

EFICIENCIA "IN VITRO" DE ANTAGONISTAS DE Rhizoctonia solani Y Sclerotium rolfsii Y ANALISIS COMPARATIVO DE DISTINTOS MODELOS DE CRECIMIENTO

P.L. CORTESE¹, M.E. GALLY¹ y MARIA V. LOPEZ²

Recibido: 04-08-92

Aceptado: 23-12-92

RESUMEN

A través de la técnica del cultivo dual se probó la eficiencia antagónica "in vitro" de un aislamiento de Trichoderma koningii Oud y uno de Trichoderma harzianum Rifai sobre dos aislamientos de Rhizoctonia solani Khun y uno de Sclerotium rolfsii Sacc.

Se realizó además un análisis comparativo de los distintos modelos de crecimiento utilizados para el análisis estadístico.

Los aislamientos de T. koningii y el de T. harzianum mostraron ser antagonistas eficientes de R. solani. En el caso de S. rolfsii, T. koningii solo limita el crecimiento del patógeno y T. harzianum no tuvo efecto antagónico.

Para el análisis de los modelos de crecimiento se compararon el logístico, el asintótico y el polinomial a través de un estudio de regresión. El modelo logístico ajusta mejor cuando los microorganismos desarrollaron solos y el asintótico cuando lo hicieron en cultivo dual. Si bien el polinomial presentó un ajuste adecuado, sus parámetros tienen poca significación biológica.

Palabras Claves: Control Biológico, Sclerotium rolfsii, Rhizoctonia solani, Modelos de Crecimiento.

ANTAGONISTIC EFFICIENCY OF Rhizoctonia solani and Sclerotium rolfsii "IN VITRO", AND COMPARATIVE ANALYSIS OF DIFFERENT MODELS OF DEVELOPMENT.

SUMMARY

The antagonistic efficiency of one isolation of Trichoderma koningii Oud and one of Trichoderma harzianum Rifai against two isolations of Rhizoctonia solani Khun and one of Sclerotium rolfsii Sacc, was proved "in vitro" by means of the dual culture technique.

It was also done a comparison between different models of development used for statistical analysis.

The isolations of T. koningii and T. harzianum behaved like efficient antagonists of R. solani. In the case of S. rolfsii, T. koningii only limited the growth of the pathogen and T. harzianum did not show any antagonistic effect.

The logistic, asymptotic and polynomial models were compared by a regression study. Logistic model adjusts better when the organisms developed alone, an the asymptotic when they did it in dual culture. The polynomial model showed one adequate adjust, but its parameters have low significance in biology.

Key words: Biological control, Sclerotium rolfsii, Rhizoctonia solani, Development models.

¹Cátedra de Fitopatología y ² Cátedra de Estadística, Facultad de Agronomía, UBA. Avda. San Martín 4453, (1417) Buenos Aires, -Argentina-

INTRODUCCION

Las determinaciones "in vitro" para la evaluación de la eficiencia antagónica de distintos hiperparásitos, tienen como objetivo realizar una selección de aquellos que presenten un mayor ritmo de crecimiento y una alta capacidad para parasitar al patógeno. Estos microorganismos seleccionados deberán ser evaluados posteriormente en condiciones de invernáculo y de campo determinando de esta forma su capacidad controladora en condiciones naturales.

Las especies de *Trichoderma* capaces de hiperparasitar hongos patógenos son generalmente antagonistas altamente eficientes. Weindling (1934) determinó el parasitismo de *Trichoderma lignorum* Tode sobre *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*. Wells et al. (1972) demostraron el efecto de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones de invernáculo. Hadar et al. (1979) observaron el ataque al micelio de *Rhizoctonia solani* por parte de hifas de *Trichoderma harzianum*.

El desarrollo y crecimiento "in vitro" de los distintos hongos es, un proceso dinámico que puede caracterizarse por su tasa de cambio en el tiempo. Este proceso puede ser expresado matemáticamente a través de distintos "Modelos biológicos de crecimiento".

El modelo adecuado para cada situación depende de: el tipo de microorganismo, las condiciones de desarrollo y la presencia o ausencia de otro microorganismo en el medio.

Son objetivos de este trabajo evaluar la eficiencia antagónica de dos especies de *Trichoderma* sobre dos aislamientos de *Rhizoctonia solani* y uno de *Sclerotium rolfsii* y efectuar un estudio comparativo de los distintos modelos de crecimiento usados para el análisis estadístico.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron dos especies de *Trichoderma*: *T. koningii*-(Tk2) y *T. harzianum* (Th)

como antagonistas de dos aislamientos de *Rhizoctonia solani* (R56 y R45) y uno de *Sclerotium rolfsii* (Sr).

El origen de los distintos aislamientos se detalla a continuación:

- *T. koningii* (Tk2) y *T. harzianum* (Th) aislados a partir de micelio y esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* parasitando girasol en la localidad de Norberto de la Riestra (Provincia de Buenos Aires).

- *S. rolfsii* (Sr) aislado sobre plantas de "Aster" (*Callistepus chinensis*) en la localidad de Chacabuco (Pcia. de Buenos Aires).

- *R. solani* (R56) aislado sobre plantas de poroto (*Phaseolus vulgaris*) en la localidad de Orán (Pcia. de Salta).

- *R. solani* (R45) obtenido de un infectario de *Colletotrichum* spp. en la Estación Experimental del INTA Paraná. (Pcia. de Entre Ríos).

Los dos aislamientos de *Trichoderma* (Tk2 y Th) fueron probados "in vitro" como posibles antagonistas de *R. solani* y *S. rolfsii* a través de la técnica de cultivo dual.

A partir de cultivos de 7 días de crecimiento se tomaron con un sacabocados previamente flameado, discos de 10 mm de diámetro. Estos discos se colocaron en cajas de Petri (de 9 cm de diámetro) con 10 ml de agar papa glucosado (pH 6,5-7) dispuestos siempre de a pares, separados 3 cm uno del otro, de modo tal que quedaran enfrentados uno del patógeno y otro del antagonista a probar en cada caso.

Como testigos se enfrentaron discos de cada uno de los microorganismos con discos de agar sin desarrollo micelial.

Se realizaron 6 repeticiones para cada tratamiento y se llevaron a estufa de cultivo ($25 \pm 1^\circ\text{C}$).

Se midió luego la superficie cubierta por cada hongo calcando la misma sobre un pa-

Eficiencia "in vitro" de antagonistas de *Rhizoctonia solani*...

pel transparente y se pesaron en una balanza de precisión. Los resultados fueron expresados en miligramos.

Las mediciones se realizaron cada 24 horas hasta que se completó el crecimiento posible en la caja o no se evidenciaron cambios en la superficie cubierta por el microorganismo.

En el caso de *Sclerotium rolfsii* se llevó a cabo un recuento del número de esclerocios formados en los distintos tratamientos. La medición se realizó a los 15 días de la siembra en las 6 repeticiones.

Para la realización del análisis estadístico se aplicó la siguiente metodología:

A) Análisis comparativo de los distintos modelos de crecimiento, para describir el comportamiento de los antagonistas y patógenos en cultivos duales y testigos.

Se utilizaron 3 modelos de crecimiento, los cuales se detallan a continuación:

1) Modelo Logístico, cuya expresión matemática es:

$$w = \frac{K}{1 + e^{-(B-t)/a}}$$

K: máximo crecimiento posible

B: tasa constante de crecimiento

a: tiempo transcurrido hasta la mitad del crecimiento

t: número de días de crecimiento.

Este modelo no lineal es el propuesto por Yule (1925) como forma reducida de la Ley de Desarrollo de Poblaciones.

1) Modelo asintótico, se expresa como

$$w = A - B e^{-pt}$$

t: número de días de crecimiento

A,B,p: son parámetros

"La curva de crecimiento que define este modelo no lineal surge del valor (A-B) cuando $t = 0$ y continuamente se aproxima a un máximo valor de A, determinando la asíntota conforme t se va haciendo grande." (Snedecor 1979).

2) Modelo Polinomial, es un modelo lineal en los parámetros y no lineal en la variable independiente que puede expresarse como:

$$y = B_0 + B_1t + B_2t^2 + \dots + B_pt^p + w$$

B: Coeficientes de regresión

t: tiempo

w: error aleatorio

A) Análisis de las diferencias entre los antagonistas.

Se estudiaron los efectos de los antagonistas a través de un análisis de variancia multifactorial y posterior prueba de Tukey para el segundo y cuarto día de observación. Se empleó un nivel de significación del 5%.

B) Análisis de las diferencias en la producción de esclerocios de *S. rolfsii* en los distintos tratamientos.

Se realizó un análisis de variancia multifactorial, con un nivel de significación del 5%, con la transformación de la variable respuesta a raíz cuadrada.

RESULTADOS

Del análisis del ritmo de crecimiento de los distintos microorganismos surge que cuando crecen solos tanto patógenos como antagonistas alcanzan el crecimiento máximo posible entre el tercer y cuarto día de medición. No se aprecian por lo tanto diferencias entre las tasas de crecimiento de los distintos hongos, (Cuadro N°1 y Figuras 1 y 2).

Cuadro N°1: Desarrollo de Testigos (peso promedio de 6 repeticiones, expresado en mg)

Test/día	1	2	3	4	5	6
Tk2	0.0294	0.1661	0.2373	0.2585	0.2585	0.2585
TH	0.0365	0.1647	0.2196	0.2585	0.2585	0.2585
Sr	0.0424	0.1468	0.2332	0.2585	0.2585	0.2585
R56	0.0375	0.1578	0.2481	0.2585	0.2585	0.2585
R45	0.0347	0.1558	0.2523	0.2585	0.2585	0.2585

Cuadro N°2: Desarrollo de *Trichoderma koningii* (Tk2) en cultivo dual con dos aislamientos de *R. solani* (R45, R56) y uno *S. rolfsii* (Sr) peso promedio de 6 repeticiones, expresado en mg.

Trat/día	1	2	3	4	5	6
R56	0.0244	0.145	0.1975	0.2447	0.2576	0.2585
R45	0.0229	0.1407	0.2166	0.2395	0.2501	0.2585
Sr.	0.0338	0.147	0.1541	0.1541	0.1541	0.1541

Cuadro N°3: Desarrollo de *Trichoderma harzianum* (Th) en cultivo dual con dos aislamientos de *R. solani* (R45, R56) y uno de *S. rolfsii* (Sr) peso promedio de 6 repeticiones, expresado en mg.

Trat/día	1	2	3	4	5	6
R56	0.0256	0.1285	0.1504	0.1906	0.246	0.2585
R45	0.0233	0.1402	0.1562	0.1975	0.2421	0.2585
Sr.	0.0282	0.1169	0.1169	0.1169	0.1169	0.1169

Cuadro N°4: Número de Esclerocios se *Sclerotium rolfsii* observados al sexto día.

Tratamiento	Repeticiones					
	1	2	3	4	5	6
Tk2	5	6	8	3	10	6
Th	34	38	28	66	59	48
Testigo	56	94	86	88	119	83

Cuadro N°5: Cuadrado Medio del Error y el Estadístico de Durbin-Watson para tratamientos testigos y sus respectivos modelos. * $sign_{\alpha} = 0,05$

	Tk2	Th	R56	R45	Sr
Logístico					
C.M.E	3.96E-04	3.48E-04	4.80E-05	1.23E-04	1.05E-04
D-W	1.7606	1.42894	1.69806	*0,99264	1.3823
Asintótico					
C.M.E	4.32E-04	2.84E-04	1.68E-04	2.59E-04	2.12E-04
D-W	1.56283	1.64725	*0,881706	*0,486941	*0,78826
Polinomial					
C.M.E	5.35E-04	3.60E-04	2.20E-04	3.31E-04	1.78E-04
D-W	*1.13238	*1.14678	*0,564463	*0539869	*0,936199

Eficiencia "in vitro" de antagonistas de *Rhizoctonia solani*...

Cuadro N°6: Cuadrado Medio del Error y el Estadístico de Durbin-Watson para los tratamientos Duales y sus respectivos modelos.

	Tk2-R56	Tk2-R45	Th-R56	Th-R45
Logístico				
C.M.E	4.31E-04	2.04E-04	5.78E-04	5.42E-04
D-W	1.33867	*0.911509	*0,86075	*0.83665
Asintótico				
C.M.E	2.89E-04	1.55E-04	3.97E-04	3.53E-04
D-W	1.81386	*1,04363	*1,08485	*1,09773
Polinomial				
C.M.E	2.99E-04	1.48E-04	3.97E-04	3.40E-04
D-W	1.79786	*1,08169	*1,12344	*1,18968

*significativo

Nivel de significancia = 0,05

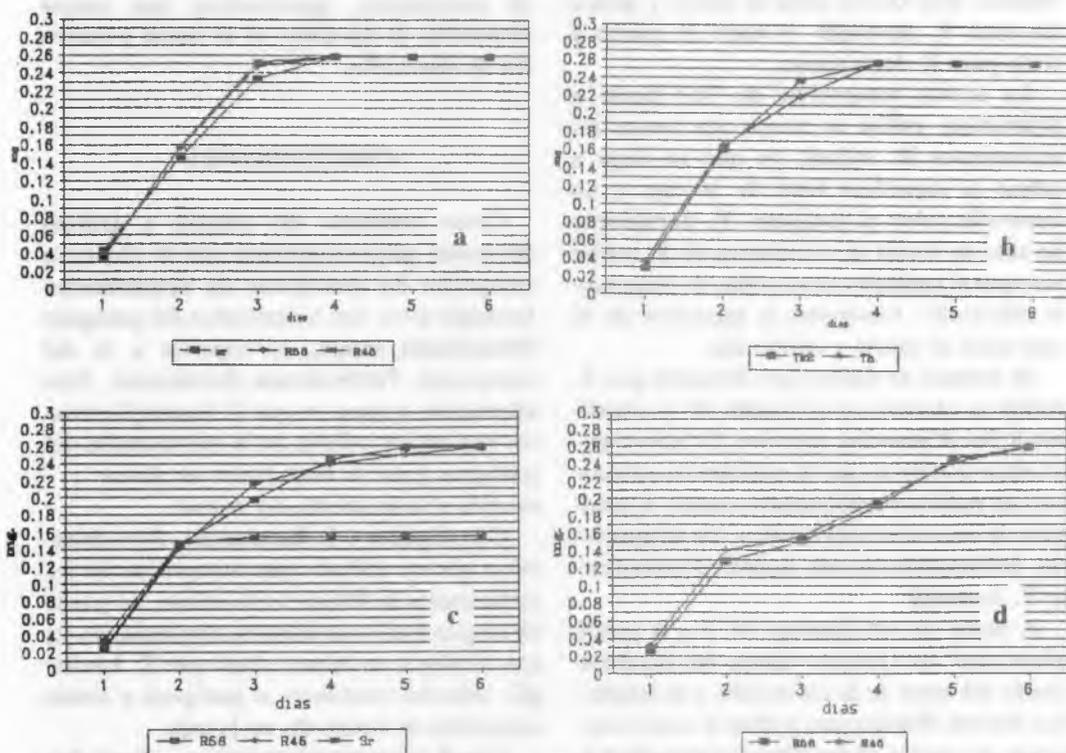


Fig.1a: Desarrollo de patógenos; b: Desarrollo de antagonistas; c: *T. koningii* en cultivo dual; d: *T. harzianum* en cultivo dual. Peso promedio de 5 repeticiones

El crecimiento observado de los antagonistas, cuando desarrollan enfrentados con los distintos patógenos puede observarse en los Cuadros N° 2 y 3 y Figuras 1c y d).

Cuando los microorganismos desarrollan en cultivo dual su ritmo de crecimiento disminuye. Esta disminución comienza a percibirse a partir del segundo día de crecimiento.

El antagonista *Trichoderma koningii* (Tk2), creciendo junto a los aislamientos R56 y R45 de *Rhizoctonia solani* tiene un ritmo de crecimiento mayor que el antagonista *Trichoderma harzianum* (Th) enfrentado a los mismos patógenos. Estos resultados se observan entre el segundo y tercer día y los patógenos son ampliamente superados al cuarto día.

Cuando los antagonistas crecen enfrentados a los aislamientos de *R. solani*, cubren la totalidad de la superficie de la caja, desarrollando sobre el micelio del patógeno y parasitándolo. Esto ocurre entre el cuarto y quinto día para *T. koningii* y entre el quinto y sexto para *T. harzianum*.

La acción antagonista de Tk2 frente a *Sclerotium rolfsii* es menor que contra los aislamientos *R. solani*, ya que no llega a cubrir la superficie total de la caja y no desarrolla sobre el patógeno. *T. harzianum* no sólo no limita el crecimiento de *S. rolfsii* sino que el patógeno crece sobre el antagonista cubriendo totalmente la superficie de la caja entre el cuarto y quinto día.

El número de esclerocios formados por *S. rolfsii* se observa en el Cuadro N° 4. Analizando las diferencias entre los distintos tratamientos se detecta que la cantidad de esclerocios se reduce sensiblemente cuando el patógeno se encuentra enfrentado a los antagonistas, destacándose en este aspecto el aislamiento *T. koningii*.

A partir de los Cuadros N° 5 y 6 puede observarse los distintos valores del cuadrado medio del error de la estimación y el estadístico Durbin-Watson para probar la autocorrelación de errores en los distintos tratamientos y modelos, se detecta en estos que para los cultivos duales el modelo asintótico presenta

un mejor ajuste cuando los antagonistas crecen enfrentados a los aislamientos de *R. solani*.

En cambio cuando los antagonistas se enfrentan con *S. rolfsii* ninguno de los tres modelos puede considerarse apropiado, ya que en el caso del aislamiento *T. koningii*, no hay concordancia entre los valores observados y predichos. La baja eficiencia mostrada por *T. harzianum* frente a este patógeno determina la imposibilidad de efectuar este tipo de análisis.

En cuanto al modelo polinomial muestra un adecuado ajuste siendo en todos los casos muy similar al modelo asintótico.

Excepto en el caso de *T. harzianum*, en el que ajusta mejor el modelo asintótico, el resto de los tratamientos testigos concuerda con el modelo logístico.

Por último cabe destacar que los modelos ajustan mejor en las primeras y últimas etapas de crecimiento, apreciándose una mayor dispersión de los datos en el tercer y cuarto día de desarrollo.

CONCLUSIONES

Como resultado del estudio y análisis efectuado, puede concluirse que la eficiencia antagonista del aislamiento de *Trichoderma koningii* sobre dos aislamientos del patógeno *Rhizoctonia solani*, es superior a la del antagonista *Trichoderma harzianum*. Esta afirmación se basa en que *T. koningii* muestra una mayor rapidez en la colonización del patógeno y por lo tanto limita en mayor medida el crecimiento del mismo.

Con respecto a *T. harzianum*, debe destacarse que su aptitud como antagonista de los aislamientos de *Rhizoctonia solani*, no puede de ningún modo considerarse despreciable; ya que si bien a un menor ritmo que *T. koningii*, coloniza totalmente al patógeno y limita netamente su desarrollo en la caja.

Cuando los antagonistas crecen enfrentados a *Sclerotium rolfsii*, muestran un comportamiento muy diferente. *T. koningii*, limita el

Eficiencia "in vitro" de antagonistas de *Rhizoctonia solani*...

crecimiento del patógeno y disminuye en forma muy significativa el número de esclerocios, pero no lo coloniza. *T. harzianum* restringe su acción antagonica a una reducción del número de esclerocios formados pero no disminuye la tasa de crecimiento del patógeno.

A partir de los resultados obtenidos del análisis comparativo de los distintos modelos de crecimiento, se concluye que para las condiciones del ensayo, el modelo de creci-

miento logístico resultó ser el más adecuado cuando los microorganismos crecen solos.

El modelo asintótico resultó apropiado para la descripción del crecimiento en los cultivos duales, verificando un mejor ajuste en las primeras y últimas etapas del proceso

Con respecto al modelo polinomial muestra un adecuado ajuste en el caso de los cultivos duales, pero su significación biológica es limitada y por lo tanto de difícil aplicación en este tipo de estudios.

BIBLIOGRAFIA

- 1) DUTTA, B.K. 1981. *Studies on some fungi isolated from the rhizosphere of tomato plants and the consequent prospect for the control of Verticillium wilt. Plant Soil*, 63:209-216.
- 2) HADAR, Y., I. CHET and Y. HENIS. 1979. *Biological control of Rhizoctonia solani damping off with wheat bran culture of Trichoderma harzianum. Phytopathology*, 69:64-68.
- 3) WEINDLING, R. 1934. *Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of Trichoderma lignorum on Rhizoctonia solani and other soil fungi. Phytopathology*, 24:1153-1179.
- 4) WELLS, H.D., D.K.BELL and C.A.JAWORSKI. 1972. *Efficacy of Trichoderma harzianum as a biological control for Sclerotium rolfsii. Phytopathology*, 62:442-447.
- 5) WRIGHT, E.R.; R. ZAPATA; OLGA S.F. de DELFINO; MARIA V. LOPEZ y N. SENLLE. 1988. *Eficiencia in vitro de antagonistas de Sclerotinia sclerotiorum y Sclerotinia minor. Rev. Facultad de Agronomía*, 9(3):109-116.
- 6) SNEDECOR, G.W., W.G. COCHRAN. 1979 *Métodos Estadísticos C.E.C.S.A.* 703 pag.
- 7) YULE, G. 1925. *The Growth of Population and the Factors which Control it. Journal of the Royal Statistical Society*, Vol: LXXXVIII; January.