

## Artículo científico

## Evaluación *in vitro* de aislamientos nativos de *Trichoderma* como agentes de biocontrol y promoción del crecimiento inicial en soja

M. Maza<sup>1,2</sup>; E. Allori Stazonelli<sup>1,2</sup> y M.G. Yasem de Romero<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Cátedra Fitopatología, Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. Florentino Ameghino S/N, El Manantial (4105), Tucumán, Argentina.

<sup>2</sup> CONICET, Tucumán, Argentina.

\* Autor de correspondencia: romeroyasem@arnet.com.ar

### Resumen

En este trabajo se evaluaron *in vitro* aislamientos nativos de *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum* y *T. theobromicola* como agentes de biocontrol de *Fusarium semitectum* Berkeley y Ravenel, *Corynespora cassiicola* (Berk. y Curt.) Wei y *Diaporthe/Phomopsis* y como biopromotores del crecimiento inicial en soja. *T. harzianum* se destacó en el método de competencia por el sustrato. *T. asperellum* A1 y A2 en la producción de metabolitos solubles, mientras que *T. asperellum* A2 y *T. theobromicola* lo hicieron en la producción de metabolitos volátiles. Los antagonistas mostraron efecto parasítico por enrollamiento y formación de estructuras en forma de gancho. *T. harzianum* y *T. asperellum*, enfrentados a los patógenos, cubrieron la totalidad de la superficie de la placa de Petri y esporularon sobre el micelio de los patógenos. *T. theobromicola* cubrió el 50% de la superficie de la placa y el micelio no avanzó sobre los patógenos. Las semillas inoculadas con *T. theobromicola* y *T. harzianum* incrementaron significativamente la energía germinativa y *T. theobromicola* incrementó el poder germinativo. No tuvieron efecto sobre la longitud de radículas y talluelos, pero indujeron una mayor producción de biomasa, con pesos secos de talluelos y raíces significativamente superiores a los testigos.

**Palabras clave:** biocontrol, hongos antagonistas, promotores de crecimiento, *Trichoderma*.

### Abstract

This study evaluated *in vitro* native isolates of *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma theobromicola* as biocontrol agents of *Fusarium semitectum* Berkeley and Ravenel, *Corynespora cassiicola* (Berk. and Curt.) Wei and *Diaporthe/Phomopsis*, and as initial growth promoters of soybean. *T. harzianum* was the best competitor for substrate. Two strains of *T. asperellum* (A1 and A2) showed significant production of soluble metabolites, capable of reducing the pathogen growth while *T. theobromicola* was good at producing growth inhibitors volatile metabolites. Antagonists showed parasitic effect by winding and forming hook shaped structures. *T. harzianum* and *T. asperellum* covered the entire surface of the Petri dish and sporulated over the pathogen mycelium. *T. theobromicola* covered 50% of the surface of the plate and did not move over the pathogen mycelium. Seeds inoculated with *Trichoderma* significantly increased the percentage of germination energy and *T. theobromicola* increased the germination power. However, the treatment had no effect on the length of the radicles and seedstalks. Even though, it induced a greater production of biomass, with roots and seedstalks dry weight significantly higher than the control.

**Key words:** biocontrol, antagonistic fungi, growth promoters, *Trichoderma*.

### Introducción

Entre las principales enfermedades fúngicas transmitidas por semillas que afectan el cultivo de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] se hallan el tizón del tallo y de la vaina, la podredumbre de la semilla y el cancro del tallo (complejo *Diaporthe/Phomopsis*), la podredumbre de la semilla (*Fusarium semitectum* Berk. y Ravenel, *F. solani* (Martius), *F. oxysporum* (Schlechtendahl emend. Snyder y Hansen) y la mancha anillada [*Corynespora cassiicola* (Berk. y Curt.) Wei] (Cámara *et al.*, 1995). Para reducir las pérdidas ocasionadas por dichas enfermedades, se aplican, generalmente, fungicidas químicos altamente eficientes y rápidos en el control (Mantecón, 2003) que sin embargo, presentan el inconveniente de ser tóxicos inespecíficos, que eliminan tanto a los organismos fitopatógenos como a los benéficos (Rey *et al.*, 2000). Además, su uso continuo genera el desarrollo de resistencia en los organismos causantes de las enfermedades mencionadas y la contaminación del agroecosistema, con consecuencias ambientales y también en la salud humana.

La tendencia mundial actual hacia una agricultura sustentable y la protección del medio ambiente, impulsa el desarrollo de alternativas no contaminantes capaces de complementar o reemplazar a los productos químicos sintéticos en el

control de enfermedades. Entre ellas, se destacan especies fúngicas del género *Trichoderma* consideradas agentes eficientes de control de enfermedades y de promoción del crecimiento vegetal (Harman *et al.*, 2004). En 1932, Weinding ya reconoció la actividad micoparasítica y de producción de antibióticos de estos organismos. En años posteriores, la confirmación de su capacidad de controlar numerosas enfermedades culminó en la producción comercial de varias de estas especies para la protección e incremento del crecimiento en diversos cultivos y países (Howell, 2003).

Estas especies fúngicas son ubicuas, de rápido crecimiento y producción de esporas y eficientes en la utilización de nutrientes. Además, sintetizan enzimas degradadoras de la pared celular (celulasas, quitinasas, glucanasas, entre otras) y sustancias antibióticas (Vinale *et al.*, 2008; Benítez *et al.*, 2004). Estos agentes desplazan al fitopatógeno mediante diferentes mecanismos de acción, no excluyentes entre sí, que en algunos casos actúan sinérgicamente en el control de los patógenos (Ghisalberti, 2000). La interacción entre el antagonista y el patógeno puede involucrar competencia directa por el espacio o por los nutrientes (Jalil *et al.*, 1997; Yasem de Romero *et al.*, 2007), producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil (Lobo Junior y Sobral de Abreu, 2000; Escobar *et al.*, 2004) y/o parasitismo directo, el cual incluye el crecimiento direccionado del antagonista hacia el hongo blanco; el enrollamiento de *Trichoderma* sobre éste y la formación de ganchos (Martins Corder y Melo 1998), junto con la producción de enzimas extracelulares antifúngicas (Inbar *et al.*, 1996, Howell, 2003). Asimismo, la producción de metabolitos tóxicos y su efecto fungicida puede variar entre especies y entre aislamientos de una misma especie (Martins Corder y de Melo, 1998). *Trichoderma*, también posee gran capacidad de movilizar y tomar los nutrientes del suelo, lo que hace a este género fúngico más eficiente y competitivo frente a otros microorganismos (Benítez *et al.*, 2004). Todas estas características los posicionan como agentes de control biológico y González Salgado *et al.* (1999) destacan la conveniencia de obtener aislamientos nativos, ya que los mismos están mejor adaptados a las condiciones edafoclimáticas de la zona donde serán aplicados.

En base a lo expuesto, y con el fin de encontrar alternativas no contaminantes que contribuyan al manejo sustentable del cultivo, se realizó este trabajo cuyo objetivo fue evaluar *in vitro* aislamientos de *Trichoderma* nativos como agentes de biocontrol y de promoción del crecimiento inicial en soja.

## Materiales y métodos

### *Aislamientos de Trichoderma y fitopatógenos*

La acción antagonista de *T. harzianum*, *T. theobromicola* y dos aislamientos de *T. asperellum*, denominados A1 y A2, se evaluó sobre los fitopatógenos *F. semitectum*, *C. cassicola* y sobre el complejo *Diaporthe/Phomopsis*. Todas las cepas estudiadas se aislaron a partir de semillas de soja producidas por la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes (EEAOC) en la provincia de Tucumán, las que fueron cultivadas en agar papa glucosado (APG) al 2% con ácido láctico al 25%, previa desinfección superficial (alcohol etílico 70° por 1 minuto, hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto y dos lavados con agua destilada estéril) e incubadas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y fotoperíodo de doce horas.

### *Porcentaje del área ocupada por la colonia de cada microorganismo*

A partir de colonias puras de ocho días de desarrollo y en crecimiento activo de los aislamientos de *Trichoderma* y de los fitopatógenos, se cortaron discos de 6 mm de diámetro del borde de la colonia. Los discos de cada uno de los microorganismos se colocaron individualmente en el centro de placas de Petri con APG al 2% con ácido láctico al 25%. Las placas se incubaron en las condiciones descritas anteriormente y se realizaron lecturas diarias de dos diámetros de cada colonia en posición ortogonal hasta que alcanzaron el borde de la caja. El promedio de estos diámetros se utilizó para estimar el porcentaje de área ocupada (PAO) por la misma, considerando el área total de la placa de Petri como equivalente al 100% (González Salgado *et al.*, 1999).

### *Competencia por el sustrato*

Se determinó la competencia por el sustrato según el método de cultivos pareados (Mariano, 1993). Se cortaron discos del borde de cada colonia de los aislamientos evaluados con un sacabocado de 6 mm de diámetro. Los discos de cada uno de los microorganismos se colocaron individualmente en placas con APG al 2% con ácido láctico al 25%, a 2,5 cm del centro de la placa, enfrentados en caso de los tratamientos testigos, a discos de APG ubicados a la misma distancia del centro de la placa. En el caso de los tratamientos, se enfrentaron discos de los fitopatógenos con discos de los antagonistas evaluados (Yasem de Romero *et al.*, 2007). Se incubaron y se hicieron lecturas diarias de dos diámetros en posición ortogonal de ambas colonias hasta enfrentamiento determinándose el PAO por cada microorganismo. También, se evaluó la capaci-

dad antagonica de *Trichoderma* sobre los patógenos, teniendo como referencia la escala de cinco clases propuesta por Bell *et al.* (1982).

#### *Tipo de parasitismo*

Se determinó el tipo de parasitismo mediante el método de cultivos pareados modificado. Para ello, se colocó previamente en la placa de Petri, un portaobjeto esterilizado con una fina lámina de medio de cultivo. Para las observaciones microscópicas se adicionó azul de algodón sobre el portaobjeto y se determinó el tipo de interacción por observaciones en el microscopio óptico (Martins-Corder y de Melo, 1998).

#### *Producción de metabolitos difusibles*

Para medir la producción de metabolitos difusibles se colocó un círculo de papel celofán estéril cubriendo el medio de cultivo de cada placa utilizada. Luego, se transfirió un disco del antagonista al centro de la placa y se incubó 72 horas en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Antes que el micelio del hongo antagonista llegue al borde del papel celofán, se lo retiró junto 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 mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = [(A - B)/A] * 100$$

donde A corresponde al diámetro de la colonia del patógeno en la condición de testigo y B al diámetro de la colonia del patógeno en presencia de metabolitos difusibles.

#### *Producción de metabolitos volátiles*

A fin de determinar la producción de metabolitos volátiles de los aislamientos de *Trichoderma* se empleó el método de la placa sobrepuesta, 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). El porcentaje de inhibición que ejerció el antagonista sobre el patógeno se calculó empleando la fórmula detallada anteriormente.

#### *Promoción del crecimiento inicial*

Se trabajó con semillas de tamaño uniforme y sin daños a simple vista en su cubierta, del cul-

tivar A8000 RG (GM VIII) producidas por la EEAOC en la localidad de Monte Redondo, Departamento Cruz Alta, Tucumán, Argentina. Los aislamientos de *Trichoderma* se desarrollaron en APG al 2% con ácido láctico al 25% y se incubaron en las mismas condiciones mencionadas con anterioridad. Se prepararon suspensiones de concentración  $10^7$  conidios.ml<sup>-1</sup> de cada uno de los cuatro aislamientos en estudio. Las semillas se desinfectaron superficialmente y se las sumergió durante 3 minutos en la suspensión del aislamiento correspondiente, que contenía además, dos gotas del adherente Tween 20 al 10%. Posteriormente se secaron a temperatura ambiente por 24 horas (Luz, 2001). Las semillas testigo fueron sumergidas en agua destilada estéril y el adherente por 3 minutos y se dejaron secar el mismo tiempo que las tratadas (Pineda y Gonnella, 1988). Se sembraron lotes de 50 semillas en bandejas plásticas de 24 a 17 cm conteniendo como sustrato una mezcla de tierra y arena estériles en proporción 1:1, regada con 75 ml de agua destilada estéril. Se mantuvieron las bandejas cubiertas con un plástico transparente en cámara de cría a  $25 \pm 2$  °C y fotoperíodo de 12 horas (Resende *et al.*, 2005). Se determinaron la energía germinativa (EG) como el número de plántulas visibles a los 5 días y el poder germinativo (PG) a los 8 días después de la siembra (Yasem de Romero *et al.*, 2000); efectuándose, además, mediciones de la longitud y del peso verde y seco de la parte aérea y de la raíz de cada plántula.

#### *Análisis de los datos*

En todos los ensayos se empleó un diseño completamente aleatorizado con número de repeticiones variables en cada caso. En el ensayo de competencia por el sustrato se hicieron 5 réplicas, en las pruebas de producción de metabolitos difusibles, 8 réplicas y en volátiles, 10 réplicas. En estos casos cada caja de Petri se consideró una repetición. En el experimento de promoción del crecimiento se utilizaron tres bandejas con 50 semillas cada una. Para el procesamiento estadístico de los datos se empleó un análisis de la varianza y las medias fueron comparadas mediante la prueba LSD de Fisher con un nivel de significancia del 5%.

## **Resultados y discusión**

#### *Porcentaje del área ocupada por la colonia de cada microorganismo*

El PAO de las cuatro cepas antagonistas fue significativamente superior al de las cepas patógenas en las tres mediciones realizadas (Tabla 1), mostrando que *Trichoderma* tuvo un crecimiento

**Tabla 1.** Valores promedios del diámetro medio (DM) (mm), área de la colonia (cm<sup>2</sup>) y porcentaje del área ocupada (PAO) (%) de cada microorganismo en diferentes tiempos de incubación.

Microorganismo	24 horas			48 horas			72 horas		
	DM	Área	PAO	DM	Área	PAO	DM	Área	PAO
<i>Diaporthe/Phomopsis</i>	7,6 ± 0,8a	0,4 ± 0,2a	0,7 ± 0,3a	13,5 ± 1,9a	1,5 ± 0,8a	2,3 ± 1,2a	21,8 ± 2,6a	3,9 ± 1,6ab	6,2 ± 2,6ab
<i>Corynespora cassiicola</i>	8,2 ± 0,9ab	0,5 ± 0,2a	0,8 ± 0,4a	12,1 ± 2,1a	1,2 ± 0,8a	1,8 ± 1,3a	17,1 ± 2,8a	2,3 ± 1,8a	3,7 ± 2,8a
<i>Fusarium semitectum</i>	9,9 ± 0,7b	0,9 ± 0,2a	1,3 ± 0,3a	19,7 ± 1,7b	3,6 ± 0,7b	5,7 ± 1,0b	28,8 ± 2,2b	7,4 ± 1,4b	11,6 ± 2,2b
<i>Trichoderma asperellum</i> A1	14,4 ± 0,6c	1,6 ± 0,2b	2,6 ± 0,3b	37,4 ± 1,5c	11,1 ± 0,6c	17,4 ± 0,9c	61,8 ± 2,0c	30,2 ± 1,3c	47,5 ± 2,0c
<i>Trichoderma harzianum</i>	20,9 ± 0,9d	3,4 ± 0,2c	5,4 ± 0,4c	46,6 ± 2,1d	17,1 ± 0,8e	26,8 ± 1,3e	71,8 ± 2,8d	40,6 ± 1,8d	63,8 ± 2,8d
<i>Trichoderma asperellum</i> A2	21,1 ± 0,9d	3,5 ± 0,2c	5,5 ± 0,4c	43,7 ± 2,1d	15,0 ± 0,8de	23,6 ± 1,3de	63,4 ± 2,8c	31,6 ± 1,8c	49,7 ± 2,8c
<i>Trichoderma theobromicola</i>	23,0 ± 0,9d	4,2 ± 0,2d	6,7 ± 0,4d	42,9 ± 2,1d	14,6 ± 0,8d	22,9 ± 1,3d	61,9 ± 2,8c	30,3 ± 1,8c	47,7 ± 2,8c

más rápido; siendo ésta una de las características requeridas para la selección de un antagonista. Esta diferencia se acentuó con el tiempo. A su vez, a las 72 horas, *T. harzianum* superó significativamente a los otros aislamientos de *Trichoderma*. Con respecto a los tres microorganismos fitopatógenos evaluados, en las primeras veinticuatro horas no fue posible apreciar diferencias significativas en su crecimiento; a medida que avanzó el tiempo, *F. semitectum* demostró mayor PAO que los otros dos patógenos. *C. cassiicola* presentó estadísticamente valores similares a los de *Diaporthe/Phomopsis* (Tabla 1). González Salgado *et al.* (1999) informaron resultados similares, obteniendo diferencias significativas en el PAO de las cepas de *Trichoderma* evaluadas, con respecto a tres cepas de *Alternaria solani* Sor.

#### Competencia por el sustrato

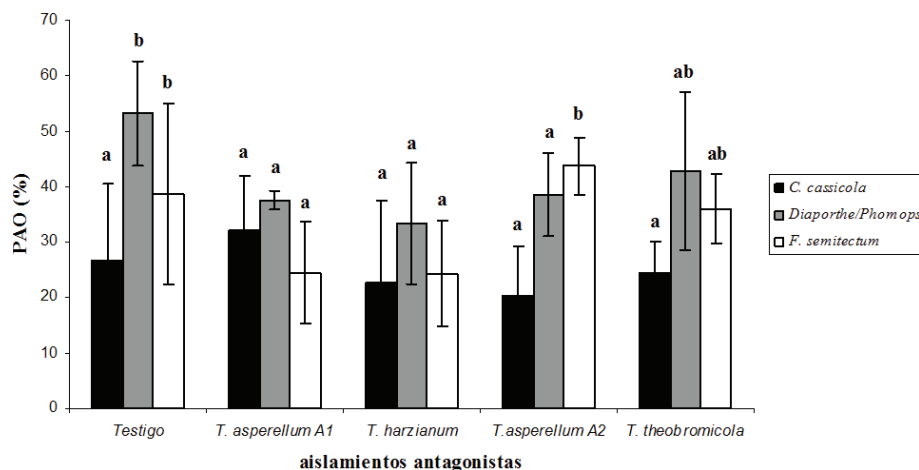
En los cultivos duales entre antagonista y fitopatógeno, *T. harzianum* provocó las mayores inhibiciones, mostrando diferencias significativas ( $F = 4,13$ ;  $p < 0,0001$ ) con respecto al testigo y a las otras cepas de *Trichoderma* evaluadas (Figura 1). Los mayores efectos de *T. harzianum* se evidenciaron sobre *Diaporthe/Phomopsis* y *F. semitectum*. En segundo lugar, se ubicó *T. asperellum* A1, influyendo en los mismos patógenos citados en el caso anterior. Los otros dos aislamientos de

*Trichoderma* fueron menos efectivos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Anees *et al.* (2010) al evaluar la capacidad antagonista de diferentes aislamientos de *Trichoderma* procedentes de un lote sembrado con remolacha azucarera frente a *Rhizoctonia solani*.

El crecimiento de *T. harzianum* y *T. asperellum* A1 y A2 en cultivos pareados con los patógenos, fueron encuadrados en la clase uno de la escala propuesta por Bell *et al.* (1982), ya que los antagonistas cubrieron la totalidad de la superficie de la placa de Petri y se produjo la esporulación sobre el micelio de los patógenos, mostrando un elevado potencial de competencia por el sustrato (Figura 2A). En cambio, *T. theobromicola* se ubicó en la clase tres ya que cubrió el 50% de la superficie de la placa y el micelio no avanzó sobre los patógenos (Figura 2B).

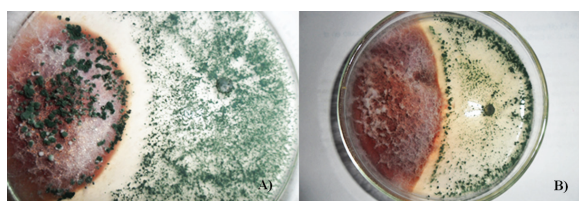
#### Tipo de parasitismo

Dentro de las formas típicas de parasitismo, *T. theobromicola* presentó estructuras semejantes a ganchos, *T. asperellum* enrollamiento de hifas alrededor de las hifas del patógeno y *T. harzianum* ambas formas (Figura 3). El enrollamiento, como forma típica de parasitismo de *Trichoderma* sobre *Fusarium* detectada en este trabajo, coincide con observaciones de John *et al.* (2010) quienes estudiaron el parasitismo de *Trichoderma viride*

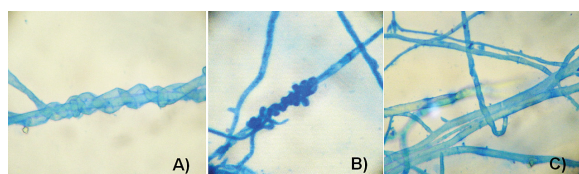


**Fig. 1.** Porcentaje del área ocupada PAO (%) de *Corynespora. cassiicola*, *Diaporthe/Phomopsis* y *Fusarium semitectum* enfrentados a las diferentes especies del género *Trichoderma*. Letras distintas en la misma categoría indican diferencias significativas con respecto a los testigos de acuerdo con la prueba de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

sobre los patógenos de soja *Fusarium oxysporum* f. *adzuki* y *Pythium arrhenomades* y con Howell (2003) y Annes *et al.* (2010), quienes estudiaron el parasitismo de *Trichoderma* sobre *R. solani*.



**Fig. 2.** A) Capacidad antagonística de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium semitectum*. B) Capacidad antagonística de *T. theobromicola* sobre *F. semitectum*.



**Fig. 3.** A) y B) enrollamiento de las hifas de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium semitectum*; C) estructuras en formas de gancho de las hifas de *T. theobromicola* sobre *F. semitectum*.

#### Detección de metabolitos difusibles

Los aislamientos de *T. asperellum* A1 y A2 fueron efectivos productores de metabolitos solubles, que inhibieron el crecimiento micelial de *C. cassicola* (40%), *Diaporthe/Phomopsis* (30 – 43%) y *F. semitectum* (65 – 73%) (Tabla 2). Por su parte, *T. harzianum* produjo metabolitos difusibles que actuaron eficientemente inhibiendo el crecimiento de colonias de *F. semitectum* (49%) y *Diaporthe/Phomopsis* (53%), pero no sucedió lo mismo con *C. cassicola* (16%). Por último, *T. theobromicola* produjo metabolitos no volátiles efectivos contra el crecimiento mi-

celial de *F. semitectum* (inhibición del 46%), pero casi nulos contra *C. cassicola* y *Diaporthe/Phomopsis* (3%). La cepa de *F. semitectum* evaluada se mostró muy susceptible a los metabolitos solubles producidos por *Trichoderma*, ya que fue fuertemente inhibida (más del 45%) por los cuatro aislamientos antagonistas evaluados. Si bien los aislamientos estudiados lograron inhibir el crecimiento micelial de los fitopatógenos, los valores resultaron inferiores a los citados por Madrid (2002) quien evaluó aislamientos de *Trichoderma* que inhibieron a *R. solani* en porcentajes superiores (93 - 100%) por la acción de sus metabolitos no volátiles. Estas diferencias se explican porque la importancia relativa de cada uno de los modos de acción depende de cada pareja de antagonista-patógeno y de las condiciones ambientales (Rey *et al.*, 2000).

#### Detección de metabolitos volátiles

En la Tabla 3 se muestra que *T. asperellum* y *T. theobromicola* provocaron inhibición significativa sobre *Diaporthe/Phomopsis* (43%) y valores intermedios sobre *F. semitectum* (21 y 30%, respectivamente). En este caso, la producción de metabolitos volátiles de las cepas de *Trichoderma* evaluadas en este estudio fue superior a lo citado por Madrid (2002), cuyas cepas tuvieron producción nula de metabolitos volátiles capaces de inhibir el crecimiento del fitopatógeno. *T. harzianum* tuvo muy baja producción de metabolitos volátiles por lo que los datos obtenidos no se incluyeron en la Tabla 3.

#### Promoción del crecimiento inicial en soja

Los tratamientos con suspensiones de *T. theo*

**Tabla 2.** Diámetro medio (DM) (mm) y porcentaje de inhibición (%) producido por los metabolitos difusibles de las especies del género *Trichoderma* sobre *Corynespora cassicola*, *Diaporthe/Phomopsis* y *Fusarium semitectum*.

Tratamientos	<i>C. cassicola</i>		<i>Diaporthe/Phomopsis</i>		<i>F. semitectum</i>	
	DM	PI	DM	PI	DM	PI
Testigo	..		33,2± 4,8 b		30,1± 4,5 b	
<i>T. asperellum</i> A1	9,4 ± 1,4 a	41,6	23,1± 3,4 a	30,3	11,4± 1,7 a	65,0
<i>T. harzianum</i>	13,4 ± 2,7 ab	16,3	15,7 ± 3,2 a	52,7	15,4± 3,1 a	48,7
<i>T. asperellum</i> A2	9,8 ± 1,5 a	38,9	19,1 ± 3,8 a	42,6	8,2 ± 1,2 a	72,8
<i>T. theobromicola</i>	15,6± 3,1 b	3,1	32,3± 4,8 b	2,6	16,4± 3,3 a	45,5

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba LSD de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabla 3.** Porcentaje de inhibición (%) producido por los metabolitos volátiles de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre *Corynespora cassicola*, *Diaporthe/Phomopsis* y *Fusarium semitectum*.

Tratamientos	<i>C. cassicola</i>		<i>Diaporthe/Phomopsis</i>		<i>F. semitectum</i>	
	DM	% de inhibición	DM	% de inhibición	DM	% de inhibición
Testigo	21,0 ± 1,7a		60,4 ± 2,7 b		55,1± 2,5 b	
<i>T. asperellum</i> A2	20,2 ± 1,7a	3.8	34,4 ± 3,3 a	43.1	43,7 ± 5,5 ab	20.6
<i>T. theobromicola</i>	17,5 ± 0,7 a	16.7	34,4 ± 2,3a	43.0	38,5 ± 3,8 a	30.2

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba LSD de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

*bromicola* y *T. harzianum* alcanzaron los valores más elevados de EG (89 y 85%), diferenciándose significativamente del testigo (73%). En cuanto al PG, solo *T. theobromicola* (90%) se diferenció significativamente del testigo (81%). Como se presenta en la Tabla 4, *T. asperellum* A1 y *T. asperellum* A2 presentaron valores muy semejantes entre sí (EG 80% y PG 87-88%). Estos resultados concuerdan con Andrada *et al.* (2008) quienes obtuvieron mayor emergencia en soja al tratar lotes con una cepa de *Trichoderma* de origen colombiano. Comparando los valores obtenidos con los parámetros de calidad de semilla de soja de Scandiani (2003), los porcentajes de EG y PG de las semillas inoculadas con *Trichoderma* correspondieron a la calificación “Muy buena” a “Excelente”. En cambio, las semillas testigo fueron calificadas como “Buenas”. A pesar de esto, las semillas inoculadas con *Trichoderma* no superaron significativamente al testigo en longitud de talluelo y de radícula. En el primer caso, el testigo fue apenas superado por *T. asperellum* A1, *T. harzianum* y *T. asperellum* A2, en dicho orden, mientras que en longitud de radícula, el testigo y los tratamientos con *Trichoderma* alcanzaron valores similares, y en el caso de *T. asperellum* A2 la radícula fue significativamente menor que

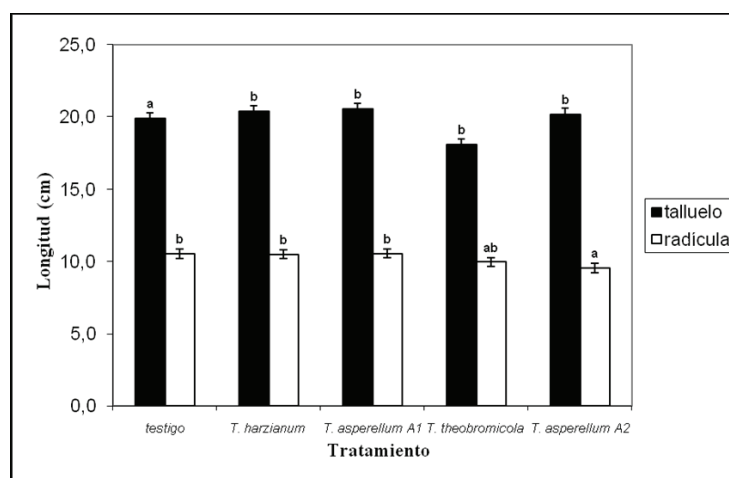
en el testigo (Figura 4). En relación al peso fresco de radícula, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos evaluados con respecto al testigo, mientras que para peso fresco de talluelos, *T. harzianum* presentó diferencias significativas frente al testigo. Para *T. asperellum* A2, *T. asperellum* A1 y *T. theobromicola* se obtuvieron valores intermedios en dicho orden; sin manifestar, sin embargo, diferencias significativas entre ellos.

Los valores de peso seco de radícula obtenidos demostraron que los tratamientos con *T. asperellum* A1 y *T. theobromicola* lograron pesos significativamente superiores al resto, llegando incluso a ser mayores al 40% respecto al testigo. Si bien, *T. harzianum* y *T. asperellum* A2 fueron significativamente inferiores, superaron ampliamente al testigo (en un 20%) (Figura 5A). En cuanto al peso seco de los talluelos (Figura 5B), se observó que las plántulas tratadas con las distintas cepas de *Trichoderma* mostraron, en todos los casos, valores significativamente superiores a los testigos (30%). De acuerdo a Harman *et al.* (2004), los elevados valores de peso seco obtenidos demuestran que la habilidad de *Trichoderma* para incrementar el crecimiento y desarrollo vegetal se debe a un aumento de los constituyentes

**Tabla 4.** Porcentajes de energía germinativa (EG) y poder germinativo (PG) para cada tratamiento con distintas especies del género *Trichoderma*.

Tratamientos	Energía germinativa (%)	Poder germinativo (%)
Testigo	73 ± 0,58a	81 ± 0,58a
<i>Trichoderma harzianum</i>	85 ± 1,7b	88 ± 4,6ab
<i>Trichoderma asperellum</i> A1	80 ± 5,7ab	87 ± 1,7ab
<i>Trichoderma theobromicola</i>	89 ± 0,58b	90 ± 1,15b
<i>Trichoderma asperellum</i> A2	80 ± 2,31ab	88 ± 1,15ab

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba LSD de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 4.** Longitud de talluelo y radícula de plántulas de soja cuyas semillas fueron inoculadas con distintas especies del género *Trichoderma*. Letras distintas en la misma categoría indican diferencias significativas con respecto a los testigos de acuerdo con la prueba de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

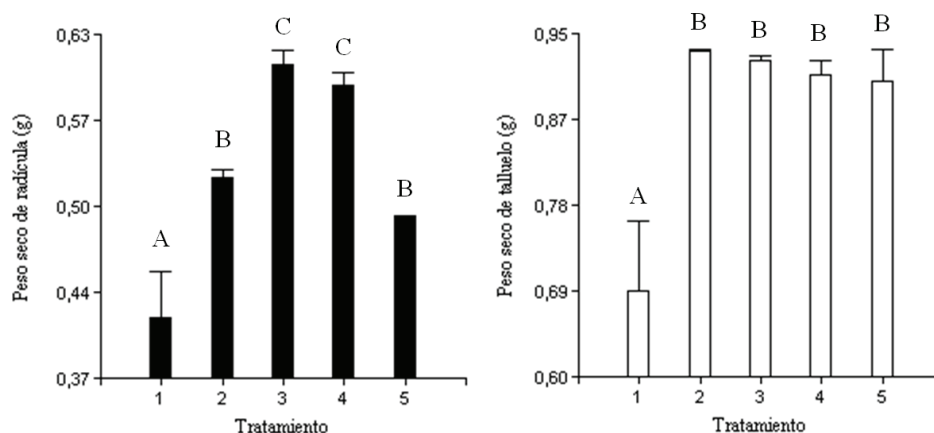


Fig. 5. Peso seco de radícula y talluelo de plántulas de soja en función de cada tratamiento con distintas especies del género *Trichoderma*. Tratamientos: 1) Testigo, 2) *T. harzianum*, 3) *T. asperellum* A1, 4) *T. theobromicola*, 5) *T. asperellum* A2. Letras distintas en la misma categoría indican diferencias significativas con respecto a los testigos de acuerdo con la prueba de Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

minerales y orgánicos (hidratos de carbono, proteínas, extracto etéreo, extracto no nitrogenado y vitaminas).

## Conclusiones

Los aislamientos de *Trichoderma* evaluados inhibieron el crecimiento micelial de *C. cassiicola*, *F. semitectum* y *Diaporthe/Phomopsis* mediante competencia por el sustrato, micoparasitismo (enrollamiento y formación de estructuras similares a ganchos), producción de metabolitos extracelulares difusibles y volátiles. *T. harzianum* se destacó en el método de competencia por el sustrato; *T. asperellum* A1 y A2 en la producción de metabolitos solubles, mientras que *T. asperellum* A2 y *T. theobromicola* lo hicieron en la producción de metabolitos volátiles. Los aislamientos nativos de *T. harzianum*, *T. asperellum* A1 y A2 y *T. theobromicola* evaluados *in vitro* son eficientes agentes de biocontrol de *F. semitectum*, *Diaporthe/Phomopsis* y *Corynespora cassicola*; a su vez, la eficiencia de las cepas frente a los fitopatógenos y el mecanismo antagonista empleado es una característica inherente a cada aislamiento y depende de cada pareja antagonista-fitopatógeno.

Las semillas inoculadas con *T. theobromicola* y *T. harzianum* incrementaron significativamente la energía germinativa y *T. theobromicola* incrementó también significativamente el poder germinativo. Las plántulas provenientes de semillas inoculadas y no inoculadas tuvieron longitudes de radículas y talluelos semejantes. En el peso fresco de la radícula no hubo diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. En cambio, los talluelos de plántulas provenientes de semillas tratadas con *Trichoderma*, y en especial con el suspensiones de *T. harzianum*, presentaron elevados pesos frescos, con relación a los

testigos. Las plántulas provenientes de semillas inoculadas con *Trichoderma* tuvieron una mayor producción de biomasa, con pesos secos de talluelos y raíces significativamente superiores a los testigos, lo que evidencia el efecto promotor del crecimiento inicial de plántulas de soja.

Los resultados de este trabajo muestran que los aislamientos nativos de *Trichoderma* podrían constituir herramientas útiles para el manejo sostenible del cultivo de soja, lo cual requerirá su validación en condiciones de campo.

## Referencias bibliográficas

- Andrada P., Sillón M., Canova D., Ridley N. (2008). Evaluaciones de efectos de *Trichoderma* spp. de distintos orígenes sobre damping-off y desarrollo de cultivos de soja. Primer Congreso Argentino de Fitopatología. 28-30 mayo, Córdoba, Argentina. pp. 197.
- Anees M., Tronsmo A., Edel-Hermann V., Hjeljord L.G., Héraud C., Steinberg C. (2010). Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. Fungal Biology 114: 691-701.
- Bell D. K., Wells H.D., Markhabell D.K., Wells C.R. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72: 379-382.
- Benítez T., Rincón A.M., Limón M.C., Codón A.C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology 7: 249-260.
- Câmara M.P.S., Ferreira M.A., Dianese J.C. (1995). Efeito da aplicação de fungicidas sistêmicos e época de plantio sobre a sanidade de sementes de cultivares de soja. Fitopatologia 20 (2): 233-240.
- Escobar P., Montealegre J., Herrera R. (2004). Respuesta *in vitro* de cepas de *Trichoderma harzianum* frente a  $Fe^{3+}$ , salinidad, pH y temperatura, con el fin de ser utilizadas en control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* en tomate. Boletín Micológico 19: 95-102.

- Ghisalberti E.L. (2000). Bioactive metabolites from soilborne fungi: natural fungicides and biocontrol agents. *Studies in Natural Products Chemistry* 21: 181-250.
- González Salgado C.H., Puertas Arias A., Fonseca Flores M., Suárez Soto E., Blaya Gómez R. (1999). Actividad antagonista de *Trichoderma* sp. aislada de un suelo de la provincia Granma, Cuba frente a *Alternaria solani* Sor. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela* 16: 167-173.
- Grondona I., Hermosa R., Tejada M., Gomis M.D., Mateos P. F., Bridge P.D., Monte E., García Acha I. (1997). Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 63(8): 3189-3198.
- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. (2004). *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews. Microbiology* 2: 43-56.
- Howell C.R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease* 87(1): 4-10.
- Inbar J., Menendez A., Chet I. (1996). Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biology Biochemistry* 28 (6): 757-763.
- Jalil, C., Norero A., Apablaza G. (1997). Efecto de la temperatura sobre el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* y de su antagonista *Trichoderma harzianum*. *Ciencia e Investigación Agraria* 24 (2 y 3): 125-132.
- Lobo Junior M., Sobral de Abreu M. (2000). Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. *Ciencia y Agrotecnología* 24 (2): 521-526.
- Mantecón J. D. (2003). Evaluación de fungicidas curasemillas en el control del tizón de la vaina y del tallo (*Diaporthe/Phomopsis*) y damping-off (*Fusarium* spp.) en semillas de soja. En: <http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/agric/oleag/soja/mantecon2.htm>, consulta: julio 2011.
- Mariano R.L.R. (1993). Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. *Revista Anual de Patología de Plantas* 1: 369-409.
- Madrid Lizana. A.C. (2002). Control biológico de *Rhizoctonia solani* (Kuhn) en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) mediante el uso de *Trichoderma* spp. Ed. Universidad de Chile. Santiago de Chile. 86 p.
- Martins-Corder M.P., de Melo I.S. (1998). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. *Scientia Agrícola* 55 (1): 1-7.
- Pineda J.B., Gonnella E. (1988). Evaluación del control biológico de *Macrophomina phaseolina* en ajonjolí (*Sesamum indicum* L.). *Agronomía Tropical* 38(4-6): 43-48.
- Resende M.L., Pereira C.E., Oliveira J.A., Guimarães R.M. (2005). Qualidade de sementes de milho (*Zea mays*) tratadas com fungicida e inoculadas com *Trichoderma harzianum*. *Revista Ciência Agronômica* 36 (1): 60-66.
- Rey M., Delgado-Jarana J., Rincón A.M., Limón M.C., Benítez T. (2000). Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. *Revista Iberoamericana de Micología* 17: S31-S36.
- Scandiani M.M. (2003). Microorganismos presentes en la semilla. Manejo integrado de enfermedades em cultivos extensivos. Jornadas Técnicas. 16 y 17 de Septiembre, Capital Federal, Argentina. pp.104-118
- Vinale, F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Marra R., Woo S.L., Lorito M. (2008). *Trichoderma* - plant - pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1-10.
- Yasem de Romero M.G., Pasqualini A.I., Romero E.R., Ramallo J.C., Lori. G. (2000). Virulencia de tres especies de *Fusarium* en soja. I: efectos en la emergencia de plántulas. *Revista Fitopatología*, 35 (1): 26-31.
- Yasem de Romero M.G.; Durán E., Romero E., Ramallo J.C. (2007). Respuesta *in vitro* de cepas de *Trichoderma* frente a aislamientos de hongos fitopatógenos de semillas de soja. *Avances en la Producción Vegetal y Animal del NOA*. 26 y 27 abril, San Miguel de Tucumán, Argentina. pp 308-311.