



# Efecto de micoparásitos sobre la capacidad reproductiva de *Sclerotinia sclerotiorum*

Cecilia Ines Mónaco<sup>1,2</sup>, María Cristina Rollán<sup>1</sup> y Andrés Ignacio Nico<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata (UNLP); <sup>2</sup> Comisión de Investigaciones Científicas de La Provincia de Buenos Aires; <sup>3</sup> Departamento de Manejo de Suelos y Aguas, Fac. de Cs. Agrarias y Forestales, (UNLP), Argentina.

## Resumen

En este estudio se investigó el efecto sobre la producción de apotecios y la capacidad para parasitar a los esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* de los antagonistas *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Gliocladium roseum* y *Chaetomium globosum*. A tal fin se prepararon bandejas con suelo estéril, cada una de ellas se inoculó con esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* más el medio de cultivo donde se había desarrollado el antagonista. Las bandejas se mantuvieron en invernadero, la evaluación se realizó a los 30, 60 y 90 días. Se evaluó la proporción de germinación carpogénica, germinación miceliogénica, esclerocios parasitados y esclerocios no recuperados (destruidos). El efecto de los antagonistas sobre la germinación carpogénica de los esclerocios fue evidente al cabo del primer mes para todos los tratamientos. A los 60 y 90 días, *T. harzianum*; *T. koningii* y *G. roseum* mantuvieron el efecto inhibitorio, no así *C. globosum*, ya que no mostró diferencias significativas con el testigo. Al cabo del primer mes el porcentaje de esclerocios parasitados fue elevado en las bandejas tratadas con *T. harzianum*, *T. koningii* y *G. roseum*. *G. roseum* y *T. harzianum* efectivamente destruyen los esclerocios de *S. sclerotiorum*.

## Palabras clave

Micoparasitismo, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma* spp., *Gliocladium roseum*, *Chaetomium globosum*.

## Mycoparasites effect on reproductive ability of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia

## Summary

The ability to parasitise *Sclerotinia sclerotiorum* and the effect on apothecia production was evaluated for the following antagonists: *Trichoderma harzianum*; *Trichoderma koningii*; *Gliocladium roseum* and *Chaetomium globosum*. Plastic trays were filled with of steam-sterilized soil. Each one of them was infested with sclerotia of *S. sclerotiorum* and the culture of the antagonists. The trays were kept in a greenhouse and after 30, 60 and 90 days, evaluations were made. The rates of carpogenic germination, myceliogenic germination, mycoparasitism and destruction were evaluated. To assess carpogenic germination, the sclerotia were put in a growth chamber over moistened filter paper at  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  and 12 light hours. The rates of myceliogenic germination and mycoparasitism were evaluated on Petri dishes with 2% APD. Antagonists effect on carpogenic germination was observed one month after the start of the assay. In the evaluation made at 60 and 90 days, *T. harzianum*; *T. koningii* and *G. roseum* kept inhibitory properties. Such inhibition was not observed in the trays containing *C. globosum*. In the evaluations made at 30 days, mycoparasitism rate was high in the trays with *T. harzianum*; *T. koningii* and *G. roseum*. *G. roseum* and *T. harzianum* destroy *S. sclerotiorum* sclerotia.

## Key words

Mycoparasitism, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma* spp., *Gliocladium roseum*, *Chaetomium globosum*

## Dirección para correspondencia:

Dra. Cecilia Mónaco  
Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata CC 31, 1.900 La Plata, Buenos Aires, Argentina.  
Fax: +54-21-252346  
E-mail: healippi@isis.unlp.edu.ar

Aceptado para publicación el 9 de marzo de 1998

La podredumbre húmeda del tallo ha sido la enfermedad más importante de la soja en los últimos diez años en la principal área productora de la Argentina. En efecto, ha ocasionado reducciones anuales del rendimiento que oscilan entre el 3 y el 5% [13] El agente causal, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, es un hongo polífago que afecta un amplio rango de hospedantes.

Este patógeno produce esclerocios que permanecen viables durante las condiciones desfavorables. El esclerocio puede germinar en el suelo formando micelio que penetra en las raíces produciendo podredumbre y marchitamiento o, bajo condiciones ambientales favorables, germinar carpogénicamente produciendo apotecios. Las ascosporas originadas a partir de los apotecios de *S. sclerotiorum* son la principal fuente primaria de inóculo para la infección en soja [1].

La supervivencia de los esclerocios de *S. sclerotiorum* en el suelo no sólo es afectada por condiciones ambientales como temperatura y humedad del suelo [2], sino también por microorganismos habitantes del suelo, como los hiperparásitos *Coniothyrium minitans* [5,8,19,20] *Trichoderma viride* [12], *Trichoderma harzianum* [11], *Gliocladium catenulatum* [9,10], *Gliocladium virens* [18], *Gliocladium roseum* [17], *Chaetomium* spp. [6,16] y *Fusarium* spp. [14,15].

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de *T. harzianum*, *Trichoderma koningii*, *G. roseum* y *Chaetomium globosum* sobre la producción de apotecios de *S. sclerotiorum*, como así también la capacidad de estos antagonistas para parasitar los esclerocios.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Fuente de esclerocios.** Los esclerocios de *S. sclerotiorum* usados para la infección artificial de las bandejas fueron recolectados a partir de plantas de soja con síntomas de la enfermedad.

Antes de su uso, los esclerocios arbitrariamente seleccionados fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 5% durante seis minutos y lavados tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente, fueron sembrados en medio con granos de trigo hervidos y esterilizados al vapor, e incubados en cámara de cultivo a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 30 días.

Al cabo de ese tiempo, se separaron los esclerocios de los granos, se seleccionaron los de tamaño entre ocho y diez mm, se colocaron en bolsas de polietileno estéril y se almacenaron en refrigerador a  $5^\circ\text{C}$  durante un mes.

**Inóculo del hiperparásito.** Los antagonistas utilizados en este ensayo fueron aislados a partir de esclerocios parasitados siguiendo la técnica del cebo descrita por Mónaco [15]. Las cepas utilizadas fueron *T. harzianum*, *T. koningii*, *C. globosum*, todas ellas con probado efecto sobre la viabilidad de los esclerocios de *S. sclerotiorum* [15] y una cepa de *G. roseum* aislada a partir de esclerocios parasitados provenientes de plantas enfermas de clavel.

El inóculo de los hiperparásitos se preparó en cultivo separado de cada uno de ellos sobre un sustrato de salvado de trigo, arena y agua destilada (2:1:2 p/p/v) autoclavado durante tres días consecutivos a  $120^\circ\text{C}$ . El sustrato fue inoculado con una suspensión de esporas de cada hiperparásito a partir de cultivo en agar patata dextrosa al 2% (APD) de siete días de edad. El sustrato inoculado fue incubado durante 15 días a  $21^\circ\text{C}$ .

El inóculo fue secado durante siete días a temperatura ambiente antes de ser incorporado al suelo.

**Ensayos en invernadero.** Se prepararon cinco bandejas (12x8x3cm) por tratamiento, que contenían cada una 250gr de suelo esterilizado al vapor. El suelo fue inoculado con 20gr del medio de cultivo salvado-arena-agua donde habían desarrollado los antagonistas. Esto se reali-

zó desmenuzando el medio de cultivo en el suelo hasta lograr una mezcla homogénea. Luego cada una de las bandejas se inoculó con diez esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*, los cuales se distribuyeron uniformemente en toda la superficie de las bandejas y se enterraron a dos cm de profundidad. Para el testigo, se incorporaron los 20 gramos del medio de cultivo más los diez esclerocios. Los tratamientos fueron los siguientes: a) Testigo; b) *S. sclerotiorum* más *T. harzianum*; c) *S. sclerotiorum* más *T. koningii*; d) *S. sclerotiorum* más *C. globosum*; e) *S. sclerotiorum* más *G. roseum*.

Las bandejas se mantuvieron en invernadero (temperatura mínima promedio  $15^\circ\text{C}$  y máxima promedio  $23^\circ\text{C}$  y HR 60-80%) y se regaron diariamente para mantener la humedad del suelo a capacidad de campo. La evaluación se realizó a los 30, 60 y 90 días, de iniciado el ensayo. Los esclerocios se separaron utilizando la técnica de tamizado bajo chorro de agua corriente [7].

**Viabilidad de los esclerocios.** La viabilidad de los esclerocios se estableció teniendo en cuenta tres parámetros: a) Germinación carpogénica (viable) [formación de apotecios a partir de los esclerocios]; b) Germinación miceliogénica (viable) [formación de micelio a partir de los esclerocios]; c) Esclerocios parasitados (no viables) [desarrollo del micelio del hiperparásito a partir de los esclerocios].

Los esclerocios aislados se colocaron en placas de Petri con papel de filtro humedecida y se llevaron a cámara de cultivo con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a  $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  hasta comprobar la formación de apotecios. Se determinó el porcentaje de esclerocios que germinaron carpogénicamente. Aquellos que no germinaron carpogénicamente se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% durante seis minutos, se lavaron con agua destilada estéril y se sembraron en placas de APD al 2%. Las placas así sembradas se incubaron en estufa a  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  durante 15 días. Luego del período de incubación se registró el número de esclerocios que germinaron miceliariamente y el número de esclerocios no viables parasitados.

**Análisis estadístico.** Las medias correspondientes a los valores de porcentaje de recuperación de esclerocios, porcentaje de esclerocios que germinaron carpogénicamente y porcentaje de esclerocios parasitados se separaron aplicando el Test de Tukey al 95% de probabilidad.

## RESULTADOS

La tabla 1 expresa el estado de los esclerocios al final de su exposición al efecto de los micoparásitos.

En aquellos casos donde el porcentaje de recuperación superó el 100% esto responde a la formación de esclerocios secundarios durante el período de realización del ensayo. Se pudo observar que el tratamiento de los esclerocios con *T. koningii*, *T. harzianum* y *G. roseum* determinó, al cabo del primer mes, la desintegración de una importante proporción de esclerocios, mientras que el tratamiento con *C. globosum* se mostró sin efecto en este sentido, ya que la recuperación de esclerocios resultó similar a la del testigo. En las bandejas inoculadas con los tres primeros micoparásitos, la destrucción por efecto del micoparasitismo aumentó al cabo de los sesenta y noventa días, y condujo de nuevo a la obtención de proporciones de esclerocios desintegrados significativamente superiores al testigo y al tratamiento con *C. globosum*. En particular, *G. roseum* y *T. harzianum* mostraron un comportamiento más eficaz que *T. koningii*, ya que la proporción de escler-

**Tabla 1:** Estado de los esclerocios después de su exposición al efecto de los micoparásitos.

Días a partir de la siembra	RT			RGC			RGM			RPP			D		
	30	60	90	30	60	90	30	60	90	30	60	90	30	60	90
<i>Trichoderma koningii</i>	70a	60b	32b	10a	6a	28a	6ab	8ab	2a	54b	46a	2a	30b	40b	68b
<i>Trichoderma harzianum</i>	74a	20a	20ab	4a	0a	10a	0a	0a	0a	70b	20b	10a	26b	80c	80bc
<i>Gliocladium roseum</i>	78ab	8a	2a	6a	4a	2a	2a	0a	0a	70b	4b	0a	22b	92c	98c
<i>Chaetomium globosum</i>	118c	64b	92c	14a	62b	72b	96c	0a	10a	8a	2b	10a	0a	0a	0a
Testigo	110bc	100c	106c	74b	76b	74b	28b	22b	22a	0a	0b	0a	0a	0a	0a

RT: porcentaje medio de los esclerocios recuperados al cabo del período de realización del ensayo.  
 RGC: porcentaje medio de los esclerocios recuperados que posteriormente germinaron en forma carpogénica.  
 RGM: porcentaje medio de los esclerocios recuperados que posteriormente germinaron en forma miceliar.  
 RPP: porcentaje medio de los esclerocios recuperados que posteriormente mostraron estar parasitados.  
 D: porcentaje medio de los esclerocios desintegrados (no recuperados).  
 En todos los casos, la proporción se expresa en porcentaje sobre el número de esclerocios enterrados al comienzo del ensayo. Las medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí.

rocios desintegrados en las bandejas inoculadas con los dos primeros micoparásitos fue, a los sesenta días, significativamente superior a la que se registró con el otro antagonista.

El efecto del micoparasitismo sobre la capacidad de los esclerocios para germinar produciendo apotecios fue evidente al cabo del primer mes, independientemente de la especie que se considere. A los 60 y 90 días, *T. harzianum*, *T. koningii* y *G. roseum* mantuvieron el efecto inhibidor de la germinación carpogénica, mientras que, en el caso de *C. globosum*, tal efecto no se verificó como en la primera observación ya que los registros obtenidos no mostraron diferencias significativas con el testigo.

Al cabo del primer mes, la proporción de esclerocios que se mostraron parasitados con posterioridad a ser recuperados de las bandejas fue elevada en aquellas bandejas inoculadas con *T. harzianum*, *T. koningii* y *G. roseum* y mostró diferencias significativas con el testigo y el tratamiento con *C. globosum*. En las dos observaciones posteriores, la proporción de esclerocios parasitados en los tratamientos con los tres primeros micoparásitos no registró diferencias significativas con el testigo y *C. globosum*, excepto *T. koningii* al segundo mes. Esto no debe ser interpretado como una incapacidad de *G. roseum* y ambas especies de *Trichoderma* para parasitar los esclerocios sino que, por el contrario, la colonización de los mismos fue tan pronunciada que la mayoría resultaron desintegrados, por lo cual no pudieron ser recuperados para comprobar la presencia de los antagonistas sobre los mismos.

## DISCUSIÓN

Los ensayos realizados en el invernadero revelaron que *G. roseum* y *T. harzianum* destruyen con eficacia los esclerocios de *S. sclerotiorum* e impiden la germinación carpogénica de los mismos. Estos resultados corroboran los obtenidos por Phillips [17], quien demostró que *T. harzianum* y *G. roseum* inhiben la germinación carpogénica de *S. sclerotiorum*. El mismo autor observó que, si bien el efecto de *G. roseum* sobre la germinación carpogénica fue menor, esta especie junto con *G. virens*, son fuertemente antagonistas de *S. sclerotiorum*, destruyendo sus esclerocios.

La capacidad para producir esclerocios secundarios en el suelo [2,21] fue también observada en este estudio. La formación de esclerocios secundarios tiene importancia ecológica, debido a que asegura la persistencia del inóculo en el suelo. Los ensayos en invernáculo revelaron que la producción de esclerocios secundarios resultó reducida por la presencia de hiperparásitos (Tabla 1), lo que concuerda con los resultados obtenidos por Huang [10].

Es interesante destacar que, después de tres meses, los esclerocios parasitados por *G. roseum* estaban comple-

tamente destruídos. Por esta razón, mediante la técnica de tamizado se aisló un solo esclerocio de las bandejas tratadas con este antagonista. Probablemente sólo los esclerocios parasitados con antagonistas poco agresivos (como por ejemplo: *T. koningii* y *T. harzianum*) podrían permanecer en el suelo durante períodos largos, mientras que aquellos infectados por hiperparásitos muy agresivos desaparecerían rápidamente. Esto fue observado por Phillips [17]. Este autor observó que cuando el suelo fué inoculado con *C. minitans*, al cabo de seis meses los esclerocios estaban totalmente destruídos.

En el caso de *C. globosum*, la inhibición de la germinación carpogénica, que se produjo sólo al mes de incubación en el suelo, y el bajo porcentaje de esclerocios parasitados o destruídos registrados durante ese período, hacen suponer que este antagonista podría producir alguna sustancia antifúngica [3], y que la concentración de la misma disminuye al aumentar el tiempo de incubación en el suelo. Según Dennis & Webster [4], sólo las hifas jóvenes de los hongos son capaces de producir sustancias antibióticas. En este ensayo, el substrato colonizado por *C. globosum* fue limitado (250gr de suelo) por lo que, probablemente, este hongo después de un mes de incubación haya disminuído su crecimiento y, como consecuencia, la producción de la sustancia antifúngica.

Los cuatro micoparásitos ensayados presentan algún tipo de actividad antagonista sobre *S. sclerotiorum*. Sin embargo, pueden señalarse diferencias marcadas entre el comportamiento de *C. globosum* y los otros tres antagonistas.

El comportamiento de *C. globosum* es apropiado sólo a corto plazo, mientras que el de *Trichoderma* spp. y *G. roseum* es persistente en el tiempo. Esto se debe a que *T. koningii*, *T. harzianum* y *G. roseum* provocan la lisis del esclerocio y no sólo su inhibición temporal. Estas observaciones permiten concluir que *Trichoderma* spp. y *G. roseum* son agentes apropiados para el control biológico de *S. sclerotiorum*.

## Bibliografía

1. Abawi G, Grogan R. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 1979;69:899-903.
2. Cook G, Steadman Y, Boosalis M. Survival of *Whetzelinia sclerotiorum* and initial infection of dry edible beans in Western Nebraska. *Phytopathology* 1975;65:250-255.
3. Cullen D, Andrews J. Evidence for the role of antibiosis in the organism of *Chaetomium globosum* to the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Can J Botany* 1994;62:1819-1823.
4. Dennis C, Webster J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* 1: Production of non-volatile antibiotics. *Trans Br Mycol Soc* 1971;57:41-48.
5. Ghaffar A. Some observations on the parasitism of *Coniothyrium minitans* on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pak J Bot* 1972;4:85-87.
6. Heller W, Theiler-hedtrich R. Antagonisms of *Chaetomium globosum*, *Gliocladium virens* and *Trichoderma viride* to four soil-borne *Phytophthora* species. *J Phytopathol* 1994;141:390-394.
7. Hoes J, Huang H. *Sclerotinia sclerotiorum*: viability and separation of sclerotia from soil. *Phytopathology* 1975;65:1431-1432.
8. Huang H. Control of *Sclerotinia* wilt of sunflower by hyperparasites. *Can J Plant Pathol* 1980;2:26-32.
9. Huang H. Importance of *Coniothyrium minitans* in survival of *Sclerotinia sclerotiorum* wilted sunflowers. *Can J Botany* 1977;55:289-295.
10. Huang H. *Gliocladium catenulatum*: hyperparasite of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium* species. *Can J Botany* 1978;56:2243-2246.
11. Knudsen G, Eschen D. Potential for biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* through colonization of sclerotia by *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis* 1991;75:466-469.
12. Lee Y, Wu W. Chemical and biological controls of sunflowers *Sclerotinia* diseases. *Plant Prot Bull (Taiwan)* 1989;28:101-109.
13. Martinez G, Ivancovich A, Botta G. Pérdidas ocasionadas por *Sclerotinia sclerotiorum*. Lib. de Bary en el Partido de Pergamino (Bs. As. Argentina), durante tres ciclos de cultivo de soja. En: Resúmenes III Seminario Nacional de Pesquisa de Soja. EMBRAPA, Londrina, Brasil, 1984:138.
14. Mc Credie T, Silvasithamparam K. Fungi mycoparasitic on sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in some Western Australian soils. *Trans Br Mycol Soc* 1985;84:736-739.
15. Mónaco C. Evaluación de la eficiencia de micoparásitos sobre esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* "in vitro". *Revista de la Facultad de Agronomía* 1989;65:67-73.
16. Nakashima N, Moromizato Z, Matosuyama N. *Chaetomium* sp., antagonistic microorganisms to phytopathogenic fungi. *Journal of Faculty of Agronomy, Kyushu University* 1991;36:109-115.
17. Phillips A. Fungi associated with sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in South Africa and their effects on the pathogen. *Phytophylactica* 1989;21:135-139.
18. Sandays-Winsch D, Whipps J, Fenlon S, Lynch J. The validity of *in vitro* screening methods in the search for fungal antagonists of *Sclerotinia sclerotiorum* causing wilt of sunflowers. *Biological Science and Technology* 1994;4:269-277.
19. Trutman P, Keane P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* on plant tissue segments by the hyperparasite *Coniothyrium minitans*. *Trans Br Mycol Soc* 1982;78:521-529.
20. Turner G, Tribe H. On *Coniothyrium minitans* and its parasitism of *Sclerotinia* species. *Trans Br Mycol Soc* 1976;66:97-105.
21. Williams G, Western J. The biology of *Sclerotinia trifoliorum* Eribbs and other species of sclerotium forming fungi II. The survival of sclerotia in soil. *Ann Appl Biol* 1965;56:261-268.