

Control biológico de *Phoma longicolla* Aveskamp, Gruyter y Verkley patógeno de coriandro (*Coriandrum sativum* L.) con *Trichoderma*

María Cristina Sandoval, María Sol Gilardino, Luciano Rafael Casacchia Sassone

Cátedra de Fitopatología. FCA-UNLZ. E-mail: msand@ciudad.com.ar

Introducción

El coriandro (*Coriandrum sativum* L.) es cultivado por sus características nutricionales y por sus propiedades medicinales. Sus semillas son también utilizadas como especias para saborizar los alimentos y como fuente para la extracción de aceites esenciales (Jaramillo *et al.*, 2011). Entre los hongos fitopatógenos que contaminan las semillas de *C. sativum* se destacan *Alternaria alternata*, *A. tenuissima*, *A. dauci*, *Fusarium avenaceum*, *F. equiseti*, y *Colletotrichum gloesporioides*, entre otros (Odstrčilova *et al.*, 2002). En Argentina, del Moro *et al.* (2014) identificaron la asociación entre *Fusarium* sp. y el tizón de las umbelas, que ocasiona semillas deformadas y de menor tamaño. También en relación a hongos que contaminan las semillas, distintos autores indicaron que *Phoma multirostrata* es el agente causal del manchado foliar en coriandro (Golzar *et al.*, 2015), señalando asimismo que el *P. multirostrata* “es tanto un patógeno de semilla como de suelo” (Kare *et al.*, 2017).

En el año 2017, en el curso de una investigación acerca del control biológico de patógenos fúngicos que afectan especies aromáticas medicinales, fue posible identificar en el laboratorio de fitopatología (FCA-UNLZ) la asociación entre la contaminación con *P. longicolla* y semillas de coriandro de menor tamaño, manchadas y de reducido poder germinativo. Motivo por el cual se iniciaron pruebas de control biológico utilizando una cepa de *Trichoderma harzianum*.

T. harzianum ha sido utilizado para el control de hongos patógenos que infestan y/o infectan semillas de coriandro, como por ejemplo: *Alternaria alternata* (Sandoval *et al.*, 2006), *Fusarium oxysporum* f. sp. *coriandri* (Jat *et al.*, 2017), y *Protomyces macrosporus* (Kahn y Parveen, 2018), entre otros.

A partir de estos antecedentes se realizó el presente trabajo con el objetivo de obtener información preliminar sobre la factibilidad de aplicación de control biológico, como

estrategia alternativa de manejo del problema de la contaminación con *P. longicolla*. Cabe indicar que *T. harzianum* aún no ha sido probado para el control de este patógeno en semillas de coriandro. En virtud de la naturaleza del estudio, la selección de los indicadores de efectividad del antagonista estuvo dirigida a la medición de los efectos del mismo sobre variables relacionadas con la calidad de semilla (Pereira *et al.*, 2005).

Materiales y Métodos

Patógeno: Se utilizó un aislamiento de *P. longicolla* obtenido en el año 2017 (cepario de Fitopatología FCA-UNLZ) a partir de semillas de coriandro contaminadas (Figura 1 A-B). *P. longicolla* fue cultivado en frascos sobre agar papa glucosado (APG) al 2% y en caldo de papa glucosado (CPG) al 2% para la obtención del inóculo para las pruebas de campo.

Antagonista: Se utilizó una cepa de *T. harzianum* aislada de muestras de suelo de cultivo de especies aromáticas medicinales mantenida en APG. Para las pruebas el hongo fue multiplicado en frascos de 500 mL de medio CPG (pH 6,8), 7 días a 24° C. Durante el período de incubación los frascos fueron colocados en la bandeja de un agitador mecánico.

Pruebas de efectividad del antagonista: Las semillas de coriandro fueron sembradas en surcos de 3 m de longitud y a una distancia de 0,35 m entre surcos. El diseño del ensayo (con tres repeticiones) correspondió a un arreglo en bloques al azar. Previo a la siembra, las semillas recibieron un tratamiento de desinfección con hipoclorito de Na al 2% (durante 5 minutos) y enjuagadas tres veces con agua destilada estéril. Los tratamientos aplicados, luego de la desinfección, consistieron en: i) Inoculación con un cultivo líquido (CPG al 2%) del patógeno (concentración 2×10^8 conidios/mL, determinada mediante hematocímetro); ii) Inoculación con un cultivo líquido del antagonista (concentración 2×10^8 conidios/mL); iii) Inoculación con la mezcla (1/1) del patógeno y del antagonista; y iv) Testigo sin tratar. El tiempo de contacto entre las semillas y los cultivos líquidos fue de 5 h. Para eliminar el exceso de humedad de estas semillas se colocaron entre papeles de filtro estériles durante la noche. El número de semillas por cada tratamiento fue de 750 (250/repeticiones), acorde con la densidad de siembra aconsejada para el cultivo (20–40 kg/ha). Las variables medidas fueron: número total de plantas en la emergencia (a los 21 y 42 días), peso de 1000 granos, % de contaminación por *P. longicolla* y calidad fisiológica de granos cosechados (% de germinación).

La muestra destinada a la determinación del nivel de contaminación con *P. longicolla* y de la calidad fisiológica fue obtenida mediante la cosecha (por separado) de granos provenientes de los distintos tratamientos. El tamaño de cada muestra fue de 400 granos/tratamiento. La misma fue dividida en dos submuestras (200 granos), destinadas a la siembra de: 1) Ocho placas Petri (25 granos/placa), sustrato papel de filtro humedecido con 5 mL de agua destilada estéril. Una vez sembradas las placas fueron sometidas a un pre enfriamiento a 5°C durante una semana y colocadas en estufa a 24° C durante 21 días (de acuerdo a las normas ISTA para coriandro). Las observaciones realizadas durante esta incubación permitieron determinar: el número de semillas germinadas y contaminadas con *P. longicolla*; y 2) Ocho placas Petri (25 granos/placa), medio APG-prueba de sanidad - incubadas durante 8 días a 24°C. A partir del noveno día se observó por separado cada grano para determinar la presencia/ausencia de *P. longicolla*.

La incidencia se calculó aplicando la fórmula: $I = \frac{\text{Número de semillas contaminadas con } P. longicolla}{\text{Número total de semillas examinadas}} \times 100$. El número de repeticiones fue ocho. Los datos fueron analizados mediante el análisis de la varianza, seguido de la prueba de comparación de medias de Tukey, con un nivel de significación del con un nivel de significación del 5% utilizando el programa InfoStat.

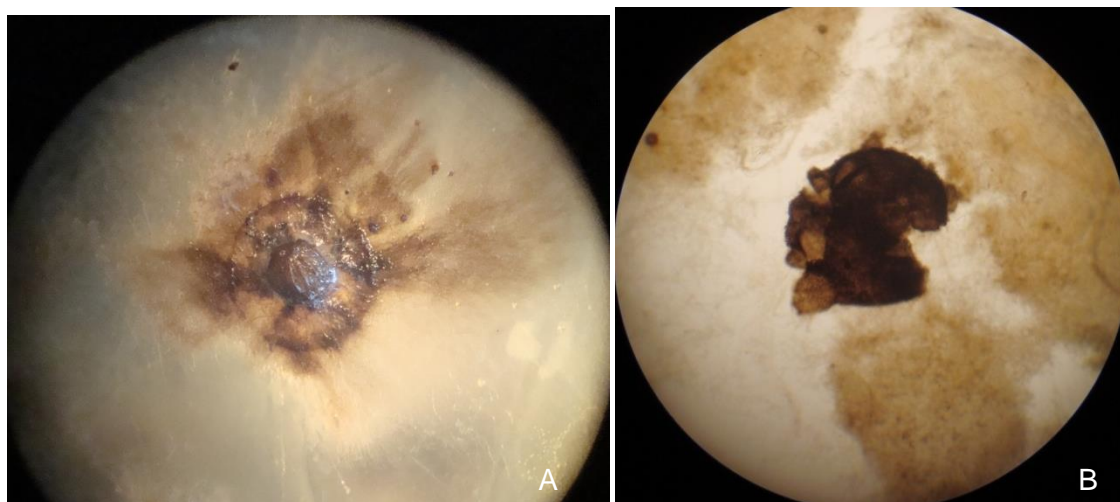


Figura 1. Semilla de coriandro infectada con *P. longicolla* (2,5X) (A). Conidioma de *P. longicolla*(20X) (B)

Resultados y Discusión

El número de plantas emergidas a los 21 días se ubicó en un rango de 100% (semillas inoculadas con el antagonista) a 79,2% (semillas inoculadas con *P. longicolla*). Mientras que, el rango de recuento a los 42 días fue de 100% (semillas inoculadas con el antagonista) a 80% (*P. longicolla*). Estos valores mostraron que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el promedio de plantas emergidas (a los 21 y 42 días) provenientes de semillas inoculadas con el patógeno y el resto de los tratamientos (Tabla 1). Idéntica situación se observó para el peso de mil granos.

Si bien, el mayor número de plantas emergidas (a los 21 y 41 días) provenientes de semillas tratadas con *T. harzianum* en forma individual no resultó estadísticamente significativo en comparación con el tratamiento dual (*T. harzianum* + *P. longicolla*) y el testigo, este resultado muestra que la cepa de *Trichoderma* utilizada promovería el crecimiento y desarrollo de las plantas de coriandro. Este efecto benéfico de distintas especies de *Trichoderma* ha sido demostrado en otros cultivos (Camargo y Ávila, 2014). Iguales consideraciones valen para las diferencias observadas en el peso de 1000 granos. En relación al mismo, la aplicación de *T. harzianum* (individual y combinado) favoreció que el peso de 1000 granos se ubicara en valores cercanos a lo establecido para coriandro (9,033) (Muñoz, 2002), en comparación a los valores observados para el testigo (Tabla 1).

Tabla 1. Promedio de plantas emergidas y peso de 1000 granos en relación a los tratamientos efectuados a las semillas

INVESTIGACION

Sandoval *et al.*

Control biológico [...]

Tratamiento	Nro. total de plantas Media \pm DS *		Peso de 1000 granos Media \pm DS*
	21 días	42 días	En la cosecha
<i>T. harzianum</i>	243,00 \pm 5,85 a	244,66 \pm 5,03 a	9,06 \pm 0,31 a
<i>T. harzianum</i> + <i>P. longicolla</i>	238,00 \pm 2 a	239,66 \pm 2,08 a	9,02 \pm 0,06 a
<i>P. longicolla</i>	204,33 \pm 6,02 b	205,33 \pm 5,50 b	7,75 \pm 0,20 b
Testigo	235,66 \pm 13 a	236,33 \pm 13,42 a	8,53 \pm 0,21 a
	CV= 7,55%	CV= 7,51%	CV= 6,74

Media seguida de letras iguales no difieren significativamente ($p < 0.05$).

En cuanto a los resultados obtenidos en la prueba de germinación, el análisis de los mismos mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas, en valores promedio de germinación (Tabla 2), entre las semillas cosechadas de plantas desarrolladas de granos inoculados con *P. longicolla* en comparación con el resto de los tratamientos y el testigo. El aumento de la germinación en relación a cada tratamiento y en comparación con los valores observados en las semillas cosechadas de plantas desarrolladas de granos inoculados con *P. longicolla* fue de 43,34 % (*T. harzianum*) y de 45,76% (*T. harzianum* + *P. longicolla*). Estos resultados fueron muy similares a los observados en el testigo, motivo por el cual puede inferirse que el tratamiento con *T. harzianum* iguala los valores de germinación de semillas sanas (Muñoz, 2002). En virtud del material evaluado (cosecha de granos provenientes de plantas desarrolladas de plantas inoculadas), el aumento de la germinación se debería al efecto del antagonista sobre las semillas contaminadas e infectadas (en forma endófitas) con el patógeno. *T. harzianum* afectaría el desarrollo de las estructuras de *P. longicolla* ubicadas en la superficie y en tejidos internos (Shing y Arthur, 2004; Shing *et al.* 2013)

En relación a los valores de incidencia, se observó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores promedio de incidencia de las semillas cosechadas de granos inoculados con el patógeno en comparación con el resto de los tratamientos y el testigo (Tabla 2). La disminución de la incidencia fue de 76,8% (*T. harzianum*) y de 63,53% (*T. harzianum* + *P. longicolla*) en comparación con la observada para *P. longicolla*. Estos resultados permiten inferir la existencia de un nivel de antagonismo de la cepa de *T. harzianum* evaluada sobre la contaminación de las semillas con el patógeno. La semilla es uno de los mecanismos de dispersión de *P. longicolla* (Kare *et al.*, 2017), sin embargo la determinación exacta del efecto de *Trichoderma* sobre la contaminación y/o la infección con el patógeno requiere de nuevos estudios.

Tabla 2. Promedio del número de semillas germinadas y promedio de la incidencia de *P. longicolla*

Tratamiento	Nro. total de semillas germinadas Media \pm DS*	Incidencia Media \pm DS*
<i>T. harzianum</i>	22,34 \pm 2,08 a	14 \pm 5,5 a
<i>T. harzianum</i> + <i>P. longicolla</i>	23,34 \pm 1,52 a	22,66 \pm 8,02 a
<i>P. longicolla</i>	12,66 \pm 3,05 b	60,32 \pm 31,65 b
Testigo	22,68 \pm 1,15 a	17,66 \pm 2,52 a
	CV= 24,24 %	CV= 83,5%

Media seguida de letras iguales no difieren significativamente ($p < 0.05$).

Conclusiones

INVESTIGACION

Sandoval *et al.*

Control biológico [...]

La inoculación de las semillas de coriandro con *T. harzianum* produjo un aumento en la emergencia y el número de semillas germinadas. Este último componente de calidad fisiológica es afectado por *P. longicolla*. También disminuyó la incidencia de contaminación con *P. longicolla* en los granos cosechados de plantas desarrolladas a partir de semillas tratadas con *T. harzianum* y *T. harzianum* + *P. longicolla*. Por consiguiente, la información obtenida valida la aplicación del control biológico como una estrategia de manejo de *P. longicolla* en semillas de coriandro.

Bibliografía

Camargo-Cepeda, D. V, Ávila, E. R. 2014. Efectos de *Trichoderma* sp sobre el crecimiento y desarrollo de la arveja (*Pisum sativum* L.). *Ciencia y Agricultura* 11(1): 91-100.

del Moro, S, Gaetán, S, Galotta, M, Paunero, I. 2014. Ocurrencia de enfermedades en dos aromáticas extensivas: coriandro y mostaza blanca. Libro de Resúmenes del 3º Congreso Argentino de Fitopatología.p. 242.

Golzar, H, Lanoiselet, V, Wang, C, Tan, Y. P.m Shivas, R. G. 2015. First report of *Phoma multirostrata* in Australia. *Australasian Plant Dis. Notes.* 10(8): DOI 10.1007/s13314-015-0161-6

Jaramillo, B. E, Duarte, E, Martelo, I. 2011. Composición química volátil del aceite esencial de *Eryngium foetidum* L. colombiano y determinación de su actividad antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 16(2): 140-150

Jat, M. K, Ahir, R. R, Choudhary, S, Kakraliya, G. L. 2017. Management of coriander wilt using biocontrol agents. *International Journal of Chemical Studies.* 5(2): 523-525.

Khan, M. R, Parveen, G. 2018. Supplementing biocontrol agents whit botanical improved growth and yield coriander (*Coriander sativum* L) infected with *Protomyces macrospores* Unger. *Current Plant Biology.* Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2018.10.00>

Muñoz, F. 2002. *Plantas Medicinales. Estudio cultivo y procesado.* Madrid: Editorial Mundi Prensa. 4ta. Reimpresión. 365 pag.

Odstrčilova, L, Ondřej, M, Kocourková, B, Ružičková, G. 2002. Monitoring of incidence and determination of fungi on caraway, fennel, coriander and anise, consideration of disease importance and possibility of chemical protection. *Plant Protection Science.* 38(2): 340-343

Pereira, R.S, Muniz, M.F.B, Nascimento, W.M. 2005. Aspectos relacionados à qualidade de sementes de coentro. *Hortic. Bras.* 23(3):703-706.

INVESTIGACION

Sandoval *et al.*

Control biológico [...]

Sandoval, M. C, Fállico, L. M, Noelting, M. C, Corcuera, V. R, Cid, P, Raggio, G. 2006. Estrategia de control de *Alternaria alternata* Keissler patógeno de *Coriandrum sativum* L. con *Trichoderma harzianum* Rifai. Rev. Protección Veg. 21(1): 31-36.

Shing, B, Mathur, S. b. 2004. Histopathology of seed borne infections. CRC Press: Washington.

Shing, B, Gitansh, Bhadauria, S. 2013. Prevalence of seeds mycoflora from different seeds of spices under field and storage conditions of Agra region. Asian Journal of Plant Science and Research. 3(2): 93-98