



# Efecto del fungicida Metalaxyl sobre la germinación, crecimiento y capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* en condiciones de laboratorio

Effect of the Metalaxyl fungicide on the germination, growth and antagonistic capacity of *Trichoderma asperellum* under laboratory conditions

Astrid Argomedeo<sup>1</sup>, Shirley Rodríguez-Reyes<sup>1</sup>, Carolina Rodríguez-Torres<sup>1</sup>, Miguel Saldaña<sup>1</sup>, Wendy Santos<sup>1</sup> y Juan Wilson Krugg<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú.

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología

## RESUMEN

Se determinó el efecto de las concentraciones (262.5 ppm, 350 ppm y 437.5 ppm) del fungicida Metalaxyl sobre la germinación, crecimiento y capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum*. El efecto del fungicida sobre la germinación de esporas se determinó colocando 1 mL de cada concentración del fungicida en frascos, adicionando 1 mL de la suspensión de esporas, con lo cual se obtuvo una concentración final de  $1 \times 10^5$  esporas/mL, incubándose a  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ , durante 24 horas. Para determinar el efecto del fungicida sobre el crecimiento de *T. asperellum*, se sembró en la parte central de las placas Petri de acuerdo a su correspondiente concentración de fungicida agrícola incubándose a  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$  durante 7 días. Y para la determinación del efecto sobre la capacidad antagónica de *T. asperellum*, se sembró micelio procedente de enfrentamientos con Metalaxyl a las concentraciones establecidas y *Rhizotocnia solani* de manera separada y en puntos equidistantes en Agar Papa Dextrosa e incubados a  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$  por 7 días. Se encontró que a medida que la concentración de Metalaxyl aumenta, el porcentaje de germinación de *T. asperellum* disminuye. El porcentaje de crecimiento, obtenido fue 83 %, 63% y 60% a las concentraciones de 262.5 ppm, 350ppm, 437.5 ppm de Metalaxyl, respectivamente. Además *T. asperellum* presentó antagonismo de grado 1 sobre *R. solani*, según la escala de Bell. Al incrementarse las concentraciones de metalaxyl de 262.5 ppm, 350ppm, 437.5 ppm, disminuyó el porcentaje de germinación de esporas, sin embargo no afecta de modo significativo los procesos de crecimiento y actividad antagónica de *Trichoderma asperellum*.

**Palabras clave:** *Trichoderma asperellum*, *Rhizotocnia solani*, metalaxyl, germinación, crecimiento

## ABSTRACT

Effect of the concentrations (262.5 ppm, 350 ppm and 437.5 ppm) of the fungicide Metalaxyl on the germination, growth and antagonistic capacity of *Trichoderma asperellum* was determined. The effect of the fungicide on spore germination was determined by placing 1 mL of each fungicide concentration in vials, adding 1 mL of the spore suspension, resulting in a final concentration of  $1 \times 10^5$  spores/mL, incubated at  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$  for 24 hours. To determine the effect of the fungicide on the growth of *T. asperellum*, it was planted in the central of Petri dishes according to their corresponding concentration of agricultural fungicide; this was incubated at  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$  for 7 days. As well as, for the determination of the effect on the antagonistic capacity of *T. asperellum*, mycelium was harvested from the confrontation with Metalaxyl at the established concentrations and *Rhizotocnia solani* separately and at equidistant points, in Papa Dextrose Agar and incubated at  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$  per 7 days. It was found that as the concentration of Metalaxyl increases, the percentage of germination of *T. asperellum* decreases. The percentage growth obtained was 83%, 63% and 60% at the concentrations of 262.5 ppm, 350 ppm, 437.5 ppm of Metalaxyl, respectively. In addition, *T. asperellum* presented grade 1 antagonism on *R. solani*, according to the Bell scale. As metalaxyl concentrations increased from 262.5 ppm, 350 ppm, 437.5 ppm, the percentage of spore germination decreased, however, this does not significantly affect the growth processes and antagonistic activity of *Trichoderma asperellum*.

**Keywords:** *Trichoderma asperellum*, *Rhizotocnia solani*, metalaxyl, germination, growth

## INTRODUCCIÓN

La mayor parte de los problemas fitosanitarios son causados por hongos, insectos y virus, quienes colonizan diversas partes de la planta, provocando desde la disminución de la calidad del producto y hasta la pérdida total de la planta.<sup>1</sup> El control químico se emplea para reducir las poblaciones de especies de plagas que se elevan a niveles peligrosos cuando las presiones ambientales son inadecuadas. El control químico es solamente necesario en esos momentos y lugares donde el control natural es insuficiente.<sup>2</sup> Dentro de los controladores químicos tenemos a metalaxil [(R, S) -metil-N-(2-metoxiacetil) -N-(2,6-xililo) -D, L-alaninato] que es una acilanilida, fabricado por primera vez por la Ciba-Geigy Corporation en 1977.<sup>3</sup> Es un fungicida sistémico, altamente activo contra hongos de orden Peronosporales, que causan el tizón tardío, el mildiu, podredumbre húmeda, y pudrición de las fruta de muchas plantas<sup>4</sup>

El control biológico es parte del control natural que regula la densidad de población de especies de plagas.<sup>2</sup> Con el empleo de la lucha o control biológico se intenta restablecer el perturbado equilibrio ecológico, mediante la utilización de organismos vivos o sus metabolitos, para eliminar o reducir los daños causados por organismos perjudiciales.<sup>5</sup> Dentro de los organismos emplados como controladores biológicos tenemos al género *Trichoderma* que pertenece al phylum Ascomycota, orden Hypocreales, Hypocreaceae familia y corresponde a los hongos filamentosos que son de vida libre y ampliamente distribuido en la naturaleza. Una de las principales características de este género es su capacidad para actuar como un agente de control biológico (BCA) contra organismos fitopatógenos tales como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp.<sup>6,7</sup>

El control biológico basado en hongos como *Trichoderma*, es una estrategia efectiva a largo plazo, ya que es necesaria la adaptación del microorganismo al ambiente y su establecimiento en los ecosistemas, mecanismo muy diferente al de los productos químicos, que son compuestos inertes. Todos estos aspectos deben tenerse en cuenta para el manejo integrado de enfermedades de plantas.<sup>8</sup>

Debido a que *Trichoderma* es uno de los controladores biológicos más utilizados contra diversos fitopatógenos que habitan en el suelo, para cuyo control se usan fungicidas como el Metalaxyl, es por eso que se hace necesario realizar estudios acerca del efecto que puede tener este fungicida sobre el mencionado hongo, a fin de poder establecer si ambos se pueden aplicar juntos dentro de un programa de control de plagas; y así planear los tratamientos fúngicos o químicos adecuados para minimizar cualquier efecto nocivo en la eficacia de *T. asperellum*, por tal razón, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo determinar el efecto del fungicida Metalaxyl sobre la germinación, el crecimiento y capacidad antagonista de *T. asperellum*, en condiciones de laboratorio.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Cultivos:

Los cultivos puros de *Trichoderma asperellum* y *Rhizotocnia solani* fueron proporcionados por la cátedra de Fitopatología del departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo. El cultivo de *T. asperellum*, joven de 6 meses, identificado molecularmente en EEUU. Asimismo se utilizó un frasco del Fungicida Fitoklin, cuyo principio activo es el Metalaxyl.

### Reactivación del cultivo de *T. asperellum* y obtención de cultivos monospóricos:

Para la reactivación de *Trichoderma asperellum*, a partir del cultivo puro, se sembró en frascos planos de vidrio con Agar papa dextrosa inclinado y luego se incubó a 25°C durante 7 días, posteriormente se sembró en 5 tubos conteniendo APD inclinado incubándose a 25°C por 7 días.

### Evaluación del efecto de Metalaxil sobre la germinación de esporas de *T. asperellum*

La preparación de las soluciones doble concentradas de Metalaxil, se hizo mediante diferentes diluciones de Metalaxil en agua destilada estéril hasta alcanzar las concentraciones de 262.5 ppm, 350 ppm y 437.5 ppm a partir del producto original.

El inóculo de esporas se obtuvo agregando 50 mL de agua destilada estéril a cada frasco plano de vidrio agitándolo moderadamente a fin de liberar las esporas del hongo. La suspensión resultante se colocó en un matraz estéril determinándose la concentración de esporas mediante recuento en cámara de Neubauer, diluyéndose hasta una concentración final de  $1 \times 10^3$  esp/mL. Inoculación e incubación: Se colocó 2 mL de cada dilución de Metalaxil doble concentrado en tubos de ensayo estériles, a los

cuales se les agregó 2mL de la suspensión de esporas obtenida previamente, con lo cual se obtuvo una dilución de  $5 \times 10^2$  esp/mL y concentraciones finales de Metalaxil de 262.5 ppm, 350 ppm y 437 ppm. Se preparó también una suspensión de esporas control, agregándole 2 mL de la suspensión de esporas en 2mL de agua destilada estéril. Cada suspensión de esporas en las diferentes concentraciones del fungicida y el control posteriormente se incubaron a temperatura ambiente por 12-24 horas. Luego del periodo de incubación (24 horas), se colocó 5 gotas de azul de lactofenol en cada frasco que contenía la suspensión de esporas en cada concentración (0 ppm, 262.5 ppm, 350 ppm y 437 ppm) con el fin de para observar en el microscopio la presencia de esporas germinadas y no germinadas y hacer el conteo respectivo.

#### **Evaluación del efecto del Metalaxil sobre el crecimiento de *T. asperellum*:**

Preparación del medio de cultivo: Se preparó Agar papa dextrosa en cuatro matraces conteniendo 100 mL de medio cada uno. El medio de cultivo se esterilizó en olla a presión y se dejó enfriar hasta una temperatura aproximada de 50 °C. Estando aún fundido el medio, a tres de los matraces se les adicionó Metalaxil en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 437.5, 350 y 262.5 ppm., respectivamente. Al medio contenido en el matraz restante no se le agregó el fungicida, a fin de utilizarlo como control. Luego, el medio de cultivo se sirvió en placas de Petri estériles (cuatro placas por cada concentración, incluyendo el control).

Siembra e incubación: Se sembró por puntura *T. asperellum* en cada placa de Petri de cada una de las concentraciones del fungicida preparadas en el paso anterior, además del grupo control. Luego se incubará a 25°C por 5 días. A partir del primer día de siembra, y hasta el quinto día, se midió el radio de crecimiento (mm.) de la colonia en diferentes direcciones, obteniéndose un radio promedio de crecimiento por día por cada concentración de fungicida y el grupo control. Los resultados de crecimiento de *T. asperellum* se expresaron en milímetros (mm) y en porcentaje de crecimiento (%C), teniendo en cuenta el crecimiento alcanzado por el grupo control (100%), de la siguiente manera:

$$\%C = \frac{\text{RADIO PROBLEMA DE LA COLONIA PROBLEMA}}{\text{RADIO PROBLEMA DE LA COLONIA TESTIGO}} \times 100$$

#### **Evaluación de la capacidad antagonista de *T. asperellum* con *R. solani* luego de ser sometido al enfrentamiento con el metalaxyl.**

Efecto antagonístico de *T. asperellum* sobre *R. solani* mediante el método de cultivo dual: La prueba de enfrentamiento se realizó empleando la técnica de cultivo dual. Para ello se utilizaron placas de Petri con 10 mL de medio de cultivo PDA (Agar Papa Dextrosa). Se colocaron en un extremo de la placa de Petri por puntura micelio del hongo patógeno (*R. solani*) y en el extremo opuesto se sembró micelio de *T. asperellum*, que creció en la concentración de 262.5 ppm, 350 ppm y 437.5 ppm de Metalaxyl, con distancia de 4.5 cm aproximadamente entre ellos. Como testigo se colocó en una placa de Petri *R. solani* en un extremo con la presencia de *T. asperellum*. Posteriormente, los cultivos se incubaron a 27 °C hasta el contacto de antagonista y patógeno. Se procedió de manera similar por cada placa en donde se evidenció crecimiento de *Trichoderma asperellum* en las concentraciones del químico.

Se tomó como índice de antagonismo la invasión del antagonista sobre la superficie del micelio patógeno tomando en cuenta la escala mostrada en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Escala de evaluación del antagonismo in vitro, tomando en cuenta la invasión de la superficie, colonización y esporulación de *Trichoderma asperellum* sobre *Rhizoctonia solani*.

Grado de capacidad antagonística	Observación macroscópica
1	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo
2	Invasión de ¼ de la superficie de la colonia del hongo patógeno
3	Invasión de ½ de la superficie de la colonia del hongo patógeno
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno
5	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno, esporulación sobre ella

### Análisis de datos

La determinación del efecto del fungicida Metalaxil sobre *T. asperellum*, se realizó analizando el porcentaje de germinación y el porcentaje de crecimiento de *T. asperellum*, en las diferentes concentraciones de Metalaxil, procesando los datos en base a la prueba de Análisis de Varianza Unidireccional (ANOVA). El antagonismo se evaluó comparando las velocidades de crecimiento, de *R. solani* de *T. asperellum* y del testigo.

## RESULTADOS

Se encontró que el porcentaje de germinación de esporas de *T. asperellum* disminuye a medida que aumenta la concentración del fungicida metalaxyl en un rango de 262.5 ppm a 437 ppm (Fig, 1) y la concentración del fungicida metalaxyl en un rango de 262.5 ppm a 437.5 ppm (Fig 2). Asimismo, se encontró antagonismo de grado 1 entre *T. asperellum* y *R. solani* (Fig, 3).

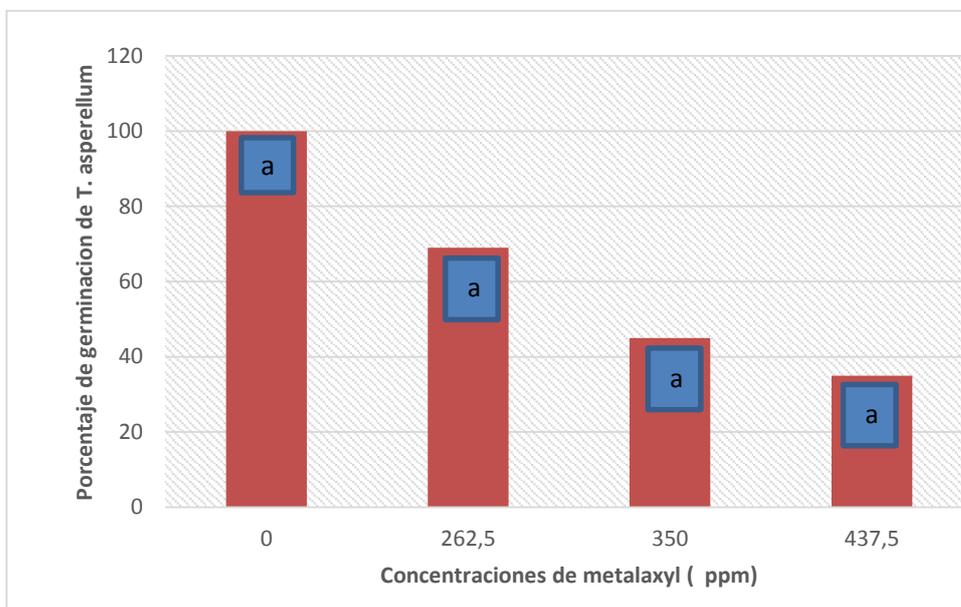
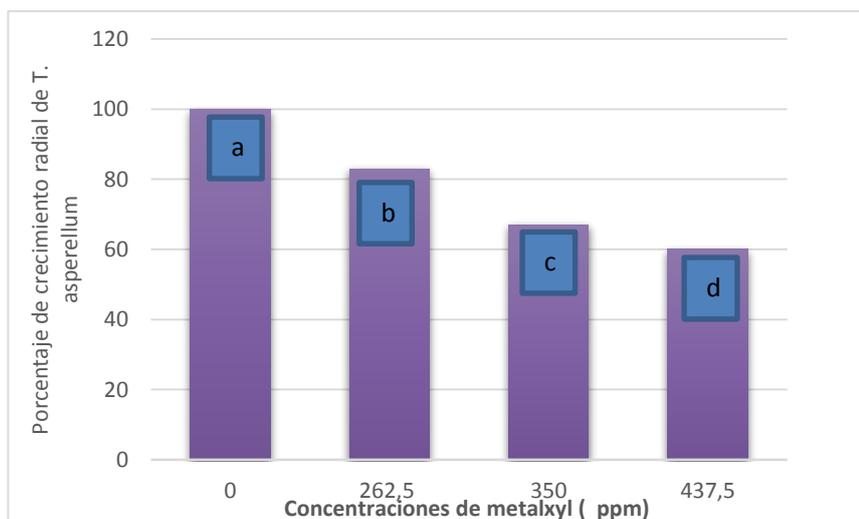
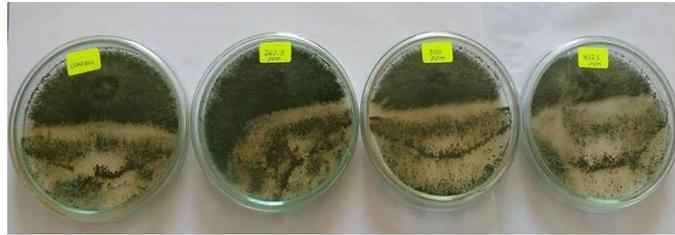


Fig.1. Porcentaje de germinación de *Trichoderma asperellum* frente a diferentes concentraciones (ppm) de Metalaxyl a las 24 horas de incubación. (a:  $p < 0.05$ , existe diferencia significativa).



**Fig.2** Porcentaje de crecimiento de *Trichoderma asperellum* frente a diferentes concentraciones (ppm) de metaxyl en condiciones de laboratorio y 5 días de incubación. (a, b, c, d:  $p>0.05$ , no existe diferencia significativa)



**Fig. 3.** Antagonismo grado 1 (Según la escala de bell)<sup>13</sup> sobre *Rhizoctonia solani* que presenta *Trichoderma asperellum* procedente de enfrentamientos con metalaxyl a las concentraciones de 262.5 ppm, 350 ppm, 437.5 ppm y control.

## DISCUSIÓN

El análisis estadístico revela que entre las concentraciones 262.5 ppm, 350ppm y 437.5 ppm del fungicida metalaxyl existe diferencia significativa; es decir, causan inhibición de la germinación de *T. asperellum* presentando valores de 69 %, 45 % y 35% respectivamente. Estudios realizados por Boucias et al. Establecen una probable explicación para la inhibición de la germinación de esporas; ellos demostraron que el tratamiento de las esporas de los hongos con productos agroquímicos, tanto iónicos como moleculares, pueden neutralizar la carga electrostática de la superficie y/o remover la capa mucosa que recubre la espora, afectando así el proceso de reconocimiento de sustrato y la transducción de las señales de iniciación de la germinación<sup>9</sup>.

En relación a los resultados obtenidos sobre el porcentaje de crecimiento de *T. asperellum*, se puede observar que hubo una leve disminución del crecimiento conforme aumentó la concentración del fungicida metalaxyl, presentando las concentraciones de 262.5 ppm, 350 ppm y 437.5 ppm valores de 83 %, 63 % y 60% respectivamente. Así pues pese a que el porcentaje de crecimiento fue mucho menor a la concentración 437.5, en comparación con el control (0 ppm); al realizar el análisis estadístico se puede comprobar que no existe diferencia significativa entre las concentraciones 0 ppm, 262.5 ppm, 350 ppm y 437.5 ppm del fungicida metalaxyl, es decir estadísticamente son iguales y por lo tanto no producen ningún efecto sobre el crecimiento de *T. asperellum*. Pasado los 5 días de incubación *T. asperellum* cubrió completamente la placa con medio Agar Papa Dextrosa, con las concentraciones del fungicida, incluida la placa control. Esto implica que el agroquímico evaluado no afecta de forma significativa los procesos que ocurren en la pared celular durante el desarrollo del hongo así como no produciría cambios en la actividad metabólica a nivel vesicular pues *T. asperellum* tendría la energía suficiente para efectuar su crecimiento<sup>10</sup>.

Cabe indicar además que el efecto inhibitorio de los fungicidas sobre el crecimiento de *T. asperellum* es mucho menor que el producido sobre la germinación, debido a que durante el crecimiento el hongo presenta un mayor número de mecanismos que le permiten resistir el efecto de este fungicida<sup>10</sup>.

Los aislamientos de *T. asperellum* evaluados en la prueba de antagonismo (0 ppm, 262.5 ppm, 350 ppm y 437.5 ppm), se ubicaron en la categoría I de la escala de Bell et al. *T. asperellum* cubrió completamente al patógeno *R. solani*. Las especies de *Trichoderma* regularmente presentan resultados satisfactorios en las pruebas de Antagonismo. Esto ha sido observado en experimentos realizados por Bell et al, quienes hallaron que un 65% de las cepas de este hongo se ubicaron en la clase I al evaluarse contra *R. solani* G-2 y un 85% se ubicó en la clase II al evaluarse contra el mismo hongo *R. solani* AG-3<sup>11</sup>.

Cabe indicar que resultan escasos los informes sobre la compatibilidad de *Trichoderma* con productos químicos que son aplicados en los cultivos donde se utiliza. Posiblemente esto se deba a que se ha señalado que *Trichoderma* posee resistencia innata a la mayoría de los agroquímicos, incluyendo los fungicidas<sup>12</sup>. En conclusión, el fungicida Metalaxyl a las concentraciones de 262.5 ppm, 350 ppm y 437.5 ppm afecta la germinación de las esporas de *T. asperellum*, disminuyendo la germinación al

incrementarse la concentración de Metalaxyl y el fungicida Metalaxyl a las concentraciones de 262.5 ppm, 350 ppm y 437.5 ppm no afecta significativamente el crecimiento y la actividad antagonista de *T. asperellum*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ibarra JE, Del rincón C. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. Rev Latinoam Microbiol. 2006; 48 (2): 113-120.
2. Stern VM, Smith RF, Van den Bosch R, Hagen KS. The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid. The integrated control concept. Hilgardia. 1959; 29(2): 81-101.
3. Monkiedje A, Spiteller M. Degradation of metalaxyl and mefenoxam and effects on the microbiological properties of tropical and temperate soils. Intern J Environ Res & Public Health, 2005; 2(2), 272-285.
4. Stern VM, Smith RF, Van den Bosch R, Hagen KS. The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid. The integrated control concept. Hilgardia. 1959; 29(2): 81-101.
5. Badii MH, Abreu JL. Biological control a sustainable way of pest control. Daena: Intern J Good Conscience. 2006; 1(1): 82-89.
6. Harman GE. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathol. 2006; 96 (1): 190-194.
7. Schuster A, Schmoll M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Appl Microbiol Biotechnol. 2010; 87(1): 787-799.
8. Guédez C, Cañizaleza L, Castillo C, Olivares R. Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. Rev Soc Venezolana Microbiol, 2012; 32(1): 44-49
9. Boucias N. factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. Appl. Environ. Microbiol. 1988; 54 ( 1) 795-1805
10. Reyes Y, Martínez B, Infante D, García-Borrego J. Efecto de tres herbicidas sobre el crecimiento y la esporulación de *Trichoderma asperellum* Samuels. In Congreso Científico del INCA, XVII, San José de las Lajas, 22-26 nov. 2010. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
11. Bell, D; Well, H; Markham, C. 1982. "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72:379-382.
12. Harman G. *Trichoderma harzianum*, *T. viridis*, *T. koningii*, *T. hamatum* (Deuteromycetes: Moniliales). [en línea] 2003 marzo 3 [Fecha de acceso 7 de febrero de 2008]. URL disponible en: <http://www.ibun.unal.edu.co/r2r7e.htm>  
Bell, D; Well, H; Markham, C. "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 1982; 72:379-382.