

Bioformulación de *Trichoderma harzianum* en sustrato sólido y efectos de su aplicación sobre plantas de pimiento

Bader, Araceli Natalia¹; Graciela Lidia Salerno¹; Fernanda Covacevich^{1,2}; Verónica Fabiana Consolo^{1,3}

¹Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC-CONICET)- Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA), Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. ²Estación Experimental Agropecuaria-Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Balcarce, Buenos Aires, Argentina; ³faconsolo@inbiotec-conicet.gob.ar

Bader, Araceli Natalia; Graciela Lidia Salerno; Fernanda Covacevich; Verónica Fabiana Consolo (2020) Bioformulación de *Trichoderma harzianum* en sustrato sólido y efectos de su aplicación sobre plantas de pimiento. Rev. Fac. Agron. Vol 119 (1): 1-9. <https://doi.org/10.24215/16699513e037>

Para la implementación de biofertilizantes se pretende que su formulación sea económica, de fácil aplicación y que garantice la eficacia del inóculo. Nuestro objetivo fue seleccionar un sustrato para vehiculizar *Trichoderma harzianum* Rifai y evaluar su efecto sobre plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). El desarrollo de biomasa fúngica y esporulación se evaluó sobre 4 soportes orgánicos: arroz, salvado de trigo, turba, salvado de trigo+turba (1:1 v/v), que fueron inoculados separadamente con *T. harzianum* (1mL 1 x 10⁸ conidios/1.250 cm³; incubados a 25°C). La mezcla de salvado de trigo+turba evidenció la mayor colonización fúngica y esporulación a los 5 días posteriores a la inoculación (DPI). La mejor conservación de la viabilidad de conidios del bioformulado se mantuvo entre 4 y 25°C durante 15 días, mientras que a 35 y 40°C la viabilidad se redujo significativamente (80%). La mayor formación de clamidosporas se observó a 4°C (76% a 35 DPI), con una reducción del 40-50% a 25 y 35°C. Cuatro cepas fueron bioformuladas en el soporte salvado de trigo+turba y todas incrementaron el crecimiento vegetal en plántulas de pimiento a 45 DPI. La cepa FCC T 16 incrementó, en más del 100% el desarrollo aéreo y la capacidad fotosintética. Las cepas FCCT 199-2 y FCCT 363-2 favorecieron preferentemente el desarrollo radical. Se sugiere como vehículo promisorio y económico, la formulación de cepas de *Trichoderma* en el soporte salvado de trigo+turba, cuya actividad y propiedades pueden ser mantenidas mediante la formación de clamidosporas en un rango de temperaturas y tiempo de conservación de uso común entre los productores hortícolas.

Palabras Clave: biofertilizante, *Trichoderma*, PGPM

Bader, Araceli Natalia; Graciela Lidia Salerno; Fernanda Covacevich; Verónica Fabiana Consolo (2020) Bioformulation of *Trichoderma harzianum* in solid substrate and effects of its application on pepper plants. Rev. Fac. Agron. Vol 119 (1): 1-9. <https://doi.org/10.24215/16699513e037>

For the use of biofertilizers for horticultural farmers the formulation has to be economical, of easy application and has to guarantee the efficiency of the inoculum. Our objective was to select a substrate for device *Trichoderma harzianum* Rifai and evaluate its effect on pepper (*Capsicum annum* L.) plants. The development of fungal biomass and sporulation was evaluated on 4 organic supports: rice, wheat bran, peat, wheat bran + peat (1:1 v/v), which were separately inoculated with *T. harzianum* (1 mL 1 x 10⁸ conidia / 1250 cm³ incubated at 25°C). The mixture of bran+peat showed the highest fungal colonization and sporulation 5 days after inoculation (DAI). The best viability preservation of conidia of the bioformulate was maintained between 4°C and 25°C during 15 DAI, while at 35°C and 40°C the viability was significantly reduced (80%). The highest formation of chlamydo spores was determined at 4°C (76% at 35% DAI), with a reduction towards of about 40-50% at 25°C and 35°C. Four strains were bioformulated in the bran+peat support and all increased pepper plant growth at 45 DAI. The FCCT 16 strain increased aerial development and photosynthetic capacity by more than 100%. The strains FCCT 199-2 and FCCT 363-2 favored mainly root development. It is suggested as a promising and economic vehicle, the formulation of strains of *Trichoderma* in the bran+peat support, whose activity and properties can be maintained through the formation of chlamydo spores in a range of temperatures and conservation time commonly used among horticultural farmers.

Keywords: biofertilization, *Trichoderma*, PGPM

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

Recibido: 11/07/2019

Aceptado: 24/10/2019

Disponible on line: 01/07/2020

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

INTRODUCCIÓN

La creciente presión ejercida sobre las tierras con aptitud agrícola por el crecimiento poblacional y la demanda de alimentos está incrementando la degradación del suelo y ocasionando daños medioambientales causados por prácticas agrícolas inadecuadas. Así, el incremento de los rendimientos es sustentado mediante la extracción de nutrientes del suelo, por lo que ha aumentado exponencialmente la demanda de fertilizantes que incrementan los costos de producción para los agricultores de todo el mundo. Sin embargo, hay abundantes evidencias que demuestran impactos negativos de la fertilización sintética excesiva sobre poblaciones de microorganismos edáficos que cumplen roles en el ciclado de nutrientes (Covacevich et al., 2007) y en la salud del suelo (Singh, 2018). Además, en general, algunos fertilizantes se aplican en exceso y/o tienen una baja eficiencia, detectándose pérdidas por volatilización y/o escurrimiento que también presentan impactos negativos sobre el medioambiente y la salud humana (FAO, 2019). Por esta razón, en la última década, se están evaluando estrategias tendientes a la menor utilización de agroquímicos así como otras alternativas tanto de manejo como de utilización de bioinsumos. En el 2018, en Argentina, se han cosechado 80.877 ha bajo uso orgánico habiéndose incrementado en los últimos años en un 20% los establecimientos que han dejado de utilizar fertilizantes y/o agroquímicos sintéticos (SENASA, 2019a).

Una de las principales alternativas para la producción vegetal con reducción o sin agroquímicos es la utilización de microorganismos benéficos los cuales pueden actuar como biofertilizantes. Entre ellos, algunos grupos de bacterias y hongos (denominados PGPM, por sus siglas en inglés referidas a Plant Growth Promoting Microbes) pueden contribuir en la promoción del crecimiento vegetal, en la absorción de nutrientes, promoción de hormonas de crecimiento, entre otros (Antoun & Prévost, 2005). Además, varios son considerados agentes de control biológico (ACB) por antagonizar la acción de los fitopatógenos, no generar resistencia (Annone, 2005; Sharon et al., 2009; Tuño Gava & Pinto, 2016), ser específicos e inoocuos para la salud humana y animal, así como para el medio ambiente (Rodríguez-Lacherre & Veneros-Terrones, 2011). Por otra parte, algunos presentan tanto capacidades PGPM como de ACB, considerándose candidatos como potenciales bioinoculantes.

Los hongos del género *Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreaceae) son microorganismos de suelo ubicuos, cosmopolitas y ecológicamente exitosos debido a su rápida tasa de crecimiento y esporulación así como por la capacidad de secretar una gran diversidad de compuestos con efectos antibióticos (Aquino-Martínez et al., 2008; Cotxarrera et al., 2002; Gravel et al., 2007; Michel-Aceves et al., 2009; Okon-Levy et al., 2015; Osman et al., 2010; Prasad et al., 2002; Sarro Baro et al., 2011; Wang et al., 2015). Algunas cepas de *Trichoderma* representan una opción prometedora para su uso como biofertilizantes ya que pueden incrementar la eficiencia del uso de nutrientes, liberar fitohormonas como el ácido indol acético (AIA) y actuar como

agentes de biocontrol contra numerosos fitopatógenos (Woo et al., 2006).

En general, los microorganismos con propiedades PGPM y/o antagonistas, incluidos los hongos, se desempeñan bien en condiciones ambientales controladas. Sin embargo, en condiciones de campo, varios factores pueden influir en efectividad biológica tales como las condiciones ambientales y disponibilidad de agua, entre otros (Arora & Mishra, 2016; Martínez & Pugnaire, 2009). Una de las razones más importantes para el éxito de la instalación de microorganismos en general, y de hongos en particular, en el campo, es lograr una formulación adecuada. El método más práctico para la aplicación de estos microorganismos es el desarrollo y la preparación de formulaciones en polvo soluble, que permitan a los agricultores utilizarlos como tratamiento de semillas, lo que puede potenciar su germinación y/o promover la protección de enfermedades de las semillas. Estudios previos realizados por Amer & Utkede (2000) y Bharathi et al. (2004), han demostrado que la eficacia de algunos antagonistas microbianos en el control biológico de diferentes enfermedades de las plantas se ha mantenido después de mezclarse con portadores orgánicos e inorgánicos.

El pimiento (*Capsicum annuum* L.) es la segunda hortaliza cultivada bajo cubierta en Argentina, extendiéndose su producción desde las provincias de Salta, Jujuy, Formosa y Corrientes, hasta el sur de la provincia de Buenos Aires, donde se estiman unas 1.700 hectáreas de producción. Dado que su sistema radical se desarrolla muy poco, requiere de una alta disponibilidad de nutrientes y buena provisión de agua a lo largo de todo su ciclo. Además, para controlar la aparición de enfermedades, la mayoría de los productores realizan desinfecciones periódicas en general utilizando métodos químicos (Adlercreutz et al., 2014). Entre las estrategias de control biológico de enfermedades del sistema radical, además de la resistencia de la planta hospedadora que puede ser propia o potenciada por la asociación con microorganismos benéficos, la tolerancia puede ser favorecida por aumento del crecimiento de raíces (Johnson et al., 2016). El mayor crecimiento radical puede ser potenciado a través de la inoculación con microorganismos PGPM tal como *Trichoderma*, entre otros (Kumar et al., 2017).

En Argentina, la comercialización de productos biológicos basados en *Trichoderma* es reciente y se encuentra en plena expansión. Hasta el presente, en nuestro país se encuentran registrados 10 productos a base de *Trichoderma*, de los cuales solo dos de ellos registrados en 2018 son de industria Argentina (SENASA, 2019b). Por lo anteriormente expuesto y considerando que la aplicación de productos de origen biológico está en plena expansión y es de fundamental interés para el sector agrícola, los objetivos de este trabajo fueron: i) desarrollar un bioformulado a partir de cuatro cepas nativas de *T. harzianum* utilizando sustratos sólidos orgánicos económicos y evaluar su estabilidad a distintas temperaturas ii) evaluar su efecto en la promoción del crecimiento vegetal, en plantas de pimiento para ser recomendados y/o aplicados en cultivos de importancia hortícola para nuestro país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de cepas y preparación del inóculo

Se seleccionaron 4 cepas nativas identificadas morfológica y molecularmente como *T. harzianum* y denominadas FCCT 16, FCCT 58, FCCT 199-2 y FCCT 363-2. Las tres primeras fueron aisladas de suelos agrícolas y la última de suelo prístino del sureste de la provincia de Buenos Aires. Las cepas fueron seleccionadas por su potencialidad PGPM (producción de ácido indolacético, capacidad solubilizadora de fosfato tricalcico capacidad de promover el crecimiento en plantas de tomate) de acuerdo a experimentos previos realizados por Bader et al. (2019).

Las cepas fueron cultivadas en cajas de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo agar papa glucosado (APG, Britania) a 24°C durante 10 días. La biomasa fúngica desarrollada dentro de cada placa fue cosechada agregando 10 mL de agua estéril. Se separó el micelio de los conidios mediante filtración con malla de nylon y se ajustó la concentración a 1×10^8 conidios/mL con cámara de Neubauer.

Selección de los soportes para la multiplicación de *Trichoderma*

Para evaluar el desarrollo de la biomasa fúngica en sustrato sólido, se eligió la cepa FCCT 363-2 por haber evidenciado ser la más promisoría como PGPM y ACB (Bader et al., 2019), que fue multiplicada en cuatro soportes orgánicos seleccionados por ser económicos, fácilmente disponibles, de textura liviana, capaces de conservar la humedad, proveer una correcta aireación y actuar como fuente de nutrientes para facilitar el crecimiento y esporulación de los hongos a multiplicar.

Los cuatro soportes evaluados fueron: i) salvado de trigo, ii) arroz, iii) turba y iv) una mezcla de salvado de trigo +turba en proporción 1:1 v/v, los cuales fueron autoclavados previo al inicio del experimento (dos veces consecutivas a 120°C y 1 atm). Con cada soporte se llenaron bandejas de 1.250 cm³ que fueron humedecidas con agua destilada estéril (20-40 mL según el sustrato de manera tal de lograr un soporte homogéneo en el que se mantuvo la agregación del soporte sin evidencias de excesos de agua). Luego, cada bandeja fue inoculada con 1 mL de suspensión fúngica de la cepa de *T. harzianum* (FCCT 363-2) conteniendo 1×10^8 conidios y mezclando de manera homogénea en el soporte. Los soportes inoculados se cubrieron con film transparente y se incubaron a 25°C con fotoperiodo (12:12 h luz/oscuridad) durante 10 días o hasta observar abundante esporulación.

Evaluación de viabilidad del bioformulado a diferentes temperaturas

Se testeó la viabilidad de la cepa en el soporte salvado de trigo+turba ante diferentes temperaturas y tiempos de exposición. Previo al fraccionamiento se determinó la viabilidad inicial del bioformulado y se lo indicó como control (0 días de exposición a las diferentes temperaturas). Posteriormente, fracciones de 2 g del material fúngico desarrollado fueron colocadas en tubos estériles e incubadas individualmente durante 35 días a 4°C, 25°C, 35°C y 40°C. De cada una de las fracciones se colectaron 0,1 g a los 0, 5, 15 y 35 días. Cada fracción fue resuspendida en un tubo tipo eppendorf

con 1 mL de agua destilada estéril. Los conidios fueron separados del soporte por agitación en vortex y se realizó una dilución 1/10 de la suspensión para el recuento en cámara de Neubauer. Las determinaciones se hicieron por triplicado para cada preparación. La viabilidad de los conidios se determinó mediante la técnica de microcultivo de esporas en portaobjeto. Para ello, una alícuota de 10 µL (aprox. 100 conidios) de la suspensión fúngica diluida fue separadamente sembrada en segmentos de agar-agua de 1 x 1 cm de lado y 2 mm de espesor, los que fueron colocados en portaobjetos, cubiertos con cubreobjetos e incubados en cámara húmeda dentro de una placa de Petri estéril a 24°C. Se determinó a las 24 h el porcentaje de conidios y/o clamidosporas germinados bajo microscopio óptico.

Ensayo *in vivo*: evaluación de efecto PGPM del bioformulado de *Trichoderma*

Preparación del sustrato y siembra de semillas de pimienta

Se evaluó el efecto promotor de cada una de las cuatro cepas de *T. harzianum* seleccionadas (FCCT 16, FCCT 58, FCCT 199-2 y FCCT 363-2) sobre el crecimiento de plantas de pimienta. Las unidades experimentales consistieron en macetas de 1 kg (10 cm de diámetro x 15 cm de altura) que fueron llenadas con sustrato inoculado previo a la siembra. El sustrato estuvo conformado por una mezcla de suelo con baja carga microbiana (205.000 UFC/g, 1% de materia orgánica, 6.2 ppm de fósforo disponible, pH 7.1) perlita y arena estériles en proporción 2:1:1 v/v. El sustrato fue inoculado con el bioformulado de cada cepa (multiplicada en la mezcla salvado de trigo+turba 7 días antes de la inoculación) y colocado en proporción 1 g/kg, homogeneizado en el sustrato y fraccionado en las macetas.

Se sembraron 4 plántulas de pimienta por maceta. Para ello las semillas fueron desinfectadas (hipoclorito de sodio al 0,1% 10 min) y colocadas durante 5 días a 25°C, en pocillos ("speedlings") conteniendo una mezcla de suelo:perlita y arena (2:1:1 v/v). Las plántulas se trasplantaron a las macetas (previamente llenadas con los sustratos inoculados con cada una de las cepas testeadas) y mantuvieron en cámara de crecimiento a 25°C y fotoperiodo controlado (12:12 h luz/oscuridad) durante 45 días. Se testearon 5 tratamientos con 3 repeticiones, que consistieron en las 4 cepas testeadas y el control, que consistió en macetas con sustrato sin el bioformulado.

Efecto de *Trichoderma* sobre el crecimiento de plantas de pimienta

Se evaluó el desarrollo de las plantas a los 45 días del inicio del ensayo. Los parámetros analizados fueron: longitud del tallo, área foliar, índice de verdor, peso fresco y peso seco de la parte aérea y de la raíz. El área foliar fue determinada con un equipo LICOR LI 3000A. El índice de verdor se determinó utilizando un equipo Minolta SPAD-502. Las mediciones se realizaron sobre tres plantas (seleccionadas por desarrollo homogéneo en relación a las restantes plantas de cada unidad experimental) por cada repetición y tratamiento.

Con los parámetros cuantificados se analizó la

respuesta a la inoculación (RI) utilizando la siguiente ecuación:

$$RI = \frac{P(I) - \text{media } P(NI) \times 100}{\text{media } P(NI)}$$

Donde P (I) corresponde al parámetro individual analizado de las plantas inoculadas, y la media P (NI) corresponde al valor promedio del parámetro en las plantas no inoculadas.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism Versión 7. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía para los ensayos de viabilidad y de doble vía para los ensayos en plantas. La significancia estadística se determinó mediante test de Tukey y test de Dunnett ($P < 0,05$) respectivamente.

RESULTADOS

Selección del soporte para la bioformulación de *T. harzianum*

El desarrollo y esporulación de *Trichoderma* fue diferente en relación al tipo de soporte utilizado para su multiplicación. A los 7 días de inoculación se evidenció un rápido desarrollo y colonización del micelio de la cepa FCCT 363-2 crecida en el soporte salvado. Sin embargo, el desarrollo de micelio sobre arroz o turba fue escaso, y en ningún caso se detectó esporulación. El soporte compuesto por la mezcla de salvado de trigo+turba mostró una rápida proliferación del micelio y una abundante esporulación a los 5 días de la inoculación para las 4 cepas evaluadas. Además, la combinación de estos dos componentes colonizados por el hongo formó una estructura dúctil y de fácil fraccionamiento (Figura 1). Por otra parte, la mezcla de

salvado con la turba contribuyó a una adecuada aireación y conservación de la humedad del soporte inoculado, en relación a los otros soportes testeados. Por esta razón, se seleccionó el soporte salvado de trigo+turba para los siguientes experimentos que estuvieron destinados a evaluar la viabilidad y la capacidad PGPM en el bioformulado de las cepas fúngicas seleccionadas.

Viabilidad del bioformulado expuesto a diferentes temperaturas

La germinación y viabilidad de los conidios en el bioformulado compuesto por el soporte salvado de trigo+turba presentó el mismo comportamiento para las 4 cepas evaluadas, detectándose una variabilidad entre cepas menor al 5%. Por esta razón, los porcentajes de viabilidad que se expresan consisten en promedios de las 4 cepas testeadas y sus réplicas. La viabilidad de los conidios al T0 fue del 67%, sin observarse cambios significativos hasta los 35 días de incubación en las condiciones de 4°C y 25°C. Sin embargo, en las incubaciones a 35 y 40°C la viabilidad de los conidios disminuyó significativamente a los 15 días. Durante la exposición a 35°C se registró una viabilidad del 25%, mientras que a 40°C durante 15 días sólo un 6% de los conidios del cultivo conservó su viabilidad.

De manera similar a lo mencionado para conidios, la formación de clamidosporas y su viabilidad en el bioformulado compuesto por salvado de trigo+turba presentó el mismo comportamiento para las 4 cepas evaluadas y los resultados que se muestran consisten en los promedios calculados para las 4 cepas. A los 35 días de incubación se observó una abundante formación de clamidosporas a todas las temperaturas de incubación. Se determinó que la viabilidad de las clamidosporas en condiciones de 4°C fue del 72%. Sin embargo, tanto a 25°C como a 35°C éstas estructuras disminuyeron su viabilidad (Figura 2).

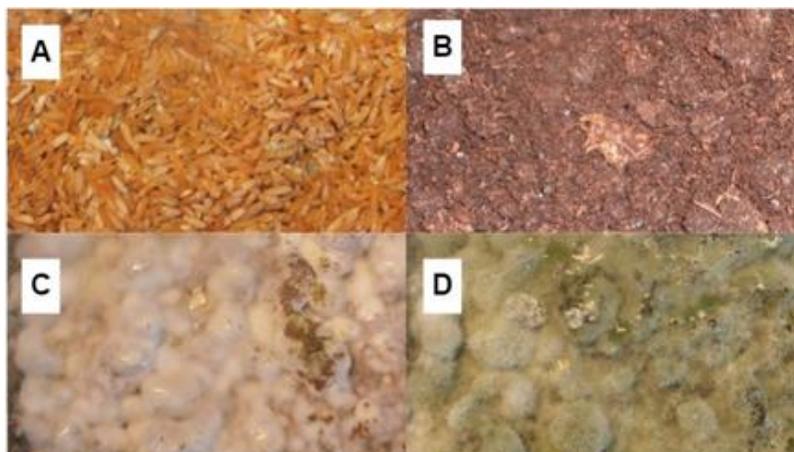


Figura 1. Imagen de los diferentes soportes evaluados a los 7 días después la inoculación con 1×10^8 conidios/mL de *T. harzianum* (cepa FCCT 363-2). Soportes: (A) arroz, (B) turba, (C) salvado de trigo y (D) mezcla de salvado de trigo+turba 1:1 v/v.

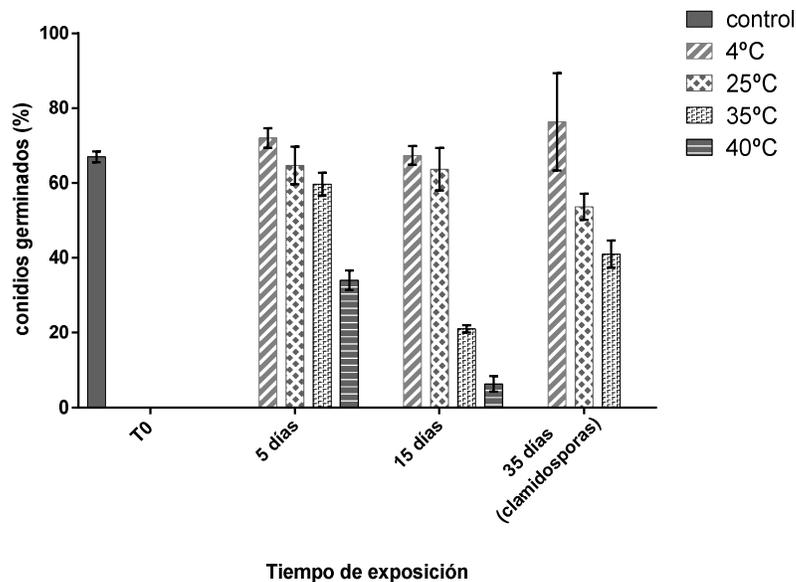


Figura 2. Germinación de propágulos (conidios y clamidosporas, considerado como parámetro de supervivencia de *T. harzianum*) en el soporte salvado de trigo+turba sometidos a diferentes temperaturas (4°C, 25°C, 35°C y 40°C). Para cada tiempo, las barras corresponden al porcentaje de germinación de propágulos promedio de las 4 cepas a las 24 h de incubación. Los recuentos de conidios se realizaron a tiempo 0 (T0 viabilidad inicial) 5 y 15 días de exposición a las diferentes temperaturas y a 35 días fueron contabilizadas las clamidosporas. Para cada tiempo, letras diferentes sobre barras corresponden a diferencias en el porcentaje de germinación entre las diferentes temperaturas a las que fue expuesto el inóculo ($P < 0,05$).

Efecto de la inoculación del bioformulado sobre plántulas de pimiento

Las plantas inoculadas con cada una de las cuatro cepas bioformuladas con el sustrato salvado de trigo+turba no mostraron diferencias significativas respecto al control en la longitud de la parte aérea, área foliar e índice de verdor a los 45 días de desarrollo de las plantas (datos no mostrados). Sin embargo, se evidenciaron incrementos en el desarrollo de la parte aérea y de raíces en las plantas inoculadas con respecto al control (Figuras 3 y 4, respectivamente).

La inoculación con la cepa FCCT 16 bioformulada en el soporte salvado de trigo+turba incrementó significativamente el crecimiento de la parte aérea de las plántulas (Figura 5, izquierda). Por otra parte, La inoculación con la cepa bioformulada FCCT 199-2 ocasionó incrementos en el crecimiento radical (Figura 5, derecha).

En este sentido, el cálculo de la respuesta a la inoculación (Tabla 1) evidencia incrementos de más del 100% en el peso fresco, área foliar y lecturas SPAD (indicador del contenido de clorofila en hojas) en plantas de pimiento inoculadas con FCCT 16. Asimismo, se obtuvieron incrementos en el crecimiento radical superiores al 50% así como en las lecturas SPAD por la inoculación con FCCT 199-2. Se destaca además que, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas, se obtuvieron incrementos en el área foliar y unidades SPAD que superaron el 50% por la inoculación con FCCT 363-2 y

FCCT 58. Además, la inoculación con FCCT 363-2 incrementó el peso seco de raíces en más del 80%.

DISCUSIÓN

Para el desarrollo de productos de origen biológico deben considerarse varios aspectos tales como el diseño de un medio de cultivo (soporte) apropiado que permita la multiplicación masiva del inóculo y que presente una buena relación costo-rendimiento en la producción. Por otra parte, es necesario garantizar la estabilidad del producto y determinar las condiciones más favorables para su almacenamiento (Damiri et al., 2014).

En este trabajo, se optimizó eficientemente el crecimiento y la multiplicación de cuatro cepas de *T. harzianum* utilizando soportes sólidos cuya principal ventaja fue la rápida generación de biomasa sin la necesidad de emplear un fermentador. De esta manera, el soporte más eficiente para el desarrollo del hongo fue aquel que combinó salvado y turba en proporciones iguales, aportando las condiciones de crecimiento adecuadas, buena aireación y conservación de la humedad permitiendo el crecimiento, esporulación y mantenimiento de la viabilidad del hongo. Al respecto, la mayor viabilidad de los conidios de *Trichoderma* se determinó a los 4°C durante el transcurso de los 35 días de evaluación.

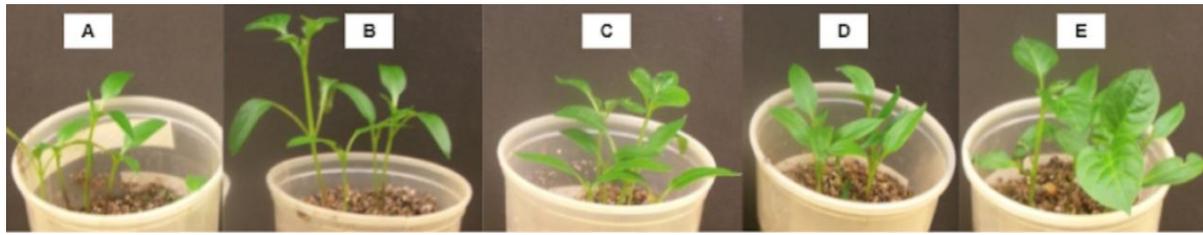


Figura 3. Imagen del desarrollo aéreo de plantas de pimienta de 45 días de crecimiento inoculadas con cuatro cepas de *T. harzianum* bioformuladas en el soporte salvado de trigo+turba. De izquierda a derecha: (A) control, inoculadas con cepas (B) FCCT 16, (C) FCCT 58, (D) FCCT 199-2 y (E) FCCT 363-2.



Figura 4. Desarrollo radical de plantas de pimienta de 45 días de crecimiento inoculadas con cuatro cepas de *T. harzianum* bioformuladas en soporte salvado de trigo+turba. De izquierda a derecha: (A) control, inoculadas con cepas (B) FCCT 16, (C) FCCT 58, (D) FCCT 199-2 y (E) FCCT 363-2.

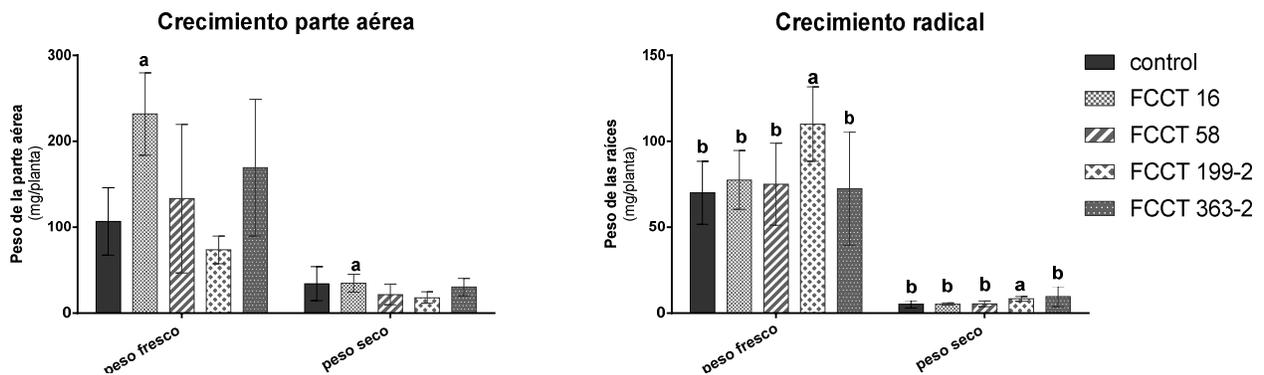


Figura 5. Crecimiento aéreo y radical (izquierda y derecha, respectivamente) de plantas de pimienta de 45 días de crecimiento inoculadas con cuatro cepas de *T. harzianum* bioformuladas en el soporte salvado de trigo+turba. Líneas verticales en cada columna corresponden a desvíos estándar. Para cada parámetro, letras diferentes sobre columnas indican diferencias significativas entre el tratamiento de inoculación y el control ($P < 0,01$).

Tabla 1. Respuesta a la inoculación (RI %) en pimiento inoculado con cuatro cepas de *Trichoderma* multiplicadas en soporte salvado de trigo+turba. PFA: peso fresco aéreo, PSA: peso seco aéreo, SPAD: unidades de lectura de clorofilómetro, AF: área foliar, PFR: peso fresco de raíces, PSR: peso seco de raíces.

Cepa	PFA	PSA	SPAD	AF	PFR	PSR
RI (%)						
FCCT 16	117	2	125	105	11	3
FCCT 58	25	-36	105	101	7	5
FCCT 199-2	-31	-47	97	5	57	59
FCCT 363-2	59	-12	148	52	4	84

Contrariamente, a 40°C la viabilidad de los conidios fue severamente afectada y luego de 15 días de conservación, se registró sólo un 6% de germinación. Un comportamiento similar fue observado para la exposición a 35°C cuya viabilidad disminuyó al 25%. Tal como fuera reportado por Papavizas (1985), el efecto de las bajas temperaturas favorece la viabilidad del hongo y, por el contrario, temperaturas superiores a la óptima para su crecimiento, podrían limitar su supervivencia debido, fundamentalmente, a un incremento en la actividad del metabolismo microbiano y/o a la presencia de metabolitos tóxicos que pueden acumularse. Si bien en este estudio no evaluamos la producción de metabolitos asociados a las temperaturas de conservación, nuestros resultados concuerdan con lo sugerido por este autor. En las condiciones más favorables para el desarrollo del hongo (25°C), como era esperable, la viabilidad de conidios no mostró diferencias a los 15 días incubación. Las respuestas de la viabilidad en relación al tiempo de exposición a diferentes temperaturas, deberían ser consideradas a la hora de formular un producto. Además, se deben especificar adecuadamente las condiciones de almacenamiento hasta su uso en el envase final del producto. Esto es de especial interés, ya que es sabido que en la mayoría de las ocasiones los productos para tratamiento de semillas y/o aplicados en el suelo a la siembra quedan en depósitos bajo condiciones de temperatura variables hasta su utilización. La disminución en la viabilidad luego de la exposición prolongada a moderada/elevada temperatura, debería ser considerada cuando se utilice el bioformulado particularmente en verano, momento en el cual la temperatura de los depósitos a campo normalmente supera los 40°C.

Las especies de *Trichoderma* producen tres tipos de propágulos (micelio, conidios y clamidosporas), éstos poseen diferentes características fisiológicas que son importantes en términos de producción de biomasa, estabilidad y actividad biológica (Verma et al., 2007). En nuestro estudio, las 4 cepas bioformuladas produjeron clamidosporas, y éstas a los 35 días de la bioformulación presentaron a 4°C una viabilidad promedio del 76%. Esto sugiere que podrían extenderse aún más los tiempos de almacenamiento de las bioformulaciones en aquellas cepas capaces de formar clamidosporas como estructuras de resistencia. Por lo tanto, nuestros resultados confirman que la formación de éstos propágulos incrementa la viabilidad del formulado a las temperaturas extremas ensayadas. En este sentido, la optimización de la viabilidad es un

desafío crucial para garantizar el éxito de la conservación, la calidad y la eficacia de bioformulaciones basadas en hongos. Probablemente la incorporación de aditivos como coadyuvantes, protectores de rayos UV, estabilizadores de pH así como siliconas entre otros podrían contribuir aún más a mejorar este aspecto. Si bien muchos productos comerciales son formulaciones basadas en conidios (Fravel, 2005), algunos, tales como Tricoguard™ basado en clamidosporas ha demostrado ser resistente a la temperatura y a la desecación, con una prolongada preservación (viabilidad óptima a los 270 días de evaluación y una mayor supervivencia en suelo que los conidios (Jagtap & Bhatnagar, 2000)), lo cual simplifica el procesamiento y almacenamiento del bioformulado (Mishra et al., 2012). De esta manera y de acuerdo a nuestros resultados próximos experimentos serán llevados a cabo para optimizar la producción de clamidosporas.

En ocasiones, se encuentran limitaciones cuando se pretende utilizar un mismo procedimiento para distintos microorganismos en particular. Es por esto, que si bien solo se utilizó la cepa FCCT 363-2 para seleccionar el soporte adecuado, la viabilidad fue también testeada para otras tres cepas que también se bioformularon y se evaluó su capacidad PGPM sobre el crecimiento de plantas de pimiento. En este sentido, nuestros resultados pueden ser extendidos a la multiplicación de otras cepas, además de la FCCT 363-2, lo que hace este estudio de mayor aplicación para la producción de bioformulaciones a base de *Trichoderma*.

Los bioformulados preparados en salvado de trigo+turba fueron de consistencia compacta, de fácil fraccionamiento y esparcimiento para las cuatro cepas multiplicadas en el soporte. Además, cuando fueron utilizados para inocular el sustrato de crecimiento de plantines de pimiento, evidenciaron efecto positivo sobre el crecimiento desde los primeros días de su germinación. De las cuatro cepas bioformuladas, FCCT 16 fue la que incrementó en mayor medida el crecimiento aéreo y la capacidad fotosintética (evidenciada por una mayor área foliar y mayores lecturas SPAD, parámetro que correlaciona con el contenido de clorofila). Por otra parte, la inoculación con FCCT 199-2 evidenció mayor efecto en el desarrollo radical. Tal como ha sido determinado por Bader et al. (2019) éstas cepas se caracterizan por secretar en medio de cultivo la hormona ácido indol acético (entre 13,24 µg/mL y 24,3 µg/mL), así como por ser capaces de solubilizar fosfato tricálcico en caldo NBRIP, rindiendo entre 215,80 y 288,18 µg/mL de fósforo soluble. De acuerdo a estos resultados era

esperable que las plantas de pimiento hayan presentado una respuesta positiva a la inoculación con estos aislamientos ensayados como bioformulados y confirma la potencialidad de las cepas testeadas para ser usadas como biofertilizantes. Lo relevante de nuestro estudio, es que la capacidad promotora de crecimiento reportada por Bader et al. (2019), no solo se limita al tomate, sino que hemos puesto en evidencia que para el pimiento la inoculación con estas cepas también beneficia el crecimiento de las plantas.

Por otra parte, se destaca que se obtuvieron respuestas diferentes a la inoculación cuando el mismo parámetro fue expresado en peso fresco o seco. Particularmente, las mayores respuestas positivas se obtuvieron con el peso fresco. Esto indicaría una eficiencia diferencial en la captación de agua, que podría estar asociada a un mayor desarrollo de raíces. Es probable que, debido al tiempo de crecimiento de las plantas (45 días) y que éstas aún se encontraban en estado vegetativo a la finalización del ensayo, esa mayor absorción de agua no se tradujo en una mayor producción de material vegetal seco. Futuros estudios deberían evaluar los parámetros de crecimiento de interés para los productores hortícolas hasta el estado de cosecha final. Además de la multiplicación de los propágulos en el soporte adecuado, hay que considerar los fines de la inoculación a efectos de seleccionar la cepa más adecuada. En este sentido según Bader et al. (2019), tanto la cepa FCCT 16 como FCCT 363-2 evidenciaron incrementar el peso fresco de plantas de tomate más del 200% en relación al control y el peso seco de raíces entre un 400 y 160% respectivamente en relación al control. Por ello, se han considerado como potenciales promotores de crecimiento en plantas de tomate, sugiriendo que ambas cepas podrían ser adecuadas como bioinoculantes también para plantas de pimiento. Además, según el estudio de Bader et al. (2019), el mayor control de *Fusarium* en tomate se evidenció por la inoculación con FCCT 363-2. Si bien en este estudio no se evaluó la capacidad de biocontrol de las cepas crecidas en el soporte, nuestros resultados indicarían que la cepa FCCT 363-2 promovió (aunque de manera no significativa) el crecimiento de raíces y la capacidad fotosintética. En ese sentido y considerando que el mayor desarrollo radical podría favorecer la tolerancia de las plantas a las enfermedades radicales, dicha cepa podría ser considerada, además, como potencial biocontroladora. Futuros experimentos deberían testear la potencialidad del bioformulado en la capacidad biocontroladora de las cepas multiplicadas.

CONCLUSIONES

El uso de sustratos económicos para la bioformulación de *Trichoderma* puede ser un vehículo eficaz para la proliferación y conservación de las potencialidades del hongo. Particularmente, la combinación de salvado de trigo y turba preservó la viabilidad de los conidios durante las condiciones de almacenamiento ensayadas. Este estudio demuestra que las plantas de pimiento mostraron una respuesta positiva a la inoculación cuando fueron tratadas con el bioformulado salvado de trigo+turba de las cepas de *Trichoderma*, cuyas

propiedades se mantuvieron óptimas en un rango de temperatura de 4-25°C.

Si bien el uso exclusivo de agentes de control biológico sería ideal, el uso racional de pesticidas químicos combinados con aquellos de origen biológico puede ser una alternativa factible en un marco de agricultura sostenible. En este sentido, se debería testear el mantenimiento de la funcionalidad de las cepas en combinación con productos químicos de uso común de los productores, que permitan sugerir estrategias de manejo que combinen ambas prácticas y reduzcan la utilización de pesticidas.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado con los proyectos PIP 2015-0424 (CONICET), PICT 2015-0392 (ANPCyT) y EXA 15/E793-EXA840/17 de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

BIBLIOGRAFÍA

- Adlercreutz, E.G., R.D. Huarte, A. López Camelo, E. Manzo, A. Szczesny & L. Viglianchino.** 2014. Producción hortícola bajo cubierta. Ed. Ediciones INTA, Buenos Aires. 190 pp.
- Amer, G.A. & R.S. Utkhede.** 2000. Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. *Canadian Journal of Microbiology* 46: 809-816.
- Annone, J.G.** 2005. El desafío del manejo integrado de enfermedades de los cultivos en sistemas agrícolas conservacionistas: El caso de la sanidad del trigo en siembra directa. XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología, Villa Carlos Paz, Argentina. pp. 19-22.
- Antoun, H. & D. Prévost.** 2005. Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. En: PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Siddiqui Z.A. (Ed.), Springer, Dordrecht. pp: 1-38.
- Aquino-Martínez, J.G., B.G. Reyes-Reyes & L.M. Vázquez-García.** 2008. Biocontrol in vitro e in vivo de *Fusarium oxysporum* con hongos antagonistas nativos de la zona florícola de Villa Guerrero, Estado de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: 127-137.
- Arora, N.K. & J. Mishra.** 2016. Prospecting the roles of metabolites and additives in future bioformulations for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology* 107: 405-407.
- Bader, A.N., F. Covacevich, G.L. Salerno & V.F. Consolo.** 2019. Native *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control wilt disease on tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of King Saud University-Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.04.002>. In press.
- Bharathi, R., S. Harish, A. Ramanathan, M.R. Samiyappan & R. Vivekananthan.** 2004. Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies. *Crop Protection* 23: 835-843.
- Cotxarrera, L., C. Alabouvette, C. Steinberg & M.I. Trillas-Gay.** 2002. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium*

- wilt of tomato. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 467-476.
- Covacevich, F., H.E. Echeverria & L.A.N. Aguirrezabal.** 2007. Soil available phosphorus status determines indigenous mycorrhizal colonization into field and glasshouse-grown spring wheat in Argentina. *Applied Soil Ecology* 35: 1–9.
- Damiri, N., M. Mulawarman & M. Mutiara.** 2014. Effect of temperature and storage on effectiveness of *Trichoderma viride* as biocontrol agents of *Rigidoporus microporus*, pathogen of white root on rubber. *Agrivita* 36: 169-173.
- FAO.** 2019. Effects of intensive fertilizer use on the human environment. Disponible en: <http://www.fao.org/3/aq378e/aq378e.pdf>. Último acceso: 24 de Julio 2019.
- Fravel, D.R.** 2005. Commercialization and Implementation of Biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 43: 337-359.
- Gravel, V., H. Antoun & R.J. Tweddell.** 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology Biochemistry* 39: 1968-1977.
- Jagtap, G.P. & S.S. Bhatnagar.** 2000. *Trichoderma* chlamydospores-based formulation (Tricoguard™): impact on shelf life. *Pestology* 24: 70–71.
- Johnson, S.N., C.M. Benefer, A. Frew., B.S. Griffithsc, S.E. Hartleyd, A.J. Karleye, S. Rasmannf, M. Schumanng, I. Sonnemannh & C.A.M. Roberti.** 2016. New frontiers in belowground ecology for plant protection from root-feeding insects. *Applied Soil Ecology* 108: 96-107.
- Kumar, G., A. Maharshi, J. Patel, A. Mukherjee, H.B. Singh & B.K. Sarma.** 2017 *Trichoderma*: A Potential Fungal Antagonist to Control Plant Diseases. SATSA Mukhapatra - Annual Technical Issue 21: 206-218.
- Martínez, L.B. & F.I. Pugnaire.** 2009. Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. *Ecosistemas* 18: 44-54.
- Michel-Aceves A.C., R. Ariza-Flores, A. Barrios-Ayala, M.A. Otero-Sánchez, A. Rebolledo-Martínez & L.Y. Solano-Pascacio.** 2009. Biocontrol in vitro con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb & Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., Agentes Causales de la "Escoba de Bruja" del Mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 27: 18-26.
- Mishra, D.S., C.R. Prajapati, A.K. Gupta & S.D. Sharma.** 2012. Relative bio-efficacy and shelf-life of mycelial fragments, conidia and chlamydospores of *Trichoderma harzianum*. *Vegetos* 25: 225–232.
- Okon-Levy, N., Y. Elad, Z.M. Haile, E. Jurkevitch, J. Katan, Y. Meller Harel & E. Rav-David.** 2015. Induced resistance to foliar diseases by soil solarization and *Trichoderma harzianum*. *Plant Pathology* 64: 365-374.
- Osman, M.B., A. Abdulhamid, N. Mohammad & M.W.Y. Wan.** 2010. Comparison of different delivery system of *Trichoderma* and *Bacillus* as biofertilizer. *Advances in Environmental Biology* 4: 31-33.
- Papavizas, G.** 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual Review Phytopatology* 23: 23-54.
- Prasad, R. D., C.P. Anuroop, S.V. Hegde & R. Rangeshwaran.** 2002. Effect of soil and seed application of *Trichoderma harzianum* on pigeon pea wilt caused by *Fusarium udum* under field conditions. *Crop Protection* 21: 293-297.
- Rodríguez-Lacherre, M. & R. Veneros-Terrones.** 2011. Biological control of *Trichoderma harzianum* RIFAI on fungal pathogens of fruits postharvest of Carica papaya from distribution areas of District of Trujillo (Perú). *Revista de la Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional de Trujillo* 31: 2.
- Sarro Baro, Á., C.F. Castillo & J.M. Lara.** 2011. Evaluación in vitro de la capacidad antagonista de *Trichoderma lignorum* FEEP TL0601 frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal* 225: 47-50.
- SENASA.** 2019a. Situación de la Producción Orgánica en la Argentina durante el año 2018. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Buenos Aires, marzo 2019. Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/situacion_de_la_po_en_la_argentina_2018.pdf. Último acceso: 24 de Julio 2019.
- SENASA.** 2019b. Lista de productos registrados por SENASA hasta enero 2019. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/files/formuladoswebene2019xls>. Último acceso: 24 de Julio 2019.
- Sharon, E., M. Bar-Eyal, I. Chet, A.B. Maghodia, M. Mor, Y. Oka & Y. Spiegel.** 2009. TrichoNema: a *Trichoderma*-Based Project to Develop a Commercial Bio-Agent Product against Phyto-Nematodes. VII International Symposium on Chemical and Non-Chemical Soil and Substrate Disinfestation 883. pp. 223-227.
- Singh, B.** 2018. Review: Are Nitrogen Fertilizers Deleterious to Soil Health? *Agronomy* 48: 21-39.
- Tuão Gava, C.A. & J.M. Pinto.** 2016. Biocontrol of melon wilt caused by *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. melonis using seed treatment with *Trichoderma* spp. and liquid compost. *Biological Control* 97:13-20.
- Verma, M., S.K Brar, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli & J.R. Valéro.** 2007. Antagonistic fungi *Trichoderma* spp: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37: 1-20.
- Wang, M., J. Chen, L. Fan, K. Fu, J. Gao, Y. Li, J. Ma & C. Yu.** 2015. Biological control of southern corn leaf blight by *Trichoderma atroviride* SG3403. *Biocontrol Science and Technology* 25: 1133-1146.
- Woo, S.L., M. Lorito, M. Ruocco & F. Scala.** 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* 96: 181-185.