

Gabriel D'Enjoy
Weinkämmerer,
Christophe Desvals,
Audrey Derumier,
Lawrence Verysse
Belchim Crop Protection

Cepa SC1 de *T. atroviride*, nueva herramienta fungicida

La cepa SC1 de *Trichoderma atroviride* es un bio-fungicida ecológico que protege al cultivo de tomate en invernadero contra la botritis. Esta cepa fue aprobada como sustancia activa de bajo riesgo conforme al reglamento CE n°1107//2009. La SC1 ha sido aislada a partir de tejido vegetal por la Trentino Sviluppo y Fundación Edmund Mach en Saint Michele all'Adige (Trentino, Italia) y codesarrollada por Belchim Crop Protection y Bi-PA, empresa especializada en el desarrollo de productos de origen natural. El origen vegetal de la cepa SC1 le confiere una alta afinidad para desarrollarse sobre los órganos aéreos de la planta de tomate y junto a su acción beneficiosa, demuestra un alto potencial para el cultivo.

La sustancia *Trichoderma atroviride* cepa SC1 y la formulación del producto comercial, Vintec, es natural y por ello está acorde a las resoluciones de la agricultura ecológica RCE n°834/2007. El registro en tomate de invernadero de Vintec, producto comercial a base de la cepa SC1 con número de registro ES-00468, fue autorizado en la resolución del 2 de marzo 2020 por la dirección general de sanidad de la producción agraria.

Presentación de la sustancia activa y de su formulación

Cepa SC1 de *Trichoderma atroviride*

La sustancia activa, cepa SC1 de *Trichoderma atroviride*, clasificada como de bajo riesgo por el reglamento CE n°1107/2009, es un hongo de la división Ascomycota, subdivisión Perizomycotina, de la clase de los Sordariomycetes, orden Hipocreales, de la familia de los Hypocreaceae, género *Trichoderma*, especie *atroviride* y cepa SC1 (D'Enjoy y Boulon, 2016).

T. atroviride cepa SC1 es un hongo asexual, sin recombinación genética ni meiosis durante su ciclo de vida. Las *Trichoderma atroviride* están naturalmente presentes en el medio ambiente en Europa y en el mundo. Las encontramos esencialmente en el suelo y en la materia orgánica. Su presencia ha sido señalada en los edificios y medios ambientes marinos (Roquebert, 1996; Esposito y Silva, 1998).

El género *Trichoderma* spp. está clasificado en el Grupo 1 de agentes biológicos (inofensivos para el ser humano) en base a la directiva 2000/54/CE.

La cepa SC1 de *Trichoderma atroviride* es de origen vegetal (Pertot, Prodorutti, Colombini y Pasini, 2016). Es decir, que a diferencia de la mayoría de otros productos comerciales a base de *Trichoderma* spp., que tienen como origen el suelo, la cepa SC1 ha sido aislada de tejido vegetal, confiriéndole una alta afinidad a su establecimiento sobre los órganos aéreos del cultivo de tomate, factor clave para una protección eficaz del cultivo contra el patógeno de la podredumbre, *Botrytis cinerea* (Maria, Longa, Pertot, & Tosi, 2008).

La sustancia activa, cepa SC1 de *T. atroviride*, está exenta de LMR, por lo cual permite la protección del cultivo y de su producción de tomates hasta su cosecha sin dejar residuos.

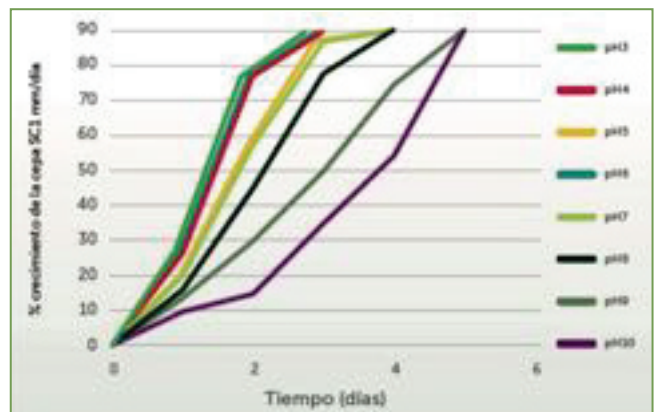


Figura 1 Crecimiento de la cepa SC1 bajo varios pH de 3 a 10 (Maria y col., 2008).

Formulación del producto comercial, Vintec

El producto comercial, llamado Vintec®, es una formulación en granulados dispersables en el agua (WG) de alta calidad por su alta concentración y su facilidad de uso.

Los granulados son de color gris claro y contienen 10¹⁰ UFC (unidades formadoras de colonias) /g de esporas bajo la forma de conidios de la cepa SC1. Esta alta concentración permite el uso de dosis bajas por volumen de agua y hectárea, permitiendo el ahorro de embalajes y disminuyendo el esfuerzo físico de la preparación. Sólo 100g de Vintec en 1000L de agua son necesarios para tratar eficazmente una hectárea de tomate en invernadero, aplicando de ese modo 100 millones de esporas/m².

La combinación de ambos, (i) la formulación de alta calidad y (ii) los conidios especializados, permite una flexibilidad de uso que facilita la preparación del tanque y la aplicación en el campo sin dejar manchas sobre los frutos. De ese modo, la Figura 1 muestra que Vintec puede ser mezclado con un alto rango de pH, de 3 a 10, volviéndose un producto biológico con flexibilidad de

uso similar a un fitosanitario convencional. Además, la formulación permite que la mezcla pueda ser aplicada inmediatamente después de su realización, demostrando una gran flexibilidad para el aplicador. El hecho es que Vintec contiene conidios activos que únicamente necesitan ser posicionados sobre el cultivo para que empiecen su desarrollo.

Autorización en producción ecológica

La formulación de Vintec es natural, tanto los co-formulantes como la sustancia activa *Trichoderma atroviride* cepa SC1. Por ello, Vintec está acorde a las resoluciones de la agricultura ecológica (RCE nº834/2007). Además de estar inscrito en listas de organismos certificadores de varios países europeos como FiBL en Alemania y Austria, Vintec es un producto ecológico reconocido por la entidad de certificación CAAE.

Propiedades biológicas de la cepa SC1 de *T. atroviride*

La cepa SC1 de *T. atroviride*, aislada de tejido vegetal, se distingue por su capacidad de germinación y colonización rápida sobre los órganos aéreos de la planta de tomate. La formulación del producto Vintec contiene nutrientes starter para favorecer el rápido establecimiento de la cepa sobre todos los órganos tratados. En menos de un día, los conidios germinan y se convierten en colonias que establecen un complejo de modos de acción (Maria y col., 2008; Pertot y col., 2017, 2016; Vinale y col., 2008; Howell, 2003; Pertot y col., 2017; Berbegal, Ramón-albalat, León y Armengol, 2019). La cepa SC1 combate a la botritis por antagonismo, antibiosis enzimática, antibiosis por blast, micoparasitismo y reduciendo la virulencia del patógeno, degradando los nutrientes en superficie de la planta de tomate.

Una de las características de la botritis es que sus conidios contienen pocas reservas energéticas endógenas, lo que implica la necesidad de conseguir fuentes de energía exógenas para poder germinar (Kosuge y Hewitt, 1964; Yoder y Whalen, 1975). La cepa SC1 degrada las fuentes energéticas exógenas en la superficie de la planta de tomate, complicando de ese modo la germinación de la botritis y de ese modo disminuyendo su virulencia.

Al mismo tiempo, Vintec coloniza la superficie de la planta de tomate, cubriendo el espacio e impidiendo que la botritis pueda infectar al cultivo (Figura 2).

Esos modos de acción son llamados antagonismos. Vintec es un potente antagonista de la botritis.

Si el patógeno consiguiera iniciar la infección y desarrollar su micelio, Vintec produce moléculas que, al difundirse sobre la botritis, bloquean su desarrollo. Vintec tiene una acción esporestática y fungistática llamada BlastProtect por Belchim Crop Protection (Figura 3).

Mientras que el crecimiento de la botritis está bloqueado por el efecto BlastProtect, las hifas de Vintec se enrollan sobre la botritis, producen enzimas líticas (ej. Quitinasas), y parasitan de ese modo al patógeno (Figura 4). Vintec es un micoparásito de la botritis.

Cada modo de acción es potente y no produce residuos. La combinación de estos permite obtener una eficacia

constante, protegiendo la producción de tomates contra la botritis. Para asegurar activación de todos los modos de acción, Vintec tiene que establecerse antes de la botritis.

Resultados: gestión de la botritis en tomate de invernadero

Eficacia

Vintec está registrado para proteger el cultivo de tomate en invernadero contra la botritis. El registro autoriza ocho aplicaciones, con un mínimo de cinco días entre cada tratamiento, con una dosis entre 0,5g/hL y 10g/hL y un volumen de caldo de 500 a 1500L. Esto significa una dosis de tratamiento comprendida entre 25g/ha con volumen de caldo 500L/ha hasta 150g/ha con un volumen de caldo de 1500L/ha.

Belchim Crop Protection recomienda el uso de 10g/hL como base de cálculo de la dosis por hectárea, que de ese modo es de 100g/ha con volumen de caldo de 1000L, que representa la mayor parte de los casos en tomate de invernadero. La concentración de 10g/hL muestra una fortaleza mayor en cuanto la presión de botritis se incrementa, volviéndose la dosis de seguridad, y permitiendo la obtención de una eficacia constante.

Al comparar Vintec con referencias orgánicas, vemos en la Figura 5 que Vintec permite proteger eficazmente toda la planta de tomate contra botritis; la hoja, el fruto y el tallo.

La gran afinidad de Vintec con la parte aérea de la planta de tomate, debida a su origen vegetal, se traduce en una eficacia que se mantiene con el tiempo. La Figura 6 muestra que, a 21 días del tratamiento, Vintec sigue mostrando una eficacia constante. Estos datos muestran una gran ventaja para Vintec, ya que se puede integrar en programas de protección convencional sin tener que cambiar las cadencias de tratamiento. Vintec es un candidato de alto potencial para iniciar una protección integrada contra la botritis.

Compatibilidades

Vintec tiene un buen perfil de compatibilidades con productos biológicos y de síntesis. De ese modo, puede mezclarse con insecticidas como Teppeki, Ovitex, con fungicidas orgánicos como azufres y cobres o fungicidas de síntesis como Ranman Top, Valis Plus, cimoxanilo. Todos los productos no son compatibles: evitar mezclar mancozeb, triazoles y strobilurinas con Vintec.

El perfil de compatibilidad es suficientemente flexible para integrar a Vintec en la mayoría de los programas de protección de cultivos en tomate de invernadero sea orgánicos como de protección integrada.

Posicionamiento

Línea biológica

Para garantizar eficacia en línea biológica, es recomendado tratar preventivamente. La aplicación de Vintec desde el inicio del ciclo del cultivo permite el establecimiento de Vintec sobre la planta, asegurando la combinación de

I+D en las empresas

todos los modos de acción y de esa manera una eficacia alta y constante contra botritis. El registro permite hasta ocho aplicaciones de 5 a 10g/hL, con cadencia mínima de tratamiento de cinco días. De ese modo, Vintec puede ser aplicado todas las semanas, sabiendo que ofrece una flexibilidad superior, con potenciales aplicaciones cada dos semanas, dependiendo tanto de la presión como de la sensibilidad de la variedad a botritis. Se aconseja usar la concentración de 10g/hL, que permite mayor flexibilidad. El objetivo es mantener un nivel de colonización estándar sobre el cultivo que permita mantener la eficacia durante el ciclo de producción.

Línea integrada. potencial de sinergia con antibotróxicos químicos, gestión de los residuos, ...

En un programa integrado, Vintec es un candidato de alto potencial gracias a su buen perfil de compatibilidad junto con sus diferentes modos de acción exentos de residuos. La alternancia entre antibotróxicos de síntesis y Vintec tiene varias ventajas:

Gestión de los residuos: Vintec está exento de LMR; de esa manera, permite el control de la botritis sin residuos. El productor puede elegir entre reducir la cantidad de residuos del cultivo para respetar las condiciones de supermercados, subastas y otras plataformas al remplazar un antibotróxico convencional con Vintec. O de usar el "residuo ahorrado" gracias a Vintec para luchar de forma convencional contra otra problemática de protección del cultivo.

Gestión de las resistencias: la eficacia constante combinada a los múltiples modos de acción de Vintec hacen que sea una herramienta pertinente para luchar contra el desarrollo de resistencias en el cultivo de tomate. Alternar los antibotróxicos de síntesis con Vintec permite mantener la eficacia de los productos convencionales por más tiempo.

Sinergia con antibotróxicos convencionales: en algunos casos, después de un uso de un antibotróxico químico de calidad, el programa con Vintec ha demostrado una sinergia a nivel de eficacia. Es decir, que la eficacia se mejora significativamente al usar un antibotróxico convencional seguido de Vintec, en comparación con un programa con el producto convencional solo (Figura 7).

Características toxicológicas y eco toxicológicas

Toxicología

Toxicidad aguda. No se observaron signos de toxicidad con altas dosis de *Trichoderma atroviride* cepa SC1 después de una administración oral, por inhalación o dermal: DL50 oral (rata): $> 4,1 \times 10^8$ CFU/animal.

Inhalación CL50 (rata): $> 4,7 \times 10^8$ CFU/animal.

DL50 dermal (rata): $3,4 \times 10^8$ CFU/animal.

Irritación ocular: no irritante.

Irritación dermal: no irritante.

Sensibilización: Como medida de precaución, todos los microorganismos se clasifican como potencialmente causantes de reacciones de sensibilización.



Figura 2 Crecimiento de la cepa SC1 frente a la botritis. La foto de encima muestra una colonia de botritis mientras que la foto de abajo muestra la colonia de Vintec (a la izquierda) que impide el desarrollo de la botritis (punto negro de la derecha).

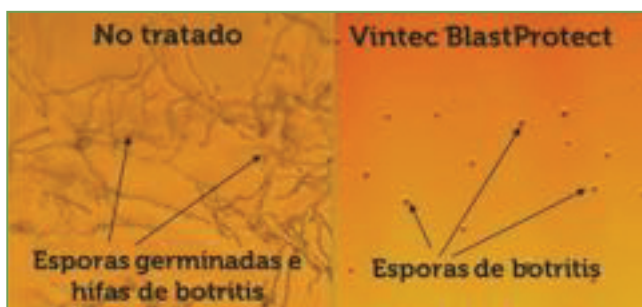


Figura 3. Antibiosis por blast, llamada BlastProtect por Belchim Crop Protection. Las fotos han sido tomadas 3 días después de la inoculación de esporas de botritis. La foto de la izquierda muestra una red de las hifas de botritis en la modalidad no tratada. La red de hifas es consecuencia de la germinación de las esporas. La foto de la derecha muestra las mismas esporas de botritis pero en presencia cercana de Vintec. Se aprecia la ausencia de germinación de las esporas de botritis inhibidas por el BlastProtect de Vintec.

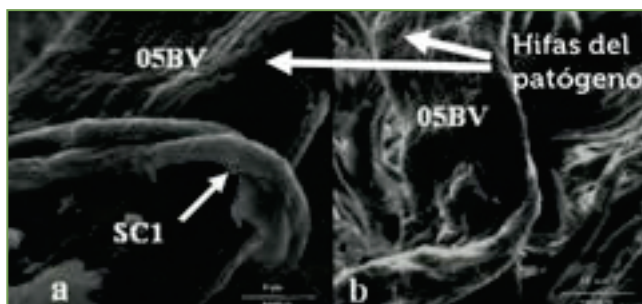


Figura 4. Foto en microscopio electrónico de barrido mostrando al Vintec (SC1) parasitando a un hongo patógeno.

Toxicidad crónica. *Trichoderma* spp. se encuentran con frecuencia en el ambiente del suelo/planta. El género *Trichoderma* no está presente en las clases 2 y 4 de la clasificación europea de agentes etiológicos humanos (dir. 2000/54/CE). Los estudios toxicológicos con el principio activo muestran que no hay efectos adversos en animales.

Ecotoxicología

Comportamiento en el suelo. El género *Trichoderma* y en particular la especie *T. atroviride* están presentes naturalmente en suelos europeos. De hecho, *T. cepa de atroviride* SC1 puede establecer colonias en la superficie del suelo y rizosfera. La densidad de población del hongo disminuye con el tiempo debido a la competencia, y llega a las de la *Trichoderma* spp. naturalmente presentes. La cepa SC1 de *T. atroviride* puede persistir en el suelo a largo plazo, sólo en forma de conidio y a niveles que no excedan a los de las poblaciones de *Trichoderma* presentes naturalmente. La concentración persistente en el medio ambiente (CPE) se calculó para el suelo considerando dos aplicaciones de 400 g/ha de producto formulado (cuatro veces la dosis recomendada para su aprobación): - CPE del suelo: 1,07 mg de producto/kg formulado de suelo en peso seco; - 0,1 mg *T. atroviride* cepa SC1/kg de suelo en peso seco; - $1.07 \cdot 10^7$ CFU/kg de suelo en peso seco. Además, la movilidad de *T. atroviride* se reduce y el potencial de lixiviación es muy bajo.

Comportamiento en el agua. El agua no es el medio preferido para la cepa SC1 de *T. atroviride*. Pero puede estar presente en el agua como resultado de los tratamientos en cultivos exteriores en caso de deriva durante las aplicaciones, y posiblemente puede sobrevivir en cantidades minúsculas gracias a los micronutrientes presentes en el agua. Por lo tanto, el CPE para el agua se calculó considerando dos aplicaciones de 400g/ha de producto formulado en cultivos exteriores con una deriva estimada del 13,52%. Agua CPE: 108 mg formulado producto/l; 9.14 *T. atroviride* cepa SC1/l; $1.02 \cdot 10^6$ CFU/l.

Efecto sobre los vertebrados terrestres. *T. atroviride* cepa SC1 no tiene ningún efecto sobre las aves o mamíferos. Esta cepa no crece por encima de 35 grados Celsius, mientras que la temperatura corporal de las aves está entre 40 y 42 grados Celsius. Como resultado, el

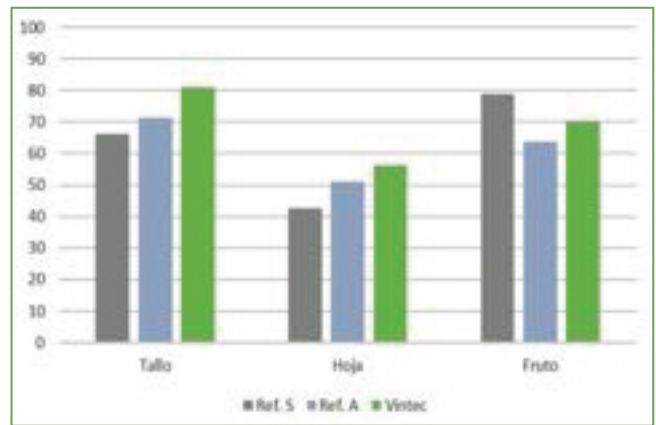


Figura 5. Eficacia en tallo, hoja y fruto frente a otras referencias orgánicas.

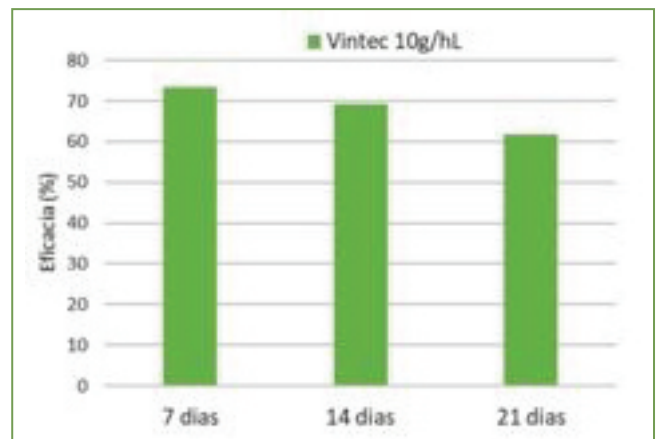


Figura 6. Eficacia media de 5 ensayos en el tiempo (días).

hongo no es capaz de infectar a las aves o causarles un efecto adverso. Por lo tanto, se considera que tiene un bajo riesgo para las aves. Además, no existe ningún efecto tóxico infeccioso y patológico de la cepa de *T. atroviride* SC1 en mamíferos.

Insectos y ácaros. La cepa SC1 de *T. atroviride* no tiene ningún efecto sobre las abejas y otros artrópodos útiles: *Aphidius rhopalosiphi*: RL50 > $3,2 \times 10^{13}$ CFU/ha. *Typhlodromus pyri*: RL50 > $3,2 \times 10^{13}$ CFU/ha.

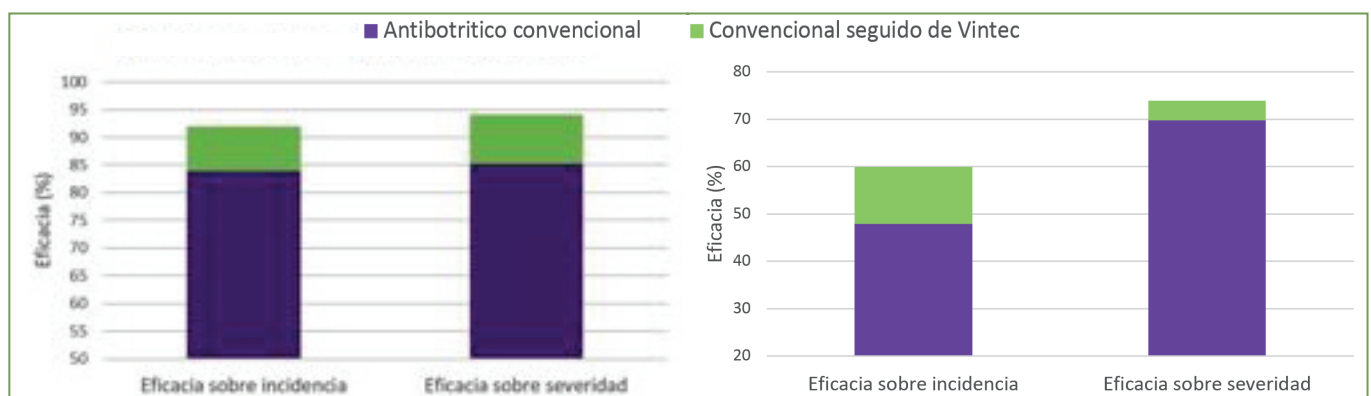


Figura 7. Eficacia en tallo y hoja de un antibotritico químico seguido de Vintec.

Organismos acuáticos. La toxicidad calculada en el laboratorio es baja:

Pezes: CL50 (96 h) > $6,3 \times 10^8$ CFU/l ;

Daphnies: CE50 (48 h) > $7,6 \times 10^8$ CFU/l ;

Algas: CE50 (72 h) - 7.1×10^8 CFU/l.

Teniendo en cuenta que se trata de tratamientos cerrados en invernadero de tomate, el riesgo de deriva es casi inexistente. Sin embargo, el riesgo de transferencia de *T. atroviride* cepa SC1 a las aguas superficiales ha sido calculado para una eventual aplicación en campo abierto. De ese modo, se calcularon las relaciones de exposición tóxica (RET). Estas proporciones demuestran el bajo riesgo del hongo para los organismos acuáticos:

RET Daphnies > 2 105.

RET Desmodesmus > 1 966.

Clasificación propuesta. Tanto el principio activo como el producto formulado se ofrecen sin clasificación (SC).

Más información en este vídeo



Bibliografía

- ! Kosuge, T., and Hewitt, W.B. 1964. Exudates of grape berries and their effect on germination of conidia of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 54: 167-172.
- Yoder, O.C., and Whalen, M.L. 1975. Factors affecting postharvest infection of stored cabbage tissue by *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Botany* 53: 691-699.
- Espósito E. & Silva, M. 1998. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Crit. Rev. Microbiol.*, 24 (2): 89-98.
- Roquebert M.F. 1996. Interaction antagoniste des *Trichoderma* sp dans les systèmes telluriques : systématique, biologie et écologie des organismes. *Compte rendu des 4èmes rencontres en toxicologie*. Paris.
- Berbegal, M., Ramón-albalat, A., León, M., & Armengol, J. (2019). *Evaluation of long-term protection from nursery to vineyard provided by Trichoderma atroviride SC1 against fungal grapevine trunk pathogens*. (March). <https://doi.org/10.1002/ps.5605>
- D'Enjoy G, Boulon J.-P., (2016) Qu'est ce que ? La souche SC1 de *T. atroviride*, *Mag. Phytoma France* n°698 (November).
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases : The history and evolution of Current concepts. *USDA/ARS Southern Plains Agricultural Research Center*, 87(Plant Disease).
- Maria, C., Longa, O., Pertot, I., & Tosi, S. (2008). *Ecophysiological requirements and survival of a Trichoderma atroviride isolate with biocontrol potential*. 269–277. <https://doi.org/10.1002/jobm.200700396>.
- Pertot, I., Giovannini, O., Benanchi, M., Caf, T., Rossi, V., & Mugnai, L. (2017). *Combining biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control Botrytis cinerea on grapevine*. 97, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.01.010>.
- Pertot, I., Prodorutti, D., Colombini, A., & Pasini, L. (2016). *Trichoderma atroviride SC1 prevents Phaeoconiella chlamydospora and Phaeoacremonium aleophilum infection of grapevine plants during the grafting process in nurseries*. *BioControl*, 61(3), 257–267. <https://doi.org/10.1007/s10526-016-9723-6>.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma – plant – pathogen interactions*. 40, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>.