

XVI Encontro Sobre a Cultura do Amendoim
15 a 17 de agosto de 2019 na Estação de Eventos Cora Coralina e FCAV/UNESP,
Jaboticabal-SP

BIOCONTROL Y PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO EN MANÍ INOCULADO CON
Trichoderma harzianum Y *Bacillus subtilis*

Camila Illa¹, José Gamba³, Mauricio Sebastián y Pérez³, Cecilia Guzmán³, María Alejandra Pérez²

¹Doctora en Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Córdoba, Argentina. Email: camilailla@agro.unc.edu.ar; ²Doctora en Ciencias Universidad Federal de Pelotas Brasil maperez@agro.unc.edu.ar. ³Docentes FCA-UNC josegamba_70@hotmail.com; mauriciosebastian@gmail.com; ceci_guzman@hotmail.com

RESUMEN: La producción de maní en Argentina se concentra en la provincia de Córdoba y dependiendo de las condiciones climáticas las enfermedades fúngicas ocasionan severas pérdidas de rendimiento y calidad del grano producido. Debido a la ineficiencia de los tratamientos químicos destinados a este cultivo, surge como alternativa la incorporación de microorganismos como biocontroladores y bioestimulantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de biocontrol y promoción de crecimiento en maní al inocular en semillas *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*. Se trabajó con semillas de maní cv. Granoleico y los efectos de los tratamientos con microorganismos solos y combinados se evaluaron en condiciones controladas de invernáculo y campo. Los resultados obtenidos demostraron actividad antifúngica eficiente, incremento en la biomasa y rendimiento final. El control eficiente de *A. flavus*, potencial generador de aflatoxinas, y la disminución en la incidencia de *Tecaphora frezzi* favorecerá la producción de maní de alta calidad sanitaria manteniendo la sustentabilidad del sistema. El incremento en los rendimientos y la calidad obtenida por la inoculación de *Bacillus* y *Trichoderma*, justifica su incorporación como estrategia tecnológica al momento de la siembra.

Palabras-Clave: *Arachis hypogaea*, rendimiento, calidad, Agentes de Control Biológico

INTRODUCCIÓN

La producción de maní en Argentina se concentra en la provincia de Córdoba, donde se llevan a cabo actividades económicas de marcado impacto social. Actualmente, se observa una alta presión de enfermedades fúngicas transportadas por la semilla que atenta con la sustentabilidad del sistema. Si bien, la aplicación de fungicidas químicos es la principal herramienta para el control de este tipo de enfermedades, es ineficiente y su uso tiene consecuencias controvertidas sobre el ambiente, la salud humana y el equilibrio en la microbiota edáfica (ANDRÉS et al., 2016).

El biocontrol es considerado una práctica importante en el manejo sustentable de los cultivos, con la finalidad de mejorar la productividad a través del incremento en la disponibilidad de nutrientes y la protección a fitopatógenos (SHERATHIA et al., 2016). Los biocontroladores son preparaciones de células

XVI Encontro Sobre a Cultura do Amendoim

**15 a 17 de agosto de 2019 na Estação de Eventos Cora Coralina e FCAV/UNESP,
Jaboticabal-SP**

vivas o latentes de microorganismos que aplicados al suelo o a la semilla, favorecen la relación planta-rizósfera. En relación a ello, *Bacillus* se destaca por su capacidad para producir antibióticos (TEJERA-HERNÁNDEZ et al., 2011), activa mecanismos de protección en plantas (SINGH et al., 2016) y la producción de metabolitos secundarios como flavonoides, fitoalexinas y auxinas (PRETALI et al., 2016). Respecto a *Trichoderma*, es un hongo filamentoso, saprófito edáfico (HARMAN et al., 2004), es oportunista, avirulento en simbiosis con la planta y antagonista de fitopatógenos por lo que mejora la sanidad y el crecimiento vegetal en diversas condiciones agrícolas (VINALE et al., 2008).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de biocontrol y promoción de crecimiento en maní al inocular en semillas *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en condiciones controladas y campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bioensayos en condiciones controladas: Se utilizaron semillas de maní cv. Granoleico inoculadas con *A. flavus*, *Fusarium* spp., *S. minor* y *T. frezzi*. El nivel de incidencia fúngica en las semillas fue testado por el ensayo de calidad sanitaria, de acuerdo a lo propuesto por MATHUR AND KONGSDAL (2003).

La siembra se realizó en macetas con sustrato compuesto por tierra:arena (3:1) previamente esterilizado, en cámara de cría a 25°C y 12 hs de luz. Los tratamientos evaluados fueron: a) testigo control (semilla infectada en sustrato estéril); b) inoculación con *T. harzianum* (semilla infectada en sustrato inoculado con *T. harzianum*); c) inoculación con *B. Subtilis* (semilla infectada y a las 24 hs inoculada con *B. subtilis* en sustrato estéril) y d) inoculación combinada con *T. harzianum* y *B. subtilis* (semilla infectada y a las 24 hs inoculada con *B. subtilis* en sustrato inoculado con *T. harzianum*). Se dispusieron macetas de control absoluto sembrando semillas estériles en sustrato estéril sin biocontroladores. El ensayo se repitió dos veces.

Desde la siembra y hasta los 60 DDS (días después de la siembra) se determinó la presencia de cada enfermedad a través de la identificación de signos por observación visual y lupa estereoscópica. En las macetas con *T. frezzi*, se separaron de las plantas los clavos y se realizaron preparados histológicos para detectar la presencia de hifas a nivel intracelular. De acuerdo al nivel de aparición de signos de cada enfermedad, se establecieron las siguientes categorías: bajo (x), medio (xx) y alto nivel de aparición (xxx).

Bioensayos de campo: se llevaron a cabo en el Módulo Maní (Campo Escuela de la FCA UNC). Los tratamientos evaluados fueron: Testigo (sin tratamiento); Pretratado con fungicida (Metalaxil-M 1,0 g + Fludioxonil 2,5 g: 750 cc/100 kg semilla); Pretratado con fungicida + Preinoculación con *Trichoderma* (1×10^8 conidios viables/ml + adherente); Pretratado con fungicida + Preinoculación con *B. subtilis* ($2,5 \times 10^{10}$ UFC/l); Pretratado con fungicida + Preinoculación con *T. harzianum* y *B. subtilis*.

XVI Encontro Sobre a Cultura do Amendoim
15 a 17 de agosto de 2019 na Estação de Eventos Cora Coralina e FCAV/UNESP,
Jaboticabal-SP

La siembra se llevó a cabo en noviembre de 2017, según un diseño de bloques completamente al azar con cuatro repeticiones para cada tratamiento. Los datos fueron relevados aleatoriamente sobre los dos surcos centrales en cada parcela experimental. Las variables medidas fueron emergencia de plantas a los 28 DDS y crecimiento en estado V3. Al final del ciclo se determinó: grado de madurez, porcentaje de infección de vainas, crecimiento de plantas, rendimiento y calidad granométrica.

Para el análisis de los datos se realizó análisis de varianza y comparación de medias mediante test LSD ($p \leq 0,05$) con el paquete estadístico InfoStat 2015 (DI RIENZO et al., 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayos en condiciones controladas: En las macetas control se evidenció el alto nivel de presencia de *A. flavus*, *Fusarium*, *S. minor* y *T. frezzi* (Tabla 1). Tanto *A. flavus* como *Fusarium* fueron 100% controlados con la inoculación de *Trichoderma* y *Bacillus* aplicados de manera aislada y combinada. Mientras que *S. minor* mostró nivel de presencia bajo con la aplicación de biocontroladores aislados, el grado ausencia se alcanzó al aplicarlos manera combinada (Tabla 1). El control de *T. frezzi* fue medio al aplicar los microorganismos aislados, sin embargo al combinarlos se logró un bajo nivel de aparición.

El control ejercido por *Trichoderma* a través del mecanismo de micoparasitismo ha sido propuesto por Harman *et al.* (2004). En maní, evaluaciones preliminares inoculando *Bacillus subtilis*, demostraron un eficiente control de hongos asociados a semillas (ILLA et al., 2013). En los resultados presentados en la Tabla 1, se debe destacar la inhibición del crecimiento del hongo *A. flavus* por la inoculación con *B. subtilis* en maní. Resultados similares fueron encontrados por SHIFA et al. (2016) lo que representa un aporte a la producción de maní inocuo, libre de aflatoxinas.

Bioensayos de campo: La emergencia de plantas a los 28 DDS (Tabla 2) para todos los tratamientos aplicados, fue mayor respecto al testigo absoluto ($p \leq 0,05$). Los tratamientos que incluyeron productos biológicos, mejoraron el porcentaje de plantas emergidas respecto al tratamiento fungicida, sin diferencias entre los productos biológicos ensayados. La aplicación combinada de fungicida mas microorganismos aumentó la eficiencia en el control de patógenos, poniendo de manifiesto la alta compatibilidad con el principio químico. Esta respuesta al combinarlos con distintos fungicidas, ya fue informada tanto para *Bacillus* (ILLA et al., 2013; 2016) como para *Trichoderma* (VINALE et al., 2008).

Respecto al crecimiento de plantas medido en estado vegetativo V3 (Tabla 2), todos los tratamientos aplicados superaron al testigo sin tratar ($p \leq 0,05$). A los 30 DDS no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos con el terapico en relación a los biocontroladores evaluados. Sin embargo, a los 165 DDS el efecto promotor de los biológicos ensayados provocó un aumento en el

XVI Encontro Sobre a Cultura do Amendoim
15 a 17 de agosto de 2019 na Estação de Eventos Cora Coralina e FCAV/UNESP,
Jaboticabal-SP

crecimiento de las plantas medido como biomasa, diferenciándose significativamente del terapico y del testigo control.

Al momento de la cosecha, el porcentaje de vainas maduras (Tabla 2) fue del 29% en promedio, sin diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. El rendimiento de vainas y granos fue mayor en todos los tratamientos respecto al control y la aplicación de biocontroladores mejoró la respuesta comparados con la aplicación de fungicida solo. Estos resultados concuerdan con los encontrados por SHIFA et al. (2016) quienes aplicaron *Bacillus* mas fungicida en semillas de maní. El porcentaje de granos de calidad confitería (Tabla 2) no mostró diferencias significativas entre los pretratamientos aplicados a las semillas, pero sí con respecto al testigo.

Los valores de incidencia de *T. frezzi* en vainas (Tabla 2), no evidenciaron diferencias entre el testigo y el tratamiento fungicida. Esto demostró que el principio químico no controló la enfermedad en el campo de acuerdo a lo propuesto por PAREDES et al. (2015). Por su parte, los tratamientos con *Bacillus* y *Trichoderma* aplicados solos y combinados, si bien no manifestaron diferencias entre ellos, disminuyeron los valores de incidencia respecto al testigo y al fungicida de manera significativa ($p \leq 0,05$). Los resultados obtenidos al aplicar biocontroladores muestran una disminución en la incidencia de *T. frezzi*. Es importante destacar que el pretratamiento de semillas con biológicos, constituiría una alternativa a considerar para el control de esta severa enfermedad que disminuye hasta un 60% del rendimiento.

Tabla 1. Nivel de aparición de hongos fitopatogénicos en maní en bioensayos en condiciones controladas

Tratamientos	Hongos fitopatogénicos			
	<i>A. flavus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>S. minor</i>	<i>T. frezzi</i>
Testigo semilla infectada en sustrato estéril	xxx	Xxx	xxx	xxx
Trichoderma en sustrato	-	-	x	x
Bacillus en semilla	-	-	x	xx
Trich. + Bacillus Sustrato semilla	-	-	-	x

Nivel de aparición Bajo: x ; Medio: xx ; Alto: xxx ; Ausencia: -

Tabla 2. Emergencia, crecimiento de plantas, estado de madurez, rendimiento de vainas y granos e incidencia de *T. frezzi* en maní, con diferentes tratamientos aplicados en semillas

Tratamiento	Emergencia (%)	Crecimiento de plantas PS/planta		Grado de Madurez (%)	Rendimiento			Incidencia <i>T. frezzi</i> %
		30 DDS mg	165 DDS g		Vainas qq/ha	Granos qq/ha	Fracción confitería %	
Testigo	5 c	116 b	472 c	30 a	37,8 c	25,7 c	39,5 b	28,3a

XVI Encontro Sobre a Cultura do Amendoim
15 a 17 de agosto de 2019 na Estação de Eventos Cora Coralina e FCAV/UNESP,
Jaboticabal-SP

Fungicida	7 b	130 a	573 b	27 a	62,5 b	42,5 b	59,4 a	30 a
<i>Bacillus</i>	9a	155 a	630 a	31 a	65,1 a	47,3 a	61,2 a	15,3 b
<i>Trichoderma</i>	8a	147 a	641 a	29 a	64,9 a	45,5 a	60,9 a	17,5 b
<i>Bac.+Trich.</i>	9a	160 a	680 a	27 a	68,3 a	47,9 a	59,8 a	12,7 b

Cada valor representa el promedio de 4 repeticiones. Letras iguales indican diferencias no significativas LSD $p \leq 0,05$

CONCLUSIONES

Los ensayos en maceta demostraron que *Trichoderma* y *Bacillus* disminuyeron la incidencia de hongos asociados a la semilla.

En ensayo a campo la aplicación de biocontroladores mejoraron la emergencia de plantas y hacia el final del ciclo el crecimiento, sin afectar el grado de madurez, con incrementos en el rendimiento y el tamaño de los granos con menor incidencia de *T. frezii*.

El incremento en los rendimientos y la calidad de maní por la inoculación con *Bacillus* y *Trichoderma*, justifica su incorporación como estrategia tecnológica al momento de la siembra.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRÉS J.A., PASTOR N.A., GANUZA M., ROVERA M., REYNOSO M.M., AND ADRIANA TORRES. Biopesticides: An Eco-Friendly Approach for the Control of Soil borne Pathogens in Peanut. In **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity**. Springer DOI 10.1007/978-81-322-2647-5_9, 2016.
- DI RIENZO J.A., CASANOVES F., BALZARINI M.G., GONZALEZ L., TABLADA M. Y ROBLEDO C.W. **InfoStat** versión 2012. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>. 2012.
- HARMAN G.E., HOWELL C.R., VITERBO A., CHET I. AND LORITO M. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nat. Rev. Microbiol** 2:43, 2004.
- ILLA C., CUGGINO S., KOPP S., SEBASTIÁN Y PÉREZ M., ULLIARTE A. Y PÉREZ M.A. Efecto de la aplicación combinada de *B. subtilis* más fungicidas sobre la calidad fitosanitaria de semillas de maní y el crecimiento posterior de las plantas. **XXVIII Jornada Nacional de Maní**. <http://www.ciacabrera.com.ar/docs/JORNADA%2028/4-%20ILLA.pdf>. 2013.
- MATHUR S.B. AND KONGSDAL O. **Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi**. 1 ed. Denmark, 425 pp. 2003.
- PAREDES, J.A., CAZÓN, L.I., BISONARD, E.M. Y RAGO, A.M. Efecto de fungicidas con carboxamidas en el control de *Thecaphora frezii*. **XXX Jornada Nacional de Maní**. https://inta.gob.ar/sites/default/files/25intaefectodefungicidasconcarboxamidasenelcontroldethecaphora_frzii.pdf. 2015.
- PRETALI, L., BERNARDO, L., BUTTERFIELD, T.S., TREVISAN, M. AND LUCINI, L. Botanical and biological pesticides elicit a similar induced systemic response in tomato (*Solanum lycopersicum*) secondary metabolism. **Phytochemistry** 130 56-63 <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.04.002>. 2016.
- SHERATHIA, D., R. DEY, M. THOMAS, T. DALSANIA, K. SAVSANI AND K. K. PAL. Biochemical and molecular characterization of DAPG-producing plant growth- promoting rhizobacteria (PGPR) of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Legume Research**, 39 (4) : 614-622, 2016.

XVI Encontro Sobre a Cultura do Amendoim
15 a 17 de agosto de 2019 na Estação de Eventos Cora Coralina e FCAV/UNESP,
Jaboticabal-SP

- SHIFA, H., S. TASNEEM, C. GOPALAKRISHNAN AND R. VELAZHAHAN. Biological control of pre-harvest aflatoxin contamination in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) with *Bacillus subtilis* G1. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**. DOI: 10.1080/03235408.2016.1160642, 2016.
- VINALE F, SIVASITHAMPARAM K., GHISALBERTI E.L., MARRA R., BARBETTI M.J., LI H., WOO S.L., LORITO M. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiol. Mol. Plant. Pathol.** 72:80–86, 2008.