

# ENSAYOS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DEL MAL DE LOS ALMÁCIGOS EN BERENJENA CON *Pseudomonas* FLUORESCENTES Y *Trichoderma harzianum*

R.L. ZAPATA<sup>1</sup>; HEMILSE E. PALMUCCI;  
VERÓNICA BLANCO MURRAY y MARIA VIRGINIA LOPEZ<sup>2</sup>

Recibido: 23/04/01

Aceptado: 18/10/01

## RESUMEN

En plantas de berenjena (*Solanum melongena*) cv. Violeta Larga, cultivadas en un lote de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, se observó una alta incidencia de podredumbre de raíces y canchales basales. *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani* fueron aislados e identificados como agentes causales de la enfermedad e inoculados separadamente a la siembra provocaron damping off. De la rizosfera de plantas sanas del mismo lote fueron aisladas 36 cepas bacterianas, testeándose su actividad antagonista potencial contra estos patógenos por la técnica de cultivo dual en cajas de Petri. La cepa P218 fue seleccionada por su habilidad para inhibir el crecimiento del patógeno. El aislamiento TH1 de *Trichoderma harzianum* fue testeado *in vitro* satisfactoriamente. Con ambas cepas se llevó a cabo un ensayo de control de "damping off" en almácigos de berenjena. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un modelo de análisis de varianza con dos factores, mediante un diseño completamente aleatorizado con 5 repeticiones. La interacción y efectos antagonistas fueron no significativos. Los patógenos mostraron diferencias significativas entre medias. En las condiciones del presente ensayo no se detectó actividad antagonista. Como los antagonistas demostraron controlar los mismos patógenos en plantas adultas en otros ensayos se presume que para lograr efectividad en almácigos deberían introducirse cambios en la estrategia de aplicación.

**Palabras clave.** Control biológico, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma*, *Pseudomonas* fluorescentes.

## BIOLOGICAL TRIALS TO CONTROL DAMPING-OFF IN EGGPLANT (*Solanum melongena*) WITH FLUORESCENT *Pseudomonas* AND *Trichoderma harzianum*

### SUMMARY

In an eggplant (*Solanum melongena*) cv. Violeta Larga crop grown in fields at the Agronomy School, University of Buenos Aires, Argentina, a high incidence of root rot and basal canker was observed. *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* were isolated and identified as causal agents. Test of pathogenicity indicated that when inoculated separately at sowing provoked damping off. Thirty six strains of fluorescent *Pseudomonas*, with potential antagonist activity, were isolated from healthy plants rhizospheres of the same field and then tested in dual cultures against *F. solani* and *R. solani*. Strain P218 was selected for their ability to inhibit pathogen growth. Isolate TH1 of *Trichoderma harzianum* was tested *in vitro* successfully. A biological control test of damping-off in eggplant with P218 and TH1 as antagonists was carried out in greenhouse. The statistical analysis followed a two factor analysis of variance model for a completely randomized design with five replicates. The interaction and antagonist effects were not significant. Pathogens showed statistical differences between means. In the trial conditions biocontrol activity was not detected. Since P218 and TH1 were effective in basal canker and root rot control of adult eggplant, induced by the same pathogens, changes in application strategy must be introduced for an effective control

**Key words.** Biological control, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma*, fluorescent *Pseudomonas*

<sup>1</sup>Cátedra de Fitopatología. <sup>2</sup>Cátedra de Estadística. Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires. Av. San Martín 4453(1417). Proyecto UBACYT TG48.

## INTRODUCCIÓN

En un lote de la huerta de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (F.A.U.B.A.), donde se realiza el cultivo sucesivo de la misma variedad de berenjena (*Solanum melongena* L.), se observó una elevada incidencia de la podredumbre de raíces y cancro basal, ocasionando graves pérdidas a través de una drástica reducción en el "stand de plantas". Se llevaron a cabo los correspondientes aislamientos, identificándose a *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. y *Rhizoctonia solani* Kühn como los agentes causales de la sintomatología descrita en planta adulta (Zapata *et al.*, 2000 c).

El control biológico de fitopatógenos de suelo a través de la introducción de hongos y bacterias antagonistas ha demostrado ser efectivo en diversos patosistemas (Bucki, 1998; Stefanova y Sandoval, 1995). Como resultado de ensayos en invernáculo y a campo se ha obtenido la cepa TH1 de *Trichoderma harzianum* Rifai, la cual fue seleccionada por su capacidad de controlar *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary afectando cultivos de endivia (Zapata *et al.*, 1997) y lechuga (Quiroga *et al.*, 1998); *Rhizoctonia solani* en papa (Zumelzú *et al.*, 1997) y *F. solani* y *R. solani* en berenjena (Zapata *et al.*, 2000, a y b).

Las bacterias promotoras del crecimiento, habitantes de la rizosfera, también son utilizadas como agentes de biocontrol (Weller, 1988; Handelsman y Stabb, 1996).

En el presente trabajo se plantean como objetivos: evaluar la patogenicidad en plántula de los aislamientos logrados a partir de plantas adultas enfermas; aislar y seleccionar, a partir de la rizosfera de plantas sanas de berenjena, bacterias pertenecientes al grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes con actividad antagónica frente a los patógenos citados y determinar la eficiencia de estos aislamientos y de TH1 en el control del Mal de los Almácigos en plántulas de berenjena creciendo bajo condiciones de invernáculo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento de agentes biocontroladores

Para el aislamiento de las *Pseudomonas* fluorescentes de la rizósfera se descalzaron plantas adultas sanas de berenjena creciendo en forma contigua a plantas enfermas. Se despojó a las raíces del terrón de suelo, agitando manualmente tres veces. Luego se suspendieron 10 gr de estas en un Erlenmeyer con 100 ml de solución

fisiológica (0,8%) colocándolo sobre un agitador de movimiento horizontal durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se realizaron seis diluciones sucesivas en tubos con solución fisiológica estéril. Cada dilución se homogeneizó en agitador Vortex durante 20 segundos. Finalmente, se transfirieron 0,1 ml de las diluciones  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  a cajas de Petri con medio King 'B' (KB) (King *et al.*, 1954).

La cepa TH1 de *Trichoderma harzianum* utilizada es propiedad de la Cátedra de Fitopatología y se obtuvo a partir de colonias de este hongo que hiperparasitaban la eflorescencia del agente *Sclerotium rolfisii* Sacc. atacando cuello y raíces de plantas de pimiento en invernadero (Zapata, 1997). Su multiplicación fue llevada a cabo en fermentadores experimentales de laboratorio en la planta piloto de IMIZA-INTA Castelar, en los cuales los propágulos se suspendieron en un medio líquido desarrollado por Cozzi y Gasoni (Cozzi y Gasoni, 1995 y 1997); lográndose una concentración de  $5 \times 10^8$  conidios/ml.

### Selección *in vitro* de los aislamientos biocontroladores

Se llevó a cabo mediante la técnica de cultivos duales en cajas de Petri, utilizándose medio de cultivo Agar Papa Glucosado (APG) y King 'B' para *F. solani* y *R. solani*, respectivamente. Las bacterias se estriaron a ambos lados de un disco con el patógeno. Para evaluar a *Trichoderma harzianum* se enfrentaron discos del patógeno y del antagonista. La selección de la cepa bacteriana se realizó considerando la extensión del halo de inhibición del desarrollo de los patógenos enfrentados. Estos se midieron a los 7 días para *F. solani* y a los 4 para *R. solani*.

### Prueba de patogenicidad en plántula

Se cultivaron estructuras reproductivas o vegetativas de los patógenos, en cajas de Petri de un diámetro de 14 cm, con 40 ml de APG. Estas cajas se incubaron durante una semana a  $24 \pm 1$  °C. Pasado ese período se agregaron 150 gramos de sustrato estéril a cada caja y se incubaron a  $22 \pm 1$  °C y oscuridad una semana más para que los aislamientos colonizaran el sustrato. Cajas de Petri con APG sin inocular y con sustrato estéril fueron utilizadas como testigo. Se sembraron 30 semillas por caja y las mismas se mantuvieron en una cámara con la temperatura controlada a un rango de 25-30°C y luz artificial directa, con una intensidad promedio durante el día de 1252,5 lux. La intensidad fue medida con un luxómetro marca Luxtron LX 101. Las cajas fueron regadas con 30 ml de agua destilada estéril diariamente y permanecieron tapadas hasta que las plántulas tocaron la tapa. Se contabilizó el número de plántulas vivas todos los días durante 45 días desde la emergencia. Se realizaron 10 repeticiones y se analizaron los datos, al finalizar el

ensayo, a través de la prueba de t de Student de comparación de medias. Para el análisis de los datos se empleó el sistema SAS (SAS Institute Inc. 1996).

### Eficiencia de los aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes y de TH1 en el control del Mal de los Almácigos

Se utilizaron semillas de berenjena de la var. Violeta Larga, lavadas, desinfectadas y posteriormente bacterizadas por inmersión durante 2 horas en una suspensión de la *Pseudomonas* fluorescente seleccionada, ajustada a una concentración de  $10^9$  u.f.c./ ml. Estas semillas fueron sembradas en suelo estéril inoculado con los patógenos siguiendo las técnicas de Pozzo Ardizzi (Pozzo Ardizzi, 1994) y Clemente (Clemente, 1997); incorporándolos una semana antes en granos de avena autoclavados como "carriers". Se utilizaron bandejas plásticas con 72 divisiones. La unidad experimental se compuso de 4 celdas, con 180 gramos de suelo y 3 semillas/celda. Idéntico procedimiento se siguió en la aplicación y la distribución de los tratamientos de TH1, regando con una suspensión de  $5 \times 10^8$  propágulos/ml. En ambos casos se contabilizó diariamente el número de plántulas vivas desde la emergencia. Los tratamientos fueron los siguientes:

- 1) Suelo inoculado con *Rhizoctonia solani* y semilla tratada con suspensión de *P. fluorescente* seleccionada o TH1.
- 2) Suelo inoculado con *Rhizoctonia solani* y semilla sin tratar.
- 3) Suelo inoculado con *Fusarium solani* y semilla tratada con suspensión de *P. fluorescente* seleccionada o TH1.
- 4) Suelo inoculado con *Fusarium solani* y semilla sin tratar.

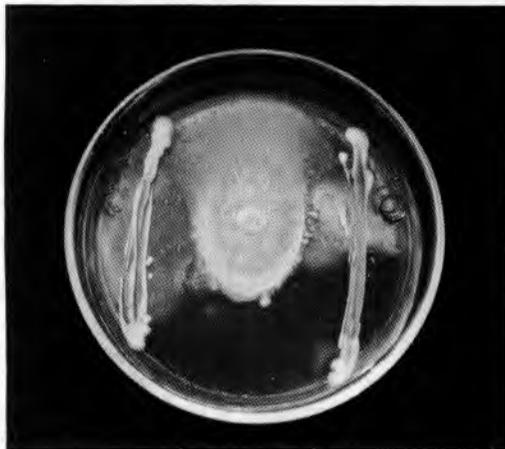


Figura 1. *Fusarium* N° 9 vs P.S.L. N° 218.

- 5) Suelo no inoculado y semilla tratada con suspensión de *P. fluorescente* seleccionada o TH1.
- 6) Suelo no inoculado y semilla embebida en solución fisiológica.

El ensayo fue llevado a cabo en invernáculo. Se realizó un diseño completamente aleatorizado con 5 repeticiones. El análisis estadístico de los datos se realizó según un modelo de análisis de variancia con dos factores. La prueba de Tukey fue empleada para las comparaciones múltiples entre medias.

La normalidad y homocedasticidad de los residuales fueron verificadas mediante las pruebas de Shapiro-Wilks y Lavane, respectivamente.

## RESULTADOS

### Aislamiento y selección *in vitro* de los agentes biocontroladores

Se aislaron 36 cepas bacterianas, que cultivadas en medio King B demostraron fluorescencia al ser expuestas a la luz ultravioleta. La cepa P218 mostró el mejor comportamiento desarrollando el halo de inhibición a ambos lados de los patógenos (Figura 1). Para el caso de TH1 todos los cultivos duales dieron resultado positivo, tanto para *F. solani* como para *R. solani*, observándose detención del crecimiento y una zona de necrosis de la colonia del patógeno en el área de contacto entre ambos microorganismos, la que se manifestó como un cambio de coloración del micelio (Figura 2). En preparados microscópicos se observó la plasmólisis de las hifas hiperparasitadas por TH1.

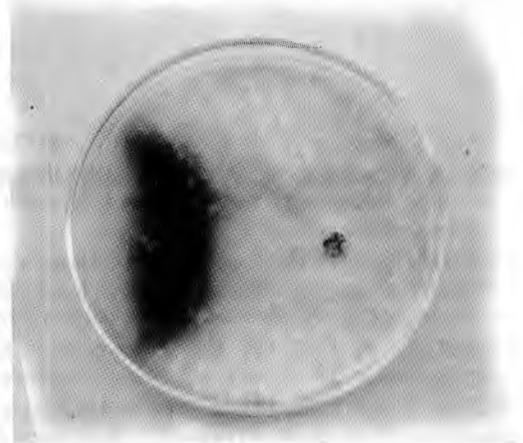


Figura 2. Rh N° 3 vs TH1.

### Pruebas de patogenicidad en plántulas

Los resultados de las pruebas de patogenicidad en plántulas indican diferencias significativas de las medias del número de plantas sanas al final del ensayo. *Rhizoctonia solani* presentó un menor número de plantas vivas que *Fusarium solani*, aunque ambas demostraron patogenicidad en plántula de berenjena (Cuadro N° 1).

No fue necesario realizar transformaciones de los datos debido a que el test de normalidad indicó que los residuales presentan una distribución aproximadamente normal.

### Eficiencia de los aislamientos de *Pseudomonas fluorescentes* y de TH1 en el control del Mal de los Almácigos

Los datos originales no fueron transformados, debido a que en el análisis de residuales no se detectó apartamiento de los supuestos del modelo. No se rechazó la hipótesis de normalidad en el experimento ni la hipótesis de homoscedasticidad, con valores de ( $p = 0,326$ ; y  $p = 0,712$ ) respectivamente para P218 y de ( $p = 0,6914$ , y  $p = 0,5190$ ) para TH1.

**Cuadro N° 1. Media aritmética del número de plantas vivas al final del ensayo.**

RHIZOCTONIA SOLANI	FUSARIUM SOLANI	TESTIGO
11,1(a)	16,4(b)	25,4(c)

Diferencia mínima significativa según Tukey= 4,06  
\*Letras distintas indican diferencias significativas.

Para P218 la interacción patógeno - antagonista y el efecto del antagonista fueron no significativas ( $F = 1,26$ ,  $p = 0,302$ ;  $F = 3,75$   $p = 0,065$  respectivamente). Se detectó efecto del patógeno ( $F = 46,09$   $p < 0,001$ ). La prueba de comparaciones múltiples permitió detectar diferencias entre el control, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*.

Los efectos del patógeno fueron significativos ( $F = 33,02$ ,  $p < 0,001$ ). La prueba de comparaciones múltiples permitió detectar diferencias entre el control y *F. solani* con respecto a *R. solani*, pero no entre los promedios de los dos primeros. Similares resultados se obtuvieron con TH1. El efecto del antagonista y su interacción con el patógeno fueron no significativos ( $F = 2,03$ ,  $p = 0,167$  y  $F = 0,29$ ,  $p = 0,748$ , respectivamente).

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

*Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*, agentes causales de la sintomatología observada en plantas adultas, también son patógenos en plántulas de berenjena causando el Mal de los Almácigos.

Durante la realización de las pruebas *in vitro* los aislamientos seleccionados P218 y TH1 mostraron un eficiente comportamiento como antagonistas de *F. solani* y *R. solani*, no obstante los resultados en los ensayos en invernáculo fueron no significativos.

Como los antagonistas P218 y TH1 demostraron controlar los mismos patógenos en plantas adultas en otros ensayos (Zapata, 2000 a y b), se asume que para lograr efectividad en almácigos deberían introducirse cambios en la estrategia de aplicación.

### BIBLIOGRAFÍA

- BUCKI, P.M.; F.S. LAICH; A.L. MELEGARI y A. R. ESCANDE. 1998. Mal de los Almácigos en Berenjena (*Solanum melongena* L.): Aislamiento y selección de agentes causales y de microorganismos para el control biológico. *Fitopatología* 33 (2): 108-115.
- CLEMENTE, G.E. 1997. Aislamiento y selección preliminar de Actinomycetes, *Pseudomonas fluorescentes* y *Trichoderma sp.* para el control del Mal de los almácigos en tomate (*Lycopersicon sculentum* Mill.). Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Mar del Plata. Tesis de Grado. 78pp.
- COZZI, J. y L. GASONI. 1995. Producción de biomasa de *Trichoderma harzianum* en distintos medios y condiciones de cultivo. *Revista Forestal Venezolana* 1(1): 28.
- COZZI, J. and L. GASONI. 1997. Temporal relationship of Inoculum formulation to density, variability on biocontrol effectiveness of *Trichoderma harzianum*. Actas IV International PGPR Workshop. Sapporo, Japón. 5-10 octubre, p 468-471

- HANDELSMAN, J. and E.V. STABB. 1996. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *The Plant Cell*, Vol. 8: 1855-1869.
- KING, E.O.; M.K. WARD and E.D. RANEY. 1954. Two simple media for demonstration of pyocynin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
- POZZO ARDIZZI, M.C. 1994. Control biológico del damping off del tomate ocasionado por *Pythium ultimum* mediante el revestimiento de semillas con *Pseudomonas* fluorescentes o *Trichoderma viride*. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata. Tesis Ms. Sc. 101pp.
- QUIROGA, D.; A. OBERTI ARNAUDO; R.L. ZAPATA; S. FILIPPINI DE DELFINO y J. GARCÍA. 1998. Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia de *Sclerotinia sclerotiorum* en tres cultivares de lechuga. Actas de resúmenes del Primer Congreso de Control Biológico de Enfermedades de las Plantas. pág. 25.
- SAS INSTITUTE INC, versión 6.12. 1989- 1996. Cary, NC.
- STEFANOVA, M. y I. SANDOVAL. 1995. Efectividad de biopreparados de *Trichoderma* spp. en el control de hongos fitopatógenos del suelo. Boletín Técnico N° 2, CID-INISA V: 22 pp.
- WELLER, D. 1988. Biological Control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathology* 26: 379-407.
- ZAPATA, R.L.; S. SPIVAK; O.S.F. DE DELFINO y M. del C. FABRIZIO. 1997. Control de la podredumbre de la endivia (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum*) producida por *Sclerotinia sclerotiorum* mediante la aplicación de *Trichoderma harzianum*. *Revista Facultad de Agronomía* 17 (2): 151-155.
- ZAPATA, R.L.; S. FUHRMAN y M.V. LÓPEZ. 2000a. Management of eggplant canker and root rot (*Rhizoctonia solani*) with benefic microorganisms. Fifth International Congress of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Ciudad de Carlos Paz, Córdoba, Argentina, pág. 147.
- ZAPATA, R.L.; S. FUHRMAN y M.V. LÓPEZ. 2000b. Control de la podredumbre de raíces causada por *Fusarium solani* en berenjena mediante la aplicación de *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas* sp fluorescente. XXIII Congreso Argentino- X Latinoamericano- III Iberoamericano de Horticultura. Mendoza, Argentina, pág. 68
- ZAPATA, R.L.; H.E. PALMUCCI y V. BLANCO MURRAY. 2000c. Aparición de una nueva enfermedad en cultivos de Berenjena (*Solanum melongena*) en la República Argentina. XXIII Congreso Argentino- X Latinoamericano-III Iberoamericano de Horticultura. Setiembre. Mendoza, Argentina. Pág. 61
- ZUMELZU, G.; R.L. ZAPATA; J. COZZI y O.S.F. DE DELFINO. 1997. Control integrado de sarna negra de la papa en invernáculo. Actas del XI Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Montevideo, Uruguay, pag. 259