

EFICIENCIA IN VITRO DE ANTAGONISTAS DE SCLEROTINIA SCLEROTIORUM Y SCLEROTINIA MINOR (1)

E.R. WRIGHT (2), R. ZAPATA (2); OLGA S.F. de DELFINO (3),
MARIA V. LOPEZ (3) y M. SENLLE (2)

Recibido: 25-8-88

Aceptado: 2-11-88

RESUMEN

Dos aislamientos de *Trichoderma koningii* (Tk1 y Tk2) y uno de *Trichoderma viride* (Tv) fueron probados "in vitro" como posibles antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor* a través de la técnica del cultivo dual, la que permite realizar una selección preliminar de antagonistas individuales, para ser probados en invernáculo y campo.

De los análisis efectuados se concluye que, para las condiciones del ensayo, el aislamiento Tk2 de *Trichoderma koningii* muestra una mayor eficiencia como antagonista de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor* en relación a los otros dos microorganismos, dado que es el aislamiento que mostró el más rápido crecimiento inicial, que mantuvo un ritmo de crecimiento nunca inferior al de los otros antagonistas y que en todos los casos colonizó totalmente la superficie cubierta por los patógenos. El comportamiento de los antagonistas a través del tiempo fue descrito utilizando un modelo de crecimiento no lineal del tipo logístico.

Palabras clave: Control biológico, prueba in vitro, antagonistas, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma viride*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, modelo logístico.

EFFICACY IN VITRO OF ANTAGONISTS OF SCLEROTINIA SCLEROTIORUM AND SCLEROTINIA MINOR

SUMMARY

Two isolates of *Trichoderma koningii* (Tk1 and Tk2) and another one of *Trichoderma viride* (Tv) were tested "in vitro" as possible antagonists of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor*, by the dual culture method, which allows to make a preliminar selection of individual antagonists, in order to be tested after in greenhouse and in the field.

It is concluded that for the conditions of the assay, the isolate Tk2 of *Trichoderma koningii* shows a greater efficiency as antagonist of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor* in relation to the other two microorganisms, since it is the isolate that showed the quickest initial growth, kept a rate of growth never inferior to the ones of the other antagonists, and in each case colonized totally the surface covered with the pathogens. The behaviour of the antagonists through time was described using a model of Non Lineal Growth of the logistic type.

Key words: Biological control, "in vitro" test, antagonists, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma viride*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, logistic model.

(1) Parte del proyecto de Investigación "Manejo biológico de enfermedades causadas por hongos del suelo", subsidiado por la Universidad de Buenos Aires.

(2) Cátedra de Fitopatología, (3) Cátedra de Estadística. Facultad de Agronomía. UBA. Avda. San Martín 4453. (1417) Buenos Aires - Argentina -

INTRODUCCION

La continua aplicación de fungicidas hace que estos se tornen cada vez menos eficientes, siendo entonces necesario aumentar las dosis utilizadas, lo que conlleva un aumento en los costos y en la contaminación ambiental. Además, los controles por aplicación de fungicidas son de efecto temporario, requiriendo sucesivas aplicaciones.

Es por ello que el manejo práctico de microorganismos antagonistas (que no presentan las desventajas anteriores), integrados a las prácticas tradicionales, se constituye en una interesante herramienta potencial para el control de enfermedades. Para Baker y Cook (1974), el control biológico debería ser considerado como una parte de un programa de control de una enfermedad, asumiendo un rol de importancia variable según la enfermedad considerada. El control biológico da respuesta a muchos problemas de la agricultura: 1) Aumenta la producción con los recursos existentes; 2) Evita la aparición del fenómeno de la resistencia de los patógenos a los fungicidas; 3) Disminuye la polución y los riesgos del manipuleo de plaguicidas; y 4) Posibilita mantener una agricultura continua (Cook y Baker, 1983).

Las pruebas en agar para determinar la capacidad antagonista de un microorganismo sobre otro permiten realizar una selección preliminar de antagonistas individuales, siendo luego evaluados en condiciones de invernáculo y campo aquellos que muestren una mayor eficiencia *in vitro*. En el presente estudio dicha eficiencia se mide a través de la velocidad de crecimiento y su capacidad de parasitar al patógeno. De esta manera se facilita enormemente el trabajo, ya que es difícil que un microorganismo sea un antagonista eficiente en campo y no lo sea en medio de cultivo.

Debido a las particularidades del desarrollo "*in vitro*" de los hongos, se hace necesario contar con un método

de análisis estadístico apropiado para el estudio de microorganismos como posibles antagonistas de hongos patógenos.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron dos aislamientos de *Trichoderma koningii* (Oud.), uno de *Trichoderma viride* (Pers. ex Gray), uno de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) D. By, y uno de *Sclerotinia minor* Jagger (*S. sclerotiorum* var. *minor*). Los orígenes de los aislamientos se señalan en el Cuadro N° 1.

Los dos aislamientos de *Trichoderma koningii* y el aislamiento de *Trichoderma viride* fueron probados "*in vitro*" como posibles antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum* y de *Sclerotinia minor* a través de la técnica de cultivo dual.

Sobre cajas de Petri de vidrio de 9 centímetros de diámetro se volcaron en cada una de ellas 10 mililitros de agar papa glucosado (pH 6,5-7). Una vez solidificado el medio de cultivo, se ubicaron sobre el mismo dos discos de agar papa glucosado de 10 milímetros de diámetro con desarrollo micelial de 7 días, a una distancia entre ambos de 5 centímetros, uno de ellos con *Trichoderma koningii* o *Trichoderma viride* y el otro con micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* o *Sclerotinia minor*. Como testigos se sembraron discos de *Trichoderma koningii*, *Trichoderma viride*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor* frente a discos de agar papa glucosado sin desarrollo micelial alguno. Una vez sembradas las cajas fueron incubadas en estufa a 24±2°C, realizándose 6 repeticiones para cada tratamiento.

Para cada caja se midió el desarrollo de los microorganismos a través de la superficie cubierta por el micelio a los 2, 3, 4, 7 y 10 días desde la siembra. Para ello se procedió a reproducir sobre papel de calcar, desde las bases de las cajas, la superficie cubierta por los hongos. Se recortó la

Cuadro N° 1: Aislamientos utilizados en el ensayo, indicando origen de los mismos.

a) Aislamientos de Trichoderma koningii (Tk1 y Tk2)

-Tk1: obtenido sobre micelio y esclerocios de Sclerotium rolfsii parasitando girasol en la localidad de Norberto de la Riestra (Provincia de Buenos Aires).

-Tk2: obtenido sobre micelio y esclerocios de Sclerotinia sclerotiorum parasitando girasol en la localidad de Norberto de la Riestra (Prov. de Buenos Aires)

b) Aislamiento de Trichoderma viride (Tv), obtenido a partir de producto comercial originario de Francia

c) Aislamiento de Sclerotinia sclerotiorum (22), aislado a partir de capítulos de girasol atacados en la localidad de Carlos Casares (Provincia de Buenos Aires).

d) Aislamiento de Sclerotinia minor (10), aislado a partir de cultivo de girasol en la localidad de Reconquista (Provincia de Santa Fe).

misma y se pesó cada trozo de papel correspondiente a cada observación. A través de una constante que relaciona el valor obtenido expresado en miligramos con la superficie del papel se obtuvieron los datos de la superficie cubierta cada día por el micelio de los hongos, expresada en centímetros cuadrados.

Dado que se partió de discos con desarrollo miceliar de 10 milímetros de diámetro la superficie cubierta original fue de 0,79 cm², y, como el diámetro de las cajas utilizadas es de 9 cm, la máxima superficie cubierta posible fue de 63,62 cm²

Las etapas del análisis estadístico fueron las siguientes:

1) Análisis del modelo de crecimiento de los antagonistas y patógenos.

Se utilizó un modelo de crecimiento no lineal para describir el comportamiento de los antagonistas y patógenos a través del tiempo y detectar no sólo posibles diferencias en el ritmo de crecimiento en el período considerado, sino también en el modelo de crecimiento.

Se observó que la curva que mejor ajustaba las observaciones es la "Curva de Crecimiento Logístico", ya que el ensayo cumple con los supuestos del modelo elegido:

a) Desarrollo de la población en un medio cerrado (cultivos en cajas de Petri).

b) Inmutabilidad de las necesidades en el medio.

El modelo teórico utilizado para estimar los parámetros es:

$$W = \frac{K}{1 + e^{(\beta - t)/\alpha}}$$

donde:

K: máximo crecimiento posible

β : tasa constante de crecimiento

α : tiempo transcurrido hasta alcanzar la mitad del máximo crecimiento.

Este modelo es el propuesto por Yule (1925) como forma reducida de la ley de desarrollo de poblaciones de (Quetelet y Verschult, 1838). El mismo presenta 4 fases:

I) Transición gradual de crecimientos casi estacionarios a un incremento despreciable de la superficie.

II) Aceleración del ritmo de crecimiento hasta llegar a un punto de inflexión.

III) Retardo del ritmo de crecimiento.

IV) Transición gradual hacia condiciones casi estacionarias.

El crecimiento comenzó a ser observado, en este caso, a partir del segundo día de iniciado. Por este motivo se constatan las tres últimas fases. Es necesario destacar que, siendo este modelo no lineal, fue necesario utilizar procedimientos especiales para la estimación de los parámetros que emplean en su resolución el algoritmo desarrollado por Marquardt (Draper y Smith, 1981).

2) Análisis diario de las diferencias entre los antagonistas.

Se estudiaron los efectos de los antagonistas a través de un análisis de variancia y posterior prueba de Tukey para cada día de observación. En todos los casos se empleó un nivel de significación del 5%.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos se presentan en los Cuadros N° 2 a 5. Para una mejor visualización se los ha representado en las figuras 1 a 4. En los cuadros se observa que en muchos casos la suma de los dos microorganismos desarrollando conjuntamente supera los $63,62 \text{ cm}^2$, máxima superficie cubierta posible. Ello se debe a que una vez puestos en contacto los micelios de ambos hongos, el antagonista puede desarrollar por encima del microorganismo patógeno, parasitándolo.

Del análisis del crecimiento de los antagonistas a través del tiempo, cuando no están enfrentados a los patógenos (testigos), surge que el aislamiento Tk2 llega a su máximo crecimiento al tercer día (segundo momento de observación). El aislamiento Tk1 llega a la mitad de su crecimiento máximo entre el segundo y tercer día, con un aumento de crecimiento estimado

entre estos días de $24,30 \text{ cm}^2$, y Tv llega a la mitad de su máximo crecimiento alrededor del segundo día con un crecimiento estimado entre el segundo y tercer día de $29,41 \text{ cm}^2$. Se observa entonces que las curvas de crecimiento estimadas de los antagonistas Tk1 y Tv son muy similares cuando desarrollan sin la presencia del patógeno (Figura 1).

Cuando los antagonistas desarrollan enfrentados con el aislamiento de *Sclerotinia minor* (10), disminuyen su ritmo de crecimiento entre el segundo y tercer día. Tk2 tiene un aumento promedio estimado de $17,74 \text{ cm}^2$; Tk1 de $15,27$; y Tv de $16,26$. Como se observa en la Figura 3, el ritmo de crecimiento en los primeros días de medición es muy similar en los tres casos, pero difieren en el desarrollo alcanzado hasta el primer día de observación (segundo día), indicando un comportamiento diferente en la primera etapa de crecimiento, Tk2 tendría un muy rápido crecimiento inicial, seguido por Tk1 y Tv. Esta situación es distinta cuando el patógeno enfrentado es *Sclerotinia sclerotiorum* (aislamiento 22), Fig. 4. El ritmo de crecimiento es menor en los tres antagonistas frente a este patógeno, Tk2 cubre una mayor superficie en el segundo día en relación a los otros antagonistas, indicando un rápido crecimiento inicial, y un ritmo de crecimiento similar a Tv entre el segundo y tercer día ($11,50 \text{ cm}^2$ y $11,43 \text{ cm}^2$ para Tk2 y Tv, respectivamente). Sin embargo, sorprende el comportamiento diferente de Tk1 cuando se enfrenta este patógeno con relación a 10. Presenta un lento crecimiento inicial y un bajo ritmo de crecimiento entre el segundo y tercer día ($6,56 \text{ cm}^2$), colocándose por debajo de Tk2 y aún Tv, en superficie alcanzada. En cambio, al séptimo día su crecimiento igual al de Tv y se hace superior al décimo día, siendo siempre inferior a Tk2.

Del análisis del crecimiento de los patógenos cuando no se enfrentan a los

Cuadro N° 2: Superficie cubierta por los antagonistas y patógenos cuando no están enfrentados a otro microorganismo (testigos). (Promedio de 6 repeticiones)

ANTAGONISTA	DIA DE OBSERVACION				
	2	3	4	7	10
Tk1	22,86	42,90	57,72	63,62	63,62
Tk2	41,83	63,62	63,62	63,62	63,62
Tv	23,89	35,98	43,12	63,62	63,62
10	11,04	30,62	50,36	63,62	63,62
22	10,56	39,59	58,64	63,62	63,62

Cuadro N° 3a: Superficie cubierta por los antagonistas Tk1, Tk2 y Tv confrontados con un aislamiento de Sclerotinia minor (Patógeno 10) en cultivo dual. (Promedio de 6 repeticiones)

		DIA DE OBSERVACION					
		2	3	4	7	10	
Tv	10	Tv	10	Tv	10	Tv	10
26,72	4,53	42,80	6,39	53,03	9,51	62,99	9,53

		DIA DE OBSERVACION					
		2	3	4	7	10	
Tv	10	Tv	10	Tv	10	Tv	10
36,55	3,94	56,47	5,73	57,25	6,00	63,62	6,00

		DIA DE OBSERVACION					
		2	3	4	7	10	
Tv	10	Tv	10	Tv	10	Tv	10
14,54	5,56	35,13	12,38	46,50	15,08	63,62	15,08

antagonistas (testigos), se observa que el aislamiento 10 desarrolla más lentamente que el aislamiento 22. Entre el segundo y tercer día el aumento de superficie estimada es de 18,9 cm² para el 10 y de 29,25 cm² para el 22 (Figura 2).

En el análisis de las diferencias en superficies promedio alcanzadas por los antagonistas se detecta que:

Frente al patógeno 10

Tk2 supera significativamente a Tk1 y Tv al segundo y tercer día, no detectándose diferencias significativas con Tk1 pero sí con Tv al cuarto día.

Tk1 supera significativamente a Tv sólo al segundo día (Cuadro N° 5).

Cuadro N° 3b: Superficie cubierta por los antagonistas Tk1 Tk2 y Tv confrontados con un aislamiento de *Sclerotinia sclerotiorum* (Patógeno 22) en cultivo dual. (Promedio de 6 repeticiones)

DIA DE OBSERVACION									
2		3		4		7		10	
Tv	22	Tv	22	Tv	22	Tv	22	Tv	22
16,10	9,04	25,82	20,73	30,30	23,91	51,03	24,53	60,49	24,53

DIA DE OBSERVACION									
2		3		4		7		10	
Tv	22	Tv	22	Tv	22	Tv	22	Tv	22
37,53	7,68	51,53	13,17	54,47	13,87	61,53	13,87	63,62	13,87

DIA DE OBSERVACION									
2		3		4		7		10	
Tv	22	Tv	22	Tv	22	Tv	22	Tv	22
19,22	5,21	34,06	19,07	39,77	23,32	49,27	23,32	52,79	23,32

Cuadro N° 4: Superficie cubierta por los antagonistas Tk1, Tk2 y Tv cuando desarrollan enfrentados con un aislamiento de *Sclerotinia* menor en 3 momentos de observación. (Promedio de 6 repeticiones)

ANTAGONISTA	DIA DE OBSERVACION		
	2	3	4
Tk1	26,72	42,80	53,03
Tk2	36,55	56,47	57,25
Tv	14,54	35,14	46,50
DMS según Tukey ($\alpha = 0,05$)	7,38	8,00	9,17

Cuadro N° 5: Promedios de superficies alcanzadas por los antagonistas cuando desarrollan enfrentados con el patógeno 22 en cuatro momentos de observación, y el valor mínimo significativo de las diferencias. (Promedio de 6 repeticiones)

ANTAGONISTA	DIA DE OBSERVACION			
	2	3	4	7
Tk1	16,10	25,82	30,30	51,03
Tk2	37,26	51,63	54,47	61,63
Tv	19,21	34,06	39,77	49,27
DMS según Tukey ($\alpha = 0,05$)	9,17	17,54	17,62	13,46

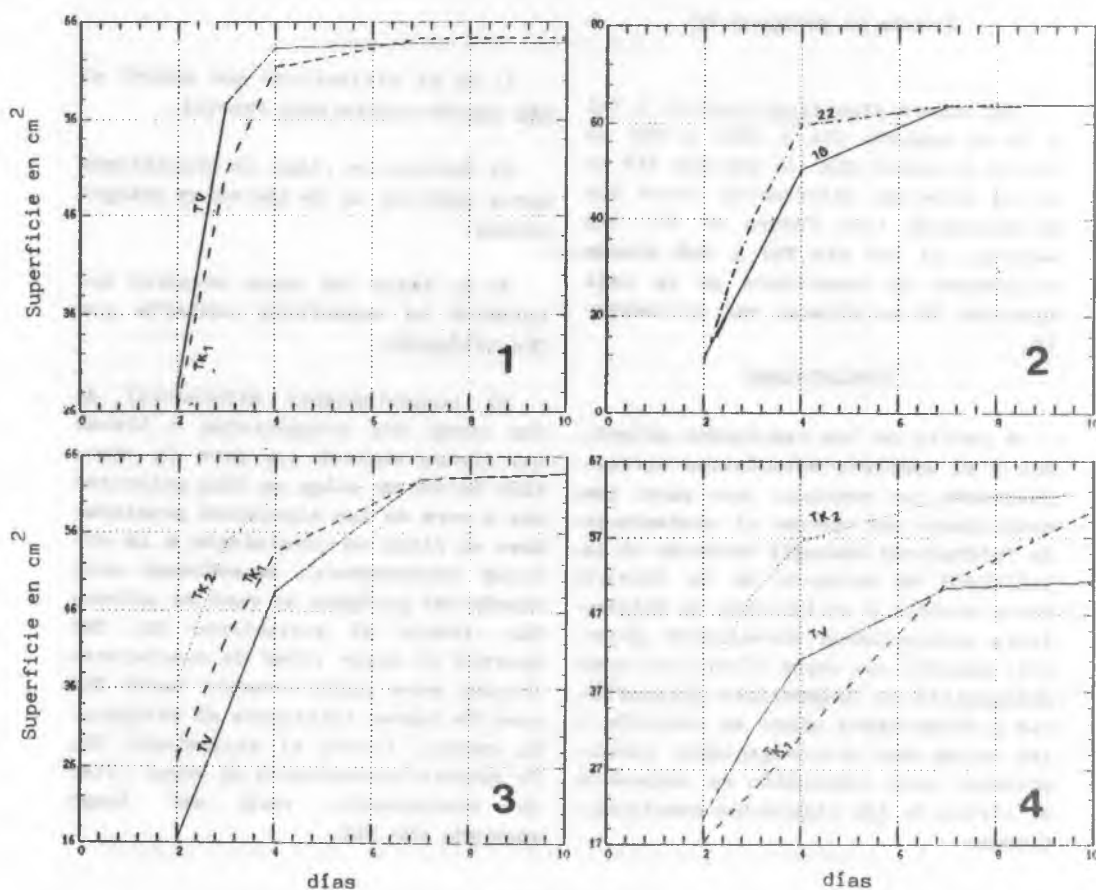


Figura 1: Curvas de Crecimiento estimadas de los antagonistas Tkl y Tv testigos.

$$W_{Tkl} = 64,3613648 / \{1 + \exp[(2,2258292 - \text{días}) / 0,5992004]\} .$$

$$W_{Tv} = 63,7686920 / \{1 + \exp[(2,0934843 - \text{días}) / 0,4050492]\} .$$

NOTA: Dado que Tk2 alcanza su máximo crecimiento al tercer día (segundo momento de observación), los parámetros de la curva de crecimiento correspondiente no pudieron ser estimados.

Figura 2: Curvas de Crecimiento estimadas de los patógenos 10 y 22 testigos.

$$W_{10} = 63,7110878 / \{1 + \exp[(3,0699836 - \text{días}) / 0,70069361]\} ,$$

$$W_{22} = 63,6911021 / \{1 + \exp[(2,7628418 - \text{días}) / 0,4694014]\} .$$

Figura 3: Curvas de Crecimiento estimadas de los antagonistas Tkl, Tk2 y Tv cuando desarrollan enfrentados al patógeno 10.

$$W_{Tkl} = 63,5568299 / \{1 + \exp[(2,3080972 - \text{días}) / 1,0110227]\} ,$$

$$W_{Tk2} = 62,6383783 / \{1 + \exp[(1,7675257 - \text{días}) / 0,6384204]\} ,$$

$$W_{Tv} = 63,707107 / \{1 + \exp[(2,9638830 - \text{días}) / 0,8977418]\} .$$

Figura 4: Curvas de Crecimiento estimadas de los antagonistas Tkl, Tk2 y Tv cuando desarrollan enfrentados al patógeno 22.

$$W_{Tkl} = 64,1295699 / \{1 + \exp[(4,1119748 - \text{días}) / 2,1152524]\} ,$$

$$W_{Tk2} = 62,5523797 / \{1 + \exp[(1,5125732 - \text{días}) / 1,1156222]\} ,$$

$$W_{Tv} = 51,3662900 / \{1 + \exp[(2,4604418 - \text{días}) / 1,1041171]\} .$$

Frente al patógeno 22

Tk2 supera significativamente a Tk1 y Tv al segundo día y sólo a Tk1 al tercer y cuarto día. Al séptimo día ya no se detectan diferencias entre los antagonistas (ver Cuadro N° 5). Sin embargo, al 10° día Tk1 y Tk2 cubren totalmente la superficie de la caja mientras Tv no alcanza ese crecimiento.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos y el análisis estadístico correspondiente se concluye que para las condiciones del ensayo el aislamiento de *Trichoderma koningii* obtenido en la localidad de Norberto de la Riestra sobre micelio y esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* parasitando girasol, muestra una mayor eficiencia como antagonista de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor* en relación a los otros dos microorganismos considerados. Esta conclusión se desprende en virtud de las siguientes consideraciones:

1) Es el aislamiento que mostró el más rápido crecimiento inicial.

2) Mantuvo un ritmo de crecimiento nunca inferior al de los otros antagonistas.

3) En todos los casos colonizó totalmente la superficie cubierta por los patógenos.

El comportamiento diferencial de los otros dos antagonistas a través del tiempo sugiere que para la elección de uno de ellos se debe priorizar una u otra de las siguientes propiedades: el ritmo de crecimiento o la aptitud colonizadora, dependiendo esto además del patógeno al cual se enfrentan. Frente al aislamiento 10, Tk1 muestra un mayor ritmo de crecimiento inicial pero posteriormente tanto Tk1 como Tv cubren totalmente al patógeno. En cambio, frente al aislamiento 22, Tv muestra inicialmente un mayor ritmo de crecimiento, para ser luego superado por Tk1.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BAKER, K.F. and R.J. COOK, 1974. *Biological control of plant pathogens*. W.H. Freeman and Company, 433.
- 2) COOK, R.J. and K.F. BAKER. 1983. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. The American Phytopathological Society, 539 pp.
- 3) DRAPER, N. and A. SMITH, 1981. *Applied Regression Analysis*, second edition. John Wiley and Sons, New York, 701.
- 4) YULE, G.U. 1925. *The growth of population and the factors which control it*. *Journal Royal Statistical Society*. 87:1-58.