



## Fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum*: su supervivencia en el suelo

Stocco, Marina<sup>1</sup>; Gladys Lampugnani<sup>3,4</sup>; Soledad Zuluaga<sup>3</sup>; Cecilia Abramoff<sup>3</sup>; Cristina Cordo<sup>1,2</sup>; Cecilia Mónaco<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales Universidad Nacional de La Plata. Calle 60 y 119 S/N CC. 31(1900) La Plata. Buenos Aires. Argentina;

<sup>2</sup>Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires. (CICBA); <sup>3</sup>Centro de Investigaciones en Protección Vegetal (CISAV), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, La Plata. Buenos Aires. Argentina; <sup>4</sup>galampugnani@gmail.com

Stocco, Marina; Gladys Lampugnani; Soledad Zuluaga; Cecilia Abramoff; Cristina Cordo; Cecilia Mónaco (2019) Fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum*: su supervivencia en el suelo. Rev. Fac. Agron. Vol 118 (2): 1-5. <https://doi.org/10.24215/16699513e020>

Una alternativa al uso indiscriminado de fitosanitarios es la incorporación de microorganismos antagonistas competitivos para la protección de los cultivos de los patógenos habitantes del suelo. En este trabajo se evaluó la potencialidad del establecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai (cepa Th5cc) en el suelo bajo diferentes formulaciones, con el objeto de conocer cuál es la más efectiva en mantener la población del antagonista a niveles moderados. La población se cuantificó mediante la técnica del suelo diluido en placa utilizando un medio selectivo para *Trichoderma*. Los resultados muestran que tanto en el formulado líquido como en las semillas recubiertas aumenta la población de Th5cc hasta los 90 días desde que se incorporó el formulado al suelo (1,4 x 10<sup>4</sup> unidades formadoras de colonia/g de suelo). En contraste, con la aplicación de formulado sólido la población del antagonista comienza a disminuir a los 90 días. En el caso de la incorporación en la semilla, la población de *T. harzianum* al inicio fue menor a la del testigo, pero a los 60 y 90 días alcanzaron valores mayores a la población original del suelo (testigo). La eficiencia de la aplicación de *T. harzianum* como antagonista en plantas está estrechamente relacionada con su formulación, la cual tiene una clara influencia en la supervivencia en el suelo.

**Palabras clave:** supervivencia, bioinsumo, antagonista, control biológico

Stocco, Marina; Gladys Lampugnani; Soledad Zuluaga; Cecilia Abramoff; Cristina Cordo; Cecilia Mónaco (2019) Biological fungicide based on a strain of the fungus *Trichoderma harzianum*: its survival in the soil. Rev. Fac. Agron. Vol 118 (2): 1-5. <https://doi.org/10.24215/16699513e020>

An alternative to the indiscriminate use of phytosanitary products is the incorporation of competing antagonistic microorganisms for the protection of the crops of soil-borne pathogens. In this work the potentiality of the establishment of *Trichoderma harzianum* Rifai (strain Th5cc) in the soil under different formulations was evaluated, in order to know which is the most effective in maintaining the population of the antagonist at moderate levels. The population was quantified using the soil dilution plate technique with a selective medium for *Trichoderma*. The results show that both the liquid formulation and the coated seeds increase the Th5cc population until 90 days after the formula was incorporated into the soil (1.4 x 10<sup>4</sup> colony forming units / g of soil). In contrast, with the application of solid formula, the population of the antagonist begins to decrease after 90 days. In the case of incorporation in the seed, the population of *T. harzianum* at the beginning was lower than that of the control, but at 60 and 90 days they reached higher values than the original soil population (control). The efficiency of the application of *T. harzianum* as an antagonist in plants is closely related to its formulation, which clearly influences survival in the soil.

**Keywords:** survival, biological input, antagonist, biological control

<https://revistas.unlp.edu.ar/revagro>

Recibido: 03/12/2018

Aceptado: 04/03/2019

Disponible on line: 27/12/2019

ISSN 0041-8676 - ISSN (on line) 1669-9513, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina



## INTRODUCCIÓN

El uso inadecuado e indiscriminado de fitosanitarios, ha generado problemas de contaminación ambiental y resistencia de los patógenos a los fungicidas. Esto ha motivado la búsqueda de alternativas amigables con el ambiente para controlar las enfermedades de las plantas. Una alternativa eficiente y no contaminante es el uso de microorganismos antagónicos competitivos para la protección de los cultivos de patógenos fúngicos del suelo. En particular, el uso de especies del género *Trichoderma* ha merecido una gran atención como agente de biocontrol (Stefanova, 2000).

Los hongos del género *Trichoderma* se pueden encontrar en diferentes ecosistemas, incluso están presentes en los suelos de uso agrícola y tienen la capacidad de reducir la incidencia y la severidad de las enfermedades de las plantas al inhibir los fitopatógenos, a través de su alto potencial antagónico (Hermosa et al., 2012). El antagonismo se basa en diferentes mecanismos, como la producción de metabolitos antifúngicos, la competencia por espacio y nutrientes, la inducción de la resistencia y el micoparasitismo (Benítez et al., 2004). Howell (2003) observó que el control biológico puede ser la culminación de varios mecanismos diferentes que trabajan sinérgicamente para lograr el control de la enfermedad. Además, algunas especies de este género poseen capacidad de bioestimulación de crecimiento en algunos cultivos (Howell, 2003).

Experiencias en la evaluación de la efectividad del *Trichoderma harzianum* Rifai para el control de enfermedades fúngicas desarrollados en sistemas agrícolas en nuestro país, mostraron que la cepa Th5cc de *T. harzianum*, causó una disminución del 20% en la severidad y 95% de la cobertura picnidial de la mancha de la hoja en trigo causada por *Zymoseptoria tritici* (Cordo et al., 2007). Asimismo, estos autores, demostraron que la actividad proteolítica antifúngica, medida 12 días después de la siembra, aumenta en plantas cultivadas a partir de semillas recubiertas con este antagonista e inoculadas con *Z. tritici*, este aumento confiere resistencia a los cultivares susceptible. En estudios posteriores, la cepa Th5cc estimuló en plantas de trigo un aumento en el rendimiento de 432,28 Kg/m<sup>2</sup> con respecto al rendimiento de las mismas plantas sin tratar, cuando fueron inoculadas artificialmente con *Z. tritici* (Mónaco et al., 2014).

Sin embargo, a pesar del éxito relativo, todavía no ha sido posible alcanzar los niveles deseados en el control de enfermedades, debido en parte a que se conoce muy poco acerca del establecimiento, proliferación y supervivencia de este antagonista en sustratos naturales.

El desarrollo de formulados eficaces adquiere una gran importancia en el campo del control biológico ya que puede afectar profundamente al rendimiento del antagonista. Uno de los mayores obstáculos para el uso y la comercialización de agentes de control biológico reside en que el desarrollo de los productos estén formulados adecuadamente. Esto implica que contenga una cantidad suficiente de inóculo y que la calidad de éste se mantenga durante el tiempo de almacenamiento. Por otra parte, debe ser de fácil

aplicación, que muestre una alta persistencia en el medio en el que se va a dispersar, y que su producción sea económicamente rentable (Fravel, 2005). Los mayores desafíos para el uso eficiente de microorganismos como agentes de control biológico son el mantenimiento de una alta densidad de inóculo una vez que se ha aplicado en el suelo o sustrato y evaluar como varía la población inicial en el tiempo. Por lo expuesto el objetivo del presente trabajo fue evaluar: a) la supervivencia del hongo en el suelo, comparando tres métodos de incorporación del antagonista en el agroecosistema; como polvo mojable, como formulación líquida y como recubrimiento de la semilla y b) establecer el método más eficaz para incorporar *T. harzianum* al suelo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepa de *Trichoderma harzianum*

La cepa de *Trichoderma harzianum* Th5cc, se encuentra conservada en el Banco Micológico que funciona en Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI-UNLP) perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata (Stocco et al., 2011). Esta cepa fue aislada del filoplano de trigo y utilizada como antagonista de *Zymoseptoria tritici* por Cordo et al., (2007). Se identificó molecularmente siguiendo la técnica descrita por Stocco et al., (2016), y fue depositada en la base de datos del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) bajo el número de accesión LN869401.

### Inóculo de *Trichoderma harzianum*

La cepa de *T. harzianum* se sembró en dos medios de cultivo diferentes, y se acondicionó en tres formulaciones diferentes: una formulación líquida con conidios del hongo (T2), un formulado sólido (T3) y semillas recubiertas con conidios (T4). Para obtener el inóculo líquido (T2), se cultivó el hongo en cajas de Petri conteniendo PDA (Potato, Dextrosa, Agar) enmendado con cloranfenicol (100 mg/L). Las cajas se incubaron en estufa a 26°C, en oscuridad durante 6 días, transcurridos los cuales, se procedió a recolectar los conidios en agua estéril, con ayuda de un ansa de siembra, ajustando la suspensión a una concentración de 1x10<sup>8</sup> conidios/ml. Para obtener el inóculo sólido (T3), se multiplicó el hongo en un medio de cultivo con arroz. Se colocaron 150 g de arroz con 100 ml de agua destilada en un Erlenmeyer de 1000 ml. Esta mezcla se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121°C dos veces, dejando 24 horas entre cada ciclo. Finalmente se incorporó la cepa de *T. harzianum*, transfiriendo tres trozos circulares de agar colonizado por micelio y conidios de 10 mm de diámetro, en cada uno de los Erlenmeyer. Los cultivos se incubaron a 26°C con alternancia de luz/oscuridad durante 10 días. Una vez que los granos fueron totalmente colonizados por el hongo, se secaron en estufa a 40°C durante 24 hs. Luego, bajo flujo de aire estéril se trituraron los granos con un molinillo de café. Con el polvo obtenido, se preparó una concentración de 3 g de polvo en 1 L de agua.

Para obtener las semillas recubiertas con los conidios de *T. harzianum* (T4), se procedió de acuerdo a la

técnica propuesta por Stocco et al., (2012). Se colocaron en un agitador magnético una mezcla de 10 g de semillas de avena con 90 ml de agar agua al 0,25% y 10 ml de la suspensión de conidios de *T. harzianum* durante 15 minutos con una agitación de 150 rpm. Las semillas recubiertas se secaron en la cámara de flujo laminar durante toda la noche.

### Ensayos a campo

Los ensayos se realizaron en dos sitios diferentes, en la Estación Experimental Julio Hirschhorn (LAT 34° 59' S-LONG, 57° 58' O), perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales y en el Vivero Forestal de la misma Facultad (LAT 34°54'40,4"S-LONG 57°55'37,5" O). Las dimensiones de cada ensayo fueron de 4 x 2 m. El terreno se preparó pasando un arado de disco y luego se realizaron los surcos a mano con una azada.

El diseño experimental consistió en 3 bloques con 4 tratamientos al azar, estos fueron: T1: Control; T2: incorporación de *T. harzianum* (Th5cc) a la línea de siembra como formulado líquido; T3: incorporación de Th5cc a la línea de siembra como formulado sólido y T4: incorporación de Th5cc adherido a la semilla de avena var. Elizabeth. En el resto de los tratamientos las semillas se incorporaron con una maquina a chorrillo.

Los tratamientos T2 y T3 se asperjaron en el surco antes de la siembra y, para el tratamiento con semillas recubiertas (T4), estas se acondicionaron previamente, como se describió más arriba, y se sembraron en el surco. El testigo consistió en la siembra de las semillas de avena en el surco sin la incorporación del antagonista.

La población de *T. harzianum* en cada uno de los tratamientos se evaluó a los 30, 60 y 90 días. Para ello, se tomaron muestras de suelo de cada uno de los tratamientos, se dejaron secar a temperatura ambiente y se realizó el recuento de colonias del antagonista mediante la técnica del suelo diluido con el medio selectivo para *Trichoderma* (TSM) propuesto por Elad et al., (1981). Esta técnica consistió en agitar durante 20 minutos una suspensión de 5 g de suelo en 50 ml de agua destilada estéril (dilución 1:10). Para cada

muestra se realizaron 2 diluciones seriadas. Para ello se tomó una alícuota de 1ml de la suspensión inicial que se vertió en 9 ml de agua destilada estéril, logrando una dilución 1:100. Luego, de esta última dilución se realizó una nueva logrando una dilución de 1:1000. Finalmente, se colocó 1 ml de cada una de las diluciones en una caja de Petri con 1ml de la solución fungistática con PCNB (Pentacloronitrobenzeno) y posteriormente, se agregó el medio de cultivo (TSM) fundido y enfriado a 50°C. Se realizaron 3 repeticiones por cada una de las diluciones. Las cajas fueron incubadas en estufas a 26°C, durante 5 días. Para la evaluación se cuantificaron las colonias de *Trichoderma* spp. que crecieron de manera aislada.

### Análisis estadístico

Los datos de cada uno de los tratamientos se analizaron mediante ANOVA, comparando sus medias con la prueba de Fisher para un nivel de significancia del 5% ( $P < 0,05$ ). Para el análisis se utilizó el programa Infostat® (Di Rienzo et al., 2015).

## RESULTADOS

Los ensayos mostraron que tanto en el formulado líquido (T2) como el de las semillas recubiertas (T4) aumentó la población de Th5cc hasta los 90 días desde que se incorporó el formulado al suelo. No así, el formulado sólido (T3), donde la población de Th5cc comienza a disminuir a los 90 días. (Figuras 1 y 2).

Además, se observó que la mayor población de *T. harzianum* se determinó a los 90 días con el formulado líquido, ya que alcanzó una población de  $1,4 \times 10^4$  unidades formadoras de colonia/g de suelo, mientras que en ese mismo tiempo la población del antagonista fue de  $0,3 \times 10^4$  ufc/g cuando se incorporó como formulado sólido.

En el caso de la incorporación en la semilla, la población de *T. harzianum* al inicio fue menor a la del testigo, sin embargo a los 60 y 90 días alcanzaron valores mayores a la población original en el suelo ( $0,78 \times 10^4$  ufc/g de suelo).

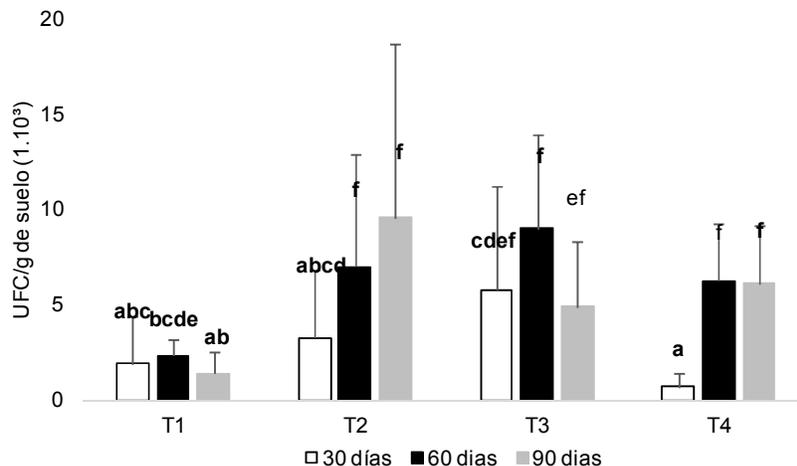


Figura 1. Recuento de la población de *Trichoderma* en los tres momentos de evaluación (30, 60 y 90 días después de la aplicación del bioformulado). Ensayo realizado en la E.E.J. Hirschhorn. T1: Control; T2: formulado líquido de Th5cc; T3: formulado sólido de Th5cc; T4: Th5cc adherido a la semilla (Letras diferentes indican diferencias significativas para un valor de significancia de  $p \leq 0,05$ ).

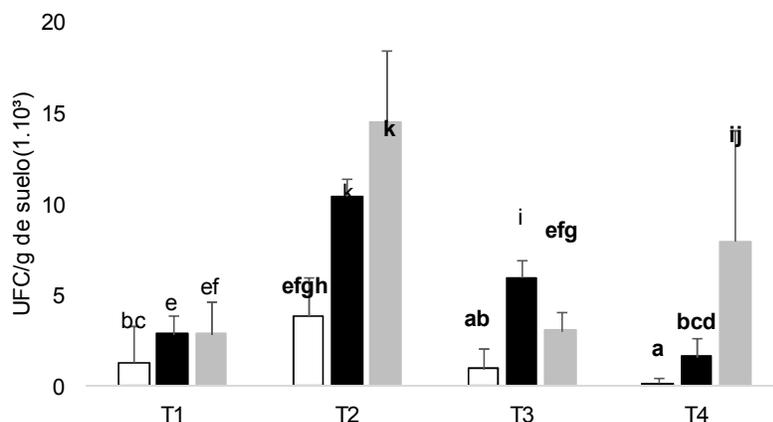


Figura 2. Recuento de la población de *Trichoderma* en los tres momentos de evaluación (30, 60 y 90 días después de la aplicación del bioformulado). Ensayo realizado en el Vivero Forestal FCAYF. T1: Control; T2: formulado líquido de *Th5cc*; T3: formulado sólido de *Th5cc*; T4: *Th5cc* adherido a la semilla (Letras diferentes indican diferencias significativas para un valor de significancia de  $p \leq 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

En el escenario cambiante de la agricultura, la única tecnología que parece prometedora para manejar las enfermedades sin perturbar el equilibrio y composición del ambiente y el ecosistema es el uso de agentes de control biológico.

Incorporar *Trichoderma* spp. al suelo provoca un aumento de la población y de este modo retrasa el establecimiento de microorganismos patógenos. Existen varios trabajos referentes a la aplicación de agentes de control biológico en el suelo antes o en el momento de la siembra para el control de una amplia gama de hongos patógenos (Kumar, 2010; Kumar et al., 2009). La eficiencia de la aplicación de *T. harzianum* como antagonista en plantas está fuertemente relacionada con su formulado, ya que este tiene una clara influencia en la supervivencia en el suelo.

En este trabajo se evaluó la potencialidad del establecimiento de *T. harzianum* en el suelo bajo diferentes formas de incorporación, con el objeto de conocer cuál es el más efectivo en mantener la población del antagonista a niveles moderados, para continuar con su actividad biocontroladora. De acuerdo con nuestros resultados, la formulación líquida y el recubrimiento de las semillas resultaron ser más efectivas en mantener la población de *T. harzianum* a mayores niveles que el control. Contrariamente, cuando el antagonista se aplicó como formulado sólido, la población aumentó hasta los 60 días, pero luego se observó una disminución hacia los 90 días. Estos resultados difieren de los observados por Martínez-Medina et al., (2017), quienes afirman que en los tratamientos en los que *T. harzianum* se incorporó en el formulado sólido, la población se mantuvo en el nivel de inoculación, mientras que en el formulado líquido la población de *T. harzianum* se redujo en 2 órdenes de magnitud.

En concordancia con Mukhopadhyay et al., (1992) un método efectivo para incorporar el antagonista es recubrir las semillas. Cordo et al., (2007) establecieron que la técnica de recubrimiento de semillas es más efectiva contra la mancha foliar del trigo que la técnica de asperjado foliar. En el recubrimiento de semilla los propágulos de los agentes de biocontrol germinan en la superficie de esta y colonizan las raíces de las plántulas y la rizosfera rápidamente (Kumar et al., 2009). En este sentido *T. harzianum*, *T. virens* y *T. viride* se encontraron ser eficaces protectores de semillas contra *Pythium* spp. y *Rizotocnia solani* (Mukherjee & Mukhopadhyay, 1995). Las semillas de arroz tratadas con dos hongos antagonistas, *T. viride* y *T. harzianum* fueron más resistentes al tizón de la vaina ocasionada por *Pyricularia oryzae* y provocaron un aumento en el rendimiento del cultivo (Das & Hazarika, 2000). Por lo tanto, la técnica del recubrimiento de semilla tiene ventajas potenciales dado que favorece un crecimiento rápido y uniforme de plántulas. Los conidios de *Trichoderma* germinan en la superficie de la semilla y forman una capa alrededor de ellas lo que genera que las semillas toleren condiciones adversas del suelo. Además, este método podría reducir la cantidad de antagonista que se aplica para el biocontrol de enfermedades (Yadav et al., 2013).

Los avances en la formulación de *Trichoderma* sp. han mejorado el uso de agentes de control biológico de patógenos de plantas dentro de una agricultura sustentable. Futuras investigaciones sobre el control biológico con el uso de *Trichoderma* sp. deben concentrarse en una formulación adecuada para controlar patógenos foliares y aéreos considerando su naturaleza endofítica. Es necesario fortalecer la asociación entre la investigación y la industria para ampliar los sistemas de producción, incluir la producción a gran escala de formulados a base de *Trichoderma* sp.. Particularmente, estos desarrollos permitirán incorporar estas metodologías en los campos

de los pequeños agricultores familiares principalmente en los países en vía de desarrollo.

## BIBLIOGRAFIA

- Benítez, T., A. Rincón, M. Limón & A. Codón.** 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7: 249-260.
- Cordo, C., C. Mónaco, C. Segarra, A. Perelló, D. Bayo, A. Mansilla, N. Kripelz & R. Conde.** 2007. *Trichoderma* spp. as elicitors in the defense responses of wheat plants against *Septoria tritici*. *Biocontrol Science and Technology* 17: 687-698.
- Das, B.C. & D.K. Hazarika.** 2000. Biological management of sheath blight of rice. *Indian Phytopathol.* 53(4):433-435.
- Di Rienzo, J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada & C.W. Robledo.** 2015. InfoStat versión. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Elad, Y., I. Chet & Y. Henis.** 1981. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica* 9: 59-67.
- Fravel, R.** 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Ann. Rev. of Phytopathol.* 43: 337-359.
- Hermosa, R., A. Viterbo, I. Chet & E. Monte.** 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*. 158: 17-25.
- Howell, C.R.** 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* 87: 4-10.
- Kumar, S.** 2010. Integrated management of maydis leaf blight of maize. *Annals of plant Protect. Sci.* 18(2):536-537.
- Kumar, S., J.P. Upadhyay & A. Rani.** 2009. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium udum* Butler causing wilt of Pigeon pea. *J. Biol. Control* 23(3):329-332.
- Martinez-Medina, A., I. Fernandez, G. Lok, M. Pozo, C. Pieterse & S. Van Wees.** 2017. Shifting from priming of salicylic acid- to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *New Phytologist* 213: 1363-1377.
- Mónaco, C., C. Abramoff, G. Lampugnani, M. Stocco, N. Kripelz & C. Cordo.** 2014. Capacidad biocontroladora de *Trichoderma* sp. sobre la manifestación de la septoriosis del trigo. 1º Simposio Internacional de Trigo, Uruguay 28-30 de Agosto.
- Mukherjee, P.K. & A.N. Mukhopadhyay.** 1995. *In situ*, mycoparasitism of *Gliocladium virens* on *Rhizoctonia solani*. *Indian Phytopathol.* 48(1):101-102.
- Mukhopadhyay, A.N., S.M. Shrestha & P.K. Mukherjee.** 1992. Biological seed treatment for control of soilborne plant pathogens. *FAO. Plant Prot Bull* 40:21-30
- Stefanova, M.** 2000. Producción y aplicación de *Trichoderma* spp. Como antagonista de hongos fitopatógenos. Informe técnico de investigación, INISAV, La Habana
- Stocco, M., C. Mónaco, G. Lampugnani, C. Abramoff, N. Kripelz, G. Laporte, C. Segarra, V.F. Consolo & C. Cordo.** 2011. Banco Micológico de especies de *Trichoderma*. 2º Congreso Argentino de Fitopatología. 1, 2 y 3 de junio de 2011. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. p 392.
- Stocco, M., F. Consolo, C. Mónaco, N. Kripelz, G.L. Salerno & C. Cordo.** 2012. Control biológico de la mancha de la hoja del trigo con especies del género *Trichoderma*. En: Cereales de Invierno II Jornada Temática del INBA "La investigación científico-técnica en cereales de Invierno". Universidad Nacional del Centro. Buenos Aires, Argentina, p 288.
- Stocco, M., C. Mónaco, C. Abramoff, G. Lampugnani, G. Salerno, N. Kripelz, C. Cordo & V.F. Consolo.** 2016. Selection and characterization of Argentine isolates of *Trichoderma harzianum* for effective biocontrol of Septoria leaf blotch of wheat. *World J Microbiol Biotechnol* 32:49 2-10.
- Yadav, S.K., A. Dave, A. Sarkar, H.B. Singh & B.K. Sharma.** 2013. Coinoculated biopriming with *Trichoderma*, *Pseudomonas* and *Rhizobium* improves crop growth in *Cicer arietinum* and *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Agric. Biol.* 6(2): 255-259.