

SENSIBILIDAD IN VITRO DE CEPAS DE *Trichoderma* AISLADAS DE SEMILLAS DE SOJA FRENTE AL FUNGICIDA MAXIM® XL

(*In vitro* sensitivity to Maxim® XL fungicide in strains of *Trichoderma*
isolated from soybean seeds)

Estela Durán, Marta Yasem de Romero,
Eduardo Romero & Juan Ramallo.

Cátedra de Fitopatología. Facultad de Agronomía y Zootecnia.
Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina. *Corresponding author.
Mailing address: Cátedra de Fitopatología. Facultad de Agronomía y
Zootecnia. Universidad Nacional de Tucumán. Avenida Roca 1900. (4000)
Tucumán. Argentina. Tel: 54 381 4330057. Fax: 54 381 4248025
E-mail: esteladuran2003@yahoo.com.ar

Palabras clave: *Trichoderma*, semillas, soja, Maxim® XL
Key words: *Trichoderma*, seeds, soybean, Maxim® XL

RESUMEN

La utilización combinada de fungicidas a bajas dosis y cepas de *Trichoderma* tolerantes a los agroquímicos sería una estrategia aplicable para el manejo integrado del cultivo de soja. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la sensibilidad in vitro de 3 cepas de *Trichoderma* aisladas de semillas de soja, frente a curasemilla Fludioxonil 2.5% + Metalaxil-M 1% (Maxim® XL). Se ensayaron 8 concentraciones de los ingredientes activos Fludioxonil 2.5% y Metalaxil-M 1% entre los rangos 10^{-5} a 10^2 µg/mL y 4.10^{-6} a 40 µg/mL, respectivamente. El fungicida se agregó al medio Agar Papa Glucosa 2% fundido, sembrándose un disco de agar con micelio en crecimiento activo en el centro de las placas de Petri. Se efectuaron mediciones del diámetro de las colonias cada 24 horas en 4 oportunidades. La concentración efectiva capaz de inhibir el crecimiento micelial en un 50% (CE_{50}) fue calculada mediante la función de regresión de los valores de inhibición micelial en respuesta a las diferentes concentraciones expresadas logarítmicamente. Las cepas ensayadas fueron altamente sensibles al curasemilla estudiado, con valores de CE_{50} que variaron entre 8.10^{-5} y 1.10^{-2} µg/mL, los que resultaron muy inferiores a la dosis agronómica del fungicida recomendada. Estos resultados indican que no sería compatible el uso conjunto del fungicida estudiado con los aislamientos de *Trichoderma* evaluados.

Recibido el 15 de Enero 2007
Aceptado el 2 de Abril 2007

ABSTRACT

The combined use of low fungicide doses and *Trichoderma* strains that are resistant to agrochemical products would constitute a viable strategy for integrated soybean cultivation management.

The aim of this work was to evaluate in vitro sensitivity to Fludioxonil 2.5% + Metalaxil-M 1% (Maxim® XL) in 3 strains of *Trichoderma* isolated from soybean seeds.

Eight concentrations of the active ingredient Fludioxonil 2.5% and Metalaxil-M 1% were tested, with a range of 10^{-5} to 10^2 µg/mL and 4.10^{-6} to 40 µg/mL, respectively. The fungicide was added to melted 2% Potate Glucose Agar medium, and sowing was carried out at the center of the Petri plates of an agar disk that contained fungus mycelium in active growth. Colony diameters were measured every 24 hours, on four successive occasions.

The concentration capable of inhibiting mycelial growth by 50% (CE_{50}) was calculated by means of the regression function of mycelial inhibition values obtained as response to different concentrations, which were expressed logarithmically. The three strains tested were highly sensitive to the seed treatment studied, with CE_{50} values that varied between 8.10^{-5} and 1.10^{-2} µg/mL, which are inferior to the agronomic dose recommended.

These results indicated that the joint use of the fungicide and the *Trichoderma* isolates evaluated would not be compatible.

INTRODUCCION

La utilización en forma complementaria de bajas dosis de fungicidas y cepas de antagonistas tolerantes a los agroquímicos es una estrategia aplicable en el manejo integrado de los cultivos. Por este motivo, se evaluaron los efectos *in vitro* de diferentes fungicidas sobre la microbiota antagonista de distintos patosistemas (Kay & Stewart, 1994; Resende *et al.*, 2005; Santos & Melo, 1989). Varias especies de *Trichoderma* han sido ampliamente reconocidas como agentes de biocontrol de enfermedades de las plantas, pero su capacidad antagónica no puede generalizarse ya que es variable según la cepa (Bettiol, 1991; Chet & Ibar, 1991). Homechin (1987), había demostrado que concentraciones superiores a 0.1 ppm del fungicida Captan inhibieron el crecimiento micelial de *Trichoderma*. Estos resultados difirieron de los obtenidos por Santos y Melo (1989) que observaron que este hongo presentó tolerancia hasta 1 ppm de Captan. Por otro lado, Rodríguez *et al.* (2006), evaluaron el efecto del Carbendazim sobre el crecimiento de diferentes antagonistas aislados de muestras de suelo de lotes de soja y de otros cultivos, encontrando la mayor tolerancia al agroquímico en cepas de *Talaromyces flavus* y *Clonostachys rosea*.

Por otra parte, Mantecón (2003), al evaluar diferentes fungicidas curasemillas en el control del tizón de la vaina y del tallo (*Diaporthe/Phomopsis*) y «damping-off» (*Fusarium* spp.) en semillas de soja, encontró que Fludioxonil 2.5%+Metalaxil 1% (Maxim® XL) fue el más eficiente en el control de dichas enfermedades. Este producto es un fungicida de amplio espectro, sistémico y de contacto, usado habitualmente en semillas de soja (dosis de uso: 100-200 mL/100 Kg, recomendada por la Guía de Productos Fitosanitarios (2005) de la República Argentina para el control de enfermedades causadas, entre otros, por *Cercospora kikuchii* y especies de *Fusarium*, *Alternaria*, *Phomopsis*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Phytophthora* y *Pythium*.

En ensayos en invernáculo, Resende *et al.* (2004), observaron que el fungicida Maxim no causó efectos tóxicos sobre *Trichoderma* y éste estaba presente en las raíces de las plantas de maíz provenientes de semillas tratadas con dicho agroquímico. Sin embargo, posteriormente Resende *et al.* (2005), verificaron en bioensayos que el micelio de *Trichoderma harzianum* que permaneció en contacto directo con el fungicida Maxim resultó con un menor índice de crecimiento micelial.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la sensibilidad *in vitro* de 3 aislamientos de *Trichoderma* al fungicida Fludioxonil 2,5% + Metalaxil-M 1% (Maxim^R XL), con el propósito de valorar la factibilidad del uso combinado del antagonista con dosis más bajas que las

habitualmente recomendadas para el citado agroquímico, en sistemas de manejo integrado en soja.

MATERIALES Y METODOS

Se evaluaron tres cepas de *Trichoderma* (designadas TA, TB, y TC), aisladas de semillas de soja provenientes de campos comerciales de la provincia de Tucumán, las que fueron seleccionadas por su efectiva acción antagónica *in vitro* (Yasem *et al.*, 2003). Para estudiar la acción inhibitoria del fungicida sobre el crecimiento de las 3 cepas de *Trichoderma*, se ensayaron 8 concentraciones del compuesto comercial Maxim® XL cuyos ingredientes activos son Fludioxonil 2.5% + Metalaxil-M 1%, correspondiendo al primero el rango de concentraciones entre 10⁻⁵ a 10² µg/mL y al segundo entre 4 x 10⁻⁶ a 40 µg/mL. La mayor concentración correspondió a la cincuentava parte de la dosis agronómica recomendada por la Guía de Productos Fitosanitarios (2005) para la República Argentina. A 9 mL de medio Agar Papa Glucosa 2% (APG) a 45-50 °C en tubos de ensayo, fue añadido 1 mL de la suspensión acuosa del producto en concentración diez veces mayor que las arriba mencionadas y fue transferido a placas de Petri de 9 cm de diámetro.

De los 3 cultivos de las cepas de *Trichoderma* en APG de 5 días de desarrollo, se extrajeron con un sacabocado, discos de 6 mm de diámetro que fueron sembrados en el centro de la placa de Petri que contenía APG más el agregado del fungicida en cada una de las diluciones descritas.

Se utilizó un diseño experimental totalmente aleatorizado con seis repeticiones por cada aislamiento (3) y por cada dilución del fungicida (8), con el control correspondiente. El testigo consistió en la siembra de discos de 6 mm de diámetro de cada cepa de *Trichoderma* ensayada en 6 placas con 9 mL de APG más 1 mL de agua destilada estéril. Las placas fueron incubadas a 26 ± 2°C con ciclos de 12 h de luz/oscuridad. Las mediciones de crecimiento micelial fueron realizadas cada 24 horas, en cuatro oportunidades sucesivas, midiendo dos diámetros de la colonia en posición ortogonal de cada placa. El porcentaje de inhibición micelial *in vitro* relativo al testigo de cada cepa de *Trichoderma* para cada dosis y réplica, fue calculado por la siguiente fórmula: $100 \times [(D_{\text{testigo}} - 6) - (D_{\text{tratamiento}} - 6)] / (D_{\text{testigo}} - 6)$. Se determinó, según el método propuesto por Mónaco *et al.* (2001), la regresión lineal $[Y = a + b(\log x)]$ entre el porcentaje de inhibición relativo al testigo (Y: dato no transformado) con el log₁₀ de las concentraciones evaluadas del producto (x), incluyendo 6 réplicas por dosis, aislamiento y evaluación (24, 48, 72 y 96 h). La CE₅₀ para cada caso fue calculada como: $CE_{50} = 10^{(50 - a) / b}$.

Tabla 1. Relación entre la inhibición relativa al testigo del crecimiento de las 3 cepas de *Trichoderma* y la dosis del fungicida Fludioxonil 2.5% + Metalaxil M 1%.

Cepas de <i>Trichoderma</i>	Evaluación (horas)	Ecuación de Regresión	R ²	CE ₅₀ (µg/ml)
Cepa TA	24	Y = 19.04 * log ₁₀ x + 128.03	0.901***	0.00008
	48	Y = 15.25 * log ₁₀ x + 87.25	0.885***	0.00361
	72	Y = 15.95 * log ₁₀ x + 86.07	0.949***	0.00549
	96	Y = 16.29 * log ₁₀ x + 86.11	0,936***	0.00608
Cepa TB	24	Y = 19.88 * log ₁₀ x + 108.08	0.887***	0.00120
	48	Y = 19.22 * log ₁₀ x + 90.01	0.932***	0.00830
	72	Y = 17.73 * log ₁₀ x + 88.00	0.955***	0.00720
	96	Y = 17.75 * log ₁₀ x + 84.22	0.936***	0.01182
Cepa TC	24	Y = 20.11 * log ₁₀ x + 105.16	0.776***	0.00181
	48	Y = 18.43 * log ₁₀ x + 88.88	0.882***	0.00780
	72	Y = 16.88 * log ₁₀ x + 85.86	0.859***	0.00750
	96	Y = 17.65 * log ₁₀ x + 88.89	0.839***	0.00627

*** Significativo al 0.1%.

Y: % de inhibición relativa al testigo X: log₁₀ de las concentraciones del producto (R²): coeficiente de determinación

Se determinó la significación estadística de cada ecuación seleccionada, considerando el coeficiente de determinación (R²).

RESULTADOS Y DISCUSION

La Tabla 1 muestra la relación entre la inhibición del crecimiento relativa al testigo de aislamientos de *Trichoderma* ensayados y la dosis expresadas como log₁₀ del fungicida Fludioxonil 2.5% + Metalaxil M 1%, en cuatro oportunidades de evaluación para las 3 cepas de *Trichoderma*.

En la Figura 1 se observa la inhibición de las colonias desarrolladas sobre APG con diferentes concentraciones del fungicida y la colonia testigo de *Trichoderma*. La Figura 2 muestra las rectas de regresión de las cepas ensayadas para el agroquímico a las 24 y 48 h. de incubación.

El coeficiente de determinación mostró baja variabilidad, no explicada por la regresión lineal, los ajustes fueron confiables y altamente significativos (R² ≥ 0,776) y se obtuvo una buena precisión en la predicción de CE₅₀ de las cepas analizadas.

Las concentraciones crecientes ensayadas se relacionaron casi al 100% de las variaciones del diámetro de crecimiento del hongo observadas (R² ≥ 0,77). Si bien a las 24 h se determinaron valores muy bajos de CE₅₀, TA fue

más sensible que las otras dos cepas (TB y TC), las que fueron similares entre sí. Este comportamiento, aunque menos marcado, se observó también a las 48, 72 y 96 h, y sus respectivas rectas de regresión y los valores de CE₅₀ determinados para cada cepa ensayada (Tabla 1), permitieron establecer claramente la sensibilidad al curasemilla de *Trichoderma* sp. *in vitro*. Los valores de CE₅₀ variaron entre 8.10⁻⁵ y 1.2 10⁻² µg/mL después de las 24, 48, 72 y 96 h de incubación.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo no concuerdan con Resende *et al.* (2004), pero en este caso, probablemente, los fungicidas probados no causaron efecto tóxico en *Trichoderma* por lixiviación del producto en el suelo. Sin embargo, coinciden con los resultados obtenidos por Homechin (1987), Resende *et al.* (2005), y Rodríguez *et al.* (2006), quienes verificaron distintos grados de incompatibilidad de *Trichoderma* en contacto directo con diferentes fungicidas.

En las concentraciones ensayadas, el fungicida curasemillas Fludioxonil 2.5% + Metalaxil M 1% provocó una marcada inhibición del crecimiento micelial de los aislamientos de *Trichoderma* evaluados.

Los valores de CE₅₀ para las cepas analizadas fueron muy inferiores a la dosis agronómica recomendada por el fabricante para la soja, por lo que no sería factible el uso combinado de los mismos en sistemas de manejo integrado en soja.

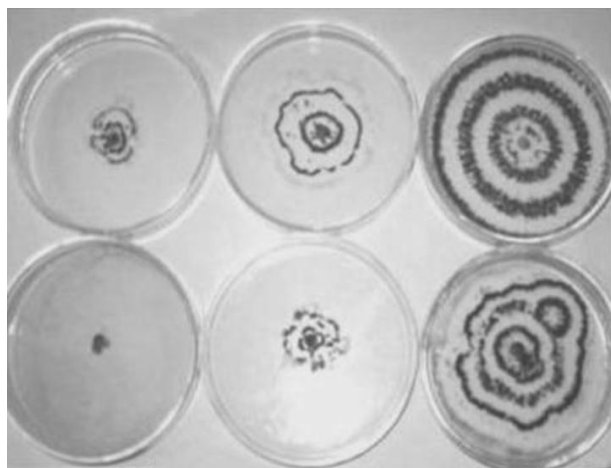


Figura 1. Colonias en APG de *Trichoderma* (cepa TA) con concentraciones decrecientes de Fludioxonil 2.5% + Metalaxil M 1% (de izquierda a derecha), y del testigo, sin agroquímico (ángulo superior derecho), incubadas durante 96 h.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subsidiado por el Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT) Programa No. 26/A333.

REFERENCIAS

Bettiol, W. (1991). Controle biológico de doenças em plantas. Jaguariúna, São Paulo, Brasil, EMBRAPA-CNPMA.

Chet, I. & Ibar, J. (1991). Biological control of fungal pathogens. Applied Biochem. Biotechnol. 48:37-43

Guía de Productos Fitosanitarios (2005). Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes Republica Argentina (CASAFE) 2da. ed. Tomo 2

Homechin, M. (1987). Potencial em emprego de isolados brasileiros de *Trichoderma harzianum* para controle de patógenos de soja (*Glicine max* (L.) Merrill). Tese doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Kay, S.J. & Stewart, A. (1994). The effect of fungicides on fungal antagonists of onion white rot and selection of dicarboximide-resistant biotypes. Plant Pathology 43:863-871

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. <http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/agric/oleag/soja/mantecon2.htm>. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Mónaco, C.; Nico, A.; Rollán, M. & Urrutia, M. (2001). Efecto *in vitro* de dos fungicidas sobre la microfiora antagonista al tizón temprano del tomate. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. 16:325-332

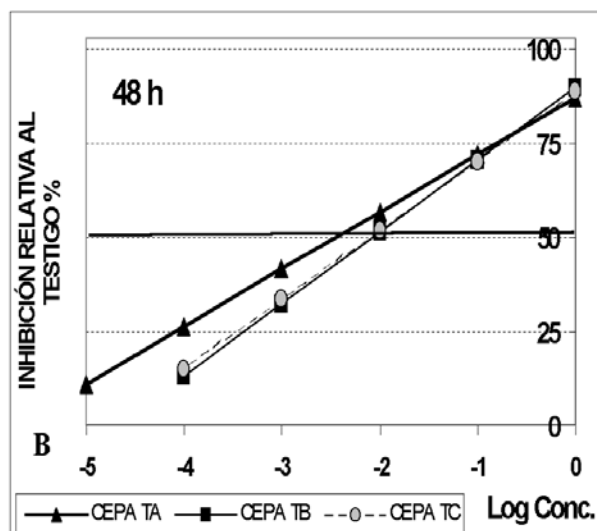


Figura 2. Regresiones determinadas entre el logaritmo de las concentraciones del Fludioxonil 2.5% + Metalaxil M 1% (10^{-5} a 10^2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y $4 \cdot 10^{-6}$ a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente) e inhibición porcentual del crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* en relación al testigo, a las 24 (A) y 48 hs (B) de incubación. Los valores de las concentraciones del fungicida fueron transformados en \log_{10} .

Resende, M.L.; Oliveira, J.A.; Guimarães, R.M.; Von Pinho, R.G.; Vieira, A. R. (2004). Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. Cienc. agrotec. Lavras 28:793-798

Resende, M.L.; Pereira, C.E.; Oliveira, J.A.E. & Guimarães, R. M. (2005). Qualidade de sementes de milho (*Zea mays*) tratadas com fungicida e inoculadas com *Trichoderma harzianum*. Revista Ciencia Agronómica 36: 60-66

Rodríguez, M. A.; Cabrera, G. M. & Godeas, A. M. (2006). Hongos del suelo: potenciales agentes de biocontrol para el manejo de enfermedades en soja. 3° Congreso de Soja del Mercosur. Protección Vegetal 370-373

Santos, T.M. & Melo, I.S. (1989). Resistência de isolados de *Trichoderma* spp. e *Penicillium* spp. a fungicidas *in vitro*. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. En EMBRAPA-CNPMA (Eds.), Boletín de Pesquisa, Jaguariúna, São Paulo, 5:18

Yasem de Romero, M.; Durán, E.L. & Ramallo, J.C. (2003). Determinación preliminar de la actividad antagonista *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium graminearum* aislados de semillas de soja en Tucumán. XX Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán. Tafí del Valle, Tucumán. 229-230