

INCREMENTO DE LA PRODUCTIVIDAD DE *Trifolium repens* EN MEZCLA CON *Lolium perenne* MEDIANTE LA INOCULACIÓN DEL SUELO CON *Trichoderma hamatum*

INCREASED PRODUCTIVITY OF *Trifolium repens* IN MIXTURE WITH *Lolium perenne* BY SOIL INOCULATION WITH *Trichoderma hamatum*

C. ALCÁNTARA^{1a}, C. R. THORNTON², V. PEDRAZA^{1a}, A. PÉREZ DE LUQUE^{1b}, K. LE COCQ² Y P. MURRAY³

^{1a}Área de Producción Agraria y ^{1b}Área de Mejora y Biotecnología, IFAPA Centro Alameda del Obispo, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14080 Córdoba, Spain. ²Biosciences, University of Exeter, Geoffrey Pope Building, Stocker Road, Exeter, EX4 4QD, UK.

³Sustainable Soils and Grassland Systems Department, Rothamsted Research, North Wyke, Okehampton, EX20 2SB, UK.

RESUMEN

Uno de los principales objetivos del manejo sostenible de los pastos es minimizar el uso de fertilizantes, de ahí que se favorezca la introducción de leguminosas aunque resulte difícil debido a la competencia con las gramíneas. Especies del género de hongos *Trichoderma* han mostrado beneficios sobre la productividad de cultivos entre los que destaca la capacidad de ciertas cepas de promover el crecimiento de las plantas. El objetivo de este estudio fue evaluar en condiciones controladas si la cepa GD12 de *Trichoderma hamatum* podría otorgar una ventaja en el crecimiento de *Trifolium repens* (trébol blanco) solo o en mezcla con *Lolium perenne* (raigrás). Se realizó un ensayo en rizotrones con trébol y raigrás sembrados solos y en mezcla y en suelos inoculados y sin inocular. Se evaluó periódicamente la altura de planta, el estado fenológico y la biomasa al final del ensayo. *T. hamatum* tuvo un efecto positivo sobre ambas especies, produciendo mayor biomasa y acortando el ciclo fenológico; además incrementó la altura de planta en el trébol no produciendo efecto sobre el raigrás. Estas características observadas parecen indicar que la inoculación con *T. hamatum* proporciona una ventaja competitiva al trébol en mezcla con raigrás.

Palabras clave: Hongo endófito, cepa GD12, competencia interespecífica, mezcla forrajera.

SUMMARY

One of the main objectives in the management of grassland ecosystems is to minimize the use of fertilizers, hence favouring the introduction of legumes despite its difficulty due to competition with grasses. The fungi genus *Trichoderma* have shown several benefits on crop productivity and the ability of some strains to promote plant growth. The aim of this study was to evaluate the ability of GD12 strain of *T. hamatum* to promote the growth of *Trifolium repens* (white clover) and *Lolium perenne* (ryegrass), as well as to increase the white clover competitiveness in their mixture. An experiment was conducted in rhizotrons with white clover and ryegrass sown alone and in mixture and in soils inoculated and non-inoculated with GD12 under controlled conditions. Plant height, phenological stage and biomass were assessed. GD12 had a positive effect on growth of white clover and ryegrass, producing greater biomass and a shorter phenological cycle. Furthermore, plant height was enhanced in white clover but not in ryegrass. These observations indicate that the inoculation with *T. hamatum* may provide a competitive advantage of white clover in its mixtures with ryegrass.

Key words: Endophytic fungi, GD12 strain, plant competition, forage mixture.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales objetivos del manejo sostenible de los pastos como respuesta a las políticas de la Unión Europea es minimizar el uso de fertilizantes producidos industrialmente. Por ello la introducción de leguminosas y el manejo de la composición de la mezcla para maximizar la fijación de N atmosférico, es uno de los pilares en los sistemas de praderas en todo el mundo (Peeters, 2009).

El trébol blanco (*Trifolium repens* L.) forma parte de muchos sistemas de pastos en mezcla con raigrás inglés (*Lolium perenne* L.) y es valorado no sólo por su capacidad de fijación de N, sino también por su calidad para la alimentación del ganado. Sin embargo, el establecimiento y mantenimiento del trébol para lograr un adecuado equilibrio en la pradera o una óptima calidad del forraje es difícil, ya que es sensible a la competencia por luz y nutrientes y a menudo no prospera (Haynes, 1988). Distintas estrategias se han propuesto para mejorar la capacidad competitiva del trébol, pero basándonos en que el trébol no desarrolla completamente su capacidad fotosintética hasta que los folíolos no alcanzan la parte superior del follaje donde hay suficiente luz (Parsons y Chapman, 2000), una estrategia con éxito podría ser favorecer el crecimiento en los primeros estadios de desarrollo, facilitando mayor co-

bertura del trébol sobre el raigrás en la mezcla.

Trichoderma es un género de hongos saprófitos que se encuentran en una amplia gama de ecosistemas y están presentes en la raíz, parte aérea de las plantas y en el suelo. Han sido caracterizados como agentes de control biológico de enfermedades vegetales y son considerados un componente beneficioso de la microbiota de la rizosfera, debido a su capacidad para colonizar las superficies radiculares y formar asociaciones endófitas ventajosas (Harman, 2000). Los efectos beneficiosos de *Trichoderma* definidos sobre la productividad de la planta son amplios, sin embargo, lo que actualmente está atrayendo un interés renovado es la capacidad de ciertas cepas para promover el crecimiento en una amplia gama de cultivos, entre ellos algunas leguminosas (Shaban y El-Bramawy, 2011). Sin embargo, no conocemos los efectos de *Trichoderma* spp. en especies de leguminosas forrajeras y concretamente en trébol no han sido estudiados.

El objetivo de este estudio fue evaluar en condiciones controladas si la cepa GD12 de *Trichoderma hamatum* podría otorgar una ventaja en el crecimiento de *Trifolium repens* (trébol blanco) solo o en mezcla con *Lolium perenne* (raigrás).

MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en rizotrones en condiciones controladas. Cada rizotróon se construyó con dos finas placas, una de cristal y otra de plástico de 120 x 240 mm, separadas 5 mm con unas tiras de plástico de 1 cm de ancho. La parte de arriba de cada rizotróon se dejó abierta para permitir el crecimiento de las plantas. Los rizotrones se rellenaron, según el tratamiento, con 100 g de suelo seco y tamizado a 2 mm o el mismo suelo mezclado con inóculo de *T. hamatum* GD12 (GenBank accession no. AY247559). El suelo fue de la serie Hallsworth con pH de 5,7 y se recogió de una pradera permanente situada en el suroeste de Inglaterra (N50°46'54,55", W3°55'1,03") no fertilizada con nitrógeno inorgánico durante 30 años. El contenido total de N y C fue respectivamente del 0,6% y del 6,6 %.

Las especies y variedades utilizadas en el ensayo fueron *Lolium perenne* L. cv Aber-Magic y *Trifolium repens* L. cv AberDai y fueron sembradas en monocultivo o en mezcla. En cada rizotróon se sembraron varias semillas y después de la emergencia se dejaron crecer dos plantas por rizotróon mientras que el resto fueron cuidadosamente retiradas. Los tratamientos fueron GR (raigrás), TR (trébol) y MIX (raigrás-trébol) en suelo inoculado con *Trichoderma* (T) y sin inocular (NT).

Los rizotrones fueron envueltos en papel de aluminio para mantener las raíces en oscuridad y se situaron verticalmente en bandejas con agua que fue cambiada periódicamente. Los tratamientos (T) y (NT) se situaron en bandejas separadas para evitar la contaminación cruzada. Las bandejas se colocaron en tres cabinas de crecimiento (Sanyo 350HT, Sanyo Corporation, Japan) a temperatura constante de 20°C y régimen de luz/oscuridad de 18/6 h. Dos repeticiones de cada combinación de tratamientos fueron situadas en cada cabina y se rotaron periódicamente en las diferentes baldas. El diseño experimental fue factorial con tres repeticiones en bloques al azar, considerando cada cabina de crecimiento como un bloque.

En cada rizotróon se evaluó la altura de planta desde los 18 a los 36 días después de la siembra (DDS) y el tiempo en alcanzar los principales estados de desarrollo del ciclo fenológico siguiendo la escala BBCH (Lancashire et al., 1991). Después de 40 días los rizotrones fueron desmontados y la parte aérea de cada planta fue separada y pesada, determinándose los pesos secos tras secado de las muestras durante 48 h en una estufa a 80°C.

Todas las variables evaluadas fueron sometidas a un análisis de la varianza. Los datos correspondientes a raigrás y a trébol fueron analizados por separado y la varianza

general fue repartida usando contrastes ortogonales. Los contrastes analizados fueron: 1.- la habilidad de *Trichoderma* de promover el crecimiento de las plantas y 2.- la influencia de la mezcla de especies sobre el crecimiento de las plantas. Los análisis se realizaron con el programa estadístico Statistix 9.

RESULTADOS

No hubo interacción entre factores en ninguna de las variables evaluadas, poniendo de manifiesto que el efecto de la inoculación de *T. hamatum* GD12 (en adelante

GD12) sobre la altura, el ciclo fenológico y la biomasa de trébol y raigrás fue independiente de si las plantas crecieron en monocultivo o en mezcla

Altura de planta. Desde los 29 días de la siembra hasta el final del experimento, la altura del trébol tendió a ser mayor en plantas que crecieron en monocultivo frente a aquellas que crecieron en mezcla (Figura 1a). El efecto de GD12 sobre las plantas de trébol fue altamente significativo a los 18 DDS en suelos infestados alcanzando mayor altura comparadas con las sembradas

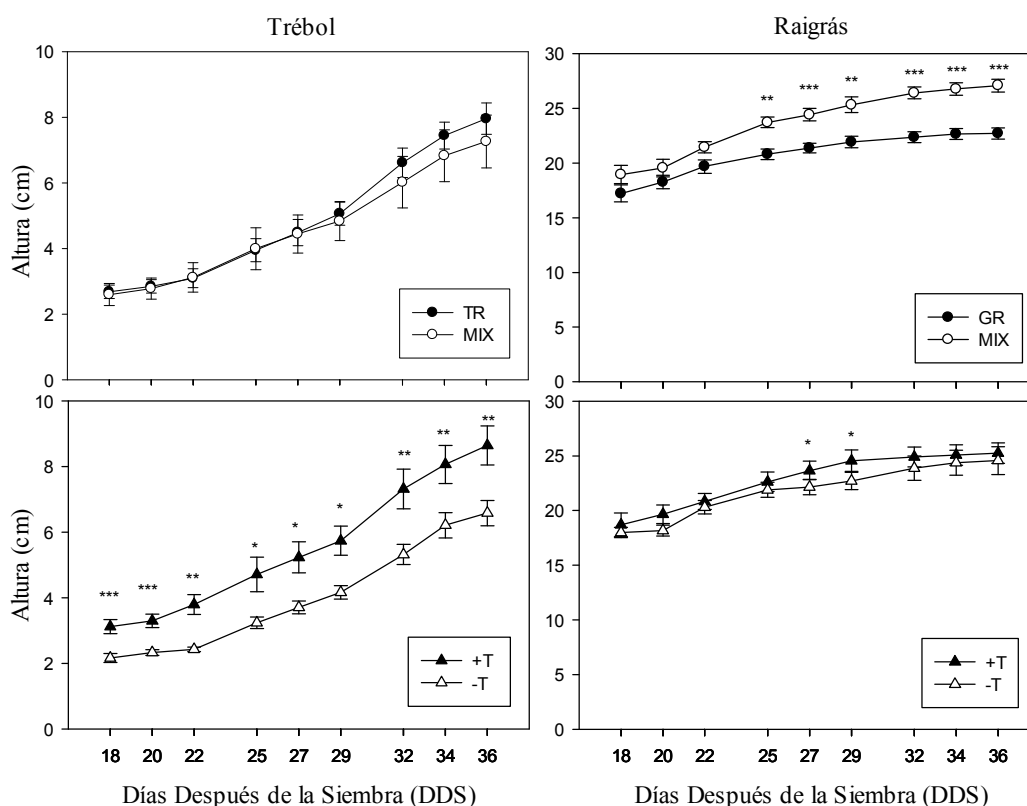


Figura 1.- Altura alcanzada por el trébol (a,c) y el raigrás (b,c) en mezcla y en monocultivo (a,b) y en suelos inoculados (T) y no inoculados (NT) (c,d) con la cepa GD12 de *T. hamatum*. Las diferencias entre tratamientos se realizaron para cada fecha separadamente (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Las barras en cada punto representan el error estándar de la media.

en suelos no infestados (Figura 1c). Se observaron diferencias significativas entre plantas de raigrás sembradas con trébol comparadas con aquellas que crecieron en monocultivo (Figura 1b), pero estas diferencias sólo aparecieron después de 25 DDS. No hubo efecto de GD12 sobre la altura del raigrás (Figura 1d).

Ciclo fenológico. No hubo diferencias significativas en los primeros estados de desarrollo (cotiledones, hoja espatulada y primera hoja verdadera) entre plantas de trébol crecidas en monocultivo o en mezcla con raigrás (Figura 2a). Sin embargo, el tré-

bol creciendo en mezcla mostró un retraso de dos días en alcanzar el estado de tres hojas con respecto al trébol en monocultivo. La inoculación con GD12 acortó el ciclo fenológico del trébol, estando las plantas en el momento del muestreo más avanzadas en su desarrollo (Figura 2c). Las plantas de raigrás que crecieron en mezcla alcanzaron las 5 hojas y el estado de ahijado 3 días antes que aquellas que crecieron en monocultivo (Figura 2b). El efecto de GD12 sobre el estado fenológico de raigrás fue significativo y se observaron claras diferencias entre tratamientos en los estadios de 5 hojas y ahijado

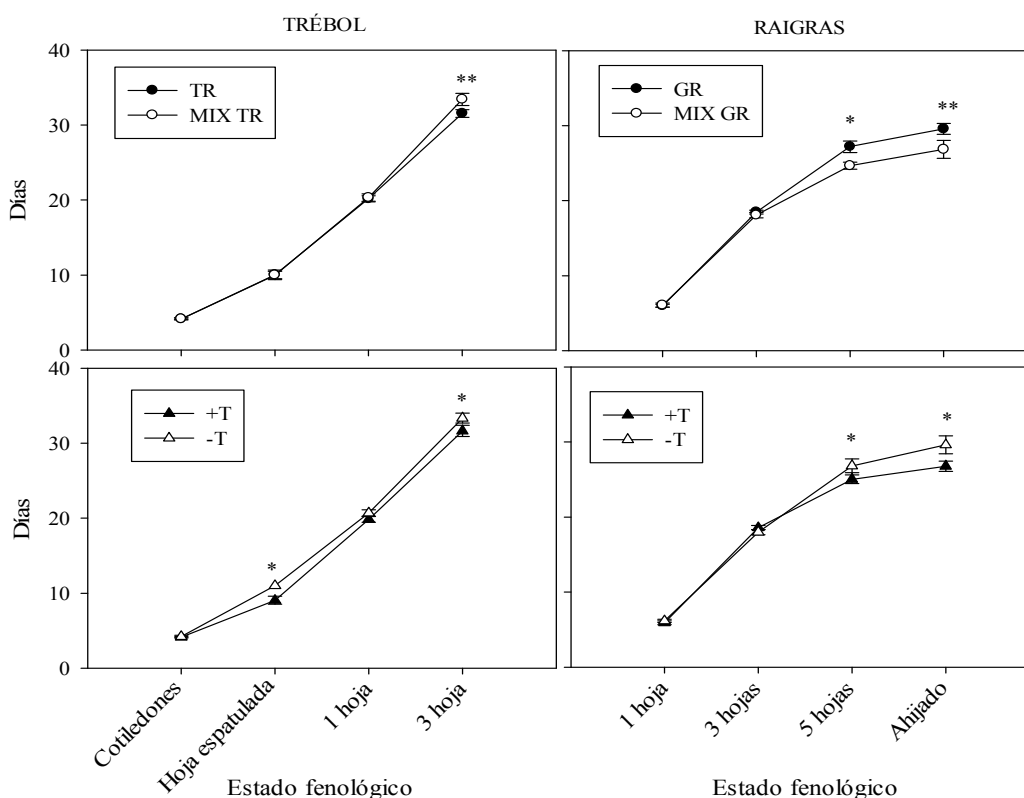


Figura 2.- Días en alcanzar distintos estados fenológicos en trébol (a,c) y raigrás (b,d) en mezcla y en monocultivo (a,b) y en suelos inoculados (T) y no inoculados (NT) (c,d) con la cepa GD12 de *T. hamatum*. (* p < 0,05; ** p < 0,01; ***.p < 0,001). Las barras en cada punto representan el error estándar de la media.

(Figura 2d), alcanzando las plantas estos estadios uno y tres días antes respectivamente en los suelos inoculados.

Biomasa. No hubo diferencias significativas en la biomasa aérea de plantas entre el trébol en monocultivo (TR) o sembrado en mezcla (MIX) (Figura 3a). Por el contrario la biomasa de plantas de trébol sembradas en suelos infestados con GD12 (T) fue significativamente mayor que cuando crecieron en suelo no inoculado (NT) (Figura 3c). En plantas de raigrás hubo diferencias significativas para ambos factores (Figura 3b y d), las plantas en mezcla con trébol tuvieron mayor biomasa que las que crecieron en monocultivo y las plantas crecidas en suelos inoculados con GD12 también tuvieron significativamente mayor biomasa que las que crecieron en suelos no inoculados.

DISCUSIÓN

Trichoderma hamatum GD12 añadido al suelo tuvo un efecto beneficioso sobre el crecimiento del trébol en todas las variables evaluadas (altura de planta, estado fenológico y biomasa en peso seco) y fue independiente de si el cultivo fue en mezcla con raigrás o en monocultivo. De igual manera el raigrás tuvo una mayor biomasa en suelos infestados y un ciclo fenológico más corto, pero no hubo efecto sobre la altura de la planta, siendo de igual tamaño que las plantas que crecieron en suelos no infestados.

Muchos estudios han descrito el efecto positivo de las leguminosas sobre las gramíneas (Rasmussen et al., 2012), y que el crecimiento del trébol puede verse reducido en mezclas comparado con el crecimiento en monocultivo (Carlsson et al., 2009). Nuestros resultados confirman esto, ya que las

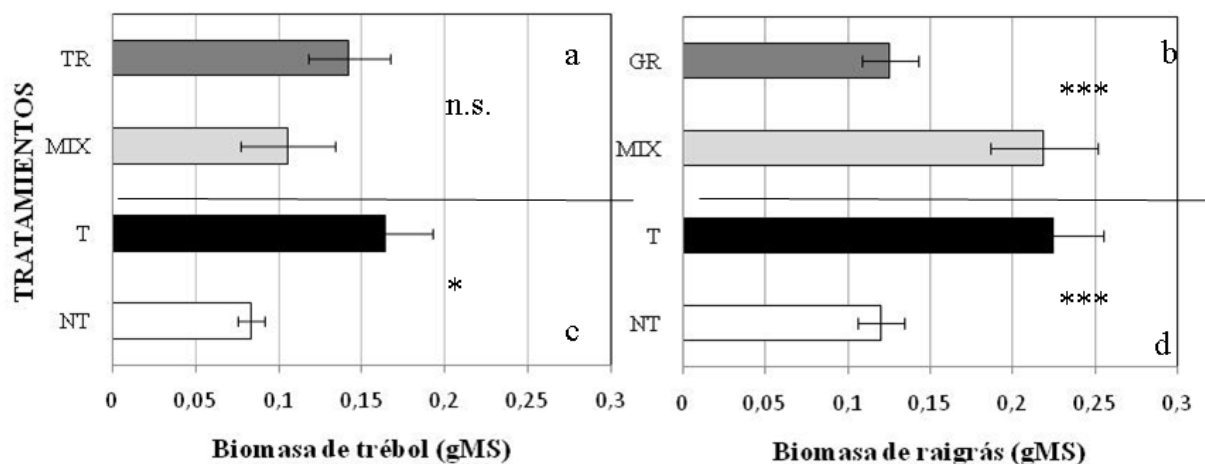


Figura 3.- Biomasa de plantas de trébol (a,c) y raigrás (b,d) en mezcla y en monocultivo (a,b) y en suelos inoculados (T) y no inoculados (NT) (c,d) con la cepa GD12 de *T. hamatum*. (n.s. no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Las barras representan el error estándar de la media.

plantas de trébol que crecieron con raigrás mostraron menor biomasa que cuando lo hicieron en monocultivo, aunque las diferencias no fueron significativas, y un retraso en el ciclo fenológico. Esta desventaja competitiva del trébol cuando crece en mezcla se debe a su mayor sensibilidad al sombreado del raigrás por un crecimiento más rápido de éste (Haynes 1988). Sin embargo, el hecho que *Trichoderma* aumente la altura del trébol en suelos infestados y no tenga efecto sobre la talla de las plantas de raigrás, demuestra el potencial de GD12 para aumentar la persistencia del trébol en mezclas con raigrás, ya que puede mejorar la exposición del trébol a la luz.

CONCLUSIONES

Trichoderma mostró efectos positivos sobre el trébol y el raigrás en la mezcla en relación a la biomasa y al adelanto del ciclo fenológico. Sin embargo, el hecho que *Trichoderma* sólo tuviera influencia en la altura de la planta en el trébol y no en el raigrás, sugiere que la inoculación del suelo con este hongo puede proporcionar una ventaja competitiva al trébol en mezclas. Aunque estos resultados deben validarse en campo, este hallazgo podría ser un avance que permitiría una mejora de los sistemas de praderas por el aumento de productividad y el efectivo establecimiento del trébol, que reduciría la necesidad de fertilización mineral.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Operativo FSE 2007-2013 y al proyecto INIARTA2011-00031 por el contrato de C. Alcántara y por la financiación de la estancia de la investigadora en North Wyke Rothamsted Research. Rothamsted Research es financiado por BBSRC.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

CARLSSON G., PALMBORG C., JUMPPONEN A., SCHERER-LORENZEN M., HÖGBERG P. Y HUSS-DANEL K. (2009) N₂ fixation in three perennial *Trifolium* species in experimental grasslands of varied plant species richness and composition. *Plant Ecology*, 205, 87-104.

HARMAN G.E. (2000) Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84 (4), 377-393.

HAYNES R.J. (1988) Competitive aspects of the grass-legume association. *Advances in Agronomy*, 33, 227-262.

LANCASHIRE P.D., BLEIHOLDER H., VAN DEN BOOM T., LANGELUDEKE P., STAUSS R., WEBER E., Y WITZENBERGER A. (1991) A uniform decimal code for growth stage crops and weeds. *Annals Applied of Biology*, 119,561-601.

PARSONS A. J. Y CHAPMAN D.F. (2000) The principles of pasture growth and utilization. En: Hopkins A. (ed) *Grass, Its Production & Utilization*, pp. 31-89. Oxford, Reino Unido: British Grassland Society by Blackwell Science, 3ª ed.

PEETERS A. (2009) Importance, evolution, environmental impact and future challenges of grasslands and grassland-based systems in Europe. *Grassland Science*, 55, 113-125.

RASSMUSEN J., SØEGAARD K., PIRHOFER-WALZI K., Y ERIKSEN J. (2012) N₂-fixation and residual N effect of four legume species and four companion grass species. *European Journal of Agronomy*, 36, 66-74.

SHABAN W. I. Y EL-BRAMAWY M. A. (2011) Impact of dual inoculation with *Rhizobium* and *Trichoderma* on damping off, root rot diseases and plant growth parameters of some legumes field crop under greenhouse conditions. *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science*, 1 (3), 98-108.