Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata. Tomo 71 (1), Año 1995: 67-72

Capacidad antagónica de algunos micoparásitos de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary, presentes en la región de Pergamino, Argentina.

Ana B Menendez y Alicia M Godeas

Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Pabellón II, Ciudad Universitaria, 1428 Capital Federal, Argentina.

Recibido: 25 de Julio de 1994. Aceptado: 6 de Marzo de 1995.

RESUMEN

Se detectó la presencia de micoparásitos de *S. sclerotiorum* en un campo ubicado en la zona de Pergamino y se comparó, *in vitro*, el potencial antagónico contra *S. sclerotiorum*, de las especies más frecuentemente aisladas. Estas fueron *Trichoderma koningii*, *Talaromyces flavus* y *Trichoderma harzianum*. Las cepas de *Trichoderma* estudiadas resultaron más exitosas que *T. flavus*, con respecto a su capacidad para disminuir el crecimiento de la colonia del patógeno y reducir, tanto la viabilidad de los esclerocios como también el desarrollo de otros nuevos. Además se observó la colonización de los tejidos de los esclerocios no viables.

Palabras claves: *Trichoderma koningii, Talaromyces flavus, T. harzianum, Sclerotinia sclerotiorum*, antagonismo.

Antagonic capacity of some microparasites of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary esclerotia, presents in the Pergamino region, Argentina.

SUMMARY

The occurrence of mycoparasites of *S. sclerotiorum* sclerotia was surveyed in a plot located in the area of Pergamino. The most frequently isolated species were compared in their antagonistic capacity against the pathogen. The main isolated species were *Trichoderma koningii*, *Talaromyces flavus* and *T. harzianum*. *Trichoderma* studied strains resulted more sucsesfull than *T. flavus* regarding their capacity for decreasing the pathogen colony growth, reducing sclerotia viability and also the formation of new ones. The colonization of non-viable sclerotia tissues was observed.

Key words: *Trichoderma koningii, Talaromyces flavus, T. harzianum, Sclerotinia sclerotiorum*, antagonism.

Digitized by Google
Original from THE UNIVERSITY OF TEXAS
Generated on 2017-03-23 16:57 GMT / http://hdl.handle.net/2027/txu.059172136617560
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike / http://www.hathitrust.org/access_use#cc-by-nc-sa-4.0

INTRODUCCION

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary causa importantes enfermedades en cultivos de las regiones húmedas y templadas de la Provincia de Buenos Aires, como de girasol, soja y de diversas hortalizas.

El alto costo de los fungicidas, los resultados pobres de las prácticas culturales, como medio de lucha, y las dificultades para obtener cultivares resistentes a este patógeno, constituyen un estímulo para la búsqueda de antagonistas con vistas a ser aplicados en el control biológico de esta enfermedad.

Diversos micoparásitos de *S. sclerotiorum* han sido estudiados como agentes biocontroladores, entre ellos varias especies del género *Trichoderma* (Chet 1987), *Coniothyrium minitans* Campbell (Huang 1980, Trutmann *et al* 1980, 1982), *Sporisdesmium sclerotivorum* Uecker, (Adams y Ayers 1982), *Talaromyces flavus* (Klocker) Stolk y Sampson (Mc Laren *et al* 1986, 1989) y *Trichothecium roseum* (Huang y Kokko 1993).

Baker *et al* (1982) sugirieron buscar antagonistas naturales en áreas donde la enfermedad ya no existe o ha disminuido, en presencia de hospedantes susceptibles.

En la región de Pergamino en la Provincia de Buenos Aires, se sucedieron serias epifitias de podredumbre húmeda del tallo de la soja (*S. sclerotiorum*) observándose, desde hace ya algunos años, el declinamiento de esta enfermedad (Juan Annone, Comun. Pers. 1991). Una de las posibles causas podría haber sido la existencia de su control biológico natural. Sobre la base de esta premisa se buscó la presencia de micoparásitos de *S. sclerotiorum* en un campo ubicado en la zona, dedicado al cultivo de soja. El propósito fue de comparar entre sí el potencial antagónico *in vitro* de las especies más frecuentemente aisladas contra el patógeno.

MATERIALES Y METODOS

a) Obtención de los micoparásitos

Se utilizaron como cebos esclerocios producidos en un medio con zanahorias (Bin *et al* 1991), a partir de una cepa de *S. sclerotiorum*, aislado de un infectario con un cultivo hospedante.

En noviembre de 1991 se tomaron al azar muestras de suelo, a una profundidad de 10 cm, en una parcela cultivada con soja perteneciente a la EEA-INTA Pergamino. Las muestras se llevaron al laboratorio donde se mezclaron.

Treinta esclerocios se enterraron en una maceta (5000 cm^3) que contenía la mezcla de suelo. La tierra se mantuvo en capacidad de campo y luego de 40 días de incubación a temperatura ambiente, se recuperaron los esclerocios por tamizado húmedo. Se esterilizaron superficialmente, sumergiéndolos en alcohol 50%, 1 min; agua-lavandina (60 g Cl/litro) 1:1, 4 min; alcohol 50%, 1 min y colocaron en cajas de Petri con agar papa glucosado (APG) 1%, pH 6,9-7,0. Al cabo de 10 días de incubación a 25 + 2°C, se aislaron las colonias crecidas a partir de los esclerocios y mantuvieron en APG, procediéndose luego a su identificación.

b) Pruebas de micoparasitismo

Se realizaron cultivos duales con los organismos aislados más frecuentemente y *S. sclerotiorum*. En cajas de Petri de 9 cm de diámetro, conteniendo APG, se colocaron discos (5 mm diám) de agar con micelio del patógeno y del antagonista, en crecimiento activo, sobre una diagonal, separados por 6 cm de distancia. Para asegurar el desarrollo de los esclerocios, los antagonistas fueron sembrados entre 5 y 7 días más tarde. Como testigo se sembró en cajas con APG, el patógeno solamente.

Digitized by Google
Original from THE UNIVERSITY OF TEXAS
Generated on 2017-03-23 16:57 GMT / http://hdl.handle.net/2027/txu.059172136617560
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike / http://www.hathitrust.org/access_use#cc-by-nc-sa-4.0

Las cajas se incubaron a 27 + 2°C con luz natural. Al cabo de 20 días se cosecharon los esclerocios, comparándose el aspecto general, consistencia y color de la médula con respecto al testigo. Luego fueron esterilizados superficialmente y puestos a germinar en cajas de Petri sobre APG a 25°C en oscuridad, para evaluar su viabilidad. Se consideraron no viables aquéllos esclerocios de los cuales, al cabo de cinco días, se reaisló solamente el antagonista.

c) Pruebas de antagonismo entre colonias

Se procedió igual que en b), pero la siembra de cepas enfrentadas fue simultánea. Al tercer día de la inoculación se comparó el radio de crecimiento de las colonias de los hongos a lo largo de la diagonal que unía los dos aislamientos. Al cabo de quince días se registró el número de esclerocios formados en cada cultivo dual.

Se efectuaron, además, cultivos individuales de cada una de las cepas estudiadas.

Se realizaron 15 y 5 réplicas por tratamiento en b) y c) respectivamente.

d) Histología de los esclerocios

Los esclerocios testigos y los no viables en las pruebas de micoparasitismo fueron fijados en glutaraldehído en buffer millonig 3% pH 7,2 (3 h), Osmio 2% (2 h a temperatura ambiente); deshidratación con alcohol (35, 50, 70, 96 y 100%); soluciones de acetona-Spurr (3:1, 2:1 y 1:1) e inclusión en cápsulas de gelatina mantenidas en estufa a 60°C, 48 h. Se hicieron cortes ultrafinos de 1µm y se colorearon con azul de metileno, los cuales fueron fotografiados.

Tabla 1: Porcentaje de esclerocios de *S. sclerotiorum* sobre el cual se aisló un micoparásito.

Percentage of *S. sclerotiorum* buried sclerotia from which fungus were isolated.

	(%)
Trichoderma koningii	47
Talaromyces flavus	23
Trichoderma harzianum	7
Neurospora sp.	3
Fusarium sp.	3
Fusarium oxysporum	3
Arthrinium sp.	3
Sordaria sp.	3

RESULTADOS

a) Aislamiento de micoparásitos

El 47% de los aislamientos correspondieron a la especie *Trichoderma koningii* (BAFC Cult. Nº 741), el 23% de los mismos a la especie *Talaromyces flavus* (BAFC Cult. Nº 740) y el 7% a *T. harzianum* (BAFC Cult. Nº 742) (Tabla 1). El resto correspondió a géneros que aparecieron sólo una vez, por lo que no fueron consideradas en los ensayos de antagonismo y de micoparasitismo de los esclerocios. A pesar de la frecuencia de aislamiento comparativamente baja de *T. harzianum,* esta especie fue incluída en los ensayos de patogenicidad y antagonismo, dada su reconocida capacidad antagónica contra *S. sclerotiorum.*

No se aislaron cepas bacterianas.

b) Pruebas de micoparasitismo

Los porcentajes de esclerocios considerados no viables al enfrentarlos con los potenciales micoparásitos se indican en la Tabla 2.

Los esclerocios más afectados presentaron consistencia muy blanda y abundante esporulación de los antagonistas en su superficie (Figura 1, 2 y 3). En algunos casos adoptaron forma bicóncava, con la médula comprimida y de color castaño; en otros ésta se

Digitized by Google
Original from THE UNIVERSITY OF TEXAS
Generated on 2017-03-23 16:57 GMT / http://hdl.handle.net/2027/txu.059172136617560
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike / http://www.hathitrust.org/access_use#cc-by-nc-sa-4.0

Tabla 2: Número de esclerocios de *S. sclerotiorum* que no resultaron viables frente a cada antagonista.

Number of *S. sclerotiorum* sclerotia that resulted non viable with each antagonist

	ANTAGONISTAS		
	T. koningii	*T. harzianum*	*T. flavus*
Nº total de esclerocios	159	133	162
Esclerocios no viables	121 (76%)	115 (86,8%)	66 (40,7%)

Tabla 3: Efecto de los antagonistas sobre el desarrollo de la colonia de *S. sclerotiorum* en cultivo dual.

Efect of antagonists on the development of *S. sclerotiorum* colony in dual cultures.

	ANTAGONISTAS			
	T.koningii	*T.harzianum*	*T.flavus*	Control
(+)Crecimiento radial del patógeno (mm d^{-1})	6	7	9	13
(++)Número de esclerocios desarrollados	1	3,75	5	6

Los valores son un promedio de 5 réplicas.
(+) y (++): valores medidos después de 3 y 15 días respectivamente.

Tabla 4: Tasa media de crecimiento radial de las colonias fúngicas en los tres primeros días de cultivo a 25ºC.

Colony rate growth over 3 days old culture (T=25 ºC)

Hongos ensayados	medida de la colonia (mm d^{-1})
T. koningii	21,67
T. harzianum	21,67
T. flavus	2,33
S. sclerotiorum	19

Los valores son un promedio de 5 réplicas.

encontró completamente desintegrada, conservándose sólo la corteza. Los esclerocios del testigo permanecieron firmes y con la médula de color blanco.

c) Pruebas de antagonismo

El crecimiento radial de *S. sclerotiorum* fue menor en presencia de antagonistas que en las cajas testigo. (Tabla 3). Ninguno de los aislamientos evitó totalmente la formación de los esclerocios, aunque redujeron su número.

Las cepas de *T. koningii* y *T. harzianum* mostraron un comportamiento muy similar entre sí. Sus velocidades de crecimiento y el diámetro máximo de las colonias fueron superiores a los de la cepa de *T. flavus* (Tabla 4).

d) Histología de los esclerocios

La corteza y la médula de los esclerocios no infectados, presentaban una morfología normal (Figura 1).

En los esclerocios colonizados por ambas especies de *Trichoderma*, las hifas penetraron intra e intercelularmente su corteza y médula (Figura 2), ocasionando el colapso y la destrucción de las células de esta última. En consecuencia, la médula perdió su organización original (Figura 3). Se observó una esporulación más abundante del micelio del antagonista sobre la superficie del esclerocio, que sobre el agar.

En los esclerocios colonizados por *T. flavus*, las hifas también invadieron la corteza y la médula, pero no se observó desorganización del tejido medular.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos puede concluirse que: el potencial antagónico de *T. harzianum* y *T. koningii* contra *S. sclerotiorum* es superior al de *T. flavus*.

Digitized by Google
Original from THE UNIVERSITY OF TEXAS
Generated on 2017-03-23 16:57 GMT / http://hdl.handle.net/2027/txu.059172136617560
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike / http://www.hathitrust.org/access_use#cc-by-nc-sa-4.0

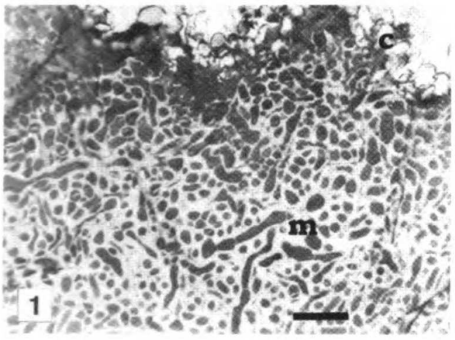

Figura 1: Aspecto normal del tejido cortical y medular de un esclerocio testigo.

Normal aspect of cortical and medullar tissues in a control sclerotium.

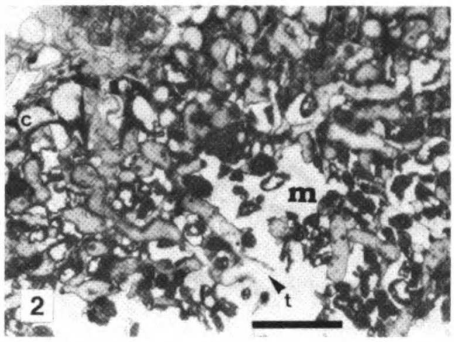

Figura 2: Esclerocio infectado por *T. koningii*. Las hifas penetran intercelularmente e intracelularmente la corteza y la médula.

Sclerotium infected by *T. koningii*. Hyphae penetrate inter and intracellularly the rind and medullary tissues.

Las cepas de *Trichoderma* estudiadas resultaron más exitosas que la de *T. flavus*, con respecto a su capacidad para evitar el desarrollo de nuevos esclerocios y reducir el crecimiento de la colonia del patógeno, en el medio de cultivo ensayado.

Los esclerocios infectados con *Trichoderma* presentaron un grado de afección mayor que los infectados con *T. flavus*, dado que en el primer caso la médula se hallaba completamente desintegrada. Esto sugeriría una mayor actividad de enzimas líticas por parte de *Trichoderma* que de *T. flavus*. En efecto, se ha visto que diversas especies de *Trichoderma* producen enzimas que solubilizan los Ó-glucanos y la quitina, que constituyen las paredes celulares de los esclerocios de *S. sclerotiorum* (Jones y Watson 1969, Chet 1987).

Mc Laren *et al* (1989) observaron que las hifas de *T. flavus* tienen la capacidad de degradar las paredes celulares de la corteza, pero no las de la médula de los esclerocios de *S. sclerotiorum*. Esto explicaría la diferencia en el grado de desorganización de la médula entre los esclerocios infectados con *T. koningii* o *T. harzianum* y *T. flavus*.

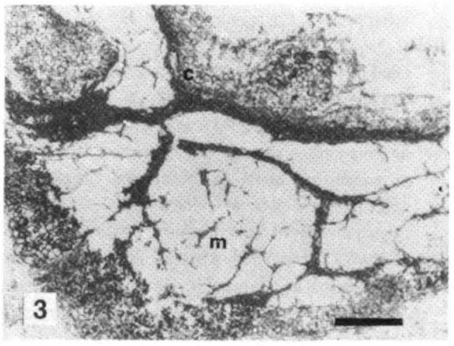

Figura 3: Médula de un esclerocio infectado por *T. koningii* completamente desorganizada.
m: tejido medular, c: tejido cortical, t: hifa de *T. koningii*. Barras: 20 µm en Figuras 1 y 2; 100 µm en

Sclerotium infected by *T. koningii* with a completely destroyed medulla.
m: medullary tissue, c: rind, t: *T. koningii* hyphae. Bars:20 µm in Figures 1 y 2; 100 µm in Figure 3

Por otra parte, es conocida la producción de metabolitos tóxicos por parte de *T. flavus* (Mizuno *et al* 1974, Fuska *et al* 1972, Fuska *et al*, 1979 a, b) por lo que es probable, que la pérdida de viabilidad de los esclerocios

Digitized by Google
Original from THE UNIVERSITY OF TEXAS
Generated on 2017-03-23 16:57 GMT / http://hdl.handle.net/2027/txu.059172136617560
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike / http://www.hathitrust.org/access_use#cc-by-nc-sa-4.0

infectados por este hongo, se deba a una combinación de ambas capacidades antagónicas.

Los dos organismos aisladas con mayor frecuencia, *T. koningii* y *T. flavus*, han sido evaluadas anteriormente como agentes efectivos del control biológico de *S. sclerotiorum* (Dos Santos y Dhingra 1982, Su and Leu 1980).

Es también conocido el micoparasitismo de *T. flavus* sobre los esclerocios de *S. sclerotiorum* (Mc Laren *et al* 1986, 1989).

La presencia de *T. koningii, T. harzianum* y *T. flavus* en la zona y en el momento del muestreo, sugiere que la declinación de la podredumbre húmeda del tallo de la soja en la región de Pergamino, pudo ser consecuencia de la acción de antagonistas naturales, siendo probable que estas especies hayan cumplido "algún rol" en dicho proceso.

BIBLIOGRAFIA

Adams PB and WA Ayers (1982) Biological control of *Sclerotinia* lettuce drop in the field by *Sporidesmium sclerotivorum*. Phytopathology 72: 485-488

Baker KF and RJ Cook (1982) Biological control of plant pathogens. Amer Phytopathol Soc St Paul, MN. 433 pp

Bin L, GR Knudsen and DJ Esche (1991) Influence of an antagonistic strain of Pseudomonas fluorescens on growth and ability of *Trichoderma harzianum* to colonize sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathology 81: 994-1033

Chet I (1987) *Trichoderma*- Application, Mode of Action, and Potential as a Biocontrol Agent of soilborne Plant Pathogenic Fungi. En I. Chet (Ed) Innovative Approaches to Plant Disease Control. John Wiley & Sons, New York, 372 pp

Dos Santos AF and OD Dhingra (1980) Patogenicity of *Trichoderma* spp. on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* Can J Bot 60: 472-475

Fuska J, P Nemec and I Kuhr (1972) Vermiculine, a new antiprotozoal antibiotic from *Penicillium vermiculatum*. J Antibiotics 25: 208-211

Fuska J, A Fuskova and P Nemec (1979a) Vermistatin, an antibiotic with cytotoxic effects, produced from *Penicillium vermiculatum*. Biologia (Bratislava) 34: 735-739

Fuska J, P Nemec and A Fuskova (1979b) Vermicillin, a new metabolite from *Penicillium vermiculatum* inhibiting tumor cells in vitro. J. Antibiotics 32: 667-669

Huang HC (1980) Control of *Sclerotinia* wilt of sunflower by hyperparasites. Can J Plant Pathol 14: 86-91

Huang HC and EG Kokko (1993) *Trichothecium roseum*, a mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*. Can J Bot 71: 1631-1639

Jones D and D Watson (1969) Parasitism and lysis by soil fungi of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, a phytopathogenic fungus. Nature, Lond. 224: *287-288*

Mc Laren HC, HC Huang and SR Rimmer (1986) Hyperparasitism of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Talaromyces flavus*. Can J Plant Pathol 8: 43-48.

Mc Laren HC, HC Huang, SR Rimmer and EG Kokko (1989) Ultrastructural studies on infection of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Talaromyces flavus*. Can J Bot 67: 2199-2205.

Mizuno K, A Yagi, M Takada, K Matsuura, K Yamaguchi and K Asano (1974) A new antibiotic, Talaron. J Antibiotics 27: 560-563

Saito I (1974) Ultrastructural aspects of the maturation of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Transactions of the Mycological Society of Japan 15: 384-400.

Su SJ and LS Leu (1980) Three parasitic fungi on *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Plant Prot Bull (Taiwan) 22: 253-262

Trutmann P, PJ Keane and P Merriman (1980) Reduction of sclerotial inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Coniothyrium minitans*. Soil Biol Biochem 12: 461-465

Trutmann P, PJ Keane and PR Meriman (1982) Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* on aerial parts of plants by the hyperparasite *Coniothyrium minitans*. Trans Brit Mycol Soc 78: 521-529

Digitized by Google

Original from THE UNIVERSITY OF TEXAS

Generated on 2017-03-23 16:57 GMT / http://hdl.handle.net/2027/txu.059172136617560
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike / http://www.hathitrust.org/access_use#cc-by-nc-sa-4.0