

COMBATE DE *Corticium* EN TOMATE Y *Fusarium* EN FRESA MEDIANTE EL USO DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS Y/O HONGOS ENDOMICORRIZOGENOS (MVA)¹

Ronald Vargas *

ABSTRACT

Control of *Corticium* in tomato and *Fusarium* in strawberry by antagonistic microorganisms and/or vesicular-arbuscular mycorrhizae (VAM). Under greenhouse conditions, the effects of seedling inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizae (VAM) (*Gigaspora margarita* and *Glomus* spp.) and/or the addition to soil of "Symbiont" (a commercial product consisting of a mixture of oil palm charcoal plus antagonistic microorganisms), on the incidence of *Corticium rolfsii* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* on tomato (*Lycopersicon sculentum* cv. Ponte Rosa) and strawberry (*Fragaria vesca* Duchesne var. Hokowase) seedlings, respectively, was studied. 90% of the tomato seedlings showed *C. rolfsii* disease symptoms in the control treatment. Symbiont incorporation to the soil resulted in a 40% reduction of disease incidence. Incorporation of the commercial product plus seedling inoculation with *G. margarita* and *Glomus* spp. resulted in suppression of the disease caused by *C. rolfsii*. On the other hand, seedling inoculation with *G. margarita* and *Glomus* spp. resulted in a disease incidence reduction of 60% and 20%, respectively. In the case of *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*, Symbiont incorporation to soil resulted in a disease incidence reduction in strawberry of 17%. Seedling inoculation with *G. margarita* and or *Glomus* spp. reduced pathogen incidence by only 17%. However, both treatments combined resulted in a 33% disease incidence reduction. The effects of both practices in the biological control of soil-borne plant pathogens and their possible commercial use are discussed.

INTRODUCCION

Existen diversos documentos en la literatura que establecen claramente el papel de los hongos endomicorrizógenos (MVA) en la reducción de la incidencia de diferentes patógenos vegetales del suelo (Bagyaraj, 1984).

La inoculación de plántulas de diversas especies de interés comercial con hongos MVA es una práctica común para la obtención de plantas micorrizadas (Mosse, 1977; Menge, 1978).

Kobayashi (1989) ha señalado sobre los efectos benéficos de la adición al suelo de un compuesto de carbón vegetal que contenía microorganismos antagonistas, y de la inoculación de plántulas con hongos MVA sobre la incidencia del mal del talluelo del pepino causado por *Phyium* y *Rhizoctonia*.

Los principales efectos asociados con la reducción de la incidencia de los patógenos vegetales del suelo causados por los hongos MVA son

^{1/} Recibido para publicación el 26 de junio de 1990.
* Laboratorio de Microbiología de Suelos, Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. Miembro del Programa Financiero de Apoyo a Investigadores Científicos del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica.

la inhibición de la formación de propágulos y la colonización de las raíces micorrizadas. Estos dos tipos de supresión son ampliamente cubiertos en la literatura: a) inhibición de la formación de clamidosporas de *Thielaviopsis basicola* en las raíces de tabaco infectadas por *Glomus mosseae* (Baltrushathy y Shonbeck, 1972; 1975); formación de esclerocios de *Sclerotium rolfii* en raíces de maní infectadas por *Glomus fasciculatum* (Krisna y Bagyaraj, 1983); y la formación de oosporas de *Aphanomyces eutiches* en arvejas infectadas por *Glomus fasciculatum* (Rosendahl, 1985); b) reducción en la colonización de *Microphomina*, *Rhizoctonia* y *Fusarium* en raíces de soya infectadas por *Glomus mosseae* (Zambolin y Schenck, 1983); la inhibición de la formación de zoosporangios y liberación de zoosporas de *Phytophthora parasitica* en raíces de cítricos (Davis *et al.*, 1978; Davis y Menge, 1980; 1981) y de *P. cinnamomi* en raíces de maíz y crisantemos infectadas por *Glomus fasciculatum* (Meyer y Linderman, 1986).

Otro factor atribuible a los hongos MVA es la inducción de reacciones morfológicas y fisiológicas de defensa en plantas infectadas por hongos MVA. Sin embargo, la supresión de los patógenos del suelo por los hongos MVA no está aún bien documentada y la evidencia experimental disponible es poca (Dehne, 1982; Schenck, 1988; Smith, 1988).

El propósito de la presente investigación fue determinar, bajo condiciones de invernadero, los efectos de la inoculación con hongos MVA en combinación con la adición al suelo de un "compost" de carbón de palma aceitera conteniendo microorganismos antagonistas, sobre la incidencia de *Corticium rolfii* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, en tomate y fresa, respectivamente.

MATERIALES Y METODOS

El presente experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología, Instituto Nacional de Investigaciones en Plantas Ornamentales, Vegetales y Té, Ministerio de Agricultura, Forestales y Pesca, Kurume, Japón.

Suelo

El suelo utilizado, recolectado en Kurume, cerca de Fukuoka, Japón, fue secado al aire, tamizado para obtener agregados de 1 a 2 mm de

diámetro, esterilizado a 120°C por 2 h en 4 días sucesivos, y almacenado a temperatura ambiente hasta su utilización.

Inmediatamente antes del transplante de las plántulas, el suelo esterilizado fue inoculado con *C. rolfii* o *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*, preparados como se describe a continuación.

Cultivo, preparación e inoculación de los hongos patógenos

Corticium rolfii fue suministrado por el Dr. N. Kobayashi (Instituto Nacional de Investigaciones en Plantas Ornamentales, Vegetales y Té, Ministerio de Agricultura, Forestales y Pesca, Kurume, Japón). Este patógeno fue reproducido en medio Agar-Papa-Azúcar (APA) (200 g papas, 20 g azúcar y 15 g de agar por 1 L de agua destilada).

El inóculo fungoso adicionado al suelo esterilizado fue preparado de la siguiente manera: agregados de suelo fueron colocados en frascos de vidrio de 1 L de capacidad, mezclados con trozos de papa, a razón de 200 g/kg de suelo, y autoclavados a 120°C por 4 h. Posteriormente, se inocularon trozos (3x3 mm) de *C. rolfii* que se distribuyeron uniformemente sobre la superficie del suelo esterilizado contenido en los frascos. Los frascos así inoculados fueron incubados a 28°C hasta que el crecimiento fungoso alcanzara la base de los mismos. Estos cultivos fueron secados al aire, tamizados para producir agregados de inóculo de 1 a 2 mm de diámetro, y almacenados en bolsas plásticas a 5°C hasta su utilización. Este inóculo fungoso fue agregado al suelo esterilizado a razón del 1.5% (p/p).

Fusarium oxysporum f. sp. *fragariae* fue también obtenido a partir de un aislamiento suministrado por el Dr. N. Kobayashi. El patógeno fue crecido en frascos conteniendo medio líquido AP bajo constante agitación a 28°C. Luego de 1 semana de incubación, una alícuota fue extraída diariamente para determinar el número de propágulos/ml. Una vez que el inóculo alcanzó 1×10^8 propágulos/ml, el contenido de los frascos fue diluido para ser inoculado al suelo esterilizado, a razón de 1×10^6 propágulos/kg de suelo, y mezclados minuciosamente.

Hongos endomicorrizógenos (MVA)

Tanto *Gigaspora margarita* como *Glomus* spp. fueron cedidos por el Dr. N. Kobayashi. Las esporas de *G. margarita* fueron aisladas de suelo;

el cual había sido previamente sembrado con soya (*Glycine max* var. Ryokuko Edamame), por el método de tamizado en húmedo (Daniels y Skipper, 1982). Las esporas aisladas fueron sometidas a un tratamiento de sonicación de baja intensidad (1-2 Watts) por 2-3 seg (Ultrasonic Disruptor Model UR-200P, Seiko Co.) con el objeto de remover contaminantes adheridos a su superficie, y esterilizadas superficialmente en una solución de Chloramine T (Kanto Chemical Co.) al 2% por 15 min (Mosse, 1988).

Las esporas esterilizadas de *G. margarita* fueron colocadas, en grupos de 30, sobre la superficie de un compuesto de carbón de palma aceitera finamente molido y arcilla japonesa (Wako Pure Chemical Industries) al 2:1, y mezcladas hasta formar un "pellet". Los "pellets" conteniendo las esporas fueron colocados en viales de vidrio y almacenados en la oscuridad a temperatura ambiente hasta su utilización.

El inóculo de *Glomus* spp. utilizado consistió de una mezcla de raíces ya infectadas y partículas de arcilla.

Plántulas

Se utilizaron plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Ponte Rosa) con 13 días de germinadas, y plántulas de fresa (*Fragaria vesca* Duchesne var. Hokowase) de 1 mes.

Mixtura de carbón vegetal y microorganismos antagonistas

La mixtura utilizada consistió de Symbiont (Kingokoru Co.), un producto comercial elaborado a base de carbón de palma aceitera finamente molido inoculado con microorganismos antagonistas aislados del suelo. Los microorganismos presentes en este producto comercial son antagonistas a los patógenos usados en la presente investigación (N. Kobayashi, comunicación personal). La mezcla, denominada en el texto como compost, fue adicionada al suelo esterilizado, inmediatamente antes del transplante, a razón del 3% (p/p).

Bioensayo

El efecto de la adición del compost y de la inoculación de las plántulas de tomate y fresa con hongos MVA, fue determinado bajo condiciones de invernadero utilizando suelo inoculado con *C. rolfsii* y *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* en recipientes de 12 L. Para tal fin, fueron estudiados los

siguientes tratamientos: 1) suelo inoculado con el patógeno (testigo); 2) suelo inoculado con el patógeno + 3% de compost; 3) suelo inoculado con el patógeno + 3% de compost + *Glomus* spp.; 4) suelo inoculado con el patógeno + 3% de compost + *G. margarita*; 5) suelo inoculado con el patógeno + *Glomus* spp.; y 6) suelo inoculado con el patógeno + *G. margarita*.

Tres "pellets" por plántula, conteniendo esporas de *G. margarita*, fueron colocados bajo la radícula de la plántulas a la siembra. Para el caso de *Glomus* spp., aproximadamente 1 g de inóculo fue adicionado al momento del transplante.

En todos los casos fueron evaluadas 3 repeticiones por tratamiento. El número promedio de plántulas de tomate y fresa evaluadas por repetición fue de 10 y 6, respectivamente. Las observaciones sobre la incidencia de ambos patógenos se realizaron durante 15 días para el caso del tomate, y 38 días para la fresa.

RESULTADOS

Incidencia de *Corticium rolfsii*

Como resultado de la inoculación de *C. rolfsii* al suelo esterilizado, un 90% de las plántulas de tomate mostraron síntomas de su ataque al cabo de 15 días de observación (Cuadro 1).

La respuesta a la inoculación con hongos MVA, al momento del transplante, estuvo determinada por el hongo inoculado. En comparación con el porcentaje de plántulas atacadas por *C. rolfsii* observadas en el tratamiento testigo, la inoculación de las plántulas con *Glomus* spp. redujo

Cuadro 1. Efecto de la adición de compost e inoculación con hongos MVA en la incidencia de *Corticium rolfsii* en plántulas de tomate en invernadero.*

Tratamientos	% incidencia**
Testigo	90
Compost	50
<i>Glomus</i> spp.	70
<i>Gigaspora margarita</i>	30
Compost + <i>Glomus</i> spp.	0
Compost + <i>Gigaspora margarita</i>	0

* El nivel de inóculo inicial de *C. rolfsii* fue de 1,5% (p/p) para todos los tratamientos.

** 10 plántulas de tomate por repetición fueron evaluadas durante 15 días. Los valores corresponden al promedio.

la incidencia del patógeno únicamente en un 20% (Cuadro 1), mientras que la inoculación de las plántulas con *G. margarita* causó una reducción en la incidencia del patógeno de un 60%.

La incorporación del compost al suelo al momento del trasplante, resultó en una reducción intermedia de la incidencia de *C. rolfsii* (40%, Cuadro 1). La adición del compost al suelo junto con la inoculación de las plántulas con *G. margarita* y/o *Glomus* spp. resultó en la completa eliminación del ataque causado por *C. rolfsii* al cabo de 15 días.

Incidencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*

La incidencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* en plántulas de fresa al cabo de 38 días, en relación con los diferentes tratamientos evaluados, se muestra en el Cuadro 2.

La inoculación del suelo esterilizado con *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*, a razón de 1×10^6 propágulos/kg de suelo, resultó en un máximo de 83% de las plántulas atacadas por el patógeno.

La inoculación con *G. margarita* y/o *Glomus* spp. al momento del trasplante en suelo infestado con el patógeno vegetal, al igual que la adición de compost, redujeron parcialmente la incidencia (de un 83% a un 66%, Cuadro 2).

La mayor reducción en la incidencia del patógeno, un 33%, se logró con la aplicación del compost junto con la inoculación de cualquiera de los hongos MVA.

Cuadro 2. Efecto de la adición de compost e inoculación con hongos MVA en la incidencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* en plántulas de tomate en invernadero.*

	% incidencia**
Testigo	83
Compost	66
<i>Glomus</i> spp.	66
<i>Gigaspora margarita</i>	66
Compost + <i>Glomus</i> spp.	50
Compost + <i>Gigaspora margarita</i>	50

* El nivel de inóculo inicial *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* fue de 1×10^6 propágulos/ml para todos los tratamientos.

** 6 plántulas de fresa por repetición fueron evaluadas durante 38 días. Los resultados corresponden al promedio.

DISCUSION

Los resultados obtenidos durante la presente investigación demuestran que para el caso del ataque de las plántulas de tomate y fresa por *C. rolfsii* y *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*, respectivamente, la simple inoculación con *G. margarita* y/o *Glomus* spp. no fue suficiente para brindar una protección total contra el ataque del patógeno. Estos resultados concuerdan con los informados por Bagyaraj (1984), quien establece que la incidencia de los patógenos del suelo puede reducirse como resultado de la inoculación con hongos MVA.

De los dos hongos MVA utilizados, *G. margarita* fue el que mayores beneficios mostró en la reducción del ataque por *C. rolfsii*. Existen reportes en la literatura que establecen el mayor efecto benéfico de ciertos hongos MVA sobre otros en el combate biológico de patógenos vegetales del suelo (Davis *et al.*, 1980). Es muy probable que factores como tipo de suelo, pH, especies vegetales involucradas, así como otros microorganismos presentes en el suelo, interactúen de manera tal, que determinen una mayor eficiencia de un hongo MVA sobre otro en el combate biológico de los patógenos vegetales del suelo. Se sugiere más investigación en este campo con el fin de poder definir claramente la estrategia de combate biológico más adecuada para un conjunto de condiciones bióticas y abióticas determinadas.

El efecto sinérgico de la adición del compost y de la inoculación con hongos MVA ha sido ampliamente discutido por Ogawa (1987; 1989). Kobayashi (1989) reportó sobre los efectos benéficos de ambas prácticas en el combate biológico del mal del talluelo en pepino causado por *Phytophthora* y *Rhizoctonia*. La incorporación del compost no solo provee con una mezcla de microorganismos antagonistas capaces de competir por exudados radiculares, de producir antibióticos, enzimas líticas a nivel de la rizosfera y con ello reducir la incidencia de los hongos patógenos vegetales del suelo, sino que provee con un sustrato poroso altamente estimulante de la actividad, proliferación e infección por parte de los hongos MVA inoculados (Nishio, 1988; Saito, 1988).

Se concluye por tanto, que para un efectivo combate biológico de los patógenos vegetales del suelo, la adición de un compuesto como el empleado durante la presente investigación inoculado con microorganismos antagonistas al patógeno a

controlar, más la inoculación a la hora del trasplante con hongos MVA, podría ser una alternativa promisoría. Es importante señalar que esta estrategia podría ponerse en práctica bajo condiciones de invernadero durante la propagación de plantas de valor comercial, donde la incidencia de patógenos vegetales del suelo es de suma importancia. Por otro lado, su implementación a nivel de campo queda sujeta a una mayor y más extensiva investigación.

RESUMEN

En pruebas de invernadero se evaluaron los efectos de la inoculación con hongos MVA (*Gigaspora margarita* y *Glomus* spp.) y/o de la adición del producto comercial "Symbiont" (carbón de palma aceitera mezclado con diversos microorganismos antagonistas) sobre la incidencia de *Corticium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, en plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Ponte Rosa) y fresa (*Fragaria vesca* Duchesne var. Hokowase), respectivamente. Un 90% de las plántulas de tomate mostraron síntomas del ataque por *C. rolfsii* en el tratamiento testigo. La incorporación al suelo del producto comercial Symbiont, redujo la incidencia de éste patógeno en un 40%. La adición al suelo de este producto comercial junto con la inoculación de *G. margarita* y/o *Glomus* spp. resultó en la no incidencia de *C. rolfsii*. Por otro lado, la simple inoculación con *G. margarita* y *Glomus* spp. resultó en una disminución de la incidencia del patógeno de un 60% y 20%, respectivamente.

Para el caso de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* la incorporación al suelo de Symbiont redujo el ataque en un 17%. La inoculación con *G. margarita* y/o *Glomus* spp. resultó en una disminución de este patógeno de apenas un 17%. Sin embargo, ambos tratamientos en conjunto resultaron en una disminución de un 33%.

Los efectos de ambas prácticas en el combate biológico de patógenos vegetales del suelo y su posible uso a nivel comercial son discutidos en el presente trabajo.

AGRADECIMIENTO

A la Lic. Lilliana Araya Villalobos, por su ayuda y apoyo constante durante la realización

del presente trabajo. Al Dr. N. Kobayashi por su gentileza en la obtención de los hongos utilizados en el presente trabajo; y a la Agencia de Cooperación Internacional Japonesa (JICA) por el apoyo brindado durante mi estadía en Japón.

LITERATURA CITADA

- BAGYARAJ, D.J. 1984. Biological interactions with VA mycorrhizal fungi. In VA Mycorrhiza. Ed. by C.L. Powell and D.J. Bagyaraj, D.J. Boca Raton, Florida, CRC Press. p. 131-153.
- BALTRUSHATHY, H.; SHONBECK, F. 1972. Untersuchungen über den Einfluss der Endotrophen Mycorrhiza auf die Chlamydosporenbildung von *Thielaviopsis basicola* in Tabakwurzeln. Phytopath. Z. 74:358-361.
- BALTRUSHATHY, H.; SHONBECK, F. 1975. Untersuchungen über den Einfluss der Endotrophen Mycorrhiza auf den Befall von Tabak mit *Thielaviopsis basicola*. Phytopath. Z. 84:172-188.
- DANIELS, B.A.; SKIPPER, H.D. 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In Methods and Principles of Mycorrhizal Research. Ed. by N.C. Schenck. St. Paul, Minn., U.S.A., The American Phytopathological Society. p. 29-36.
- DAVIS, R.M.; MENGE, J.A.; ZENTMYER, G.A. 1978. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on *Phytophthora* root rot of three crop plants. Phytopathology 68:1614-1617.
- DAVIS, R.M.; MENGE, J.A. 1980. Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorus on *Phytophthora* root rot of citrus. Phytopathology 70:447-452.
- DAVIS, R.M.; MENGE, J.A. 1981. *Phytophthora parasitica* inoculation and intensity of vesicular-arbuscular mycorrhizae in citrus. New Phytol. 87:705-715.
- DEHNE, H.W. 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. Phytopathology 72:1115-1119.
- KOBAYASHI, N. 1989. Suppression of *Rhizoctonia*, *Phytophthora* damping-off of cucumber by microorganisms in charcoal and VAM fungi. In International Symposium on Microbial Ecology (ISME 5). (5., 1989, Japan). Recent Advances in Microbial Ecology. Ed. by T. Hattori et al. Kyoto, Japan, Japan Scientific Societies Press. p. 242-246.
- KRISNA, K.R.; BAGYARAJ, D.J. 1983. Interaction between *Glomus fasciculatum* and *Sclerotium rolfsii* in peanut. Can. J. Bot. 61:2349-2351.

- MENGE, J.A. 1978. Mycorrhizal fungi increase growth and reduce transplant injury in avocado. *Calif. Agr.* 32:6-9.
- MEYER, J.R.; LINDERMAN, R.G. 1986. Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. *Soil Biol. Biochem.* 18:191-196.
- MOSSE, B. 1977. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. X. Responses of *Stylosanthes* and maize to inoculation in unsterile soils. *New Phytol.* 78:277-281.
- MOSSE, B. 1988. Some studies relating to "independent" growth of vesicular arbuscular endophytes. *Can. J. Bot.* 66:2533-2440.
- NISHIO, M.; OKANO, S.; YAMAMOTO, T. 1988. Stimulation of Di-nitrogen fixation by alfalfa utilizing VA mycorrhiza. *Bulletin of Green Energy Program. Group. II (Fixation of Matter)* no. 19:113-123.
- OGAWA, M. 1987. Shokobutsu to tsuchi o tsunagu kyoseibiseibutsu kinkon no setaigaku. *Setai to kogaku giyutsu shirizu.* Nobunkyo, Tokyo, Japón. 241 p.
- OGAWA, M. 1989. Inoculation methods of VAM fungi: charcoal ball method and rice hulls method. *In* International Symposium on Microbial Ecology (ISME 5). (5., 1989, Japan). *Recent Advances in Microbial Ecology.* Ed. by T. Hattori *et al.* Kyoto, Japan, Japan Scientific Societies Press. p. 247-251.
- ROSENDAHL, S. 1985. Interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and *Aphanomyces eutiches* root rot of peas. *Phytopath. Z.* 114:31-40.
- SAITO, M. 1988. Charcoal as a micro-habitat for VA Mycorrhizal fungi, and its practical implication. *In* European Symposium on Mycorrhizae. (2., 1988, Czechoslovakia). *Proceedings.* Ed. by M. Fassolo-Bonafante *et al.* Prague, Czechoslovakia. p. 1-6.
- SCHENCK, N.C. 1988. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and the control of fungal root diseases. *In* Innovative Approaches to Plant Disease Control. Ed. L. Chet. New York, Wiley & Sons. p. 179-191.
- SMITH, G.S. 1988. The role of phosphorus nutrition in interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with soil nematodes and fungi. *Phytopathology* 78:371-374.
- ZAMBOLIN, L.; SCHENCK, N.C. 1983. Reduction of the effects of pathogenic, root infecting fungi on soybean by the mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*. *Phytopathology* 73:1402-1405.