

EVALUACION DE LA EFICIENCIA DE MICOPARASITOS SOBRE ESCLEROCIOS DE *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* "IN VITRO"

C. MONACO

Cátedra de Fitopatología. Fac. de Agronomía. Univ. Nac. de La Plata

Recibido: 21 de noviembre de 1989. Aceptado: 19 de abril de 1990.

RESUMEN

Seis hongos aislados de algunos suelos hortícolas del Partido de La Plata (Pcia. de Buenos Aires) mediante la técnica del cebo con esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*, fueron evaluados por su antagonismo "in vitro" frente a este hongo usando cultivos dobles y ensayos con esclerocios.

Trichoderma spp., *Coniothyrium minitans* y especies del género *Fusarium* y *Penicillium* mostraron una fuerte actividad antagonista. *Trichoderma harzianum* y *T. koningii* evidenciaron el mejor comportamiento en la destrucción de esclerocios de *S. sclerotiorum*.

Palabras claves: Hongos del suelo, *Sclerotinia sclerotiorum*, antagonismo, esclerocios, ensayos "in vitro".

SUMMARY

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF MYCOPARASITES ON *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* "IN VITRO"

Six fungi isolated from some horticultural soils in La Plata (Buenos Aires, province, Argentine) by a baiting technique with sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary, were evaluated for their antagonism "in vitro" to this fungus using dual cultures and tests with sclerotia.

Trichoderma spp., *Coniothyrium minitans* and species of *Fusarium* and *Penicillium* showed strong antagonistic activity.

Trichoderma harzianum and *T. koningii* showed the best behaviour because they killed a very high percentage of the sclerotia of *S. sclerotiorum*.

Keywords: Soil fungi; *Sclerotinia sclerotiorum*; Antagonisms; Sclerotia; "in vitro" assays

INTRODUCCION

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary es un hongo patógeno habitante del suelo que afecta a numerosas plantas hortícolas de significativa importancia económica (Mitidieri, 1984). Su control es difícil debido a que ante condiciones climáticas adversas puede sobrevivir en forma de órganos de resistencia (esclerocios) en el tejido del huésped o en el suelo; también lo es por el alto

costo de los fungicidas y la dificultad en la obtención de cultivares resistentes.

Campbell, (1947) al realizar cultivos axénicos de esclerocios recogidos del suelo observó que desarrollaban colonias de otras especies fúngicas y que en muchos casos eran responsables de la muerte de aquellos. Los estudios sobre agentes de biocontrol han mostrado que los esclerocios son vulnerables al ataque de otros hongos tales como *Coniothyrium minitans* (Hoes,

* Becaria de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

J. and Huang, H. 1975; Tribe, 1957; Trutman P. and Keane, P. 1982) y algunas especies de *Trichoderma* (Mitidieri, I. 1988; Su, S and Leu, L. 1980; Whipps, J. 1987).

El objetivo de este trabajo fue identificar a los antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum* presentes en los suelos de la zona hortícola platense infestados con el mismo e investigar su actividad.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron esclerocios provenientes de suelos cultivados con tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) algunas de cuyas plantas presentaban marchitamiento por *S. sclerotiorum*, provenientes de la zona hortícola platense. Los mismos se esterilizaron en una mezcla de iguales volúmenes de hipoclorito de sodio al 2,5% y etanol 70° durante un min., y se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo agar-papa-glucosado (APG) al 2% e incubaron en estufa a 20 - 2° C para obtener cultivos puros del hongo.

A. Aislamiento del antagonista por la técnica del cebo.

Se recogieron muestras de suelo en distintos puntos de la zona hortícola platense y se colocaron en potes de 15 cm. de diámetro. En cada uno de ellos se depositaron 10 esclerocios previamente esterilizados por la técnica anteriormente descrita y se los mantuvo con riegos periódicos en condiciones de invernáculo por espacio de 60 días.

Al cabo de este tiempo se recolectaron los esclerocios, se lavaron con agua corriente, se esterilizaron como se describió anteriormente, y se sembraron en cajas de Petri con APG al 2% las que se incubaron a 20 - 2° C durante 10 días para observar el desarrollo del hiperparásito.

B.- Acción antagónica del hongo aislado

Cada aislamiento de los hongos se enfrentó a *S. sclerotiorum* (cultivo doble) en cajas de Petri con APG al 2%. Ambos se sembraron si-

multáneamente. La siembra se realizó depositando pequeños trozos de colonia de los hongos a probar que se ubicaron de manera equidistante con el patógeno y a una distancia de 1 cm. del borde de la placa de agar. Finalmente se incubaron en una estufa a 20 - 2° C durante 28 días.

C.- Viabilidad de los esclerocios

El efecto del antagonismo sobre los esclerocios se probó por inmersión de los hongos en suspensiones de 10⁸ conidios/ml. provenientes de cultivos en APG al 2% de 7 días de edad. Se colocaron durante 20 min. 50 esclerocios en cada una de las suspensiones y 50 en agua destilada estéril que sirvieron como testigo. Después de este tratamiento, los mismos se colocaron en cajas de Petri con medio de Bayle (Bayle, 1936) y se llevaron a una estufa a 20 - 2° C durante 25 días. Pasado este lapso los esclerocios se lavaron con abundante agua corriente, se esterilizaron según la técnica descrita y se colocaron sobre discos estériles de zanahoria en cajas de Petri y se incubaron a 20 - 2° C durante siete días; al cabo de este tiempo se examinó el crecimiento fúngico. *S. sclerotiorum* fue fácilmente reconocido por su micelio muy blanco y lanoso que cubrió rápidamente los discos de zanahoria (Zizzerini and Tosi, 1985).

RESULTADOS

A.- Aislamiento del antagonista por la técnica del cebo

Las especies fúngicas aisladas de los esclerocios se detallan en la Tabla 1

B.- Acción antagónica del hongo aislado

Se observó que los esclerocios que se producen en la región de contacto de los cultivos duales mueren y al transferirlos a un medio de cultivo, solo crece el antagonista. Los esclerocios muertos son blandos y sobre su superficie se desarrollan numerosos propágulos del parásito,

Espece	Nº de Aislamiento
Trichoderma harzianum	2 3
Trichoderma koningii	1 ; 2
Coniothyrium minitán	1 ; 2 ; 3
Fusarium oxysporum	2 . 3
Fusarium p.	1 ; 3 ; 4
Penicillium p.	1 ; 2 ; 3 ; 4
Chaetomiun p.	2 ; 3

Tabla 1: Hongos aislados por la técnica del cebo
Los números identifican a las localidades de donde se tomó la muestra. Los Hornos, Arana, Gorina y Etcheverry, respectivamente.

Fungi isolated by a baiting technique. The numbers point out were the soil sample was taken. Los Hornos; Arana; Gorina y Etcheverry, respectly.

Cultivo dual	Nº de esclerocios producidos en cultivo					
	Región de contacto			Resto del cultivo		
	Sanos	Muertos	Contaminados	Sanos	Muertos	Contaminados
Coniothyrium minitán S. sclerotiorum	0	30	2	15	5	10
Chaetomiun p. S. sclerotiorum	5	10	10	20	5	5
Fusarium oxysporum S. sclerotiorum	0	25	17	20	10	5
Trichoderma harzianum S. sclerotiorum	0	30	0	0	0	0
Trichoderma koningii S. sclerotiorum	0	25	5	5	2	10
Penicillium p. S. sclerotiorum	0	20	5	0	10	5
Fusarium p. S. sclerotiorum	0	15	5	15	5	10

Tabla 2: Patogenicidad de hongos habitantes del suelo aislados de esclerocios de *S. sclerotiorum*.

Pathogenicity of soil fungi isolated from sclerotia of *S. sclerotiorum*.

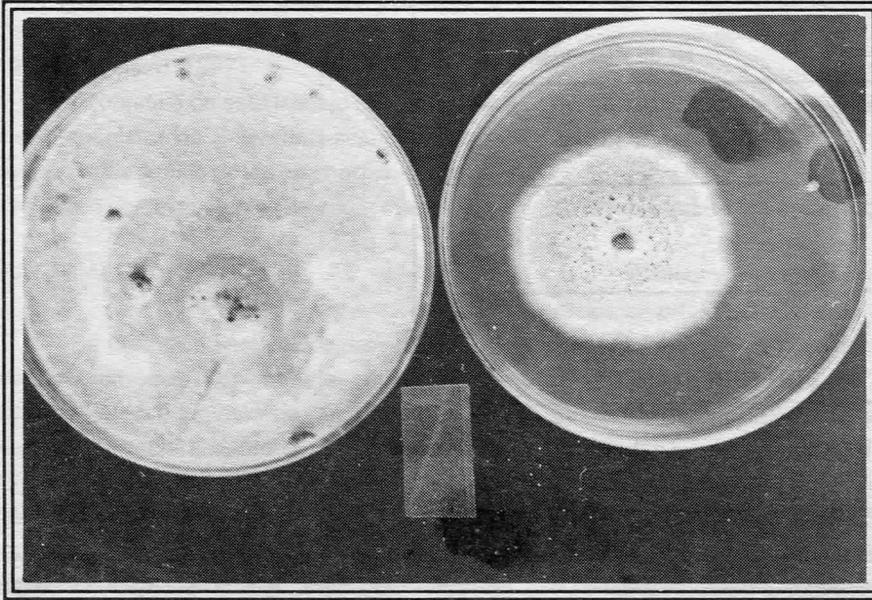


Foto 1: A la derecha se observa un esclerocio tomado de la región de contacto de un cultivo dual de *Coniothyrium minitans* y *S. sclerotiorum*. A la izquierda los esclerocios que se observan se tomaron del resto del cultivo.

A sclerotium taken from contact-region from dual culture of *Coniothyrium minitans* and *S. sclerotiorum* (on right). The sclerotia were taken from non-contact-region (in left).

excepto en el caso del cultivo dual, donde el patógeno y el antagonista no están en contacto, son viables o solo están ligeramente contaminados (Foto 1).

cada combinación patógeno - antagonista. (Fotos 2 y 3).

C.- Viabilidad de los esclerocios

En la Tabla 2 se indica el número de esclerocios producidos en 20 cultivos dobles de

En todos los casos se observó que si los esclerocios no fueron contaminados, las colonias



Foto 2: Cultivo doble de *Penicillium* sp. y *Sclerotinia sclerotiorum*

Dual culture of *Penicillium* sp. and *S. sclerotiorum*

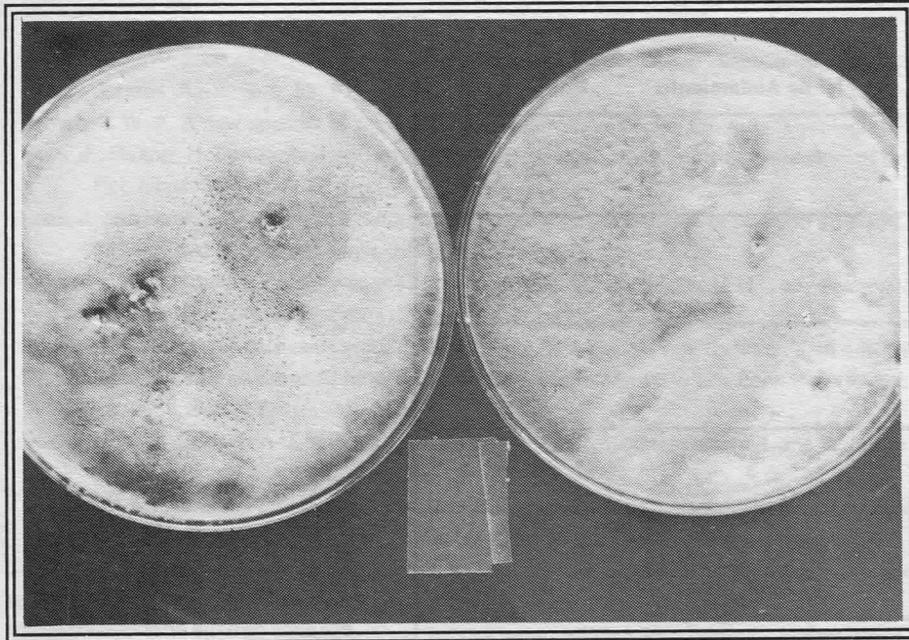


Foto 3: Cultivos dobles: *S. sclerotiorum* - *T. harzianum* (Izquierda). *S. sclerotiorum* - *T. koningii* (derecha).

Dual cultures: *S. sclerotiorum* - *T. harzianum* (On left). *S. Sclerotiorum* - *T. koningii* (On right).

puras de *S. sclerotiorum* se desarrollaban sobre el disco de zanahoria; si el esclerocio fué ligeramente contaminado el patógeno y el antagonista se desarrollaban sobre el disco; los esclerocios no viables no desarrollaban micelio sobre los discos, o sólo lo hacía el antagonista. El porcentaje mas alto de esclerocios no viables fué encon-

trado frente a *Trichoderma harzianum* y *T. koningii*, seguido por *Coniothyrium minitans* y *Fusarium oxysporum*. (Foto 4).

Otros aislamientos fueron menos activos, como en el caso de *Chaetomiun* sp. en que un 60% de los esclerocios fueron viables.

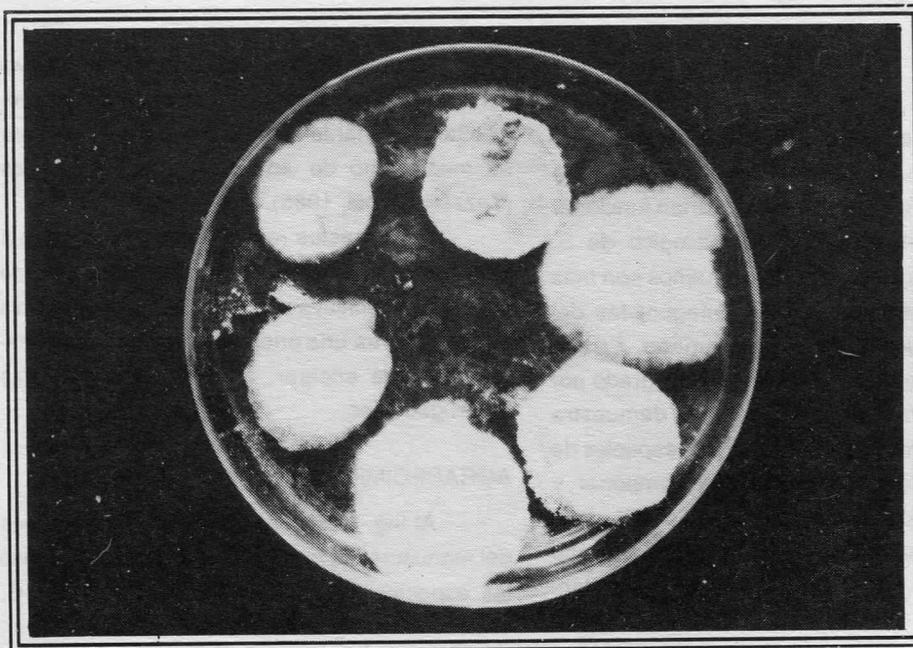


Foto 4: Esclerocios tratados con una suspensión de *Trichoderma harzianum*. Sobre los discos de zanahoria desarrolla solo el micelio del antagonista.

Sclerotia treated with *T. harzianum* suspension. Only Antagonistic fungi developed on carrot disks.

Especie	Nº de Aislamiento	% de Esclerocios NoViables
Trichoderma harzianum	2	95
Trichoderma koningii	1	93
Coniothyrium minitan	2	56
Penicillium p.	3	62
Fusarium oxysporum	2	57
Fusarium p.	4	50
Chaetomium p.	2	37

Tabla 3: Germinación de esclerocios después de estar en contacto con una suspensión de conidios de hongos aislados de los mismos

Germination of sclerotia of *S. sclerotiorum* after immersion in conidial suspension of fungal isolates.

DISCUSION

De los resultados obtenidos puede inferirse que algunos hongos habitantes normales de los suelos hortícolas platenses podrían funcionar como auxiliares en el control biológico de *S. sclerotiorum*. Los esclerocios pequeños son más fácilmente destruidos por los antagonistas del suelo que aquellos de mayor tamaño. El alto porcentaje de muerte de esclerocios logrado por *Trichoderma harzianum* y *T. koningii* demuestra que son efectivos micoparásitos. Las especies de *Trichoderma* son capaces de descomponer y destruir las hifas y paredes de esclerocios con enzimas (glucanasas y quitinasas) (Jones and Watson, 1969), causando así podredumbre blanda.

Algunas especies del género *Fusarium* tienen un potencial de destrucción de los esclerocios tan importante como *Trichoderma* spp. pero su mecanismo de acción aún no se conoce (Zizzerini, Tosi, 1985).

Si bien estos resultados corresponden a un ensayo "in vitro" y no se puede extraer una conclusión definitiva con miras a una aplicación a campo, provee una orientación sumamente interesante para encarar, a partir de ellos, otras investigaciones.

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Héctor Alippi por la lectura crítica del manuscrito; a la Ing. G. Lori, quién determinó las especies del género *Fusarium* y al Sr. G. Wotzke por su colaboración en el trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- Bayle, B.B. Influence of environment during maturation on the disease reaction and yield of wheat and barley. *Journal Agric Res.* 53: 717 - 748 (1936)
- Campbell, W. A. A new species of *Coniothyrium minitans* parasitic on sclerotia. *Mycologia* 39: 190 - 195. (1947).
- Hoes, J.; Huang, H. Penetration and infection of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans*. *Can Jour of Bot.* 54: 406 - 410. (1975)
- Hoes, J. and Huang, H. *Sclerotinia Sclerotium*: viability and separation of sclerotia from soil. *Phytopathology* 65: 1431 - 1432 (Phytopathological Notes). (1975).
- Mitidieri, I. Antecedentes y observaciones de la podredumbre del tallo de la soja por *Sclerotinia sclerotiorum*(Lib.) de Bary IDIA 385 - 386. (1984).
- Mitidieri, I. Control biológico de hongos del suelo con *Trichoderma* spp. "in vitro". IDIA 449 - 452: 45 - 49. (1988).
- Su, S. and Leu, L. Three parasitic fungi on *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Plant Protection Bulletin Taiwan* 22: 253 - 262. (1980)
- Tribe, H. On the parasitism of *Sclerotinia trifoliorum* by *Coniothyrium minitans*. *Trans Br. Mycol. Soc.* 40: 489 - 499. (1957).
- Trutman, P. and Keane, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotium* on plant tissue segments by the hyperparasite *Coniothyrium minitans*. *Trans Br. Mycol. Soc.* 78: 521 - 529. (1982).
- Whipps, J. M. Behaviour of fungi antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* on plant tissue segments. *Jour. of General Microbiology* 133: 1495 - 1501. (1987).
- Zizzerini, A. and Tosi, L. Antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology* 34: 415 - 421. (1985).