

Efecto de microorganismos antagonistas en el control de
la enfermedad denominada “Nectria” en la melina
Gmelina arborea Roxb.

Marena Chavarría-Vega¹
Randall Carmona-Solís²

Resumen

Se evaluaron posibles métodos de control biológico a través de microorganismos antagonistas, por medio de pruebas en laboratorio en las cuales se puso a competir el organismo antagonista contra el agente patógeno causal de la enfermedad denominada “Nectria”, el cual fue determinado en éste mismo estudio. Adicionalmente, se realizaron pruebas de inoculación en vivero, así como ensayos en plantaciones forestales propiedad de la empresa Ethical Forestry S.A. en la Zona Norte de Costa Rica. Los resultados determinaron que el principal agente patógeno de la enfermedad es *Fusarium solani*. Las pruebas de laboratorio en las cuales se confrontaron los microorganismos antagonistas contra el patógeno, demostraron que tanto *Trichoderma harzianum* como *Trichoderma asperellum* generan resultados acertados

Abstract

Effect of antagonistic microorganisms in the control of “Nectria” disease in melina *Gmelina arborea* Roxb.

Possible biological control methods were evaluated by antagonistic microorganisms, through laboratory tests in which the antagonistic organisms were put to compete against the causative pathogen of the disease called “Nectria”, determined in the same study, as well as the evaluation of evidence of inoculation in the nursery and trials in forest plantations of Ethical Forestry S.A. in the Northern zone of Costa Rica. The results determined that the main pathogen of the disease is *Fusarium solani*. Laboratory tests in which the pathogens were confronted against antagonistic microorganisms showed that both *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma asperellum* generated important results in the control

1. Universidad de Costa Rica, Centro de Investigaciones Agronómicas; San José, Costa Rica; marenachavarría@gmail.com

2. Ethical Forestry EFCR S.A.; San Carlos, Alajuela, Costa Rica; randall.carmona@ethicalforestry.com

Recibido: 06/10/2016
Aceptado: 02/03/2016

en el control del patógeno, no obstante se reporta un crecimiento más agresivo de *T. harzianum*. A nivel de vivero, se obtuvieron diferencias importantes en los porcentajes de germinación en los tratamientos de *T. harzianum* más *T. asperellum* (52% superior) y *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter chroococcum* (21% superior) respecto al tratamiento testigo; en cuanto a ensayos de campo la incidencia de la enfermedad en plantaciones de 21 meses de edad ha sido prácticamente nula, además a pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas se ha podido notar un crecimiento superior tanto en diámetro (hasta 1,15 cm en promedio) como en altura (hasta 1,03 metros en promedio) en los tratamientos a base de microorganismos antagonistas.

Palabras clave: Gmelina arborea, Nectria, Fusarium solani, Trichoderma harzianum, Trichoderma asperellum, microorganismos antagonistas, biocontroladores, Costa Rica.

Introducción

Desde 1979, con la creación del programa de incentivos estatales en Costa Rica, la melina se consolidó como una de las principales especies empleadas en los programas de reforestación, debido a su adaptación a gran variedad de condiciones de sitio y, ligado a ello, buen desarrollo silvicultural (Rojas, Arias, Moya, Meza, Murillo y Arguedas, 2004). La experiencia generada con su utilización, para la fabricación de muebles y estructuras para la construcción, han confirmado las grandes fortalezas de la especie en lo que a facilidad para trabajar y aceptación de tintes se refiere (Gonzalez y Serrano, 2004; Moya, 2004; Rojas et al. 2004).

Pese a sus bondades, se reporta que existen serios problemas de mortalidad en grupos de árboles con edades que pueden variar entre los 2 a 5 años principalmente, lo anterior asociado a altas densidades de árboles, suelos inadecuados y el hongo *Nectria sp.* (Arguedas, 2004). Dicho hongo produce canchales en el fuste y ramas en varias especies forestales de importancia en la reforestación y se ha constituido en el principal problema fitosanitario de las plantaciones de *G. arborea* (Arguedas, Chaverri y Millar, 1995).

En Costa Rica, Méndez (2011), puso a prueba algunos tratamientos a nivel curativo para contrarrestar el problema en plantaciones de melina, sin embargo no se obtuvieron los resultados esperados al aplicar distintos productos fungicidas utilizados a nivel agrícola, lo que confirma que revertir el estado de un árbol afectado por la enfermedad ha sido un tema complicado y poco exitoso.

En los últimos años, se ha incrementado el interés en buscar un método de control pero de carácter preventivo,

of the pathogen, however there was a more aggressive growth noted from the antagonist *Trichoderma harzianum*. At the nursery level, important differences in the percentages of germination were obtained in the treatment of *T. harzianum* with *T. asperellum* (52% higher) and *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter chroococcum* (21% higher) with respect to the control treatment, in terms of field trials the incidence of the disease in plantations of 21 months of age had been practically nil. Also, despite not finding statistically significant differences, both diameter (up to 1,15 cm on average) and height (up to 1,03 meters on average) growth in the treatments based on antagonistic microorganisms were notably superior.

Keywords: Gmelina arborea, Nectria, Fusarium solani, Trichoderma harzianum, Trichoderma asperellum, antagonistic microorganisms, biocontrollers, Costa Rica.

lo anterior al estar claro que, controlar el avance de la enfermedad una vez establecida en las plantaciones se convierte en una labor complicada.

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de hongos antagonistas del género *Trichoderma* en el control del patógeno que provoca la enfermedad de la melina denominada *Nectria*, mediante su inoculación tanto a nivel de laboratorio como en plantas de vivero y plantaciones forestales de la empresa Ethical Forestry S.A, en la Zona Norte de Costa Rica.

Material y métodos

La investigación se llevó a cabo en dos fases: la primera contempló el aislamiento del (los) agente(s) causal (es) de la enfermedad de la *Nectria*, para posteriormente colocarlos junto a organismos antagonistas y de esa manera evaluar el efecto en el control de los microorganismos patógenos aislados. En una segunda fase se evaluó la respuesta de los árboles, en cuanto a su resistencia a la enfermedad, mediante la inoculación con hongos antagonistas desde la semilla hasta plantaciones forestales, a continuación se describen las metodologías seguidas:

Fase I. Pruebas de laboratorio

Aislamiento, purificación e identificación de patógenos encontrados en plantaciones de melina afectadas por la *Nectria*

La recolección de muestras de árboles afectados se realizó en finca Cocobolo, ubicada en Coopevega de Cutris, cantón de San Carlos, Alajuela, Costa Rica (Coordenadas Este 84°25'21,972", Norte 10°43'32,16").

En primera instancia se tomaron muestras de la corteza en árboles que mostraban la sintomatología de la enfermedad, asimismo se colectaron muestras de suelo para su posterior análisis en laboratorio.

De los trozos de corteza infectados se aislaron y purificaron todos aquellos microorganismos que estaban presentes en la muestra, con el fin de hacer su identificación molecular utilizando la técnica de extracción de ADN mediante el método CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio). En el caso del suelo se llevó a cabo un recuento microbiológico mediante la técnica de dilución, esto para determinar la presencia de las poblaciones de cualquier patógeno existente, que eventualmente pueden servir como inóculo a otros árboles sanos.

Para garantizar el aislamiento se utilizaron dos distintos métodos:

Las muestras de corteza de melina con la enfermedad, se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de contaminantes presentes en ellos, se hicieron disecciones de 0,5 cm de la zona de avance de la enfermedad, cada trozo se desinfectó con hipoclorito de sodio al 2,5 % por 2 minutos y posteriormente se realizaron cuatro enjuagues con agua destilada; luego, se sembraron los trozos de la corteza fraccionados en secciones de aproximadamente 0,25 cm, en platos Petri con medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA). De los aislamientos obtenidos del tallo, se purificaron mediante la técnica de punta de hifa, la cual consiste en seleccionar la muestra, cortarla, y transferirla a una caja Petri que contendrá medio de cultivo Komoda, que luego se dejó incubar por dos o tres días, hasta observar un crecimiento puro del hongo.

Otro método que se utilizó para el aislamiento de las diferentes estructuras del patógeno, presentes en los trozos de corteza, fue el uso del microscopio, por medio del cual se podían observar estructuras como peritecios y micelio del hongo considerado como *Nectria* sp., esos peritecios germinados fueron aislados y puestos en medios de cultivo para su crecimiento y más tarde se llevó a cabo su purificación.

Una vez aislados los patógenos, fueron enviados al Centro de Investigaciones de la Universidad de Pennsylvania, por medio del Laboratorio de Técnicas Moleculares Aplicadas a la Fitoprotección, se realizó la identificación molecular de cada uno.

Prueba de crecimiento radial del hongo *Fusarium solani* vs *T. harzianum* y *T. asperellum* a nivel de laboratorio

Una vez identificado el patógeno, aros impregnados con las diferentes cepas de *Trichoderma spp.* y de *Fusarium sp.* fueron colocados en platos Petri, los que contenían el medio de crecimiento PDA, con el fin de comprobar si se registraba antagonismo entre ambos hongos.

Los tratamientos evaluados fueron los siguientes:

- a. Crecimiento puro de las diferentes especies de *Trichoderma spp.*
- b. Crecimiento puro de *Fusarium solani*.
- c. *Trichoderma harzianum* + *Fusarium solani*.
- d. *Trichoderma asperellum* + *Fusarium solani*.

En esta etapa se estimaron las siguientes variables:

1. Radios de crecimiento de los hongos para cada uno de los tratamientos de interés.
2. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los hongos antagonistas sobre el patógeno.
3. Grado de micoparasitismo de los hongos antagonistas respecto al hongo patógeno.

Fase II: Pruebas a nivel de campo

Inoculación de plantas en vivero y establecimiento de ensayos a nivel de plantaciones.

Ensayos en vivero

Los tratamientos a nivel de vivero fueron:

1. Solución líquida de *Trichoderma harzianum* (Pr) + *Trichoderma asperellum* con una concentración de 12×10^8 (50 ml/litro de agua).
2. Solución líquida *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter chroococcum* (Fertilizante Líquido con una concentración de 23×10^9 /ml).
3. Tratamiento testigo: no incluye ninguno de los tratamientos anteriores.

Las semillas de cada tratamiento fueron sumergidas por 12 horas en cada una de las soluciones anteriores, transcurrido ese tiempo se llevaron al germinador, en donde fueron colocadas en camas destinadas para tal fin por la empresa, una vez germinadas las plantas fueron trasladadas al invernadero donde se llevó a cabo otra aplicación en forma de aspersión según cada uno de los tratamientos. Las aplicaciones se realizaron tanto al follaje como al sustrato.

Una vez completado el período de vivero, el material fue llevado a los sitios donde se establecieron los ensayos.

Ensayos de campo

Los ensayos se establecieron en finca San Cristóbal, ubicada en la localidad del mismo nombre, Pocosol de San Carlos (Coordenadas Este 84°31'3", Norte 10°48'56") y en la finca Santa Rita, ubicada en La Vasconia de Los Chiles (Coordenadas Este 84°39'30", Norte 10°47'33").

Se establecieron ensayos mediante un diseño de bloques completos al azar, con 4 repeticiones por tratamiento, cada repetición constó de 40 plantas, con un distanciamiento entre líneas de 4 metros y de 2 metros entre árboles.

La selección de los sitios experimentales se basó en aquellos que presentaran condiciones uniformes para establecer cada ensayo y de esa manera reducir al mínimo la variabilidad que pudiera causar variaciones en los resultados que no se debieran estrictamente a los tratamientos evaluados. A cada ensayo se le realizó el mismo manejo silvicultural aplicado como norma a las plantaciones de la empresa, en cuanto a control de malezas, fertilización y podas, entre otros.

Una vez establecidos los ensayos se realizaron aplicaciones cada 15 días de los tratamientos a evaluar, por un lapso de 5 meses. Los tratamientos en campo fueron los mismos aplicados en la etapa del vivero:

1. Solución líquida de *Trichoderma harzianum* (Pr) + *Trichoderma asperellum* con una concentración de 12×10^8 (50 ml/litro de agua).
2. Solución líquida *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter chroococcum* (Fertibiol Líquido con una concentración de 23×10^9 /ml).

Las variables evaluadas en los ensayos fueron las siguientes:

- Diámetro normal o a la altura de pecho (dap): medido a 1,30 m de la base del árbol, el mismo se determinó mediante una cinta diamétrica de lona.
- Altura total: medida con vara telescópica hasta la copa del árbol.
- Incidencia de la enfermedad: se determinó por la presencia de árboles muertos o presencia de sintomatología propia de la Nectria.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un Análisis de Varianza (ANDEVA), para los distintos tratamientos evaluados. Para lo cual se utilizó el software estadístico Infostat Versión 2015.

Discusión y resultados

I Fase: Pruebas de laboratorio

Aislamiento, Purificación e Identificación de patógenos encontrados en plantaciones de Melina.

Se logró determinar la concentración de poblaciones de patógenos, tanto hongos como bacterias, al analizar microbiológicamente muestras de suelo en plantaciones de melina con un alto grado de afectación por la Nectria sp. (Cuadro 1). Dicha condición representa un estado de riesgo latente pero inminente para la plantación en general,

Cuadro 1. Recuento microbiológico del suelo en plantaciones de melina, Finca Cocobolo, Coopevega de Cutris, San Carlos Costa Rica.

Table 1. Soil microbiological count in melina plantations, Finca Cocobolo, Coopevega of Cutris, San Carlos, Costa Rica.

Hongo/Bacteria	Población (UFC/mL)
<i>Fusarium sp</i>	43×10^8
<i>Rosellinia sp</i>	12×10^5
<i>Mucor sp</i>	54×10^8
<i>Erwinia sp</i>	12×10^9

la diseminación de estos patógenos es un problema que incluso puede llegar a afectar a otras plantaciones al encontrarse en las raíces y otros órganos subterráneos, así como en la base de los árboles (Arguedas, 2004).

Una vez aislado, purificado y multiplicado el patógeno de interés para su debida identificación (Figura 1) se obtuvo que, de las 700 bases analizadas, 699 presentaron un 99 % de similitud con *Fusarium solani* (Figura 2). Por tanto, se comprobó que el cancro de la enfermedad denominada Nectria, estuvo principalmente compuesto por el patógeno del género *Fusarium* y la especie *solani*, encontrándose tanto en el suelo como en los árboles evaluados. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Murillo, Badilla, Rojas y Mata (2014), quienes determinaron que el principal agente patógeno en muestras de árboles de melina afectados por Nectria en la Zona Norte y Sur de Costa Rica corresponden a *F. solani*. Al respecto, Dueñas, Shagarodsky, Fresneda, Hernández y González (2007) en la provincias Ciudad Habana y La Habana, Cuba, señalaron que algunos de los síntomas que caracterizan al *F. solani* es la marchitez descendente ocasionada por una necrosis en los vasos conductores que conforman el floema, asimismo al realizar cortes longitudinales a las muestras se pudo observar una coloración marrón en los tejidos afectados, de tal manera que coinciden con los síntomas observados en la enfermedad de la Nectria en árboles de melina.

Prueba de crecimiento radial del hongo *F. solani* vs *T. harzianum* y *T. asperellum* a nivel de laboratorio.

Una vez que se identificó el principal agente patógeno en el árbol, se realizó la confrontación *in vitro* de las diferentes especies de *Trichoderma* spp. frente al patógeno *F. solani*, las cuales registraron radios de crecimiento (RCA) superiores a los del patógeno (RCP) (Figura 3).

Los mayores radios de crecimiento de la cepa Pr (*T. harzianum*) fueron de 45,0 mm, por su parte, para la cepa 2C (*T. asperellum*) fue de 35,33 mm (Figura 3a). Cabe destacar que las cepas del antagonista (Figura 3c y 3d) llegaron a tener un radio de crecimiento muy cercano al de los respectivos tratamientos testigos, de manera que a los ocho días del ensayo en todos los casos lograron



Figura 1. Aislamiento puro de una cepa de *Nectria* sp., en laboratorio.

Figure 1. Isolating a pure strain *Nectria* sp., in laboratory.

cubrir totalmente la superficie de la caja Petri con 42,75 mm de radio. Por otra parte, el crecimiento evaluado para el patógeno (Figura 3b) fue de 25,34 mm, por debajo de los tratamientos testigos.

Los radios de crecimiento, en la prueba de antagonismo *in vitro*, registraron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,0001$) entre las especies de *Trichoderma* spp. frente al patógeno *F. solani*, presentando el mayor antagonismo con la cepa Pr (*T. harzianum*) (Figura 4).

Este mayor crecimiento por parte de las cepas de *Trichoderma* podría deberse a que presentan una mejor tasa de incorporación de nutrientes, mayor metabolismo y un crecimiento superior a *F. solani*, utilizando distintos mecanismos, uno de estos es la secreción de enzimas hidrolíticas, entre ellas celulasas, quitinasas, glucanasas, xilasas y muchas veces las proteasas, estas enzimas degradan la celulosa de las paredes celulares de microorganismos patógenos (Benítez, Rincón, Limón, Codón, 2004; Castaño, 2008), de ahí su importancia como mecanismos de biocontrol, permitiéndole al antagonista aprovechar mejor los nutrientes del medio y privar al patógeno de utilizar los recursos disponibles, con lo que limita o inhibe del todo su crecimiento Mukherjee, Mukherjee, Horwitz, Zachow, Berg y Zeilinger (2012).

En cuanto al micoparasitismo (Figura 5), se observó que la cepa 2C logró alcanzar el grado 4 y Pr obtuvo un 3,6, estadísticamente no se observan diferencias significativas entre ellas ($P \leq 0,0001$). El complejo proceso de micoparasitismo consiste de muchos eventos desde el reconocimiento del hospedero, el ataque y la subsecuente penetración y muerte (Benítez et al. 2004), lográndose observar a través del microscopio como en los papeles de celofán se lleva a cabo el entrelazamiento

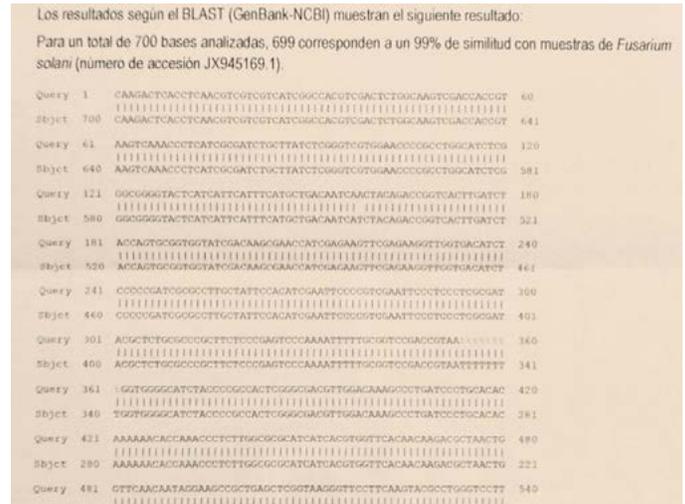


Figura 2. Extracción molecular mediante el método CTAB del hongo *Nectria* sp.

Figure 2. Molecular extraction of fungus *Nectria* sp. by CTAB method.

de las hifas de las diferentes cepas de *Trichoderma* con las del patógeno *F. solani*.

Durante el proceso, *Trichoderma* secreta enzimas que degradan la pared celular del otro hongo, además por la secreción de exoenzimas hidrolíticas disminuyen el crecimiento y la actividad del patógeno. Los hongos *Trichoderma* se adhieren con carbohidratos unidos a lecitinas en la pared celular del patógeno y forma el apresorio para posteriormente iniciar la producción de enzimas que degradan la pared celular (CWDE's) (Benítez et al. 2004).

En lo que respecta al porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), ambos tratamientos lograron superar el 50% de inhibición del crecimiento radial del patógeno *F. solani* (Figura 6), se registraron diferencias significativas entre especies ($P \leq 0,0001$), donde la más efectiva fue Pr con 80,8% de inhibición, mientras que con 2C se alcanzó un 68,4%. De acuerdo con estos resultados se puede concluir que existen diferencias en la capacidad antagónica de las diferentes especies de *Trichoderma*, ya que la cepa de *T. harzianum* mostró ser más efectiva en el combate de *F. solani*; sin embargo, *T. asperellum* mantuvo una inhibición lo suficientemente aceptable para combatir al patógeno.

Es difícil determinar si *Trichoderma* es capaz de ejercer su acción antagonista solamente mediante la competencia, o si por el contrario, otros mecanismos como el micoparasitismo o la antibiosis preparan el escenario para que la competencia se lleve a cabo de una forma más eficaz.

El éxito de cepas de *Trichoderma* como biocontrolador se debe a su alta capacidad reproductiva, su capacidad de sobrevivir bajo condiciones desfavorables, la

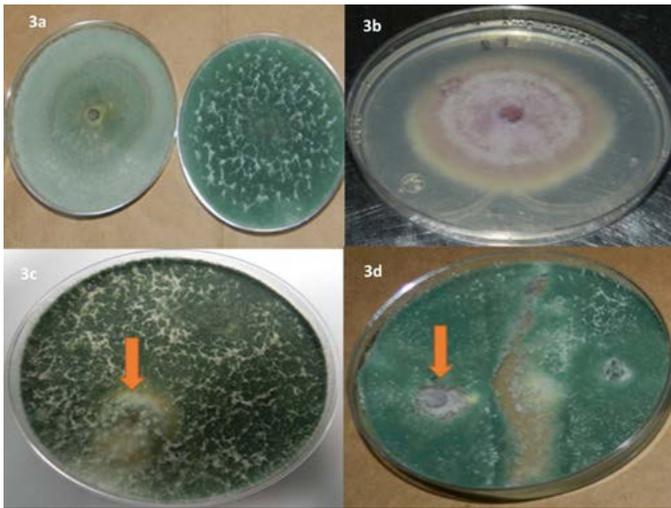


Figura 3. Prueba de antagonismo de *T. harzianum* y *T. asperellum* frente a *F. solani* a los ocho días del ensayo *in vitro*. 3.a) Testigos *T. harzianum* (izquierda) y *T. asperellum* (derecha), 3.b) Testigo *F. solani*, 3.c) *T. harzianum* vs *F. solani* y 3.d) *T. asperellum* vs *F. solani*. Flecha roja: *F. solani*.

Figure 3. Antagonism test of *T. harzianum* y *T. asperellum* in relation with *F. solani* at eight days of assay *in vitro*. 3.a) Control treatment *T. harzianum* (left) y *T. asperellum* (right), 3.b) Control treatment *F. solani*, 3.c) *T. harzianum* vs *F. solani* y 3.d) *T. asperellum* vs *F. solani*. Red arrow: *F. solani*.

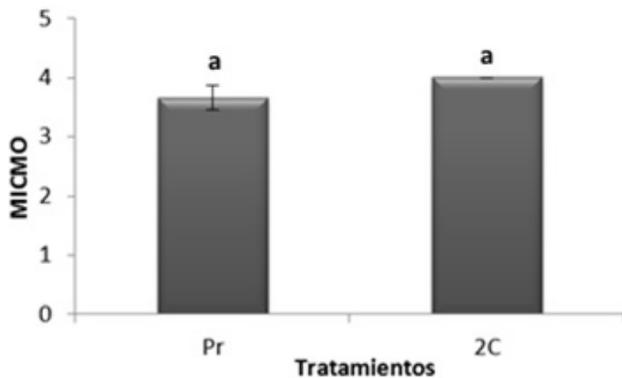


Figura 5. Grado de micoparasitismo (MICMO) correspondiente a cultivos duales de *T. harzianum* y *T. asperellum*, frente a *F. solani*, al octavo día de evaluación. (Letras diferentes indican diferencias significativas para Tukey P=0,05. Las barras verticales representan el error estándar. Escala de capacidad antagónica: 0= ninguna invasión, 1= Invasión de 1/4, 2= Invasión de 1/2, 3= Invasión total, 4= Invasión total con esporulación sobre ella).

Figure 5. Mycoparasitism stage (MICMO) for dual cultivates of *T. harzianum* and *T. asperellum*, against *F. solani*, at eighth day of evaluation. (Different letters indicate significant differences Tukey P = 0,05 Vertical bars represent the standard error. Scale antagonistic capacity: 0 = none invasion, 1 = 1/4 of invasion, 2 = 1/2 invasion, 3 = total invasion, 4 = total invasion with sporulation on it).

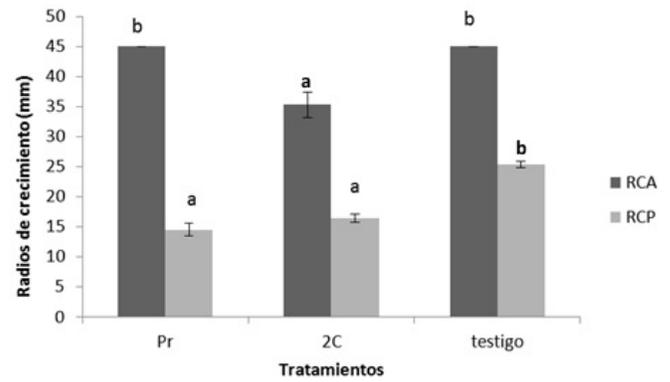


Figura 4. Radios de crecimiento del patógeno (RCP) y del antagonista (RCA), correspondientes a cultivos duales de *T. harzianum* y *T. asperellum* frente a *F. solani*, al octavo día de evaluación. (Letras diferentes indican diferencias significativas para Tukey P=0.05. Las barras verticales representan el error estándar. (Todos los testigos alcanzaron el máximo crecimiento).

Figure 4. Radios pathogen growth (RCP) and the antagonist (RCA) covering dual cultivates of *T. harzianum* and *T. asperellum* against *F. solani*, at eighth day of evaluation. (Different letters indicate significant differences Tukey P = 0.05. The vertical bars represent the standard error. (All control treatments growth peaked).

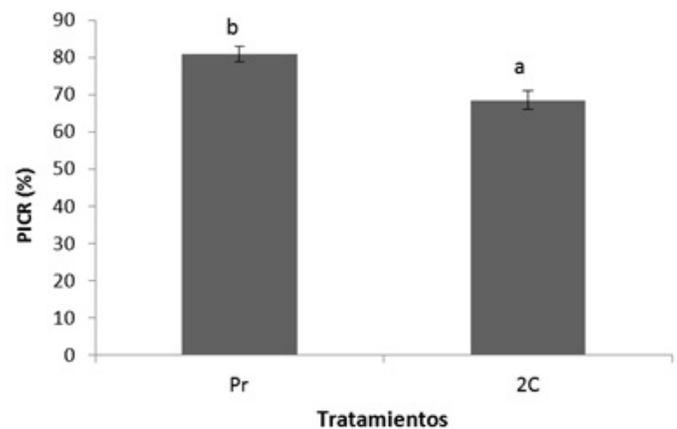


Figura 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), correspondientes a cultivos duales de *T. harzianum* y *T. asperellum* frente al patógeno *F. solani*, al octavo día de evaluación. (Letras diferentes indican diferencias significativas para Tukey P=0,05. Las barras verticales representan el error estándar).

Figure 6. Percentage inhibition of radial growth (PICR) covering dual cultivates of *T. harzianum* and *T. asperellum* against the pathogen *F. solani*, the eighth day of evaluation. (Different letters indicate significant differences Tukey P = 0, 05. The vertical bars represent the standard error).

Table 2. Number of sown seeds vs sprout seeds, Ethical Forestry, Santa Rosa of Pocosol.

Tratamiento	N° de semillas sembradas	N° de plántulas germinadas	% Germinación	Embriones germinados de más
T3-Testigo	611	647	106%	36
T1-Trichoderma	485	764	158%	279
T2-Fertibiol	537	683	127%	146

eficiencia en la utilización de nutrientes, la capacidad de modificar la rizósfera, fuerte agresividad contra hongos fitopatógenos y la eficiencia en la promoción del crecimiento de las plantas y de los mecanismos de defensa, estas propiedades han hecho de *Trichoderma* un género que se encuentra presente en cualquier hábitat y en densidades de población altas (Chet et al., 1997 citado por Benítez et al., 2004).

Fase II: Pruebas a nivel de campo

Inoculación de plantas en vivero y establecimiento de ensayos a nivel de plantaciones

Ensayos de vivero

El cuadro 2 muestra que en la etapa de germinación los mejores tratamientos fueron T1 y T2 en ese orden, el antagonista *Trichoderma* crece muy bien en pH ácidos, con humedad relativa alta y temperaturas elevadas, condiciones que se encuentran presentes en el invernadero. Caso contrario a lo que sucede con el Fertibiol el cual cuenta una serie de cepas de bacterias, que muchas veces se ven afectadas por pH ácido, debido a que estas crecen mejor en pH más básicos; no obstante, la cantidad de embriones generados fue sumamente alta en comparación con el testigo.

Asimismo, es de esperar un mejor desarrollo de raíces en las plantas tratadas con los hongos biocontroladores. Mukherjee et al. (2012) resaltan la capacidad de *Trichoderma spp.* para colonizar las raíces de las plantas, posteriormente el hongo produce auxinas que promueven el crecimiento de la raíz. Donoso, Lobos y Rojas (2008) y Romero, Crosara y Baraibar (2008) concluyeron que la inclusión de *T. harzianum* en plantas de vivero mejoró significativamente el desarrollo radicular de las plantas de *Pinus taeda*, *Pinus radiata* y *Eucaliptus grandis*. De igual forma, Solano, Mata y Murillo (2015) concluyen que la inclusión de *Trichoderma spp.* en etapa de vivero para plantas de melina favorecen el crecimiento y desarrollo radicular de la misma.

Por su parte, Fernández (2001) menciona que uno de los usos de *B.subtilis* como agente de control biológico es el tratamiento de semillas, ya que además de poseer un efecto antagonista influye positivamente en la germinación, desarrollo y rendimiento del cultivo debido a

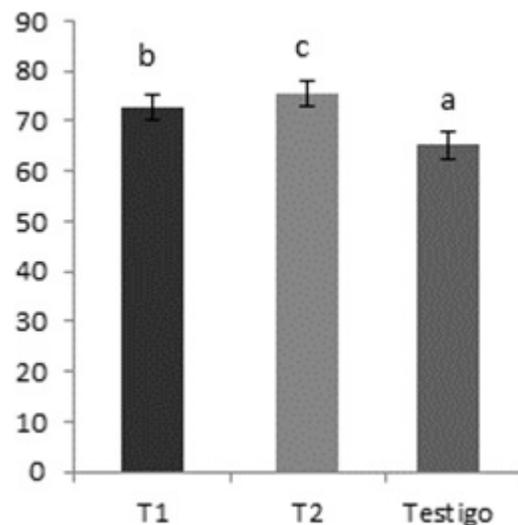


Figura 7. Altura promedio (cm) por tratamiento a los 6 meses de edad, ensayo de biocontroladores. Finca Santa Rita, La Vasconia de los Chiles. Costa Rica.

Figure 7. Average height (cm) by treatment at 6 months, biocontrol assay. Finca Santa Rita, La Vasconia of Los Chiles. Costa Rica.

la producción de sustancias promotoras del crecimiento y al mejoramiento de la nutrición de las plantas.

Ensayos de campo

A los 6 meses de edad se evaluó la altura de los árboles establecidos en los ensayos de investigación, los resultados mostraron que los tratamientos con mejor crecimiento a esa edad fueron en los que estuvieron involucrados microorganismos antagonistas como *T. harzianum* y *T. asperellum* (T1), *B. subtilis*, *P. fluorescens* y *A. chroococcum* (T2), microorganismos que tuvieron mucha adaptabilidad a las condiciones de suelo y ambiente de la zona, estadísticamente se observaron diferencias significativas tanto entre los tratamientos como también entre ellos y el testigo ($p < 0,0001$), mostrándose una tendencia a tener alturas superiores en el tratamiento 2 (Figura 7).

La segunda evaluación de campo, a la edad de 21 meses registró resultados similares a la primera medición. Estadísticamente no se han encontrado diferencias

Cuadro 3. Diámetro promedio en ensayo de biocontroladores en plantaciones de melina, a los 21 meses de edad años. Finca Santa Rita, La Vasconia de los Chiles, Alajuela.

Table 3. Average diameter in the biocontrol assay of Melina plantations, at the age of 21 months. Finca Santa Rita, La Vasconia of Los Chiles, Alajuela.

Tratamiento	Medias	E.E.	
T2-Fertibiol	9,52	0,57	A
T1-Trichoderma	8,82	0,59	A
T3-Testigo	8,49	0,58	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

significativas ($p < 0,0001$), sin embargo, los valores promedio tanto para el diámetro como para la altura mostraron crecimientos superiores en los tratamientos donde se han aplicado los microorganismos antagonistas (Cuadros 3 y 4), lo que sugiere un efecto positivo que debe ser más evaluado.

Castaño (2008) menciona que una de las características de las diferentes especies de *Trichoderma* es el rápido crecimiento micelial y abundante producción de esporas que ayuda a la colonización de diversos sustratos del suelo, asimismo se ha encontrado que algunas especies de *Trichoderma* especialmente *T. harzianum* tienen el potencial de aumentar el crecimiento y desarrollo de las plantas, esto parece deberse a la inhibición de patógenos menores y a la producción de factores que estimulan el crecimiento de la planta y favorecen la toma de nutrientes.

Por su parte, las bacterias del grupo de *P. fluorescens* y las del género *Bacillus* son consideradas promotores del crecimiento, las cuales estimulan la síntesis de sustancias reguladoras del crecimiento, fijan nitrógeno y solubilizan fósforo (Fernández, 2001; Cano, 2011). Asimismo, se ha determinado que algunas cepas de *B. subtilis* han tenido un efecto antagónico importante sobre el patógeno *F. solani*, llegando a alcanzar hasta un 67 % en la inhibición en el crecimiento del micelio de este hongo (Villa, Alfonso, Rivero, Gonzalez, 2007); de igual forma Fernández (2001) citando a Torres et al. (2001) mencionaron que al realizar pruebas in vitro con *Pseudomonas sp.* y *B. subtilis*, estos microorganismos mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos del suelo, entre ellos *F. solani*.

En lo que corresponde a la incidencia de la enfermedad de la Nectria en los ensayos de campo, esta resultó prácticamente nula, se infiere que la influencia de las poblaciones de microorganismos antagonistas ha resultado muy positiva hasta este momento como mecanismo de control preventivo de la enfermedad. Paralelamente, las labores silviculturales que se realizan normalmente en las plantaciones, como la preparación de terrenos, control efectivo de malezas, enclado,

Cuadro 4. Altura promedio en ensayo de biocontroladores en plantaciones de melina, a los 21 meses de edad. Finca Santa Rita, La Vasconia de los Chiles, Alajuela.

Table 4. Average height in the biocontrol assay of Melina plantations, at the age of 21 months. Finca Santa Rita, La Vasconia of Los Chiles, Alajuela.

Tratamiento	Medias	E.E.	
T2-Fertibiol	11,9	0,77	A
T1-Trichoderma	11,06	0,78	A
T3-Testigo	10,75	0,79	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

podas en época seca y curado preventivo de podas, entre otras; contribuyen a reducir significativamente los índices de afectación de la enfermedad en las plantaciones de Ethical Forestry S.A. principalmente al minimizar las causas de estrés en los árboles. Adicionalmente, se debe ser muy cauteloso ya que la enfermedad se manifiesta con más intensidad alrededor de los 2 años en adelante, por tanto aún consideramos necesario realizar mayor seguimiento a estos ensayos.

Conclusiones y recomendaciones

Fusarium solani fue identificado como el principal agente causal de la enfermedad de la Nectria.

Los microorganismos antagonistas *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma asperellum* fueron efectivos en disminuir los radios de crecimiento de la Nectria.

Los bloques de plantación donde se han establecido los ensayos con aplicaciones de microorganismos antagonistas desde la etapa de vivero hasta campo, registraron muy buena respuesta en cuanto a la prácticamente nula incidencia de la enfermedad, aunque se debe ser cauteloso tomando en cuenta que las plantaciones aún son jóvenes (alrededor de 2 meses de edad).

Los resultados sugieren que la inoculación con biocontroladores u organismos antagonistas, tanto en las plantas, desde el vivero hasta aplicaciones en el campo como parte de la preparación del terreno, deben tomar mayor importancia en la actividad forestal al demostrar un efecto positivo en retrasar la aparición de la enfermedad, desde luego siempre y cuando se ajusten a las condiciones de costos de la actividad.

Agradecimiento

A Ethical Forestry S.A por el financiamiento y participación durante el desarrollo de esta investigación, así como a cada uno de los miembros involucrados de una u otra forma en este proyecto.

Referencias

- Arguedas, M. (2004). Problemas fitosanitarios de la melina (*Gmelina arborea*) en Costa Rica. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 1(2), 9.
- Arguedas, M., Chaverri, P. y Millar, C. (1995). Cancro *Nectria* sp. en especies forestales. *Serie Plagas y enfermedades forestales N° 18*. ITCR-CIT: Cartago, Costa Rica.
- Benítez, T., Rincón, A., Limón, M. & Codón, A. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7, 249-260.
- Cano, M. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: *Micorrizas*, *Trichoderma spp.* y *Pseudomonas spp.* *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), 15-31.
- Castañó, J. (2008). *Evaluación de la capacidad antagonista "in vivo" de aislamientos de Trichoderma spp.* frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. (Trabajo de grado para optar por el título de Microbiólogo Agrícola y Veterinario). Pontificia Universidad Javeriana: Bogotá Colombia.
- Donoso, E., Lobos, G. y Rojas, N. (2008). Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. *Revista Bosque*, 29(1), 52-57.
- Dueñas, J., Shagarodsky T., Fresneda J., Hernández Y. y González J. (2007). Caracterización de especies del Género *Fusarium* en el cultivo de Garbanzo (*Cicer arietinum*) en las provincias Ciudad de Habana y La Habana. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 11(32), 63-66.
- Fernández, O. (2001). Mecanismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 62, 96-100.
- González, G., Serrano, R. 2004. Propiedades y utilidades de la madera de melina (*Gmelina arborea* Roxb) procedente de árboles plantados en Costa Rica. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú* 1(1). 1-9. Costa Rica.
- Méndez, A. (2011). *Evaluación de tratamientos para el manejo de Nectria sp. en plantaciones de Gmelina arborea en Santa Rosa de Pocosal, Alajuela*. (Tesis de Licenciatura), Instituto Tecnológico de Costa Rica: Cartago, Costa Rica.
- Moya, R. (2004). Wood of *Gmelina arborea* in Costa Rica. *New Forests*, 28(2-3), 299-317.
- Mukherjee, M., Mukherjee, P., Horwitz, B., Zachow, C., Berg, G., Zeilinger, S. 2012. *Trichoderma-Plant-Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control*. *Indian Journal of Microbiology*, 52(4), 522-529.
- Murillo, O., Badilla, Y., Rojas, F. y Mata, X. (2014). Uso de biocontroladores y materiales tolerantes a los patógenos asociados al síndrome de la muerte descendente de la teca (*Tectona grandis*) y cancro *Nectria* de la melina (*Gmelina arborea*). (51 p). Costa Rica.
- Rojas, F., Arias, D., Moya R., Meza, A., Murillo, O. y Arguedas, M. (2004). *Manual para productores de Melina (Gmelina arborea) en Costa Rica*. (160 p). Cartago, Costa Rica.
- Romero, G., Crosara, A. y Baraibar, A. (2008). *Trichoderma harzianum*: un biocontrol y biopromotor en viveros de especies forestales. *Ciencia e Investigación Forestal*, 14(2), 335-345.
- Solano, L., Mata, X., Murillo, O. 2015. Efecto de extractos de metabolitos de dos aislados nativos *Trichoderma sp.* sobre el crecimiento y desarrollo de brotes juveniles de melina (*Gmelina arborea* Roxb. ex Sm.) bajo condiciones de minitúnel. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú* 12 (29). 53-68. Costa Rica.
- Villa, P., Alfonso, I., Rivero, M. y González, G. (2007). Evaluación de cepas de *Bacillus subtilis* bioantagonistas de hongos fitopatógenos del género *Fusarium*. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 41(1), 52-56.