

PROYECTO DE TESIS DE MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, MONTEVIDEO - URUGUAY

Tecnologías de multiplicación y formulación de cepas de *Trichoderma* para el desarrollo de un bioinsumo de uso agrícola.

Estudiante: Magdalena Olivera

Tutor: Eduardo Abreo

Tutor académico: Silvana Albores

Lugar de desarrollo: INIA, Las Brujas

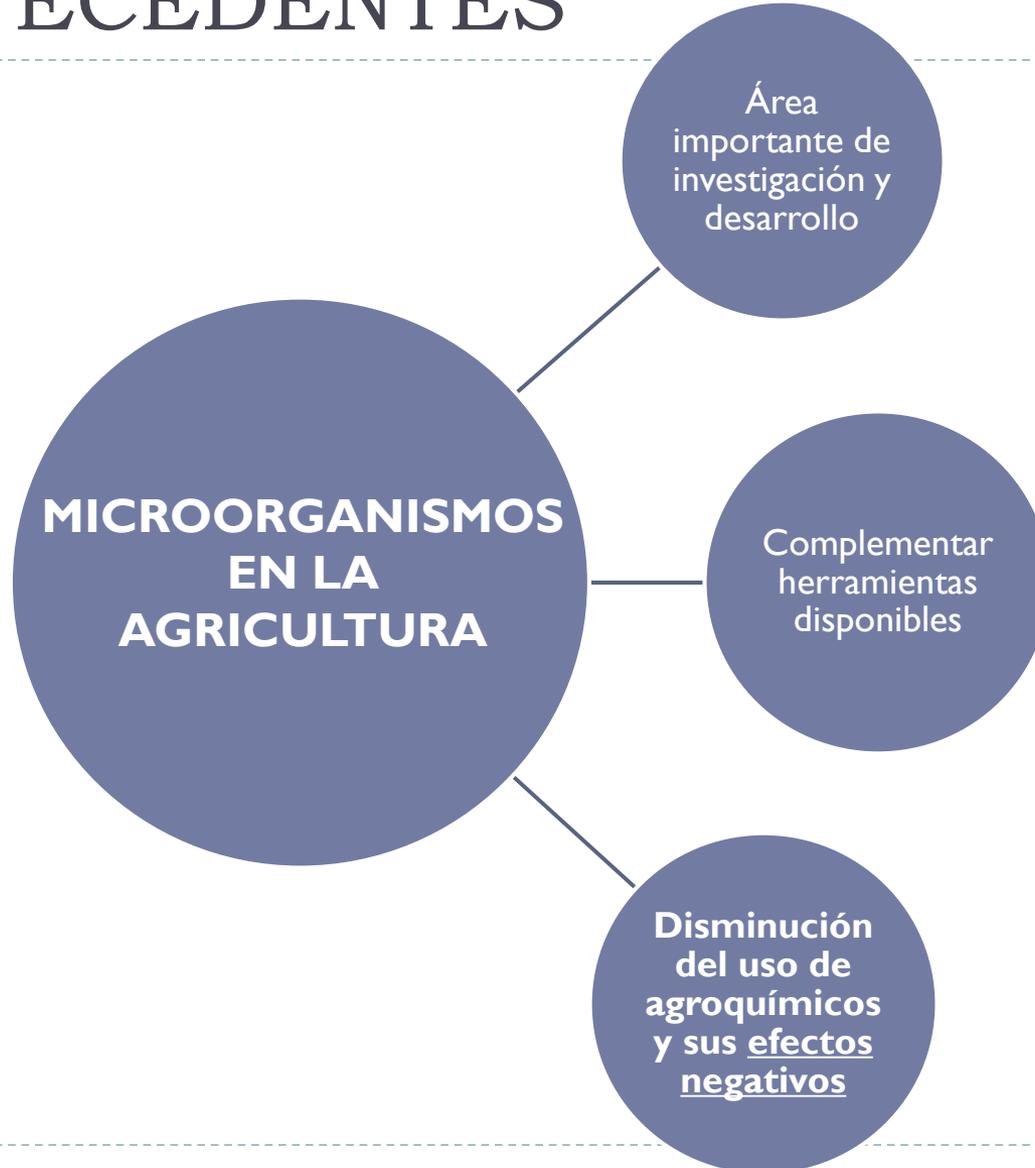
Financiación: Agencia Nacional de Investigación e Innovación, ANII.

INTRODUCCIÓN

- ▶ Proyecto enmarcado dentro de la problemática de la sustentabilidad de los cultivos extensivos de arroz y trigo.
- ▶ Enfoque tecnológico



ANTECEDENTES



- Manejo de ecosistemas productivos de forma SUSTENTABLE

Cultivos

- ▶ En Uruguay los cultivos de **arroz y trigo** son considerados de alto interés económico.
- ▶ Pueden ser gravemente afectados por la presencia de enfermedades  **hongos patógenos**

CULTIVO DE TRIGO

HONGOS
*Fusarium
graminearum*



Afecta la implantación y Fusariosis

- En el proyecto pondremos foco en el control de las enfermedades de implantación

CULTIVO DE ARROZ

HONGOS

Sclerotium oryzae

Rhizoctonia oryzae

Rhizoctonia oryzae-sativae



Enfermedades de tallo y vaina



Manchado de vaina /
Rhizoctonia oryzae



Mancha agregada /
Rhizoctonia oryzae sativa



Podredumbre de tallo /
Sclerotium oryzae

Hongos del género *Trichoderma*

- ▶ Estudiados y reconocidos por sus actividades benéficas sobre vegetales
 - Agentes de control biológico de enfermedades
 - Promotores de crecimiento
 - Mejor germinación
 - Mejora de peso seco
 - Nutrición, etc.
- ▶ A pesar de su amplio estudio y desarrollo



aún existen dificultades para la producción y comercialización de estos productos a gran escala

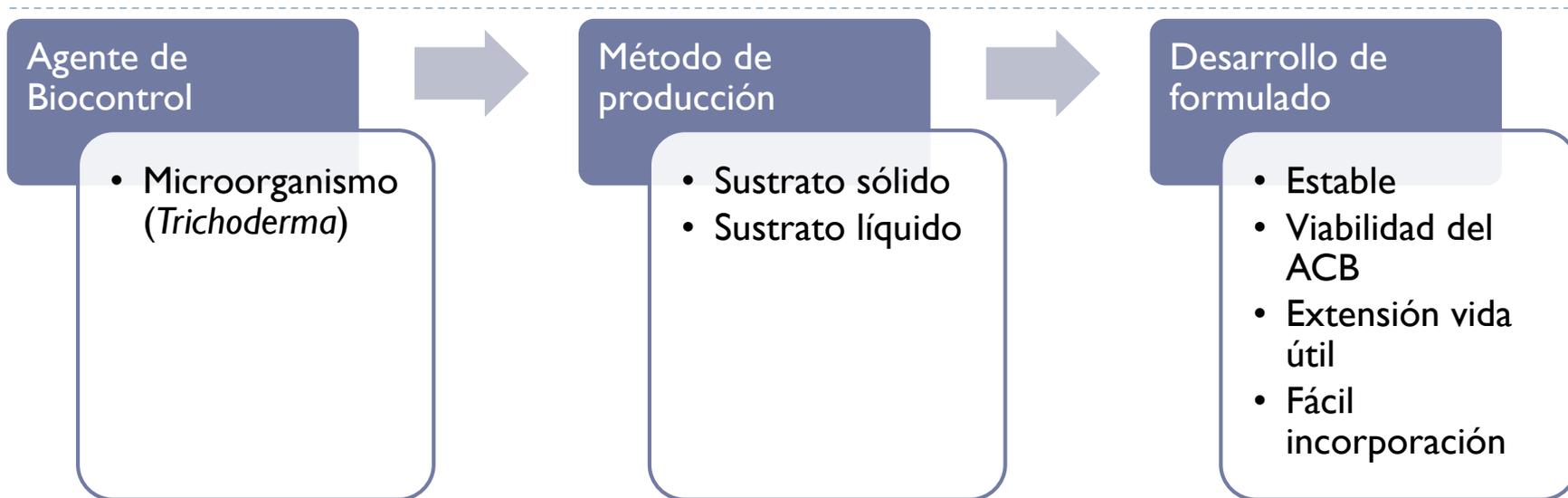
¿Por qué? →

Dificultad de
obtener
formulados
adecuados



- ✓ Viabilidad del agente de control biológico (ACB)
- ✓ Eficacia del ACB
- ✓ Aplicabilidad en campo

- Estudios enfocados en el desarrollo de microencapsulados de cepas de *Trichoderma* spp., como método de formulación novedoso y prometedor.



Herramientas basadas en la microtecnología

- Técnicas para el encapsulamiento del *Trichoderma* en diferentes matrices.

Microencapsulado

- ❑ Consiste en crear una **barrera física** que provee **protección** al ingrediente activo frente a estrés externo.
- ▶ El microorganismo resulta envuelto con una capa protectora, usualmente un biopolímero como alginato de Sodio, quitosano, almidón, agar, entre otros.
- ❑ Como resultado, el microorganismo es capaz de sobrevivir por más tiempo y mantener su actividad metabólica.
- ❑ Los métodos de microencapsulamiento pueden ser físicos (**spray drying**), químicos (polimerización) o físico-químicos (gelación iónica, método clásico).

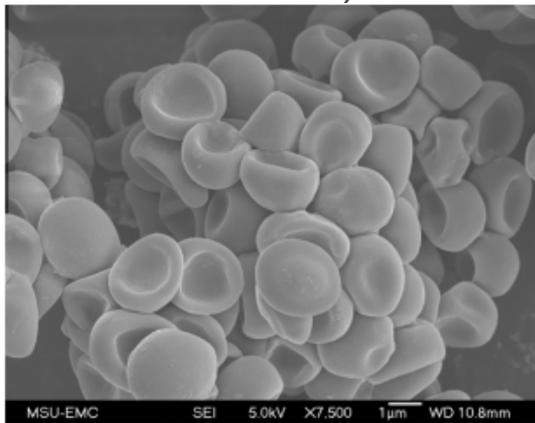


Fig. 4. Conidia of *T. harzianum* spray dried at an inlet/outlet temperature setting of 60/31 °C using a BÜCHI Mini Spray Dryer B-290 without microencapsulation of sugar.

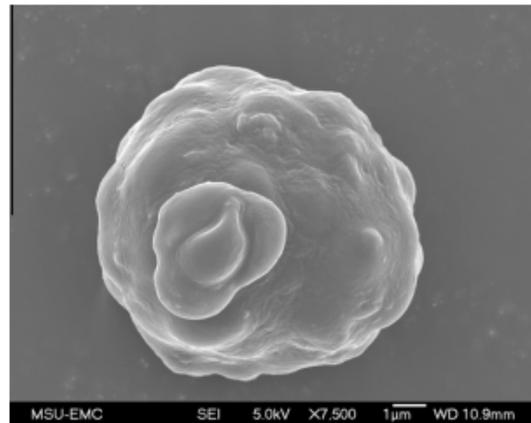


Fig. 6. Conidia of *T. harzianum* microencapsulated with 8% (w/v) sucrose solution and spray dried at an inlet/outlet temperature setting of 60/31 °C using a BÜCHI Mini Spray Dryer B-290.

Jin, X., y Custis, D. (2011)

HIPOTESIS

Es posible la producción y formulación de esporas de *Trichoderma* para el desarrollo de un producto biológico de aplicación comercial, utilizando microtecnologías que aseguren viabilidad del agente activo, extensión de vida útil, y facilidad de incorporación a prácticas agrarias, manteniendo las funciones por la cual la cepa fue seleccionada.

OBJETIVOS

Objetivos generales

- Desarrollar una microtecnología a partir de cepas locales de *Trichoderma*, seleccionadas por su capacidad para el control biológico y/o la promoción del desarrollo vegetal
- Validar su aplicación en planta en invernáculo

Resultados esperados

- Obtener al menos un microencapsulado de *Trichoderma*, que pueda ser usado para maximizar su efecto positivo sobre las plantas, ya sea a través de un mejor control biológico de las enfermedades o promoción del crecimiento de los cultivos de trigo y arroz

Objetivos específicos

Evaluar la capacidad de multiplicación masiva de aislamientos preseleccionados de *Trichoderma* spp.

Evaluar la compatibilidad de los aislamientos con los polímeros comúnmente utilizados para el microencapsulado de microorganismos

Desarrollar el proceso de encapsulamiento adecuado para el secado y encapsulado de los propágulos

Lograr la identificación y tipificación molecular de las cepas que permita su seguimiento a través de los procesos de producción y aplicación en campo

Verificar mediante ensayos en planta la actividad de las cepas y de los formulados obtenidos

METODOLOGÍA

PUNTO DE PARTIDA

- ▶ TRIGO
- ▶ Semillas cultivar La Estanzuela 2433

Código de cepa	Identificación	Observación
TME	<i>Trichoderma atroviride</i>	Aisladas de trigo, evaluadas y seleccionadas por su eficiencia en el control biológico de <i>Fusarium</i> [S.Vero / F. Química].
TIC	<i>T. koningiopsis</i>	
Control comercial	-	Producto comercial
F.g.09.005	<i>F. graminearum</i>	Cepas patógenas del trigo. [S.Vero, F. Química y S. Pereyra, INIA-La Estanzuela].
F.02.020	<i>F. graminearum</i>	

- ▶ ARROZ
- ▶ 12 cepas, 9 aisladas como endófitas o de suelos de cultivos de arroz [S. Martínez y S. Lupo, INIA / F. Ciencias], 3 cepas de uso comercial.
- ▶ Semillas cultivar INIA Tacuarí, sensibilidad intermedia a SCL y ROS

Código cepa	Identificación	Observación
ILB 425	<i>Sclerotium oryzae</i>	[S. Martínez y S. Lupo, INIA / F. Ciencias]
ILB 427	<i>Rhizoctonia oryzae sativa</i>	

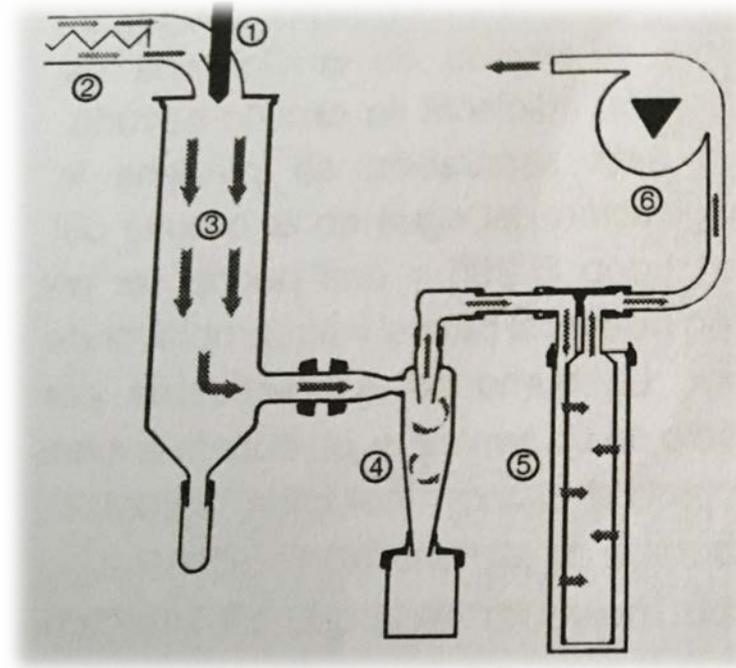
Plan de trabajo

1. Ensayos para establecer línea base
 - de las cepas de *Trichoderma* de **trigo** en lo que refiere a su actividad como **promotoras de crecimiento** y de **protección de la semilla**.
 - de las provenientes de **arroz**, línea base como **controlador biológico** y como **promotoras de crecimiento**.
2. Evaluar la capacidad de todas las cepas de producir propágulos en **medio sólido**
 - Cantidad de esporas producidas y % de esporas germinables como indicador de viabilidad.
3. Finalmente, la producción de microencapsulados será realizada con aquellas cepas que hayan resultado seleccionadas tanto por su actividad benéfica como por su aptitud para ser multiplicadas.

FORMULACIÓN

SPRAY DRYER

- ▶ La suspensión de agente encapsulante y esporas es atomizada y deshidratada, formándose en simultáneo la cápsula protectora en torno a las esporas



1. Tobera, para la dispersión de la solución en gotas finas.
2. Calefacción eléctrica del desecante.
3. Cilindro de pulverización para secar las gotitas a partículas sólidas.
4. Separación de las partículas en el ciclón.
5. Filtro para limpiar el aire de las partículas finas.
6. Aspirador para la producción de corriente.

FORMULACIÓN

- Se evalúa:
 - Compatibilidad esporas-agente encapsulante
 - Eficiencia del proceso (esporas efectivamente encapsuladas)
 - Viabilidad de las esporas encapsuladas, al momento de su producción y durante su conservación a distintas temperaturas durante 12 meses.



Spray Dryer

ENSAYOS DE INVERNÁCULO CON FORMULADOS

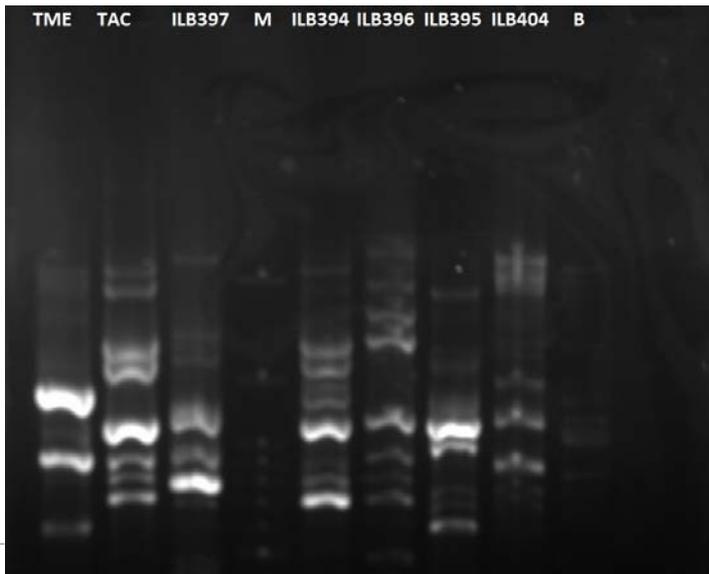
- Se evalúa la promoción del crecimiento y el control biológico en bioensayos en plantas en invernáculo

Desafío: verificar que se mantenga la función luego del proceso de deshidratación y encapsulado

- ▶ Se realiza siguiendo la misma metodología que para la evaluación de control biológico de cepas inicial.

TIPIFICACIÓN DE CEPAS

- Técnicas moleculares para la identificación de cepas de trabajo
 - Extracción de ADN genómico (Kit Qiagen Plant and Tissue)
 - En casos de dudas sobre la especie de un aislamiento, el ADN será usado como molde para amplificar hasta 4 genes mediante PCR (ITS, FE, RPB2, cal I)
 - Productos de PCR se secuencian y se usan para identificar las especies mediante comparación con secuencias de cepas de referencia.
- ADN genómico, se usa para genotipar las cepas mediante UP-PCR
 - Permite separar cepas de una misma especie de *Trichoderma*, para su seguimiento
 - Primer L-45 [Lubeck, M. et al. 1999]



Perfil de UP-PCR de cepas de *Trichoderma*

Cepa	Especie
TME	<i>T. atroviride</i>
TAC	<i>T. koningiopsis</i>
ILB 397	<i>T. asperellum</i>
ILB 394	<i>T. koningiopsis</i>
ILB 396	<i>T. koningiopsis</i>
<u>ILB395</u>	<i>T. harzianum</i>
<u>ILB404</u>	<i>T. harzianum</i>

GRACIAS !

Magdalena Olivera Alegre
Contacto: maguioli315@gmail.com

