerotinia* Workshop, York, England: Central Science



- Laboratory, York, England. Pp.135-136.
- Gepp V, Vero S, Cassanello ME, Romero G, Silvera E, González P, Rebellato J, Ferreira Y, Bentancur O. 2012. Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. *Agrociencia* 16:97-107.
- Giacinti MA. 2003. Visión mundial de las frutas con calidad diferenciada: Producción integrada y Orgánica. *Fruticultura Profesional* 136:7-20.
- Gilbert J, Fernando WGD. 2004. Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae*/*Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26:464-472.
- González P. 2012. Instalación de un centro de multiplicación y distribución de agentes microbianos para el control de enfermedades y plagas en horticultura. Resultados Experimentales en Sanidad de Tomate y Morrón 694:2123.
- González P, Galván G, Silvera-Pérez E, Scattolini A, Mondino P, Gepp V, González H. 1998a. Metodología de selección de resistencia a mancha de la hoja de la cebolla (*Botrytis* sp.). *Fitopatología*, 33:1: 31
- González P, Rauduvíniche L, De Aurrecochea I, Gepp V, Mondino P, Zaccari F, Cracco P. 2005. El propóleo como alternativa al control químico de enfermedades hortícolas. 11er. Congreso Nacional de Hortifruticultura y 3er. Congreso Panamericano de Promoción del Consumo de Frutas y Hortalizas. Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU). .
- González P, Silvera-Pérez E, Di Candia M, Galván G, Scattolini A, Mondino P, Gepp V, Curbelo N. 1998b. Control biológico de la mancha foliar y punta seca de la cebolla (*Allium cepa*) ocasionada por *Botrytis squamosa* en almácigo. *Fitopatología* 33:1:50.
- Höfte M, Altier N. 2010. Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Research in Microbiology* 161:464-471.
- Khan NI, Schisler DA, Boehm MJ, Slininger PJ, Bothast RJ. 2001. Selection and evaluation of microorganisms for biocontrol of *Fusarium* head blight of wheat incited by *Gibberella zeae*. *Plant Disease* 85:1253-1258.
- Khonga EB, Sutton JC. 1988. Inoculum production and survival of *Gibberella zeae* in maize and wheat residues. *Canadian Journal of Plant Pathology* 10:232-239.
- Koch, BL. 1965. Calendario de aplicación de fungicidas en montes frutales. *Almanaque del BSE 1965*. Montevideo. Pp. 139-146.
- Kosová K, Chrpová J, Sip V. 2009. Cereal resistance to *Fusarium* head blight and possibilities of its improvement through breeding. *Czech J. Genet. Plant Breeding* 45: 87-105.
- Labadie V. 2011. Optimización de las condiciones de cultivo para producción de levadura para control biológico de postcosecha de manzanas. Tesis (Maestría en Biotecnología). Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo. Uruguay.
- Labadie V, Bentancur O, Vero S. 2011. Diseño de un medio de cultivo para la producción de *Leucosporidium scottii*, levadura psicrótrofa biocontroladora de *P. expansum* en manzanas. III Taller Uruguayo de Agentes de Control Biológico. Sociedad uruguaya de Fitopatología. Piriápolis, Maldonado, Uruguay.
- Liu J, Wisniewski M, Droby S, Vero S, Tian S, Hershkovitz V. 2011. Glycine betaine improves oxidative stress tolerance and biocontrol efficacy of the antagonistic yeast *Cystofilobasidium infirmominiatum*. *International Journal of Food Microbiology* 146:76-83.
- Lupo S. 1992 Selección de cepas de *Trichoderma harzianum* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii*. Tesis de Mestría PEDECIBA-Universidad de la República.
- Lupwayi NZ, Olsen PE, Sande ES, Keyser HH, Collins MM, Singleton PW, Rice WA. 2000. Inoculant quality and its evaluation. *Field Crops Res.* 65:259-270.
- Luz WC, Stockwell CA, Bergstrom GC. 2003. Biological control of *Fusarium graminearum*. En: *Fusarium head blight of wheat and barley*. K. Leonard and W. Bushnell, eds. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN. Pp. 381-394.

- Macarisin D, Droby S, Bauchan G, Wisniewski M. 2010. Superoxide anion and hydrogen peroxide in the yeast antagonist-fruit interaction: A new role for reactive oxygen species in postharvest biocontrol? *Postharvest Biology Technology* 58:194-202.
- Machado V, Mondino P, Vidal I. 1992. Impacto sociológico del uso de agrotóxicos en la fruticultura. Caso del área de influencia de la cooperativa JUMECAL. Facultad de Agronomía. Universidad de la República Oriental del Uruguay junio 1992 Tesis de grado. 215 pp.
- Maeso D, Núñez S, Núñez S, Mieres I, Conde P, Duarte F, Bruno A. 2007. Evaluación del impacto ambiental de los plaguicidas en la Producción Hortifrutícola (Parte 2. Cultivos Hortícolas). *Revista INIA* 13:20-26.
- Martin FN, Loper JE. 1999. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: ecology, epidemiology and prospects for biological control. *Critical Review Plant Science* 18:111-181.
- McSpadden Gardener, BB. 2007. Diversity and ecology of biocontrol *Pseudomonas* spp. in agricultural systems. *Phytopathology* 97:221-226.
- 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.
- Mondino, P.; Casanova, L.; Calero, G.; Bentancur, O.; Alaniz, S. 2012. Zimevit: un biofungicida que combina la acción de una bacteria y una levadura para el control del moho gris de la vid ocasionado por *Botrytis cinerea*. *Revista Brasileira de Agroecologia*. 7:3:127-134.
- Mondino P, Vero S. 2006. Control Biológico de patógenos de plantas. Facultad de Agronomía. Montevideo. 158 pp.
- Navarro MN, Piña L. 2006. Análisis de la situación de uso de los agrotóxicos en Uruguay. Caso de estudio "la producción de tomate" Facultad de Agronomía. Montevideo. 121 pp.
- Núñez S, Maeso D. 2010. Los plaguicidas agrícolas y su potencial impacto ambiental. *Revista INIA* 22:35-40.
- Patrón G, Juncal M, González P. 2012. Proyecto: Instalación de un centro de multiplicación y distribución de agentes microbianos para el control de enfermedades y plagas en horticultura. Actividades de difusión N° 694. INIA. Canelones. Pp. 21-22.
- Pereyra SA, Dill-Macky R. 2008. Colonization of the residues of diverse plant species by *Gibberella zeae* and their contribution to *Fusarium* head blight inoculum. *Plant Disease* 92:5:800-807.
- Pereyra SA, Dill-Macky R. 2010. *Fusarium* species present in wheat and barley grains in Uruguay. En: Second International Symposium on *Fusarium* Head Blight, Vol. 2. Orlando, EEUU p. 488.
- Pereyra SA, Dill-Macky R, Sims AL. 2004. Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. *Plant Dis.* 88:724-730.
- Pereyra S, Garmendia G, Cabrera M, Vero S, Pianzolla M, Dill-Macky R. 2005. Control biológico de la Fusariosis de la espiga de trigo y cebada. *Agrociencia* 9:337-343.
- Pérez C, Arias A, Altier N. 2010. Manejo de enfermedades de implantación en leguminosas forrajeras, con especial énfasis en el uso de agentes de biocontrol. INIA. Montevideo (Uruguay). Serie Técnica 183:111-122.
- Pérez C, De La Fuente L, Arias A, Altier N. 2000. Uso de *Pseudomonas fluorescentes* nativas para el control de enfermedades de implantación en *Lotus corniculatus* L. *Agrociencia* 4:41-47.
- Perez C, Villar HA. 2011. Control biológico en cultivos extensivos. En: Serie Técnica 189. INIA Uruguay. Hemisferio Sur. Montevideo. Pp. 49-62.
- Perondi NL, Da Luz WC, Thoomas R. 1996. Controle microbiológico da giberela do trigo. *Fitopatologia Brasileira* 21:243-249.
- Pritsch C. 1995. Variabilidad patogénica en *Fusarium* spp. agente causal del golpe blanco

- del trigo. FPTA-INIA. Informe final 79 pp.
- Quagliotto L, Azziz G, Bajsa N, Vaz P, Pérez C, Ducamp F, Cadenazzi M, Altier N, Arias A. 2009. Three native *Pseudomonas fluorescens* strains tested under growth chamber and field conditions as biocontrol agents against damping-off in alfalfa. *Biological Control* 51:42-50.
- Rabendran N, Jones E, Stewart A. 1998. Isolation and *in vitro* screening of soil fungi for biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*. Proceedings of the fifty first New Zealand plant protection conference.
- Rebuffo M, Bemhaja M, Risso DF. 2006. Utilization of forage legumes in pastoral systems: state of art in Uruguay. *Lotus Newsletter* 36:22-33.
- Reis EM. 1988. Doenças do trigo III. Giberela. Segunda edição. São Paulo, Brazil. 13 pp.
- Scatoni B, Mondino P, Leoni C, Nuñez S, Buschiazzi M, Merino N, De Lucca R, Moizo A, Ferrando N, Telis V. 2004. Programa de Producción Integrada Frutícola, Directivas Zona Sur-Uruguay. Facultad de Agronomía. Montevideo. 46 pp.
- Schinca C, González MB, Vero S, Barcos J, Montealegre JR, Mondino P, Herrera R, Henríquez JL. 2011. Identification of *Penicillium* isolates causing blue mould of apples in Uruguay and Chile, and assessment of thiabendazole resistance. International Congress of Postharvest Pathology. Lleida. España.
- Schisler DA, Khan NI, Bohem MJ, Slininger PJ. 2002. Greenhouse and field evaluation of biological control of *Fusarium* head blight on durum wheat. *Plant Disease* 86:1350-1356.
- Sharma RR, Singh D, Singh R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control* 50:205-221.
- Silveira AC, Gepp V, Perez E. 2001. Aislamiento y selección de hongos antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum*. In: Anais da 7ª Reuniao de Controle Biológicos de Fitopatógenos. Bento Gonçalves, Embrapa Uva e Vinho. P. 95.
- Silveira AC, Gepp V, Perez E. 2003. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in Uruguayan vegetable crops. 8<sup>th</sup> Internacional Congress of Plant Pathology, Christchurch, Nueva Zelândia, P. 33.
- Silvera-Pérez E, González P, Mondino P, Galván G, Gepp V. 1998. Segundo año de evaluación del control biológico de la mancha foliar y punta seca de la cebolla (*Allium cepa*) ocasionada por *Botrytis squamosa* en almácigo. Resumen en *Fitopatología* 34:2:51-52.
- Stockwell CA, Luz WC, Bergstrom GC. 1997. Biocontrol of wheat scab with microbial antagonists. *Phytopathology* 87:S94.
- Stockwell CA, da Luz WC, Bergstrom GC. 2000. Identification of bioprotectants for control of *Gibberella zeae*. En: 2000 National *Fusarium* head blight Forum (proc.), Erlanger, KY. Pp. 114-117.
- Sutton JC. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can. J. Plant Pathol.* 4:195-209.
- Umpiérrez M, Garmendia G, Pereyra S, Rodríguez A, Vero S. 2011. Las técnicas moleculares en el estudio de los patógenos: ejemplos en patógenos de trigo. En: Serie Técnica 189. INIA Uruguay. Hemisferio Sur. Montevideo. Pp. 41-47.
- Usall J, Teixidó N, Abadias M, Torres R, Cañamas T, Viñas I. 2010. Improving Formulation of Biocontrol Agents Manipulating Production Process En: Prusky D, Gullino ML. (Ed) *Postharvest Pathology (Plant Pathology in the 21st Century)*, Springer Netherlands, Pp. 149-169.
- Vero S, Garmendia G, Garat MF, De Aurecochea I, Wisniewski M. 2011. *Cystofilibasidium infirmominiatum* as a biocontrol agent of postharvest diseases on apples and citrus. *Acta Horticulturae* 905:169-180.
- Vero S, Garmendia G, González MB, Bentancur O, Wisniewski M. 2013. Evaluation of Yeasts Obtained from Antarctic Soil Samples as Biocontrol Agents for the Management of



- Postharvest Diseases of Apple (*Malus x domestica*). Fems Yeast Research 13:2.189-199.
- Vero S, Garmendia G, González MB, Garat MF, Wisniewski M. 2009. *Aureobasidium pullulans* as a biocontrol agent of postharvest pathogens of apples in Uruguay. Biocontrol Science and Technology 19:1033-1049.
- Vero S, Mondino P, Burgueño J, Soubes M, Wisniewski M. 2002. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. Postharvest Biology and Technology 26:91-98.
- Villacieros M, Power B, Sánchez-Contreras M, Lloret J, Oruezabal RI, Martín M, Fernández-Piñas F, Bonilla I, Whelan C, Dowling DN, Rivilla R. 2003. Colonization behaviour of *Pseudomonas fluorescens* and *Sinorhizobium meliloti* in the alfalfa (*Medicago sativa*) rhizosphere. Plant Soil 251:47-54.
- Weller DM, Landa BB, Mavrodi OV, Schroeder KL, De La Fuente L, Blouin Bankhead S, Allende Molar R, Bonsall RF, Mavrodi DV, Thomashow LS. 2007. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. Plant Biology 9:1:4-20.
- Weller DM, McSpadden Gardener BB, Raaijmakers JM, Thomashow LS. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 40:309-48.
- Wisniewski M, Wilson C, Droby S, Chalutz E, El Ghaouth A, Stevens C. 2007. Postharvest Biocontrol: New Concepts and Applications. En: Vincent C, Goettel MS, Lazarovits G. (Ed.), Biological Control A Global Perspective. CABI, Cambridge, MA, USA, Pp. 262-273.
- Wozniak A. 2003. Caracterización de los patógenos postcosecha de citrus y perspectivas para el control biológico de los mismos. Tesis (Maestría en Biotecnología). Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo. Uruguay. 158 pp.
- Yanes ML, Fernández A, Arias A, Altier N. 2004. Método para evaluar protección contra *Pythium debaryanum* y promoción del crecimiento de alfalfa por *Pseudomonas* fluorescentes. Agrociencia 8:23-32.