

EFICIENCIA ANTAGONICA "IN VITRO" Y EN INVERNACULO DE *Trichoderma koningii* SOBRE *Colletotrichum dematium* var *truncata*

P. E. GRIJALBA¹, G. A. DEVITTO¹, E. R. WRIGHT¹, MARÍA V. LÓPEZ², Y OLGA S. F. DE DELFINO².

Recibido: 13/05/93

Aceptado: 03/09/93

RESUMEN

En este trabajo se analizó la eficiencia antagónica de un aislamiento de *Trichoderma koningii* sobre un aislamiento de *Colletotrichum dematium* var *truncata*, patógeno de la soja que además de causar una enfermedad denominada "antracnosis" impide la germinación de la semilla.

Se evaluó dicha eficiencia "in vitro" y en invernáculo.

Al desarrollar el antagonista enfrentado al patógeno en medio de cultivo, *Trichoderma koningii* creció a un ritmo levemente inferior al observado en el tratamiento testigo, pero a partir del 5°-6° día comenzó a desarrollar sobre la colonia de *Colletotrichum dematium* var *truncata*. Bajo las condiciones del ensayo en invernáculo no hubo diferencias significativas en el porcentaje de emergencia cuando sobre las semillas previamente inoculadas con el patógeno se pulverizó una suspensión conidial del antagonista o se aplicó el fungicida Captan.

Palabras clave : control biológico, *Trichoderma koningii*, soja, *Colletotrichum dematium* var. *truncata*.

ANTAGONISTIC EFFICIENCY OF *Trichoderma koningii* ON *Colletotrichum dematium* var. *truncata*. TESTED "IN VITRO" AND IN GLASSHOUSE

SUMMARY

The antagonistic efficiency of *Trichoderma koningii* on *Colletotrichum dematium* var *truncata* is analyzed in this paper. The latter is a pathogen on soybean causing anthracnose on plants and germination of seeds.

Test were carried out "in vitro" and in the glasshouse. The culture of *Trichoderma koningii* in front of the pathogen was slightly slower than the observed in the control treatment. Nevertheless, from the 5th-6th day on, it began to grow on the mycelium of *Colletotrichum dematium* var *truncata*. There were no statistical differences in the germination when over the seeds previously inoculated with the pathogen, the antagonist or the fungicide Captan were applied.

Key words: biological control. *Trichoderma koningii*. soybean *Colletotrichum dematium* var. *truncata*.

¹ Cátedra de Fitopatología y ² Cátedra de Estadística, Facultad de Agronomía, Universidad de Bs. As., Av. San Martín 4453 (1417) Buenos Aires

INTRODUCCION

Frente a las diferentes estrategias disponibles para el manejo de las enfermedades de las plantas, la utilización de agentes biológicos surge como una atractiva posibilidad, ya que permitiría superar los inconvenientes resultantes de la aplicación constante de fungicidas químicos, tales como los riesgos de contaminación ambiental y la generación de resistencia.

Algunos aislamientos del género *Trichoderma* han demostrado comportarse como eficientes antagonistas frente a un gran número de patógenos cuyo hábitat es el suelo o que son portados por la semilla (Harman *et al.* 1980, Elad *et al.* 1980, Liu y Baker, 1980). En el caso de tratamientos de semilla, *Trichoderma hamatum* coloniza la cubierta seminal controlando el ataque de ciertos patógenos, por ocupación física y utilización de los exudados producidos por la germinación. Aparentemente esta eficiencia del hongo, cuando se lo aplica a la semilla, está asociado a la capacidad de crecer y esporular sobre la misma y posteriormente quedar establecido en el suelo (Harman *et al.*, 1980).

El tratamiento de semillas con antagonistas microbianos constituye, hasta el presente, la técnica de control biológico de las plantas que ha obtenido mejores resultados (Luz, 1991). Los hongos antagonistas más efectivos para tratamientos biológicos de semillas son especies de los géneros *Chaetomium*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Cook y Baker, 1983).

En este trabajo se analiza la eficiencia antagónica de un aislamiento de *Trichoderma koningii* sobre un aislamiento de *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, que además de causar una enfermedad denominada "antracnosis" en los estadios adultos de este vegetal, impide la germinación y provoca el colapso de las plántulas cuando es portado por la semilla, obligando a la utilización de fungicidas curasemillas.

Dicha eficiencia fue evaluada *in vitro* y en invernáculo a través de su aplicación en semilla.

El desarrollo y crecimiento *in vitro* de los distintos hongos es un proceso dinámico caracterizable por su tasa de cambio en el tiempo. Para expresar dicho proceso, se utilizan distintos "Modelos Biológicos de Crecimiento".

MATERIALES Y METODOS

El origen de los aislamientos es el siguiente:

--*Trichoderma koningii* (Tk₂): obtenido sobre el micelio y esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* parasitando girasol en la localidad de Norberto de la Riestra, provincia de Buenos Aires, que en un ensayo anterior mostró una buena eficiencia antagónica *in vitro* (Wright *et al.*, 1988).

--*Colletotrichum dematium* var. *truncata*: obtenido de semillas de soja provenientes de la localidad de Arrecifes, provincia de Buenos Aires.

Se realizaron dos ensayos:

A) ENSAYO IN VITRO

Se utilizó la técnica de cultivos duales (Wright *et al.*, 1988), realizándose seis repeticiones para cada tratamiento. El desarrollo de los microorganismos se midió cada 24 horas durante diez días, calcándose sobre papel la superficie cubierta por hongos desde la base de la caja de Petri. Se recortó el papel correspondiente a cada observación y se pesó, expresando los resultados en miligramos.

El crecimiento de los micelios fue descrito a través de dos modelos no lineales:

1) **Modelo logístico**, cuya expresión matemática es la siguiente:

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

donde 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 fue propuesto por Yule (1925) como forma reducida de la Ley de Desarrollo de Poblaciones de Quetelet y Verhulst (Verhulst, 1838).

2) **Modelo asintótico**, cuya expresión es:

$$W = A - B^{(pt)}$$

A, B y p son parámetros. La cota superior de crecimiento está dada por A.

La comparación de los pesos promedios alcanzados por el patógeno creciendo solo y con el antagonista se realizó mediante el análisis de variancia.

B) ENSAYO EN INVERNACULO:

Se midió la acción antagónica de *Trichoderma*

koningii sobre *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, aplicando el antagonista a través de un tratamiento de semillas.

Para ello se sembraron semillas de soja de la variedad Asgrow 5502 en bandejas plásticas rectangulares de 25 x 18 cm. de lados y una profundidad de 5 cm., conteniendo tierra y arena (1:1) previamente esterilizadas. Estas bandejas fueron colocadas en media sombra en invernáculo, evaluándose el porcentaje de emergencia a los 15 días de iniciado el ensayo. La humedad de la tierra se mantuvo constante a lo largo del ensayo en un contenido aproximado a capacidad de campo.

Se realizaron 6 tratamientos:

- 1) Semillas de soja sin tratar (T_0COL_0).
- 2) Semillas de soja inoculadas con una suspensión de 4×10^5 conidios/ml. de *Colletotrichum dematium* var. *truncata* (T_0COL_1).
- 3) Semillas de soja inoculadas con una suspensión de $4,5 \times 10^7$ conidios/ml. de *Trichoderma koningii* (TK_1COL_0).
- 4) Semillas de soja inoculadas con ambas suspensiones (TK_1COL_1).
- 5) Semillas de soja inoculadas con la suspensión de *Colletotrichum dematium* var. *truncata* y posteriormente tratadas con un fungicida de uso corriente en soja (CAPTAN al 83%, dosis 0,6 grs. de p.a./kg de semilla) (F_1COL_1).
- 6) Semillas de soja tratadas únicamente con el mismo fungicida y a la misma dosis ($F COL_0$).

Las suspensiones conidiales fueron pulverizadas con el agregado de 0,5% de Metil celulosa (Osburn et al., 1986). El diseño estadístico fue en bloques completos aleatorizados, empleándose 4 repeticiones por tratamiento.

Para la evaluación de las observaciones se realizó un análisis de varianza multifactorial a efectos fijos, con tratamiento fúngico como factor A a 3 niveles (testigo, antagonista TK_2 , fungicida) e inoculación del patógeno como factor B a 2 niveles (sin y con inoculación) y posteriormente la prueba de Tukey, empleándose un nivel de significación del 5%.

RESULTADOS

1) Ensayo in vitro:

El peso alcanzado por los microorganismos cuando desarrollan solos y en cultivo dual se presentan en el Cuadro N° 1.

En el Cuadro N° 2 se resumen los resultados del análisis de varianza realizado para la comparación del crecimiento del patógeno solo y enfrentado al antagonista.

CUADRO N° 1 : Peso promedio (expresado en miligramos) alcanzado por *Colletotrichum dematium* var. *truncata* y *Trichoderma koningii* cuando desarrollan solos y enfrentados en cultivo dual (promedio de seis repeticiones).

Días	Crecimiento de <i>T. koningii</i>		Crecimiento de <i>C. dematium</i>	
	Solo	Cultivo dual	Solo	Cultivo dual
1	1,83	1,43	0,35	0,42
2	15,75	12,31	0,86	1,18
3	33,83	25,04	1,48	2,02
4	33,83	28,68	2,13	2,24
5	33,83	28,32	3,04	2,38
6	33,83	27,84	3,87	2,48
7	33,83	27,67	5,22	2,65
8	33,83	28,49	8,08	2,63
9	33,83	29,16	6,99	2,63
10	33,83	29,91	8,89	2,68

CUADRO N° 2: Resumen de los resultados del análisis de variancia para la comparación del crecimiento del patógeno cuando creció enfrentado al antagonista y solo.

DIAS DE OBSERVACION	DIAS DE OBSERVACION		
	4	5	6
Estadístico F	0,09	2,79	7,18
Significación	ns	ns	*

Las figuras 1 y 2 muestran las curvas de crecimiento ajustadas a los modelos Logístico y Asintótico.

2) Ensayo en invernáculo:

En el Cuadro N° 3 se presentan los porcentajes de emergencia promedio a los 15 días para los seis tratamientos y en el Cuadro N° 4 la comparación de dichos tratamientos.

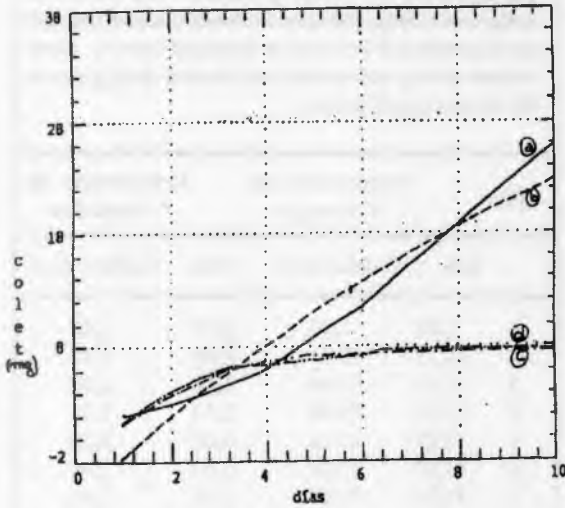


Figura 1: Curvas de crecimiento de *Colletotrichum dematium var truncata*

- a) ajustada al modelo logístico cuando crece solo.
DSE 2,5833
Estadístico de Durbin-Watson 2,50877 (1)
- b) ajustada al modelo asintótico cuando crece solo.
DSE 3,18
Estadístico de Durbin-Watson 1,77086 *
- c) ajustada al modelo logístico cuando crece enfrentado a *Trichoderma koningii*.
DSE 2,237
Estadístico de Durbin-Watson 2,67844
- d) ajustada al modelo asintótico cuando crece enfrentado a *Trichoderma koningii*.
DSE 2,241
Estadístico de Durbin-Watson 2,66455

DSE = Desvío estándar se la estimación = CMEE
(1) = Estadístico de prueba para detectar autocorrelación de errores.
* = Significativo.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

1) Ensayo in vitro:

Del análisis de los ritmos de crecimiento de los dos microorganismos surge lo siguiente:

a) Se observa una notoria diferencia entre el ritmo de crecimiento del aislamiento de *Tricho-*

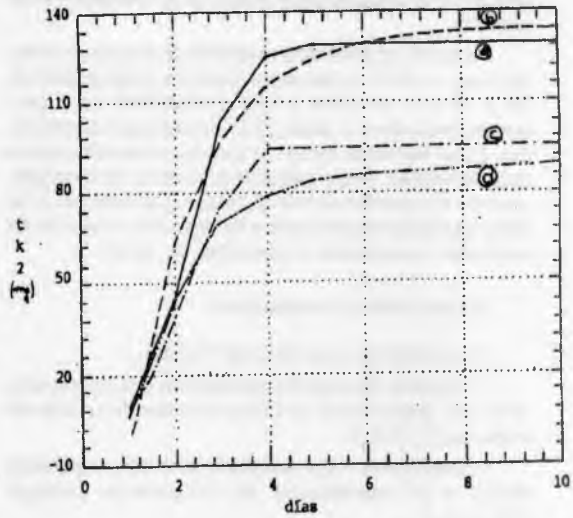


Figura 2: Curvas de crecimiento de *Trichoderma koningii*

- a) ajustada al modelo logístico cuando crece solo.
DSE7,034
Estadístico de Durbin-Watson 2,54583
 - b) ajustada al modelo asintótico cuando crece solo.
DSE10,50
Estadístico de Durbin-Watson 1,15947
 - c) ajustada al modelo logístico cuando crece enfrentado a *Colletotrichum dematium var truncata*.
DSE7,872
Estadístico de Durbin-Watson 1,88348
 - d) ajustada al modelo asintótico cuando crece enfrentado a *Colletotrichum dematium var truncata*.
DSE 9,107
Estadístico Durbin-Watson 1,67788
- DSE = Desvío estándar se la estimación = CMEE

derma koningii con el de *Colletotrichum dematium var truncata* cuando ambos crecieron solos, ya que el primero alcanzó la superficie máxima posible al tercer día (cubre en su totalidad la caja de Petri), mientras que el patógeno no alcanzó a cubrir toda la superficie posible el último día de observación (décimo día).

b) Cuando patógeno y antagonista crecieron enfrentados, ninguno de los dos igualó la superficie alcanzada en los tratamientos testigos. En el caso del aislamiento de *Colletotrichum dematium*

Cuadro N° 3: Resultado del análisis de variancia de invernáculo.

Efecto	Estadístico F	Valor P
Factor A	16,65	0,0001
Factor B	32,31	<0,0001
Interacción A*B	10,73	0,0013

Cuadro N° 4: Porcentaje de emergencia promedio a los 15 días de siembra y diferencias significativas según prueba de Tukey.

Tratamiento	Promedio %	Significación (I)
F COL ₀	93,75	*
TK ₁ COL ₀	90,50	*
To COL ₀	87,00	*
F ₁ COL ₁	84,25	*
TK ₁ COL ₁	78,50	*
To COL ₁	32,50	*

var *truncata*, la superficie máxima alcanzada fue sensiblemente menor a la cubierta cuando creció solo. Su crecimiento se detuvo entre el 5° y 6° día, momento en el cual se encontró con la colonia del antagonista.

El aislamiento de *Trichoderma koningii* creció a un ritmo levemente inferior al observado en el tratamiento testigo hasta el 5° - 6° día, momento de encuentro con la colonia del patógeno. A partir de allí comenzó a rodear a la misma, ocupando los espacios que el otro microorganismo no había cubierto, por lo que su superficie se fue incrementando hasta el 9° - 10° día, en que cubrió la totalidad de la superficie restante. Se observó además, que luego del 5° - 6° día, el aislamiento de *Trichoderma koningii* comenzó a desarrollar so-

bre la colonia del patógeno. Este desarrollo no fue posible de medir, ya que se manifestó en forma de pequeños puntos o áreas distribuidos con discontinuidad.

c) Del cálculo y posterior análisis del ANVA realizado para determinar el momento a partir del cual el patógeno sufrió la influencia del antagonista (**Cuadro N° 2**) se concluye que entre el 5° y 6° día (momento de encuentro entre las dos colonias) comenzaron a observarse diferencias significativas entre la superficie alcanzada por el patógeno cuando creció solo y la cubierta en el tratamiento dual. Esto permite inferir que la acción antagonica de *Trichoderma koningii* se inicia recién al tomar contacto con el patógeno.

A partir de los resultados obtenidos por el análisis comparativo de los modelos de crecimiento se observa que el Modelo Logístico es el que mejor describe el crecimiento de ambos microorganismos en las dos situaciones, creciendo solos y enfrentados. En todos los casos el desvío standard de la estimación fue menor cuando se ajustó el modelo logístico (**Figuras 1 y 2**). Una de las ventajas de la elección del modelo logístico es que cada uno de sus parámetros tiene interpretación biológica.

2) Ensayo de invernáculo:

De los **Cuadros N° 3 y 4** se observa que el único tratamiento que presenta diferencias significativas es T₀COL₁ (semillas tratadas con una suspensión conidial de *Colletotrichum dematium* var *truncata*), lo que permite concluir que:

a) Bajo las condiciones del ensayo, el aislamiento de *Trichoderma koningii* controló satisfactoriamente al patógeno.

Esta observación surge de comparar el tratamiento TK₁COL₁ con T₀COL₁, donde se verifica que la presencia del antagonista se tradujo en una cantidad significativamente mayor de semillas de soja germinadas. Comparando el mismo tratamiento de TK₁COL₁ con F₁COL₁ se comprueba que la acción del antagonista probado no difirió de la de un fungicida de uso corriente. Sin embargo, esta aparente igualdad en la capacidad de control del

patógeno solo se cumplió para la variable medida en el ensayo (porcentaje de germinación a los 15 días), ya que pudieron observarse diferencias en la sanidad de las plántulas germinadas. En el tratamiento con el antagonista, las plántulas germinadas manifestaron en gran proporción síntomas del ataque del patógeno, mientras que en el tratamiento con el fungicida germinaron en su gran mayoría sanas. Esto sugiere que el fungicida controla al

patógeno mientras que el antagonista frena su desarrollo aunque no impide que se manifiesten algunos síntomas de su ataque.

b) De la ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos TK₁COL₀ y testigo T₀COL₀ se desprende que la inoculación de este aislamiento de *Trichoderma koningii* sobre semillas de soja no resulta perjudicial para la normal germinación y emergencia de las mismas.

BIBLIOGRAFIA

- COOK, R.J.; BAKER, K.F.; 1983. The Nature and Practice of biological control of plant. Pathogens st. Paul: The American Phytopathological Society 539 p.
- ELAD, Y.; CHET, I. y KATAN, J.; 1980. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70 : 121-125.
- HARMAN, G., CHET, I. y BAKER, R. 1980. *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedling disease induced in Radish and Pea by *Pythium* spp. or *Rhizoctonia solani* *Phytopathology* 70 : 1167-1172.
- LIU, S. y BAKER, R., 1980. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70: 404-412.
- LUZ, W.C., 1991. Controle Biológico Das Doencas NA espermosferá. En: Bettiol, W. *Controle Biológico de doencas de plantas*. Embrapa, Brasilia. p. 25-31.
- OSBURN, R.M., Mc CAIN, A. H., CLEMENT, L. and SCHROTH, M.N., 1986. Biocontrol of *Rhizoctonia* disease of dry beans doing *Trichoderma harzianum* and *Nocardia* sp. seed treatments. *Biological and Cultural Test for Control of Plant Diseases* 1:4.
- VERHULST, P.F. 1838. Notice sue la loi que la population suit dans son accroissement. *Correspondance mathématique et physique publiée par A. Quetelet*. 10:113-121.
- WRIGHT, E.R., ZAPATA, R., DELFINO, O. de, LOPEZ, M. y SENLE, M. 1988. Eficiencia in vitro de antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*. *Revista de la Facultad de Agronomia* 9 (3): 109-116.
- YULE, G.U. 1925. The growth of population and the factors which control it *Journal Royal Statistical Society* 87: 1-58.