

HONGOS CELULOLITICOS ASOCIADOS AL RASTROJO DE TRIGO Y SU RELACION CON ALGUNAS VARIABLES AMBIENTALES.

Cellulolytic fungi associated to Stubble of wheat and its relationship with some environmental variables

Alicia G. Luque¹, Rosanna N. Pioli², Raúl Sianca¹, Oscar Sachi².

¹CEREMIC. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531 (2000) Rosario (Argentina). ²Cátedras de Fitopatología y Climatología. Facultad de Ciencias Agrarias. U.N.R. C.C.14 (2123) Zavalla.

Palabras clave: Hongos celulolíticos, rastrojo de trigo, variables ambientales, Argentina.

Key words: Cellulolytic fungi, stubble of wheat, environmental variables, Argentina.

RESUMEN

Se cuantificó e identificó la población de hongos celulolíticos, asociados al rastrojo de trigo, relacionándolos con algunas variables ambientales.

En parcelas bajo siembra directa del grano, incluidas en un diseño en bloques aleatorizados con tres repeticiones, los restos de cosecha de trigo obtenidos de 1 m² se cortaron y distribuyeron en bolsas de malla.

Mensualmente se procedió a determinar la pérdida de peso del rastrojo y a registrar las variables agroclimáticas. Se cuantificó e identificó la población fúngica celulolítica por el método de dilución en placas en medio selectivo. Por análisis de regresión múltiple, se examinó la relación entre las variables ambientales y el peso del rastrojo con la micota celulolítica ($r^2 = 0,95$).

Por análisis stepwise, la temperatura edáfica, la variación de la humedad relativa y las precipitaciones fueron las variables más explicativas.

Los hongos celulolíticos más aislados fueron especies de *Penicillium* y *Fusarium*. En este último género se destaca la presencia de *F. solani* y *F. graminearum*, potenciales patógenos de cultivos vegetales.

INTRODUCCION

La agricultura sustentable propone reducir el laboreo del suelo y conservar en superficie los residuos de cosecha para minimizar los riesgos de erosión y mantener las propiedades físicas y químicas del suelo. El aporte de

SUMMARY

The aim of this work was to study and to identify the population fluctuation of cellulolytic fungi associated to stubble of wheat in no tillage, and their relation with environmental variables.

In the no tillage plots included in the design of aleatoric blocks with three replicates, the residues obtained in 1 m² were fractionated and placed in mesh bags. Loss of stubble weight was determined through monthly samplings and agroclimatic variables were registered. For isolation and identification of cellulolytic fungi, dilution in plates with selective media was used.

The relationship between environmental variables, weight of residues and fungal population was examined by multiple regression analysis ($r^2 = 0,95$). Soil temperature, variation of relative humidity and precipitation explained population fluctuations. A stepwise analysis revealed that the edaphic temperature, the variation in relative humidity and precipitations were the most explanatory variables.

With respect to cellulolytic fungi, the most frequent isolation corresponded to *Penicillium* spp. and *Fusarium* spp. *Fusarium solani* (potential pathogens of soybean) and *F. graminearum* (potential pathogens of wheat and corn) were isolated.

rastrojos de cultivos agrícolas, posee grandes ventajas en la retención de agua, mejoramiento de la estructura edáfica (10), además su forma de adición puede afectar la dinámica de la materia orgánica y los nutrientes (16). Tales razones, promovieron en nuestro país (Argentina), el incremento

del área cultivada bajo siembra directa, pasando de 6000 há en la campaña 1986/87 a 2400000 há en 1994/95 (1).

La retención superficial de los restos de cosecha modifica además las características morfológicas y fisiológicas de los cultivos y la actividad biológica del suelo, tanto en la presencia y comportamiento de las poblaciones degradadoras del rastrojo, como en su capacidad micoparasítica (5, 6). Los microorganismos del suelo cumplen un rol fundamental tanto en la degradación enzimática de sustancias orgánicas complejas, provenientes de restos vegetales y animales, a nutrientes, como en su reciclado a partir de la fracción mineral del suelo. El número y la actividad de tales microorganismos dependen de diversos factores, entre ellos, el desarrollo del cultivo (especie, cobertura, penetración de raíces, tipo de residuo, etc.), el tipo y manejo de suelo y el macro y microclima del lugar (20).

Los principales componentes de la paja son celulosa y hemicelulosa, que constituyen del 77 - 80% de su peso seco (11). La velocidad de degradación de los residuos depende de su composición química y de las condiciones de temperatura, oxígeno, humedad, pH, nutrientes inorgánicos del ambiente que lo rodea y tipo de microorganismo. La edad de la planta, la relación C/N del residuo y su grado de desintegración también influyen en el proceso de descomposición (2). Los hongos celulolíticos constituyen uno de los principales grupos de organismos involucrados en la degradación de la paja (10), por lo cual, es importante conocer las tasas de descomposición de los residuos para planificar el uso adecuado de los mismos (19).

Nuestros objetivos fueron: cuantificar e identificar la población de hongos celulolíticos, a nivel genérico principalmente, asociada al rastrojo de trigo bajo un sistema de siembra directa y su relación con algunas variables agroclimáticas.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó un ensayo de manejo de tierras ubicado en localidad de Zavalla, 33° latitud sur (Provincia de Santa Fe, Argentina), sobre un suelo Argiudol vértico, serie Roldán (pH=6,1, materia orgánica=2,5%, nitrógeno=0,9%). Los cultivos se iniciaron en julio de 1993, con un diseño en bloques completamente aleatorios y tres repeticiones, con una rotación de cultivos maíz, trigo-soja, soja (secuencia de cuatro cultivos en tres años: 1-maíz, 2-trigo y soja sobre trigo, 3-soja). En las tres parcelas bajo siembra directa, los restos de cosecha del trigo (diciembre de 1993), disponibles en un m², se cortaron en secciones de 10 cm, de longitud y fueron distribuidos en bolsas de malla plástica con poros de 1mm². En el mes de marzo de 1994, el material retornó a la superficie unitaria, fijada en cada una de las tres parcelas, en 5 bolsas cuya superficie total simuló la

cobertura original del rastrojo.

Para determinar la pérdida de peso del residuo se destinaron cuatro bolsas que cubrieron 0,60 m², y la restante se utilizó para determinaciones microbianas (15). El peso de la paja de trigo disponible en las bolsas, fue registrado mediante muestreos mensuales efectuados en los últimos días de cada mes, y a partir de octubre de 1994 a mayo de 1995, se cuantificó la población fúngica celulolítica asociada mediante la técnica de dilución en placas (22).

Durante el mes de febrero de 1995 por factores climáticos fue imposible recoger las muestras en las fechas previstas, por lo cual los meses de febrero y marzo se consideraron consolidados.

Diez gramos de rastrojo se diluyeron en agua al 10%, con la adición de tween 80 y se homogeneizaron en agitador a 120 revoluciones por minuto, durante 30 minutos. Alícuotas de 1ml, obtenidas a partir de las diluciones 10⁻³ y 10⁻⁴, fueron sembradas por duplicado en 10 ml de medio selectivo para el aislamiento de hongos celulolíticos (8), modificado (3), adicionado con 0,1 ml, de Rosa de Bengala (1:150) y 0,1 ml de cloranfenicol (50 µg/ml). Las placas se incubaron durante 7 días a 28°C, posteriormente se realizó el recuento de las colonias y los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias (U.F.C) por gramo de rastrojo seco. Las cepas fúngicas aisladas con mayor frecuencia, en relación al número total de placas sembradas, se identificaron de acuerdo a sus características macro y micromorfológicas (4, 7, 17).

Las variables climáticas registradas fueron: las medias de temperatura ambiente (medida con termómetro de bulbo seco de mercurio) y edáfica (medida con geotermómetros de mercurio), humedad relativa ambiente (a partir de las temperaturas de los termómetros de bulbo seco y de bulbo húmedo ubicados dentro del abrigo meteorológico, por psicrométrico) y precipitaciones acumuladas en los intervalos de muestreo (medidas con pluviómetro tipo B: boca receptora de 16 cm de diámetro). La frecuencia de los registros fue la siguiente: la temperatura ambiente se registró cada hora obteniéndose como temperatura media el promedio de las 24 observaciones diarias; la temperatura edáfica se obtuvo como un promedio de las temperaturas registradas a las 8, 14 y 20 horas meridianas; la humedad relativa se midió a las 8, 14 y 20 horas / día y las precipitaciones a las 8 horas / día, correspondiendo la precipitación diaria, cada 24 horas a partir de las 8AM. A su vez, el valor medio de cada muestreo es el promedio de todas las observaciones realizadas en los días del intervalo previo.

Para analizar las variaciones de la población celulolítica fúngica a través del tiempo, se realizó un ANOVA (con variable transformada $y = \sqrt{x}$) a dos criterios de clasificación: las parcelas y el tiempo.

Para examinar la relación entre los factores ambientales y peso del rastrojo con la población celulolítica,

se realizó un análisis de regresión múltiple en el que se incluyeron los datos registrados en todos los muestreos considerados; este estudio se complementó con un análisis de Stepwise para seleccionar las variables más explicativas de la fluctuación de estos microorganismos.

RESULTADOS

El resultado del ANOVA presenta una diferencia estadísticamente significativa en las poblaciones fúngicas celulolíticas a través del tiempo ($p < 0.001$) y entre las tres parcelas consideradas ($p < 0.01$). A su vez por test LSD de comparaciones múltiples, encontramos que el mayor recuento se produce en el mes de enero y los menores en abril y mayo (Tabla 1).

Tabla 1.- Prueba de comparaciones múltiples por método LSD.

Tiempo	Medias(UFC/g)*	Grupos homogéneos
Abril 95	436176.63	a
Mayo 95	487972.10	a
Noviembre 94	587302.59	a b
Feb.- Marzo 95	612869.78	a b
Diciembre 94	803933.34	b
Octubre 94	821932.67	b
Enero 95	11633751.83	c

* Medias seguidas de igual letra, no registran diferencias significativas con $\alpha = 0.05$. (Los valores de UFC/g para los periodos de Noviembre y Febrero - Marzo, no difieren significativamente de los obtenidos para los meses de Abril y Mayo ni de los observados en Diciembre y Octubre.

Tabla 2.- Datos de las variables climáticas y peso del rastrojo

Meses	Temp. Media Suelo (°C)	Humedad relativa (%)	Precipit. (mm)	Peso de rastrojo (gr.)
Oct.94	18.6	76	69.6	27.52
Nov.94	21.6	74	99.8	25.14
Die.94	25.6	75	130.8	23.34
Ene.95	25.9	82	197.3	22.10
Fb-Mz.95	24.4	83	207.1	20.62
Abr.95	19.8	84	109.4	18.39
May.95	15.7	83	11.3	16.64

Tabla 3.- Hongos celulolíticos más frecuentes en cada período de muestreo

Tiempo	Hongos aislados
Octubre	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Rhizopus spp.</i> <i>Penicillium spp.</i>
Noviembre	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Penicillium spp.</i> <i>Trichoderma koningii</i>
Diciembre	<i>Fusarium spp.</i> <i>Penicillium spp.</i>
Enero	<i>Penicillium spp.</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Scopulariopsis spp.</i>
Feb.Mzo	<i>Penicillium spp.</i> <i>Micelio estéril</i>
Abril	<i>Penicillium spp.</i> <i>Fusarium verticillioides</i>
Mayo	<i>Penicillium spp.</i> <i>Fusarium subglutinans</i>

Desde marzo hasta septiembre de 1994 la pérdida de peso del rastrojo fue del 38.8.% y durante el periodo en estudio, desde octubre de 1994 hasta mayo de 1995, el peso del rastrojo disminuyó en un 39.53.%. En la Tabla 2 se presentan los valores observados de las variables agroclimáticas y peso del rastrojo durante dicho periodo.

En el análisis de regresión múltiple, el modelo más adecuado fue conformado por la población celulolítica (U.F.C./ gr de rastrojo seco) como variable dependiente y las siguientes variables independientes: peso del rastrojo, temperatura del suelo en superficie, variación de la temperatura (expresado como el cambio de temperatura entre dos muestreos consecutivos), humedad relativa ambiente, variación de la humedad relativa ambiente (cambio porcentual de la humedad entre el muestreo anterior y el actual) y las precipitaciones ($r^2 = 0.949$). Como consecuencia de la diferencia encontrada entre las parcelas, se realizó un análisis de regresión múltiple para cada una de ellas, y se obtuvieron resultados similares para las tres parcelas estudiadas.

Por análisis stepwise de la regresión múltiple se seleccionaron las variables más explicativas del fenómeno biológico en estudio: temperatura, variación de la hume-

dad y precipitaciones ($r^2 = 0,85$).

Se estudiaron un total de 36 cepas fúngicas y en la Tabla 3 se presentan las especies de hongos celulolíticos más frecuentes para cada muestreo. Durante el periodo considerado, *Penicillium* spp. estuvo presente en el 100% de los muestreos y *Fusarium* spp. en un 86 %.

DISCUSION

En las condiciones del ensayo, encontramos que la variabilidad temporal de la población de hongos celulolíticos se pudo explicar, en gran medida, a través de factores ambientales como son la temperatura, la humedad y sus cambios. Es de destacar que el modelo de regresión múltiple tuvo un mayor ajuste con la temperatura edáfica que con la temperatura ambiental.

En nuestra experiencia encontramos máximos niveles de población celulolítica en el mes de enero, cuando se registró la mayor temperatura media del suelo (25,9° C), precipitaciones de 197,3 mm y humedad relativa ambiente de 82%.

La temperatura afecta tanto la velocidad de las reacciones fisiológicas de las células como las características físicoquímicas del ambiente (14). Por lo tanto, un cambio en la temperatura altera la composición de especies de la microbiota activa y a su vez tiene una influencia directa sobre cada organismo dentro de la comunidad (2). La humedad también es un factor fundamental en la actividad microbiana, pero cuando sus niveles son muy elevados puede inhibirla indirectamente al disminuir el movimiento del aire y reducir, por lo tanto, el oxígeno disponible para la respiración.

En aislamientos de paja inoculada con suelo, Harper & Linch (11) presentaron como hongos dominantes a los géneros: *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* y *Trichoderma*. En nuestra experiencia también encontramos que *Fusarium* y *Penicillium*, estuvieron presentes prácticamente en todos los muestreos, estos géneros tienen gran

abundancia en suelos cultivables y son importantes en la ecología de esos habitat, ya que su recuento viable se utiliza como indicador directo de la actividad microbiana e indirecto del material orgánico disponible (9).

Con respecto a *Fusarium* Jeschke et al. (12), encontraron una estrecha relación entre este género y los restos vegetales, con mayor diversidad de especies en los residuos que en el suelo. Evidentemente, estos hongos cumplen un importante rol en la descomposición del sustrato (12). Las especies de *Fusarium*, aisladas en el rastrojo de trigo, variaron de un mes a otro durante todo el período estudiado, siendo más frecuentes las especies incluidas en el grupo de *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme*) (7). La presencia de *Fusarium solani* y de *Fusarium graminearum* evaluados en un sistema de rotación maíz, trigo-soja, soja, indicaría que los residuos podrían actuar como potencial fuente de inóculo para los cultivos sucesivos, ya que *F. solani* está citado como patógeno de soja (18) y *F. graminearum* como patógeno de maíz (21) y trigo (23).

Trichoderma, uno de los hongos más activos en la celulólisis, fue aislado en una sola oportunidad. Si bien dentro de este género se encuentran especies muy exitosas, en cuanto a su capacidad para actuar como agentes de biocontrol de hongos patógenos, este rol puede atribuirse a las especies de *Penicillium*, que también tiene habilidades antagonicas con otros microorganismos a través de un mecanismo directo (antibiosis) o indirecto (competición por el sustrato) (9).

La descomposición de los residuos o restos de cosecha en el suelo, realizada por un conjunto de poblaciones microbianas, constituye una transformación compleja con múltiples interacciones que influyen sobre sus estructuras poblacionales. Por ello, para comprender mejor estos procesos habría que determinar la actividad celulolítica de las cepas aisladas y posteriormente estudiar las interacciones posibles entre ellas, para clarificar el rol de estos microorganismos en el ambiente edáfico.

REFERENCIAS

- 1.-Apresid, A. (1995). Gacetilla Informativa. Año 6. Set.-Oct. pp. 1-2
- 2.-Alexander, M. (1977). Introduction to soil microbiology. John Wiley and Sons. London. pp. 128-162
- 3.-Alvarez, D.P.; Luque, A.G.; Alvarez, J.; Papa, J.C.; Gamberale, M.E. (1991). Aislamiento de la micota total, celulolítica y queratinolítica de suelos cultivables, con abonos verdes y fertilizantes. Ciencia del Suelo. 9:63-67
- 4.-Booth, C. (1971). The genus *Fusarium*. Commonwealth Micrological Institute, Kew, England.
- 5.-Chae Gun Phae; Shoda, M. & Kubota, H. (1990). Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms. Journ. Ferment. And Bioengineering 69:1-7
- 6.-Deacon, J.W. & Lorraine, A.B. (1993). Biocontrol of soil borne plant pathogens: Concepts and their application. Pestie. Sci. 37: 417-426
- 7.-Domsch, K.H.; Gams, W. & Anderson, T.H. (1980). Compendium of soil fungi. Vol. 1. Academic Press. London.
- 8.-Eggin, H.Q.W. & Pugh, G.F. (1962). Isolation of cellulose-decomposing fungi from the soil. Nature 193:94-95

- 9.-Elmholt, S. (1996). Microbial activity, fungal abundance, and distribution of *Penicillium* and *Fusarium* as bioindicators of a temporal development of organically cultivated soils. *Biological Agriculture and Horticulture*. 13:123-140
- 10.-Halsall, D.M. (1993). Inoculation of wheat straw to enhance lignocellulose breakdown and associated nitrogenase activity. *Soil Biol. Biochem.* 25:419-429
- 11.-Harper, S.H.T. & Lynch, J.M.L. (1985). Colonization and decomposition of straw by fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 85:655-661
- 12 - Jeschke, N.; Nelson, P. E. & Marasas, W. F. O. (1990). *Fusarium* species isolated from soil samples collected at different altitudes in the Transkei, Southern Africa. *Mycologia*. 82:727-733
- 13.-McGill, W.B.; Cannon, K.R.; Robertson, J.A.; Cook, F.D. (1986). Dynamics of soil microbial biomass and water-soluble organic C in breton after 50 years of cropping to two rotations. *Can. J. Soil Sci.* 66:1-19
- 14.-Paul, E.A. & Clark, F.E.(1989). *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. Inc. San Diego. California
- 15.-Pioji, R.N.; Montico, S.; Toresani, S.; Gomez, E.; Bisaro, V. (1994). Estudio de la relación entre sobrevivencia de hongos patógenos, la degradación del rastrojo de trigo y la actividad celulolítica. III Congreso Nacional de Trigo. pp.225-226
- 16.-Power, J. E.; Doran, J. W. & Wilhel, W. W. (1986) . Uptake of nitrogen from soil , fertilizer, and crop residues by no till corn and soybean. *Soil Sci. Soc. Am.J.* 50:137-142
- 17.-Rifai, M.A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol Papers* 116:1-56
- 18.-Roy, K.W.; Rupe, J.C.; Hershman, D.E.; Abney, T.S. (1997). Sudden death syndrome of soybean. *Plant Dis* 81:1100-1111
- 19.-Sánchez, S.R.; Studdert, G.A. & Echeverría, H.E. (1996). Descomposición de residuos de cosecha en un Argiudol típico. *Ciencia del Suelo* 14:63-68
- 20.-Schinner, F.; Ohlinger, R.; Kandeler, E.; Margesin, R. (1996). *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York, pp. 3-5
- 21.-Shurtleff, M. C. (1980). *Compendio de enfermedades del maíz*. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires
- 22.-Warcup, J.H. (1950). The soil plate method for isolation of fungi from soil. *Nature* 150:166-167
- 23.-Wiese, M.V. (1986). *Compendio de enfermedades de trigo*. American Phytopathological Society (A.P.S.) Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires