Evaluación del efecto de *Equisetum giganteum* L. y *Trichoderma* sobre el crecimiento y desarrollo de *Botrytis cinerea* Whetzel y *Colletotrichum falcatum* Went

Evaluation of the effect of *Equisetum giganteum* L. and *Trichoderma* on the growth and development of *Botrytis cinerea* Whetzel and *Colletotrichum falcatum* Went

María CristinaSandoval[1], María Sol Gilardino[2], Mónica Beatriz Barrios[3], María Victoria Fernández[4], Cecilia Piwowarczuck[5], Andrés Mollá Kralj[6]

[1]maríacristinasandoval2@gmail.com,[2]mariasolgilardino@gmail.com, [3] monicabarrios4@yahoo.com.ar, [4] m.victoria.fernandez5@gmail.com, [5] cecipiwo@gmail.com, [6] andresmollakralj@hotmail.com

[1-2] Cátedra de Fitopatología. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Camino de Cintura y Juan XXIII. 1832 Lomas de Zamora. Argentina.

[3] Cátedras Edafología, y Manejo y Conservación de Suelos. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Camino de Cintura y Juan XXIII. 1832 Lomas de Zamora. Argentina.

[4-5] Cátedra de Fitopatología. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Camino de Cintura y Juan XXIII. 1832 Lomas de Zamora. Argentina. SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria)

[6] Cátedra Botánica Morfológica. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Camino de Cintura y Juan XXIII. 1832 Lomas de Zamora. Argentina

Recibido 29/12/2022; Aceptado: 19/02/2023

Resumen: La preocupación por el cuidado medioambiental y la salud de los productores y consumidores de alimentos ha generado el interés creciente por la utilización de productos naturales para el manejo de enfermedades que afectan a distintos cultivos. Uno de estos productos naturales (bioinsumos) es el obtenido a partir de *Equisetum giganteum* "cola de caballo", cuyo uso está indicado para el manejo de plagas y también de enfermedades de etiología fúngica que afectan a distintos cultivos. En este contexto, se realizó el presente trabajo con los objetivos de evaluar *in vitro* la efectividad de una preparación (decocción) a base de *E. giganteum* sobre el crecimiento y desarrollo de *Botrytis cinerea* (moho gris) y *Colletotrichum falcatum* (antracnosis) patógenos del cultivo de frutilla, y comparar el nivel de efectividad de *E. giganteum* con el de *Trichoderma.* Se utilizaron: cultivos

puros de *B. cinerea* y *C. falcatum* aislados de plantas sintomáticas de frutilla; un aislamiento nativo de *Trichoderma*; y una decocción de *E. giganteum.* La técnica utilizada para medir la efectividad (antagonismo) consistió en cultivos individuales de los patógenos y duales con la decocción y *Trichoderma.* Se observó la disminución del diámetro de colonias de *C. falcatum* en las pruebas con *E. giganteum*, y de *C. falcatum* y *B. cinerea* en las pruebas con *Trichoderma*. Los valores promedio de disminución del diámetro de colonias fueron estadísticamente significativos (p<.01) y los mayores porcentajes (56-58%) se observaron con el uso de *Trichoderma.* Contrariamente a lo esperado, la decocción estimuló levemente el crecimiento de las colonias de *B. cinerea.*

Palabras-clave: Antagonismo; *Equisetum; Trichoderma*; *B. cinerea; C. falcatum.*

Abstract: The concern for environmental care and the health of food producers and consumers has generated a growing interest in the use of natural products for the management of diseases that affect different crops. One of these natural products (bio-inputs) is obtained from *Equisetum giganteum* "horsetail", whose use is indicated for the management of pests and also of diseases of fungal etiology that affect different crops. In this context, the present work was carried out with the objectives of evaluating in vitro the effectiveness of a preparation (decoction) based on *E. giganteum* on the growth and development of *Botrytis cinerea* (gray mold) and *Colletotrichum falcatum* (antracnose) pathogens of the strawberry cultivation; and, compare the level of effectiveness of E. giganteum with that of *Trichoderma*. The following were used: pure cultures of *B. cinerea* and *C. falcatum* isolated from symptomatic strawberry plants; a native *Trichoderma isolate*; and a decoction of *E. giganteum*. The technique used to measure the effectiveness (antagonism) consisted of individual cultures of the pathogens and dual cultures with the decoction and *Trichoderma.* A decrease in the diameter of colonies of *C. falcatum* was observed in the tests with *E. giganteum*, and of *C. falcatum* and *B. cinerea* in the tests with *Trichoderma*. The average values of colony diameter decrease were statistically significant (p<.01) and the highest percentages (56-58%) were observed with the use of Trichoderma. Contrary to expectations, the decoction slightly stimulated the growth of the colonies. colonies of *B. cinerea*.

Keywords*: Antagonism*; *Equisetum*; *Trichoderma; B. cinerea; C. falcatum.*

1. Introducción

La preocupación por el cuidado medioambiental y la salud de los productores y consumidores de alimentos ha generado el interés creciente por la utilización de productos naturales para el manejo de enfermedades que afectan a distintos cultivos. Estos productos denominados bionsumos, incluyen en su composición microorganismos y sus productos, macroorganismos y extractos de plantas (Starobinsky *et al*., 2021). "La definición de bioinsumos incluye (pero no se limita a) biofertilizantes, bioestimulantes, biocontroladores, biorremediadores y/o reductores del impacto ambiental, biotransformadores para el tratamiento de subproductos agropecuarios y bioinsumos para la producción de bioenergía (Bocchetto *et al*.,

2020)" (Starobinsky *et al*., 2021, p. 11). Uno de los bioinsumos de origen vegetal es el producto obtenido a partir de *E. giganteum* "cola de caballo", cuyo uso está indicado para el manejo de plagas y también de enfermedades de etiología fúngica que afectan a distintos cultivos.

E. giganteum "es una planta rizomatosa, de 1-2 m de altura, tallos fistulosos, gruesos, ramificado, con 24-30 costillas, ramas verticiladas, más o menos ásperas. Hojas escamiformes negras, subuladas, unidas entre sí, formando vainas de 6-12 mm de largo. Espigas oblongas, negras, apiculadas. Sudamérica y regiones templadas y templado-cálidas de Argentina". (Parodi, 1978, p. 49). La literatura menciona su uso como biofungicida en general y específicamente para el manejo de mildius, oidio y roya, entre otros (INTA, 2021). Existen investigaciones recientes que muestran el nivel de efectividad de productos a base de cola de caballo en cultivos intensivos y extensivos (Trebbi *et al.*, 2021). Además, en el año 2014, el Reglamento de Ejecución de la Unión Europea Nº 264/2014 aprobó el uso de *E. arvense* L. como fungicida (EFSA, 2020, p. 6).

Existen antecedentes acerca de la aplicación de *Equisetum* y *Trichoderma* para el manejo de *Botrytis* spp., *Podosphaera aphanis, Mycosphaerella fragariae*. y otros hongos fitopatógenos que afectan el cultivo de frutilla (Bertalot *et al.*, 2012; CE, 2013; Amerio *et al.,* 2020). Entre los patógenos mencionados puede señalarse que *B. cinerea* es el agente causal de la podredumbre gris, la enfermedad más importante que afecta el cultivo de frutilla en Argentina (INTA, 2021).

La metodología indicada para la selección de bioinsumos se inicia con la realización de pruebas de efectividad *in vitro* e *in vivo*, a las que siguen las pruebas de multiplicación, formulación, estabilidad e inocuidad (Starobinsky *et al*., 2021). En este contexto, se realizó el presente trabajo con los objetivos de evaluar *in vitro* la efectividad de una preparación a base de *E. giganteum* sobre el crecimiento y desarrollo de *Botrytis cinerea* (moho gris) y *Colletotrichum falcatum* (antracnosis) dos patógenos del cultivo de frutilla; y, comparar el nivel de efectividad de *E. giganteum* con el de *Trichoderma*

2. Materiales y Métodos

Microorganismos patógenos: se utilizaron dos cultivos puros de *B. cinerea* y *C. falcatum* aislados de plantas sintomáticas de frutilla (Figura 1 a-b). Los cultivos fueron mantenidos en agar papa glucosado (APG) por sucesivas transferencias a medio APG fresco.

Figura 1.

Plantas sintomáticas a partir de las cuales se aislaron los patógenos utilizados en las pruebas: a. Conocarpo de frutilla cubierto por fructificaciones de *B. cinerea* y b. plantas infectadas c,on *C. falcatum*

E. giganteum: el bioinsumo fue preparado siguiendo la técnica de decocción (INTA, 2021). Para lo cual se partió de secciones de plantas de aproximadamente 3 cm de longitud. Estas secciones se dejaron en reposo en agua limpia durante 24 horas, luego de las cuales la mezcla fue llevada a un baño de María con agua en ebullición donde permaneció durante 20 minutos. Se prepararon 750 ml en frascos Erlenmeyer, según la relación indicada: 1kg de *E. giganteum*/ 1l de agua. El preparado obtenido se utilizó una vez frio.

***Trichoderma*:** se utilizó un cultivo puro de un aislamiento obtenido de suelo de cultivo de plantas de frutilla. El cultivo fue mantenido en APG por sucesivas transferencias a medio fresco.

Pruebas de efectividad

Para las pruebas con *Equisetum* se mezclaron 2,5 ml de la decocción con 10 ml de APG y se vertieron en placas de Petri. Una vez solidificado el medio, se procedió a sembrar en el centro de la placa secciones de 1,5 mm de un cultivo puro de *B. cinerea*. Igual procedimiento se siguió por separado con *C. falcatum*. Las placas fueron incubadas durante 8 días a temperatura ambiente y luz natural. La medición del diámetro de colonias se realizó con intervalos de 24 horas. Las siembras se realizaron por triplicado y como testigo se utilizó la siembra del patógeno en placas con sólo medio APG. La decocción también fue sembrada en placas con sólo medio APG.

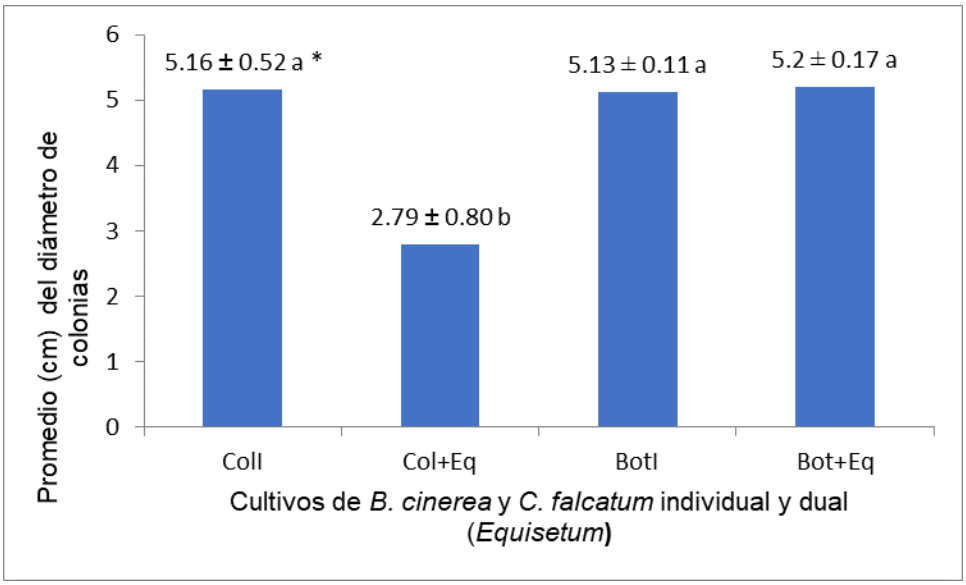
Las pruebas con *Trichoderma*: se realizaron utilizando la técnica del cultivo dual, para lo cual se sembraron secciones enfrentadas de *Trichoderma* y del patógeno en el centro de placas con medio APG. Las siembras de *B. cinerea* y *C. falcatum* se realizaron por separado. Las condiciones de incubación y medición fueron idénticas a las descritas para *Equisetum*. Las siembras se realizaron por triplicado y como testigos se utilizó la siembra individual de cada uno de los patógenos y la siembra individual de *Trichoderma.* Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de la varianza utilizando el programa InfoStat (2008).

3. Resultados y discusión

***E. giganteum*,** en las placas conteniendo APG y decocción de *E. giganteum* sembradas con *C. falcatum* la disminución del diámetro de colonias fue estadísticamente significativa (p<.01) en comparación con los observado en el testigo (placas con medio APG+ decocción) (Figura 2).

Figura 2.

Diámetro de colonias de *C. falcatum* y *B. cinera* en cultivo individual y dual con la decocción de *E. giganteum*

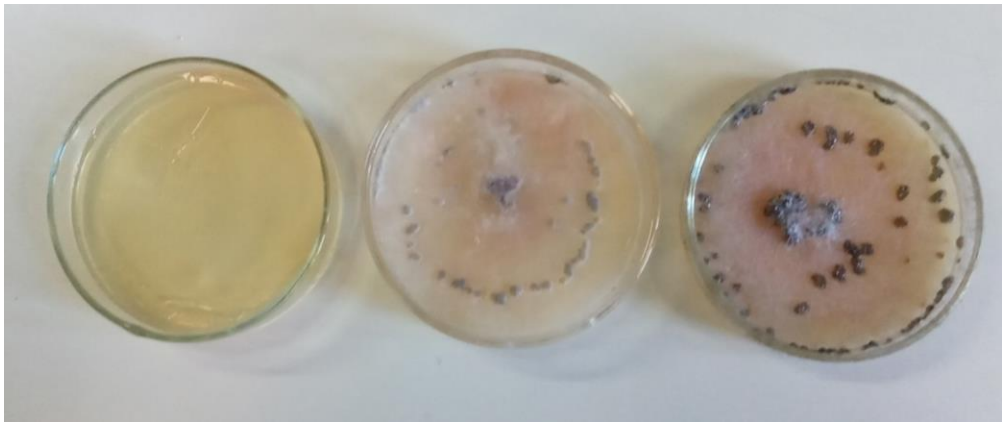


* Valores promedio ± desvío estándar. Los valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente p<.01

Por el contrario, la adición de la decocción a las placas sembradas con *B. cinerea* no tuvo ningún efecto sobre el diámetro de colonias del patógeno (Figuras 2 y 3), incluso el diámetro de las colonias de *Botrytis* fue ligeramente mayor en comparación con el testigo. Finalmente, en las placas que contenían medio de cultivo y la decocción de *E. giganteum* no se observó el desarrollo de ningún microorganismo que pudiera haber estado presente en la decocción.

Figura 3.

Prueba con la decocción de *E. giganteum* y *B. cinerea*, de izquierda a derecha: placa con sólo medio de cultivo, cultivo individual de *B. cinerea;* placa con decocción + *B. cinerea*



Trichoderma: en los cultivos duales de *Trichoderma* con *C. falcatum* y *B. cinerea* se observó la disminución del diámetro de colonias de ambos hongos patógenos. Esta disminución fue estadísticamente significativa ($p<.01$) en comparación con el diámetro de colonias observado en los cultivos individuales (Figuras 4 a-b, 5 y 6). En ambos casos se observó la presencia de un halo de inhibición en la totalidad de las placas. También en los cultivos duales se observó la disminución de las colonias de *Trichoderma*, ligeramente menor a la registrada para las colonias de los patógenos.

Figura 4.

Placas sembradas con cultivos individuales y duales: a. De izquierda a derecha: *Trichoderma* individual, *Trichoderma* + *C. falcatum* y *C. falcatum* individual. b. De izquierda a derecha: *Trichoderma* individual, *Trichoderma* + *B. cinerea* y *B. cinerea* individual.

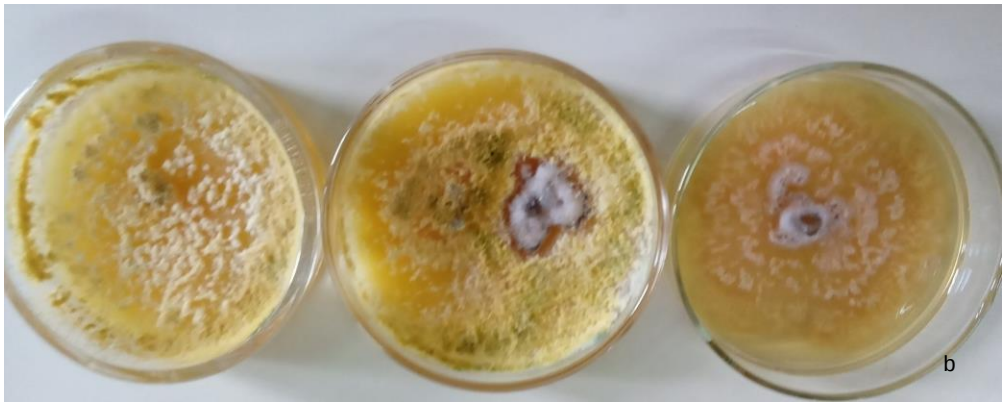
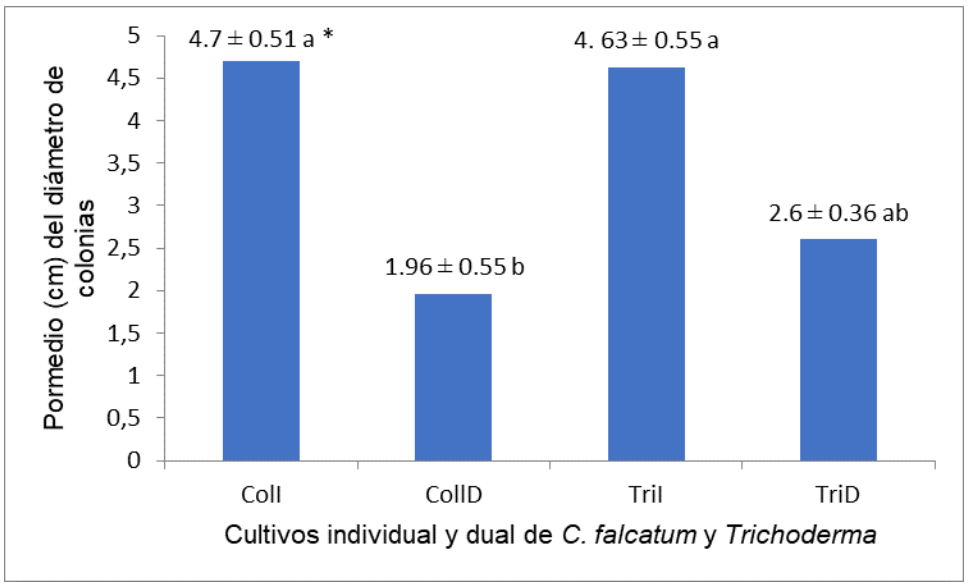


Figura 5.

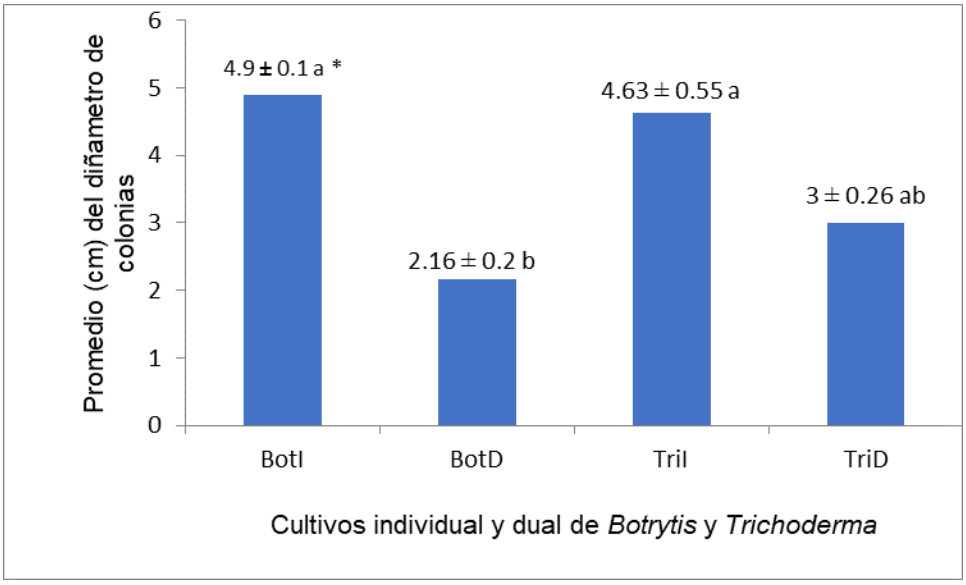
Diámetro de colonias de *C. falcatum* en cultivo individual y dual con *Trichoderma*



* Valores promedio ± desvío estándar. Los valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente p<.01

Figura 6.

Diámetro de colonias de *B. cinerea* (Bot) en cultivo individual y dual con *Trichoderma* (Tri).



* Valores promedio ± desvío estándar. Los valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente p<.01

Por consiguiente, la comparación de los valores promedio de la disminución del diámetro de colonias de *C. falcatum* y *B. cinerea* en cultivos duales con *E. giganteum* y *Trichoderma* mostró lo siguiente: la adición de la decocción resultó en la disminución de un 46% del diámetro de colonias de *C. falcatum* y un aumento del 1,36% de las de *B. cinerea*. Mientras que, en cultivos duales con *Trichoderma* se observó un 58% de disminución en las colonias de *C. falcatum* y un 56% en las de *B. cinerea.*

La disminución del diámetro de colonias de *C. falcatum* mediada por la decocción de *E. giganteum* no había sido citada previamente en la literatura sobre el tema. El comportamiento registrado es promisorio para la subsiguiente realización de pruebas *in vivo*, como lo establece el protocolo para la prueba de bioinsumos. El resultado es también promisorio, dada la relevancia que tiene la antracnosis causada por *C. falcatum,* para la cual sólo existen variedades de frutilla tolerantes (González, 2017), y para cuyo manejo se recomiendan fungicidas de síntesis (Chavez y Soilán Duarte, 2018) con consecuencias negativas sobre el medio ambiente. Entre las que pueden mencionarse la supresión de los microorganismos benéficos que habitan el agroecosistema y la disminución de la biodiversidad (Sarandón, 2020).

En cuanto al efecto nulo sobre la disminución del diámetro de colonias de *B. cinerea* observado, el mismo coincide con el reportado por Pazmiño Miranda (2018) cuando aplicó extractos de *Equisetum* en cultivo de frutilla a campo. Cabe mencionar que, en una revisión realizada en Europa en el año 2014 por el Directorio General para la Salud y Seguridad Alimentaria, se menciona la

utilización de un homogenato de *Equisetum* para el manejo de *B. cinerea* desde el inicio del cultivo de frutilla y frambuesa hasta finalizar la fructificación. Por consiguiente, sería adecuado realizar nuevas pruebas utilizando distintos procedimientos de extracción, considerando que los mismos influyen en el contenido de sustancias bioactivas de *Equisetum* (Langa-Lomba *et al.*, 2021). Por otra parte, no se encontraron reportes acerca de la estimulación del crecimiento de las colonias de *B. cinerea* utilizando *Equisetum,* como el observado en el presente trabajo. Efecto que si fue reportado en un trabajo donde la aplicación de extractos de ricino (*Ricinus communis*) produjo un aumento significativo del crecimiento y desarrollo de *B. cinerea* (Belesansky *et al*., 2021).

Los resultados positivos observados, con la utilización de *Trichoderma,* en la disminución del diámetro de colonias de *C. falcatum y B. cinerea* confirman la efectividad de un antagonista ampliamente utilizado en el manejo de distintos patógenos, y también la recomendación de la utilización de aislamientos nativos de *Trichoderma* (Samaniego-Fernández *et al.,* 2018*)* como el utilizado en el presente trabajo). Sin embargo, el efecto observado en la disminución del diámetro de colonias de *Trichoderma* en los cultivos duales con ambos patógenos es un comportamiento a tener en cuenta en las pruebas *in vivo* que se realizarán a futuro. Esto es, considerar la utilización de suspensiones con un alto número de propágulos de *Trichoderma*.

4. Conclusiones

La aplicación de una decocción de *E. giganteum* resulta efectiva en la disminución del diámetro de las colonias del patógeno *C. falcatum.* Mientras que no tiene efecto sobre *B. cinerea*. Por el contrario, la decocción favorece levemente el crecimiento de *B. cinerea.*

El aislamiento nativo de *Trichoderma* probado muestra efecto antagónico sobre el diámetro de colonias de *B.cinerea* y *C. falcatum*; y en el caso de *C. falcatum* la disminución es mayor a la mediada por *E. giganteum.*

La disminución del diámetro de colonias de *Trichoderma* en cultivo dual es un factor a considerar en las futuras pruebas *in vivo.*

5. Referencias bibliográficas

Amerio, N. S., Castrillo, M.L., Bich, G. A., Zapata, P. D. y Villalba, L. L. (2020). Trichoderma en la Argentina: Estado del Arte. *Ecología Austral, 30*, 113-124.

Belesansky, C., Gutiérrez, N. M. y Sandoval, M. C. (2021). Efecto de extractos de ricino (Ricinus communis L.) y de Trichoderma harzianum Rifai sobre el crecimiento y desarrollo de *Botrytis cinerea* Whetzel y de Penicillium Link, patógenos del cultivo de frutilla (Fragaria x ananassa Duch.). *Revista Científica y Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental, 8*(1), 28-45.

Bertalot, M. J., Carvalho-Puppato, J., Furtado, E., Mendoza, E., Mendes, R. Buso y D. R. (2012). Controle alternativo de Mycosphaerella fragariae na cultura de morango orgánico (Fragaria vesca). *Revista Brasileira de Agroecologia, 7*(2), 170-177.

Chavez; M. A. y Soilán Duarte, L. C. (2018). Efecto de fungicidas sobre la antracnosis (Colletotrichum fragariae Brooks) en plantines de frutilla (Fragaria x ananassa (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier). *Investigación Agraria, 20* (1), 38-50

EFSA (European Food Safety Authority) (2020). Thecnical reports on the outcome of the consultation whit Members States and EFSA on te basic substance application for approval of Equisetum arvense for the extensión of use in plant protection against fungal disease on horticulture and vegetable crops. EFSA supporting: EN-1869 doi:10.2903/sp.efsa.2020.EN1869

EU (European Commission). (2014). Basic Substance Equisetum arvense L. SANCO/12386/2013 rev.7. EU Directorate-General for Health and Food Safety.

González, B. A. (2017). Antracnosis o mancha negra. *Frutilla Patología Vegetal.* http://www.patologiavegetal.unlu.edu.ar/?q=node/69

InfoStat. (2008). *Infostat versión 2008.* Grupo InfoStat FCA. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba.

INTA. (2021). *Botiquín del huertero: Equisetum o "cola de caballo*". https://inta.gob.ar/noticias/botiquin-del-huertero-equisetum-o-cola-de-caballo

Langa-Lomba, N., Buzón-Durán, L., Martín-Ramos, P., Casanova-Gascón, J., Martín-Gil, J., Sánchez-Hernández, E. y González-García, V. (2021). Assessment of Conjugate Complexes od Chitosan and Urtica dioica or Equisetum arvense Extracts for the Control of Grapevine Trunk Pathogens. *Agronomy*, *11*, 976. https://doi.org/10.3390/agronomy11050976

Parodi, L. R. (1978). *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. Tomo I. ACME.

Pazmiño Miranda, N. P. (2018). Métodos alternativos de fungicidas para control de B. cinerea en fresa (Fragaria vesca). *Innova Research Journal. 3* (2.1), 52-58

Samaniego-Fernández, L. M., Harouna, M., Corbea, O., Rondón-Castillo, A. J. y Placeres-Espinosa, I. (2018). Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de Trichoderma spp. antagonistas de patógenos de suelo. *Revista de Protección Vegetal*, *33,* 3. http://opn.to/a/4herH

Sarandón, S. J. (coord.). (2020). *Biodiversidad, agroecología y agricultura sustentable.* Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.

Starobinsky, G., Monzón, J., Di Marzo Broggi, E. y Braude, E. (2021). Bioinsumos para la agricultrua que demandan esfuerzos de investigación y desarrollo. Capacidades existentes y estrategia de política pública para impulsar su desarrollo en Argentina. Documentos de trabajo del CCE Nº 17. Buenos Aires: Ministerio de Desarrollo Productivo de la Nación.

Trebbi, G., Negri, L., Bosi, S., Dinelli, G., Cozzo, R. y Marotti, I. (2021). Evaluation of Equisetum arvense (Horsetail Macerate) as a Copper Substitute for Pathogen Management in Field-Grown Organic Tomato and Durum Wheat Cultivations. *Agriculture* 11, 5. https://dx.doi.org/10.3390/agriculture11010005