

## **EFFECTO DE LA ADICIÓN DE ENMIENDAS ORGÁNICAS AL SUELO SOBRE LA CAPACIDAD PATOGENICA DE *RHIZOCTONIA SOLANI*: TEST DE PATOGENICIDAD Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE METABOLITOS VOLÁTILES Y DIFUSIBLES**

NICO, A.I.<sup>1</sup>, MÓNACO, C.I.<sup>2,3</sup>, DAL BELLO, G.<sup>2,3</sup> y ALIPPI, H.<sup>2</sup>

### **RESUMEN**

Se evaluó en el presente trabajo el efecto del agregado al suelo de enmiendas orgánicas sobre la capacidad patogénica de *Rhizoctonia solani* en plántulas de poroto chaucha y el papel potencial de metabolitos volátiles y difusibles en el proceso de supresión de la enfermedad. Fueron aplicadas tres diferentes enmiendas: alfalfa enfardada (2,5 y 5 % P/P), harina de pescado (1 y 2 % P/P) y compost de champiñon (2,5 y 5 % P/P). Dos tratamientos, la enmienda de alfalfa al 5 % P/P y la enmienda de harina de pescado al 2 % P/P, resultaron en una reducción significativa de la incidencia y la severidad de la enfermedad. La fitotoxicidad debida

---

<sup>1</sup> Curso de Horticultura, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Calle 60 y 119, 1900 La Plata

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP calle 60 y 119, La Plata

<sup>3</sup> Comisión de Investigaciones Científicas. Provincia de Buenos Aires

a las enmiendas sólo resultó relevante al agregar harina de pescado al 2 %. El ascenso de pH y la liberación de amonio permitirían explicar el efecto de las dos enmiendas supresivas dada la baja relación C/N de ambas.

**Palabras clave:** *Rhizoctonia solani*, *Phaseolus vulgaris*, patógenos de suelo, control cultural, enmiendas de suelo.

## ABSTRACT

### ORGANIC AMENDMENT EFFECT ON PATHOGENIC ABILITY OF *RHIZOCTONIA SOLANI*: PATHOGENICITY TEST AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF VOLATILE AND DIFFUSIBLE METABOLITES

Soil amendment effect over pathogenic ability of *Rhizoctonia solani* on green bean, was assessed in the current work. Potential role of diffusible and volatile metabolites in the suppression process was also evaluated. Three different amendments were evaluated: hayed alfalfa (2,5 and 5 % w/w), fish powder (1 and 2 % w/w) and spent mushroom compost (2,5 and 5 % w/w). Two treatments, soil amendment with alfalfa hay 5 % W/W and soil amendment with fish powder 2 % W/W, resulted in a significant reduction of disease incidence and severity. Phytotoxicity attributable to soil amendment was only relevant with fish powder at 2 % w/w. Increase in pH and ammonia release may accomplish for suppressiveness in both amendments because of their low C/N ratio.

**Key words:** *Rhizoctonia solani*, *Phaseolus vulgaris*, soilborne pathogens, cultural control, soil amendments

## INTRODUCCIÓN

*Rhizoctonia solani* Kühn es un hongo polífago que afecta a un elevado número de especies cultivadas. En Argentina está cita-

do afectando especies hortícolas de diversas familias (Marchionatto, 1944; Mittidieri, 1973; Mitidieri, 1994; Carranza, 1979). Si bien puede atacar órganos aéreos es más frecuente de observar en la zona del cuello donde provoca lesiones necróticas que pueden llevar a la muerte de las plantas (Rodríguez Rodríguez *et al.*, 1989; Blancard, 1990; Blancard *et al.*, 1990). Se asocia con otros hongos conformando el complejo damping-off tanto en pre como postemergencia.

La obtención de variedades resistentes al patógeno resulta extremadamente difícil en *R. solani*, dada la naturaleza no selectiva de su parasitismo (Leach y Garber, 1970). Por este motivo el control químico, ya sea a través de la desinfección total del suelo previa a la siembra o transplante y el empleo de fungicidas específicos aplicados al suelo o a la base de la planta, continúa siendo el método más empleado en el control de enfermedades causadas por este patógeno. Los distintos inconvenientes asociados al control químico (toxicidad, efectos deletéreos sobre el medio ambiente, incremento en las restricciones legales al empleo, etc.) han determinado la necesidad de estudiar la adopción de técnicas menos agresivas para el medio ambiente. Es así como se han estudiado métodos físicos como el calentamiento artificial (Leach y Garber, 1970) y la solarización del suelo (Fleet, 1985). También han mostrado ser eficaces métodos biológicos basados en la introducción de antagonistas en condiciones experimentales, tal como comprobaron Elad *et al.* (1982) al inocular semillas de algodón con *Trichoderma harzianum*.

Por otra parte es interesante señalar el empleo de enmiendas orgánicas como una práctica cultural adoptada por los horticultores para el mejoramiento de las propiedades físicas y químicas del suelo que, de acuerdo con Nico (2002), puede contribuir al control de enfermedades provocadas por hongos de suelo. El efecto supresivo de algunas enmiendas orgánicas sobre determinados hongos patógenos de suelo ha sido atribuido a diferentes causas entre las que se mencionan la liberación de metabolitos de acción

inhibitoria sobre el patógeno (Tsao y Oster, 1981; Lewis y Papavizas, 1974) y la ocurrencia de fenómenos de antagonismo encuadrables dentro del control biológico (Baker y Cook, 1974). Los objetivos del presente trabajo son: 1) determinar los efectos de enmiendas orgánicas sobre la capacidad patogénica de *R. solani*, en poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) 2) evaluar su posible efecto fitotóxico y 3) identificar la presencia de factores químicos y biológicos en el eventual fenómeno de supresividad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### A) Inóculo utilizado

En todos los ensayos se empleó una cepa de *R. solani* perteneciente al grupo de anastomosis AG-4, subgrupo HG-II aislada de plantas de *Aster* sp. de probada capacidad patogénica sobre *P. vulgaris* L.

Para la obtención del inóculo, se colocó un fragmento de cultivo de *R. solani* en desarrollo activo sobre agar de papa glucosado (APG) al 2 % sobre grano de trigo hervido colocado en botellas esterilizadas. Las botellas se mantuvieron en estufa a 25 °C durante 1 mes, se secó al aire el grano colonizado y posteriormente fue molido. El inóculo obtenido se conservó en una bolsa plástica a 4 °C

### B) Preparación de los sustratos

Para las pruebas de patogenicidad y fitotoxicidad se prepararon distintos sustratos: suelo sin agregado de enmienda (T), suelo sin inocular más alfalfa enfardada 2,5 % P/P (aa 2,5), suelo sin inocular más alfalfa enfardada 5 % P/P (aa 5), suelo sin inocular más harina de pescado 1 % P/P (HP 1), suelo sin inocular más harina de pescado 2 % P/P (HP2), suelo sin inocular más compost residual de champiñón 2,5 % P/P (CCh 2,5) y suelo sin inocular más compost residual de champiñón 5 % P/P (CCh 2,5).

Para el cálculo de las proporciones se tomó como referencia el peso seco tanto del suelo como de las enmiendas. El suelo correspondió a un horizonte superficial (Ap) de un Argiudol típico de la Serie Centeno (textura franco limosa, % M.O. = 3, 8 y pH = 6). La alfalfa empleada como enmienda provenía de fardos comerciales y previo a su incorporación se cortó en trozos < 5 cm. La harina de pescado empleada fue el material comercializado como cebo en casas de pesca deportiva («carnarina») y procedía de Mar del Plata. El compost residual de champiñón, que contenía residuos miceliares del hongo cultivado, fue obtenido de un establecimiento de fungicultura comercial y en la elaboración del mismo se había usado cama de establos de paja de trigo, según el procedimiento habitual de compostaje (Toovey, 1976).

Con cada uno de los sustratos se realizó un tratamiento inoculado y su correspondiente control sin inocular. En los tratamientos correspondientes, la incorporación del patógeno se efectuó aportando inóculo al 1% P/P sobre base de suelo seco. Las mezclas correspondientes a cada tratamiento se colocaron a razón de aproximadamente dos kilos en bolsas plásticas contenidas dentro de macetas de polietileno negro de cuatro litros y medio previo ajuste de la humedad a 25% P/P. Cada maceta se cubrió con una bolsa plástica opaca blanca a efectos de mantener una alta humedad relativa por encima de las muestras. Las mezclas se mantuvieron en un invernáculo provisto de una cobertura de media sombra durante aproximadamente un mes (del 21/12/'96 al 25/1/'97). La humedad se controló por gravimetría y se repuso con intervalos de 10 días. Sobre una muestra de 50 gramos extraída a los 15 días de haber efectuado las mezclas se realizaron las siguientes determinaciones: pH (método potenciométrico en dilución 1:2,5), carbono orgánico (micro método de determinación por vía húmeda), nitrógeno total (microkjeldahl) y relación C/N. Estos análisis se efectuaron sobre una porción de cada una de las enmiendas utilizadas siguiendo las normas del PROMAR (Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo, 1989).

### **C) Pruebas de patogenicidad y fitotoxicidad**

Al cabo del mes se colocaron 400 g de cada mezcla correspondiente a los tratamientos en bandejas plásticas de 16 x 12,5 x 4,5 cm, disponiéndose cuatro repeticiones en cada caso en un diseño en bloques completamente aleatorizados. En cada una de las bandejas se sembraron 10 semillas pregerminadas de poroto chaucha variedad Contrancha de enrame, desinfestadas con una solución de hipoclorito de sodio al 5 % durante 30 minutos. Las bandejas sembradas se mantuvieron durante siete días bajo el mismo invernáculo en el que se habían dispuesto las macetas con las mezclas. Al cabo de ese lapso las plántulas se descalzaron y se efectuaron las siguientes determinaciones: incidencia de la enfermedad, severidad, longitud del hipocótilo y peso fresco de la parte aérea. A fin de verificar si las lesiones observadas se debían al patógeno inoculado se efectuaron aislamientos a partir de tejido afectado previa desinfección superficial con alcohol 70% y bicloruro de mercurio al 0,1 %.

La incidencia (%) correspondiente a cada unidad muestral se calculó según:

$$I \text{ (incidencia)} = (\text{número de plantas sintomáticas} / \text{número de plantas totales}) \times 100$$

Para el registro de severidad de cada unidad muestral se utilizó la siguiente escala basada en la magnitud de la necrosis observada en la zona del cuello:

0: planta sana

1: Lesiones necróticas que no superan el 20 % de la circunferencia del cuello.

2: Lesiones necróticas que ocupan entre el 20 y el 50% de la circunferencia del cuello.

3: Lesiones necróticas que ocupan entre el 50 y el 80% de la circunferencia del cuello.

4: Lesiones necróticas que ocupan más del 80% de la circunferencia del cuello.

5: La zona necrosada ocupa la totalidad de la zona del cuello. Planta muerta o que se desprende con facilidad.

Se consideró como longitud del hipocótilo la distancia entre el nudo cotiledonar y la inserción de la primera raíz secundaria. Los valores de longitud de hipocótilo, peso fresco y severidad correspondientes a cada unidad muestral estuvieron constituidos por el valor medio de las diez plantas localizadas en cada bandeja.

A efectos de evaluar la influencia sobre la reducción de la enfermedad que tuvo el agregado de las diferentes enmiendas, se calculó el índice de supresividad según:

$$IS = [(IT \text{ inoc} - I) / IT \text{ inoc}] \times 100$$

Donde IS = índice de supresividad, IT inoc = incidencia media en el testigo inoculado e I = incidencia en el tratamiento analizado. La severidad relativa resultó del cociente entre la severidad registrada en cada tratamiento y la severidad media registrada en el testigo inoculado expresado en porcentaje.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente recurriendo a ANOVA y separación de medias por test de Tukey.

#### **D) Estudio del efecto de sustancias difusibles**

Para determinar el efecto de los metabolitos difusibles liberados por cada uno de los sustratos se aplicó el siguiente procedimiento. A los veinte días de haberse efectuado las mezclas de aquellas macetas que contenían sustratos sin inocular (T, aa 2,5, aa 5, HP 1, HP 2, CCh 2,5 y CCh 5), se extrajeron muestras de 10 gramos. A cada una de estas muestras se les agregó 90 ml de agua destilada y se las colocó en un agitador rotativo durante una hora. Se tomaron 50 ml del líquido sobrenadante; los mismos se filtra-

ron a través de papel Whatmann N° 1 y luego se los sometió a centrifugación a aproximadamente 3600 r. p. m. durante diez minutos. Se recuperó el sobrenadante y se lo esterilizó mediante pasaje a través de un filtro Millipore de 0,45µm. Para ensayar el efecto del líquido obtenido sobre *R. solani* se procedió de la siguiente manera: a una porción de 8 ml de APG al 2 % se le agregó 1 ml del extracto acuoso correspondiente al tratamiento que se quería evaluar y 1 ml de una solución de cloranfenicol al 0,05 % + sulfato de estreptomicina al 0,05 %. La mezcla resultante se colocó en una caja de Petri de 9 cm de diámetro y en el centro de la misma se «sembró» un trozo de 6 mm de diámetro de un cultivo del patógeno en activo crecimiento. Una caja de Petri conteniendo 8 ml de APG al 2 % más 1ml de agua destilada esterilizada y 1ml de la solución de antibióticos constituyó el testigo. Se dispusieron cinco repeticiones por cada uno de tratamientos. Las cajas fueron llevadas a estufa a 26°C ± 2°C. El crecimiento de las colonias se evaluó midiendo el diámetro de las mismas a las 24 y a las 48 horas. Con el fin de determinar la tasa de crecimiento y establecer si el agregado del extracto acuoso resultaba estimulante o inhibidor, en todos los casos se calculó el cociente entre el diámetro medido en las cajas y el promedio de los testigos. En forma paralela al ensayo efectuado con los sustratos se realizó uno similar con los extractos acuosos de las enmiendas puras. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA y test de Tukey para comparación de medias al 5 % de significancia.

#### **E) Estudio del efecto de metabolitos volátiles**

A fin de estudiar el efecto de los metabolitos volátiles desprendidos de los sustratos se recogió de cada uno los sustratos una muestra de aproximadamente 30 g con criterio similar al expuesto en el punto precedente. Se tomaron cajas de Petri y los conjuntos tapa-fondo fueron rearmados en conjuntos tapa-tapa y fondo-fondo de forma tal que pudieran enfrentarse por los bordes y formar una cámara cerrada en el interior (Mariano, 1993). Sobre el plato



inferior se depositaron 5 g de la mezcla tierra-enmienda que correspondiera al tratamiento y sobre el plato superior se volcaron 9 ml de APG al 2 % más una solución de cloranfenicol al 0,05 % + sulfato de estreptomicina al 0,05 %. Sobre la capa del medio de cultivo en la placa superior se sembró un trozo de 6 mm. de diámetro de un cultivo del patógeno en activo crecimiento. El conjunto se selló con Parafilm y se llevó a estufa a  $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El testigo se constituyó en forma similar pero sin colocar nada en el plato inferior. Se efectuaron 5 repeticiones por tratamiento. El crecimiento de la colonia se evaluó midiendo su diámetro mayor a las 24, 48 y 72 horas. En todos los casos se calculó el cociente entre el diámetro medido en las cajas y el promedio de los testigos a fin de establecer si los metabolitos volátiles desprendidos resultaban estimulantes o inhibidores al patógeno. Un ensayo similar se realizó para estudiar el efecto de los metabolitos volátiles desprendidos de las enmiendas puras. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA y test de Tukey para comparación de medias.

## RESULTADOS

### **A) Determinaciones analíticas realizadas sobre las enmiendas y los sustratos**

La alfalfa enfiada, la harina de pescado y el compost de champiñón presentaron características variables en lo que respecta al pH y los contenidos de carbono orgánico y nitrógeno total (Tabla 1). La adición de las enmiendas a la tierra determinó un incremento en los valores de pH, carbono orgánico y nitrógeno total con respecto al testigo. La relación C/N evolucionó en forma particular según la enmienda considerada. Los tratamientos aa 2,5, CCh 2,5 y CCh 5 determinaron un ascenso en dicha relación, mientras que, en los casos restantes, la adición de la enmienda resultó en una caída del valor (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características químicas de las enmiendas y los sustratos utilizados.

	pH	Carbono orgánico (%)	Nitrógeno total (%)	Relación C/N
<b>Enmiendas</b>				
Alfalfa enfiada	7.7	28.34	3.06	9.25
Harina de pescado	6.4	25.82	6.38	4.05
Compost de champiñón	7.7	15.57	0.87	17.94
<b>Sustratos</b>				
Testigo	6.0	2.22	0.16	13.87
aa 2,5 inoc	6.7	2.46	0.18	13.92
aa 5 inoc	7.6	2.58	0.21	12.56
HP 1	7.2	2.26	0.22	10.47
HP 2	8.2	2.31	0.26	8.89
CCh 2,5	6.0	2.40	0.17	14.11
CCh 5	6.2	2.73	0.19	14.35

### B) Prueba de patogenicidad y fitotoxicidad

El análisis de la varianza mostró que todas las variables analizadas fueron afectadas significativamente ( $P < 0.05$ ) por el tratamiento. Por el contrario, los bloques experimentales no constituyeron una fuente de variación significativa ( $P > 0.05$ ) por lo que los datos de los diferentes bloques fueron considerados en forma conjunta.

No se observaron síntomas en los controles no inoculados, mientras que el testigo inoculado mostró una incidencia cercana al 90% (Tabla 2). Los tratamientos con adición de enmiendas en la mayor dosis no inoculados y los tratamientos aa 5 inoc. y HP 2 inoc. tuvieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con el testigo inoculado, mientras que los tratamientos con enmiendas a la menor dosis e inoculados presentaron valores intermedios (Tabla 2).

Los tratamientos aa 5 inoc. y HP 2 inoc. mostraron un índice de supresividad significativamente más alto ( $P < 0.05$ ) y una severidad relativa significativamente más baja ( $P < 0.05$ ) que el testigo inoculado. El tratamiento CCh 5 inoc, en cambio, solo mostró un índice de supresividad significativamente superior al testigo inoculado. El resto de los tratamientos no mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) respecto al testigo inoculado en ninguno de los dos parámetros considerados. La severidad media varió entre 0 para el testigo no inoculado y 2,87 para HP 1 inoc, correspondiendo al

**Tabla 2.** resultados de las variables evaluadas en la prueba de patogenicidad y fitotoxicidad (promedios de cuatro repeticiones).

Tratamiento	Incidencia (%)	Índice de su-presividad (%)	Severidad (1)	Severidad relativa (%)	Emergencia (%)	Longitud de hipocótilo (cm)	Peso fresco (gr)
T	0.0 a <sup>1</sup>	-	0.00 a	-	100.0 b	15.1 e	23.2 a
α α 2,5	0.0 a	-	0.00 a	-	97.5 b	11.01 cd	18.6 ab
α α 5	2.5 a	-	0.02 a	-	90.0 ab	7.73 abc	17.4 ab
HP 1	0.0 a	-	0.00 a	-	87.5 ab	6.95 ab	18.3 ab
HP 2	0.0 a	-	0.00 a	-	80.0 ab	9.35 bcd	14.1 a
CCh 2,5	0.0 a	-	0.00 a	-	97.5 b	11.88 de	20.0 ab
CCh 5	0.0 a	-	0.00 a	-	90.0 ab	11.10 cd	18.2 ab
T inoc.	89.5 d	0 a	2.59 cd	100 a	90.0 ab	8.14 abcd	16.7 ab
aa 2,5 inoc.	61.5 bcd	31.15 ab	1.40 abc	53.9 ab	67.5 a	4.44 a	12.7 a
aa 5 inoc.	8.25 a	90.67 c	0.08 a	3.22 b	85.0 ab	7.00 ab	15.8 a
HP 1 inoc.	74.0 cd	17.27 a	2.87 d	110.97 a	85.0 ab	6.41 ab	15.6 a
HP 2 inoc.	23.25 ab	74.00 bc	0.55 ab	21.45 b	82.5 ab	5.11 a	15.1 a
CC h 2,5 inoc.	65.75 cd	26.52 a	1.61 bcd	62.22 ab	75.0 ab	5.71 ab	14.5 a
CCh 5 inoc.	49.75 bc	44.40 b	1.30 abc	50.07 ab	85.0 ab	6.25 ab	13.0 a

<sup>1</sup>Las letras que siguen a los valores indican el resultado del test de Tukey para comparación de las medias que figuran en una misma columna. Los valores que comparten una letra difieren significativamente entre sí ( $P < 0.05$ ).

testigo inoculado un valor de 2,59. Los únicos tratamientos inoculados que se diferenciaron significativamente del testigo inoculado pero no del testigo no inoculado fueron aa 5 y HP 2.

El porcentaje de emergencia registrado en el tratamiento aa 2,5 inoc. (67,5 %) fue el más bajo y resultó significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) que el que presentaron el testigo sin inocular y los tratamientos aa 2,5 y CCh 2,5 (97,5 % en ambos casos). El resto de los tratamientos registraron valores intermedios entre estos extremos citados. La longitud de hipocótilo fluctuó entre un máximo de 15,1 cm. para el testigo sin inocular y un mínimo de 4,4 cm. para el tratamiento aa 5 inoc. El testigo no inoculado mostró el registro más alto de peso medio de plántula. Los valores más bajos corresponden a HP 2 y a los tratamientos que combinan el agregado de enmiendas y la inoculación con el patógeno. El resto de los tratamientos conforman, en la separación de medias un grupo homogéneo que no presenta diferencias significativas con ninguno de los mencionados previamente.

### C) Estudio del efecto de metabolitos difusibles

Los extractos acuosos obtenidos de las enmiendas puras no tuvieron efecto significativo ( $P < 0.05$ ) sobre el desarrollo cultural

de *R. solani*, en comparación con el testigo ni a las 24 ni a las 48 horas (Tabla 3). A las 24 horas de haberse efectuado la siembra el extracto acuoso proveniente de sustrato HP 2 determinó en la colonia del patógeno un diámetro significativamente superior ( $P < 0.05$ ) a todo el resto de los tratamientos. La tasa de inhibición muestra que el único extracto que provoca un efecto estimulante sobre el crecimiento de la colonia es el que corresponde al tratamiento mencionado. A las 48 horas el diámetro medio de las colonias correspondiente al tratamiento HP 2 sigue siendo significativamente mayor que la de todos los otros tratamientos. El extracto del sustrato CCh 5 es el único que determinó un crecimiento significativamente menor. Las tasas de inhibición registradas permiten hacer una distinción entre el tratamiento HP 2 que aparece como estimulante del crecimiento y los tratamientos aa 5, CCh 2, 5 y CCh 5 que muestran un efecto detrimental (Tabla 3).

**Tabla 3.** prueba del efecto de extractos acuosos de las distintas enmiendas puras sobre el crecimiento cultural de *Rhizoctonia solani*.

	24horas		48horas	
	diámetro de la Colonia	tasa de crecimiento	diámetro de la Colonia	tasa de crecimiento
Testigo total	3.00 a <sup>1</sup>		7.20 a	
Alfalfa	3.01 a	1.00 a	7.30 a	1.01 a
Harina de pescado	3.01 a	1.00 a	7.24 a	1.01 a
Compost de champiñón	3.30 a	1.1 a	7.30 a	1.01 a
Tierra sin enmendar	3.00 a	1.00 ab	7.29 b	1.01 ab
aa 2,5 inoc	3.05 a	1.02 b	7.33 b	1.02 ab
aa 5 inoc	2.96 a	0.99 ab	6.92 ab	0.96 a
HP 1	2.88 a	0.96 a	7.29 b	1.01 ab
HP 2	3.50 b	1.17 c	7.84 c	1.09 b
CCh 2,5	3.08 a	1.03 b	7.14 ab	0.99 a
CCh 5	3.04 a	1.01 ab	6.74 a	0.94 a

<sup>1</sup> Las letras que siguen a los valores indican el resultado del test de Tukey para comparación de las medias que figuran en una misma columna. Los valores que comparten una letra difieren significativamente entre sí ( $P < 0.05$ ).

#### D) Estudio del efecto de metabolitos volátiles

Los metabolitos volátiles desprendidos de la harina de pescado pura determinaron, a las 24, 48 y 72 horas, un crecimiento de la colonia del patógeno significativamente más bajo ( $P < 0.05$ ) que el testigo (Tabla 4). La alfalfa pura, en cambio, mostró inhibir significativamente ( $P < 0.05$ ) el crecimiento con respecto al testigo sólo a partir de las 48 horas, mientras que el compost de champiñón no produjo en ninguno de los tres momentos de observación metabolitos volátiles que redujeran significativamente ( $P < 0.05$ ) el crecimiento de la colonia (Tabla 4).

Tanto el testigo sin enmendar como la totalidad de los sustratos mostraron ejercer a las 24 horas un efecto significativamente inhibitorio ( $P < 0.05$ ) con respecto al testigo. A las 48 horas, en cambio, sólo HP 1 determinó un diámetro de colonia significativamente inferior ( $P < 0.05$ ) al del testigo, mientras que a las 76 horas ninguno de los sustratos mostró inhibir el desarrollo del patógeno.

**Tabla 4.** efecto de los metabolitos volátiles desprendidos de los sustratos sobre el crecimiento cultural de *Rhizoctonia solani*.

	24 horas		48 horas		72 horas	
	diámetro de la colonia	tasa de crecimiento	diámetro de la colonia	tasa de crecimiento	diámetro de la colonia	tasa de crecimiento
Testigo	1.80 a <sup>1</sup>		4.60 a		8.50 a	
Alfalfa	1.83 a	0.77 a	2.63 b	0.60 b	3.49 c	0.46 c
Harina de pescado	1.07 b	0.44 b	3.00 b	0.60 b	5.86 b	0.77 b
Compost de champiñón	1.74 a	0.71 a	4.58 a	0.83 a	7.40 ab	0.96 ab
Testigo	1.62 b	0.66 b	4.22 ab	0.79 ab	8.28 a	0.97 a
aa 2,5 inoc	1.58 b	0.65 b	4.39 ab	0.82 ab	7.96 a	0.94 a
aa 5 inoc	1.56 b	0.64 b	3.96 ab	0.74 ab	7.52 ab	0.89 ab
HP 1	1.30 b	0.53 b	3.46 b	0.65 b	7.10 ab	0.84 ab
HP 2	1.54 b	0.63 b	3.94 ab	0.74 ab	6.92 ab	0.81 ab
CCh 2,5	1.62 b	0.86 b	4.47 a	0.84 a	8.40 a	0.99 a
CCh 5	1.54 b	0.58 b	4.13 ab	0.78 ab	7.96 a	0.94 a

<sup>1</sup> Las letras que siguen a los valores indican el resultado del Test de Tukey para comparación de las medias que figuran en una misma columna. Los valores que comparten una letra difieren significativamente entre sí ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

El agregado de enmiendas orgánicas al suelo produjo una reducción en los valores de incidencia y severidad del daño provocado por *R. solani*. Lumsden *et al.* (1983) obtuvieron resultados similares con el mismo patógeno y sobre el mismo hospedante, empleando compost de barrido urbano. Por su parte, Voland y Epstein (1994) obtuvieron mayor supresividad del damping-off provocado por *R. solani* en suelos abonados con compost o estiércol, en relación con otros fertilizados con nitrógeno en forma inorgánica.

La alfalfa resultó la enmienda más efectiva para reducir la incidencia y la severidad de la enfermedad ocasionada por el patógeno. Este resultado confirma las determinaciones previas de distintos autores que recomendaron el empleo de residuos de leguminosas para controlar hongos de suelo como *R. solani* (Blum *et al.*, 1996) y *Sclerotium rolfsii* (Boyd y Philips, 1972; Blum *et al.*, 1996), y nematodos (Huang *et al.*, 1981). La harina de pescado, cuando se aplicó a la mayor de las dosis evaluadas, también determinó reducciones significativas en los registros de incidencia y severidad. La baja relación C/N que caracteriza especialmente a los desechos industriales de origen animal y, en cierta medida, a los residuos de leguminosas, puede contribuir a explicar la supresividad verificada cuando se aplicaron ambas enmiendas en las mayores dosis. Las enmiendas de baja relación C/N provocan en el corto plazo un ascenso brusco en el pH, debido a la liberación de amonio (Tsao y Oster, 1981). Este ascenso de pH, que en nuestro estudio tuvo lugar en los dos sustratos de mayor potencial supresivo (aa 5 con pH = 7,6 y HP 2 con pH = 8,2), puede resultar en una mayor predisposición del patógeno a ser parasitado por ciertos agentes de control biológico como lo demostraron Elad *et al.* (1980) con *R. solani* y *S. rolfsii*. Por otra parte, los iones amonio, nitrato y nitrito que se acumulan en los sustratos con posterioridad a la incorporación de enmiendas de baja relación C/N, presentan efecto fungitóxico. Así fue observado en diversos patógenos como *S.*

*rolfsii* (Henis y Chet, 1968), *Fusarium* spp. (Smiley *et al.*, 1974) y *Phytophthora* spp. (Tsao y Oster, 1981). Todos los tratamientos evaluados causaron disminución de emergencia, longitud del hipocótilo y peso fresco de las plántulas, lo que puede atribuirse a fitotoxicidad en los tratamientos no inoculados, y a la combinación de ésta y el daño por el patógeno, en los tratamientos inoculados. La reducción en los parámetros de crecimiento de las plantas inoculadas puede obedecer al fenómeno de ocurrencia de síntomas hipoplásicos que tiene lugar en plántulas afectadas por hongos del complejo damping-off, aun en ausencia de síntomas necróticos visibles (Klein, 1959; Strissel y Dunleavy, 1970). Estos síntomas incluyen retrasos en la emergencia y reducción de la elongación del hipocótilo (Grau y Martinson, 1979). Dentro de los tratamientos no inoculados, HP 2 determinó sobre las plántulas un efecto fitotóxico relevante, ya que produjo una reducción significativa con respecto al testigo en los tres parámetros que se consideraron para la evaluación. Esto confirma el concepto expresado por otros autores acerca de la necesidad de ajustar convenientemente las dosis cuando se emplean enmiendas de baja relación C/N, habida cuenta de que la considerable liberación de amonio y nitritos puede tener efecto detrimental sobre el cultivo a implantar (Saviozzi *et al.*, 1997; González y Benítez, 1990).

Numerosos autores han estudiado el efecto de los metabolitos volátiles y difusibles provenientes de las enmiendas orgánicas y los residuos de cosecha sobre la actividad biológica de los hongos de suelo, con énfasis en particular en los mecanismos de interrupción de la fungistasis (Linderman y Gilbert, 1969; Gilbert y Griebel, 1969; Smolinska *et al.*, 1997). Los dos metabolitos volátiles asociados en mayor medida a la mineralización de la materia orgánica en el suelo son el CO<sub>2</sub> (en sustratos de alta relación C/N) y el NH<sub>3</sub> (en sustratos de baja relación C/N) (Lewis y Papavizas, 1974). Ambos gases provocan efectos detrimentales sobre *R. solani* cuando se superan determinadas concentraciones (Lewis y Papavizas, 1974; Papavizas y Davey, 1962). En el presente trabajo se observó que

los metabolitos volátiles desprendidos de la alfalfa y la harina de pescado, así como los originados en el tratamiento HP 1 provocaban, con respecto al testigo, retrasos en el crecimiento de la colonia de *R. solani*. Coincidentemente Lewis y Papavizas (1974), encontraron que los metabolitos volátiles desprendidos a partir de la incorporación de enmiendas de baja relación C/N (amoníaco y aminos de bajo peso molecular) provocaban en *R. solani* melanización y reducción en la supervivencia y la actividad saprofítica. El efecto fungitóxico de los metabolitos difusibles obtenidos de enmiendas orgánicas que algunos autores han logrado reproducir *in vitro* (Gautam y Kolte, 1979; Qasem *et al.* 1995) no pudo reproducirse consistentemente en nuestros experimentos que mostraron tendencias poco claras y no asociadas con los resultados de la prueba de patogenicidad.

## BIBLIOGRAFÍA

**ASOCIACIÓN ARGENTINA DE LA CIENCIA DEL SUELO.** 1989. *PROMAR, Programa de métodos analíticos de referencia*. Secretaría de Agricultura, Ganadería y pesca. Dirección de Producción Agrícola. Buenos Aires. 27 pp.

**BAKER, K. F. y COOK, R. J.** 1974. *Biological Control of Pathogens*. W. H. Freeman & Co., San Francisco, USA. 433 pp.

**BLANCARD, D.** 1990. *Enfermedades del tomate. Observar, identificar, luchar*. Ed. Mundi Prensa, Madrid. 212 pp.

**BLANCARD, D., LECOQ, H. y PITRAT, M.** 1990. *Enfermedades de las cucurbitáceas. Observar, identificar, luchar*. Ed. Mundi Prensa, Madrid. 301pp.

**BLUM, L. E. B., RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. y MORGAN-JONES, G.** 1996. Effect of soil organic amendments on diseases of tomato and soybean caused by *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*, and on the soil microbial population (Res.). *Phytopathology* 86: 554.

**BOYD, H. W. ; PHILIPS, D. V.** 1972. Toxicity of Crop Residue to Peanut Seed and *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 63, 70-71.



**CARRANZA, J. M.** 1979. *Lista de las principales causas de enfermedades de los cultivos hortícolas en la República Argentina. Serie Técnica N°1.* Ministerio de Economía. Subsecretaría de Asuntos Agrarios. Estación Experimental de Gorina. 48 pp.

**ELAD, Y.; KALFON, A. ; CHET, I.** 1982. Control of *Rhizoctonia solani* in cotton by seed-coating with *Trichoderma harzianum* spores. *Plant and Soil* 66: 279-281.

**FLEET, N. L.** 1985. Effect of soil solarization with clear plastic and shallow flood on the survival of *Rhizoctonia solani* sclerotia. *Phytopathology* 75: 1291.

**GAUTAM, M. y KOLTE, S. J.** 1979. Control of sclerotium of sunflower through organic amendments of soil. *Plant and Soil* 53: 233-238.

**GILBERT, R. G. y GRIEBEL, G. E.** 1969. The influence of volatile substances from alfalfa on *Verticillium dahliae* in soil. *Phytopathology* 59, 1400-1403.

**GONZÁLEZ, J. L. y BENÍTEZ, J. C.** 1990. Evolución de fracciones nitrogenadas y materia orgánica en compostajes de mezclas de estiércoles animales. *Ciencia del Suelo* 817-23.

**GRAU, C. R. y MARTINSON, C. A.** 1979. Inhibition of Soybean Hypocotyl Elongation by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 69, 706-709.

**HENIS, Y. y CHET, I.** 1968. The effect of nitrogenous amendments on the germinability of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* and on their accompanying microflora. *Phytopathology* 58, 209-211.

**HUANG, C. S.; TENENTE, R. C. V.; DA SILVA, F. C. C. ; LARA, J. A. R.** 1981. Effect of *Crotalaria spectabilis* and two nematicides on numbers of *Meloidogyne incognita* and *Helicotylenchus dihystera*. *Nematologica* 27,1-5.

**KLEIN, H. H.** 1959. Etiology of *Phytophthora* disease of soybeans. *Phytopathology* 49, 380-383.

**LEACH, L. D. y GARBER, R. H.** 1970. Control of *Rhizoctonia solani*. pp 189-199. En: *Rhizoctonia solani, biology and pathology.* (Parmeter, J. R., Edit.). University of California Press, Berkeley.

**LEWIS, J. A. y PAPAIVIZAS, G. C.** 1974. Effect of volatiles from decomposing tissues on pigmentation, growth and survival of *Rhizoctonia solani*. *Soil Sci.* 118, 156-163.

**LINDERMAN, R. G. y GILBERT, R. G.** 1969. Stimulation of *Sclerotium rolfsii* in Soil by Volatile Components of Alfalfa Hay. *Phytopathology* 59, 1366-1372.

**LUMSDEN, R. D.; LEWIS, J. A. ; MILLNER, P. D.** 1983. Effect of Composted Sewage Sludge on Several soilborne Pathogens and Diseases. *Phytopathology* 73, 1543-1548.

**MARCHIONATTO, J. B.** 1944. Observaciones sobre el comportamiento patógeno y en cultivo de la *Rhizoctonia solani*. *Physis* XIX: 482-489.

**MARIANO, R. L.** 1993. Métodos de seleção in vitro para o control e microbiológico de patógenos de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 1: 369-409.

**MITIDIERI, I. Z. M.** 1973. Enfermedades criptogámicas nuevas o poco difundidas en la Argentina. *IIDIA* 301: 9-14

**MITIDIERI, I. Z. M.** 1994. Principales enfermedades que afectan a los cultivos hortícolas que se desarrollan bajo cubierta en el norte de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Acta Horticulturae* 357: 143-152

**NICO, A. I.** 2002. El empleo de enmiendas orgánicas para el control de hongos de suelo y nematodos. pp 319-327. En: *Agroecología: El camino hacia una agricultura sustentable* Sarandón, S. J., Ed).Ediciones Científicas Latinoamericanas, La Plata.

**PAPAVIZAS , G. C. y DAVEY, C. B.** 1962. Activity of *Rhizoctonia* in soil as affected by carbon dioxide. *Phytopathology* 52: 759-766.

**QASEM, J. R.; AL-ABED, A. S. y ABU-LABAN** 1995. Antifungal activity of clammy inula (*Inula viscosa*) on *Helminthosporium sativum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathol. medit.* 37, 7-14.

**RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, R.; TABARES RODRÍGUEZ, J. M. y MEDINA SAN JUAN, J. A.** 1989 *Cultivo moderno del tomate*. Ed. Mundi Prensa, Madrid. 206 pp.

**SAVIOZZI, A.; LEVIMINZI, R.; RIFFALDI, R. y VANNI., G.** 1997. Laboratory studies on the application of wheat straw and pig slurry to soil and the resulting environmental implications. *Agriculture Ecosystems & Environment* 61, 35-43.

**SMILEY, R. W.** 1974. Take-All of Wheat as Influenced by Organic Amendments and Nitrogen Fertilizers. *Phytopathology* 64, 822-825.

**SMOLINSKA, U.; KNUDSEN, G. R.; MORRA, M. J.; BOREK, V.** 1997. Inhibition of *Aphanomyces euteiches* f. sp. *pisi* by Volatiles Produced by Hidrolysis of *Brassica napus* Seed Meal. *Plant Dis.* 81, 288-292.

**STRISSEL, J. F. y DUNLEAVY, J. M.** 1970. Stunting of soybean by *Pythium debaryanum*. *Phytopathology* 60, 961-963.

**TOOVEY, F. W.** 1976. *Cultivo de champiñon*. Edit. Acribia, Zaragoza, 152 pp.

**TSAO, P. H. y OSTER, J. J.** 1981. Relation of Ammonia and Nitrous Acid to suppression of Phytophthora in Soil Amended with Nitrogenous Organic Substances. *Phytopathology* 71, 53-59.

**VOLAND, R. P. y EPSTEIN, A. H.** 1994. Development of Suppressiveness to Diseases Caused by *Rhizoctonia solani* in Soils Amended with Composted and Non composted Manure. *Plant Dis.* 78, 461-466.