

ENSAYOS DE SUPERVIVENCIA DE *TRICHODERMA HARZIANUM* EN SEMILLAS DE TRIGO PELETEADAS

Gernetti, Claudio; Larran, Silvina y Mónaco, Cecilia

Fitopatología. CIDEFI. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

cecilia.monaco7@gmail.com

RESUMEN: Si bien los ensayos de biocontrol en plantas de trigo fueron promisorios utilizando la técnica de peleteado o recubrimiento, ninguno de éstos estudió la adherencia de los conidios de *Trichoderma harzianum* a la semilla según la formulación utilizada. Tampoco se han encontrado antecedentes en la evaluación de la supervivencia de conidios al aplicarse como recubrimiento de semillas durante su almacenamiento. Estos aspectos son considerados fundamentales para la selección de la formulación y su concentración para lograr la adherencia y supervivencia de los conidios que se busca. En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue: evaluar la efectividad del método de peleteado con *T. harzianum* en semillas de trigo, en cantidad de conidios adheridos y supervivencia durante el almacenaje y su efecto sobre la germinación de las semillas, el peso seco y el índice de verdor de plántulas de trigo. Para el ensayo se utilizaron semillas de trigo Variedad Pampero del Criadero Santa Rosa, que fueron provistas por la empresa NITRAP S.A. peleteadas con un producto comercial biológico a base de conidios de *T. harzianum* (TRICOTRAP) aplicando diferentes formulaciones y concentraciones. La empresa a su vez, proporcionó el producto comercial para la realización de los ensayos en invernáculo. A fin de conocer el efecto de la aplicación de *T. harzianum* como peleteado de semillas en el crecimiento de plántulas de trigo se evaluaron tres indicadores que fueron: la emergencia de plántulas, el peso seco y el índice de verdor. Los resultados obtenidos del ensayo para evaluar la cantidad de conidios de *T. harzianum* que se adhieren a la semilla utilizando diferentes formulaciones y concentraciones mostraron que los mayores valores de ufc/g de semilla de trigo peleteada recuperados en medio de cultivo fueron para las formulaciones sólidas. En las evaluaciones a los 10, 20 y 30 días de almacenamiento, se observó que los valores de recuento de conidios fueron disminuyendo. Además, se evidenció una estimulación en la germinación de las semillas tratadas con *T. harzianum* en comparación con las semillas no tratadas. El peso seco promedio de las plantas emergidas de las semillas no tratadas fue de 0,0608 g y el promedio de las tratadas fue de 0,0604 g. No se observaron diferencias entre ambos valores, por lo que no se pudo establecer ningún efecto de la aplicación de *T. harzianum* sobre el peso seco de las plantas de trigo. Lo mismo se observó para el índice de verdor de las plantas, no hubo diferencias significativas entre las semillas tratadas y las no tratadas. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo se considera de importancia conocer la cantidad de conidios de *Trichoderma* spp. que se adhieren a la semilla según la formulación y la concentración de conidios que se apliquen a las semillas y su sobrevivencia en el tiempo. Se sugiere la continuación de los ensayos analizando diferentes condiciones de almacenamiento para favorecer la mayor sobrevivencia de conidios y evaluar la adherencia y supervivencia en semillas de otras especies.

PALABRAS CLAVE: trigo, *Trichoderma harzianum*, semillas, supervivencia conidial, peleteado.

TRICHODERMA HARZIANUM. SURVIVAL TEST IN PELLEDED WHEAT SEEDS

ABSTRACT: While biocontrol assays in wheat plants were promising using the pelleting or coating technique, none of these studied the adhesion of *Trichoderma harzianum* conidia to the seed according to the formulation used. No antecedents have been found in the evaluation of the survival of conidia when applied as a seed coating during storage. These aspects are considered fundamental for the selection of the formulation and its concentration to achieve the adhesion and survival of the conidia that is sought. In this sense, the objective of the present work was: To evaluate the effectiveness of the method of pelleting with *T. harzianum* in wheat seeds, in the amount of adhered conidia and survival during storage and its effect on the germination of seeds, dry weight and greenness index of wheat seedlings. For the essay, wheat seeds, Variety Pampero from the Santa Rosa Hatchery, which were provided by the company NITRAP S.A. pelleted with a commercial biological product based on *T. harzianum* conidia (TRICOTRAP) applying different formulations and concentrations were used. In order to know the effect of the application of *T. harzianum* as a seed pellet on the growth of wheat seedlings, three indicators were evaluated, which were the emergence of seedlings, dry weight and greenness index. The results obtained from the trial to evaluate the amount of *T. harzianum* conidia adhering to the seed using different formulations and concentrations showed that the highest values of cfu/g of pelleted wheat seed recovered in culture medium were for the solid formulations. In the evaluations at 10, 20 and 30 days of storage, it was observed that the conidia count values were decreasing. In addition, there was evidence of stimulation in the germination of seeds treated with *T. harzianum* compared to untreated seeds. The average dry weight of plants emerged from untreated seeds was 0.0608 g and the average of treated seeds was 0.0604 g. No

differences were observed between the two values, so no effect of the application of *T. harzianum* on the dry weight of wheat plants could be established. The same it was observed respect to greenness index, there was not significant differences between treated and untreated wheat seeds. According to the results obtained in the present work, it is considered important to know the amount of conidia of *Trichoderma* spp. that adhere to the seed according to the formulation and concentration of conidia that are applied to the seeds and their survival over time. It is suggested to continue the trials analyzing different storage conditions to favor the greater survival of conidia and evaluate the adhesion and survival in seeds of other species

KEYWORDS: wheat, *Trichoderma harzianum*, seeds, conidial survival, pelled.

INTRODUCCIÓN

El trigo es la principal fuente de hidratos de carbono del mundo occidental y junto con el arroz y el maíz conforman el 75 % de los carbohidratos y el 50 % de las proteínas comestibles por el ser humano [1]. Hoy, tiene destinos tales como los de primera industrialización, las harinas y las de segunda industrialización para elaboración de pastas, panificados, galletitas y bizcochos. Su origen es la región situada en la Mesopotamia de los ríos Tigris, Eufrates y las montañas adyacentes denominada “Media Luna Fértil” hace aproximadamente 7000 años AC. Posteriormente, por diversas vías se introdujo en Europa y actualmente se encuentra distribuido por todo el mundo.

En Argentina se obtuvo una producción de aproximadamente 13,9 millones de toneladas para la campaña 2020/2021 con un rendimiento promedio de 3200 kg/ha (Fuente MAGyP, 2020).

Es conocido que las enfermedades de las plantas ocasionan importantes pérdidas, tanto de rendimiento como de calidad, y el trigo no es ajeno a esta situación, siendo afectado por diferentes patologías, principalmente de origen fúngico. Durante su ciclo fenológico el trigo puede ser afectado por enfermedades que parasitan la raíz, tallos, hojas, espigas, aristas y granos [1, 2].

En nuestra zona triguera, el panorama de enfermedades ha cambiado en los últimos años debido a diversos factores, tales como el aumento del área influenciada bajo siembra directa, el monocultivo, el uso de variedades susceptibles, el aumento en los niveles de fertilización, el uso del riego, entre otros. Algunas enfermedades foliares del trigo como la mancha amarilla se incrementaron considerablemente en campos bajo siembra directa y monocultivo.

Por otro lado, deben mencionarse algunas enfermedades llamadas emergentes, que son aquellas enfermedades en un cultivo en una región geográfica, en donde su aparición ocurre por primera vez. Un ejemplo de éstas es el brusone o wheat Blast ocasionado por *Pyricularia oryzae* cuyo agente etiológico (patotipo *Triticum*) ha sido descubierto recientemente en trigo en Argentina [3].

Asimismo, entre los cambios ocasionados en el panorama sanitario de la región triguera pueden mencionarse a las enfermedades que ya habían sido registradas y que fueron oportunamente controladas y que han vuelto a incrementarse. Estas enfermedades son denominadas re-emergentes y un ejemplo es el manchado foliar ocasionado por *Parastagonospora nodorum* (= *Septoria nodorum*) en trigo y en cebada [4]. En la zona triguera Argentina se han reportado pérdidas de rendimiento producidas por *Zymoseptoria tritici* (mancha de la hoja) que oscilan entre el 20 y 40 % y disminuciones de entre 3 y 13 % según cultivares con ataques tardíos de la enfermedad. En cuanto a *Drechslera tritici-repentis* (mancha amarilla) se han determinado pérdidas de entre 10 y 20%. Se ha observado que esta enfermedad una vez introducida en un área determinada se vuelve dominante sobre otras manchas producidas por patógenos necrotróficos. Las Royas a su vez, causan importantes pérdidas

en los rendimientos. Su efecto se ha atenuado por la resistencia genética obtenida en los cultivares actuales, sobre todo a la roya negra (*Puccinia graminis* f.sp. *tritici*). Entre las royas más importantes por su severidad e incidencia en la actualidad pueden mencionarse a la roya anaranjada (*P. triticea*) y a la amarilla (*P. striiformis* f.sp. *tritici*), esta última distribuida en toda la región triguera con valores muy elevados de incidencia y severidad según subregiones y cultivares [5].

Otra enfermedad de importancia en el cultivo de trigo es la fusariosis de la espiga de trigo (FET) ocasionada por especies del género *Fusarium*, principalmente *F. graminearum*. Esta enfermedad afecta el rendimiento de granos ocasionando pérdidas de entre 5 a 15 % en años con epidemias moderadas y mermas superiores al 40% en años con epidemias severas, siendo altamente relacionada a las condiciones ambientales. Asimismo, esta enfermedad debe su importancia a su efecto en la calidad de grano por la producción de micotoxinas [6].

En cuanto a los carbones, “el volador y el hediondo” ocasionados por *Ustilago tritici* y *Tilletia* spp., respectivamente, han llegado a producir hasta un 16 % de espigas enfermas, cuando las semillas no son tratadas con fungicidas adecuados [7].

Las principales fuentes de inóculo de estas enfermedades son las semillas, los restos culturales y otros hospedantes secundarios o alternativos entre los cuales se pueden mencionar a malezas u otros cereales. Es a través de las semillas, que la mayoría de los patógenos son transportados a largas distancias y, por lo tanto, introducidos en lugares donde no existían. Entre las recomendaciones para el manejo de las enfermedades en el cultivo de trigo pueden mencionarse la rotación de cultivos con especies no susceptibles, las prácticas de manejo que aceleren la descomposición del rastrojo, el uso de cultivares tolerantes o no susceptibles, el uso de semilla sana o curada, el control de hospedantes alternativos y plantas voluntarias y el control químico [8]. Estas prácticas de manejo intervienen en el ciclo de vida de los patógenos, previniendo la introducción de inóculo, o reduciendo su cantidad o eliminando los hospedantes que pueden constituirse en puentes verdes [9].

Estas prácticas y estrategias de manejo de las enfermedades se integran en un nuevo paradigma: el Manejo Integrado de Enfermedades (MIE), que utiliza los recursos y técnicas en forma racional para permitir la sustentabilidad de la producción agrícola en el tiempo. Las principales estrategias para el manejo de estas enfermedades están basadas en el control químico, control cultural y búsqueda e incorporación de germoplasma resistente por mejoramiento genético [10]. En los últimos años se suma a estas estrategias, el control biológico como alternativa complementaria de bajo impacto ambiental [11, 12, 13, 14, 15, 16]. En este sentido, las especies fúngicas del género *Trichoderma* han sido evaluadas con resultados promisorios para el control biológico de patógenos en plantas de la familia crucíferas, solanáceas, gramíneas y

oleaginosas [2, 17, 18, 19, 20, 21, 22]. En Argentina, numerosos autores, han realizado ensayos de control biológico de enfermedades foliares en cereales en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Entre ellos, Cordo *et al.* [23] trabajó con 14 cepas de *T. harzianum* aplicadas como pelets en la semilla para evaluar la reducción de la mancha de la hoja del trigo (MHT) ocasionada por *Zymoseptoria tritici* (= *Septoria tritici*) en plántulas. Dicho trabajo fue realizado bajo condiciones de invernáculo. Los resultados de esta investigación sugieren que el hongo *T. harzianum* provoca un cambio bioquímico en las plantas, como respuesta de defensa. Además, Perelló *et al.* [22] observaron una reducción de la incidencia de la MHT del 40 % y de la severidad del 70 % cuando se aplicó *T. harzianum* como recubrimiento de la semilla. En este sentido, Navarrete [24], evaluó el efecto biocontrolador de dos cepas de *T. harzianum* aplicadas solas y en combinación con fungicidas, sobre la severidad de la MHT, utilizando diferentes técnicas de aplicación en tres estadios fenológicos (plántula, macollaje y espigazón). Este autor observó que la severidad de la enfermedad se redujo entre un 16,2 % y un 18,5 % en los tratamientos en los que se aplicó el biocontrolador en semilla peleteada mientras que la ganancia en el rendimiento fue de 646,6 kg/ha⁻¹ cuando se reforzó el peleteado de la semilla con 2 aplicaciones aéreas del agente de biocontrol en comparación con los otros tratamientos.

Asimismo, otros ensayos fueron realizados por Larran [2] para el biocontrol de *Macrophomina phaseolina* en soja utilizando 8 diferentes cepas endofíticas de *Trichoderma* sp., previamente aisladas de plantas de soja asintomáticas. Los endófitos fueron aplicados como recubrimiento de semillas de soja a partir de suspensiones adicionadas de agar agua. Estas semillas, en las pruebas *in vitro* fueron colocadas en medio colonizado por el patógeno mientras que en las pruebas *in vivo* se sembraron en sustrato inoculado con el patógeno. En las pruebas *in vitro* se evaluó su efecto en la germinación y el largo de radícula de las plántulas emergidas en comparación con los testigos sembrados en medio sin el patógeno. En las pruebas en invernáculo se evaluó la germinación y la severidad de la podredumbre carbonosa en plántulas. Los resultados demostraron que todas las cepas de *Trichoderma* sp. aplicadas como recubrimiento mejoraron la germinación y el largo de radícula en los ensayos *in vitro* y en el ensayo *in vivo* todas mejoraron la germinación si bien se destacaron dos cepas [2].

Interesantemente, si bien todos estos ensayos mencionados fueron promisorios utilizando la técnica de peleteado o recubrimiento, ninguno de éstos estudió la adherencia de los conidios de *T. harzianum* a la semilla según la formulación utilizada. Tampoco se han encontrado antecedentes en la evaluación de la supervivencia de conidios al aplicarse como recubrimiento de semillas durante su almacenamiento. Estos aspectos son considerados fundamentales para la selección de la formulación y su concentración para lograr la adherencia y supervivencia de los conidios que se busca. Frente a esto, surge la inquietud para la realización de este trabajo. En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue: evaluar la efectividad del método de peleteado con *T. harzianum* en semillas de trigo, en cantidad de conidios adheridos y supervivencia durante el almacenaje y su efecto sobre la germinación de las semillas, el peso seco y el índice de verdor de plántulas de trigo.

MATERIALES Y METODOS

Peleteado de las semillas con *Trichoderma harzianum* (Th1).

Para el ensayo se utilizaron semillas de trigo Variedad Pampero del Criadero Santa Rosa, que fueron provistas por la empresa NITRAP S.A.

peleteadas con un producto comercial biológico a base de conidios de *T. harzianum* (TRICOTRAP) aplicando diferentes formulaciones y concentraciones. La empresa a su vez, proporcionó el producto comercial para la realización de los ensayos en invernáculo.

Los tratamientos fueron los siguientes:

M1-500 cc de Tricotrap Formulación Líquida + 31.25 cc Protrap (protector orgánico) / 100 Kg de semilla de trigo.

M2-250 cc de Tricotrap Formulación Líquida + 31.25 cc Protrap (protector orgánico) / 100 Kg de semilla de trigo.

M3-500 g de Tricotrap Formulación Sólida Liofilizada + 31.25 cc Protrap (protector orgánico) / 100 Kg de semilla de trigo.

M4-200 g de Tricotrap Formulación Sólida Tamizada + 31.25 cc Protrap (protector orgánico) / 100 Kg de semilla de trigo.

Supervivencia de *T. harzianum* (TRICOTRAP) en la semilla de trigo peleteada

Con la finalidad de evaluar la concentración de conidios de *T. harzianum* que se adhieren a las semillas al ser peleteadas con las distintas formulaciones y concentraciones, se diseñó un ensayo que consistió en el recuento de unidades formadoras de colonia (ufc) por gramo de semilla que se recuperan en laboratorio. Asimismo, con la finalidad de evaluar la supervivencia en el tiempo, las semillas peleteadas con los distintos tratamientos fueron almacenadas en bolsas de papel durante 30 días a temperatura ambiente (20-22 °C). El recuento de ufc/g de semillas fue realizado a los 0, 10, 20 y 30 días del peleteado colocando 1 g de semilla peleteada de cada uno de los tratamientos en 100 ml de agua destilada estéril y llevando a un agitador magnético (120 rpm) durante 20 minutos (Figura 1). A partir del sobrenadante se realizaron diluciones sucesivas hasta obtener 10⁻⁵. Se realizarán 4 repeticiones de cada dilución. Luego, 1 ml de cada dilución se sembró en cajas de Petri conteniendo 1mL del fungicida pentacloronitrobenzeno (PCNB) y el medio selectivo para *Trichoderma* (TSM) (Figura 2). El recuento de ufc/g de semillas de cada tratamiento se realizó luego de 7 días de incubación en estufa a 24 ± 2 °C y en condiciones de oscuridad. El resultado final se expresó como ufc por gramo de semillas.

Previamente se preparó el medio selectivo con los siguientes componentes y se esterilizó en autoclave:

SO ₄ Mg. 7 H ₂ O	0,2 g
PO ₄ HK ₂	0,9 g
ClK	0,15 g
NO ₃ Na	1 g
Glucosa	3 g
Cloranfenicol	0,25 g
Rosa de bengala	0,15 g
Agar	20 g

Con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico. Para la primera fecha se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal Wallis y una prueba de Ranks para comparación de medias ($P \leq 0,05$). Para las otras fechas se realizaron ANOVAs y Test de Fisher para comparación de medias ($P \leq 0,05$).

Efecto de *T. harzianum* (TRICOTRAP) sobre la germinación, peso seco e índice de verdor de plántulas de trigo en invernáculo

A fin de conocer el efecto de la aplicación de *T. harzianum* como peleteado de semillas en el crecimiento de plántulas de trigo se evaluaron tres indicadores que fueron la emergencia de plántulas, el peso seco y el índice de verdor.



Figura 1: Semillas de trigo peleteadas en 100 ml de agua destilada estéril en agitador magnético.

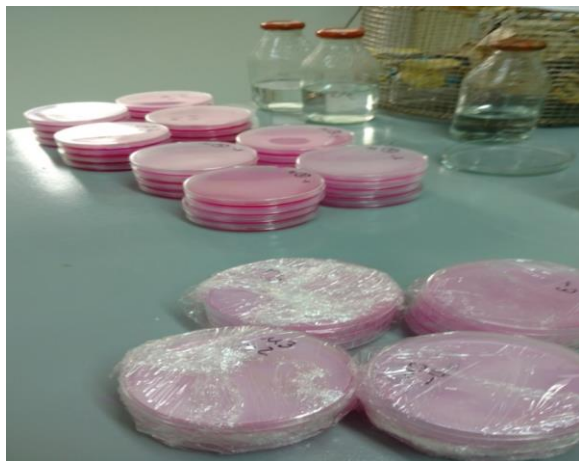
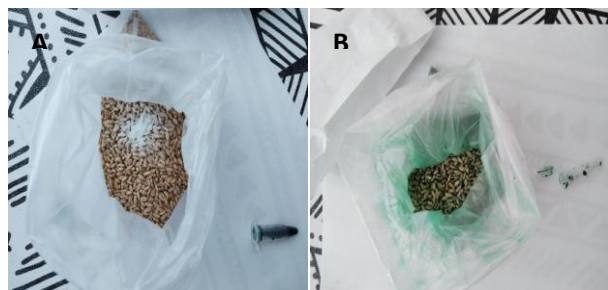


Figura 2: Cajas de Petri con el medio selectivo para *Trichoderma* (TSM)

Inicialmente se procedió al peleteado que consistió en incorporar 400 g de Tricotrap como formulación sólida liofilizada + 31.25 cc Protrap (protector) a 100 Kg de semilla de trigo. En un recipiente se colocó TRICOTRAP (0.25 g) y se agregó 1 ml de agua para disolver (agua de pozo libre de cloro), así, se logró una mejor distribución del inóculo sobre la semilla. Las semillas se colocaron en una bolsa de polietileno, se incorporó la mezcla de inoculante + agua + protector y se agitó hasta lograr una distribución uniforme (Figura 3). Una vez peleteadas las semillas se sembraron en 2 plantineras de 50 celdas, 1 semilla por celda (total 100 semillas) conteniendo tierra estéril y fueron mantenidas en invernáculo con riegos periódicos y condiciones óptimas de luminosidad. Con los mismos parámetros se prepararon dos bandejas con semilla sin tratar como testigo.



C. Gemetti et. Al / *Inv. Jov. 10 (1) (2023) 7-14*

Figura 3: Peleteado de semillas de trigo con Tricotrap formulación sólida liofilizada + protector. A: previo al peleteado; B: posterior al peleteado. El ensayo se sembró el 27 de julio realizándose el recuento de plántulas emergidas a los 38 días después de la siembra registrándose el porcentaje de plántulas emergidas en las 100 semillas sembradas tratadas y las testigo.

Al estado de tres hojas desplegadas se descalzaron las plantas, se lavaron para eliminar los restos de tierra, se ubicaron en bandejas sobre papel para acondicionarlas y se llevaron a estufa a 60 °C (durante tres días) para obtener el peso seco constante. Luego, se pesó planta por planta de las tratadas y las testigo (un total de 41 en cada uno), registrándose los datos. Los datos fueron analizados estadísticamente realizándose un test T para muestras independiente (ver anexo).

La medición de índice de verdor se realizó en estadio de tercera hoja (Z1.3: tres hojas en el tallo principal y 1 macollo [25] con el data logger medidor de clorofila SPAD-502 Minolta tomando la primera hoja expandida para dicha medición. Se realizaron tres mediciones sobre la misma hoja en un total de 20 plántulas promediándose el valor final. Se recopilaron los datos de las mediciones tanto para las plántulas provenientes de semillas tratadas con *T. harzianum* (Th1) como para las plántulas provenientes de semillas sin tratar (testigo).



Figura 4: Plantineras en invernáculo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Cantidad de conidios adheridos según formulación y concentración

El hongo *Trichoderma* sp. es un antagonista, que parasita a un gran número de fitopatógenos por lo cual es ampliamente utilizado en el control biológico de diversas enfermedades, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aislado y cultivado y a su rápido crecimiento en un gran rango de sustratos [26].

Los resultados obtenidos del ensayo para evaluar la cantidad de conidios de *T. harzianum* que se adhieren a la semilla utilizando diferentes formulaciones y concentraciones mostraron que los mayores valores de ufc/g de semilla de trigo peleteada recuperados en medio de cultivo fueron para las formulaciones sólidas, destacándose la formulación tamizada con 200 g de Tricotrap y seguida de la formulación sólida liofilizada con 500 g de Tricotrap, tal como puede verse en la Figura 6.

La técnica de la adhesión de esporas de *T. harzianum* a las semillas de trigo ha sido ampliamente usada por diversos autores en estudios de biocontrol de fitopatógenos [2, 19, 23]. A la fecha, no se ha establecido la concentración de conidios que debe tener la suspensión de esporas de *Trichoderma* sp. para cubrir la superficie de la semilla. En este sentido, Paredes [27] por primera vez estudió la adherencia de los conidios de dos cepas de *T. harzianum* a la semilla según la concentración de la suspensión preparada. Las dos cepas de *T. harzianum* utilizadas en este ensayo, respondieron de diferente forma a la adherencia en la semilla.

Este autor concluyó que existe un número límite de conidios en la suspensión que se adhieren a la semilla, ya que superada la misma no se recupera mayor cantidad de conidios a pesar de aumentar el número o concentración de los mismos. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente trabajo en el que la mayor cantidad de ufc/g semilla se obtuvieron en el tratamiento M4 que en M3 con 200 g de Tricotrap formulación sólida tamizada y 500 g en formulación sólida liofilizada, respectivamente (Figura 6).

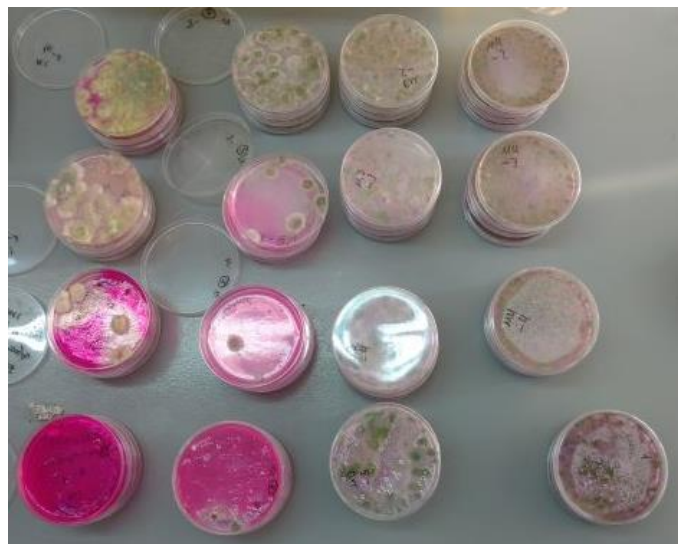


Figura 5: Cajas de Petri con colonias desarrolladas para el recuento de ufc/g de semillas.

Supervivencia de *T. harzianum* en semillas de trigo peleteada

Los resultados de la evaluación de la supervivencia de los conidios de *T. harzianum* en el tiempo con los diferentes formulaciones y concentraciones de Tricotrap mostraron que en el primer recuento de ufc/g de semillas correspondiente al día 0, los valores obtenidos fueron los mayores en comparación con las siguientes fechas de evaluación. En las evaluaciones a los 10, 20 y 30 días los valores de recuento de conidios fueron disminuyendo, excepto para la muestra M4 que en la segunda fecha mantuvo los mismos valores que en la primera fecha.

Asimismo, en estos resultados puede destacarse que los valores más altos de ufc/g semillas fueron para las formulaciones M4 con 200 g de Tricotrap en formulación sólida tamizada, seguido de M3 con 500 g de Tricotrap en formulación sólida liofilizada para todas las fechas evaluadas. Por lo que pueden destacarse las formulaciones sólidas en la supervivencia de los conidios de *T. harzianum* en comparación con las formulaciones líquidas. Sin embargo, se remarca de acuerdo a los resultados que las semillas de la muestra M4 tratadas con *T. harzianum* como formulación sólida tamizada mantuvieron los valores más altos de conidios adheridos a las semillas a los 30 días (promedio de 16.7×10^4 ufc/g de semilla) como puede observarse en la Figura 6, en comparación con el resto de los tratamientos.

Las semillas tratadas con formulaciones de Tricotrap líquidas (M1 y M2) mostraron los valores de ufc/g de semilla más bajos de los cuatro tratamientos. Interesantemente, se observó que en las primeras fechas de evaluación (0 y 10 días) M1 con 500 cc de Tricotrap mostró valores mayores de ufc/g que M2 con 250 cc de Tricotrap y luego a los 20 y 30 días los valores fueron similares con un valor levemente mayor M2 (Figura 6). Se aclara que los valores que se representan en la Figura 6 en el eje Y corresponden a la media del número de ufc/g de semilla (dividido mil) en las distintas muestras y fechas de evaluación.

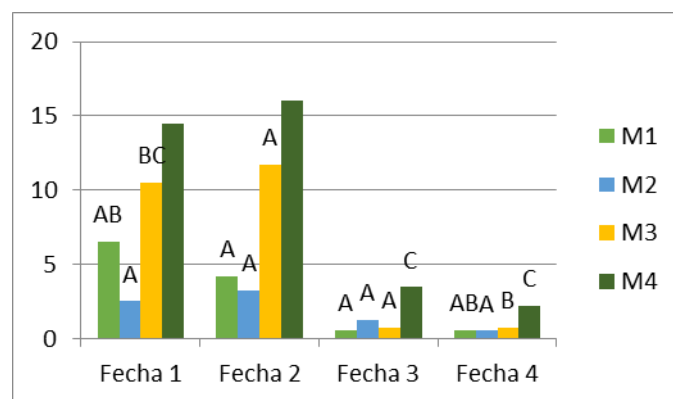


Figura 6: Adherencia y supervivencia de conidios de *T. harzianum* obtenidos por recuento de ufc/gramo de semillas de trigo peleteadas con diferentes formulaciones

Fecha 1: 0 días, Fecha 2: 10 días; Fecha 3: 20 días; Fecha 4: 30 días; M1: 500 cc de Tricotrap Formulación Líquida + 31.25 cc Protrap/100 Kg de semilla de trigo; M2: 250 cc de Tricotrap Formulación Líquida + 31.25 cc Protrap/100 Kg de semilla de trigo; M3: 500 g de Tricotrap Formulación Sólida Liofilizada + 31.25 cc Protrap/100 Kg de semilla de trigo; M4: 200 g de Tricotrap Formulación Sólida Tamizada + 31.25 cc Protrap/100 Kg de semilla.

Los resultados del análisis estadístico mostraron que hubo diferencias significativas entre los tratamientos para todas las fechas y entre tratamientos (ver Figura 6 y Anexo).

De acuerdo a los resultados obtenidos surge la importancia del conocimiento de la cantidad de conidios que se adhieren a la semilla según el formulado y la concentración que se utilice para el peleteado y su supervivencia en el tiempo. Esto último a los fines de propiciar la mejor condición para el almacenamiento del formulado.

Efecto de *T. harzianum* (TRICOTRAP) sobre el crecimiento de plántulas de trigo en invernáculo

Los resultados del ensayo en el que se evaluó la aplicación de 400 g de Tricotrap con formulación sólida liofilizada a semillas de trigo a través del procedimiento de peleteado con la finalidad de evaluar su efecto en el crecimiento de plantas de trigo se presentan a continuación. Inicialmente se registraron los valores de **porcentaje de emergencia de plántulas** a partir de semillas tratadas y no tratadas mostrando un valor de 66% de las primeras en comparación con el testigo sin tratar con el que se registró 47% de emergencia. De esta manera se evidencia una estimulación en la germinación de las semillas tratadas con *T. harzianum* en comparación con las semillas no tratadas (Figura 7).

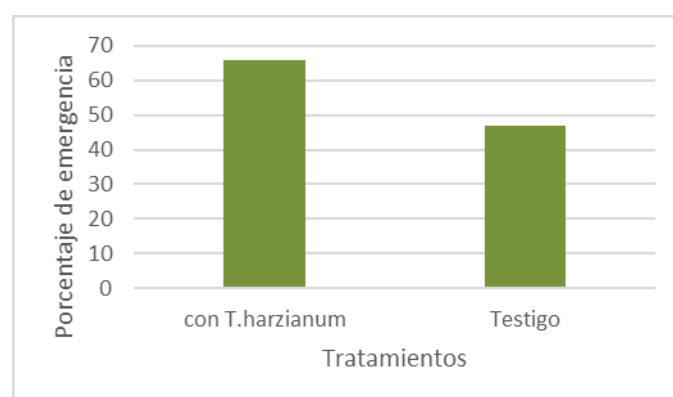


Figura 7: Porcentaje de emergencia de plántulas de trigo a partir de

semillas tratadas con *T. harzianum* en comparación con las semillas sin tratar.

En los resultados obtenidos, la aplicación del producto comercial ensayado en semillas de trigo puede verse una tendencia a la mejora en el porcentaje de emergencia en las semillas tratadas en comparación con las no tratadas. En este sentido, puede mencionarse que hay evidencias de estudios que reportan que la aplicación de *Trichoderma* spp. puede incrementar el crecimiento, actuando como bioestimulador [28]. Por otro lado, Ananthi *et al.* [29] reportaron que la aplicación de *T. viride* en semillas de pimiento, arrojó los valores más altos para la tasa de germinación, el porcentaje de germinación, la longitud media de la raíz, la longitud media del brote, la producción de biomasa y el índice de vigor de las plántulas en comparación con las semillas no tratadas.

Asimismo, Morinigo-Villán *et al.* [30] evaluando la aplicación de diferentes dosis de un formulado comercial a base de *T. harzianum*, sobre la calidad fisiológica y sanitaria de las semillas de trigo obtuvieron al igual que en los resultados obtenidos en este trabajo un efecto estimulante en la germinación en comparación con las semillas no tratadas. Otros ensayos realizados por diferentes autores mostraron que la aplicación de *T. harzianum* en semillas de café incrementó hasta un 90 % la germinación en comparación con 70 % en el tratamiento control [31].

Los resultados obtenidos de la evaluación del **peso seco** de plantas de trigo emergidas a partir de semillas tratadas con el producto a base de *T. harzianum* en el estadio Z1.3 según Zadoks *et al.* [25] se presentan con valores promedio en la Figura 8 en comparación con las plantas emergidas a partir de las semillas no tratadas.

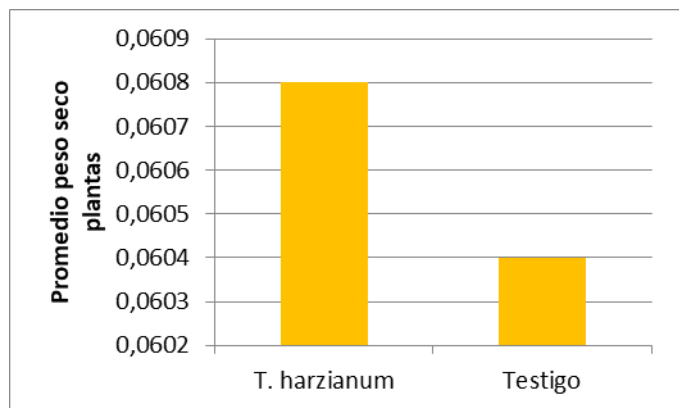


Figura 8: Efecto de la aplicación de Tricotrap a base de *T. harzianum* en semillas en el peso seco de plantas de trigo (valores promedio).

Como puede verse, el peso seco promedio de las plantas emergidas de las semillas no tratadas fue de 0.0608 g y el promedio de las tratadas fue de 0.0604 g. No se observaron diferencias entre ambos valores, por lo que no se pudo establecer ningún efecto de la aplicación de *T. harzianum* sobre el peso seco de las plantas de trigo.



Figura 9: Plántulas listas para ser llevada a estufa para posterior medición de peso seco.

El análisis estadístico realizado (prueba T para muestras independientes) mostró que no hubo diferencias significativas entre las medias del peso entre las semillas tratadas y los testigos (ver Anexo).

A continuación, en la Figura 10 se presentan los valores de peso seco de plantas individuales de trigo en estadio de 3 hojas Z1.3 según Zadoks *et al.* [25] emergidas de semillas tratadas con Tricotrap a base de *T. harzianum* y de las testigo sin tratar.

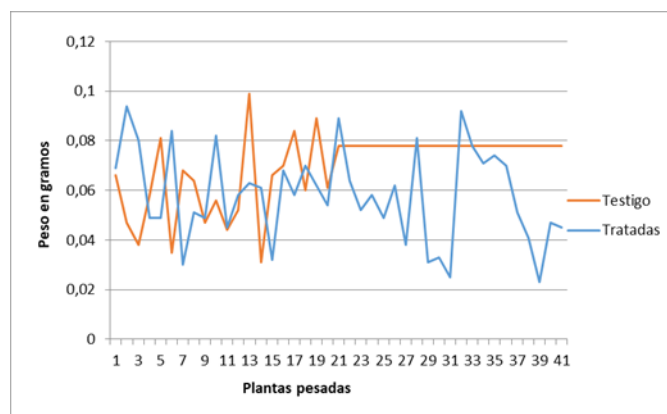


Figura 10: Peso seco individual de plantas de trigo emergidas de semillas tratadas con Tricotrap en comparación con las testigo (total 41 plantas).

Numerosos autores han estudiado el efecto de la aplicación de diferentes especies de *Trichoderma* sobre el peso seco de las plantas tratadas (se probaron tanto la aspersión de hojas y el recubrimiento de semillas) [23, 32, 33, 34]. En concordancia con Cordo *et al.* [23], en nuestro trabajo no se observaron diferencias de peso seco entre las plantas provenientes de semillas tratadas y no tratadas. Sin embargo, otros autores, observaron diferencias significativas respecto al peso seco de las plantas. Tal es el caso de lo reportado por Salerhpour *et al.* [32], quienes observaron que diferentes aislamientos de *Trichoderma* aplicados en semillas de trigo y en el suelo, aumentaron la altura de las plantas, el peso fresco y seco de las raíces y los brotes de plántulas de trigo en comparación con el control no inoculado. También, Barakat *et al.* [33] demostraron un efecto de la aplicación de diferentes cepas de *Trichoderma* en suspensión sobre las plántulas de frijol en el crecimiento de las mismas. En estos estudios la altura de las plantas casi se duplicó (160 % - 200 %), mientras que el peso fresco y seco se incrementó en las plantas en un 133 % - 217 %, respectivamente.

De estos estudios puede arribarse a que no todas las cepas de *Trichoderma* sp. se comportan de la misma manera. Y, que habría que encontrar la cepa que produzca los efectos deseados sobre la especie vegetal que se quiere mejorar y utilizar esta como agente de control biológico.

Los resultados de la evaluación del **índice de verdor** de las plantas emergidas a partir de semillas tratadas con el producto comercial a base de *T. harzianum* y de las testigo no tratadas y sembradas en el invernáculo, se obtuvo que las plantas tratadas arrojaron un valor promedio de 37.76 y las testigos de 32.55, por lo que, sin haber diferencias significativas (ver Anexo), se pudo observar un efecto positivo de la aplicación de *T. harzianum* a las semillas de trigo sobre el índice de verdor, tal como se observa en las Figuras 11 y 12.

Díaz *et al.* [34] en plantas de maracuyá, evaluaron algunos parámetros como el número de hojas (NH), altura de plantas (AP), índice de clorofila (IC), longitud de la raíz (LR), peso seco de la parte aérea (PSPA) y de la parte radical (PSPR). Estos autores determinaron mayores valores para todos los parámetros evaluados excepto para el índice de clorofila, donde, al igual que en nuestro trabajo no se observaron diferencias significativas entre las plantas tratadas y el testigo. Sin embargo, Bader *et al.* [35] observaron en plantas de pimiento, que la aplicación de la cepa de *Trichoderma* sp. FCC T 16 sobre el sustrato de las plántulas incrementó, en más del 100% el desarrollo aéreo y la capacidad fotosintética.

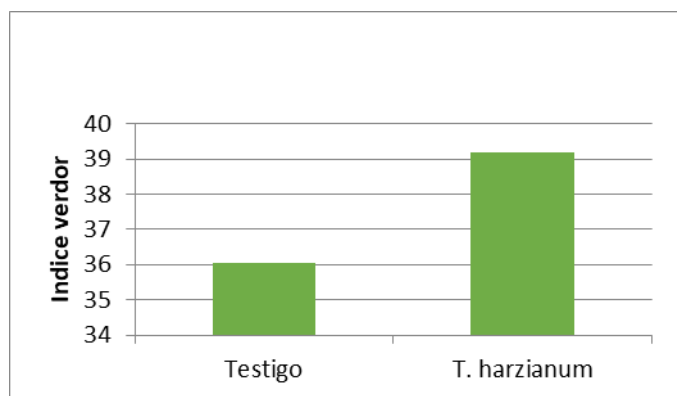


Figura 11: Promedio comparativo de índice de verdor de hojas de plántulas emergidas de semillas tratadas y no tratadas con Tricotrapp en unidades SPAD.

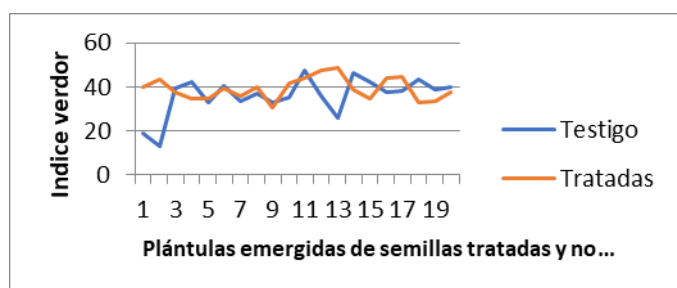


Figura 12: Índice de verdor individual de plantas emergidas de semillas tratadas con Tricotrapp a base de *T. harzianum* en comparación con el testigo (total 20 plántulas).

CONCLUSIONES

Los resultados de los ensayos realizados con la finalidad de evaluar la cantidad de conidios adheridos a las semillas peleteadas con las diferentes formulaciones y concentraciones de *T. harzianum* mostraron que los valores de ufc/g de semillas mayores fueron para los tratamientos con formulaciones sólidas M4 (200 gr de Tricotrapp Formulación Sólida Tamizada + 31.25 cc Protrap (protector orgánico) / 100 Kg de semilla de trigo) seguida por M3 (500 gr de Tricotrapp Formulación Sólida Liofilizada + 31.25 cc Protrap (protector orgánico) / 100 Kg de semilla de trigo) para todas las fechas evaluadas.

Los valores de conidios de *T. harzianum* recuperados de las semillas tratadas fueron los más altos en el día 0 y con el tiempo fueron

reduciéndose en las siguientes fechas de evaluación, a excepción del tratamiento M4 en los que se mantuvieron los valores de conidios recuperados en la primera y segunda fecha.

En relación a las formulaciones líquidas para las primera y segunda fecha, con la formulación con 500 cc de Tricotrapp (M1) se obtuvieron mayores valores de ufc/g de semillas que con la de 250 cc de Tricotrapp (M2), sin embargo, para la tercera y cuarta fecha los valores fueron similares entre ellos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo se considera de importancia conocer la cantidad de conidios de *Trichoderma* spp. que se adhieren a la semilla según la formulación y la concentración de conidios que se apliquen a las semillas y su sobrevivencia en el tiempo. Se sugiere la continuación de los ensayos analizando diferentes condiciones de almacenamiento para favorecer la mayor sobrevivencia de conidios y evaluar la adherencia y supervivencia en semillas de otras especies.

Con respecto a la evaluación del efecto de la aplicación de *T. harzianum* como producto comercial (TRICOTRAP) aplicado como peleteado a semillas de trigo sobre la emergencia de plántulas en el invernáculo, se observó una mejora en los porcentajes de plántulas emergidas de las semillas tratadas con respecto a las testigo.

No se obtuvo un efecto favorable en la aplicación del producto comercial a base de *T. harzianum* (TRICOTRAP) a las semillas de trigo sobre el peso seco e índice de verdor de plántulas en invernáculo.

REFERENCIAS

- [1] A. Cordo, "Patologías del trigo". En: *Enfermedades del trigo. Avances científicos en la Argentina*. Cordo, C.A., Sisterna, M. N. (Coords.) Editorial Edulp. 2014, Capítulo 1, 21-56 pp.
- [2] S. Larran, "Estudio de la micobiota endofítica asociada a trigo y soja y su significancia en la interacción con patógenos fúngicos". Tesis doctoral Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, 2016. Disponible <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/54499>
- [3] A. Perelló, Martínez I., Molina, M., "First report of virulence and effects of *Magnaporthe oryzae* isolates causing wheat blast in Argentina", *Plant Disease*, 99, 2015, 904-1042.
- [4] I. Errenguerena, Carpaneto B., Samoiloff A., Couretot L., "Parastagonospora nodorum: un patógeno re-emergente en trigo y ahora también en cebada". Ed. INTA. 2019. Disponible https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_parastagonospora_nodorum.pdf
- [5] A. Formento, "Roya estriada del trigo (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*): aspectos claves para su manejo". Serie Extensión INTA Paraná N° 87, 2021, 19-27. Disponible https://inta.gob.ar/sites/default/files/roya_estriada_del_trigo_puccinia_striiformis_f_sp_tritici_aspectos_claves_para_su_manejo.pdf
- [6] C. Mourellos, "Fusariosis de la espiga del trigo: dinámica del inóculo de *Fusarium graminearum* ante un manejo sustentable. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. 2015. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes, <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/579>
- [7] M. Simón, Malagrina, G. "Guías de Cerealicultura. Material de apoyo didáctico para las unidades de enfermedades y plagas en Trigo". FCAyF, UNLP. 2007.
- [8] M. Carmona, Barreto D., López S., Gally M., Grijalba P., Sugía V., "Proyecto de Investigación UBACyT. Manejo integrado de enfermedades

importantes en soja y cereales de invierno: Alternativas para una producción sustentable”, **2004**. Disponible http://www.produccionanimal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_combate_de_plagas_y_malezas/38-controlar_enfermedades_en_cereales_invierno.pdf

[9] J. Annone, “El desafío del manejo integrado de enfermedades de los cultivos en sistemas agrícolas conservacionistas: el caso de la sanidad del trigo en siembra directa”, 13th Congreso Latinoamericano de Fitopatología, **2004**. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina, Actas 161-164.

[10] M. Carmona, “El manejo integrado de las enfermedades del cultivo de trigo, una asignatura pendiente”, **2006**, Congreso A Todo Trigo. Conocimiento y Producción, organizado por Federación de Centros y Entidades Gremiales de Acopiadores de Cereales, Mar del Plata, Actas 161-165.

[11] C.A. Cordo, Consolo V.F., Astiz Gassó M., Simón M.R., Kripelz N.I., Mónaco C. “Septorios del trigo en la Argentina: observaciones prácticas para el manejo de la enfermedad”, **2014**. 1° Simposio Internacional de Trigo, Uruguay.

[12] N. Ferraris, Abramoff C., Lampugnani G., Zuluaga S., Cordo C., Mónaco C., Stocco M., “Alternativa biológica para el control de patógenos transmitidos por semilla en cebada”, **2016**. VIII Congreso Nacional de Trigo. VI Simposio de cereales de siembra otoño -invernal. II Reunión del Mercosur. Pergamino, Pcia. de Buenos Aires.

[13] C. Mónaco, Abramoff C., Lampugnani G., Stocco M., Kripelz N., Cordo C., “Capacidad biocontroladora de *Trichoderma* spp. sobre la manifestación de la septorios del trigo”, **2014**, 1° Simposio Internacional de Trigo, Uruguay.

[14] E. Paredes, Gallego D., Kripelz N., Cordo C., Mónaco C., “Evaluación de la aptitud colonizadora de dos cepas de *Trichoderma harzianum* en semillas y hojas de trigo”, **2014**, 3° Congreso Argentino de Fitopatología. San Miguel de Tucumán.

[15] M. Stocco, Mansilla A.Y., Mónaco C.I., Segarra C., Lampugnani G., Abramoff C., Marchetti M.F., Kripelz N., Cordo C.A., Consolo V.F., “Native isolates of *Trichoderma harzianum* inducing resistance to *Mycosphaerella graminicola*, on wheat plants”, *X Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, **50**, **2015a**, 291-301.

[16] M. Stocco, Mónaco C.I., Abramoff C., Lampugnani G., Salerno G., Kripelz N., Cordo C., Consolo V.F., “Selection and characterization of Argentine isolates of *Trichoderma harzianum* for effective biocontrol of *Septoria* leaf blotch of wheat”, *World journal of Microbiology and Biotechnology*, **28**, **2015b**, 1389-1398.

[17] G. Dal Bello, Mónaco C., Simón M., “Biological control of seedling blight of wheat caused *Fusarium graminearum* with beneficial rhizosphere microorganisms”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **18**, **2002**, 627-636.

[18] G. Dal Bello, Sisterna M., Mónaco C., “Antagonistic effect of soil rhizosphere microorganisms on *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of wheat seedling blight”, *International Journal of Pest Management*, **49**, **2003**, 313-317.

[19] A. Perelló, Mónaco C., Sisterna M., Dal Bello G., “Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina”, *Crop Protection*, **22**, **2003**, 1099-1106.

[20] A. Perelló, Mónaco C., Moreno V., Cordo C., Simón M.R., “The effect of *Trichoderma harzianum* and *T. koningii* on the control of tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) and leaf blotch (*Mycosphaerella*

graminicola) of wheat under field conditions in Argentina”, *Biocontrol Science and Technology*, **16**, **2006**, 803-813.

[21] A. Perelló, Mónaco C., Moreno M.V., Simón M.R., Cordo C., “*Trichoderma* spp. isolates as potential biological agents for foliar wheat diseases under field conditions in Argentina”, *Biocontrol Science and Technology*, **16**, **2006** 16: 803-813.

[22] A. Perelló, Mónaco C., Simón M., Dal Bello G., “Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina”, *Crop Protection*, **22**, **2003**, 1099-1106.

[23] C. Cordo, Mónaco C., Segarra C., Simón M.R., Mansilla A., Perelló A., Kripelz N., Bayo D., Conde R., “*Trichoderma* sp. as elicitors of wheat plant defense responses against *Septoria tritici*”. *Biocontrol Science and Technology*, **17**, **2007**, 687-698.

[24] F. Navarrete, “Tratamientos combinados con diferentes fungicidas para reducir la severidad de *Septoria tritici* y su impacto sobre el rendimiento de trigo y sus componentes”. Trabajo Final para la obtención del título de grado: Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, **2013**, 51 pp.

[25] J. Zadoks J., Chang T., Konzak C., “A decimal code for the growth stage of cereals”, *Weed Research*, **14**, **1974**, 415-421.

[26] T. Benítez, Rincon A., Limon M.C., Codón A.C., “Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* Strains”, *International Microbiology*, **7**, **2004**, 249-260.

[27] A. Paredes, “Acción biofungicida con aplicaciones de *Trichoderma harzianum* para controlar la mancha de la hoja del trigo”. Trabajo Final para la obtención del título de grado: Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, **2015**, 43 pp.

[28] V. Olmedo, S. Casas. “Molecular mechanisms of biocontrol in *Trichoderma* spp. and their applications in agriculture”, Chapter 32. En *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, **2014**, 429-453 pp.

[29] M. Ananthi, Selvaraju, P. Sundaralingam, K., “Effect of bio-priming using bio-control agents on seed germination and seedling vigour in chilli (*Capsicum annuum* L.) ‘PKM 1’”, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **89**, **2014** 5, 564-568.

[30] I. A. Morinigo-Villan, Vega-Britez, G.D., Lesmo-Duarte N.D., Velázquez Duarte J.A., Gennaro-Campos K.H., Alvarenga-Serafini J.D., “Efecto del formulado comercial de *Trichoderma harzianum* en semillas de trigo. Effect of commercially formulated *Trichoderma harzianum* fungus on wheat seed”. *Intropica*, **14**, **2019**, 104-111. Disponible <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8054871>

[31] A. Castro, Rivillas, C., “Bioregulación de *Rhizoctonia solani* en germinadores de café”. Boletín Cenicafé. Avance Técnico N°336 Chinchiná, Colombia., **2005**.

[32] M. Salerhpour, Etebarian H.R., Roustaei A., Khodakaramian G., “Biological control of common root rot of wheat (*Bipolaris sorokiniana*) by *Trichoderma* isolates”, *Plant Pathology Journal* **14**, **2012**, 118-124.

[33] R. Barakat, Al-Mahareeq F., AL- Masri M.I., “Biological control of *Sclerotium rolfsii* by using indigenous *Trichoderma* spp. isolates from Palestine”, *Hebron University Research Journal*, **2**, **2006**, 27 - 47.

[34] G. Diaz, Rodríguez G., Montana L., Miranda T., Basso C., Arcia M., “Efecto de la aplicación de bioestimulantes y *Trichoderma* sobre el crecimiento en plántulas de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims) en vivero”, *Bioagro*, **2**, **2020**, 195-204.

[35] A. Bader, Salerno, G.L., Covacevich F., Consolo V.F., “Bioformulación de *Trichoderma harzianum* en sustrato sólido y efectos de su aplicación

sobre plantas de pimiento”, *Revista de la Facultad de Agronomía*, 119, 2020, 119: 1-9.