

# Evaluación de aislados de *Trichoderma* spp. nativos del Paraguay para el control de *Colletotrichum* spp. causante de la antracnosis en frutilla

## Evaluation of Paraguayan native strains of *Trichoderma* spp. for the control of *Colletotrichum* spp. causal agent of strawberry anthracnose

Andrés Dejesús Sanabria Velázquez<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup> Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA), Centro de Investigación Hernando Bertoni (CIHB), Departamento Fitopatología. Caacupé, Paraguay.

**\*Autor para correspondencia:**  
asanabriavelazquez@gmail.com

**Conflicto de interés:**  
El autor declara no tener conflicto de interés.

**Licencia:**  
Artículo publicado en acceso abierto con una licencia Creative Commons CC-BY

**Historial:**  
Recibido: 09/04/2019;  
Aceptado: 16/03/2020

**Periodo de Publicación:**  
Enero-Junio de 2020

### RESUMEN

Uno de los agentes de control biológico más estudiados y efectivos en varios fitopatosistemas, es el hongo *Trichoderma* spp.; sin embargo, en Paraguay no existen productos comerciales a base de aislados nativos. El objetivo del trabajo fue seleccionar aislados de *Trichoderma* nativos del Paraguay como biocontroladores de *Colletotrichum* spp. causante de la antracnosis en frutilla, midiendo la velocidad de crecimiento, sobreposición micelial y la capacidad de inhibición de crecimiento *in vitro*. Se verificaron diferencias significativas entre los aislados de *Trichoderma* spp. para la inhibición de crecimiento de *Colletotrichum* spp. registrándose valores de 50,00 hasta 74,44%, siendo el aislado TFC14-06 el que ejerció mayor inhibición. Para evaluar el efecto sobre la producción de frutilla, se realizaron aplicaciones semanales de la mezcla de la suspensión de esporas de *Trichoderma* spp. TKC14-03, TFC14-06 y TFLE-08 en las parcelas experimentales de frutilla variedad Dover del CIHB/IPTA. Durante evaluaciones de campo bajo condiciones de infección natural, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos testigo y tratados con la suspensión de esporas de *Trichoderma*. En conclusión, los aislados nativos TFC14-04, TFC14-05, y TFC14-06 presentan potencial antagonista ante *Colletotrichum* spp. en base a su capacidad de inhibición de crecimiento del patógeno *in vitro*. Sin embargo, bajo condiciones de infección natural del patógeno no se observó el efecto de la aplicación de la suspensión de esporas de *Trichoderma* sobre la producción de frutilla. Futuros trabajos de selección deberán evaluar aislados nativos de *Trichoderma* bajo condiciones ambientales controladas que aseguren una alta presión de la enfermedad.

**Palabras claves:** Control biológico, *Fragaria × ananassa* Duchesne, hongos, MIP.

### ABSTRACT

One of the most studied and effective biological control agents in several phytopathosystems is the fungus *Trichoderma* spp.. However, in Paraguay there are no commercial products based on native isolates. The objective of this work was to select *Trichoderma* isolates native to Paraguay as biocontrol agents of *Colletotrichum* spp. causal agent of the anthracnose in strawberries. It was measured the average speed of growth, degree of mycelial overlap and capacity of inhibition of growth *in vitro* of the plant pathogen *Colletotrichum* spp. using the dual culture technique. Significant differences were observed between isolates of *Trichoderma* spp. for the inhibition of growth of *Colletotrichum* spp. with values of 50.00 to 74.44%, being the native isolate TFC14-06 the one that exerted the greatest inhibition. To evaluate the effect on strawberry production, weekly applications of spore suspension mix of *Trichoderma* spp. TKC14-03, TFC14-06 and TFLE-08 were carried out in the experimental plots of strawberry cv. Dover in the CIHB/IPTA. During field evaluations under conditions of natural infection, no significant differences were observed between control treatments and treated with *Trichoderma* spore suspension. In conclusion, the native isolates TFC14-04, TFC14-05, and TFC14-06 have antagonistic potential against *Colletotrichum* spp. based on their ability to inhibit pathogen growth *in vitro*. However, the effect of the application of the spore suspension of *Trichoderma* isolates on strawberry production under conditions of natural infection was not observed. Therefore, future screening experiments of native *Trichoderma* isolates should evaluate their effect under controlled environmental conditions that ensure high disease pressure.

**Keywords:** Biological control, *Fragaria × ananassa* Duchesne, fungi, IPM.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los principales rubros de producción de muchas familias del Departamento Central es la frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne) ya que representa un rubro de gran importancia social y económica. La producción anual alcanza más de 3.000 toneladas siendo los distritos de Areguá, Itauguá e Ypacaraí las áreas frutilleras más importantes en Paraguay (Doldán Larrea y González 2013; Dirección General de Estadística Encuestas y Censos 2016).

Entre los principales problemas fitosanitarios que pueden presentarse en el cultivo de frutilla, se encuentran las enfermedades fisiológicas, causadas por desórdenes genéticos, falta/exceso de fertilizantes, heladas, deriva de herbicidas, etc. (Paulus, 1990; Neri, Baruzzi, Massetani, & Faedi, 2012); y las enfermedades causadas por microorganismos patógenos como la bacteriosis (*Xanthomonas fragariae*) (Gétaz, van der Wolf, Blom y Pothier, 2017), mancha marrón (*Pestalotiopsis* sp.) (Chamorro, Aguado & De los Santos, 2016), moho gris (*Botrytis cinerea*) (Petrasch, Knapp, van Kan & Blanco-Ulate, 2019), y antracnosis (*Colletotrichum* spp.) (Han et al., 2016).

La antracnosis, causada por un complejo de especies del género *Colletotrichum* (*C. fragariae*, *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*), es una de las enfermedades más importantes de la frutilla debido a que puede dañar cualquier órgano de la planta: raíces, estolón, corona, hojas, yemas, pecíolos, flores y frutos (Garrido et al., 2009). Los síntomas de esta enfermedad son frutos inmaduros momificados, mientras que los maduros presentan lesiones de color castaño-oscuro, circulares, de centro hundido y bordes levantados. También provoca la pudrición de rizomas causando el marchitamiento y seca progresiva de las plantas (Aguado et al., 2014). Esta enfermedad es de difícil control debido a la gran capacidad de esporulación y la facilidad de diseminación de las esporas de *Colletotrichum* tanto por viento como por agua (Paynter, Gomez, Ko & Herrington, 2016).

Son pocos los fungicidas adecuados para el cultivo de frutilla, y muchos de ellos presentan largos periodos de carencia, razón por la cual este cultivo está entre los más propensos a contener residuos de fungicidas (McInnes, Black y Gatti et al., 1992; Han et al., 2018). La preocupación pública por residuos en los productos comestibles y el medio ambiente, además de la selección de cepas fitopatógenas resistentes a fungicidas, han acelerado la búsqueda de estrategias alternativas de control de enfermedades, siendo una de ellas el control biológico (Mochizuki, Yamamoto, Aoki & Suzuki, 2012; Benítez-Díaz, Miranda-Contreras, Balza-Quintero, Sánchez-Gil & Molina-Morales, 2015). La búsqueda de agentes de control biológico que puedan disminuir el inóculo inicial del

patógeno es una intensiva pero necesaria tarea. Esto se debe a que agentes de control biológico previamente adaptados a las condiciones del medio al que son reintroducidos presentan una mayor efectividad (Sanabria Velázquez y Grabowski, 2016)

*Trichoderma* spp. es un hongo antagonista de varios patógenos de plantas. Existen reportes que indican que este tiene efecto antagonista sobre hongos del suelo como *Phytophthora capsici* (Bae et al., 2016), *Pythium ultimum* (Roberts et al., 2016), *Sclerotium rolfsii* (Louzada et al., 2016), *Macrophomina phaseolina* (Garcete Gómez y Orrego Fuente, 2011; Franco y Orrego Fuente, 2013). Las colonias de este hongo biocontrolador son fácilmente reconocibles por su crecimiento rápido y su color verde. Primeramente, presenta un micelio blanco, pocos días después toma un color verde, por la aparición de estructuras reproductivas (Carvalho et al., 2018). La versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación de los hongos de este género ha permitido su uso en el control biológico (Fernández-Larrea Vega, 2001, Diánez Martínez, Santos, Carretero & Marín, 2016).

En Paraguay se han realizado varios trabajos experimentales investigando el uso de *Trichoderma* en varios cultivos como soja (Franco y Orrego Fuente, 2013), sésamo (Garcete Gómez y Orrego Fuente, 2011), menta (Orrego Fuente et al., 2010), macadamia (Sanabria Velázquez y Grabowski, 2016) y estevia (Gamarra Sosa, 2013). Sin embargo, no se han redactado aun protocolos específicos para la evaluación de aislados nativos de *Trichoderma* spp. como agentes de control biológico en el cultivo de frutilla (Chiriboga, Gómes y Garces, 2015). Tampoco existen productos comerciales desarrollados utilizando como ingrediente activo cepas de *Trichoderma* spp. nativas de Paraguay (Grabowski, Orrego y Soilán, 2014). Por ello se planteó la realización de ensayos exploratorios para la selección de agentes biocontroladores y la evaluación del efecto ejercido por estos sobre la producción de frutilla. Este tipo de estudios permitirán ajustar las metodologías necesarias para la obtención de información confiable sobre el efecto de agentes biocontroladores en cultivos y sistemas de producción específicos, lo cual posibilitará que en el futuro se desarrollen bioinsumos agrícolas formulados a base de cepas de *Trichoderma* nativas del Paraguay.

Este trabajo es el primer reporte de la evaluación del efecto de aislados nativos de *Trichoderma* spp. en condiciones *in vitro* y de campo sobre el cultivo de frutilla en Paraguay. El objetivo fue seleccionar aislados nativos del género *Trichoderma* como biocontroladores de *Colletotrichum* spp., para ello se midió para cada aislado la velocidad media de crecimiento, el grado de sobreposición micelial y la capacidad de inhibición de crecimiento *in vitro*

de *Colletotrichum* spp. y se evaluó el efecto de la aplicación de la suspensión de esporas de aislados de *Trichoderma* sobre la producción de frutilla bajo condiciones de infección natural del patógeno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento y preservación de *Trichoderma* spp.

El aislamiento de *Trichoderma* spp. se realizó mediante una adaptación del método de dilución del suelo. Este método consistió en diluir 3 g de suelo en 100 mL de agua destilada estéril y agitar la suspensión. Posteriormente, bajo la cámara de flujo laminar se retiró y colocó 1 mL de la suspensión en una placa de Petri esterilizada. Luego, se adicionó el medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar), y se agitó suavemente. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 5 días en la incubadora (Insaurralde, Sanabria Velázquez, Verdina, Sotelo & Barúa, 2017). Al cabo de los 5 días de incubación, se realizó la identificación morfológica de *Trichoderma* spp., utilizando las claves de identificación de Barnett &

Hunter (1998). Se procedió a la monosporización del cultivo puro a fin de asegurar la pureza genética de los aislados. Para ello se agregó a la placa de Petri 10 mL de agua estéril y se removieron cuidadosamente las esporas del hongo con un ansa estéril raspando la superficie de la colonia. A partir de esta suspensión de esporas se realizaron diluciones sucesivas de 1:10, 1:100 y 1:1000, de esta última dilución se tomó 0,1 mL de la suspensión y se distribuyó en el centro de la placa de Petri. Los cultivos de *Trichoderma* spp. se incubaron durante 48 h a 25°C y las colonias individuales obtenidas a partir de una sola espora se transfirieron nuevamente a placas de Petri con medio de cultivo PDA. Los cultivos monospóricos de *Trichoderma* spp. fueron codificados y preservados en tubos de ensayo con medio de cultivo PDA a una temperatura de 4°C (Tabla 1). Para los experimentos se extrajo una pequeña porción de micelio del hongo y se transfirió a las placas de Petri con medio de cultivo PDA. Dos de los aislados procedentes de Ecuador, TFLE-07 y TFLE-08, fueron proveídos por el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) como aislados de referencia.

**Tabla 1.** Muestras de suelo georreferenciadas para la obtención de aislados de *Trichoderma* spp. CIHB-IPTA. Caacupé, Paraguay. 2014.

Código de la muestra	Aislados de <i>Trichoderma</i>	Localidad	Coordenadas
1KH	TKC14-01	Cordillera	S 25,3883413 W 57, 1869743
2KH	TKC14-02	Cordillera	S 25,38839495 W 57,1846740
3KH	TKC14-03	Cordillera	S 25,38807153 W 57,18603803
1 Picofrutilla 4	TFC14-04	Cordillera	S 25,38756 W 57,18980
1 Picofrutilla 6.1	TFC14-05	Cordillera	S 25,38763 W 57,18969
1 Picofrutilla 6.2	TFC14-06	Cordillera	S 25,38765 W 57,18960
C2 (Muestra de referencia)	TFLE-07	Ecuador	-----
C12(Muestra de referencia)	TFLE-08	Ecuador	-----

### Aislamiento y preservación de *Colletotrichum* spp.

Las muestras de tejido vegetal colectadas de plantas de frutilla con síntomas de antracnosis se lavaron con agua corriente y fueron cortadas en trozos de 1 a 2 cm, después se desinfectaron mediante una solución con etanol (OH) al 70% y otra de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2%, seguidamente se realizó un triple enjuague en agua destilada estéril, se dejó secar el tejido vegetal y se transfirió a placas de Petri con medio de cultivo PDA bajo cámara de flujo laminar. Posteriormente, se dejaron incubar a 28°C durante 8 días. Para el reconocimiento de *Colletotrichum* spp. se observaron las colonias mediante el estereoscopio y el microscopio óptico identificando las estructuras típicas del hongo. Para la obtención del cultivo monospórico del hongo *Colletotrichum* spp., se realizaron diluciones y se sembraron en medio de cultivo PDA, luego mediante repiques de las colonias originadas a partir de una sola espora utilizando

agujas de disección se obtuvo el cultivo puro del hongo, el cual fue preservado en tubos de ensayo con medio de cultivo PDA a una temperatura de 4°C (French y Hebert, 1980).

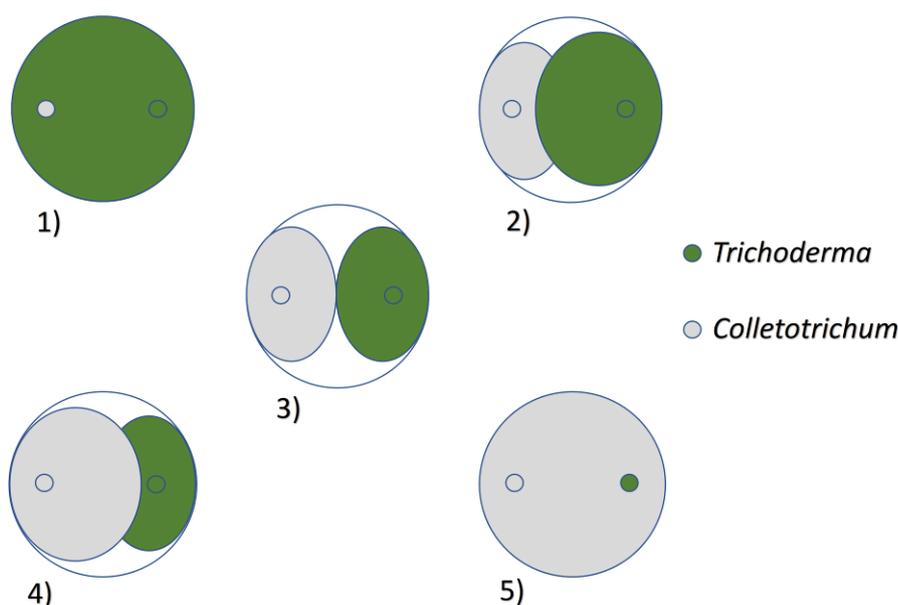
### Selección de aislados de *Trichoderma* spp. *in vitro*

El experimento se realizó en el Laboratorio de Patología de Hortalizas del Dpto. Fitopatología ubicado en el Centro de Investigación "Ing. Agr. Hernando Bertoní" en la ciudad de Caacupé, Paraguay. El trabajo fue desarrollado entre los meses de febrero y agosto de 2014. Este ensayo consistió en confrontar en cultivo pareado cada uno de los 8 aislados de *Trichoderma* spp. obtenidos de parcelas productoras de frutilla.

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con 9 tratamientos siendo 8 los aislados de *Trichoderma* spp., enfrentados cada uno con *Colletotrichum* spp., y un testigo consistente en un cultivo puro

del patógeno sin competencia. Cada tratamiento contó con 5 repeticiones, resultando 45 unidades experimentales, las cuales consistieron en una placa de Petri cada una. Para seleccionar los aislados de *Trichoderma* spp. con capacidad antagonista ante *Colletotrichum* spp. se empleó la técnica de cultivo pareado mencionada por Bell, Wells & Markham (1982) (Figura 1), la cual consistió en enfrentar dos discos de 5 mm de diámetro de *Trichoderma* spp. y del fitopatógeno *Colletotrichum* spp. obtenidos con un sacabocados y posicionarlos 7 cm separados entre sí en una placa de Petri de 9 cm con medio de cultivo PDA, incubando luego a 25°C hasta que el tratamiento testigo haya cubierto totalmente la superficie del medio.

Se evaluó la actividad antagonista de los aislados de *Trichoderma* spp. mediante la medición de la velocidad de crecimiento micelial promedio (mm día<sup>-1</sup>) y la sobreposición del micelio de *Trichoderma* spp. y el fitopatógeno *Colletotrichum* spp., para ello se utilizó la escala propuesta por Bell et al. (1982) (Figura 1). También se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento del patógeno mediante la siguiente fórmula adaptada de Franco y Orrego Fuente (2013):  $I = 100 - [(LMP_{CP} / LMP_{CI}) * 100]$ . Donde: I: Inhibición del crecimiento de *Colletotrichum* spp. (%); LMP<sub>CP</sub>: Longitud del crecimiento de *Colletotrichum* spp. en cultivo pareado (mm); LMP<sub>CI</sub>: Longitud del crecimiento de *Colletotrichum* spp. en cultivo individual (mm).



**Figura 1.** Escala propuesta por Bell et al. (1982) para la evaluación y clasificación del antagonismo. 1) *Trichoderma* spp. sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio 2) *Trichoderma* spp. sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio. 3) *Trichoderma* spp. y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro. 4) El patógeno coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio y parece resistir a la invasión por *Trichoderma* spp. 5) El patógeno sobrecrece completamente a *Trichoderma* spp.. CIHB-IPTA. Caacupé, Paraguay. 2014.

### Preparación suspensión de esporas de aislados nativos de *Trichoderma* spp.

Para la producción masiva los aislados seleccionados TKC14-03, TFC14-06 y TFLE-08 se repicaron en medio de cultivo PDA e incubaron a 25°C durante 5 días. Posteriormente, se preparó una suspensión de 100 mL de *Trichoderma* spp. en agua destilada esterilizada, raspando superficialmente los propágulos contenidos en las placas cultivadas de manera a liberar los conidios del hongo. Luego con ayuda de una pipeta estéril se dispensó la suspensión de esporas de cada aislado de *Trichoderma* spp. en bolsas de polipropileno con 250 g de arroz y 125

mL de agua destilada, previamente esterilizada en autoclave a 121°C por 20 minutos. Una vez dispensada la suspensión de conidios, las bolsas con arroz se incubaron con luz artificial a temperatura ambiente (28-32°C) durante 15 días. Transcurrido este periodo de tiempo el arroz adquirió una coloración verde debido a la formación de conidióforos y conidios de *Trichoderma* spp. (Sawangri, Pengnoo, Suwanprasert & Kanjanamaneesathian, 2007). A continuación, se procedió a la cosecha de esporas agitando el arroz colonizado contenido en el recipiente Erlenmeyer de manera a liberar los conidios del hongo. Se adicionó agua y se diluyó la suspensión hasta obtener una concentración de 10<sup>8</sup>

esporas/mL la cual fue distribuida en botellas de 1 L. La suspensión fue conservada durante 3 días a temperatura de 10°C.

### Efecto de aislados nativos de *Trichoderma* sobre la producción de frutilla en condiciones de campo

Las aplicaciones semanales de la suspensión de esporas de *Trichoderma* spp. se realizaron en las parcelas experimentales de frutilla de la variedad Dover bajo condiciones de infección natural de antracnosis, las cuales fueron tratadas únicamente con extractos de plantas para el control de ácaros, ubicadas en el Programa de Investigación de Cultivos Olerícolas (PICO) del Centro de Investigación Hernando Bertoni (CIHB), Caacupé. El periodo de aplicación estuvo comprendido entre los meses de julio y agosto de 2014 (total de 60 días).

Para la aplicación de la suspensión de esporas de *Trichoderma* spp. se empleó un pulverizador tipo mochila de 20 L con pico del tipo cono hueco, de uso exclusivo para productos biológicos. La dosis utilizada fue un litro de suspensión de esporas por cada 20 L de agua, obteniendo una concentración final de  $5 \times 10^6$  esporas/mL. Se mezcló con agua y se agitó apropiadamente el pulverizador de manera a mejorar el mezclado y que el caldo sea homogéneo. La aplicación del caldo se realizó a la altura de la base de la planta.

Para el ensayo se utilizó el Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA), con dos tratamientos y cinco repeticiones. Se consideró como unidad experimental el promedio de frutos obtenidos de cada bloque durante diferentes fechas de evaluación.

En el tratamiento con *Trichoderma* el sustrato de las plantas fue tratado con una mezcla de tres aislados de *Trichoderma* spp. (TKC14-03, TFC14-06 y TFLE-08). Por otro lado, el tratamiento testigo consistió en plantas no tratadas con la suspensión. Para la evaluación, los frutos de frutilla se cosecharon en bolsas individuales. En cada cosecha se hizo un conteo del total de frutas y se las clasificó en sanas o enfermas mediante la observación directa y se calculó área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC).

### Análisis estadísticos

Los datos obtenidos, en ambos experimentos, fueron sometidos al análisis de Varianza (ANOVA), y al encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos se aplicó el test de Tukey al 5% de probabilidad de error. Para los análisis estadísticos se utilizó el paquete estadístico InfoStat® (Di Rienzo et al., 2008).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se observa el crecimiento micelial lineal medido en mm/día (velocidad de crecimiento) para los 8 aislados de *Trichoderma* spp. a las 72 horas de incubación. Se hallaron diferencias significativas entre los aislados de *Trichoderma* spp. en cuanto su velocidad de crecimiento lineal, registrándose valores de 12,7 hasta 17,1 mm/día. Para los aislados TFC14-04, TFC14-06, TFC14-05, TKC14-03, TKC14-01, TKC14-02 no se encontraron diferencias estadísticas en cuanto a la velocidad de crecimiento lineal en cultivo pareado con *Colletotrichum* spp., observando crecimientos lineales de 14,9 a 17,1 mm/día.

**Tabla 2.** Velocidad de crecimiento, escala de Bell y porcentaje de inhibición del crecimiento de *Colletotrichum* spp. enfrentado a aislados de *Trichoderma* spp. durante las pruebas de antagonismo *in vitro*. CIHB-IPTA. Caacupé, Paraguay. 2014.

Aislado de <i>Trichoderma</i>	Velocidad (mm/día)*	Escala de Bell**	Inhibición del crecimiento (%)*
TFC14-04	17,1 a	2	67,78 a b c
TFC14-06	16,7 a	2	74,44 a
TFC14-05	16,6 a	2	71,11 a b
TKC14-03	15,9 a b	2	56,67 c d
TKC14-01	15,2 a b	3	51,33 d
TKC14-02	14,9 a b c	3	50,00 d
TFLE-07	13,6 b c	3	59,56 b c d
TFLE-08	12,7 c	3	52,22 d
Testigo	----	----	0,00 e

(\*) Medias seguidas por la misma letra no difieren entre sí por el test de Tukey al 5% de probabilidad de error.

(\*\*) Escala adaptada de Bell et al. (1982).

Para el aislado TKC14-02 se observó un crecimiento lineal de 14,9 mm/día, no diferenciándose estadísticamente de los aislados TKC14-02, TFLE-07 y TFLE-08 cuyo crecimiento micelial fue el más

lento entre todos los aislados con 12,7 mm/día. Los valores de crecimiento micelial lineal de los aislados evaluados en este ensayo fueron menores a los verificados en trabajos anteriores de control de



**Figura 2.** Sobreposición de colonias en cultivo pareado: *Colletotrichum* spp. (izquierda) y *Trichoderma* spp. (derecha). CIHB-IPTA. Caacupé, Paraguay. 2014.

fitopatógenos del suelo con aislados de *Trichoderma* spp. como los de Franco y Orrego Fuente (2013) quienes registraron valores máximos de 20,25 mm/día.

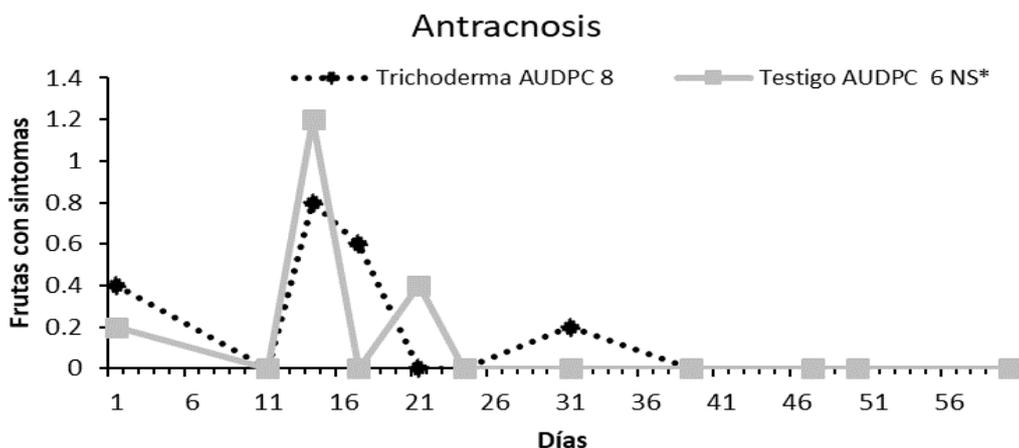
En cuanto a los grados de la escala de Bell et al. (1982) también se verificaron diferentes valores para los aislados de *Trichoderma* spp.. Para los aislados TFC14-04, TFC14-06, TFC14-05, TKC14-03 se registraron valores iguales a 2, lo que equivale a que los aislados de *Trichoderma* spp. sobrecrecieron las dos terceras partes de la superficie del medio. Los aislados TKC14-01, TKC14-02, TFLE-07, TFLE-08 y el patógeno *Colletotrichum* spp. colonizaron cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo pareció dominar al otro, obteniendo el valor 3 de la escala.

Se verificaron diferencias significativas entre los aislados de *Trichoderma* spp. en cuanto a los porcentajes de inhibición de crecimiento de *Colletotrichum* spp. registrándose porcentajes de inhibición de 50,00 hasta 74,44% (Figura 2). Todos los aislados de *Trichoderma* spp. se diferenciaron del tratamiento testigo. Los aislados TKC14-03, TKC14-01, TKC14-02, TFLE-07 y TFLE-08 no fueron estadísticamente diferentes entre sí presentando porcentajes de inhibición de crecimiento de *Colletotrichum* spp. de entre 50,00 y 56,67%, sin embargo, estos dos

aislados sí presentaron diferencias estadísticas respecto al aislado TFC14-06 el cual presentó un 74,44% inhibición de crecimiento del patógeno. Los aislados TFC14-04 y TFC14-05 no se diferenciaron estadísticamente entre sí, observándose porcentajes de inhibición de crecimiento de 67,78 a 71,11%. Estos valores son superiores a los registrados por Franco y Orrego Fuente (2013) quienes observaron 50,2% como máxima de inhibición de crecimiento del patógeno de suelo *Macrophomina phaseolina* al seleccionar aislados nativos de *Trichoderma* spp. para el tratamiento de semillas de soja.

### **Efecto de aislados nativos de *Trichoderma* sobre la producción de frutilla en condiciones de campo**

No se hallaron diferencias significativas entre las plantas de frutilla tratadas con la suspensión de *Trichoderma* spp. y las no tratadas (testigo) en cuanto al efecto sobre el número total de frutas cosechadas semanalmente, registrándose un promedio de 24 frutas/planta para las tratadas con *Trichoderma* spp. y 22 frutas/planta para el testigo. No se observaron efectos fitotóxicos de la suspensión de esporas de *Trichoderma* spp. sobre las plantas o los frutos cosechados semanalmente. Tampoco se verificaron diferencias significativas en cuanto al efecto de la aplicación de la suspensión de *Trichoderma* sobre la



**Figura 3.** AUDPC para antracnosis en cultivos de frutilla de la variedad Dover tratadas con la suspensión de *Trichoderma* spp. NS\*: Diferencia no significativa al 5% de probabilidad de error. Caacupé, Paraguay. 2014.

incidencia de antracnosis en frutos de frutilla (Figura 3). Posibles causas de esto podrían ser la falta de inóculo de *Colletotrichum* spp. o condiciones poco favorables para el desarrollo de la enfermedad dando como resultado una baja incidencia. La inoculación de plantas en forma natural en condiciones de campo es muy arriesgada, debido a que, en casos como este, la baja presión de la enfermedad no permite observar diferencias significativas entre tratamientos. Se deberán centrar esfuerzos de manera a superar esta dificultad asegurando condiciones favorables para la enfermedad que posibiliten la evaluación de bioinsumos destinados a la protección vegetal (Budge y Whipps, 1991; Barratt, Moran, Bigler & van Lenteren, 2018).

De la misma manera no se observó control de la enfermedad causada por *Macrophomina phaseolina* en plantas de sésamo previamente tratadas con el producto comercial Trichonat® (Natural Rural S.A., Araraquara-SP, BR) formulado a base de cepas de *Trichoderma* nativas del Brasil. Sin embargo, sí se observó el efecto de la aplicación del formulado sobre la longitud de las raíces y altura de las plantas (Colman, 2011). Este efecto no fue observado durante las aplicaciones de la suspensión de esporas de aislados de *Trichoderma* paraguayos previamente seleccionados en pruebas *in vitro* en este trabajo. Por el contrario, los resultados en este experimento sí concuerdan con Orrego Fuente et al. (2010) quienes obtuvieron observaciones inconsistentes durante evaluaciones del efecto de las aplicaciones foliares de los productos comerciales Trichonat® y Biorrent® para el control de enfermedades en menta (*Mentha arvensis* L).

Esto genera cuestionamientos acerca de las metodologías más adecuadas que podrían utilizarse para el *screening* de cepas nativas de *Trichoderma*

spp.. Primeramente, información acerca del modo de acción y efectos ambientales (humedad, temperatura, radiación) deben ser obtenidos de experimentos *in vitro*. Posteriormente, se debe poner énfasis en el uso de bioensayos que permitan evaluar las condiciones ambientales requeridas para la efectiva implementación del control biológico (Steyaert et al., 2016).

Ensayos *in vitro* fueron la norma para el estudio de agentes de control biológico durante 1980 e inicios de los años 1990, época durante la cual la mayoría de los trabajos pioneros sobre control biológico fueron llevados a cabo. Subsiguientemente, la mayoría de estos ensayos implicaron ensayos con plantas en invernadero o campo (Whipps, 1987; Budge y Whipps 1991; Bunbury-Blanchette & Walker, 2019). Durante estos experimentos reducciones en la incidencia de enfermedades fueron reportados, pero solo parcialmente, lo cual es inconveniente para los productores que esperan obtener un control total de la enfermedad (Bennett, Leifert & Whipps, 2003).

El Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA) con el apoyo del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) ha impulsado la investigación para el desarrollo y producción de bioinsumos para control biológico de enfermedades principalmente dirigido a pequeños productores hortícolas (Chiriboga et al., 2015). El uso y comercialización de productos a base de aislados de *Trichoderma* nativos del Paraguay como agente de control biológico en un programa de manejo integrado (MIP) para pequeños productores todavía tiene un largo camino. Primeramente, el *screening* de cepas a gran escala es todavía requerido de manera a encontrar cepas de *Trichoderma* que controlen enfermedades bajo condiciones ambientales específicas. Cualquier aislado candidato que tenga

éxito en esta fase deberá ser apropiadamente caracterizado taxonómica y fisiológicamente de manera a asegurar un control reproducible bajo las condiciones de campo. Posteriormente, formular estos aislados de manera que puedan ser distribuidos y aplicados por los productores. Finalmente, será necesaria la realización del registro del formulado en el Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas (SENAVE), este proceso por sí mismo puede tomar mucho tiempo y ser una limitante para obtener un bioinsumo a base de cepas nativas paraguayas en corto tiempo. Aún queda pendiente la discusión de si cepas promotoras de crecimiento deben ser registradas como tales o como defensivos agrícolas. Para ello, más experimentos que permitan identificar los mecanismos de acción de los aislados de *Trichoderma* son necesarios, siendo la inducción de resistencia y promoción de crecimiento uno de estos mecanismos (De Meyer, Bigirimana, Elad & Höfte, 1998; Lamdan, Shalaby, Ziv, Kenerley & Horwitz, 2015).

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En las condiciones en las que se realizaron los experimentos y en base a los resultados obtenidos se concluye que:

- Los aislados de *Trichoderma* spp. obtenidos de diferentes parcelas de frutilla presentan diferencias en cuanto a la velocidad media de crecimiento, el grado de sobreposición micelial y su capacidad de inhibición de crecimiento de *Colletotrichum* spp. *in vitro*. Los aislados de *Trichoderma* spp. TFC14-04, TFC14-06, TFC14-05 seleccionados durante las pruebas *in vitro* presentan potencial antagónico ante *Colletotrichum* spp.. Se recomienda realizar experimentos que permitan identificar otros posibles mecanismos de acción de los diferentes aislados de *Trichoderma*, así como la identificación a nivel de especies utilizando técnicas de biología molecular.

- No se observan diferencias significativas en cuanto al efecto de la aplicación de la suspensión de esporas de aislados nativos de *Trichoderma* TKC14-03, TFC14-06 y TFLE-08 sobre el número de frutos de frutilla cosechados durante los ensayos de campo. Tampoco se observan efectos significativos sobre el número de frutos con síntomas de antracnosis entre los tratamientos testigo y tratados en condiciones de infección natural del fitopatógeno. Para futuros estudios se recomienda realizar inoculaciones artificiales con el patógeno durante ensayos de campo y al mismo tiempo ensayos de invernadero donde las condiciones ambientales puedan ser controladas.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos por la ayuda con la preparación y aplicación de la suspensión

de *Trichoderma* spp. y evaluación de los ensayos de campo a Lilian Mabel Cabrera, Miguel Cabrera, Miriam Trabuco y Gregorio Bozzano del Programa de Investigación de Cultivos Olerícolas (PICO) del Centro de Investigación Hernando Bertoni, Caacupé. También agradecer al Instituto Interamericano de Cooperación Agrícola (IICA) por el apoyo y la colaboración para la realización de esta investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguado, A., Pastrana, A.M., De Los Santos, B., Romero, F., Sánchez, M. C. & Capote, N. (2014). Efficiency of natural products in the control of *Colletotrichum acutatum* monitored by real-time PCR. *Acta Horticulturae*, 1049, 329-334. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1049.44>.
- Bae, S. J., Mohanta, T. K., Chung, J. Y., Ryu, M., Park, G., Shim, S.,...Bae, H. (2016). *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. *Biological Control*, 92, 128-138. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.10.005>.
- Barratt, B. I. P., Moran, V. C., Bigler, F. & van Lenteren, J. C. (2018). The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future. *BioControl*, 63(1),155-167. DOI:<https://doi.org/10.1007/s10526-017-9831-y>.
- Barnett, H. L. & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. The American Phytopathological Society. Washington State University, Pullman. APS Press. USA. St. Paul, Minnesota USA : Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 218 p.
- Bell, D. K., Wells, H. D. & Markham, C. R. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72, 379-382. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-77-379>.
- Benítez-Díaz, P., Miranda-Contreras, L., Balza-Quintero, A., Sánchez-Gil, B. & Molina-Morales, Y. (2015). Residuos de plaguicidas en fresa (*Fragaria x ananassa*) cosechada en una región agrícola del Estado Mérida, Venezuela. *Bioagro*, 27(3), 181-188.
- Bennett, A.J., Leifert, C. & Whipps, J. M. (2003). Survival of the biocontrol agents *Coniothyrium minitans* and *Bacillus subtilis* MBI 600 introduced into pasteurised, sterilised and non-sterile soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(12), 1565-1573. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.08.001>.
- Budge, S.P. & Whipps, J.M. (1991). Glasshouse trials of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma* species for the biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in celery and lettuce. *Plant Pathology*, 40(1), 59-66. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1991>.

tb02293.x

Estadístico Ambiental 2016.pdf.

- Bunbury-Blanchette, A.L. & Walker, A.K. (2019). *Trichoderma* species show biocontrol potential in dual culture and greenhouse bioassays against *Fusarium* basal rot of onion. *Biological Control*, 130, 127-135. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.11.007>.
- Carvalho, D. D. C., Inglis, P. W., Ávila, Z. R. de, Martins, I., Muniz, P. H. P. C. & Mello, S. C. M. de. (2018). Morphological characteristics and genetic variability of *Trichoderma* spp. from conventional cotton crop soils in Federal District, Brazil. *Journal of Agricultural Science*, 10(8), 146-155. DOI: <https://doi.org/10.5539/jas.v10n8p146>.
- Chamorro, M., Aguado, A. & De los Santos, B. (2016). First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain. *Plant Disease*, 100(7), 1495. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1308-PDN>.
- Chiriboga, H., Gómez, G. y Garces, K. (2015). *Protocolos para formulación y aplicación del bio-insumo: Trichoderma spp. para el control biológico de enfermedades*. Asunción, PY: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 28 p.
- Colman A.A. (2011). Tratamiento químico y biológico en semillas de sésamo (*Sesamum indicum* L.) para el control de *Macrophomina phaseolina*. Tesis Ing. Agr. Carrera de Ingeniería Agronómica. San Lorenzo, PY : FCA, UNA, 50 p.
- De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y. & Höfte, M. (1998). Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 104(3), 279-286. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1008628806616>.
- Di Rienzo, J.A., Balzarini, M.G., Robledo, C.W., Casanoves, F., González, L.A. & Tablada, E.M. (2008). InfoStat Manual del Usuario. 1ra Ed. Editorial Brujas. Córdoba, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, 336 p.
- Diáñez Martínez, F., Santos, M., Carretero, F. & Marín, F. (2016). *Trichoderma saturnisporum*, a new biological control agent. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(6), 1934-1944. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.7301>.
- Dirección General de Estadística Encuestas y Censos. (2016). *Compendio estadístico ambiental del Paraguay 2016*. Asunción : DGEEC, 115 p. Disponible en [http://www.dgeec.gov.py/Publicaciones/Biblioteca/compendio\\_ambiental\\_2016/Compendio](http://www.dgeec.gov.py/Publicaciones/Biblioteca/compendio_ambiental_2016/Compendio)
- Doldán Larrea, L.C.A. y González, J.D. (2013). Influencia de las organizaciones de productores en los resultados productivos y económicos en el cultivo de frutilla en la Compañía Estanzuela de Itaugua. *Investigación Agraria* 9(1), 38-43.
- Franco, B. M. y Orrego Fuente, A. L. (2013). Compatibilidad *in vitro* de aislados nativos de *Trichoderma* spp. con fungicidas para el tratamiento de semillas. *Investigación Agraria*, 15(1), 15-22.
- Fernández-Larrea Vega, O. (2001). *Avances en el fomento de productos fitosanitarios no sintéticos (en línea). Manejo Integrado De Plagas (Costa Rica)* (62), 96-100. DOI: <https://doi.org/10.1080/09583150310001517992>.
- French, E.R. y Hebert, T.T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica*. San José (Costa Rica).: IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura), 43 p.
- Gamarra Sosa G. (2013). *Control biológico de hongos fitopatógenos del suelo con aislados de Trichoderma spp. en el cultivo de ka'á he'e (Stevia rebaudiana [Bertoni] Bertoni)* Tesis Ing. Agr. San Lorenzo, PY, Carrera de Ingeniería Agronómica. San Lorenzo : FCA, UNA, 51 p.
- Garcete Gómez, J.M. y Orrego Fuente, A.L. (2011). Efecto de aislados nativos de *Trichoderma* spp. en la incidencia de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid en sésamo (*Sesamum indicum* L.) *Effect. Investigación Agraria*, 422(2), 87-93.
- Garrido, C., Carbú, M., Fernández-Acero, F. J., Boonham, N., Colyer, A., Cantoral, J. M. & Budge, G. (2009). Development of protocols for detection of *Colletotrichum acutatum* and monitoring of strawberry anthracnose using real-time PCR. *Plant Pathology*, 58(1), 43-51. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01933.x>.
- Gétaz, M., van der Wolf, J.M., Blom, J. y Pothier, JF. (2017). Complete genome sequences of three isolates of *Xanthomonas fragariae*, the Bacterium Responsible for angular leaf spots on strawberry plants. *Genome Announcements*, 5(32):e00642-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00642-17>.
- Grabowski, C., Orrego A. y Soilán, L. (2014). Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe". En: Bettiol, W., Rivera, M. C., Mondino, P. y Montealegre, J. R., eds. *Control biológico de enfermedades de plantas en Paraguay*, pp. 309-321
- Han, Y. C., Zeng, X.G., Xiang, F. Y., Ren, L., Chen, F. Y. &

- Gu, Y. C. (2016). Distribution and characteristics of *Colletotrichum* spp. Associated with anthracnose of strawberry in Hubei, China. *Plant Disease*, 100(5), 996-1006. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-15-1016-RE>.
- Han, Y. C., Zeng, X. G., Xiang, F. Y., Zhang, Q. H., Guo, C., Chen, F.Y. & Gu Y. Chen. (2018). Carbendazim sensitivity in populations of *Colletotrichum gloeosporioides* complex infecting strawberry and yams in Hubei Province of China. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(6), 1391-1400. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61854-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61854-9).
- Insaurralde, L., Sanabria Velázquez, A., Verdina, D., Sotelo, P. & Barúa, J. (2017). Isolation and characterization of native *Trichoderma* spp. and phytopathogenic fungi in Paraguay. In IV Congreso Nacional de Ciencias Agrarias. FCA/UNA (ed.). Asunción, PY: FCA/UNA, p. 1071-1074.
- Lamdan, N. L., Shalaby, S., Ziv, T., Kenerley, C. M. & Horwitz, B.A. (2015). Secretome of the biocontrol fungus *Trichoderma virens* co-cultured with maize roots: role in induced systemic resistance. *Molecular & cellular proteomics*, 14(4), 1054-1063. DOI: <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.046607>.
- Louzada, G. A. S., Barbosa, H. N., Carvalho, D. D. C., Martins, I., Junior, M. L. & Mello, S. C. M. (2016). Relações entre testes com metabólitos e seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum*. *Revista Brasileira de Biociências*, 14(1), 9-14.
- McInnes, T.B., Black, L.L. & Gatti, J. (1992). Disease-free plants for management of strawberry anthracnose crown rot. *Plant Disease*, 78(3), 260-264. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-76-0260>.
- Mochizuki, M., Yamamoto, S., Aoki, Y. & Suzuki, S. (2012). Isolation and characterisation of *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 as a biological control agent for anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Biocontrol Science and Technology*, 22(6), 697-709. DOI: <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.679644>.
- Neri, D., Baruzzi, G., Massetani, F. & Faedi, W. (2012). Strawberry production in forced and protected culture in Europe as a response to climate change. *Canadian Journal of Plant Science*, 92(6), 1021-1036. DOI: <https://doi.org/10.4141/CJPS2011-276>.
- Orrego Fuente A. L., Pino C. D. & Rodríguez H. N. (2010). Evaluación de productos para control del complejo de enfermedades foliares de la *Mentha arvensis* L. en Mayor Otaño (Itapúa- Paraguay). Informe final. San Lorenzo: FCA, UNA, pp. 194-202
- Paulus, A.O. (1990). Fungal Diseases of Strawberry. *HortScience*, 25(8), 885-889. DOI: <https://doi.org/10.21273/hortsci.25.8.885>.
- Paynter, M., Gomez, A., Ko, L. & Herrington, M.E. (2016). Research into crown rot and wilt diseases of strawberries in Queensland. XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014): II 1117, pp. 163-170). DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1117.26>.
- Petrasch, S., Knapp, S. J., van Kan, J.A.L. & Blanco-Ulate, B. (2019). Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 20 (6), 877-892. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12794>.
- Roberts, D.P., Lakshman, D.K., McKenna, L.F., Emche, S.E., Maul, J.E. & Bauchan, G. (2016). Seed treatment with ethanol extract of *Serratia marcescens* is compatible with *Trichoderma* isolates for control of damping-off of cucumber caused by *Pythium ultimum*. *Plant Disease*, 100(7), 1278-1287. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-15-1039-RE>.
- Sanabria Velázquez, A. D. y Grabowski, C.J. (2016). Control biológico de *Rosellinia* sp. causante de la muerte súbita en macadamia (*Macadamia integrifolia*) con aislados de *Trichoderma* spp. *Investigación Agraria*, 18(2), 7-86. DOI: <https://doi.org/10.18004/investig.agrar.2016.diciembre>.
- Sawangri, P., Pengnoo, A., Suwanprasert, J. & Kanjanamaneesathian, M. (2007). Effect of *Trichoderma harzianum* biomass and *Bradyrhizobium* sp. strain NC 92 to control leaf blight disease of bambara groundnut (*Vigna subterranea*) caused by *Rhizoctonia solani* in the field. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 29(1), 15-24.
- Steyaert, J., Hicks, E., Kandula, J., Kandula, D., Alizadeh, H., Braithwaite, M., Yardley, J. & Mendoza-Mendoza, A. (2016). Methods for the evaluation of the bioactivity and biocontrol potential of species of *Trichoderma*. In: Glare T., Moran-Diez M. (eds) *Microbial-Based Biopesticides. Methods in Molecular Biology*, 1477. Humana Press, New York, NY. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6367-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6367-6_3).
- Whipps, J. M. (1987). Effect of media on growth and interactions between a range of soilborne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytologist*, 107(1), 127-142. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb04887.x>.