

CONTROL BIOLÓGICO DE LA PUDRICIÓN BASAL DEL TALLO EN CRISANTEMO (*Dendranthema grandiflorum*) OCASIONADA POR *Sclerotinia sclerotiorum* CON ALGUNOS AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp.

Biological control of basal stem rot of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) caused by *Sclerotinia sclerotiorum* with some isolates of *Trichoderma* sp. and *Gliocladium* sp.

Jenny Valencia¹ y Germán Arbeláez²

¹ Bacterióloga, Pontificia Universidad Javeriana, Santafé de Bogotá

² Profesor Titular, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Santafé de Bogotá

RESUMEN

El hongo *Sclerotinia sclerotiorum* ocasiona pérdidas apreciables en diversos cultivos de flores y hortalizas. La investigación consistió en evaluar la capacidad antagonista de algunos aislamientos de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, tanto in vitro, como en plantas de crisantemo. Los mejores antagonistas del patógeno in vitro fueron los aislamientos G-8B y G-9B de *Gliocladium* sp. y los aislamientos T-21B y T-34B de *Trichoderma* sp. Los dos aislamientos de *Gliocladium* sp. formaron un halo de inhibición alrededor de la colonia del patógeno, mientras que los aislamientos de *Trichoderma* sp. produjeron esporulación abundante sobre las colonias del patógeno. Los mejores tratamientos en el control de la enfermedad en plantas de crisantemo fueron los aislamientos T-21B y T-34B de *Trichoderma* sp. y el aislamiento G-8B de *Gliocladium* sp., con un menor índice y una menor severidad de la enfermedad. La metodología de evaluación in vitro utilizada en la investigación fue confiable, ya que los resultados encontrados en el laboratorio fueron bastante similares a los obtenidos en el ensayo de invernadero. Además, los aislamientos de *Trichoderma* y de *Gliocladium* utilizados ocasionaron un estímulo apreciable en el crecimiento de las plantas y un adelanto en la floración.

Palabras claves: Antagonismo in vitro, estímulo crecimiento, adelanto floración

SUMMARY

The fungus *Sclerotinia sclerotiorum* causes great losses in different floricultural and horticultural crops. This research consisted in the evaluation of the antagonistic capacity of some isolates of *Trichoderma* sp. and *Gliocladium* sp. on *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro and with chrysanthemum plants. The best

antagonists of the pathogen were the isolates G-8B y G-9B of *Gliocladium* sp. and the isolates T-21B y T-34B of *Trichoderma* sp. The isolates of *Gliocladium* sp. produced an inhibition zone around the colony of the pathogen, meanwhile the isolates of *Trichoderma* sp. produce abundant sporulation on the colonies of the pathogen. The best treatments for the control of the disease on chrysanthemum plants were the isolates T-21B and T-34B of *Trichoderma* sp. and the isolate G-8B of *Gliocladium* sp. with a lower disease index and lower severity of the disease. The methodology of evaluation of antagonism in vitro used in this research was reliable, because the results found in the laboratory were similar to those found in the greenhouse trial. Furthermore, the isolates of *Trichoderma* and *Gliocladium* used stimulated the growth of the plants and anticipated flower production.

Key words: In vitro antagonism, increase growth, flower production anticipation

INTRODUCCION

Las pérdidas ocasionadas en los cultivos de flores y hortalizas por diversos fitopatógenos y, en especial, por los hongos del suelo, han sido limitantes en algunas empresas localizadas en la Sabana de Bogotá. El hongo *Sclerotinia sclerotiorum* ha causado pérdidas importantes en cultivos de crisantemo y de clavel y su manejo ha incrementado notablemente los costos de producción.

Las dificultades encontradas para la reducción de la enfermedad por medio de los métodos químicos hacen que la aplicación de diversos organismos sea un método promisorio, mediante la aplicación de antagonistas al suelo que degraden los esclerocios y el micelio del patógeno e impidan su germinación o disminuyan su viabilidad y su desarrollo.

Diversos investigadores han encontrado que algunas especies de *Trichoderma* y de *Gliocladium* tienen una gran actividad antagonista sobre hongos productores de esclerocios, como

Sclerotinia sclerotiorum, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*, causando una disminución importante de las enfermedades que ocasionan (Merriman, 1976; Papavizas, 1985; Chet, 1987).

Las diferentes especies de *Trichoderma* y de *Gliocladium* son muy comunes en diversos suelos, principalmente, en aquellos ácidos y ricos en materia orgánica (Papavizas, 1985). Estas especies se caracterizan por tener un rápido crecimiento micelial y una abundante esporulación, lo cual ayuda a la colonización del suelo y de diversos sustratos. Además, la acción de *Trichoderma* y de *Gliocladium* se debe al hiperparasitismo, a la competencia por espacio y nutrientes, a la producción de antibióticos y por poseer un sistema de enzimas capaz de atacar un buen número de hongos fitopatógenos (Papavizas, 1985; Chet, 1987).

MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Fitopatología y en un invernadero con cubierta plástica de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, en Santafé de Bogotá.

El aislamiento de *S. sclerotiorum* se obtuvo de plantas de crisantemo de un cultivo comercial para exportación, localizado en la Sabana de Bogotá y en cuyos tallos se observaban los síntomas de la enfermedad. El aislamiento se realizó a partir de trozos de tallos, previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto y dos enjuagues con agua destilada estéril, los cuales se colocaron en el medio de cultivo Papa-dextrosa-agar (PDA) y se incubaron a 24 °C.

Para la investigación, se escogieron cuatro aislamientos de *Trichoderma* sp. y dos de *Gliocladium* sp., los cuales habían demostrado un buen comportamiento a nivel de laboratorio y de campo como antagonistas de varios hongos patógenos del suelo (Elías *et al*, 1993; Garcés de Granada *et al*, 1996; 1997).

Los aislamientos utilizados fueron T-13 y T-17 de *Trichoderma harzianum*, procedentes del Programa de Control Biológico de la Facultad de Agronomía y T-21B y T-34B de *Trichoderma* sp. y G-8B y G-9B de *Gliocladium* sp, procedentes del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia.

Las pruebas de antagonismo in vitro se realizaron para observar la capacidad inhibitoria y de colonización de los diferentes antagonistas sobre el patógeno. Para el efecto, se utilizaron cajas de Petri con PDA, colocando dos discos de agar de 6 mm de diámetro, un disco procedente de un aislamiento del antagonista y el otro procedente del patógeno. Dichos aislamientos se colocaron en las cajas a una distancia de 3 cm el uno del otro y se incubaron a 24 °C. Se utilizaron tres repeticiones.

También, se realizaron observaciones cualitativas de la capacidad colonizadora de los aislamientos de *Trichoderma* y *Gliocladium* sobre las colonias de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Las pruebas de invernadero se realizaron en materos plásticos, colocados en un banco de concreto elevado. Los materos se llenaron con 800 gramos de suelo de textura franco limosa esterilizados con vapor de agua a 82 °C durante una hora y, en

cada uno de ellos, se sembraron tres esquejes de crisantemo de la variedad "White Polaris", la cual es altamente susceptible a la enfermedad.

Para este ensayo, se utilizaron cuatro aislamientos de *Trichoderma* sp. y dos aislamientos de *Gliocladium* sp. utilizados en las pruebas in vitro. También, se utilizó el producto comercial GlioGard, el cual se produce a partir de un aislamiento de *Gliocladium virens* y contiene una concentración de 10^6 unidades formadoras de colonias por gramo. Este producto es fabricado por la empresa Thermo Trilogy de los Estados Unidos y fue suministrado por la empresa Proficol El Carmen S.A..

Para el ensayo, se utilizó, un diseño experimental Completamente al Azar con cuatro repeticiones en arreglo factorial de $7 \times 2 \times 4$, el cual consistió en siete antagonistas en dos dosis, combinado con cuatro niveles del patógeno.

Tanto los antagonistas, como el patógeno, se propagaron en granos enteros de trigo, los cuales se esterilizaron dentro de erlenmeyers a 121 °C durante una hora por dos días consecutivos. Los antagonistas se incorporaron en dosis de 16 y 48 gramos del material colonizado por matero y se aplicaron al suelo diez días antes de la siembra. El patógeno se inoculó en cuatro niveles, 0; 8; 16 y 32 gramos por matero y se aplicó al suelo un día antes de la siembra de los esquejes de crisantemo.

Como variables para considerar se evaluaron el número de plantas afectadas y la altura de las plantas. El número de plantas enfermas se evaluó por la presencia de los síntomas de la enfermedad cada tres días, realizando un total de 20 evaluaciones. La altura de las plantas se determinó semanalmente. Al finalizar el experimento se evaluó la población de los antagonistas en el suelo, para lo cual se utilizó el método de las diluciones decimales en el medio específico propuesto por Elad y Chet (1983).

RESULTADOS Y DISCUSION

Pruebas de antagonismo in vitro

La inhibición del crecimiento micelial del patógeno in vitro mostró una gran variabilidad, según los diferentes aislamientos de *Trichoderma* y *Gliocladium* utilizados. Los aislamientos G-8B y G-9B de *Gliocladium* sp. produjeron, a las 48 horas de interacción en las cajas de Petri, los mayores promedios de inhibición del crecimiento micelial, con un 37,5 % y 28,4 %, respectivamente. Estos aislamientos mostraron una muy buena capacidad antibiótica, formando un halo de inhibición muy definido e impidiendo el desarrollo normal de las colonias del patógeno.

Los aislamientos T-21B y T-34B de *Trichoderma* sp. produjeron una inhibición de 18,8 % y 13,4%, respectivamente. Estos dos antagonistas presentaron una alta tasa de crecimiento micelial y una esporulación muy abundante. Los aislamientos T-13 y T-17 de *Trichoderma harzianum* presentaron, a las 48 horas de siembra, los menores promedios de inhibición del crecimiento micelial del patógeno, con valores de 6,8 % y 5,0 %, respectivamente; estos aislamientos se caracterizaron por presentar un crecimiento micelial abundante con muy poca

esporulación. Ninguno de los aislamientos impidió la formación de los esclerocios del patógeno.

Ensayo de invernadero con plantas de crisantemo

Los aislamientos T-21B y T-24B de *Trichoderma* sp., el aislamiento G-8B de *Gliocladium* sp. y el producto comercial GlioGard ocasionaron el menor índice de la enfermedad y la menor mortalidad de plantas de crisantemo.

La mortalidad de las plantas de crisantemo, a los 30 días después de la siembra con la dosis alta de los antagonistas (48 g) fue de 22,2 % para los aislamientos T-21B y G-8B de *Gliocladium*, de 33,3 % para el aislamiento T-34 de *Trichoderma* sp. y de 36,1 % para el producto GlioGard, en comparación con el Testigo, cuya mortalidad fue de 41,7 %. Estos resultados se pueden correlacionar con la mayor población de esos aislamientos en el suelo al finalizar el experimento, ya que mantuvieron sus poblaciones entre 4×10^6 y 24×10^6 ufc/g de suelo.

Con relación a la población del hongo en el suelo, se observó un incremento, cuando los antagonistas interactuaron con las dosis más altas del patógeno (16 y 32 g).

El aislamiento G-9B de *Gliocladium* sp. y el producto a base de *Gliocladium virens* presentaron las poblaciones más bajas de los antagonistas aplicados, las cuales oscilaron entre 2×10^6 y 3×10^6 y fueron los menos eficientes en el control de la enfermedad.

En cuanto a los aislamientos T-13 y T-17 de *T. harzianum*, el bajo control de la enfermedad, pudo deberse a las bajas poblaciones encontradas de esos antagonistas al final del experimento, las cuales oscilaron entre 1×10^6 y 6×10^6 ; estas poblaciones fueron mucho más bajas que en el caso de los antagonistas que ejercieron mejor control de la enfermedad.

Todos los antagonistas utilizados estimularon el crecimiento y el desarrollo de las plantas de crisantemo, en comparación con el testigo, el cual no recibió ninguna aplicación, presentando, estadísticamente diferencias altamente significativas.

La diferencia en la altura de las plantas fue aún mayor en la tercera evaluación, la cual ocurrió a los 74 días después de la siembra. Dicha diferencia, para la dosis de 16 g de los antagonistas, varió entre 22,0 y 24,5 cm, en comparación con las plantas testigo, las cuales no recibieron la aplicación de ningún antagonista; estas plantas tuvieron un promedio de 15,5 cm (Cuadro 1).

Para la dosis de 48 g de los antagonistas, la altura de las plantas fue aún mayor, las cuales variaron entre 24,0 y 27,5 cm (Cuadro 1).

Al igual que el estímulo observado con la aplicación de los antagonistas en el mayor crecimiento de las plantas, también, se observó un adelanto de 15 días en la floración de las plantas, en comparación con las plantas testigo. Estos resultados coinciden con los observados por Chang *et al.* (1986), Baker *et al.* (1986) y por Baker (1988), los cuales parecen deberse a la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento por parte de los antagonistas.

Los resultados de esta investigación muestran muy buenas posibilidades de diversos aislamientos de *Trichoderma* sp. y de *Gliocladium* sp. para el control de la enfermedades ocasionadas

por *Sclerotinia sclerotiorum* en plantas de crisantemo y en otros tipos de plantas.

Cuadro 1. Altura promedio de las plantas de crisantemo, en centímetros, para los diferentes antagonistas en dos dosis aplicadas

Aislamiento	Dosis (16 g)	Dosis (48 g)
T-17	22,5	27,5
G-9	24,0	27,5
T-13	23,0	27,0
T-21B	23,5	26,0
T-34B	22,0	25,0
G-8B	23,5	24,0
GlioGard	22,5	24,0
Testigo	15,5	15,5

LITERATURA CITADA

- BAKER, R., T. PAULITZ, M.H. WINDHAM and Y. ELAD. Enhancement of growth of ornamentals by a biological control agent. Colorado Flower Growers Association. Research Bulletin 431: 1-2., 1986.
- BAKER, R. *Trichoderma* spp. as plant-growth stimulants. CRC Critical Reviews in Biotechnology 7: 97-106. 1988.
- CHANG, Y.C., Y.C. CHANG, R. BAKER, O. KLEIFFELD and I. CHET. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. Plant Disease 70: 145-148. 1986.
- CHET, I. *Trichoderma*. Application, mode of action and potentials as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. p 137-160. In I. Chet (Ed.). Innovative approaches to plant disease control. John Wiley & Sons. New York. 1987.
- ELAD, Y. and I. CHET. Improved selective media for isolation of *Trichoderma* spp. or *Fusarium* spp. Phytoparasitica 11: 55-58. 1983.
- ELIAS, R., O. ARCOS y G. ARBELAEZ. Antagonismo de algunas especies de *Trichoderma* aisladas de suelos colombianos en el control de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. Agronomía Colombiana 10: 52-61. 1993.
- GARCÉS DE GRANADA, E., G. ARBELAEZ, M. OROZCO DE AMEZQUITA, M. SALAMANCA, R. LEE y L.M. CARVAJAL. Búsqueda y evaluación de antagonistas nativos para el control de hongos del suelo que afectan la producción de flores de exportación en la Sabana de Bogotá. Revista Asocolflores 49: 22-26. 1996.
- GARCÉS DE GRANADA, E., G. ARBELAEZ, M. OROZCO DE AMEZQUITA, M. SALAMANCA, R. LEE y L.M. CARVAJAL. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp. en el control de *Phoma chrysanthemicola* en crisantemo. Revista Asocolflores 50: 19-23. 1997.

MERRIMAN, P.R. Survival of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Soil Biol. Bioch.* 8: 385-389. 1976.

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 23: 23-54. 1985.

Agradecimientos. Los autores expresan su agradecimiento a las empresas Jardines de Los Andes y Proficol El Carmen S.A. y a Fernando Jaramillo, Jaime Soriano y Jesús Alberto León por el apoyo dado a la investigación.