

## Inhibición de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabolitos volátiles y no volátiles producidos por especies nativas del género *Trichoderma*

E. Allori Stazzonelli<sup>1\*</sup>; M.G. Yasem<sup>1</sup>; D.L. Ploper<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. Florentino Ameghino S/N, El Manantial. CP: T4104AUD, Tucumán, Argentina.

<sup>2</sup>Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes.

\* Autor de correspondencia: enzo\_0387@hotmail.com

**Palabras clave:** *Trichoderma*, *Sclerotinia*, inhibición, esclerocios

*Sclerotinia sclerotiorum* representa un serio problema para el cultivo de porotos (*Phaseolus vulgaris*) y/o hortalizas en el Noroeste argentino (NOA). Se trata de un fitopatógeno capaz de desarrollar estructuras de resistencia llamadas esclerocios. Dichas estructuras son fuente de inóculo ya que pueden germinar cuando las condiciones ambientales son favorables generando nuevas infecciones. Los órganos atacados quedan completamente invadidos por el hongo y manifiestan un síntoma de podredumbre húmeda. En los tejidos desintegrados se observa la presencia de micelio algodonoso blanco, sobre el cual se forman cuerpos de color negro, de 2 a 20 mm de longitud y de forma irregular (esclerocios). Durante la estación de crecimiento, dependiendo de varios factores ambientales, los esclerocios germinan y forman ya sea micelio, el cual infecta plantas, o produce ascosporas mediante el desarrollo de apotecios. Las ascosporas son el inóculo primario de las epifitias en muchos cultivos. El manejo de esta enfermedad usando la rotación de cultivos es prácticamente imposible debido a la sobrevivencia del esclerocio en el suelo por largos períodos (Bueno *et al.*, 2007) y al amplio rango de hospederos de *S. sclerotiorum*. Otros métodos usados sin éxito en el control de *S. sclerotiorum* han sido la solarización del suelo y el control químico. Las dificultades en obtener cultivares resistentes hacen al control biológico una interesante alternativa para la supresión del hongo (Inbar *et al.*, 1996; Mitidieri *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2007). En el campo, es posible interferir sobre el ciclo de infección con prácticas culturales y con el incremento del parasitismo de los esclerocios con Agentes de Control Biológico (ACB) endémicos o introducidos al cultivo. Entre los ACB citados, figuran *Trichoderma* spp., *Aspergillus* sp., *Mucor* sp., *Gibberella baccata*, *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. *Coniothyrium minitans*, *Gliocladium virens*, *Talaromyces flavus*, *Trichote-*

*cium roseum*, *Epicoccum purpurascens* y *Sporidesmium sclerotivorum* y otros hongos de suelo, que colonizan esclerocios de *S. sclerotiorum* (Huang *et al.*, 2000). En este sentido, las especies del género *Trichoderma* se destacan entre las más utilizadas para el biocontrol de patógenos fúngicos del suelo. Las mismas presentan diferentes modos o mecanismos de acción que le permiten el control de los fitopatógenos. Entre estos mecanismos se encuentran: competencia por el sustrato, espacio y nutrientes, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno, resistencia inducida, entre otros (Infante *et al.*, 2009; Castillo *et al.*, 2011). El objetivo de este trabajo es el aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma* y su preselección mediante pruebas de laboratorio teniendo en cuenta la emisión de metabolitos volátiles y no volátiles capaces de inhibir el crecimiento y desarrollo de *S. sclerotiorum*. De los tejidos enfermos se colectaron esclerocios y micelio del patógeno, los cuales previa desinfección superficial, fueron colocados en medio agar papa glucosado (APG) e incubados a  $25 \pm 2$  °C y fotoperiodo de 12 horas de luz día. En los ensayos realizados se empleó el aislamiento patógeno *S. sclerotiorum* 11 precedente de “Los Altos” provincia de Catamarca. Los posibles ACB nativos se aislaron de esclerocios parasitados naturalmente presentes en restos de cultivos y también empleando la técnica de “esclerocios trampa” (Gracia-Garza *et al.*, 1997; Allori Stazzonelli *et al.*, 2014). A fin de determinar la producción de metabolitos volátiles de los ACB, se empleó el método de placas superpuestas que consiste en sustituir la tapa de la placa de Petri que contiene un cultivo del antagonista de 72 horas de crecimiento, por un círculo de papel celofán estéril, sobreponiendo otra placa en la cual se sembró el patógeno (Mariano, 1993). Se midió el diámetro de las colonias del patógeno y se compararon con el testigo (en ausencia de volátiles) cuando el mis-

Recibido 30/06/14; Aceptado 28/08/14; Publicado en línea 03/11/14.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

mo completó el diámetro total de la caja (90 mm), calculando de esta manera el porcentaje de inhibición que ejerció el antagonista sobre el patógeno. Para medir la producción de metabolitos difusibles se colocó un círculo de papel celofán estéril cubriendo el medio de cultivo de cada placa empleada. Luego, se transfirió un disco del antagonista al centro de la placa y se incubó 72 horas. Antes que el micelio del hongo antagonista llegue al borde del papel celofán, se efectuó el retiro de éste con la colonia del antagonista y en el mismo lugar se colocó un disco proveniente del fitopatógeno. El testigo consistió en el cultivo del patógeno después de retirado el celofán, sin previa siembra del antagonista (Mariano, 1993). Se midió el crecimiento micelial de los patógenos a las 96 horas y se calculó el porcentaje de inhibición que ejerció el antagonista sobre el patógeno. Los datos fueron analizados estadísticamente empleando el software InfoStat, ajustándolos a los modelos lineales generales y mixtos mediante test de DGC ( $\text{Alfa}=0.05$ ) y ANOVA. A partir de los esclerocios colectados en campo y posteriormente incubados, se aislaron 3 cepas de *T. atroviride*, mientras que de los aislamientos procedentes de “esclerocios trampa”, 8 pertenecieron a la especie *T. atroviride*, 6 a *T. koningiopsis*, 1 a *T. longibrachiarum* y 1 a *T. harzianum* (Tabla 1). De la totalidad de ACB eva-

luados, 16 aislamientos tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento de las colonias patógenas de *S. sclerotiorum* por la emisión de metabolitos volátiles. El crecimiento micelial de *S. sclerotiorum* fue inhibido en mayor porcentaje por los aislamientos *T. atroviride* 7,4, 8, 2 y *T. koningiopsis* 5, en un rango de 30 y 23%, los que se destacaron significativamente frente a los demás aislamientos. *T. atroviride* 6 mostró un porcentaje de inhibición de 18 % mientras que el resto no superó el 11% (Tabla 1). Resultados semejantes fueron reportados por Castillo *et al.*, (2011) quienes evaluaron el porcentaje de inhibición por compuestos volátiles de *T. longibrachiatum* y *T. harzianum* sobre *S. sclerotiorum* y *S. cepivorum* en un rango de 28 y 12 % de inhibición respectivamente. La totalidad de los aislamientos, aunque en alguno de los casos no lograron reducir el diámetro de las colonias patógenas, provocaron que el micelio se torne pobre y menos denso, al igual que lo observado por Castillo *et al.* (2011). Todas las cepas evaluadas mostraron elevados porcentaje de inhibición del patógeno por metabolitos no volátiles, los que rondaron entre 57 y 100%. Las que se destacaron fueron *T. koningiopsis* 17 y *T. koningiopsis* 12 inhibiendo en un 100% el crecimiento del patógeno, no se observó desarrollo micelial de *S. sclerotiorum* sobre el medio de cultivo con meta-

**Tabla 1.** Porcentaje de inhibición ejercida por metabolitos volátiles y difusibles de aislamientos nativos de *Trichoderma* sobre colonias de *S. sclerotiorum*.

Aislamientos	Inhibición de crecimiento por compuestos volátiles (%)	Inhibición de crecimiento por compuestos difusibles (%)
<i>T. koningiopsis</i> 5	29,17 A	89,31 B
<i>T. atroviride</i> 6	17,92 B	64,63 D
<i>T. atroviride</i> 8	25 A	90,93 B
<i>T. atroviride</i> 2	22,59 A	93,33 B
<i>T. atroviride</i> 4	29,03 A	85 C
<i>T. koningiopsis</i> 15	10,56 C	93,33 B
<i>T. atroviride</i> 18	8,89 C	87,08 C
<i>T. atroviride</i> 7	30,14 A	56,67 E
<i>T. atroviride</i> 13	3,06 D	89,31 B
<i>T. koningiopsis</i> 16	2,22 D	93,33 B
<i>T. koningiopsis</i> 12	0 D	100 A
<i>T. koningiopsis</i> 17	8,19 C	100 A
<i>T. koningiopsis</i> 3	11,39 C	92,78 B
<i>T. koningiopsis</i> 10	0 D	93,06 B
<i>T. harzianum</i> 9	10 C	93,33 B
<i>T. atroviride</i> 21	8,33 C	92,22 B
<i>T. longibrachiatum</i> 11	4,72 D	93,33 B
<i>T. atroviride</i> 20	5,56 D	91,11 B
<i>T. atroviride</i> 19	5,19 D	81,94 C

bolitos de dichas cepas. Los aislamientos *T. longibrachiarum* 11, *T. harzianum* 9, *T. koningiopsis* 15, 16, 10, 5, 3 y *T. atroviride* 2, 20, 8, 13, 21, presentaron porcentajes de inhibición que rondaron entre 93, 33% y 89, 31% (Tabla 1). En ensayos semejantes, Lifshitz *et al.* (1986) mostraron el control de especies de *Pythium* con *T. harzianum* y *T. koningii*, lo que fue atribuido a la producción de metabolitos tóxicos por parte del antagonista. Al evaluar los aislamientos nativos, se observó que presentaron en mayor o menor medida capacidad de inhibir al patógeno valiéndose de la emisión de metabolitos volátiles y no volátiles. Se observó que la capacidad de inhibir al patógeno no fue específica si no que fue propia de cada aislamiento. *T. koningiopsis* 5, *T. atroviride* 8 y *T. atroviride* 2 se destacaron inhibiendo a *S. sclerotiorum* con los dos mecanismos de acción evaluados, lo que estaría asociado a una mayor potencialidad para el control del patógeno. Aunque los aislamientos de *Trichoderma* demostraron capacidad de inhibir al patógeno en ensayos *in vitro*, se desconoce su desempeño en condiciones no controladas, por lo que son necesarios ensayos a mayor escala para evaluarlos con mayor precisión. El aislamiento y selección de microorganismos antagonistas nativos representa una alternativa para el manejo del “moho blanco del poroto y las hortalizas”. A esto se suman los beneficios del control biológico al evitar la contaminación acarreada por el uso excesivo de agroquímicos, la resistencia fúngica y otros efectos perjudiciales.

## Referencias bibliográficas

- Allori Stazzonelli E., Yasem de Romero M., Ploper L.D. (2014). “Evaluación de antagonistas nativos para el manejo de *Sclerotinia sclerotiorum*”. 3° Congreso Argentino de Fitopatología. 4 al 6 de junio de 2014. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.
- Bueno C.J., Ambrosio M.M. de Q., Souza N.L. (2007). Production and evaluation of survival of resistance structures of soilborne phytopathogenic. *Summa phytopathologica* 33 (1): 47-55.
- Castillo F.D.H., Padilla A.M.B., Morales G.G., Siller M.C., Herrera R.R., Gonzalez N., Reyes F.C. (2011). *In vitro* Antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 6 (3): 410-417.
- García-Garza J.A., Reeleder R.D., Paulitz T. C. (1997). Degradation of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by fungus ghats (*Bradysia coprophila*) and the bio-control fungi *Trichoderma spp.* *Soil Biol. Biochem.* 29 (2): 123-129.
- Huang H.C., Bremer E., Hynes R.K., Erikson R.S. (2000). Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of White mold of dry vean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control* 12: 182-190.
- Inbar J., Menendez A., Chet I. (1996). Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biol. Biochem.* 28(6): 757-763.
- Infante D., Martínez B., Gonzalez N., Reyes Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Protección Vegetal* 24(1): 14-21.
- Lifshitz R., Windhan M.T., Baker R. (1986). Mechanism of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma spp.* *Phytopathol* 76: 720-725.
- Mariano R.L.R. (1993). Métodos de selección *in vitro* para el control microbiológico de patógenos de plantas. *RAPP* 1: 369-409.
- Martínez S., Mónaco C., Etchevers P. (2007). Efecto de *Trichoderma harzianum* (SM2007) sobre el rendimiento y sanidad de hortalizas de hoja bajo invernadero en el cinturón hortícola de la Plata. 30° Congreso Argentino de Horticultura. La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Mitidieri M., Brambilla V., Gabilondo J., Saliva V., Piris M., (2005). Efectos de la solarización y biofumigación sobre la incidencia de podredumbres radiculares en cultivo de tomate bajo cubierta. XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. 19-22 de abril de 2005. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina.