



TECNOLOGÍA *en marcha*

Contenido

Introducción

William Rivera Méndez 3

Aislamiento de esporas y evaluación de métodos de inoculación en la producción de micorrizas en cultivos trampa

Spore isolation and evaluation of inoculation methods in the production of mycorrhizae in trap crops

Wendy Aguilar-Ulloa, Priscilla Arce-Acuña, Fiorella Galiano-Murillo, Terry J. Torres-Cruz 5

Aislamiento e identificación de *Ascochyta phaseolorum* proveniente de un cultivo de *Sechium edule* en Costa Rica

Isolation and identification of *Ascochyta phaseolorum* from a field of *S. edule* in Costa Rica

W. Watson, R. Fuentes, J. Madrigal..... 15

Antagonismo de *Trichoderma sp.* ante el patógeno *Stromatinia cepivora* en el cultivo de cebolla

Trichoderma's anthagonism in front of the pathogen *Stromatinia cepivora* in onion crops

William Rivera-Méndez, Karla Meneses-Montero, Claudia Zúniga-Vega, Jaime A. Brenes-Madriz 22

Control microbiológico como experiencia de sostenibilidad local en la agricultura centroamericana

Microbiological control as experience of local sustainability in Central American agriculture

William Rivera-Méndez..... 31

Control biológico del hongo *Sclerotium cepivorum* utilizando *Trichoderma asperellum* en el cultivo del ajo en Costa Rica

Biocontrol fungus *Sclerotium cepivorum* using *Trichoderma asperellum* in garlic crops in Costa Rica

William Rivera-Méndez, Claudia Zúniga-Vega, Jaime Brenes-Madriz..... 41

Identificación y caracterización molecular del hongo causante de la pudrición blanca en *Allium cepa*, en Llano Grande de Cartago, Costa Rica

Isolation and identification of causal agent of white rot in *Allium cepa*, in Llano Grande Cartago, Costa Rica

Wendy Aguilar-Ulloa, Priscilla Arce-Acuña, William Rivera-Méndez..... 51

Actividad antagonista de *Gliocladium sp.* contra *Sclerotium cepivorum*

Antagonist activity of *Gliocladium sp.* against *Sclerotium cepivorum*

Humberto Castillo, Randall Rojas, Manuel Villalta 57

Gliocladium sp., agente biocontrolador con aplicaciones prometedoras

Gliocladium sp., important biocontrol agent with promising applications

Humberto Castillo, Randall Rojas, Manuel Villalta 65

Aislamiento, identificación y patogenicidad de *Hirsutella* en *Planococcus citri*

Isolation, identification and pathogenicity of *Hirsutella* in *Planococcus citri*

Kevin Asdrúbal Quesada-Sojo, William Rivera-Méndez 74

Hirsutella, agente biocontrolador de ácaros e insectos de importancia agronómica

Hirsutella as biological controller agent of mites and insects of agricultural importance

Kevin Asdrúbal Quesada-Sojo, William Rivera-Méndez 85

Introducción

*Master William Rivera Méndez
Profesor e Investigador, Escuela de Biología
Centro de Investigación en Biotecnología
Correo electrónico: wirivera@itcr.ac.cr. Tel: (506) 25509094*

La agricultura ha sido uno de los principales avances de la humanidad, y ha abierto la vía para el asentamiento de los seres humanos y la formación y consolidación de la civilización. Se ha formado como un proceso milenario de introducción de técnicas y tecnologías que actualmente enfrenta el reto de alimentar a una población creciente en áreas cada vez más reducidas de tierra.

No obstante algunos de los avances tecnológicos enfocados hacia la producción de alimentos han resultado tener efectos nocivos a largo plazo en el medio ambiente y en la salud de los seres humanos. La apuesta decidida desde el siglo XX por el empleo de moléculas agroquímicas de baja especificidad y fertilizantes sintéticos cuya materia prima son los hidrocarburos, ha acarreado un sinnúmero de efectos secundarios adversos que están perfectamente escritos y planteados en abundante literatura científica desde 1960.

La mayor parte de estos efectos adversos tiene que ver con el desarrollo de afecciones en el ser humano, entre ellos el aumento en las tasas de cáncer, afecciones en la piel, en los ojos, en el sistema digestivo y las vías respiratorias, el debilitamiento de tejidos del corazón, de las arterias, del vaso, del hígado y los riñones. Además de las innumerables intoxicaciones en trabajadores y personas cercanas a las fincas.

En el apartado del medio ambiente también se han producido muchos resultados adversos. Se destacan la contaminación de fuentes de agua, superficiales o subterráneas. El caso de las superficiales, se afectan los ecosistemas marinos y de los ríos. En el caso de la contaminación de fuentes subterráneas generalmente la afectación impacta directamente sobre las poblaciones cercanas, pues éstas constituyen su agua de consumo. Se genera también un daño irreparable a las comunidades microbianas del suelo, lo que afecta la textura y por ende el grado de erosión. Se producen enfermedades y envenenamiento en animales. Además se da un desplazamiento de poblaciones de insectos benéficos y enemigos naturales.

Es en este contexto donde aparece el control biológico de plagas y enfermedades como una alternativa para asegurar la sanidad y la calidad de los cultivos como una menor afectación hacia los ecosistemas días y el ser humano. El control biológico es un campo de trabajo que integra conocimientos ecológicos, ancestrales o actuales, dentro de los sistemas de producción agrícola. Ha sido definido como el uso de algún organismo vivo para controlar el crecimiento de poblaciones que intervengan contra el aprovechamiento de los cultivos por parte de los seres humanos. En este sentido, se trata de controlar que el organismo causal de una enfermedad o un insecto plaga mediante otro organismo vivo.

El control biológico no busca la erradicación de las plagas o de los agentes causantes de enfermedades, sino que busca una regulación adecuada entre las diferentes poblaciones que constituyen el agroecosistema. Da soluciones tecnológicas e innovadoras a problemas de manejo de plantaciones mediante el fortalecimiento de los sistemas naturales de defensa u la introducción controlada de nuevas especies de organismos.

El Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica tiene dentro de sus facilidades un Laboratorio de Biocontrol, que se encarga precisamente del desarrollo de alternativas de control biológico para las necesidades de algunos cultivos importantes para el esquema económico del País. En éste se desarrollan actividades de investigación en torno a la caracterización y aplicación de especies con potencial antagónico o entomopatógeno, la producción a pequeña y mediana escala de microorganismos, el estudio molecular de la respuesta sistémica mediada por organismos benéficos y patogénicos, y el uso de controladores biológicos en cultivos agrícolas.

La carrera de Ingeniería en Biotecnología también contribuye en la formación de profesionales que son capaces de buscar la innovación en los sistemas de producción a través del uso y manejo de controladores biológicos. En este proceso de formación se destacan los cursos de "Procesos biotecnológicos con el empleo de hongos" y "Aspectos moleculares de la Fitopatología".

Este número de la revista de Tecnología en Marcha, publica una serie de investigaciones desarrolladas por investigadores del laboratorio de Biocontrol y por estudiantes de los cursos anteriormente mencionados. Las publicaciones incluyen investigaciones realizadas en laboratorio y campo, algunas revisiones especializadas que acompañen a los artículos de investigación y un artículo sobre el desarrollo del control microbiológico en el ámbito centroamericano desde la óptica del desarrollo sostenible. Es un esfuerzo de investigadores, docentes y estudiantes tiene como objetivo principal mostrar cómo se puede utilizar la docencia como una vía para el mejoramiento de las capacidades de investigación en pro del beneficio del sector productivo nacional. Además recalca el esfuerzo de los investigadores por buscar soluciones a problemáticas que afectan a sectores productivos muy vulnerables, como los son los productores agrícolas nacionales.

En el laboratorio de Biocontrol buscamos la vinculación con los sectores productivos agrícolas, y esta edición de la revista responde a esa relación, donde valoramos la capacidad científica como una forma de mejorar la producción, proteger el medio ambiente y aumentar el beneficio social.

Aislamiento de esporas y evaluación de métodos de inoculación en la producción de micorrizas en cultivos trampa

Spore isolation and evaluation of inoculation methods in the production of mycorrhizae in trap crops

Wendy Aguilar-Ulloa¹, Priscilla Arce-Acuña², Fiorella Galiano-Murillo³,
Terry J. Torres-Cruz⁴

Fecha de recepción: 27 de marzo del 2015
Fecha de aprobación: 6 de agosto del 2015

Aguilar-Ulloa, W; Arce-Acuña, P; Galiano-Murillo, F; Torres-Cruz, T. Aislamiento de esporas y evaluación de métodos de inoculación en la producción de micorrizas en cultivos trampa. *Tecnología en Marcha*. Edición Especial Biocontrol. Pág 5-14.

- 1 Estudiante de Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tel. 86879975, correo electrónico: w.aguilar0@hotmail.com
- 2 Estudiante de Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tel. 6052-0515, correo electrónico: priarce.30@gmail.com
- 3 Estudiante de Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tel. 88768755, correo electrónico: fiogaliano@hotmail.com
- 4 Estudiante de Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tel. 84401809, correo electrónico: terryjari@gmail.com

Palabras clave

Micorriza; simbiosis; esporas; *Phaseolus vulgaris*; crecimiento.

Resumen

Los microorganismos del suelo desempeñan un importante papel en la agricultura; entre ellos están las micorrizas que generan una gran cantidad de beneficios para las plantas. En la presente investigación se tomaron muestras de suelo y raíz de plantas de vainica; se aislaron esporas por el método de tamizado y decantación; se realizó conteo de esporas y tinción de raíces y luego se determinó el porcentaje de colonización. Además, se inocularon 15 macetas con cada uno de los diferentes tratamientos (esporas, suelo y raíces) y se sembraron semillas de frijol en cada una. Luego de un mes, se midió la longitud de la raíz y el tallo de todos los tratamientos. Además, para determinar el desarrollo del inóculo en cada tratamiento se precisó la cantidad de esporas producidas y el nivel de colonización de las raíces. La longitud del tallo y de la raíz de las plantas evaluadas no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos. El método de inoculación con esporas presentó el mayor porcentaje de micorrización. Los métodos de inoculación que favorecieron más la producción de estructuras reproductivas fueron los tratados con las esporas aisladas y los tratados con raíces; de igual forma, ambos presentaron la mayor cantidad de esporas germinadas. Para cultivos como frijol o vainica, se recomienda utilizar como inóculo las raíces de plantas infectadas.

Keywords

Mycorrhiza; symbiosis; *Phaseolus vulgaris*.

Abstract

Soil microorganisms play an important role in agriculture, among them we find mycorrhizae, which generate to the plant a great quantity of benefits. In this investigation we took soil and root samples from bean plants. Spores were isolated by the method of wet sieving and decanting. We did a spore count and stained roots and then determined the percentage of AMF colonization. We inoculated 15 pots with each treatment; spores, soil and roots, and we planted bean seeds on each one of them. A month later we measured the length of the roots and stems of every treatment. Also, to determine the inoculum development we determined the quantity of spores produced and the percentage of AMF colonization of the roots. Roots and stems length of the plants evaluated did not present statistically significant differences among the different treatments. The spore inoculation method presented the higher mycorrhization percentage. The methods of inoculation that favored the production of reproductive structures were the treatments with isolated spores and roots; also both of them presented the higher quantity of germinated spores. We recommend for use in crops like beans to use root inoculum from infected plants.

Introducción

En la actualidad, la necesidad de obtener cultivos con altos rendimientos y calidad en periodos cortos de tiempo ha llevado al empleo de prácticas agronómicas que dependen de productos agroquímicos. Sin embargo, estas prácticas pueden causar un impacto negativo sobre el medio y con ello la degradación de los recursos naturales, la erosión genética y la contaminación ambiental (Pérez, Rojas & Montes, 2011; Terry et al., 2013). Ante esta situación, la biotecnología agrícola se ha convertido en un campo importante de conocimiento científico y de nuevas

tecnologías que tienen como finalidad principal reducir el uso de productos químicos peligrosos y prácticas agrícolas que tengan efectos perjudiciales sobre el entorno, a la vez que se mantienen o aumentan los rendimientos (Terry et al., 2013).

Los microorganismos del suelo desempeñan un papel importante en el contexto agrícola, debido a que contribuyen al funcionamiento de los ecosistemas terrestres, ya que permiten tanto la recuperación de suelos dañados como la sustitución parcial o total de los fertilizantes minerales; además de su bajo costo de producción y la posibilidad de ser producidos a partir de recursos renovables (Cruz et al., 2014). Para estudiar las comunidades de organismos y ecosistemas se han desarrollado diversas investigaciones. Por ejemplo, los hongos son los organismos más estudiados debido a su papel como descomponedores primarios y su participación en los ciclos biogeoquímicos (Cuadros et al., 2011).

Los hongos formadores de micorrizas son uno de los componentes principales de las comunidades microbianas rizosféricas que permiten establecer relaciones de simbiosis con alrededor del 90% de las plantas vasculares. Son importantes principalmente para lograr una mayor absorción de nutrientes, niveles mayores en la producción de hormonas y clorofila, incremento en la vida útil de las raíces, tolerancia al estrés (abiótico y biótico), mejora de las condiciones del suelo y en el establecimiento de relaciones sinérgicas con otros microorganismos (Paillacho, 2010; Mohammadi et al., 2011). Por lo tanto, ha cobrado gran importancia el estudio de técnicas para aislar y evaluar el rendimiento de estos organismos con el fin de aplicarlos al suelo como biofertilizantes, ya que constituyen una alternativa para la solución de problemas de propagación, aclimatación y nutrición, al reducir los costos de producción y permitir sistemas más eficientes y sostenibles (CORPOICA, 2008; Cruz et al., 2014).

El frijol o vainica (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa más importante en el consumo humano a nivel mundial, especialmente en Centroamérica y Suramérica, debido a sus cualidades nutritivas, diversidad de variedades y alto contenido de proteína (Ulloa et al., 2011). Este cultivo ha sido utilizado en varias investigaciones como trampa para la producción de micorrizas, por su susceptibilidad para ser colonizado por ellas y su rápido crecimiento (Paillacho, 2010; Liriano et al., 2012). En esta investigación se evalúan varios métodos de inoculación para producir micorrizas en cultivos trampa de vainica.

Metodología

Las muestras se obtuvieron en un cultivo de vainicas de la zona de Carrillos Altos de Poás, provincia de Alajuela. Para tomar muestras de la rizosfera de la planta se utilizó un palín, haciendo un corte de 15 cm de profundidad, 20 cm de ancho y 20 cm de largo. Las muestras se colocaron en bolsas y se desmenuzaron. También se tomaron muestras de raíces, que se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de los análisis.

Tinción de raíces

Se pesó 1 g de raíces (secundarias y terciarias) y se lavaron por dos minutos con agua abundante, luego se colocaron en tubos Falcon. Se procedió a realizar la clarificación adicionando hidróxido de potasio (KOH) al 2,5% hasta que todas las raíces quedaron cubiertas y se mantuvieron en baño maría a 90 °C durante una hora. Posteriormente, se decantó el hidróxido de potasio (KOH) y se adicionó ácido clorhídrico (HCl) al 2% durante una hora a temperatura ambiente. Luego se decantó el HCl y se lavaron las raíces con agua. Finalmente, se agregó tinta china como colorante y se dejó en baño maría a 90 °C durante una hora; transcurrido este tiempo se decantó y las raíces se depositaron en placas de Petri con glicerol. Las placas se mantuvieron refrigeradas hasta el día de la evaluación.

Determinación del nivel de colonización

Por cada unidad experimental se prepararon cuatro placas y en cada una se colocaron cinco trozos de raíces teñidas. Las raíces se observaron utilizando un microscopio de luz en objetivo 10X para contar los campos colonizados con estructuras de micorrizas dentro de ellas (hifas, arbuscúlos y vesículas) y los no colonizados. En algunos casos se requirió utilizar el objetivo 40X para detallar las diferentes estructuras de las micorrizas. El porcentaje de colonización se determinó mediante la observación de las placas en el microscopio dividiendo el número de campos colonizados por el total de campos observados y multiplicando el resultado por 100.

$$\% \text{ colonización} = \left(\frac{\text{campos colonizados}}{\text{campos totales observados}} \right) \times 100$$

Aislamiento de esporas

Se tomaron cuatro muestras de suelo de 25 g y se colocaron en *beakers*. Los agregados de suelo se trituraron con una espátula. A cada *beaker* se le añadieron 250 mL de agua destilada y las suspensiones se agitaron por una hora. Estas suspensiones se hicieron pasar por tamices apilados (850µm, 250µm, 106µm y 63µm). Se añadió agua del tubo para facilitar el movimiento de las esporas. El material retenido en los tamices de 106µm y 63µm se colocó en tubos Falcon y se suspendió en agua, se centrifugó por tres minutos a 2000 g y se removió el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en una solución de sacarosa al 50% y se centrifugó por dos minutos a 2000 g. El sobrenadante se hizo pasar por un papel filtro Whatman 5 y se hicieron dos lavados con agua destilada, utilizando un sistema de filtración al vacío. Los diferentes papeles filtros se colocaron en placas de Petri y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento del conteo.

Conteo de esporas

Los papeles filtro en los cuales se retuvieron las esporas, colocados en placas de Petri, se observaron con un estereoscopio para realizar el conteo del número de esporas presentes y del número de esporas germinadas presentes en las muestras.

Pruebas de inoculación para cultivos trampa

Para determinar el efecto del método de inoculación en la producción de cultivos trampa se realizaron pruebas con plantas de vainica utilizando diferentes tratamientos: testigo, inoculación con esporas, inoculación con suelo e inoculación con raíces. Para realizar la inoculación con esporas, se utilizaron las obtenidas con el método de tamizaje y decantación, previamente descrito. Se seleccionaron las esporas utilizando el microscopio y se colocaron en papel filtro en triángulos. Para iniciar el cultivo se utilizaron aproximadamente 200 esporas por maceta. Las esporas en los triángulos de filtro se lavaron en un orificio de 2 cm de profundidad realizado en el sustrato de cada una de las macetas (figura 1a). Se cubrieron con tierra y se incubaron por cuatro días, antes de sembrar sobre ellas las semillas de la planta huésped. Para la inoculación con suelo se pesaron 100 g de la muestra de suelo seco y se mezclaron en igual proporción con tierra estéril. Para el montaje del tratamiento con inoculación con suelo en las macetas se agregó una capa de tierra estéril, seguida de la mezcla de tierra con la muestra de suelo y finalmente otra capa de tierra estéril (figura 1b). Posteriormente, se sembraron las semillas de la planta hospedera. En el caso de la inoculación con raíces, estas se colocaron en una maceta con tierra estéril como se muestra en la figura 1c. Luego se sembraron las semillas de la planta hospedera. Las macetas se mantuvieron en invernadero durante el tiempo de la prueba.

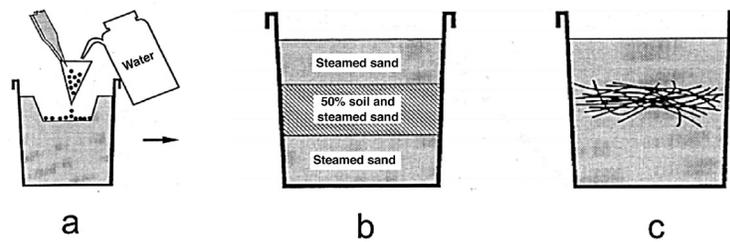


Figura 1. Inoculación con micorrizas. a) inoculación con esporas, b) inoculación con suelo y c) inoculación con raíces. Fuente: Habte y Osorio, 2001.

Evaluación del inóculo producido en los cultivos trampa

Transcurrido un mes, se midió la longitud de la raíz y del tallo de todas las muestras. Para determinar el desarrollo del inóculo se obtuvo la cantidad de esporas producidas mediante el método de tamizaje y decantación y el nivel de colonización de las raíces. En este caso, para el nivel de colonización se realizaron las siguientes modificaciones al procedimiento anteriormente descrito: se utilizó KOH al 10% durante 15 minutos, HCl al 10% durante 12 minutos y la tinción se agregó al fondo de los tubos durante 15 minutos. Además, en lugar de glicerol se utilizó una gota de aceite de inmersión para fijar las muestras al portaobjetos.

Resultados

Luego de verificar la normalidad o no de los datos se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, con la comparación de pares para los resultados de la longitud de tallo y raíz de las plantas evaluadas en los diferentes tratamientos, y se encontró que no existía una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ($p_{raiz} = 0,7442$; $p_{tallo} = 0,1957$) tanto para raíz como para tallo, con un 5% de significancia. Se realizó un ANOVA para el número de esporas totales y las esporas germinadas de cada uno de los tratamientos con una significancia del 5%; se encontró que estadísticamente existía una diferencia significativa entre los tratamientos con respecto al número de esporas totales ($p = 0,0049$), mientras que no había diferencia significativa entre los tratamientos con respecto al número de esporas germinadas ($p = 0,0782$). En el cuadro 1 se presentan las medias del número de esporas totales y el número de esporas germinadas obtenidas con la prueba de Tuckey, en la cual la media mayor es la del tratamiento de las esporas. Estadísticamente, los tratamientos con inóculo de esporas e inóculo de raíces presentan un mejor rendimiento en la germinación de esporas.

Cuadro 1. Prueba de Tuckey para el número de esporas y la germinación de las mismas, obtenida en los distintos tratamientos de inoculación.

Tratamiento	Media de número de esporas totales	Media de número de esporas germinadas
Testigo	121,60 A	1,00 A
Inoculación con suelo	170,60 AB	1,80 AB
Inoculación con esporas	233,60 B	3,80 A
Inoculación con raíces	232,40 B	4,60 A

En el cuadro 2 se presenta el porcentaje de colonización inicial y de los diferentes tratamientos evaluados, observándose que el tratamiento de inoculación con esporas fue incluso mayor que el porcentaje inicial de colonización.

Cuadro 2. Porcentaje de colonización de las micorrizas mediante los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Porcentaje de colonización
Inicial	70%
Testigo	10%
Inoculación con esporas	75%
Inoculación con suelo	25%
Inoculación con raíz	25%

En la figura 2 se muestran las estructuras micorrícicas observadas en los tratamientos durante el conteo de esporas y en la determinación del porcentaje de colonización.

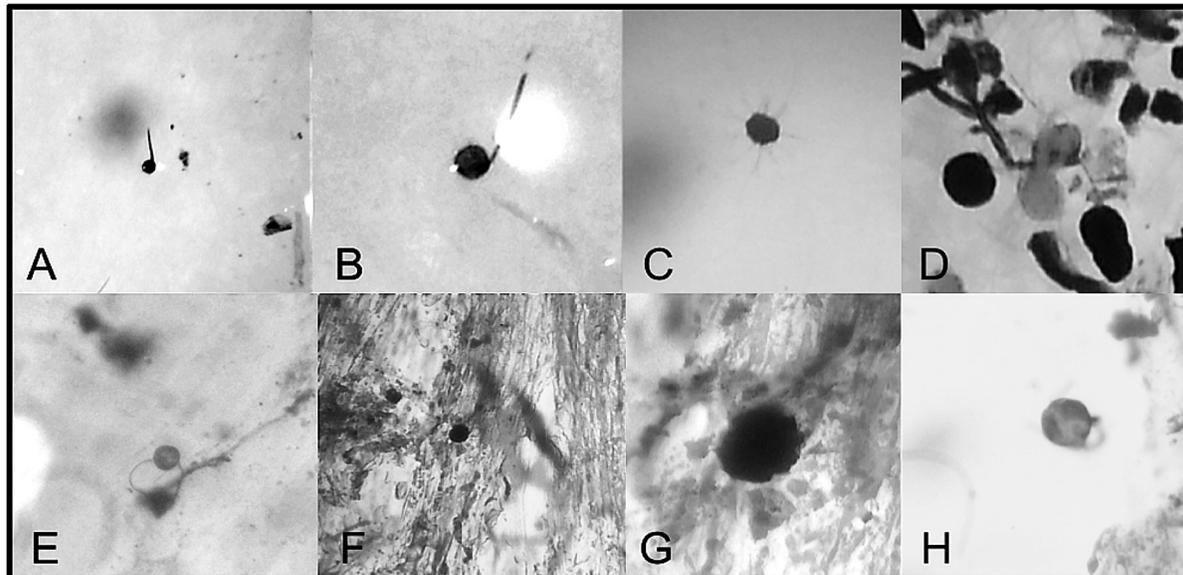


Figura 2. Esporas observadas en los distintos tratamientos. *Durante el conteo de esporas:* A) Germinada en el control (30X). B) Germinada en inoculación con esporas (30X). C) Germinada en inoculación con suelo (30X). D) Germinada (blanca transparente) en inoculación con raíz (30X). *Durante la determinación del nivel de colonización:* E) Espora observada en el control (1000X). F) Espora observada en inoculación con esporas (400X). G) Arbusculo observado en inoculación con suelo (1000X). H) Espora observada en inoculación con raíz (1000X).

En la figura 3 se muestra la morfología de las esporas observadas en los tratamientos evaluados, caracterizadas por su coloración, tamaño y forma.



Figura 3. Morfología de las esporas observadas al microscopio. **A)** Espora negra con borde irregular de forma globosa circular y espóra parda de forma globosa circular y con sus bordes lisos. **B)** Esporas amarillas con bordes lisos y forma globosa. **C)** Espora de color blanco con bordes regulares de forma circular (400X).

Discusión

La vainica y el frijol común pertenecen al grupo de las leguminosas, plantas caracterizadas por la fijación de nitrógeno de la atmósfera mediante la asociación con *Rhizobium phaseoli*, así como la fijación de fósforo gracias a la capacidad de asociarse con micorrizas, por lo que se utilizan como cultivo trampa para realizar ensayos con micorrizas (Gamboa, 2005). El efecto más importante que producen las micorrizas en los hospederos es un incremento en la absorción de nutrientes minerales del suelo, que se traduce en un mayor crecimiento y desarrollo. La principal causa de este efecto es la expansión del micelio externo del hongo por el suelo rizosférico, que permite la captación de los nutrientes más allá de la zona de agotamiento que se crea alrededor de las raíces (Paillacho, 2010).

En la investigación realizada por Aravena (2007) en plantas de aguacate y cítricos se observó que ninguna de las variables (altura, diámetro, materia seca radicular y aérea) afectó el crecimiento final de las plantas. Se conoce que las respuestas a la micorrización tienden a ser menores en suelos ricos en fósforo. La concentración de fósforo presente en el sustrato que se utilizó durante las pruebas no se midió, por lo que dicho elemento podría tener influencia en los resultados obtenidos en los ensayos.

Otro factor que se debe tener en consideración, y que eventualmente podría explicar la falta de diferenciación en el crecimiento de las plantas, es el tiempo transcurrido entre la inoculación y las mediciones realizadas. Plantas que se encuentran en condiciones de invernadero, con fertilización y riego controlados, y pese a porcentajes de colonización adecuados, pueden no expresar respuestas en el crecimiento debido al tiempo de exposición a la acción de las micorrizas, lo que genera un enmascaramiento de la efectividad de la micorrización (Aravena, 2007).

Dado que las micorrizas vesículo-arbusculares no se desarrollan en cultivos puros, se emplea una planta trampa susceptible a la micorrización, como la vainica, para la multiplicación de esporas del hongo (Paillacho, 2010). Para cultivos de crecimiento rápido como el maíz y el frijol, se deja el cultivo trampa por un periodo de tres (Paillacho, 2010) a cuatro meses (Habte & Osorio, 2001). En las pruebas realizadas por Kohashi y Aguirre (2002), se obtuvo que 30 días después de la siembra las plantas de frijol común inoculadas empezaron a inducir un mayor desarrollo vegetal que el testigo. Para generar un cultivo trampa se debe utilizar una planta de crecimiento rápido, que se adapte a las condiciones de crecimiento, que sea colonizada por micorrizas fácilmente y que produzca una gran cantidad de raíces en un tiempo relativamente corto (45-60 días). Por estas y otras razones es que se seleccionó el frijol.

Para asegurarse de que la mayoría de las esporas en el inóculo estén maduras, es esencial el crecimiento del cultivo trampa durante 12 a 14 semanas (Habte & Osorio, 2001). Tomando en

cuenta los resultados obtenidos en cuanto al crecimiento, se hace necesario un estudio con un mayor tiempo de evaluación (más de un mes después de la siembra) para poder determinar mejor el efecto de la micorrización en el desarrollo de las plantas de vainica (Aravena, 2007). En cuanto al desarrollo radical, en un estudio en frijol se determinó que la edad de la planta afecta significativamente la masa radical fresca obtenida y que varía con el estado de desarrollo del cultivo, con lo cual se obtuvieron valores mayores en las plantas cosechadas a los 60 días que en plantas evaluadas a los 30 días, en donde los tratamientos no influenciaron la masa radical de las plantas de frijol (Galindo, 2008). La ausencia de diferencias significativas entre la longitud de las raíces en la investigación efectuada podría relacionarse con factores como el periodo de evaluación del ensayo, ya que se requiere un tiempo mayor para encontrar mejoras en el desarrollo radicular de las plantas de frijol.

A su vez, en el cultivo de trigo se determinó que la longitud radical y otras características morfológicas de una planta están establecidas genéticamente y también son influenciadas por las condiciones ambientales. De este modo, de acuerdo con la especie de planta, la longitud radical varía si se modifica la concentración de algún nutrimento del suelo, aunado a esto con el fin de evaluar eficiencia y obtención de nutrimentos del suelo, en las plantas de trigo evaluadas se obtuvo que la longitud radical fue un 23% mayor en un suelo natural que en un suelo estéril (Cruz et al., 1998). Estos resultados demuestran que la longitud radical se ve influenciada por la condición del suelo y la dosis de nutrientes presentes, especialmente fósforo, lo que podría ser una causa por la cual no se obtuvieron diferencias significativas en los tratamientos evaluados en relación con el crecimiento radicular en las plantas de frijol.

Phaseolus vulgaris se caracteriza por desarrollar micorrizas vesículo-arbusculares, por eso es común ver raíces colonizadas con arbuscúlos y otras estructuras fúngicas (Guzmán et al., 1992). Esto justifica que se encontraran esporas y arbuscúlos al teñir las raíces, tal y como se observa en la figura 2. Según Monroy (2004), la colonización se produce más rápidamente a partir de raíces previamente micorrizadas que a partir de esporas, ya que en la raíz tienen mayor viabilidad y desarrollo de estructuras. Sin embargo, en este ensayo ocurrió lo contrario, ya que el mayor porcentaje de colonización fue el tratamiento de inoculación de esporas, lo cual se puede justificar con lo obtenido estadísticamente, ya que el mayor número de esporas viables se obtuvo en los tratamientos de inóculo con raíces y esporas, ya que entre ambos no hubo diferencia significativa pero fueron las mayores medias. En un ensayo efectuado en maíz por Pérez et al. (2012), se obtuvo que a mayor número de esporas en el suelo, mayor porcentaje de colonización de hongos micorrízicos; esto coincide con los datos obtenidos, ya que el tratamiento que obtuvo mayor número de esporas fue el mismo que tuvo un mayor porcentaje de colonización.

Con respecto a la cantidad de esporas en los diferentes tratamientos, se observó que en todos hay presencia de ellas. La formación de esporas comienza entre la tercera y cuarta semana después de la colonización de la raíz. Sin embargo, la extensión de la esporulación se puede ver afectada por la planta hospedera, el suelo y las condiciones medioambientales (León, 2006). Los resultados muestran diferencias entre los tratamientos con respecto a la cantidad de esporas; los inóculos que favorecieron más la producción de estas estructuras reproductivas fueron los tratados con las esporas aisladas y los tratados con raíces, con un promedio de 233,6 esporas/20 g de suelo y 232,4 esporas/20 g de suelo, respectivamente, los cuales corresponderían a aproximadamente 1170 esporas/100 g. Con respecto a la cantidad de esporas aisladas, se ha reportado que puede variar de acuerdo con el tipo de uso del suelo; en el caso de esporas que se han recuperado de potreros, bosques o zonas de recuperación natural, el promedio es de aproximadamente 2000 esporas/100 g de suelo; mientras que en suelos que han sido cultivados (monocultivo o policultivo), los promedios del número de esporas disminuyen a alrededor de 1000 esporas/100 g de suelo. Esto es producto de la alteración de los ecosistemas naturales, ya que al darle diferentes usos y tratamientos al suelo, se influye en la abundancia de esporas y en la composición de especies de las micorrizas arbusculares (León, 2006; Moreira et al., 2012).

A pesar de que los tratamientos no presentan diferencias significativas para la cantidad de esporas germinadas, las medias obtenidas en la prueba de Tuckey muestran que los tratamientos de inóculo con raíces y esporas presentaron la mayor cantidad de esporas germinadas, lo que evidencia la viabilidad de estas estructuras reproductivas de los hongos micorrízicos que colonizaron las raíces de las plantas de vainica.

Sin embargo, se debe tomar en cuenta que en el tratamiento testigo también se contabilizó una presencia importante de esporas, con un promedio de 121 esporas/20 g de suelo. Esto se puede deber a que en los procesos de esterilización de la tierra para cultivar las semillas, las esporas, por ser estructuras que presentan ciertos niveles de resistencia, no se destruyen por completo, en especial las esporas sexuales que usualmente presentan mayor resistencia al calor que las asexuales (García, 2004).

Al estudiar la abundancia y diversidad de micorrizas presentes en una planta hospedera mediante el aislamiento de las esporas, se observa que existen varios factores que pueden afectar la caracterización. Es por eso que se deberían tomar en cuenta aspectos como la capacidad de cada especie para producir esporas, la época y las condiciones del muestreo (León, 2006). A partir de la morfología particular de las esporas observadas se puede determinar que en la rizosfera hay presencia de varias especies de micorrizas, lo que demuestra la diversidad de estos hongos en los suelos de cultivos de frijol.

La morfología de las esporas se puede caracterizar de acuerdo a la coloración, el tamaño y la forma, como se observó en la figura 3. En este caso, se realizó una clasificación básica a partir de la mayor diferenciación observable, que es el color de la espora, y según esta característica se observaron cuatro grupos diferenciados: 1. Esporas negras con borde irregular de forma globosa circular, 2. Esporas pardas de forma globosa circular y con sus bordes lisos, 3. Esporas amarillas con bordes lisos y forma globosa y 4. Esporas de color blanco con bordes regulares de forma circular. Esta agrupación a partir del color no corresponde a ningún tipo de clasificación taxonómica, ya que es necesario contar con una mayor y detallada cantidad de datos para este fin.

Conclusiones

La longitud del tallo y de la raíz de las plantas evaluadas no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos.

El método de inoculación con esporas presentó el mayor porcentaje de micorrización y colonización, en comparación con la muestra inicial utilizada para el aislamiento de las esporas. Los métodos de inoculación que favorecieron más la producción de estructuras reproductivas fueron los tratados con las esporas aisladas y los tratados con raíces; de igual forma, ambos presentaron la mayor cantidad de esporas germinadas.

Para la elaboración de algún producto comercial a base de micorrizas, se recomienda utilizar como inóculo las raíces de plantas infectadas, ya que, a pesar de que el inóculo con esporas aisladas también presentó resultados satisfactorios, el proceso metodológico para el aislamiento es complicado e implicaría mayor inversión de trabajo, tiempo y dinero. Además, para futuros estudios se recomienda no utilizar tierra como sustrato para los cultivos trampa, sino algún otro tipo de material, como arena, que es menos probable que tenga esporas que vayan a influenciar los resultados finales.

Bibliografía

Aravena, C. (2007). *Efecto de la micorrización en plantas de vivero de palto y cítricos bajo diferentes dosis de fertilización*. Obtenido de http://www.avocadosource.com/papers/Chile_Papers_A-Z/A-B-C/AravenaCristian0000.pdf

- Cuadros, G.A., Gómez, R. & Rodríguez, N.F. (2011). Asociación simbiótica entre hongos micorrízicos arbusculares y el sistema radicular de plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.): efecto de la formononetina y la disponibilidad de fósforo en el suelo. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(1), 77-85. Obtenido de http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Archivos/Revista/8_Asociacin.pdf
- Cruz, I., Gayosso, E., Cruz, G., Ortiz, I. & Manske, G. (1998). Colonización micorrízica arbuscular, actividad fosfática y longitud radical como respuesta a estrés de fósforo en trigo y triticale cultivados en un andisol. *Terra*, 16(01), 55-61. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57316107>
- Cruz, Y., García, M., León, Y. & Acosta, Y. (2014). Influencia de la aplicación de micorrizas arbusculares y la reducción del fertilizante mineral en plántulas de tabaco. *Cultivos Tropicales*, 35(01), 21-24. Obtenido de: <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v35n1/ctr03114.pdf>
- Galindo, P. (2008). *Comparación del efecto de inoculación con micorrizas vesículo-arbusculares nativas y comerciales en plantas de frijol (Vigna unguiculata (L.) WALP)*. Tesis de Grado. Universidad de Zulia, Venezuela.
- Gamboa, W. (2005). *Producción agroecológica: una opción para el desarrollo del cultivo del chayote*. San José: Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- García, V. (2004). *Introducción a la microbiología*. San José: Editorial Universidad Estatal a Distancia.
- Guzmán, R., Bethlenfalvay, G. & Ferrera, R. (1992). *The role of V-A mycorrhizae in the transfer of root exudates between associated bean and corn plants under field conditions*. Obtenido de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=MX19940123769>
- Habte, M. & Osorio, N.W. (2001). *Arbuscular mycorrhizas: producing and applying arbuscular mycorrhizal inoculum*. Obtenido de http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/amf_manual.pdf
- Kohashi, J. & Aguirre, J. (junio, 2002). Dinámica de la colonización micorrízica y su efecto sobre los componentes del rendimiento y contenido de fósforo en frijol común. *Agricultura Técnica en México*, 28(1), 23-33. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/608/60828103.pdf>
- León, D. (2006). *Evaluación y caracterización de micorrizas arbusculares asociadas a yuca (Manihot esculenta sp.) en dos regiones de la Amazonía colombiana*. Tesis para optar por el título de microbióloga agrícola y veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana.
- Liriano, R., Núñez, D. & Barceló, R. (octubre, 2012). Efecto de la aplicación de Rhizobium y Micorriza en el crecimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) variedad CC-25-9 negro. *Centro Agrícola*, 39(4), 17-20. Obtenido de http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V39-Numero_4/cag044121877.pdf
- Mohammadi, K., Khalesro, S., Sohrabi, Y. & Heidari, G. (2011). A Review: Beneficial effects of the mycorrhizal fungi for plant growth. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 1(9), 310-319. Obtenido de [http://www.textroad.com/pdf/JAEBS/J.%20Appl.%20Environ.%20Biol.%20Sci.,%201\(9\)310-319,%202011.pdf](http://www.textroad.com/pdf/JAEBS/J.%20Appl.%20Environ.%20Biol.%20Sci.,%201(9)310-319,%202011.pdf)
- Monroy, H. (2004). *Caracterización de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) nativas, en seis coberturas de cítricos en el Piedemonte del Meta*. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Colombia.
- Moreira, F., Huising & Bignell. (2012). *Manual de biología de suelos tropicales. Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo*. México, D.F.: Instituto Nacional de Ecología.
- Paillacho, F.I. (2010). *Evaluación de la efectividad de las micorrizas arbusculares nativas sobre el desarrollo y estado nutritivo del palmito en etapa de vivero, en Santo Domingo de los Tsáchilas*. Tesis de maestría. Escuela Politécnica del Ejército, Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador. Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2892/1/T-ESPE-IASA%20II-002332.pdf>
- Pérez, A., Rojas, J. & Montes, D. (septiembre, 2011). Hongos formadores de micorrizas arbusculares: una alternativa biológica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el Caribe colombiano. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 3(2), 366-385. Obtenido de <http://www.recia.edu.co/documentos-recia/vol-3num2/revisiones/REC-03-02-REV-2-MA-HONGOS.pdf>
- Pérez, Y., Álvarez, J., Mendoza, J., Pat, J.M., Gómez, R. & Cuevas, L. (2012). Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares en maíz con cultivo de cobertura y biofertilizantes en Chiapas, México. *Gayana, Botánica* 69(1), 46-56.
- Terry, E., Ruiz, J., Tejeda, T. & Díaz, M. (2013). Respuesta del cultivo de la habichuela (*Phaseolus vulgaris* L. var. *Verlilli*) a la aplicación de diferentes bioproductos. *Cultivos Tropicales*, 34(3), 5-10. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v34n3/ctr01313.pdf>
- Ulloa, J., Rosas, P., Ramírez, J. & Ulloa, B. (julio, 2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente*, 3(8), 5-9. Obtenido de <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-08/1.pdf>

Aislamiento e identificación de *Ascochyta phaseolorum* proveniente de un cultivo de *Sechium edule* en Costa Rica

**Isolation and identification of *Ascochyta
phaseolorum* from a field of *S. edule* in Costa Rica**

William Watson-Guido¹, Rachel Fuentes-Alfaro²,
Jorge Madrigal-Rueda³

Fecha de recepción: 15 de junio del 2015
Fecha de aprobación: 13 de octubre del 2015

Watson-Guido, W; Fuentes-Alfaro, R; Madrigal-Rueda, J. Aislamiento e identificación de *Ascochyta phaseolorum* proveniente de un cultivo de *Sechium edule* en Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. Edición Especial Biocontrol. Pág 15-21.

1 Ingeniería en Biotecnología. Correo electrónico: willwatgui@gmail.com. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

2 Ingeniería en Biotecnología. Correo electrónico: pfuentes040390@gmail.com. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

3 Ingeniería en Biotecnología. Correo electrónico: joenmaru21@gmail.com. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Palabras clave

Chayote; *Ascochyta phaseolorum*; métodos moleculares; frutos; quelite.

Resumen

El cultivo de chayote (*Sechium edule*) ha incrementado su producción en los últimos años y la exportación del fruto es una fuente importante de ingresos para los productores nacionales. Sin embargo, esta cucurbitácea es atacada por *Ascochyta phaseolorum*, un hongo causante de una enfermedad que produce manchas blancas en los frutos y ocasiona pérdidas importantes para los productores. Para prevenir este daño es importante tener medidas de control adecuadas, basadas en la identificación certera del patógeno. El objetivo general de esta investigación consistió en la implementación de una metodología de identificación con microscopía óptica y a la vez se utilizan métodos moleculares que permiten una identificación correcta del patógeno a partir de material vegetativo de chayote en el campo, para su uso en futuros trabajos de control de esta enfermedad.

La metodología permitió identificar a nivel molecular y con un alto porcentaje de certeza que el patógeno pertenece al género *Ascochyta*; la identificación con microscopía óptica basada en las estructuras del patógeno reveló que se trata de *A. phaseolorum*.

Keywords

Chayote; *Ascochyta phaseolorum*; molecular methods; fruits; quelite.

Abstract

The chayote (*S. edule*) has increased its production in recent years, with the export of fruit as an important source of income for national producers. However, this gourd is attacked by *Ascochyta phaseolorum*, which generates white spots on the fruits that cause significant losses for producers. To prevent such damage is important to have appropriate measures of control, which are based on the accurate identification of the pathogen. Therefore, the overall objective of this research was to implement a methodology for identification by light microscopy and molecular methods that allow accurate identification of the pathogen from plant material of chayote field for future work to control this disease. The methodology identified at the molecular level with a high percentage of certainty that the pathogen belongs to the genus *Ascochyta*, identification by light microscopy-based structures revealed that this pathogen is *A. phaseolorum*.

Introducción

El chayote (*Sechium edule*) es una cucurbitácea comestible que se explota principalmente por su fruto. La variedad cultivada para la producción y exportación de frutos es la conocida como quelite, que se ha empleado durante muchos años y fue desarrollada por agricultores de la zona de Paraíso, en la provincia de Cartago, Costa Rica. Se caracteriza por producir un chayote sin espinas y sin estrías longitudinales, de superficie lisa, forma aplanada y color verde claro (CINPE, 2011).

En Costa Rica existen unas 450 hectáreas (ha) sembradas con este cultivo. El mercado principal de exportación es Estados Unidos y el mercado interno de mayor importancia es el Centro Nacional de Abastecimiento y Distribución de Alimentos (CENADA). Esta hortaliza es la que genera más divisas a nivel nacional (Gamboa, 2005; MAG, 2010).

Las enfermedades y plagas principales que afectan a esta dicotiledónea son la vejiga (*Micovellosiella cucurbiticola*), la sarna (*Phoma cucurbitacearum*), fusariosis (*Fusarium oxysporum*) y peca blanca (*Ascochyta phaseolorum*), que es la más relevante (Somá & Núñez, 2013).

A. phaseolorum apareció en las plantaciones de chayote en la década de los 80 y para la de los 90 se convirtió en la plaga de mayor impacto a nivel nacional. Esto afectó las exportaciones, ya que este hongo ataca principalmente las hojas, tallos y peciolos, produciendo lesiones cafés; asimismo, en el fruto se observan lesiones secas de color blanco con un diámetro pequeño, lo que merma la productividad de la plantación y provoca su descarte (Gamboa, 2005, Somá & Núñez, 2013).

Se han tomado medidas para reducir el daño, como aumentar las distancias de siembra y utilizar Benomyl® y Clorotalonil®, especialmente durante la época lluviosa (Gamboa, 2005; Somá & Núñez, 2013).

El objetivo de esta investigación fue lograr el aislamiento e identificación de *A. phaseolorum*, así como hacer una revisión de su ciclo de vida, lo que permitiría orientar mejor el manejo integral de la enfermedad.

Metodología

El aislamiento *in vitro* de *A. phaseolorum* se desarrolla en medio de cultivo agar papa dextrosa acidificado (PDA ac) a una temperatura de 35 °C durante siete días. Para la identificación morfológica es necesaria la observación microscópica y macroscópica del cultivo puro del hongo. Con ello se observan las estructuras morfológicas que lo caracterizan. Aunque esta es una técnica relativamente antigua, ayuda de una manera rápida a la identificación del hongo.

Para la identificación del patógeno de una manera eficaz se utilizaron métodos moleculares, como la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Poggi *et al*, 2009), que puede identificar el organismo con una mayor presión y en un tiempo relativamente corto.

Se visitó la plantación de chayote de V y C Exportaciones, en Ujarrás, Paraíso, Cartago, donde se tomaron muestras del tejido afectado por el patógeno, presuntamente *A. phaseolorum*. Las muestras se almacenaron en una bolsa y se guardaron fuera del alcance de la luz solar hasta llegar al laboratorio, donde se refrigeraron. Antes de inocularlas en el medio de cultivo se cortaron segmentos de 1 cm² aproximadamente, de tal manera que el segmento tomara parte tanto del tejido afectado y como del tejido con apariencia sana. Los segmentos se colocaron durante un minuto en cloro, luego dos minutos en alcohol y tres minutos en agua, como método de desinfección.

Una vez desinfectados, los segmentos se colocaron en un medio PDA acidificado, cuatro por placa de Petri, y se incubaron a 35 °C por cinco días. Además se realizó un subcultivo utilizando las colonias con morfología similar a los posibles patógenos causales de la sintomatología observada en la planta, para asegurar la pureza del aislado, y se volvió a incubar por cinco días a 35 °C.

Posteriormente, se realizaron observaciones usando un microscopio óptico, en busca de estructuras características que ayudaran a la identificación morfológica del hongo. Las muestras se tiñeron con azul de lactofenol para obtener un mayor contraste.

Para la identificación molecular se realizó una extracción de ADN genómico de micelios macerados en nitrógeno líquido, utilizando el *kit* de extracción Power Soil de MOBIO®, y se hizo un PCR usando los cebadores NS1 y GC-FUNG en el ADN extraído.

Resultados

Los resultados muestran que la plantación presenta lesiones foliares circulares de coloración amarillenta en etapas iniciales y café con un halo amarillo en etapas avanzadas, no delimitadas a las áreas intervenales de la hoja. Además, son de apariencia seca y se encuentran en la mayoría de las plantas, existiendo zonas con mayor incidencia de la enfermedad.

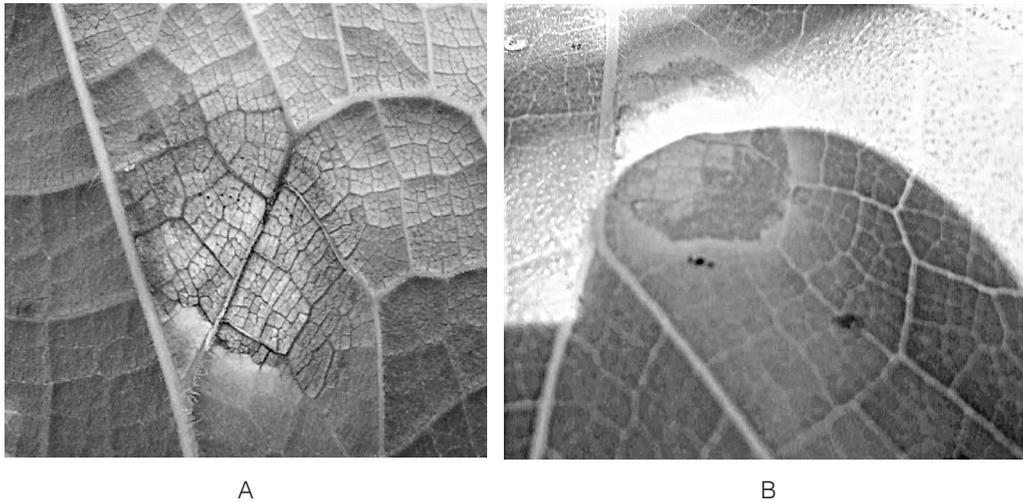


Figura 1. Lesiones de apariencia fúngica en hojas de chayote (*Sechium edule*). A) Envés, B) Haz.

Una vez terminado el tiempo de incubación, se obtuvieron colonias de apariencia filamentososa de color blanco en la parte superior, mientras que en la inferior tenían una coloración oscura.

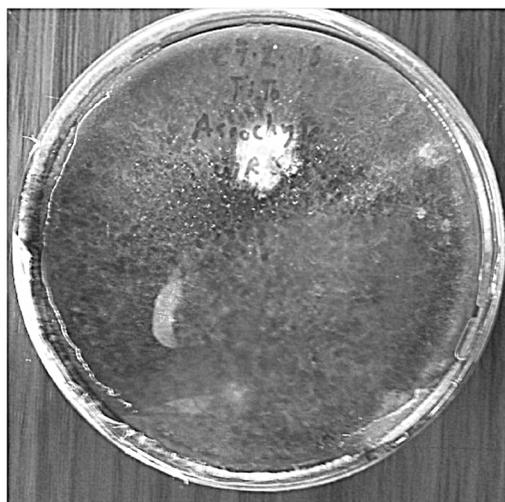


Figura 2. Crecimiento fúngico observado a los cinco días de incubación a 35 °C, a partir de segmentos de hoja.

Al analizar una muestra del micelio a 40X se observó un micelio septado y esporas características del género *Ascomycota*.

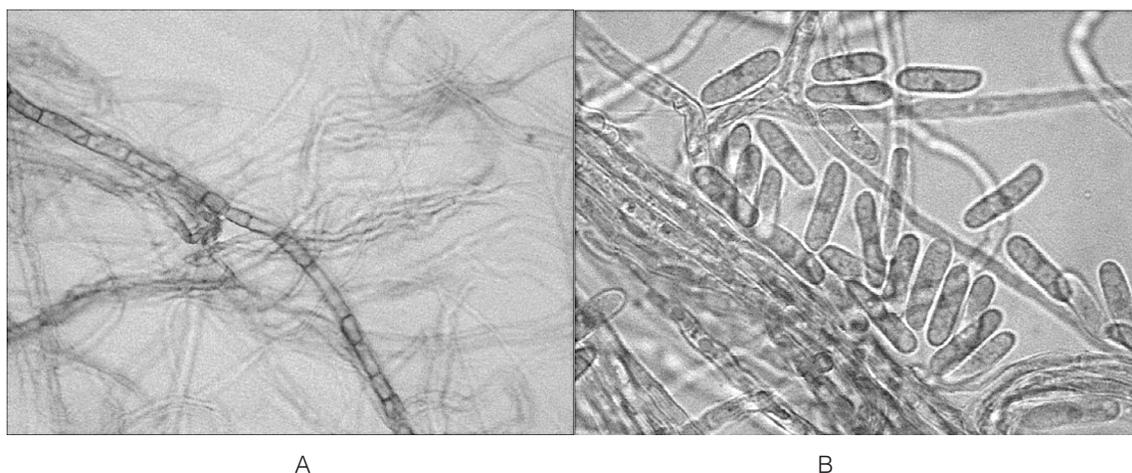


Figura 3. A) Micelio observado en las muestras de hongo a 40X, así como esporas presentes en el cultivo B).

Se amplificó un segmento del ADN aislado a partir de los micelios del hongo, correspondiente a la región codificante para el ARN ribosomal 18S, utilizando los *primers* GC-FUNG y NS1. Una vez obtenido el segmento amplificado, se procedió a su secuenciación.

Al ingresarse la secuencia de ADN obtenida a la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), se observó que el producto de PCR posee un 99% de similitud con la secuencia 18S reportada para el filo *Ascomycota*, grupo al que pertenece *A. phaseolorum* (Boreson, Dillner & Peccia, 2005).

Debido a la poca literatura existente sobre secuencias que permitan la identificación de este patógeno con marcadores moleculares, solo se pudo identificar la división a la que pertenece este hongo.

Discusión

Como se puede apreciar en la figura 1, las hojas de *S. edule* presentan lesiones circulares, secas, quebradizas y no delimitadas por el tejido vascular. Por las características anteriores y la coloración café claro de los halos y la presencia de anillos amarillentos, se concluye en primera instancia que el causante de estas lesiones podría ser *A. phaseolorum* (MAG, 2010; Gamboa, 2005). Esto fue corroborado (figuras 2 y 3) por la presencia de micelio septado y ramificado, así como por conidios con forma bicelular, hialinos y con un solo septo, estructuras características del género *Ascochyta* y que han sido reportadas por De Souza et al. (1996) y Ames (1997) para *A. phaseolorum*.

A. phaseolorum es un patógeno que durante la época lluviosa induce la germinación de conidios, con la posterior formación de apresorios y el inicio de la secreción de enzimas para penetrar las células de la epidermis o los estomas. Una vez dentro de la planta, genera micelio y penetra en las otras células, para lo cual utiliza enzimas como poligalacturonasas, pectinasas, lipasas, celulasas, así como otras hidrolasas. Lo anterior permite que el micelio invada el interior de la célula y una mayor movilización en parénquima que esclerénquima; esto provoca que las células vegetales engruesen sus paredes y reduzcan los espacios intercelulares, lo que se podría deber a la secreción por parte del patógeno de reguladores y señales para evitar que las células colapsen y se lisen por la presión ejercida durante el crecimiento del micelio (Vásquez et al., 1976; Ames, 1997).

Con el paso del tiempo, las áreas infectadas empiezan a sufrir alteraciones, como la formación de protoplasmas granulares y cambio de color en el contenido celular, lo que conduce a la muerte celular. Es por eso que al observar las lesiones en las hojas de chayote se puede ver que el patógeno se expande formando círculos concéntricos desde donde germinó el conidio, siendo las áreas amarillentas donde el patógeno está aumentando su micelio en el interior de las células y alimentándose de los nutrientes celulares, mientras que las zonas café claro o pardo corresponden a las células que están sufriendo los cambios mencionados y el área central con tejido necrótico a las células que han colapsado (Vásquez et al., 1976).

Además, durante la invasión el micelio del hongo destruye los elementos traqueales del xilema, como resultado de la etapa ontogénica y la formación de estructuras teratológicas, mientras que las células parenquimáticas que rodean el haz infectado se comprimen y distorsionan, provocando la deposición de sustancias en los espacios intercelulares (Vásquez et al., 1976).

En una etapa posterior se da la fase de reproducción asexual, con la formación de numerosos picnidios inmersos parcialmente en el tejido, los cuales poseen una abertura al exterior mediante un poro u ostiolo en el extremo superior, a través del cual se liberan los conidios, lo que le permite al patógeno dispersarse e invadir otras hojas y tallos de la misma planta o bien de ejemplares cercanos (Ames, 1997, Rishabh & Rohini, 2009).

Entre los mecanismos de defensa de la planta se pueden mencionar el engrosamiento de las capas de las paredes celulares y la producción de los diferentes compuestos que conforman estas paredes (la producción de suberina y el proceso de lignificación aumentan la resistencia al ataque), siendo este último aspecto de gran relevancia para inhibir la germinación, reducir la capacidad de alargamiento de las hifas e impedir la difusión de enzimas y toxinas del hongo al hospedero, así como de agua y nutrientes del hospedero al hongo. Otro mecanismo para dificultar la invasión es la producción de gomas y mucílago. Se ha determinado que el hospedero utiliza una demarcación histológica que le permite limitar la extensión del patógeno y los metabolitos producidos por éste, como es la síntesis de saponinas, enzimas hidrolíticas, pectinasas y la activación de la respuesta hipersensible, proteínas PR, entre otros mecanismos (Gamboa, 2005; Agrios, 2005; Campos & Flores, 2012).

Conclusiones

Por medio del diagnóstico molecular se reveló que el patógeno pertenece a la división Ascomycota, que incluye a *A. phaseolorum*.

Las estructuras de reproducción del patógeno le permiten diseminarse con facilidad, por lo que es necesario que los productores de chayote implementen un control integrado de plagas, con distancias adecuadas entre las plantas y el uso de fungicidas, a fin de manejar más apropiadamente el cultivo y evitar daños en la planta y sobre todo en el fruto.

Bibliografía

- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. Florida, USA: Elsevier.
- Ames, T. (1997). *Enfermedades fúngicas y bacterianas de raíces y tubérculos andinos*. Lima: Centro Internacional de la Papa.
- Boreson, J., Dillner, A. & Peccia, J. (2005). *NCBI*. Obtenido de [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/40796084?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=TBEBABCS01R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/40796084?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=TBEBABCS01R)
- Campos, L. & Flores, D. (2012). Deshidratación osmótica de placas de chayote (*Sechium edule*) utilizando soluciones hipertónicas de cloruro de sodio y sacarosa. Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana (México).
- CINPE. (2011). *Sector Chayotero*.

- De Souza, M., Fumiko, M., Dudienas, C. & Atsushi, V. (1996). Ocorrência e sintomas da mancha de *Ascochyta* em Feijão-Vagem. *Bragantia*, 55(2), 263-268.
- Gamboa, W. (2005). *Producción agroecológica, una opción para el desarrollo del cultivo de chayote (Sechium edule (Jacq) Sw)*. 1 ed. San José: Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- MAG. (2010). *Cultivo del fruto de chayote*. Cartago.
- Miklós, L. (2009). *Conventional and molecular comparisons of the taxonomy of Phoma-like species*. Debrecen, Hungría.
- Monroy, E., Soto, M., Cadena, J. & Osorio, S. (2009). Estudio biodirigido de un extracto alcohólico de frutos de *Sechium edule*. *Agrociencia*.
- Poggi, H., Guzmán, A., García, P. & Lagos, M. (2009). PCR universal o de amplio espectro: Un aporte de la detección e identificación de bacterias y hongos en la práctica clínica. *Revista médica de Chile*, 137(8), 1122-1125.
- Rishabh, P. & Rohini, P. (2009). *Novel Proteinaceous Compounds as Determinants in Ascochyta rabiei - Chickpea Interaction*. Obtenido de <http://www.odec.ca/projects/2010/pratxp2/summary.html>
- Somá, L. & Núñez, S. (2013). Estudio socio-agronómico de la producción de chayote (*Sechium edule* Jac. Swartz), en los municipios de Villaflores y Villa Corzo, Chiapas, Mexico. Chiapas, México.
- Vásquez, N., Flores, E. & Vargas, E. (1976). Efecto de la interacción de *Ascochyta phaseolorum* y *Pseudomonas* sp. sobre la morfología de los frutos de *Sechium edule* (Cucurbitaceae). *Revista de Biología Tropical*, 34(1), 63-74.

Antagonismo de *Trichoderma* *sp.* ante el patógeno *Stromatinia cepivora* en el cultivo de cebolla

Trichoderma's antagonism in front of the pathogen *Stromatinia cepivora* in onion crops

William Rivera-Méndez¹, Karla Meneses-Montero²,
Claudia Zúñiga-Vega³, Jaime A. Brenes-Madriz⁴

Fecha de recepción: 27 de marzo del 2015

Fecha de aprobación: 6 de agosto del 2015

Rivera-Méndez, W; Meneses-Montero, K; Zúñiga-Vega, C; Brenes-Madriz, J. Antagonismo de *Trichoderma sp.* ante el patógeno *Stromatinia cepivora* en el cultivo de cebolla. *Tecnología en Marcha*. Edición Especial Biocontrol. Pág 22-30.

1 Instituto Tecnológico de Costa Rica, Centro de Investigación en Biotecnología. Apdo. 159-7050, Cartago, Costa Rica. Correo electrónico: wirivera@tec.ac.cr.

2 Instituto Tecnológico de Costa Rica, Centro de Investigación en Biotecnología. Apdo. 159-7050, Cartago, Costa Rica. Correo electrónico: kmeneses@tec.ac.cr.

3 Instituto Tecnológico de Costa Rica, Centro de Investigación en Biotecnología. Apdo. 159-7050, Cartago, Costa Rica. Correo electrónico: czuniga@tec.ac.cr.

4 Instituto Tecnológico de Costa Rica, Centro de Investigación en Biotecnología. Apdo. 159-7050, Cartago, Costa Rica. Correo electrónico: jabrenes@tec.ac.cr.

Palabras clave

Trichoderma; *Stromatinia cepivora*; cebolla; biocontrol.

Resumen

En Costa Rica, el cultivo de cebolla (*Allium cepa*) es una importante fuente de recursos para los pequeños y medianos agricultores. La pudrición blanca provocada por el hongo *Stromatinia cepivora* es una enfermedad importante del cultivo a nivel mundial y en Costa Rica específicamente en la provincia de Cartago (Granados, 2005, 2013; Metcalf et al., 2004). El manejo de *S. cepivora* no es fácil, ya que existen pocos cultivares comerciales resistentes y pocos fungicidas para combatirlo, estos factores hacen que el control biológico sea una opción contra la pudrición blanca. *Trichoderma sp* es un género de hongos que incluye especies utilizadas como agentes de control biológico.

El objetivo de esta investigación consistió en evaluar el antagonismo de aislamientos de *Trichoderma sp.* provenientes de zonas productoras de cebolla de Cartago con respecto a *S. cepivora*. Se realizaron estudios de aislamiento y caracterización de *S. cepivora* y *Trichoderma sp.* a partir de bulbos con síntomas de la enfermedad. Posteriormente, se desarrollaron pruebas de antagonismo *in vitro* e *in vivo* para mostrar la efectividad de las cepas escogidas. La cepa identificada como *T. asperellum* resultó ser antagónica con respecto a *S. cepivora*, tanto en pruebas *in vitro* como en el campo. Esta efectividad estuvo determinada por la interacción de una cepa específica del antagonista frente a un aislamiento del patógeno. Para la aplicación de esta estrategia de manejo es necesario insistir ante los agricultores en la importancia que tienen las medidas que permiten la reducción de los niveles del inóculo, factor fundamental para obtener buenos rendimientos en los cultivos.

Keywords

Trichoderma; *Stromatinia cepivora*; onion; biocontrol.

Abstract

In Costa Rica, the onion crop is an important source of income for small and middle size farmers. The fungus *Stromatinia cepivora*, it has worldwide importance and specifically in Cartago (Granados, 2005, 2013; Metcalf et al., 2004). The control of *S. cepivora* is not easy, there are few resistant and commercial onion varieties and there are not many fungicides for this control. Due to these factors, biological control is a good option against white rot. *Trichoderma* is a soil fungal genus that includes species widely used as biological control agents in agriculture. The objective of the research was to evaluate the antagonism *in vitro* and in the field of *Trichoderma* isolated from producing areas in Cartago, Costa Rica, against *S. cepivora*. Isolation and characterization studies were conducted from onion bulbs with symptoms of the disease. Then antagonism essays were developed to show the effectiveness of selected strains. The strain identified as *T. asperellum* was antagonistic against *S. cepivora*, both *in vitro* and in the field test. This effectiveness was determined by the interaction between a specific antagonistic strain and a specific pathogenic strain. For the application of this control strategy, it is necessary to emphasize to farmers the importance of the actions to maintain the health and the preparation of the soil, which allow for the reduction in the inoculum levels, an essential factor for obtaining good crop yields.

Introducción

En Costa Rica, el cultivo de la cebolla (*Allium cepa*) es una importante fuente de recursos para los pequeños y medianos agricultores de la zona norte de Cartago, Santa Ana de San José y Bagaces de Guanacaste. Según estudios realizados, la producción se estimó en 30,000kg/ha y es una de las hortalizas que más se consumen en el país, principalmente como condimento o acompañamiento de ensaladas (Jáen & Azofeifa, 2010; MAG, 2007).

Entre los problemas que afectan esta actividad productiva, las enfermedades por hongos y bacterias ocupan uno de los principales lugares. Entre ellas se encuentran la enfermedad llamada la pudrición blanca provocada por el hongo *Stromatinia cepivora*, una enfermedad importante de la cebolla a nivel mundial y en Costa Rica específicamente en la provincia de Cartago (Granados, 2005, 2013; Metcalf et al., 2004).

El manejo de *S. cepivora* no es fácil, existen pocos cultivares comerciales de cebolla resistentes y no hay muchos fungicidas para combatirlo; estos factores hacen que el control biológico sea una buena opción contra la pudrición blanca (Metcalf et al., 2004). Uno de los aspectos más difíciles de manejar es la producción de estructuras resistentes por parte del hongo, denominadas esclerocios, que son las responsables de que el patógeno permanezca en el suelo por muchos años (Granados, 2013).

Actualmente, el control biológico de los hongos del suelo, como parte de las estrategias del manejo integrado de plagas, es una de las alternativas más prometedoras para la mejora de la calidad de los cultivos y también para reducir la dependencia de los agroquímicos y la contaminación de los suelos y el ambiente en general. Este tipo de control incide en la reducción del uso de plaguicidas y proporciona además una ventaja competitiva en el mercado (Flores et al., 2007, Granados & Wang, 2008).

Trichoderma sp es un género de hongos del suelo que incluye especies ampliamente utilizadas como agentes de control biológico en la agricultura, además de ser de fácil manejo y rápido crecimiento. Muchas cepas son conocidas por secretar metabolitos secundarios con diferentes actividades biológicas, así como por incrementar el aprovechamiento de los nutrientes por parte de las plantas. Los biofungicidas basados en este hongo comprenden más de 50 formulaciones, disponibles como productos registrados en todo el mundo. Investigaciones recientes han identificado y determinado la función de nuevos genes, enzimas y otras proteínas que producen resistencia inducida en las plantas (Infante et al., 2011; Vinale et al., 2014; Woo et al., 2006).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el antagonismo *in vitro* y en campo de aislamientos de *Trichoderma sp.* provenientes de zonas productoras de cebolla de Cartago con respecto a *S. cepivora*.

Materiales y métodos

Localización y material experimental

Los experimentos y análisis se realizaron en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC). Se emplearon bulbos de cebolla con síntomas de enfermedad de la pudrición blanca. El patógeno se identificó según la metodología descrita por Astorga et al. (2013). *Trichoderma sp.* se obtuvo a partir de cepas seleccionadas, conservadas a -10°C y almacenadas en el CIB, las cuales fueron previamente identificadas (Astorga et al., 2014).

Aislamiento y caracterización de *Stromatinia cepivora* y *Trichoderma* sp.

Se seleccionaron ocho fincas dedicadas a la producción intensiva de cebolla, ubicadas entre 1800 y 2100 metros sobre el nivel del mar (msnm) en la provincia de Cartago. En cada una se marcaron cinco puntos de muestreo y en cada punto se tomaron 200 g de suelo con un palín, a una profundidad de 15 cm. La muestra compuesta resultante (1 kg) se cuarteó hasta dejar 200 g como muestra total de la finca. Las ocho muestras resultantes fueron trasladadas al laboratorio de Biocontrol del CIB.

Con cada muestra se realizaron diluciones seriadas y de la dilución 10^4 se sembraron 0.5 ml en placas con el medio de cultivo TSM, enriquecido para el aislamiento de *Trichoderma*, compuesto por (g/L): 1,0 Ca (NO₃)₂; 0,26 KNO₃; 0,26 MgSO₄ · 7H₂O; 0,12 KH₂PO₄; 1,0 CaCl₂ · 2H₂O; 0,05 ácido cítrico; 2,0 sacarosa; 20,0 agar; 1,0 Flint 50% WG (Trifloxystrobin); 0,005 clortetraciclina; 0,004 Captan® 80% WG, 0,0025 Previcur N (Propamocarb HCl). Las placas fueron incubadas a 25 °C durante cuatro días, al cabo de los cuales las colonias identificadas morfológicamente se resembraron en medios PDA y CMD para su purificación. Estas cepas fueron luego identificadas según la metodología descrita por Astorga et al. (2013).

Para el aislamiento de *S. cepivora* se usó la técnica del tamizado húmedo. De cada muestra de suelo se tomaron 20g de suelo, se mezclaron y homogenizaron con agua destilada durante 2 minutos. Posteriormente se filtraron usando los tamices de 20 mesh (0,84 mm) y 80 mesh (0,25 mm) superpuestos (Cole Palmer®). La fracción recolectada con el tamiz de 20 mesh se descartó. La fracción recolectada con 80 mesh se lavó con agua en flujo constante durante 15 minutos. Los esclerocios presentes fueron seleccionados bajo un estereoscopio (Leyca®) a 5X y se sembraron cinco esclerocios en placas con el medio de cultivo PDA-ac (acidificado) con una solución de ácido láctico al 10%. Se incubaron durante cuatro días a 25 °C. Los esclerocios germinados fueron resembrados en placas con el medio de cultivo PDA para su purificación e identificados según la metodología descrita por Astorga et al. (2014).

Pruebas de antagonismo *in vitro*

Estas pruebas se realizaron siguiendo la técnica de cultivo dual con el medio PDA-ac. En las placas de Petri se colocó un disco del patógeno y otro del biocontrolador, situados en lados opuestos a 1cm del borde (Correa et al., 2007). Posteriormente, se incubaron a 28±1°C. Las mediciones de los diámetros de los dos microorganismos se hicieron a las 120 horas.

La determinación de la capacidad del biocontrolador para combatir al patógeno se valoró mediante el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). Este porcentaje se calculó aplicando la fórmula de Suárez et al. (2008):

$$PICR = \left(\frac{R1 - R2}{R1} \right) 100$$

donde R1 es el radio mayor (radio patógeno como testigo) y R2 es el radio menor (radio patógeno frente al biocontrolador).

Pruebas de antagonismo en campo

Se evaluaron seis parcelas, cada una de 1m de largo por 1m de ancho; tres parcelas con aplicaciones de *Trichoderma* sp. y tres testigos. Se contó el número de plantas sobrevivientes por parcela por mes y se le dio seguimiento durante el ciclo de cultivo.

Resultados y discusión

Identificación y caracterización de aislamientos de *Trichoderma sp* y *S. cepivora*

Se logró obtener diferentes aislamientos de *Trichoderma sp* de las muestras 2, 3, 4 y 8. Debido a la similitud de los morfotipos que se obtuvieron del suelo, de cada una de las fincas se seleccionó uno por muestra, para su posterior identificación. De las muestras 1, 5, 6 y 7 no se obtuvieron aislamientos. En el caso de *S. cepivora* se obtuvieron tres aislamientos procedentes de esclerocios de las muestras 2, 7 y 8. En las muestras de las fincas 1, 3, 4, 5 y 6 no se encontraron esclerocios. En el cuadro 1 se detallan los aislamientos y la ubicación de las fincas de las que fueron obtenidos.

Cuadro 1. Procedencia de los aislamientos obtenidos de *Trichoderma sp.* y *Stromatina sp.* en las fincas evaluadas.

Género del microorganismo y codificación asignada	Altitud (msnm)
Trichoderma, F2	2046
Trichoderma, F3	2083
Trichoderma, F4	1811
Trichoderma, F8	1952
Stromatina, F2	2046
Stromatina, F7	1930
Stromatina, F8	1952

En los organismos purificados en agar CMD, la esporulación se concentra en determinadas zonas siguiendo los patrones de crecimiento asociados a la cepa (figura 1), debido a las características nutricionales de su composición. Estos aislamientos se identificaron posteriormente como *T. asperellum* por sus características morfológicas.

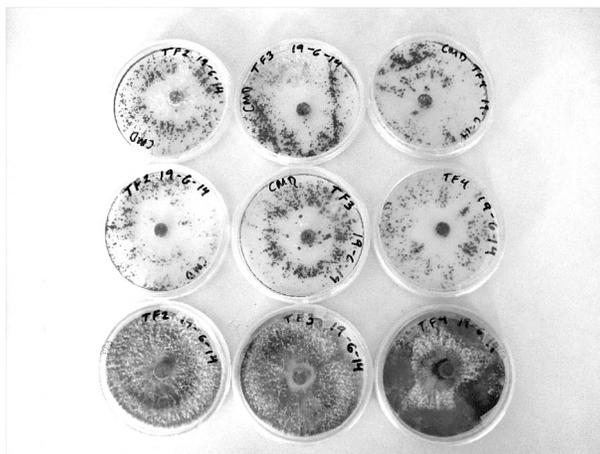


Figura 1. Cepas obtenidas de *Trichoderma sp* que crecieron en agar CMD (las dos filas superiores) y en agar PDA (fila inferior).

Pruebas de antagonismo *in vitro*

Las pruebas de antagonismo son un paso fundamental para evaluar la capacidad de un determinado microorganismo como agente de biocontrol. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) obtenido para cada cepa es un indicador directo de su potencial. Los resultados promedios de los valores obtenidos por las cepas aisladas, tanto del patógeno como del antagonista, establecen diferencias importantes en cuanto a susceptibilidad y agresividad.

Cuadro 2. PICR promedio medido en pruebas de cultivo dual de *Trichoderma asperellum* y *Stromatinia cepivora*.

Aislamientos Trichoderma	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial			
	Stromatinia F2	Stromatinia F7	Stromatinia F8	PICR Promedio
F2	41.09	54.02	42.97	46.03
F3	41.31	56.40	48.73	48.81
F4	70.02	50.56	69.73	63.44
F8	68.95	52.47	72.15	64.52
Promedio PICR	55.34	53.36	58.39	

Las cepas de *T. asperellum* obtenidas de las finca 4 y 8 mostraron los valores más altos de PICR. Estos valores son elevados y muestran un potencial efecto inhibitorio y parasítico contra *S. cepivora*, que a nivel *in vitro* se demuestra por la rapidez con que el microorganismo logra hacer contacto con el patógeno y detener su crecimiento (cuadro 2).

Las cepas obtenidas de *S. cepivora* son afectadas por los aislamientos de *Trichoderma sp.* En este caso, el PICR determinado permite observar de manera indirecta la susceptibilidad del patógeno ante cada una de las cepas evaluadas. Los valores del PICR obtenidos en este caso son muy similares, sin embargo, la cepa más afectada fue la extraída de la muestra de la finca 8, donde los aislamientos del biocontrolador presentan el valor más alto.

El análisis estadístico permitió establecer la normalidad de los datos ($p < 0.010$ en la prueba de Shapiro Wilks). En el análisis de varianza se encontraron diferencias estadísticas entre los valores del PICR de los aislamientos con respecto a *Trichoderma sp* ($p < 0.000$) y con respecto a *Stromatinia* ($p < 0.000$), de forma individual. Además, se determinó la existencia de interacciones entre las cepas de *Trichoderma* y de *Stromatinia* ($p < 0.000$) (cuadro 3). El R^2 fue de 85,47% y el R^2 ajustado de 83,99%. Las diferencias encontradas en los valores de PICR se muestran en el siguiente cuadro:

El análisis del valor del PICR producto de la interacción entre las cepas de *Trichoderma* y *Stromatinia* genera información importante sobre la capacidad antagónica del primero. En el cuadro 3 se destaca que los aislamientos 4 y 8 de *Trichoderma* muestran el mejor efecto antagónico sobre las cepas 2 y 8 de *Stromatinia*. Por el contrario, las cepas 2 y 3 de *Trichoderma* presentan el desempeño más bajo ante los aislamientos 2 y 8 de *Stromatinia*. En ambos casos son las mismas cepas de *Stromatinia*, es decir, la diferencia en el PICR la marca la capacidad intrínseca de la cepa del biocontrolador y no la capacidad de defensa del organismo atacado.

El fenómeno de antagonismo entre hongos está mediado por una serie de mecanismos de ataque y respuesta desarrollados por el biocontrolador y el patógeno por controlar. *Trichoderma*

sp dispone de una gran variedad de mecanismos de ataque; entre los más conocidos se encuentran el parasitismo, la antibiosis, la competencia por nutrientes y espacio, la liberación de enzimas que afectan el metabolismo de otros microorganismos, la activación de respuesta de defensa por parte de la planta, la estimulación de la germinación y el crecimiento (Infante et al., 2009; Harman, 2006; Howell, 2003; Lorito et al.; 1990). Estos mecanismos y su intensidad varían entre especies y cepas aisladas. Por lo tanto, se puede afirmar que las cepas de *Trichoderma* T4 y T8 presentan el mejor control contra *Stromatinia*.

Cuadro 3. Comparaciones establecidas del valor medio del PICR de las cepas mediante la prueba Tukey al 95% de confianza.

<i>Trichoderma</i> * <i>Stromatinia</i>	Media PICR	Grupo
T8*S8	72,149	A
T4*S2	70,084	A
T4*S8	69,727	A
T8*S2	68,955	A
T3*S7	56,398	B
T2*S7	54,018	BC
T8*S7	52,466	BC
T4*S7	50,560	BC
T3*S8	48,729	CD
T2*S8	42,966	DE
T3*S2	41,308	E
T2*S2	41,086	E

El potencial determinado para los aislamientos 4 y 8 de *Trichoderma* los ubica como buenos candidatos para la ejecución de pruebas in vivo y pruebas de producción semimasiva, con fines de inserción en planes de manejo integrado en el cultivo de cebolla. Sin embargo, en pruebas de campo se debe verificar su eficiencia y el papel de elementos como la concentración de inóculo, la dispersión, la resistencia a factores ambientales y las técnicas de aplicación.

Pruebas de antagonismo en campo

En la figura 2 se muestran los porcentajes de supervivencia de las plantas en las parcelas en estudio, a las cuales se les aplicó *Trichoderma* como microorganismo antagonista del hongo *S. cepivora*. Se puede observar que tanto en la finca 1 como en la finca 2 el porcentaje fue mayor cuando se utilizó *Trichoderma* sp. como biocontrolador del hongo patógeno.

Las relaciones de organismos antagónicos, al igual que cualquier proceso patológico, están mediadas en buena parte por la genética de las respuestas de defensa de un microorganismo ante los ataques de otro. En las relaciones de plantas y microorganismos, la activación de genes P y R, cuyas proteínas modulan una serie de reacciones enzimáticas y no enzimáticas, es una de las bases de los procesos de enfermedad, susceptibilidad y resistencia.

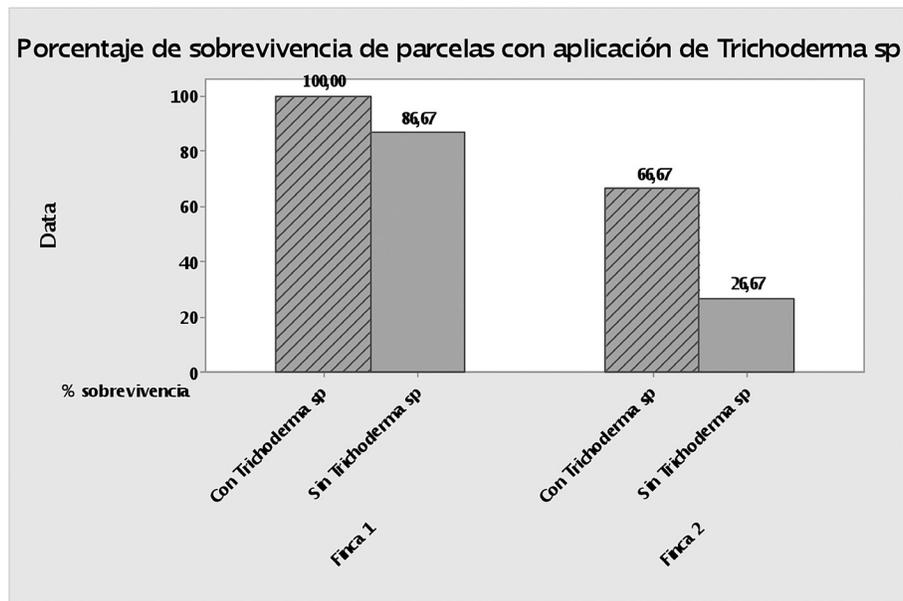


Figura 2. Porcentajes de supervivencia de plantas de las parcelas con y sin aplicación de *Trichoderma*.

De la misma forma, los organismos biocontroladores interactúan con los microorganismos blanco, provocando una serie de acciones y reacciones que tienen su origen en la información genética de cada uno. En la variedad de estrategias de biocontrol, el género *Trichoderma* activa una serie de genes, relacionados principalmente con proteínas de reconocimiento transmembrana, formación de apresorios, producción de enzimas hidrolíticas y antibióticos (Mukherjee et al., 2012).

Cuando un hongo ha desarrollado una o varias estrategias que le permiten atacar las células de otro con éxito, es porque los mecanismos de defensa han sido superados y se establece un proceso infeccioso. En este sentido, los mecanismos evolutivos de los organismos juegan un papel determinante. Sin embargo, este ataque exitoso puede tener diferentes grados de efectividad, que se deben a diferencias genéticas específicas de los microorganismos que intervienen o a factores ambientales, en el caso de pruebas in vivo. Estas diferencias específicas son las que se buscan en los programas de control biológico de plagas o enfermedades, donde, a pesar de tener aislamientos que representan una misma especie, se pueden encontrar cepas con un potencial superior (Dennis & Webster, 1971a,b; Bell et al., 1982). El hecho de que un microorganismo pueda desarrollar estrategias de biocontrol y otro organismo sea susceptible o resistente a éstas es, a largo plazo, un reflejo de la capacidad adaptativa de cada uno (Ehler et al., 2003).

Conclusiones

T. asperellum resultó ser efectiva para controlar el hongo *S. cepivora* en el cultivo de la cebolla tanto en pruebas *in vitro* como en el campo, en las parcelas evaluadas.

La evaluación desarrollada permite disponer de cepas con poder antagónico contra *S. cepivora*, para aplicar en campo estrategias agroecológicas de manejo de cultivos. Lo anterior, aunado a un acompañamiento de los agricultores en el uso de biocontroladores y medidas tendientes a mantener la sanidad y la preparación del suelo, permitirá disminuir los niveles del inóculo, factor fundamental para la obtención de buenos rendimientos en los cultivos.

Bibliografía

- Astorga, K.; Zúñiga, C; & Rivera, W. (2014). Aislamiento e identificación de patógenos de ajo (*Allium sativum* L.). *Tecnología en Marcha*, 27(2), 82-91.
- Astorga-Quirós, K. ; Meneses-Montero, K.; Zúñiga-Vega, C.; Brenes-Madriz, J. & Rivera-Méndez, W. (2013). Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. *Tecnología en Marcha*, 27(2), 89-98.
- Bell, D.K. ; Wells, H.D. & Markham, C.R. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72(4), 379-382.
- Correa, S. ; Mello, M. ; Ávila, Z.R. ; Minaré Braúna L; Pádua, R.R. & Gomes, D. (marzo, 2007). Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* SACC. *Fitosanidad*.
- Dennis, C. & Webster, J. (1971a). Antagonistic Properties of Species-Groups of *Trichoderma* I. Production of Non-Volatile Antibiotics. *Transactions British Mycological Society*, 57. 25-39.
- Dennis, C. & Webster, J. (1971b). Antagonistic Properties of Species-Groups of *Trichoderma* III. Hyphal Interactions. *Transactions British Mycological Society*, 57, 363-369.
- Ehler, L.E. ; Sforza, R. & Mateille, T. (Eds.). (2003). *Genetics, evolution, and biological control*. CABI.
- Flores, Y. ; Mujica, Y. & Rondón, A. (2007). Evaluación *in vitro* de tres controladores del hongo *Sclerotium rolfsii*. *Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales* (166), 141-149.
- Granados, M. (2005). Pudrición blanca de la cebolla: una enfermedad difícil de combatir. *Revista Agronomía costarricense*, 29(2):142-156. Obtenido de <http://es.scribd.com/doc/76713474/sclerotium-sp>.
- Granados, M.M. & Wang, A. (2008). Efecto de biocontroladores aislados en fincas productoras de cebolla sobre la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum*). *Revista Agronomía Costarricense*, 32(1), 9-17.
- Granados-Montero, M. (Ed.) (2013). *Problemas fitosanitarios de la cebolla en Costa Rica*. San José: Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Harman, G.E. (2006). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2), 190-194.
- Howell, C.R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*, 87(1), 4-10.
- Infante, D.; González, N.; Reyes, Y. & Martínez, B. (2011). Evaluación de la efectividad de doce cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels sobre tres fitopatógenos en condiciones de campo. *Rev. Protección Veg.*, 26(3), 194-197.
- Infante, D.; Martínez, B.; González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.*, 24(1), 14-21.
- Jáen, L. & Azofeifa, C. (2010). *Sector agropecuario. Políticas y acciones para la cadena productiva de cebolla*. San José: SEPSA, Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- Lorito, M.; Harman, G.; Prieto, A.D. & Hayes, C. (1990). Extracellular chitinolytic enzymes produced by *T. harzianum*, purification, characterization and molecular cloning. *Phytopathology*, 82(10), 10-77.
- Metcalf, D.A.; Dennis J.C. & Wilson, C.R. (2004). Effect of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* on the ability of *Trichoderma koningii* to suppress white rot of onion. *Plant Dis.*, 88, 287-291.
- Mukherjee, M.; Mukherjee, P.K.; Horwitz, B.A.; 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.
- Suárez, C.; Fernández, R.; Valero, N.; Gámez, R. & Páez, A. (2008). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(3), 35-43.
- Vinale, F.; Manganiello, G.; Nigro, M.; Mazzei, P.; Piccolo, A.; Pascale, A.; Ruocco, M.; Marra, R.; Lombardi, N.; Lanzuise, S.; Varlese, R.; Cavallo, P.; Lorito, M. & Woo, S.L. (2014). A Novel Fungal Metabolite with Beneficial Properties for Agricultural Applications. *Molecules* (19), 9760-9772. doi: 10.3390/molecules19079760
- Woo, S.L.; Scala, F.; Ruocco, M. & Lorito, M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, 96, 181-185.

Control microbiológico como experiencia de sostenibilidad local en la agricultura centroamericana

Microbiological control as experience of local sustainability in Central American agriculture

William Rivera-Méndez¹

Fecha de recepción: 15 de junio del 2015
Fecha de aprobación: 13 de octubre del 2015

Rivera-Méndez, W. Control microbiológico como experiencia de sostenibilidad local en la agricultura centroamericana. *Tecnología en Marcha*. Edición Especial Biocontrol. Pág 31-40.

¹ Ingeniero en Biotecnología. Tel. (506) 25509094. Correo electrónico: wirivera@itcr.ac.cr. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Centro de Investigaciones en Biotecnología, Laboratorio de Control Biológico. Cartago, Costa Rica.

Palabras clave

Control microbiológico; plagas; enfermedades; desarrollo sostenible; sostenibilidad.

Resumen

En las últimas décadas se ha experimentado un auge en la investigación y en la aplicación de técnicas de control biológico de plagas y enfermedades agrícolas. La penetración de este tipo de tecnologías de producción se ve reflejada en los cambios observados en el mercado global de bioplaguicidas. La investigación sobre los agentes de control biológico (ACB) y la aparición de empresas y productos basados en microorganismos parecen reafirmar esta tendencia. El objetivo de esta publicación es analizar, con un enfoque de desarrollo sostenible, la reciente introducción del control microbiológico de plagas y enfermedades en la agricultura centroamericana. Se discute sobre los efectos de la expansión del uso de estas tecnologías en los ámbitos social, económico y ambiental. Se enumera una serie de retos que los diversos actores y sectores vinculados deben enfrentar si desean lograr que esta sea una tecnología inclusiva, eficiente y competitiva. Se concluye que, aunque el control microbiológico aún se encuentra en desarrollo, se puede convertir en una opción para transformar nuestros sistemas agrícolas altamente dependientes de insumos sintéticos en sistemas productivos sostenibles.

Keywords

Microbiological control; plagues; diseases; sustainable development; sustainability.

Abstract

In the last decades it has experimented a boom in the research and the application of technics for biological control of pest and diseases. The penetration of this kind of production technologies are reflected in the changes observed in the global market for biopesticides. The research about biological control agents (BCA's) and the emergence of enterprises and microorganisms-based products seem reaffirm the trend. The publication's objective is analyze, focused on sustainable development, the recent introduction of microbiological control in the Central American agriculture. It discusses about the effects of the expansion in the use of the technology in the social, economic and environmental sphere. It lists the challenges that several actors and sectors linked must deal if they wish this technology be inclusive, efficient and competitive. It concludes that although microbiological control is still in develop, it could transform in option for change our agricultural systems highly dependent of synthetic inputs in sustainable productive systems.

Introducción

En las últimas décadas se ha experimentado un auge en la investigación y la aplicación de técnicas de control biológico de plagas y enfermedades con fines agrícolas. La suma de los problemas ambientales y sociales provocados por un uso indiscriminado de plaguicidas sintéticos, las nuevas exigencias de los mercados ante la globalización y las necesidades de desarrollo tecnocientífico en el campo agrícola han sido los impulsores de este auge.

La penetración de este tipo de tecnologías de producción se ve reflejada en los cambios observados en el mercado global de bioplaguicidas. Para 2013 las ventas de estos insumos

ascendieron a US\$1,213 millones y se espera que para el año 2017 alcancen un valor cercano a US\$3,200 millones (Markets and Markets, 2015).

En América Latina la situación ha mostrado un comportamiento similar, destacándose casos como los de Brasil, México y Cuba, donde la cantidad de hectáreas a las que se les aplican estos productos aumenta cada año, con tasas importantes de crecimiento. La tasa de incremento general de ventas para la región latinoamericana se calcula en 17% hasta el año 2019. Aparte de las cifras disponibles sobre el mercado de bioplaguicidas, existen muchas experiencias documentadas en casi todo el continente donde su uso empieza a demostrar el nivel de expansión en la agricultura latinoamericana (Bettioli et al., 2015).

La investigación sobre los agentes de control biológico (ACB), por otro lado, parece tomar un rumbo similar. Si bien no existen datos sobre la cantidad de publicaciones producidas en la región centroamericana en el tema, es evidente cómo ha crecido la información disponible, generada principalmente por los institutos de investigación adscritos a las universidades y difundida no solo a través de las revistas especializadas, sino también en congresos, seminarios y cursos.

Una de las razones principales del interés en el potencial del control biológico como parte de los sistemas de manejo integrado de plagas y enfermedades parece responder a las exigencias de los mercados y a la concientización de la población sobre la protección ambiental y al cuidado de la salud humana, ambos temas presentes en las agendas de desarrollo sostenible a nivel mundial (Naranjo et al., 2015).

El objetivo de esta publicación es analizar, con un enfoque de desarrollo sostenible, la reciente introducción del control microbiológico de plagas y enfermedades en la agricultura centroamericana. Se pretende discutir sobre los efectos de la expansión del uso de estas tecnologías en los ámbitos económico, social y ambiental.

Control microbiológico de plagas y enfermedades

El control biológico es una estrategia de combate de plagas y enfermedades que se basa en el uso de organismos o parte de ellos. Estas partes pueden ser estructuras o compuestos químicos derivados. Se debe diferenciar entre control biológico y control natural. El primero involucra la intervención del ser humano a través del aumento en la cantidad del organismo controlador o mediante la conservación. El control natural se hace sin intervención humana, pero constituye la base de cualquier sistema agroecológico.

El tipo de control biológico al que hacemos referencia en este documento se caracteriza por utilizar microorganismos como agente patogénico o controlador, es decir, control microbiológico. Si bien existen referencias a lo largo de la historia sobre su uso, ha sido en los últimos 30 años que este tipo de estrategia ha cobrado relevancia. A nivel centroamericano, si bien existen experiencias aisladas desde los años 60, fue después de la década de los 90 que se dio una expansión significativa, comenzando con la creación del Centro para Control Biológico en Centroamérica en la Escuela Agrícola Panamericana, en 1989 (Cave, 1992).

En la actualidad se dispone de mucha información sobre algunos microorganismos estudiados. Sin lugar a dudas, los hongos y las bacterias han sido los organismos utilizados más ampliamente. Según el tipo de objetivo hacia el que van dirigidos, se clasifican en bioinsecticidas, biofungicidas, biobactericidas y bionematicidas. Entre los microorganismos más estudiados están las bacterias de los géneros *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Erwinia* sp. y los hongos como *Trichoderma* sp., *Metarhizium* sp., *Beauveria Bassiana*, *Lecanicillium lecanii*, *Hirsutella* sp., *Entomophthora* sp. e *Gliocladium* sp., entre otros.

En cuanto a la tecnología de producción de estos organismos, se destacan la de fermentación sólida y la líquida. La fermentación líquida se ha empleado tradicionalmente para el cultivo de bacterias y la de fase sólida para el cultivo de hongos. En ambos casos se ha buscado tener biomasa o compuestos del metabolismo secundario, que funcionan como principio activo de los productos.

En el caso de la biomasa, se han desarrollado metodologías para la obtención de células (diversos tipos celulares) que sirvan para la dispersión del agente biológico en el ambiente. Este es el caso de las esporas, los conidios, células vegetativas, clamidósporas y blastósporas. Los productos para control biológico que basan su principio activo en la biomasa son los más utilizados en Centroamérica. Muchos de ellos provienen de tecnologías de producción artesanales o semiartesanales. Incluso, muchos productos altamente industrializados provienen de fermentaciones sólidas como medio de obtención de la biomasa, con la particularidad de que luego sufren un proceso de formulación.

En el caso de los productos que utilizan los compuestos del metabolismo secundario como ingrediente para el control, generalmente se obtienen de tecnologías de fermentación líquida, que se caracterizan por ser más controladas y requerir de mayor tecnificación (Barrios-González, 2012). Este tipo de productos proviene de empresas con mayor capital y en general se presentan en forma de compuestos líquidos o emulsiones. El uso de estos productos puede ser muy efectivo pero no es un medio para la dispersión ni la perpetuación del organismo en el ambiente.

Existen varios mecanismos asociados a la capacidad biocontroladora de un determinado microorganismo, ya sea por su capacidad antagónica o entomopatógena. Algunos de estos mecanismos dependen en buena medida de la producción y liberación de compuestos del metabolismo secundario del microorganismo. Estos son compuestos bioactivos de bajo peso molecular, cuya diferenciación parece responder a procesos evolutivos a través de la selección natural (Brakhage & Schroeckh, 2011). Pueden ser producidos y liberados al medio exterior como una secreción o como un compuesto volátil.

Se han descrito numerosas funciones para este tipo de compuestos. Normalmente se encuentran asociados a procesos de patogénesis, de señalización de vías metabólicas, en respuesta a reacciones de estrés, en la promoción del crecimiento y como activadores de defensas vegetales. Debido a su variada naturaleza, muchos tienen una función desconocida en el organismo productor y en las interacciones en las que participan, sin embargo, han mostrado tener importantes aplicaciones para el ser humano.

Enfoque de sostenibilidad en el control microbiológico

Una de las razones principales que ha dado pie a un uso más extensivo de las técnicas de control biológico han sido los efectos ambientales y sociales del uso indiscriminado de plaguicidas sintéticos. Entre esos efectos se pueden citar la contaminación de fuentes subterráneas y superficiales de aguas, la degradación química de los suelos de labranza, la pérdida de integridad física de las partículas del suelo, la supresión de poblaciones de organismos benéficos, la aparición de especies, variedades, patotipos y formas especiales de organismos con mayor potencial patogénico, parasítico o con una resistencia inusual a los insumos sintéticos (Damalas et al., 2011).

Si se mencionan los efectos sociales, cobran particular importancia las intoxicaciones agudas y graves, el debilitamiento del sistema inmunológico de los trabajadores, las alteraciones del sistema nervioso y los daños congénitos. También se pueden describir las intoxicaciones por ingesta de agua contaminada y los enfrentamientos, cada vez más frecuentes, entre

comunidades y empresas agrícolas ubicadas alrededor por disputas y contaminación de los recursos naturales.

En los países de Centroamérica, el uso de controladores biológicos se inició en los años 80. Al comienzo se aprovecharon como alternativas para la sustitución de plaguicidas restringidos y la tecnología fue promovida por la interacción de universidades, centros de investigación e instituciones autónomas y semiautónomas (Obregón, 2007). Basándose en algunos casos exitosos, el modelo se empezó a transferir a productores y pequeños campesinos de las zonas rurales.

Los centros universitarios y algunas instituciones de capacitación técnica de los distintos países implementaron programas de investigación y enseñanza para promover este tipo de agentes de control. Es ahí donde se inicia el desarrollo de experiencias de trabajo con empresas medianas y grandes, exportadoras y transnacionales. Estas sirvieron como base para el desarrollo de protocolos, programas de aplicaciones y metodologías de uso, que con el paso del tiempo se fueron afinando hasta lograr que el combate biológico fuera parte de las técnicas de manejo integrado de plagas y enfermedades utilizadas por el sector productivo.

A partir de ese momento comienzan a aparecer pequeñas empresas productoras y comercializadoras de controladores biológicos. Estas firmas han basado su producción en algunas bacterias, como *Bacillus thuringiensis*, *B. subtilis* y *Azotobacter* spp., pero sobre todo en la producción de los hongos antagónicos *Trichoderma* spp., *Lecanicillium lecanii* y *Gliocladium* spp., además de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

La aparición de empresas relacionadas con el sector de control biológico ha traído consigo varios fenómenos de tipo económico y social. Entre los más sobresalientes está la aparición de profesionales con conocimientos que van desde niveles muy básicos hasta posgrados en control biológico y el desarrollo de micro y pequeñas empresas de producción en las zonas rurales. Además, muchas empresas comercializadoras de plaguicidas y fertilizantes sintéticos han incluido en sus líneas de productos insumos basados en microorganismos.

Estos nuevos desarrollos adquieren forma a través de la instalación de biofábricas, que son instalaciones utilizadas en este caso para la producción de hongos y bacterias (Machado et al.; 2011) por parte de empresarios, pequeños grupos comunales, grupos de mujeres, cooperativas e incluso empresas agrícolas. Desde este punto de vista, el joven gremio de productores de microorganismos está realizando un aporte a algunas economías locales, ya que no solo consumen mano de obra sino que disponen de un pequeño capital para el desarrollo de inversiones y compra de servicios, como la construcción de edificios, bodegas, mantenimiento de vehículos y maquinaria y transporte de trabajadores.

Son ya bastantes los casos de grandes empresas agrícolas o fincas dirigidas por compañías transnacionales que han logrado establecer su propia biofábrica para el autoconsumo. En estos casos, generalmente se promueve la capacitación de algunos peones para la ejecución de las labores técnicas de reproducción de organismos. Según el tamaño de estas instalaciones, se contrata personal científico o con mayor grado de capacitación o se incorporan jóvenes profesionales provenientes de la zona. Los operarios relacionados con las labores técnicas usualmente son mujeres, lo que refuerza las economías domésticas.

Existen esfuerzos que involucran a sectores agrícolas completos en el desarrollo de productos y programas de control biológico, tal es el caso de la Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar (LAICA), a través de la Dirección de Investigación (DIECA), que mantiene un importante programa de control de barrenadores en el cultivo y cuyo centro de reproducción exporta microorganismos desecados a otras naciones centroamericanas (Sáenz & Blanco, s.f.).

Actualmente son las universidades estatales y algunas instituciones de carácter técnico las que poseen las biofábricas o los centros de reproducción más grandes y tecnificados en Centroamérica, con algunas excepciones del sector privado. Las universidades han desarrollado estos centros como modelos de investigación y aplicación de microorganismos. Por ejemplo, en Honduras se destaca la Escuela Agrícola Panamericana (El Zamorano), en Nicaragua la Universidad Nacional Agraria y la UNAN-León y en Costa Rica la Universidad de Costa Rica, el Instituto Tecnológico y el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) (Cave et al., 2013).

Estos centros universitarios promueven la formación de nuevos profesionales con conocimientos en control biológico, tales como ingenieros agrónomos, técnicos agrícolas, ingenieros agrícolas, ingenieros en biotecnología o ingenieros ambientales y personal científico. Además, brindan capacitación a productores y empresas de todo tamaño, de manera que se realizan servicios de docencia, investigación y extensión. Esto ha servido de base para promover un nuevo acercamiento entre el sector productivo y la academia, ya no solo a través de venta de análisis y recomendaciones, sino mediante la formación e instrucción técnica. Incluso, muchos centros universitarios comercializan los microorganismos que reproducen a precios accesibles para los productores de forma directa.

Todavía el sector de producción de productos basados en el control microbiológico es muy pequeño y su contribución a la economía centroamericana no es sensible, ni siquiera al punto de ser detectada en las estadísticas macroeconómicas o de sectorización de los países de la región, pero es evidente que se ha iniciado un proceso de expansión, en el que aparecen cada vez más empresas productoras, formuladoras y distribuidores que afectan positivamente la microeconomía. En países con un mayor desarrollo en producción de microorganismos para control biológico, como Colombia México, Brasil y Cuba, se reconoce su aporte a la dinámica de las economías locales (García, 2011).

En el plano ambiental, los problemas de contaminación y las nuevas exigencias del mercado han hecho posible la introducción de estrategias de control biológico en las fincas de producción. Si bien existen algunas experiencias cuyo origen es la concientización ambiental, la gran mayoría de casos de uso de biocontroladores ha sido forzada o influenciada por terceros.

En muchos casos, la sustitución de plaguicidas ha sido el resultado de presiones de sectores ambientales, económicos, políticos y de las comunidades. Tal es el caso de la producción de melón en las costas pacíficas, donde, debido a la restricción del uso de bromuro de metilo, los productores se han visto forzados a implementar nuevas alternativas de control para los hongos del suelo, en especial *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* y algunos que atacaban los frutos, como es el caso de *Botrytis*.

Los conflictos entre las comunidades y empresas agrícolas se han vuelto cada vez más recurrentes, pues los primeros reclaman la contaminación de las fuentes de agua con el uso de plaguicidas sintéticos por moléculas persistentes o de fertilizantes. Existen reportes de enfrentamientos, sanciones sanitarias y casos presentados ante los sistemas judiciales (Acuña, 2006).

Otro factor que ha propiciado la introducción de microorganismos para el biocontrol han sido los casos de intoxicaciones agudas registrados en los distintos países, producto del mal uso de los plaguicidas sintéticos por exceso en las dosis, por falta de medidas e instrumentos de protección o por la toxicidad de las moléculas utilizadas como ingrediente activo. Existen muchos informes en los que se puede encontrar información sobre el uso inadecuado de plaguicidas en Centroamérica y sus consecuencias (Bravo et al., 2011; Aragón et al., 2011).

Para medir la efectividad de la tecnología del uso de microorganismos para biocontrol, se debería disponer de indicadores que permitan determinar la cantidad de los insumos registrados o importados por cada país, además de la producción de productos de control biológico nacionales. Para ninguno de los países centroamericanos se encuentra disponible esta información y no existe un sistema que permita centralizar la recolección de estos datos. Tampoco hay información disponible sobre la forma en que estos productos biológicos contribuyen al reemplazo de plaguicidas. Por esta razón, no es posible analizar con certeza el grado en que la sustitución de plaguicidas pueda verse como una consecuencia directa del uso de controladores biológicos.

Es importante hacer notar que los datos de importaciones totales de plaguicidas para la región centroamericana parecen mostrar una disminución. Ya el informe de vigilancia sanitaria de plaguicidas de la Organización Panamericana de la Salud mostraba para el año 2002 una tendencia a la baja (OPS, 2004). Este documento señala además que Belice, Costa Rica y Panamá tenían el índice más elevado de plaguicidas importados por kilogramo. Al analizar datos más recientes sobre Costa Rica, se encuentra que desde 2006 hasta 2010 el país volvió a incrementar sus índices de importación, y a partir de ese año hasta la fecha ha vuelto a darse una disminución, reduciéndose en cerca de 4,000 toneladas la cantidad de ingrediente activo importado en los últimos cuatro años (Programa Estado de La Nación, 2014).

Sin embargo, esas variaciones no pueden atribuirse al uso de plaguicidas biológicos ni mucho menos a los plaguicidas de origen microbiano, pues existen numerosas variables que afectan la importación total de plaguicidas; por ejemplo, la variación en el área sembrada para cada año, las condiciones climáticas, el consumo de otros plaguicidas como los de origen botánico, el área destinada a la agricultura orgánica y factores particulares de la legislación de cada país. No obstante, sin lugar a duda los insumos microbiológicos tienen una contribución en dicha disminución. Algunos de los datos anteriores se encuentran en el siguiente cuadro.

Cuadro 1. Resumen de la situación agrícola de Costa Rica período 2006-2013.

Año	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Área sembrada de las principales actividades agrícolas (ha)	441.552	437.569	441.697	473.210	482.933	498.667	486.587	486.222
Cultivo orgánico (porcentaje del cultivo total)	2,4	1,8	1,8	1,7	2,3	1,9	1,9	1,5
Importación total de plaguicidas (ton de ingrediente activo)	8.495	11.583	13.530	11.825	14.589	11.817	12.377	10.439

Fuente: Programa Estado de la Nación, Costa Rica, 2014.

Una situación similar ocurre cuando se trata de usar el porcentaje de cultivos orgánicos con respecto a los cultivos totales en el país como indicador de sostenibilidad. En este caso, contrario a lo esperado, el cultivo orgánico en Costa Rica va en disminución desde 2006.

Los productos de control microbiológico fueron un importante aliado para el crecimiento de los cultivos orgánicos establecidos alrededor del año 2000, pero poco a poco han ido migrando hacia otros sistemas agrícolas enmarcados como agricultura sostenible e incluso en los sistemas de agricultura convencional. En este momento no solo los sistemas orgánicos consumen productos microbiológicos, por lo que no existe una relación directa que pueda ser determinante entre ellos. De forma general, tampoco existen indicadores indirectos que nos permitan evaluar el uso de productos microbiológicos desde una perspectiva de sostenibilidad.

No solamente existe un vacío de información relacionada con aspectos técnicos, sino además con aspectos económicos y sociales de este tipo de tecnologías. Sin esta información y con una carencia de indicadores relacionados, es imposible analizar desde una perspectiva de desarrollo sostenible las contribuciones generadas por el uso de plaguicidas microbiológicos a nivel nacional o regional, y los análisis a nivel local solo se pueden hacer mediante la valoración y recopilación de experiencias en cada país.

Conclusiones y retos de sostenibilidad para el control microbiológico

La tecnología del uso de plaguicidas microbiológicos para el control de plagas y enfermedades en los cultivos agrícolas está todavía en desarrollo. Actualmente muchas universidades y centros de investigación realizan importantes esfuerzos para la consolidación de estas opciones biológicas; además, muchas micro y pequeñas empresas aprovechan el conocimiento generado para la creación y comercialización de productos.

La percepción general es que cada vez se utiliza más este tipo de insumos en los sistemas agrícolas, sin embargo, no existen indicadores disponibles que permitan realizar una adecuada evaluación de la situación actual. El primer reto para el control microbiológico y los sectores productivo y académico relacionados es la creación de este tipo de indicadores y los sistemas de manejo de información adecuados para tal fin. Esto requerirá un esfuerzo conjunto para definir el tipo de información que se quiere obtener, la multidimensionalidad con que se quiera construir cada uno de esos indicadores y la forma en que se gestionará la información (Phelán, 2011).

Otro reto por asumir es que los sectores involucrados presionen a los gobiernos para facilitar o promover el uso de este tipo de tecnologías en los sistemas productivos tradicionales, y allanar el camino para el desarrollo de sistemas agrícolas sostenibles. Esto es particularmente importante en los productos agrícolas de exportación, de forma que la contribución que estos insumos realizan en la producción nacional se pueda ver reflejada en la macroeconomía. La promoción de la agricultura sostenible pasa por la aprobación de leyes y reglamentos, de sistemas de registro de insumos, de financiamiento para empresas agrícolas y de bioinsumos, de educación de la población y de estrategias y políticas alimentarias y productivas.

Por supuesto que la agricultura familiar y la agricultura para el mercado local son piezas fundamentales en el desarrollo y consolidación de los productos de control microbiológico. Estos sistemas agrícolas, caracterizados por pequeñas producciones, deben ser atendidos e incluidos en los esquemas de comercialización de las nascentes industrias de biocontrol. Indudablemente, la atención de este sector debe realizarse en coordinación con los servicios de asistencia técnica y extensión de los ministerios o secretarías de Agricultura de cada país. En este caso se está hablando de un compromiso de disponibilidad de dichos insumos sin importar el sector agrícola, el tamaño de la producción o la capacidad adquisitiva del agricultor.

Es evidente que existe un reto comercial, a través del cual los insumos microbiológicos deben mostrar una eficiencia adecuada y un precio accesible, lo que permitirá la sustitución de los plaguicidas sintéticos. Muchas veces, esta sustitución encuentra como barreras la falta de

confianza en el producto, su elevado precio o una pobre relación costo-beneficio. La eficiencia de este tipo de productos y su precio están íntimamente relacionados con los medios y métodos de producción y la estabilización del producto final. Por esta razón, los productores de bioinsumos deben apoyarse en los centros de investigación locales, de manera que se logren desarrollar formulados eficientes y baratos, capaces de competir en igualdad de condiciones con los plaguicidas sintéticos.

Si bien los programas y productos de control biológico en Centroamérica han mostrado que pueden ir ganando espacio poco a poco en los sistemas productivos, todavía deben dar un salto de calidad que asegure su efectividad, eficacia y disponibilidad. Es necesario que la nascente industria supere los límites de producción semiartesanal y que los centros de investigación establezcan programas de vinculación y transferencia tecnológica efectivos, de forma tal que los nuevos conocimientos no queden en poder de las universidades, sino que el resto de la sociedad pueda percibir sus beneficios.

La tecnología de control microbiológico de plagas y enfermedades puede convertirse en un ejemplo magnífico de iniciativas para el desarrollo sostenible, debido a sus características intrínsecas. Pero para que efectivamente, en este caso, el desarrollo vincule las esferas económica, ambiental y social, primero debe darse una integración de todos los actores que pueden ser parte importante de este proceso: agricultores, empresarios, políticos, académicos, técnicos e inversionistas. Si bien es cierto que a nivel centroamericano la aplicación de control microbiológico en campo ha sobrepasado las capacidades de investigación y gestión de las universidades, es necesario retomar y darle una nueva dimensión al vínculo universidad-empresa-agricultor. Solo a través de la cooperación y el trabajo coordinado es que el control microbiológico se convertirá en una opción para transformar nuestros sistemas agrícolas altamente dependientes de insumos sintéticos en sistemas productivos sostenibles.

Bibliografía

- Acuña, G. (2006). Producción de piña en Caribe y Pacífico Sur de Costa Rica. *Revista Ambientico*, 158.
- Aragón, A., Partanen, T., Felknor, S. & Corriols, M. (2011). Social determinants of workers' health in Central America. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 17(3), 230-237.
- Barrios-González, J. (2012). Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*, 47(2), 175-185.
- Bettioli, W., Rivera, M., Mondino, P., Montealegre, J. & Colmenarez, Y. (2015). *Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe*. Embrapa Meio Ambiente-Livros científicos (ALICE).
- Brakhage, A. & Schroeckh, V. (2011). Fungal secondary metabolites-strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genetics and Biology*, 48(1), 15-22.
- Bravo, V., Rodríguez, T., Joode, B.V.W., Canto, N., Calderón, G.R., Turcios, M. & Wesseling, C. (2011). Monitoring pesticide use and associated health hazards in Central America. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 17(3), 258-269.
- Cave, R. (1992). Centro para control biológico en Centro América. Escuela Agrícola Panamericana, Departamento de Protección Vegetal. Honduras, Centroamérica.
- Cave, R., Trabanino, R. & Pitty, A. (2013). Zamorano y sus Contribuciones a la Agricultura Sostenible a Través del Control Biológico de Plagas. *Ceiba*, 52(1), 26-38.
- Damalas, C.A. & Eleftherohorinos, I.G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(5), 1402-1419.
- García, G. (2011). La propiedad intelectual en las biofábricas. *Revista Virtual Universidad Católica del Norte*, 1(27).
- Machado, A.C.R., Monteiro, A.C., de Almeida, A.M.B. & Martins, M.I.E.G. (2011). Tecnologia de produção de fungo entomopatogênico pelo sistema bifásico de cultivo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45(10), 1157-1163.

- Markets and Markets. (2015). *Biopesticides Market by Active Ingredient, by Types, by Application, by Formulation, by Crop Type & by Geography. Global trends & forecasts to 2019*. Obtenido de <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biopesticides-267.html?gclid=CJil7KiDn8UCFUc2gQoddRAAnQ>
- Naranjo, S.E., Ellsworth, P.C. & Frisvold, G.B. (2015). Economic Value of Biological Control in Integrated Pest Management of Managed Plant Systems. *Annual Review of Entomology*, 60, 621-645.
- Obregón M. (2007). Costa Rica experience in crop disease biological control. *IX Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas*. São Paulo, Brasil.
- OPS (Organización Panamericana de la Salud). (2004). *Vigilancia sanitaria de plaguicidas: experiencia de PLAGSALUD en Centroamérica*.
- Phélan, M. (2011). Revisión de índices e indicadores de desarrollo: aportes para la medición del buen vivir (sumak kawsay). *OBETS: Revista de Ciencias Sociales* (6), 69-96.
- Programa Estado de la Nación. (2014). *Cuarto Informe Estado de la Educación*. San José.
- Sáenz, J.L. & Blanco, N.A. (2012). *Informe para discusión. Desarrollo histórico del sector agroindustrial de la caña de azúcar en el siglo XX: aspectos económicos, institucionales y tecnológicos*. Instituto de Investigaciones en Ciencias Económicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

Control biológico del hongo *Sclerotium cepivorum* utilizando *Trichoderma asperellum* en el cultivo del ajo en Costa Rica

Biological control of fungus *Sclerotium cepivorum* using *Trichoderma asperellum* in garlic crops in Costa Rica

William Rivera-Méndez¹, Claudia Zúniga-Vega², Jaime Brenes-Madriz³

Fecha de recepción: 15 de junio del 2015
Fecha de aprobación: 13 de octubre del 2015

Rivera-Méndez, W; Zúniga-Vega, C; Brenes-Madriz, J. Control biológico del hongo *Sclerotium cepivorum* utilizando *Trichoderma asperellum* en el cultivo del ajo en Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. Edición Especial Biocontrol. Pág 41-50.

-
- 1 Instituto Tecnológico de Costa Rica, Centro de Investigación en Biotecnología. Apdo. 159-7050, Cartago, Costa Rica. Correo electrónico: wirivera@tec.ac.cr.
 - 2 Instituto Tecnológico de Costa Rica, Centro de Investigación en Biotecnología. Apdo. 159-7050, Cartago, Costa Rica. Correo electrónico: czuniga@tec.ac.cr.
 - 3 Instituto Tecnológico de Costa Rica, Centro de Investigación en Biotecnología. Apdo. 159-7050, Cartago, Costa Rica. Correo electrónico: jabrenes@tec.ac.cr.

Palabras clave

Control biológico; esclerocios; antagonismo; pudrición blanca; inóculo inicial.

Resumen

En este trabajo se evaluó la efectividad del hongo antagonista *Trichoderma asperellum*, previamente aislado e identificado, para el control del agente causante de la pudrición blanca del ajo y la cebolla, *Sclerotium cepivorum*. Para ello se realizaron ensayos de campo en seis parcelas experimentales cultivadas con ajo, donde se determinó el inóculo inicial de cada parcela. Posteriormente se aplicaron dos tratamientos distintos, uno basado en una suspensión de esporas de *T. asperellum* a una concentración de $1,0 \times 10^5$ /ml. El otro fue el control químico tradicional usado por los productores, basado en una mezcla en partes iguales de oxiclورو de cobre (61,1%), Ftalamida- Carboxin-Captan (40%), Ziram (76%) y Tebuconazole (25%). Se evaluó la concentración de los esclerocios cada 30 días; además se registró la mortalidad total en cada tratamiento y parcela. Luego del análisis de datos, el hongo antagonista mostró una eficacia similar a la de los agroquímicos usados. Además, se confirmó la importancia que tiene la cuantificación del inóculo inicial sobre el desarrollo de la enfermedad y la mortalidad asociada.

Keywords

Biological control; sclerotia; antagonism; white rot; initial inoculums.

Abstract

In this paper, the effectiveness of the antagonist fungus *Trichoderma asperellum*, previously isolated and identified, was evaluated for control the causative agent of white rot of garlic and onion, *Sclerotium cepivorum*. For this, field trials were conducted in six experimental plots cultivated with garlic, where the initial inoculum of each plot was determined. Subsequently two different treatments were applied; one based on a spore suspension of *T. asperellum* with a concentration of $1,0 \times 10^5$ spores/ ml. The other, was the traditional chemical control used by farmers, based on a mixture in equal parts of copper oxychloride (61.1%), Ftalamida- Carboxin-Captan (40%), Ziram (76%), and Tebuconazole (25%). Sclerotia concentration was evaluated every thirty days; also the total mortality in each treatment and plot was recorded. After data analysis the antagonist fungus has similar efficacy as the agrochemicals used. Besides the value of the determination of initial inoculums on the disease spread ant total mortality was confirmed.

Introducción

El hongo *Sclerotium cepivorum* Berkeley causa la principal enfermedad en el mundo de las plantas del género *Allium* (Clarkson et al., 2006), lo que es especialmente importante en los cultivos de ajo (*A. sativum*) y cebolla (*A. cepa*). En Costa Rica, pese a existir pocos reportes de su presencia, en la realidad representa una fuente importante de pérdidas para los productores.

S. cepivorum es un hongo que produce abundante micelio, de color blanco, marrón o grisáceo. Las hifas son ramificadas y cada ramificación se divide mediante septos, a veces con conexiones tipo *clamp*. Normalmente no forma conidios pero establece un tipo de estructura de resistencia a la que se le da el nombre de “esclerocio” y presenta coloraciones desde pardo oscuro hasta negro, es globosa o subglobosa y de apariencia húmeda en su superficie. Los esclerocios pueden sobrevivir en el suelo hasta por 20 años sin perder su viabilidad (Coley-

Smith et al., 1990) y su germinación responde a los exudados de compuestos sulfatados y a los grupos tiol (Davis, 2002).

Este patógeno coloniza las raíces de sus hospederos y en estadios avanzados puede infectar completamente el bulbo, provocando una descomposición blanda del tejido, que se recubre de un micelio blanquecino. A medida que la enfermedad avanza sobre las raíces y bulbos, la planta muestra signos de marchitez, enanismo y las hojas terminan completamente necrosadas (Velásquez & Medina, 2004).

Las formas tradicionales de combatir esta enfermedad han incluido técnicas como la rotación de cultivos, el descanso de la tierra, la siembra de crucíferas y el combate químico por medio de distintas moléculas con actividad fungicida. Algunas otras técnicas de control más novedosas las constituyen el uso de abonos orgánicos tipo compost y la incorporación de material vegetal, la solarización para el tratamiento del suelo (McLean et al., 2001) y la aplicación de compuestos como el dialil-disulfuro para provocar la germinación temprana de los esclerocios (Melero et al., 2000). No obstante, algunas de estas estrategias presentan efectos variables en cuanto a la eficacia del control o dificultades técnicas para su aplicación por parte de los productores (Clarkson et al., 2006).

Otra opción consiste en el uso de control biológico con organismos antagonistas (Bellows & Fisher, 1999), como las especies del género *Trichoderma*. Este es un género de distribución global (Kubicek et al., 2008), de degradadores generalistas de celulosa y quitina, asociados normalmente a materia orgánica en descomposición. Sin embargo, también se reconoce su habilidad para crecer en la rizosfera (Schuster & Schmoll, 2010) y como parásito de otros hongos (Kubicek et al., 2008). Su estado perfecto, es decir, su teleomorfo, se clasifica en el género *Hypocrea*.

Trichoderma presenta una amplia variedad de mecanismos de control. Existen seis tipos claramente definidos que son: el micoparasitismo, la antibiosis, la competencia, la degradación enzimática, la activación de respuestas de defensa y la estimulación de la germinación y el crecimiento (Harman et al., 2004; Metcalf et al., 2004; Mukherjee et al., 2008; Schuster & Schmoll, 2010). Estos mecanismos no siempre se logran activar en condiciones naturales, debido a las variables ambientales, al tipo de sustrato en el que se desarrolla el hongo y a las interacciones con otros microorganismos (Howell, 2003).

El objetivo de esta investigación consistió en comprobar en campo el efecto antagónico de un aislamiento de *T. asperellum* previamente seleccionado contra *S. cepivorum* y compararlo con el control químico tradicional usado por los productores de ajo en Costa Rica.

Material y métodos

Las pruebas de campo se realizaron en seis parcelas en dos años diferentes en la zona de Llano Grande, en la provincia de Cartago, Costa Rica, dedicadas a la producción de cebolla y el ajo denominado "criollo", así como a otras hortalizas. Las parcelas están ubicadas entre 1900 y 2100 metros sobre el nivel del mar (msnm). Se determinaron las variaciones en la cantidad de esclerocios presentes durante el ciclo de cultivo y la mortalidad observada bajo las dos diferentes estrategias de control de la enfermedad (*T. asperellum* vs. control químico tradicional).

Toma de muestras para análisis

En cada parcela se hicieron cinco muestreos, el primero de ellos para determinar el inóculo inicial presente. Los siguientes cuatro se usaron para evaluar cada 30 días la concentración de esclerocios en ambos tratamientos, durante la duración del ciclo de cultivo. Para cada muestra

se tomaron 10 submuestras de 100 g de suelo a una profundidad de 0 a 15 cm y siguiendo un esquema de zigzag. Al final se obtuvieron 1000 g de muestra, que luego se mezclaron mediante agitación, se colocaron en bolsas y se rotularon.

Cuantificación del inóculo inicial de *S. cepivorum* en cada parcela

Para evaluar la cantidad de esclerocios de *S. cepivorum* presentes por gramo de suelo se utilizó la técnica de Vimard *et al.* (1986). Este procedimiento se repitió por quintuplicado para cada parcela y se obtuvo el promedio de las cinco repeticiones, que se dividió entre el peso de la muestra y se reportó como la concentración de esclerocios por gramo de suelo de la parcela analizada.

Pruebas en campo: tratamiento con *Trichoderma* y tratamiento con control químico

Se escogió un diseño de bloques completos al azar (DBCA) por las variaciones en el inóculo inicial de cada parcela. Para esto, cada parcela experimental se consideró como un bloque (seis bloques en total). En cada bloque se prepararon eras (unidades experimentales) de 3,3 m de largo, 1 m de ancho y 0,3 m de altura separadas por un canal de 0,5 m de ancho y 0,3 m de profundidad. En cada bloque se hicieron dos unidades experimentales (una para cada tratamiento). En estos bloques se probaron dos tratamientos. El 1 (T1) correspondió a la utilización de una cepa previamente seleccionada de *T. asperellum* como único fungicida y el 2 (T2) al manejo tradicional empleado por los productores locales, que consistía de mezclas en partes iguales de los siguientes fungicidas: Cobrethane® 61WP (oxicloruro de cobre,), Vitavax® 40WP (Ftalamida-Carboxin-Captan) y Zetarán® 76WP (Ziram), Folicur® 25WP y Silvacur Combi® 25WP (Tebuconazole).

La preparación del terreno y las eras se hizo de la misma manera para ambos tratamientos. La densidad de siembra fue de 1500 kg/ha, con bulbos de primera calidad; se marcaron surcos a lo largo de las eras y se colocaron los ajos a una distancia recomendada de 10 cm entre planta y de 30 cm entre hileras, para un total de 110 plantas por unidad experimental en cada bloque. Los dientes se sembraron con el ápice hacia arriba. A lo largo del ciclo de cultivo se usaron los mismos agroquímicos, además, el manejo agronómico fue similar.

Durante todo el período del cultivo (cuatro meses) se determinó la concentración de esclerocios usando la metodología descrita por Vimard *et al.* (1986). Se contaron los esclerocios por triplicado en cada unidad experimental durante cada mes y se registró la mortalidad total de plantas por el ataque de *S. cepivorum* para cada tratamiento. Los datos de concentración de esclerocios se analizaron mediante pruebas de normalidad y análisis de varianza para un DBCA.

Resultados y discusión

Cuantificación del inóculo inicial de *S. cepivorum* en cada parcela

Los resultados de la cuantificación inicial de esclerocios por gramo de suelo de cada parcela por año se observan en el cuadro 1. Para el primer año, la parcela 2 presentó la mayor concentración y la 3 la menor. Para el segundo año, la parcela 6 fue la más alta y la 5 la más baja. Este inóculo representa la cantidad inicial de los principales propágulos del hongo (APS, 2014).

Según Ponce *et al.* (2008), en estudios de la pudrición blanca en cebolla en México, los inóculos del valor de 0,02 se consideran de baja intensidad o concentración y los de 0,05 de mediana intensidad. Tomando esto como parámetro, las parcelas 1 y 3 tenían un inóculo inicial bajo y la 2 uno intermedio.

Cuadro 1. Inóculo inicial de esclerocios por gramo de suelo para las seis parcelas experimentales.

Parcela	Esclerocios/g	Intensidad del inóculo
1	0,02	Baja
2	0,04	Mediana
3	0,01	Baja
4	0,10	Alta
5	0,05	Mediana
6	0,25	Alta

Es necesario indicar que en el caso de la pudrición blanca, el hecho de que un inóculo sea catalogado como de baja o intermedia intensidad no excluye que cause grandes pérdidas en la cosecha, por las altas tasas de incidencia de la enfermedad. Crowe et al. (1979) encontraron que una densidad de inóculo de 0,001 a 0,01 puede llevar a niveles de incidencia del 10 al 85% del cultivo; mientras que concentraciones de 0,01 a 0,1 pueden alcanzar del 85 al 100% de infección. Otros autores (Ponce et al., 2008) reportaron incidencias de enfermedad del 51,93% para inóculos de 0,02 esclerocios/g (baja intensidad) y del 62,75% para inóculos de 0,05 esclerocios/g (mediana intensidad).

Las divergencias encontradas en el inóculo inicial en cada parcela se pueden atribuir principalmente al manejo agronómico de cada productor y a las características físicas, químicas y biológicas del terreno (Rivera, 2011). Esto incluye factores básicos como: los cultivos sembrados con anterioridad, los agroquímicos usados y su persistencia en el suelo, las prácticas culturales, como la rotación de cultivos y la incorporación de rastrojos u otras formas de materia orgánica, el tipo y la estructura del suelo, la pendiente y el manejo del riego (Ponce et al., 2008; Velásquez & Medina, 2004).

Algunas de las prácticas acostumbradas por los agricultores tienen distintos niveles de repercusión para el establecimiento exitoso del patógeno. El uso de materia orgánica en forma de abonos orgánicos y residuos precomposteados de otros cultivos ha sido probado como una práctica que contribuye a la disminución de la concentración de esclerocios en los cultivos de ajo y cebolla (Coventry et al., 2005, Clarkson et al., 2006; Ulacio, 2011).

Por otro lado, existen prácticas inadecuadas que suprimen las poblaciones de microorganismos benéficos, como son las aplicaciones innecesarias de agroquímicos, la sobredosificación de productos y el uso excesivo de fertilizantes sintéticos en forma de sales solubles y granulados, lo que se observó en las parcelas 2 y 6. Estas prácticas favorecen el incremento a largo plazo de los esclerocios, ante la ausencia de mecanismos de competencia (Delgadillo et al., 2002).

Pruebas en campo: tratamiento *Trichoderma* y tratamiento con control químico

En la parcela 3, bajo el tratamiento T1 se logró reducir el conteo de esclerocios al final del ciclo de cultivo, en comparación con el inóculo inicial (día 0), mientras que en la parcela 6 se obtuvo una reducción bajo ambos tratamientos. Es importante destacar que en cuatro de las seis parcelas, al final del ciclo de cultivo se obtuvieron mejores resultados con el tratamiento de *Trichoderma* (T1). En las otras dos, la concentración de esclerocios por gramo fue la misma para ambos tratamientos (cuadro 2, figuras 1 y 2).

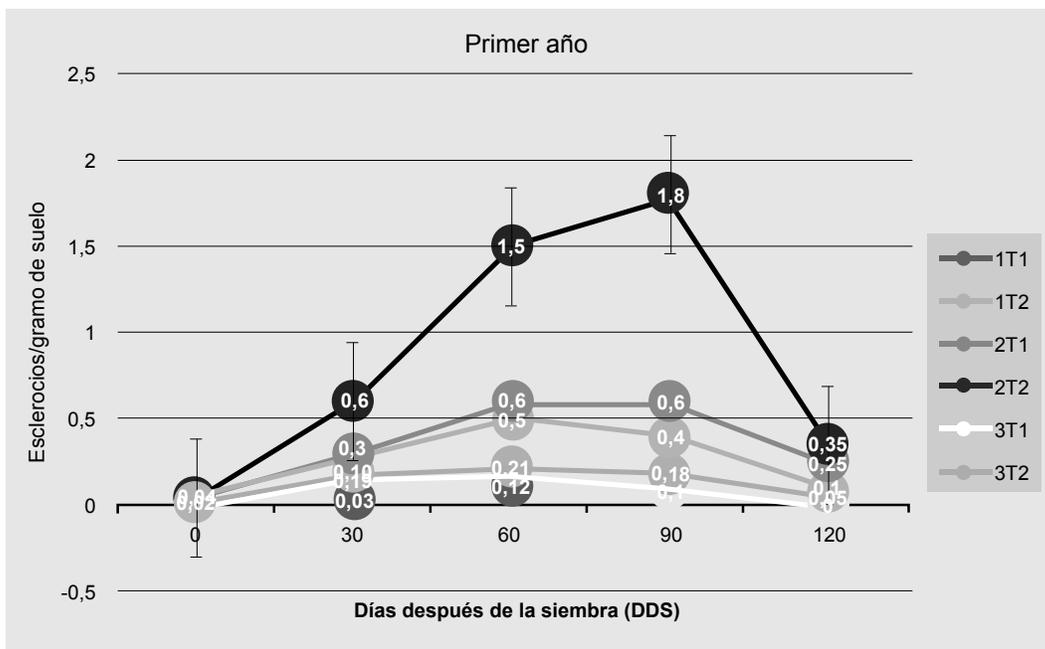


Figura 1. Concentración de esclerocios en cada parcela y bajo cada tratamiento (F: parcela; T1: tratamiento con *Trichoderma*, T2: tratamiento con químicos) a lo largo del ciclo de cultivo de 120 días. Año 1.

Cuadro 2. Comportamiento de la cantidad promedio de esclerocios/g de suelo a lo largo del ciclo de cultivo para las parcelas tratadas con *Trichoderma* (T1) y de manera convencional (T2).

Número de parcela	TRATAMIENTO 1				
	Días después de la siembra				
	0	30	60	90	120
	Promedio esclerocios por gramo de suelo				
1	0,0200	0,0300	0,1200	0,1000	0,1000
2	0,0400	0,3000	0,6000	0,6000	0,2500
3	0,0100	0,1500	0,1800	0,1000	0,0001
4	0,1000	0,0500	0,1000	0,1000	0,1500
5	0,0500	0,3000	0,3500	0,1500	0,0500
6	0,2500	0,1500	0,4000	0,1500	0,0001

Lo anterior evidencia el potencial que posee la cepa de *T. asperellum* evaluada, como antagonista. Esto concuerda con numerosos autores que investigan este biocontrolador (Harman et al., 2004).

Las mayores concentraciones de esclerocios se dieron entre los 60 y 90 días. Los niveles más altos correspondieron a las etapas de formación y engrosamiento de los bulbos, lo que

concuera con lo encontrado por Ponce *et al.* (2008). También coincide con el momento en que se da el completo desarrollo del micelio del patógeno, que prefiere utilizar los bulbos como sitio principal de la infección, y con la formación de los esclerocios.

Se observó en cuatro parcelas que el tratamiento correspondiente al uso de fungicidas en los dos primeros meses presentó una mayor producción de esclerocios del patógeno y posteriormente provocó una caída drástica en los conteos. Por el contrario, el tratamiento con *Trichoderma* no presentó grandes aumentos en la concentración de esclerocios ni causó un descenso tan pronunciado como los fungicidas químicos (figuras 1 y 2). Lo anterior demuestra su capacidad para el control de poblaciones de este patógeno de una forma menos agresiva que el tratamiento químico, lo que tiene repercusiones en el ecosistema del suelo, el ambiente y la salud humana y animal (McLean *et al.*, 2001; Melero *et al.*, 2000).

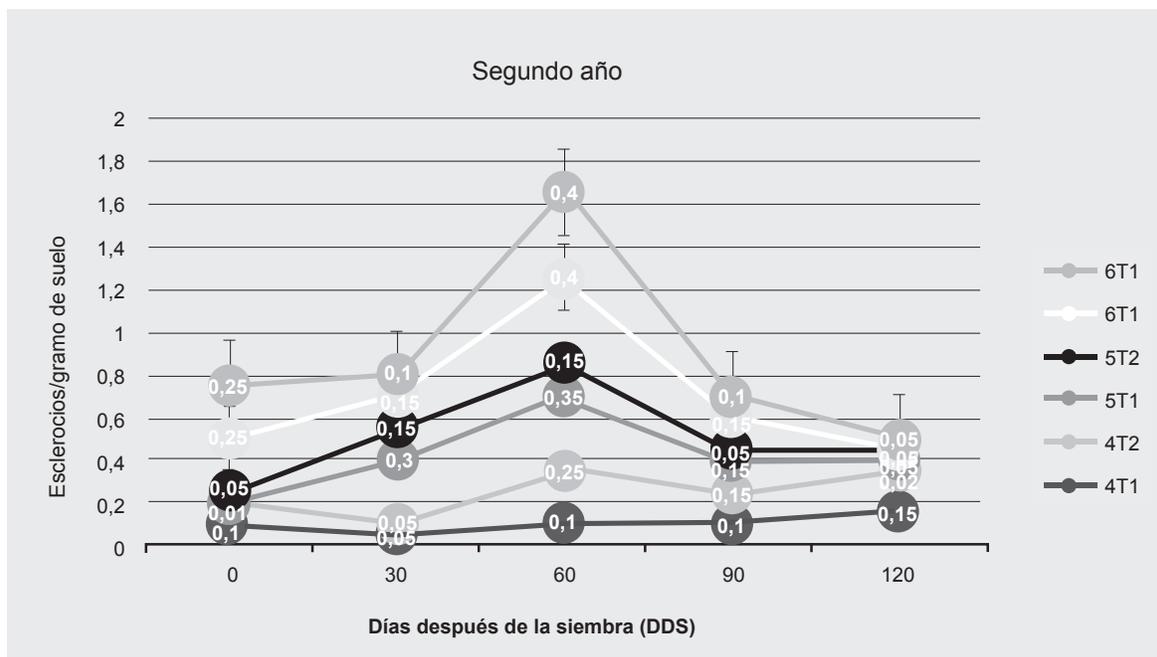


Figura 2. Concentración de esclerocios en cada parcela y bajo cada tratamiento (#: parcela; T1: tratamiento con *Trichoderma*, T2: tratamiento con químicos) a lo largo del ciclo de cultivo de 120 días. Año 2.

Los cambios en la concentración fueron más equilibrados en los conteos bajo el efecto del antagonismo biológico, aunque la cantidad final de esclerocios al término del ciclo de cultivo fue prácticamente la misma en ambos tratamientos. Este tipo de observaciones, producto de las interacciones entre el tratamiento y la cantidad de esclerocios, pueden dar indicaciones para el diseño y la evaluación de estrategias de control integrado de la enfermedad.

Para el análisis estadístico durante todo el ciclo de cultivo en los seis bloques y bajo los dos tratamientos, se realizó una comprobación de la normalidad de los datos mediante sus residuos, a través de la prueba Ryan-Joiner, y se obtuvo que no siguen el supuesto de una distribución normal ($p=0,01$). Por este motivo, los datos se transformaron mediante Box-Cox y se comprobó su normalidad ($p=0,081$).

El análisis de varianza posterior (cuadro 3) demostró que no existieron diferencias entre la cantidad de esclerocios contados en cada uno de los tratamientos ($p=0,069$), pero sí entre los conteos de los bloques ($p=0,000$) y los días después de la siembra ($p=0,007$).

Los resultados mostraron que las diferencias establecidas son influenciadas por el bloque (parcela) del que provenían, lo que se relaciona directamente con el inóculo inicial encontrado. Las propiedades internas de los esclerocios de *S. cepivorum*, como son la formación de estructuras secundarias y la latencia constitutiva y la exógena, juegan un papel fundamental en los factores de diseminación y en el aumento de la cantidad de los mismos al final de la cosecha (Coley et al., 1990). Lo anterior cobra importancia cuando se considera la interacción del tipo de tratamiento con los bloques (parcelas) y el nivel de inóculo inicial de cada uno. Y coincide con lo encontrado por otros autores (Metcalf et al., 2004; Rojas et al., 2010; Ulacio et al., 2003; Clarkson et al., 2006). El día 60 sobresale por la mayor producción de esclerocios, lo que coincide con el inicio de la formación de la cabeza del ajo, proceso que involucra la producción de mayor cantidad de nutrientes y sustancias que favorecen el crecimiento del patógeno.

Cuadro 3. Factores incluidos en el ANDEVA y comparación de medias realizadas con la prueba de Tukey.

Factores analizados					
Bloque	Esclerocios/g de suelo	DDS	Esclerocios/g de suelo	Tratamiento	Esclerocios/g de suelo
A	0.169 b ¹	0	0.078 b	<i>Trichoderma</i>	0.565 a
B	0.608 a	30	0.196 ab	Químico	0.636 a
C	0.107 b	60	0.396 a	-	-
D	0.125 b	90	0.323 ab	-	-
E	0.135 b	120	0.112 b	-	-
F	0.185 b	-	-	-	-

¹ Los valores con la misma letra en cada columna no difieren en la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

En todas las parcelas y en cada mes evaluado, el tratamiento con *Trichoderma* siempre presentó conteos iguales o menores de esclerocios que el tratamiento con fungicidas químicos, lo que da una indicación de su efectividad. Los resultados obtenidos en la evaluación de la mortalidad por parcela y por tratamiento se presentan en el cuadro 4. El análisis confirmó la efectividad de *Trichoderma* como tratamiento alternativo, al presentar un desempeño estadísticamente igual que el tratamiento químico utilizado.

En relación con la mortalidad, es importante hacer notar que el tratamiento 1 (con *Trichoderma*) siempre fue el que presentó igual o menor mortalidad en todas las parcelas. El porcentaje de mortalidad total es un factor importante que se puede relacionar con el inóculo inicial presente en esa parcela. Existe una relación lógica, marcada por el modelo de infección monocíclica, que determina que a mayor inóculo inicial, mayor debe ser la infección ($x = Qrt$) (APS, 2014). En este caso, las concentraciones iniciales de inóculo de 10 esclerocios/g provocaron una pérdida de 1,5% del total de las plantas. Las densidades de inóculo inicial de 20 esclerocios/g causaron una mortalidad del 4,1%, y conteos de 40 esclerocios/g produjeron una mortalidad total del 12,7% de las plantas. La relación descrita pone de manifiesto la importancia de un manejo adecuado del inóculo inicial de cada parcela, con el fin de reducir las pérdidas totales que se pueden asociar a dicho nivel de infestación, lo que también ha sido confirmado en muchas investigaciones (Delgadillo et al., 2002; Crowe et al., 1979; Ponce et al., 2008).

Cuadro 4. Mortalidad de plantas por parcela y por tratamiento.

Parcela	Inóculo inicial*	Mortalidad total por tratamiento	% Mortalidad/ Tratamiento	Mortalidad total Plantas/Parcela	% Mortalidad total
1	20	T1= 11	3,3	27	4,1
		T2= 16	4,8		
2	40	T1= 36	10,9	84	12,7
		T2= 48	14,5		
3	10	T1= 5	1,5	10	1,5
		T2= 5	1,5		
4	10	T1= 4	1,2	8	1,2
		T2= 4	1,2		
5	5	T1= 2	0,6	7	1,1
		T2= 5	1,5		
6	25	T1= 20	6,1	43	6,5
		T2= 23	7,0		

*= esclerocios por kg de suelo.

Conclusiones

Se determinó que *Trichoderma* es una alternativa viable para el control del hongo *Sclerotium cepivorum*, ya que en el campo mostró una eficacia similar a los controles químicos más usados; esto se constató por el conteo de esclerocios y la mortalidad durante el cultivo.

Asimismo, se confirmó la importancia que tiene la cuantificación del inóculo inicial sobre el desarrollo de la enfermedad y la mortalidad asociada. Este aspecto se considera una herramienta valiosa para lograr una adecuada planificación por parte del productor y las autoridades sanitarias.

El uso de microorganismos como método alternativo para la sustitución de plaguicidas permite disminuir el impacto negativo de la agricultura sobre el ambiente y contribuir con su sostenibilidad, además de proporcionar métodos de cultivo más seguros para la salud de los trabajadores. Estas prácticas no solo se deben incentivar, sino también potenciar por medio de la investigación, para asegurar un óptimo control por parte de los microorganismos de las enfermedades a tratar y obtener los mejores resultados. En el caso de *S. cepivorum*, para su combate es fundamental determinar los tiempos de mayor producción de los propágulos, con el fin de enfocar las estrategias de control.

El uso de biocontroladores podría resultar en una disminución de costos para los productores de países que dispongan de producciones artesanales o industriales de microorganismos de alta calidad y precio moderado.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Rectores (Conare), por el financiamiento otorgado mediante el Sistema de Fondos FEES, y a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica, por el apoyo en el manejo administrativo del proyecto.

Bibliografía

- American Phytopathological Society Net. (2014). *Estrategias para el Manejo de las Enfermedades de las Plantas*. Obtenido de <http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Epidemiologia/Pages/Estrategias.aspx>.
- Clarkson, P., Scruby, A., Bellows, T. & Fisher, T. (Eds.). (1999). *Handbook of Biological Control*. California: Academic Press.
- Mead, A., Wright, C., Smith, B. & Whipps, J. (2006). Integrated control of *Allium* white rot with *Trichoderma viride*, tebuconazole and composted onion waste. *Plant Pathology*, *55*, 375-386.
- Coley-Smith, J., Mitchell, C. & Sansford, C. (1990). Long term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. *Plant Pathology*, *39*, 58-69.
- Coventry, E., Noble, R., Mead, A. & Whipps, J. (2005). Suppression of *Allium* white rot (*Sclerotium cepivorum*) in different soils using vegetable wastes. *European Journal of Plant Pathology*, *111*, 101-112.
- Crowe, F., Hall, D., Greathead, A. & Baghott, K. (1979). Inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and the incidence of white rot of onion and garlic. *Phytopathology*, *70*, 64-69.
- Davis, R. (2002). *Use of a natural product to stimulate sclerotial germination of Sclerotium cepivorum for the control white rot of onions and garlic*. Pest Management Grants Final Report. California Department of Pesticide Regulation, University of California.
- Delgadillo, F., Zavaleta, E., Osada, S., Arévalo, A., González, V., Nieto, D. & Torres, I. (2002). Densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* Berk. y su control mediante tebuconazole en ajo (*Allium sativum* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, *25*, 349-354.
- Harman, G., Howell, C., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Natures Reviews*, *2*, 43-56.
- Howell, C. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, *87*, 4-10.
- Kubicek, C., Komon-Zelazowska, M. & Druzhinina, I. (2008). Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *Journal of Zhejiang University Science B*, *9*, 753-763.
- McLean, K., Hunt, J. & Stewart, A. (2001). Compatibility of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* c52 with selected fungicides. *New Zealand Plant Protection*, *54*, 84-88.
- Melero, J., Prados, A. & Basallote, M. (2000). Comparison of physical, chemical and biological methods of controlling garlic white rot. *European Journal of Plant Pathology*, *106*, 581-588.
- Metcalf, D., Dennis, J. & Wilson, C. (2004). Effect of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* on the ability of *Trichoderma koningii* to suppress white rot of onion. *Plant Disease*, *88*, 287-291.
- Mukherjee, P., Nautiyal, C. & Mukhopadhyay, A. (2008). Molecular Mechanisms of Biocontrol by *Trichoderma* spp. En C.S. Nautiyal y P. Dion (Eds.), *Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence*. *Soil Biology 15*. Berlin: Springer-Verlag.
- Ponce, V., García, R., Rodríguez, M. & Zavaleta, E. (2008). Análisis temporal de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla (*Allium cepa* L.) bajo tres niveles de inóculo del patógeno. *Agrociencia*, *42*, 71-83.
- Rivera, W. (2011). *Aislamiento y uso de cepas de Trichoderma spp. para el control biológico del hongo Sclerotium cepivorum Berkeley, causante de la pudrición blanda de bulbos de ajo (Allium sativum), con miras a la transferencia tecnológica a productores de la zona de Llano Grande de Cartago*. Tesis Magister en Gestión de recursos naturales y Tecnologías de producción. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Rojas, V., Ulacio, D., Jiménez, M., Perdomo, W. & Pardo, A. (2010). Análisis epidemiológico y control de *S. cepivorum* Berk. y la pudrición blanca en ajo. *Bioagro*, *22*(3), 185-192.
- Schuster, A. & Schmoll, M. (2010). Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbial Biotechnology* *87*, 787-799.
- Ulacio, D., Zavaleta, E., García, R., Delgadillo, F., Pedroza, A. & Martínez, A. (2003). Materia orgánica y microorganismos antagonistas como estrategias de manejo de *Sclerotium cepivorum* Berk y su impacto en el progreso de la pudrición blanca en ajo (*Allium sativum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, *21*(3), 346-354.
- Ulacio, D., Jiménez, M. & Perdomo, W. (2011). Estrategias de manejo integrado de *Sclerotium cepivorum* Berk y la pudrición blanca del ajo en Carache, Estado Trujillo, Venezuela. *Bioagro*, *23*, 105-114.
- Velásquez, R. & Medina, M. (2004). Persistencia de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. en suelos infestado de Aguas Calientes y Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *22*, 143-146.
- Vimard, B., Leggett, E. & Rahe, E. (1986). Rapid isolation of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* from muck soil by sucrose centrifugation. *Phytopathology*, *76*, 465-467.

Identificación y caracterización molecular del hongo causante de la pudrición blanca en *Allium cepa*, en Llano Grande de Cartago, Costa Rica

Isolation and identification of causal agent of white rot in *Allium cepa*, in Llano Grande Cartago, Costa Rica

Wendy Aguilar-Ulloa¹, Priscilla Arce-Acuña², William Rivera-Méndez³

Fecha de recepción: 27 de marzo del 2015
Fecha de aprobación: 6 de agosto del 2015

Aguilar-Ulloa, W; Arce-Acuña, P; Rivera-Méndez.
Identificación y caracterización molecular del hongo causante de la pudrición blanca en *Allium cepa*, en Llano Grande de Cartago, Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. Edición Especial Biocontrol. Pág 51-56.

1 Ingeniera en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tel. 63065604, correo electrónico: waguilar@estudiantec.cr

2 Ingeniera en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tel. 6052-0515, correo electrónico: priarce.30@gmail.com

3 Profesor de la Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: wirivera@itcr.ac.cr

Palabras clave

Sclerotinia sclerotiorum; pudrición blanca; cebolla.

Resumen

La cebolla (*Allium cepa* L.) es un cultivo de importancia de Costa Rica, tanto para el consumo nacional como internacional. En este cultivo se presentan pérdidas económicas debido a enfermedades producidas por patógenos como la pudrición blanca, que afecta directamente el bulbo y representa una gran amenaza para la agricultura, por tener la capacidad de perdurar hasta 20 años en el suelo. El objetivo general de esta investigación consistió en hacer el diagnóstico microbiológico y molecular de un patógeno causante de pudrición blanca en cebolla cultivada en Varillal de Llano Grande, en la provincia de Cartago, Costa Rica, mediante el aislamiento y cultivo de esclerocios. Con esta metodología se logró el aislamiento e identificación del patógeno causante de la pudrición blanca en la cebolla y se determinó que, de manera microscópica, es similar a *Stromatinia cepivorum* ya que desarrolla esclerocios y presenta hifas con estructuras en forma de *clamps*, sin embargo, mediante el análisis molecular se logró identificar como *Sclerotinia sclerotiorum*, otro patógeno causante de esta enfermedad.

Keywords

Sclerotinia sclerotiorum; white rot; onion.

Abstract

Onion (*Allium cepa* L.) is a very important crop in Costa Rica in national consume but also international. With this crop, it has been estimated economic loses because of diseases produced by different pathogens like the white rot, which generate illness directly in the bulb and it represents a great threat for the agriculture, because it can stay 20 years in the ground. Therefore, the general objective of this research was to develop a microscopic and molecular diagnosis of the pathogen that causes the white rot in the onion cultivated in Varillal de Llano Grande in Cartago, from sclerotic isolation and culture. The followed methodology allowed us to isolate and identify the causal agent of this illness, the one in a microscopic manner it was similar to *Stromatinia cepivorum*, however it was able to identify as *Sclerotinia sclerotiorum* by molecular analysis.

Introducción

La cebolla (*Allium cepa* L.) es uno de los cultivos más importantes de Costa Rica. Su producción satisface el consumo nacional y un porcentaje se destina a la exportación. La producción de este cultivo se concentra principalmente en la zona alta de la provincia de Cartago, en los cantones Central, Oreamuno y Alvarado, donde se ubican cerca del 79% de los productores, mientras que el porcentaje restante se distribuye entre las zonas de Santa Ana, Alajuela, Belén y Bagaces (Granados, 2005).

En Costa Rica, se estiman pérdidas económicas que rondan el 39% de la producción del primer ciclo de cultivo de la cebolla debido a la enfermedad fúngica conocida como pudrición blanca, que genera afecciones directamente en el bulbo. Esto hace que el control de esta enfermedad sea de vital importancia a nivel comercial (Granados & Wang, 2008; Rojas et al., 2010).

El cultivo de la cebolla se ve afectado por diversos patógenos causantes de pudriciones radicales, entre los que destacan *Fusarium oxysporum* f. sp. cepa, *Sclerotium cepivorum*, *Pyrenochaeta terrestris* y *Pythium* spp. (Herrera et al., 2012). Se ha reportado que la pudrición blanca en cebolla es inducida principalmente por el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk, específico del género *Allium* y perteneciente al orden Mycelia sterilia (Herrera et al., 2008; Velásquez et al., 2011; Cortez, 2014).

Sin embargo, en otras hortalizas como lechuga, coliflor, repollo, cebolla, calabacín, apio, entre otras, se ha determinado que la pudrición blanca puede ser producida por otros hongos patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum* y *S. minor* que son microorganismos capaces de formar esclerocios y desarrollar síntomas similares a los producidos por *S. cepivorum* (Granados, 2005; Pérez et al., 2009).

La particularidad de estos patógenos es que pueden persistir en el suelo hasta por 20 años, con un viabilidad promedio del 90%, gracias a la formación de estructuras resistentes llamadas esclerocios, que son además las estructuras reproductivas que funcionan como inóculo, tal es el caso del hongo *Sclerotinia sclerotiorum* (Granados, 2005).

S. sclerotiorum pertenece al filo Ascomycota, comúnmente habita el suelo, está distribuido mundialmente y afecta alrededor de 360 especies de plantas cultivadas, causando la enfermedad conocida como pudrición blanca o moho blanco (Smith, 2007).

Para la agricultura, esta enfermedad representa una gran amenaza, ya que prácticas como la rotación de cultivos no resultan eficaces, no existen variedades resistentes y el combate químico no es factible económicamente, porque se necesitan dosis muy altas que no aseguran una adecuada cobertura de los sitios de infección (Velásquez et al., 2011). Ante esta problemática, ha sido muy importante el apoyo al sector agrícola y el desarrollo de investigaciones con el fin de tener un mayor conocimiento de los agentes causales.

Con el fin de emplear estrategias más eficientes para la identificación, se han desarrollado diferentes investigaciones, como en el caso de *S. cepivorum*, mediante la detección molecular, amplificando las regiones ITS del hongo, lo que ha cobrado mayor importancia ya que representa una técnica más eficiente, específica y sencilla para su identificación tanto en muestras de plantas como de suelo (Cortez, 2014).

El objetivo de esta investigación se enfoca en el aislamiento e identificación del agente causante de la pudrición blanca en muestras de cebolla de la zona de Llano Grande, Cartago, mediante técnicas microbiológicas y el diagnóstico molecular.

Materiales y métodos

Localización y material experimental

Se tomaron muestras de cebollas que presentaron micelio de coloración blanca y esclerocios adheridos en la zona radical, en una finca ubicada en la zona de Varillal de Llano Grande, a 1850 metros sobre el nivel del mar (msnm). Las pruebas y procedimientos se llevaron a cabo en los laboratorios de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Aislamiento de los esclerocios

Los esclerocios fueron retirados de las cebollas cuidadosamente y se colocaron sobre una toalla de papel, luego se realizó un proceso de desinfección con hipoclorito de sodio al 3% durante 30 segundos, 1 minuto en alcohol al 70% y 2 minutos en agua destilada estéril. Se tomaron grupos de 10 esclerocios, se cultivaron en placas de Petri con medio de cultivo PDA acidificado y se

incubaron durante siete días a 30 °C. Posteriormente, se seleccionaron esclerocios germinados y se transfirieron a placas de PDA acidificado y se incubaron a 30 °C durante 10 días.

Identificación microscópica

Para la identificación microscópica se tomó un segmento del micelio de los esclerocios germinados, se colocó en un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol y se observó en el microscopio hasta un aumento de 100X. Los esclerocios formados en la placa de medio de cultivo se observaron en el estereoscopio.

Análisis molecular

Extracción de ADN

Se utilizó el kit Power Soil® DNA Isolation y se siguió el protocolo establecido por el fabricante. Se realizó una variante en el proceso de lisis, para lo cual las muestras se calentaron sin aditivo 1, posteriormente se adicionó a cada muestra el volumen de aditivo 1 y se procedió a realizar el proceso de calentado.

Amplificación del ADN

Se utilizaron las siguientes mezclas de reactivos para realizar la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de cada muestra: 30,7µl de agua para PCR, 5 µl de Buffer Dream Taq 10X, 5µl dNTPs (2mM), 2µl de cada *primer* (10µM), 0,3 µl de Dream Taq polimerasa (5U/µl) y 5µl de la muestra. El volumen total de la reacción fue 50µl. Se utilizó el perfil térmico para *primers* universales del dominio Eukarya descrito por Gutiérrez et al. (2010). Se utilizaron los *primers* GC-FUNG y NS1 y agua destilada como control negativo. Los fragmentos de ADN amplificados se analizaron mediante secuenciación y se analizó la información obtenida con el propósito de encontrar diferencias o similitudes entre las muestras.

Resultados y discusión

Aislamiento e identificación de estructuras

El cultivo de los esclerocios del bulbo de la cebolla permitió el aislamiento del hongo *Sclerotinia sclerotiorum*, ya que el esclerocio produce micelio y el desarrollo de abundantes estructuras reproductivas (figura 1).



Figura 1. Aislamiento de *Sclerotinia sclerotiorum* en medio de cultivo PDA mediante el cultivo de esclerocios extraídos de muestras de cebolla.

En la plantación de cebolla muestreada en Llano Grande de Cartago fue posible observar los diferentes síntomas característicos del desarrollo de la enfermedad. Entre estos se destacan primeramente el amarillamiento general de la planta, sobre todo cuando se inicia el proceso de bulbificación, así como la muerte descendente de las hojas externas, la aparición de una pudrición basal seca o ligeramente acuosa, paralelamente en las hojas inferiores y en las raíces la acumulación de micelio blanco y lanoso que produce esclerocios negros esféricos tanto en la superficie como de manera interna en los tejidos enfermos y que culmina con la pudrición completa del bulbo (figura 2). La enfermedad se desarrolla a una temperatura de 16-20 °C y una humedad relativa menor al 90%, principalmente en suelos con alta humedad, ya que este es un factor de predisposición que favorece el desarrollo de la infección (Carranza, 2006).

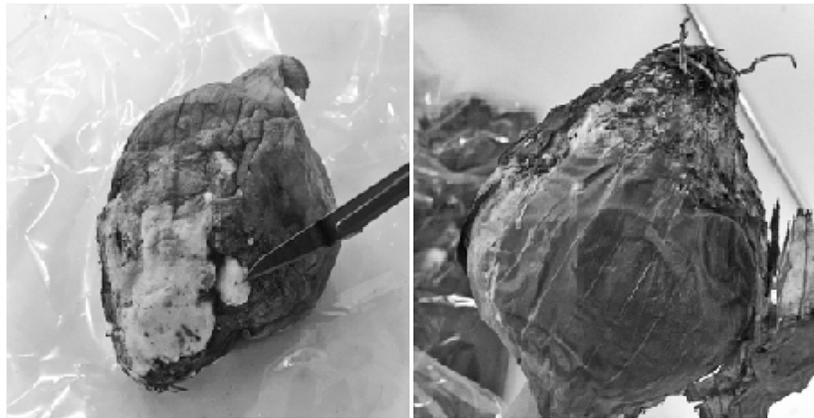


Figura 2. Bulbos infectados de la Finca en Varillal de Llano Grande.

El micelio blanco algodonoso con presencia de esclerocios oscuros de tamaño reducido obtenidos tras el cultivo de los esclerocios aislados del bulbo es característico de *S. sclerotiorum*. Según Pérez et al. (2009), una particularidad importante es el tamaño de los esclerocios, que son más grandes que los de *S. minor*, con un diámetro de entre 2 y 10 mm (figura 3). Las hifas que germinan a partir de esclerocios presentan anastomosis, un fenómeno que permite el intercambio por fusión entre ellas, lo cual lleva a observar la formación de fíbulas o *clamps*, por su nombre en inglés (figura 3).

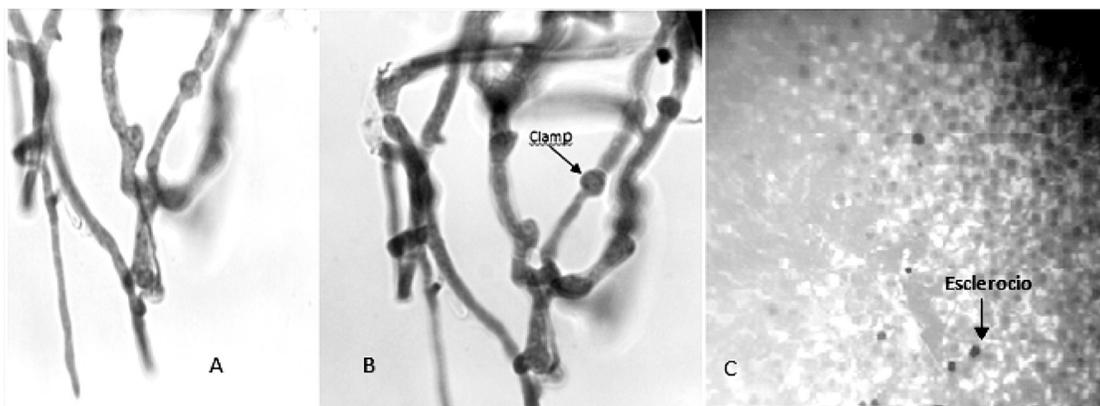


Figura 3. Estructuras vistas en el microscopio. A) Micelio de *S. sclerotiorum*, B) presencia de *clamps* en el micelio (100X), C) esclerocios observados en el estereoscopio.

Tras el análisis de los resultados de la secuenciación mediante herramientas bioinformáticas, se logró determinar que el hongo aislado corresponde a *S. sclerotiorum* con un 99% de identidad, descartando así que el patógeno causante de la pudrición blanca fuera *Sclerotium cepivorum*, que, según Granados (2005), es el patógeno causante de esta enfermedad con mayor incidencia en las zonas altas de Cartago; además, de igual manera, este hongo se caracteriza morfológicamente por un micelio blanco, la formación de esclerocios y *clamps*. A esto se le suma la similitud de la forma de infección en el cultivo y los respectivos síntomas presentes en la planta.

Conclusiones

Se logró aislar el patógeno causante de la pudrición blanca en la cebolla cultivada en Varillal de Llano Grande, el cual de manera microscópica es similar a *Sclerotium cepivorum*, pero que mediante el análisis molecular se logró identificar como *Sclerotinia sclerotiorum*.

Bibliografía

- Carranza, Z. (2006). *Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizógenos del Estado de Hidalgo más competentes en medio de cultivo sólido*. Tesis de grado para optar por el título de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Cortez, A. (2014). *Estandarización de una metodología para la detección molecular de Sclerotium cepivorum en suelos, basada en la amplificación de secuencias espaciadoras internas de transcripción (ITS)*. Trabajo de grado para optar por el título de Licenciatura en Biotecnología, Universidad Autónoma de Querétaro, México.
- Granados, M. (2005). Pudrición blanca de la cebolla, una enfermedad difícil de combatir. *Revista Agronomía Costarricense*, 29(2), 143-156.
- Granados, M. & Wang, A. (2008). Efecto de biocontroladores aislados en finca productoras de cebolla sobre la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum*). *Revista Agronomía Costarricense*, 32(1), 9-17.
- Gutiérrez, A., Pantoja, S., Quiñones, R. & González, R. (2010). Primer registro de hongos filamentosos en el ecosistema de surgencia costero frente a Chile central. *Gayana*, 74(1), 66-73.
- Herrera, V., García, R., Rodríguez, M. & Zavaleta, E. (2008). Análisis temporal de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla (*Allium cepa* L.) bajo tres niveles de inóculo del patógeno. *Agrociencia*, 42, 71-83.
- Herrera, A., Zavaleta, E., Cervantes, L. & Grimaldo, O. (2012). Alternativas de control de la pudrición radical de cebolla para el Valle de la Trinidad, Baja California. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(1), 97-112.
- Pérez, S., Piedrahíta, W. & Arbeláez, G. (2009). Patogénesis de la pudrición blanda de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) en la Sabana de Bogotá causada por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotinia minor* Jagger. Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 3(2), 262-274.
- Rojas, V., Ulacio, D., Jiménez, M., Perdomo, W. & Pardo, A. (2010). Análisis epidemiológico y control de *Sclerotium cepivorum* Berk y la pudrición blanca en ajo. *Revista Bioagro*, 22(3), 185-192.
- Smith, A. (2007). *Caracterización, análisis espacial y manejo integrado del moho blanco (Sclerotinia minor Jagger y S. sclerotiorum (Lib.) de Bary) en lechuga bartavia (Lactuca sativa L. var. capitata L.) en la vereda La Moya (Cota-Cumdinamarca)*. Trabajo de grado para optar por el título de microbiología agrícola y veterinario. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Velásquez, R., Reveles, M. & Medina, M. (2011). *Ecología del hongo causante de la pudrición blanca del ajo y cebolla y saneamiento de parcelas infestadas*. Folleto Técnico No. 32. Campo Experimental Zacatecas, CIRNOC-INIFAP.

Actividad antagonista de *Gliocladium sp.* contra *Sclerotium cepivorum*

Antagonist activity of *Gliocladium sp.* against *Sclerotium cepivorum*

Humberto Castillo¹, Randall Rojas², Manuel Villalta³

Fecha de recepción: 27 de marzo del 2015
Fecha de aprobación: 6 de agosto del 2015

Castillo, H; Rojas, R; Villalta, M. Actividad antagonista de *Gliocladium sp.* contra *Sclerotium cepivorum*. *Tecnología en Marcha*. Edición Especial Biocontrol. Pág 57-64.

-
- 1 Estudiante de Ingeniería en Biotecnología. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: humber198@hotmail.com, tel. 89483795.
 - 2 Estudiante de Ingeniería en Biotecnología. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: randallrojas16@gmail.com, tel. 84328050.
 - 3 Estudiante de Ingeniería en Biotecnología. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: mvilla024@gmail.com, tel. 88605074.

Palabras clave

Aislamiento; biocontrolador; inhibición del crecimiento radial; metabolitos secundarios.

Resumen

Algunos géneros fúngicos han sido utilizados para el control de agentes causantes de enfermedades en plantas, por lo que su actividad representa una alternativa para la disminución e incluso la sustitución de químicos sintéticos. Existen hongos antagonistas ampliamente estudiados, como *Trichoderma* sp., que concurre con otros hongos que poseen un alto potencial como agentes biocontroladores, entre ellos se destaca *Gliocladium* sp. En este estudio se pretende establecer la capacidad antagonista que tiene *Gliocladium* contra el patógeno causante de la pudrición blanca de la cebolla, *Sclerotium cepivorum*. Se logró aislar *Gliocladium* sp. a partir de una muestra de suelo dedicada al cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.), se subcultivó hasta obtener un cultivo axénico y se realizaron cultivos duales en placas con el hongo y el patógeno. Se determinó que el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) promedio obtenido a los ocho días de exposición (53,66%) no presentaba diferencias significativas ($p=0,19$) con el obtenido a los 15 días (54,20%) y, dadas las características de inhibición, se presume que el mecanismo de control presentado por la cepa de *Gliocladium* sp. utilizada responde a la producción de enzimas, metabolitos y posiblemente una mezcla de compuestos orgánicos volátiles capaces de inhibir el crecimiento y desarrollo de *S. cepivorum* aun sin que sus hifas entren en contacto.

Keywords

Isolation; biocontrol; inhibition of radial growth; secondary metabolites.

Abstract

Some fungal genus have been used in controlling disease-causing agents in plants, so their activity represents an alternative to reduce and even replace some synthetic chemicals. There are many studies about antagonistic Fungi, such as *Trichoderma spp.*, which concurs with other Fungi that have high potential as biocontrol agents, like the genus *Gliocladium*. In this study, it is intended to establish the antagonistic ability of this one against the pathogen causing white rot in onions *Sclerotium cepivorum*. It was possible to isolate *Gliocladium sp.* from a soil sample, which was subcultured until obtain an axenic culture and then, dual cultures were performed on plates with the fungus and the pathogen. The average IPRG obtained at 8 days of exposure (53.66%) showed no significant difference ($p= 0,19$) to the one obtained at 15 days (54.20%). It was presumed that the control mechanism presented by the strain of *Gliocladium sp.* used, responds to the production of enzymes, metabolites and possibly a mixture of volatile organic compounds capable of inhibit the growth and development of *Sclerotium* even if their hyphae don't come into contact.

Introducción

En Costa Rica, tanto la cebolla (*Allium cepa* L.) como el ajo (*Allium sativum*) son hortalizas de importancia económica. Para el año 2013 la producción de cebolla alcanzó 1247 ha, siendo la provincia de Cartago la principal zona productora, con 1100 ha (SEPSA, 2013). A su vez, el ajo tiene una alta demanda en el país, sin embargo, su producción se ve afectada por los bajos

rendimientos y la importación del producto. Se estima que la zona de Llano Grande de Cartago concentra dicha actividad, con 3 ha sembradas (Brenes & Guillén, 2014).

El hongo patógeno *Sclerotium cepivorum* es un habitante del suelo presente en clima templado y subtropical (Sarmiento & Monsalve, 2013). Se caracteriza por infectar las plantas del género *Allium* y ocasionar la enfermedad conocida como podredumbre blanca de la cebolla, generando con ello pérdidas importantes en los cultivos (Ouf et al., 2008). Este hongo tiene la capacidad de desarrollar esclerocios secundarios dentro de los esclerocios originales, generando una gran capacidad de resistencia en el suelo que puede prolongarse hasta por 20 años y que dificulta su control (Rojas et al., 2010; Astorga-Quirós et al., 2014b). El hongo invade las raíces y bulbos en forma de moho blanco y sedoso para luego formar los esclerocios. Los compuestos de azufre en los exudados favorecen la germinación de los esclerocios, ocasionando la podredumbre de la planta joven; si la planta está en estado tardío inicialmente no presenta síntomas pero sí durante su almacenamiento (Astorga-Quirós et al., 2014b).

Una de las estrategias de combate contra *S. cepivorum* es el uso de fungicidas, sin embargo, es una técnica poco práctica y con un considerable impacto ambiental, por lo que se han implementado otros métodos como el biocontrol (Jiménez et al., 2013). A pesar de la resistencia de los esclerocios, diversos estudios han demostrado su susceptibilidad frente a otros microorganismos (Sarmiento & Monsalve, 2013); por ejemplo, la acción antagonista in vitro de *Trichoderma* sp. contra *S. cepivorum* ha sido evaluada por varios autores (Shalaby et al., 2013; Sarmiento & Monsalve, 2013; Astorga-Quirós et al., 2014a).

Los hongos biocontroladores utilizan diversos mecanismos, tales como las enzimas quitinolíticas, antibióticos que inhiben el crecimiento de otros hongos. También se caracterizan por competir por nutrientes y evitar que su tejido huésped sea colonizado por patógenos, mientras que muchos inducen resistencia en las plantas (Narayanasamy, 2013).

Gliocladium sp. es un género perteneciente al filo Ascomycota, del que se han descrito al menos 32 especies (Roskov et al., 2015). Su potencial como biocontrolador se ha evidenciado frente a *Alternaria*, *Botrytis*, *Didymella*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* y *Slerotinia*. El principal método de acción observado en *Gliocladium* es el enrollamiento de sus hifas alrededor de las del patógeno (Helyer et al., 2014).

El objetivo del presente trabajo es evaluar la capacidad antagonista in vitro del hongo biocontrolador *Gliocladium* sp., aislado a partir de suelo dedicado al cultivo de cebolla, sobre el hongo patógeno *S. cepivorum* a través del análisis del índice de inhibición radial.

Metodología

Aislamiento del biocontrolador

Gliocladium sp. se aisló a partir de una muestra de tierra proveniente de cultivos de cebolla de la provincia de Cartago, Costa Rica. Para el aislamiento se tomó como base la metodología y el medio de cultivo descrito por Vargas et al. (2009). La metodología empleada se detalla a continuación:

- Se tomaron 10 g de suelo y se disolvieron en 90 ml de agua destilada (10^{-1}), procurando realizar la mayor homogenización posible. Se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} . Para cada dilución realizada, se inoculó 1 ml en placas de Petri con agar Rosa de Bengala (0,3 g/l cloranfenicol; 0,1 g/l estreptomycin; pH 6). Las placas se dejaron incubando a temperatura ambiente (24-25 °C) durante ocho días. Para el aislamiento únicamente se emplearon las placas que presentaban colonias separadas y bien definidas.

- Se identificaron las colonias de hongos que por su apariencia y características (color y crecimiento de los micelios, entre otras) tenían probabilidades de ser de *Gliocladium* sp. y se subcultivaron en placas de Petri con PDA acidificado. Una vez que las colonias subcultivadas crecieron, se identificaron bajo el microscopio las que, por sus características morfológicas, efectivamente eran *Gliocladium* sp. y se procedió a subcultivarlas nuevamente en PDA acidificado.

Pruebas in vitro de la capacidad biocontroladora de *Gliocladium* sp. para *S. cepivorum*

La capacidad biocontroladora de la cepa de *Gliocladium* sp. aislada se probó de forma in vitro mediante pruebas de inhibición de crecimiento radial en cultivos duales, tomando como base la metodología propuesta por Agarwal et al. (2011). En placas de Petri (8,5 cm de diámetro) con PDA acidificado se procedió a sembrar en un extremo un disco (7 mm de diámetro) del micelio activo del biocontrolador. En las mismas placas se colocó en el otro extremo un disco del mismo tamaño con el micelio activo del patógeno. Se dejaron incubando a temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C. En total se cultivaron 16 placas, sin contar los controles. Los controles únicamente contenían, en un extremo, un disco con el micelio activo, ya fuera del patógeno o del hongo con la supuesta actividad antagonista. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) se calculó con base en mediciones a los 8 y a los 15 días para las 16 placas con el fin de determinar, aparte de la capacidad biocontroladora de *Gliocladium*, si esta aumentaba o disminuía según el tiempo que estuvieran expuestos los dos hongos. El PICR se calculó con la siguiente fórmula:

$$PICR = \frac{100 * r1 - r2}{r1}$$

r1= diámetro de colonia control de *S. cepivorum*

r2= diámetro de colonia de *cepivorum* en cultivo dual con *Gliocladium*.

Resultados

Aislamiento de *Gliocladium* sp.

Se logró obtener un cultivo puro de *Gliocladium* sp. después de varios subcultivos, a partir del aislamiento, utilizando una muestra de suelo dedicada al cultivo de cebolla (figura 1).

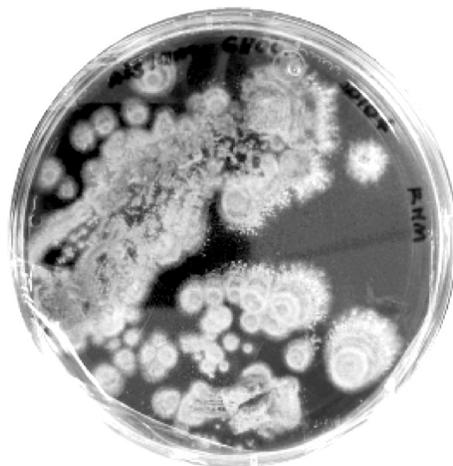


Figura 1. Cultivo axénico en PDA acidificado obtenido del *Gliocladium* sp. aislado.

Como se observa en la Figura 1, la especie de *Gliocladium* sp. que se logró aislar presenta la particularidad de que libera compuestos que tiñen el medio de cultivo (PDA) de un color rojizo. Las colonias se caracterizan por ser de color amarillo con zonas rojizas, pero estas características cambian con la edad del cultivo.

Para la identificación se examinaron sus estructuras en el microscopio. En la Figura 2 se observa el conidióforo de *Gliocladium* sp.

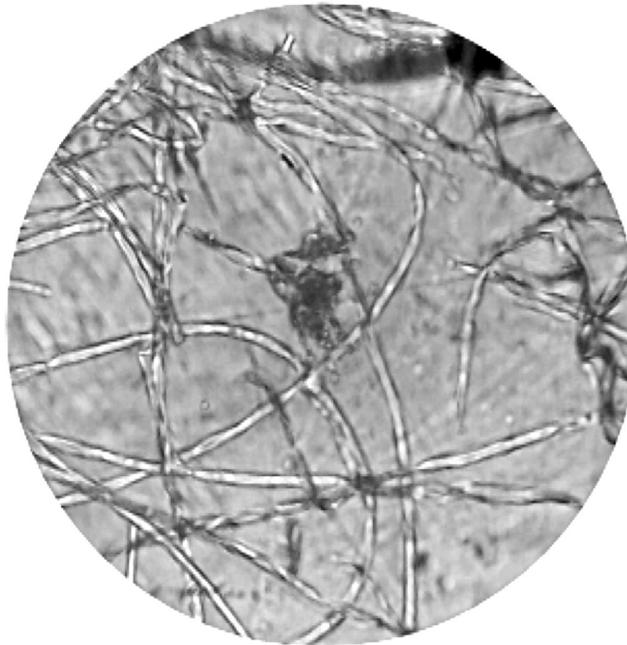


Figura 2. Características morfológicas del conidióforo que presenta la cepa aislada de *Gliocladium* sp. (40X).

Se observa que el conidióforo presenta fiálides ramificadas con conidios esféricos en sus puntas y aglomerados.

Pruebas in vitro de la capacidad biocontroladora de *Gliocladium* sp. para *S. cepivorum*

El PICR promedio de *S. cepivorum* calculado a los 8 días fue de 53,66%, mientras que a los 15 días fue de 54,20%.

Con el fin de determinar si hubo diferencia significativa o no entre los PICR calculados para los 8 y los 15 días, se realizó un análisis estadístico. Al emplearse la prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificada se determinó que los datos obtenidos no presentaban un comportamiento normal ($n= 32$, $w^*= 0.90$ y $p= 0.01$), por lo que se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis para analizarlos, obteniéndose: $H= 1.64$ y $p= 0.19$. Estos resultados indican que no existe diferencia significativa entre los PICR calculados, es decir, el tiempo de exposición, ya sea 8 o 15 días, no ejerce un efecto directo sobre la inhibición del crecimiento del patógeno por parte de *Gliocladium*.

Cabe destacar que, según lo observado en las pruebas de antagonismo, la inhibición del crecimiento del patógeno se debió principalmente a la liberación de metabolitos al medio por parte del biocontrolador, presencia que se evidencia debido a que tiñeron el medio PDA de un tono rojizo (figura 3).



Figura 3. Pruebas de inhibición del crecimiento radial de *S. cepivorum* empleando *Gliocladium* sp. como agente biocontrolador.

Discusión

Narayanasamy (2013) indica que se han buscado métodos eficientes de aislamiento de *Gliocladium* sp., debido a los múltiples beneficios de este hongo como agente biocontrolador de hongos fitopatógenos. Este autor establece que el medio de aislamiento más eficiente fue el empleado en esta investigación, que consiste en el medio Agar Papa Dextrosa modificado con Rosa Bengala, cloranfenicol y sulfato de estreptomicina. Sin embargo, de acuerdo con Young et al. (2010), al no ser este medio selectivo para *Gliocladium* sp., se debe proceder a una identificación visual basada en características morfológicas distintivas de *Gliocladium* sp., tal como se realizó en su aislamiento.

Menciona Walsh (2010) que una de las características microscópicas de *Gliocladium* sp. es la presencia de conidióforos y fiálides semejantes a las de *Penicillium*; estos conidióforos son erectos y poseen ramificaciones en la parte superior. Kim et al. (2010) destacan que sus fiálides son ramificadas y al final de ellas se encuentran los conidios con morfología esférica y en grupos, formando una bola. Estas características descritas por dichos autores concuerdan con lo observado bajo el microscopio de *Gliocladium* sp. aislado (figura 2). Las colonias obtenidas del aislamiento son amarillas, lo que concuerda con las características de *Gliocladium roseum* sp., mencionadas por Rojas (2004), cuyas colonias pueden ser blancas, amarillas o rojizas (figura 1).

En cuanto a los resultados sobre el potencial antagonista de *Gliocladium* sp. sobre *S. cepivorum*, se observa que después de exponer al antagonista contra el patógeno durante 8 o 15 días, el biocontrolador fue capaz de inhibir el crecimiento del segundo en más de la mitad de lo que este crece normalmente cuando está en un cultivo solo.

Un agente de biocontrol puede actuar contra los agentes patógenos mediante el uso de uno o más de los siguientes mecanismos: competencia, antibiosis y parasitismo, o mediante la activación de los mecanismos de defensa de la planta hospedera (Narayanasamy, 2013). En este caso específico, el crecimiento de *Gliocladium* no es agresivo, por lo que se infiere que su

potencial antagonista contra el agente causal de la pudrición blanca de la cebolla no se basó en colonizarlo, sino en producir una serie de enzimas y metabolitos secundarios con capacidad antifúngica (figura 3). Con el fin de prevenir que el espacio y los nutrientes fueran colonizados por el patógeno, el antagonista pudo haber aumentado la producción de enzimas quitinolíticas o antibióticos, entre otras sustancias, que inhibieran su crecimiento y desarrollo.

Ya se ha reportado que, aparte de producir quitinasas, este hongo también produce metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas, y que incluso sus hifas pueden matar el hongo por actividad enzimática sin penetración (Saputra et al., 2013). El principal compuesto volátil producido por *Gliocladium* sp. es el 1,3,5,7-ciclo-octatetraeno, que es un efectivo inhibidor del crecimiento fúngico (Liouane et al., 2010). En 2003, Stinson et al. encontraron que el hongo producía una mezcla de compuestos orgánicos volátiles (VOC, por sus siglas en inglés) que resultaban letales para ciertos patógenos o que al menos tenían capacidad para inhibir y detener su crecimiento. Estas características hacen de *Gliocladium* un organismo con alto potencial para su utilización en prácticas agrícolas sostenibles para evitar o sustituir los químicos de origen sintético en el control de algunas enfermedades.

Las especies de *Gliocladium* y *Trichoderma* son agentes biocontroladores muy conocidos, a los que se les ha atribuido esta cualidad por su poderosa capacidad de producir un amplio rango de antibióticos (Merillón & Gopal, 2012). Incluso, existen dos especies de *Gliocladium* (*catenulatum* y *virens*) a partir de las cuales se han registrado biofungicidas comerciales (Saputra et al., 2013) que se usan en un amplio rango de situaciones, incluyendo la prevención o el control de enfermedades fúngicas en plantas (Helyer et al., 2014).

Conclusiones

En esta investigación se aisló el hongo biocontrolador *Gliocladium* sp. a partir de muestras de suelo dedicadas al cultivo de cebolla, y se determinó que este microorganismo es capaz de inhibir hasta en más del 50% el crecimiento normal del agente causal de la pudrición blanca en ajo y cebolla (*S. cepivorum*). No se encontró diferencia significativa entre el porcentaje de inhibición de crecimiento radial obtenido a partir de mediciones realizadas a los 8 y 15 días de cultivo dual y de acuerdo con las características del halo de inhibición, se presume que el mecanismo de control presentado por la cepa de *Gliocladium* sp. aislada es la liberación de enzimas, metabolitos y/o posiblemente una mezcla de compuestos orgánicos volátiles al medio, con capacidad para inhibir el crecimiento y desarrollo del patógeno, incluso sin necesidad de que sus hifas entren en contacto, sin embargo, se requieren mayores estudios para su comprobación.

Bibliografía

- Agarwal, T., Malhotra, A., Trivedi, P.C. & Biyani, M. (2011). Biocontrol potential of *Gliocladium virens* against fungal pathogens isolated from chickpea, lentil and black gram seeds. *Journal of Agricultural Technology*, 7(6), 1833-1839.
- Astorga-Quirós, K., Meneses-Montero, K., Zúñiga-Vega, C., Brenes-Madriz, J. & Rivera-Méndez, W. (2014a). Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. *Tecnología en Marcha*, 27(2), 82-91.
- Astorga-Quirós, K., Zúñiga-Vega, C. & Rivera-Méndez, W. (2014b). Aislamiento e identificación de patógenos de la estirpe silvestre del ajo (*Allium sativum* L.). *Tecnología en Marcha*, 27(1), 77-84.
- Brenes-Madriz, J. & Guillén-Watson, A. (2014). Establecimiento de un protocolo *in vitro* para el cultivo del ajo (*Allium sativum*) en Costa Rica. *Tecnología en Marcha*, 27(4), 49-57.



- Demirci, E., Dane, E. & Eken, C. (2011). In vitro antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia on potato tubers against *Rhizoctonia solani*. *Turkish Journal of Biology*, 35, 457-462
- Helyer, N., Cattlin, N.D. & Brown, K.C. (2014). *Biological Control in Plant Protection: A Colour Handbook*. EE.UU.: CRC Press.
- Jiménez, M.A., Asdrúbal, A., Ulacio, D. & Hernández, A. (2012). Evaluación de *Trichoderma* spp. y Acibenzolar-S-Metil (Bion®) como inductores de resistencia a la pudrición blanca *Sclerotium cepivorum* Berk. en ajo (*Allium sativum* L.) bajo condiciones de campo. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 3(1), 14-25.
- Kim, J.Y., Yun, Y.H., Hyun, M.W., Kim, M.H. & Kim, S.H. (2010). Identification and characterization of *Gliocladium viride* isolated from mushroom fly infested oak log beds used for shiitake cultivation. *Mycobiology*, 38(1), 7-12.
- Liouane, K., Saïdana, D., Edziri, H., Ammar, S., Chriaa, J., Mahjoub, M., Said, K. & Mighri, Z. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of extracts from *Gliocladium* sp. growing wild in Tunisia. *Medicinal Chemistry Research*, 19(8), 743-756.
- Merillón, J.M. & Gopal, K. (2012). *Plant Defense: Biological Control*. Londres, Springer Science & Business Media.
- Narayanasamy, P. (2013). *Biological Management of Diseases of Crops: Vol.1: Characteristics of Biological Control Agents*. India: Springer Science & Business Media.
- Ouf, S.A., Ali, M.I. & Ibrahim, A.E. (2008). In Vitro Evaluation of the Biocontrol Activity of Some Biofungicides on *Sclerotium cepivorum*. *Int. J. Agricultural Biology*, 10, 241-248.
- Rojas, L. (2004). *Hongos alcalino-tolerantes como potencial fuente de enzimas de interés biotecnológico*. Obtenido de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2189/Documento_completo.PDF?sequence=1
- Rojas, V., Ulacio, D., Jiménez, M.A., Perdomo, W. & Pardo, A. (2010). Análisis epidemiológico y control de *Sclerotium cepivorum* Berk. y la pudrición blanca en ajo. *Bioagro*, 22(3), 185-192.
- Roskov, Y., Abucay, L., Orrell, T., Nicolson, D., Kunze, T., Culham, A., Bailly, N., Kirk, P., Bourgoin, T., DeWalt, R.E., Decoc, K.W. & De Wever, A. (Eds.) (2015). *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 21st April 2015*. Obtenido de www.catalogueoflife.org/col. Species 2000: Naturalis, Leiden, Holanda.
- Saputra, H., Pusputa, F. & Tjandrawati, T. (2013). Production of an antibacterial compound against the plant pathogen *Erwinia carotovora* subs. *carotovora* by the biocontrol strain *Gliocladium* sp. T.N.C73. *Journal of Agricultural Technology*, 9(5), 1157-1165.
- Sarmiento, G.A. & Velandía-Monsalve, J. (2013). Evaluación de hongos y bacterias aislados de gallinaza en el biocontrol de *Sclerotium cepivorum* Berk. *Ciencia y Agricultura*, 10(2), 37-43.
- SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). (2013). *Boletín Estadístico Agropecuario N°24, Serie cronológica 2010-2013*. San José: MAG. Obtenido de <http://www.infoagro.go.cr/BEA/BEA24.pdf>
- Shalaby, M.E., Ghoniem, K.E. & El-Diehi, M.A. (2013). Biological and fungicidal antagonism of *Sclerotium cepivorum* for controlling onion white rot disease. *Annals of Microbiology*, 63(4), 1579-1589.
- Stinson, M., Ezra, D., Hess, E., Sears, J. & Strobel, G. (2003). An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. *Plant Science*, 165, 913-922.
- Vargas, S., Pastor, S. & March, G.J. (2009). Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. *Microbiological Research*, 164, 196-205.
- Walsh, E. (2010). Estudio de la productividad del cultivo de *Delphinium*, variedad *Sea Waltz*, con la aplicación de microorganismos benéficos (*Trichoderma harzianum*, *Gliocladium* spp., *Bacillus subtilis*, *Azospirillum* spp. y *Azotobacter* spp.) bajo condiciones de campo, Cusubamba-2008. Quito: Escuela Politécnica Nacional.

***Gliocladium sp.*, agente biocontrolador con aplicaciones prometedoras**

***Gliocladium sp.*, important biocontrol agent with promising applications**

Humberto Castillo¹, Randall Rojas², Manuel Villalta³

Fecha de recepción: 27 de marzo del 2015
Fecha de aprobación: 6 de agosto del 2015

Castillo, H; Rojas, R; Villalta, M. *Gliocladium sp.*, agente biocontrolador con aplicaciones prometedoras. *Tecnología en Marcha*. Edición Especial Biocontrol. Pág 65-73.

-
- 1 Estudiante de Ingeniería en Biotecnología. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: humber198@hotmail.com.
 - 2 Estudiante de Ingeniería en Biotecnología. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: randallrojas16@gmail.com.
 - 3 Estudiante de Ingeniería en Biotecnología. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: mvilla024@gmail.com.

Palabras clave

Biocontrol; endófito; micodiésel; COV; taxol.

Resumen

La mayoría de estudios relacionados con *Gliocladium* se han enfocado en su potente capacidad como agente biocontrolador, principalmente de hongos fitopatógenos. Sin embargo, las aplicaciones potenciales de este género de hongos abarcan numerosos productos obtenidos a partir de su metabolismo, capaz de generar una gran variedad de compuestos químicos. Cabe destacar también que es un organismo endófito que, además, de proveer beneficios a un amplio rango de plantas hospedadas, puede imitar con éxito su comportamiento químico. Entre las aplicaciones más novedosas destaca su potencial para la producción de compuestos asociados con biocombustibles y su capacidad bioabsorbente de metales pesados. Esta investigación describe y ejemplifica estas aplicaciones y muestra a este género de hongos como una prometedora herramienta biotecnológica.

Keywords

Biocontrol; endophyte; myco-diesel; VOCs; taxol.

Abstract

Gliocladium sp. is a genus from Fungi that is often described as a counterpart of *Penicillium* sp. Most studies related to this genus have been focused on its powerful capacity as biocontrol agent, especially of fungal pathogens. Nevertheless, its potential applications include numerous products derived from its metabolism capable of generate a variety of chemicals. It is remarkable as well that *Gliocladium* sp. is an important endophyte organism whom besides providing benefits to the wide range of host plants, can successfully mimic their chemical behavior. Among the latest applications stands out its potential for the production of compounds associated with diesel fuel and its ability as bio-absorbent organism of heavy metals. This research describes and illustrates these applications showing this genus of Fungi as a promising biotechnological tool.

Introducción

En los últimos años se ha venido investigando la utilidad de diversos microorganismos para el control biológico de hongos fitopatógenos, entre los cuales las especies de *Trichoderma* han sido ampliamente estudiadas (Hernández & Rangel, 2011). Sin embargo, también existen otros hongos que poseen alto potencial como agentes biocontroladores, entre los que se encuentra el género *Gliocladium*. De hecho, especies de *Gliocladium* y *Trichoderma* son agentes biocontroladores conocidos por producir un amplio rango de antibióticos (Merillón & Gopal, 2012).

Los agentes biocontroladores fúngicos (BCA, por sus siglas en inglés) pertenecen a diferentes grupos taxonómicos y existen en forma de cepas, variedades o razas, las cuales se diferencian por su potencial biocontrolador. Poseen uno o más mecanismos, como la producción de enzimas quitinolíticas y antibióticos que inhiben el crecimiento o desarrollo del patógeno, entre otros. También se caracterizan por competir por los nutrientes y evitar que su tejido huésped

sea colonizado por patógenos. Muchos BCA actúan indirectamente sobre el patógeno al inducir resistencia en las plantas (Narayanasamy, 2013).

Del género *Gliocladium* se han utilizado cepas comerciales como biofungicidas en un amplio rango de situaciones, incluyendo la prevención y el control de enfermedades en plantas. Entre algunos de los patógenos que se controlan con este hongo se encuentran *Alternaria*, *Botrytis*, *Didymella*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* y *Sclerotinia* (Helyer et al., 2014).

El presente trabajo se planteó con el objetivo de describir las características más relevantes del género *Gliocladium*, especialmente aquellas asociadas a su potencial antagonico de hongos fitopatógenos.

Generalidades taxonómicas

Gliocladium sp. pertenece al reino Fungi, filo Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales. Se han descrito al menos 32 especies (Roskov et al., 2015), algunas de las más conocidas son *G. penicilloides*, *G. virens*, *G. roseum* y *G. deliquescens* (Walsh, 2010).

Aspectos morfológicos

De manera macroscópica (en un medio PDA), *Gliocladium* forma colonias inicialmente blancas, que pueden cambiar a tonos que varían de rosa a salmón; durante la esporulación se tornan de color verde (Ellis, 2015).

Microscópicamente, este hongo ha sido relacionado con *Penicillium*, ya que sus conidióforos y fiálides son similares entre sí; sin embargo, la diferencia radica en la morfología de los conidios (Walsh, 2010). Debe destacarse que el rasgo más característico del género es su distintivo conidióforo erecto densamente penicilado y con apariencia babosa (figura 1). A pesar de que estos siempre están presentes, las especies de *Gliocladium* también pueden producir conidióforos verticilados ramificados que pueden confundirse con los de *Verticillium* sp. o *Trichoderma* sp. (Ezz, 2012).

En cuanto a las hifas, son hialinas y septadas, se caracterizan también por ser viscosas y transparentes (Walsh, 2010). Por su parte, las fiálides presentan ramificaciones y puntas afiladas, en las cuales se encuentran los conidios, formando grupos semejantes a una bola apretada (Situmorang et al., 2014). Los conidios son una sola célula y su forma puede variar desde ovoide hasta cilíndrica; se producen en una cabeza terminal y algunas veces en una columna suelta (Helyer et al., 2014). En la figura 2 se observan detalles de la estructura microscópica.

En relación con el tamaño de las estructuras, específicamente para *Gliocladium viride*, el tamaño de los conidióforos se encuentra entre 100~225 μm \times 8~10 μm y de los conidios entre 3.0~3.8 μm \times 2~2.5 μm (Kim et al., 2010).

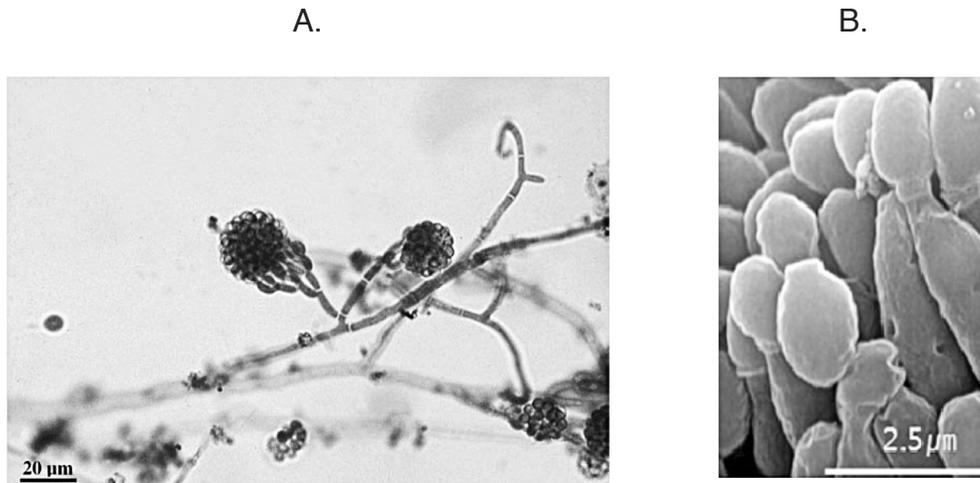


Figura 1. Morfología microscópica de *Gliocladium* sp. A. Conidióforo con conidios, tomado de Ellis (2015). B. Conidios, tomado de Kim et al. (2010).

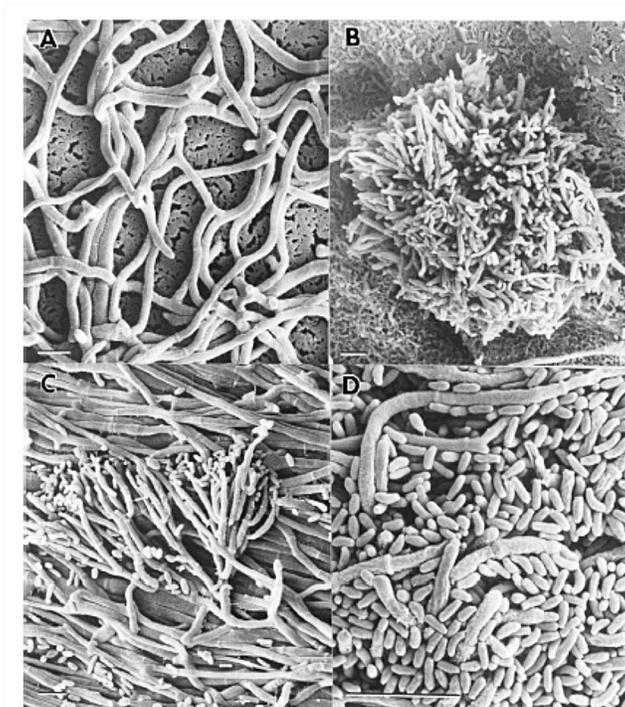


Figura 2. Micrografía electrónica de *Gliocladium* sp. (A) Cultivo joven de *Gliocladium* sp. creciendo en PDA. (B) Hongo colonizando tejido de hoja. (C) Filíales con células hifales y conidiosporos en el fondo. (D) Conidiosporos en mayor resolución. Tomado de Stinson et al. (2003).

Métodos de aislamiento, condiciones de cultivo y requerimientos nutricionales

Narayanasamy (2013) establece que entre los diferentes medios de cultivo para su aislamiento, el más eficiente para aislar tanto *Gliocladium* como *Trichoderma* de muestras de suelo es el medio

Agar Papa Dextrosa modificado con Rosa Bengala, cloranfenicol y sulfato de estreptomina, tal y como fue descrito por Vargas et al. (2009).

La temperatura y el pH son factores importantes necesarios para el desarrollo y producción de enzimas, antibióticos y toxinas involucradas en la actividad biocontroladora. De acuerdo con Arias y Piñeros (2008), un pH muy bajo puede afectar los sistemas enzimáticos y el ingreso de vitaminas esenciales y ácidos orgánicos; en cambio, un pH alto incide en la solubilidad de los metales. Por ello, consideran que un pH óptimo se encuentra en el rango de 4-6 para los hongos en general. En cuanto a temperatura, *Gliocladium* es activo a una temperatura de entre 5 °C y 34 °C, con la mejor actividad entre 15 °C a 25 °C. En cambio, temperaturas muy altas, mayores a 42 °C, pueden matar al hongo, las esporas y los micelios (Helyer et al., 2014).

Gliocladium sp., como cualquier hongo filamentoso, es incapaz de utilizar el carbono inorgánico, siendo la glucosa el compuesto más simple de fuente de energía, además puede aprovechar la fructosa, la manosa y la galactosa. También requiere de una fuente de nitrógeno (nitrato y/o amonio), entre otros (Arias & Piñeros, 2008). Posee una nutrición saprofita en muchos ambientes, aunque también se encuentran patógenos de hongos, incluyendo las setas comestibles como *Agaricus bisporus* (Helyer et al., 2014).

Agente de biocontrol

Entre las especies de *Gliocladium* que se han caracterizado por ser potentes agentes de control biológico, se destacan dos registrados como biofungicidas comerciales: *G. catenulatum* (cepa j1446) y *G. virens* (cepa GL-21). A partir de la germinación de esporas, *Gliocladium* produce hifas finas, de rápido crecimiento y apariencia vellosa, que puede entrar en contacto con el hongo patógeno. Estas estructuras pueden actuar por actividad enzimática sin penetración o por acción física, tal y como se ha demostrado con la presencia de haustorios en las puntas de las hifas del hongo *Rhizoctonia solani*. En este sentido, el principal método de acción observado es el enrollamiento de las hifas alrededor de las del huésped. También existe evidencia de que puede formar una relación cercana con raíces saludables de las plantas, otorgándoles protección contra ataques de hongos patógenos. Por esta razón se ha utilizado para controlar patógenos fúngicos causantes de enfermedades en plantas, como las podredumbres de raíz (Helyer et al., 2014).

La cepa TNC73 de *Gliocladium* sp. originalmente fue aislada como un agente biocontrolador contra el patógeno *Phytophthora capsici*, causante de la pudrición de fruto del chile. Aparte de quitinasas, también produce metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas contra las bacterias Gram positiva *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. Se ha descubierto su habilidad para inhibir bacterias Gram negativas como *Erwinia carotovora* pv. *Carotovora*, causante de la enfermedad de la pudrición blanda en cultivos alimentarios como la papa. Estas características hacen de este hongo un organismo con un potencial para ser utilizado en las prácticas agrícolas sostenibles que buscan la sustitución de los químicos de origen sintético (Saputra et al., 2013).

Otros estudios han demostrado su potencial como agente inhibidor del crecimiento de patógenos asociados a leguminosas (garbanzos, lentejas y frijol negro), entre los que se mencionan *Alternaria alternata*, *Chaetomium* spp., *Penicillium citrinum*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Rhizopus nigricans* y *Fusarium oxysporum*. *G. virens* inhibe de manera significativa el crecimiento radial de dichos hongos patógenos (Agarwal et al., 2011). Asimismo, puede controlar a *Rhizotocnia solani*, lo mismo que a *G. catenulatum* y *G. roseum*, especies que pueden ser aisladas de los esclerocios causantes de podredumbres y la enfermedad de costras negras en una amplia variedad de cultivos, como la papa, el tomate, la soya y el kiwi (Demirci et al., 2011).

Gliocladium spp. también ha sido usado para combatir al nemátodo formador de nódulos en raíces, *Meloidogyne* spp., una plaga importante en muchos cultivos alrededor del mundo, tales como chile, berenjena y papa. Amin (2014) demostró que el tratamiento con diferentes concentraciones de suspensiones del conidio del hongo causa daño intenso y reducción en la densidad poblacional del nemátodo, posiblemente debido al mecanismo de colonización. También se determinó que ayuda a la planta en la inducción de resistencia sistémica ante el ataque de este nemátodo.

Patogenicidad

No hay reportes de daños causados por este hongo en cultivos. Sin embargo, algunas especies de *Gliocladium* han sido reconocidas como agentes de la enfermedad del moho verde, que afecta a las setas cultivadas, como *A. bisporus*, *Lentinula edodes* y *Pleurotus ostreatus*. Kim et al. (2010) aislaron e identificaron al género en las camas de roble; sin embargo, el rol que juega este hongo en el cultivo de setas aún no ha sido identificado.

Potencial farmacéutico

Los usos farmacéuticos que involucran a este microorganismo son muy variados, especialmente considerando la diversa cantidad de metabolitos secundarios que produce. Se ha demostrado la capacidad de *Gliocladium* sp. para producir taxol. El taxol es el nombre comercial del metabolito secundario (paclitaxel) producido por *Taxus brevifolia* y se comercializa como un tratamiento antitumoral para el control del cáncer, principalmente.

En la actualidad, la producción tradicional de este fármaco es ecológicamente insostenible, ya que requiere la maduración del árbol, que tarda hasta 20 años, para sacrificarlo con el fin de extraer el metabolito que se produce en la corteza, por lo que se han buscado otras fuentes de producción más rentables y amigables con el ambiente. Lo anterior llevó al descubrimiento de que varias especies de hongos, bacterias y actinomicetos lo producen. Estos estudios demuestran que este hongo no está solo establecido como un endófito sino que ha logrado con éxito imitar la diversidad química del hospedero, lo que podría ayudar a entender aspectos evolutivos implicados en la transferencia de genes entre el hospedero y el endófito (Sreekanth et al., 2009; Sreekanth et al., 2011).

Producción de enzimas y compuestos de interés

Fiana et al. (2013) produjeron enzimas glucoamilasas, a través de la fermentación en sustrato de fase sólida utilizando la cepa *Gliocladium KE* y obteniendo rendimientos de actividad enzimática de 24,22 unidades/ml al optimizar la concentración de nitrato de calcio añadida. Las glucoamilasas son enzimas de importancia industrial para procesos de degradación del almidón. A su vez, a partir de dicho género también se han obtenido enzimas con potenciales médicos. Nanda et al. (2012), produjeron la enzima uricasa, con rendimientos que alcanzaron las 84,99 unidades/ml en fermentación sumergida de *G. viride*. La uricasa se utiliza en el tratamiento de la hiperuricemia y la gota, ya que se encarga de la degradación del ácido úrico y es un importante componente en la ruta metabólica de la degradación de las purinas.

Por otra parte, Batista et al. (2012) lograron producir fructooligosacáridos (FOS), específicamente 6-Kestosa, en fermentación sumergida de *G. virens*. Dichas sustancias pueden utilizarse como suplemento alimentario ya que actúan como prebióticos, mejorando el crecimiento de las bifidobacterias. Igualmente, contribuyen en la reducción de los niveles de colesterol y triglicéridos en el plasma sanguíneo y se relacionan con una disminución en el desarrollo de

tumores y las enfermedades inflamatorias del intestino; por último, al ser compuestos de difícil hidrolización para el ser humano, se convierten en una alternativa para endulzar alimentos para diabéticos, dado su nulo contenido calórico.

En 2003, Stinson et al. lograron un aislamiento de *Gliocladium* sp. a partir de la especie vegetal *Eucryphia cordifolia*, y se encontró que el hongo producía una mezcla de compuestos orgánicos volátiles (VOC, por sus siglas en inglés) letales para los patógenos de la planta, como *Phytophthora ultimum* y *Verticillium dahliae*. Este comportamiento de producción de COV se ha reportado principalmente en *Muscodor albus*, un productor de antimicrobiales volátiles bastante conocido, al que *Gliocladium* sp. mostró resistencia y produjo algunos de los mismos compuestos reportados para el primero, entre los que destacan: 1-butanol, 3-metil, feniletil alcohol y ácido acético, 2-feniletil éster y otros ésteres de ácido propanoico; sin embargo, el compuesto volátil principal resultó ser 1,3,5,7- ciclooctatetrano u 8-anuleno, un potente inhibidor de crecimiento fúngico (Liouane et al., 2010).

Estudios más recientes demuestran que los VOC juegan un importante papel en la señalización para los hongos en sus ambientes naturales. Muchas interacciones ecológicas están mediadas por ellos, incluyendo aquellas entre hongos y plantas, artrópodos, bacterias y otros hongos. Las diversas funciones de los COV fúngicos se pueden desarrollar para su uso en aplicaciones biotecnológicas como biocombustibles, biocontrol y micofumigación. Estos compuestos representan una nueva frontera en la bioprospección y el estudio de estos compuestos promete el descubrimiento de nuevos productos para la explotación humana (Shannon et al., 2012).

Producción de micodiésel a partir de *Gliocladium*

Entre las posibles sustancias que se pueden obtener a través del género *Gliocladium* cabe destacar su producción de hidrocarburos y su uso en la producción de biocombustibles, específicamente del llamado micodiésel. *G. roseum*, aislado del árbol *Eucryphia cordifolia* en la Patagonia, produce compuestos orgánicos volátiles de cadena media y altamente ramificados que pueden utilizarse como combustible. Entre las características más llamativas se encuentra su capacidad de utilizar celulosa como sustrato, lo que lo vuelve más atractivo dado su potencial. El perfil de hidrocarburos producidos por *G. roseum* contiene un alto número de compuestos que normalmente se asocian con el combustible diesel, por lo que han sido denominados “mico-diesel”. La extracción en cultivo líquido reveló la presencia de numerosos ácidos grasos y otros lípidos. Todos estos hallazgos tienen implicaciones para la producción y utilización de energía (Strobel et al., 2008). En esta misma línea han trabajado otros autores como Ahamed y Ahring (2011), quienes obtuvieron resultados de producción de hidrocarburos hasta 100 veces mayores al cocultivar tres cepas de *Gliocladium* sp. con *Escherichia coli*.

Aplicación de *Gliocladium* en la biorremediación

Entre los bioabsorbentes más prometedores para la eliminación de metales pesados que se han investigado durante las últimas décadas, los hongos son los que han recibido una creciente atención, debido a su gran capacidad para eliminar altas concentraciones de metales pesados en comparación con levaduras, algas e incluso bacterias. Tahir (2012) demostró mediante diversas pruebas la eficiencia de *Gliocladium* sp. en la absorción de metales pesados; los resultados indicaron que este era el mejor hongo resistente al cobre entre todas las especies aisladas para el experimento y se encontró que los componentes de la pared celular fueron los responsables de la absorción de este metal.

Consideraciones finales

Gliocladium sp. representa un grupo de especies fúngicas con alto potencial biotecnológico; la enorme cantidad de metabolitos que produce lo transforman en un microorganismo de interés para el descubrimiento de nuevos productos. En múltiples estudios se ha demostrado su eficiencia como un agente biológico para el control de hongos, bacterias e incluso nemátodos. A nivel ecológico, *Gliocladium* sp. es un importante microorganismo endófito, capaz no solo de adaptarse a vivir dentro de la planta sino de imitar con éxito su perfil químico y producir algunos de sus mismos metabolitos. La investigación sobre este microorganismo ha abarcado una diversidad de áreas, desde su uso para la producción de enzimas y compuestos de interés farmacéutico hasta la producción de lípidos para biocombustibles y la bioabsorción de metales pesados como el cobre. Este organismo ejemplifica con claridad por qué cada vez más los hongos se han vuelto importantes aliados en las industrias, con un futuro prometedor dentro de la biotecnología moderna.

Bibliografía

- Agarwal, T., Malhotra, A., Trivedi, P. & Biyani, M. (2011). Biocontrol potential of *Gliocladium virens* against fungal pathogens isolated from chickpea, lentil and black gram seeds. *Journal of Agricultural Technology*, 7(6), 1833-1839.
- Ahamed, A. & Ahring, B.K. (2011). Production of hydrocarbon compounds by endophytic fungi *Gliocladium* species grown on cellulose. *Bioresource technology*, 102(20), 9718-9722.
- Amin, N. (2014). The Use of Fungal Endophytes *Gliocladium* spp. in Different Concentration to Control of Root-Knot Nematode *Meloidogyne* spp. *Academic Research International*, 5(2), 91- 95.
- Arias, E. & Piñeros, L. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde*. (Tesis de grado). Universidad Pontificia Javeriana, Bogotá.
- Batista, M., Simoes, K., de Almeida Barros, C., Pessoni, R.A.B., Braga, M.R. & Figueiredo-Ribeiro, R.D.C.L. (2013). Production of 6-kestose by the filamentous fungus *Gliocladium virens* as affected by sucrose concentration. *Mycoscience*, 54(3), 198-205.
- Ellis, D. (2015). *Gliocladium* sp. Mycology Online. The University of Adelaide. Obtenido de [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Gliocladium/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Gliocladium/)
- Ezz, N. (2012). Entomopathogenic fungi associated with certain scale insects (Hemiptera: *Coccoidea*) in Egypt. *Egypt Acad. J. Biolog. Sci.*, 5(3), 211-221.
- Demirci, E., Dane, E. & Eken, C. (2011). In vitro antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia on potato tubers against *Rhizoctonia solani*. *Turkish Journal of Biology*, 35, 457-462
- Fiana, R.M., Novelina, N. & Asben, A. (2013). Effect of Fermentation Time and Calcium Nitrate Concentration on Enzyme Glucoamylase Production of *Gliocladium* KE Using Sago Hampas Solid Substrate. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 3(3), 01-04.
- Helyer, N., Cattlin, N.D. & Brown, K.C. (2014). *Biological Control in Plant Protection: A Colour Handbook*. EE.UU.: CRC Press.
- Hernández, R. & Rangel, E. (2011). Búsqueda de cepas de antagonistas a hongos causantes de marchitez vascular en tomate. *Revista electrónica de Divulgación de la Investigación*, 2, 1-9. Obtenido de http://sabes.edu.mx/redi/2/pdf/SABES_2_4_RUFINAPDF_V1.pdf
- Kim, J.Y., Yun, Y.H., Hyun, M.W., Kim, M.H. & Kim, S.H. (2010). Identification and characterization of *Gliocladium viride* isolated from mushroom fly infested oak log beds used for shiitake cultivation. *Mycobiology*, 38(1), 7-12.
- Liouane, K., Saïdana, D., Edziri, H., Ammar, S., Chriaa, J., Mahjoub, M., Said, K. & Mighri, Z. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of extracts from *Gliocladium* sp. growing wild in Tunisia. *Medicinal Chemistry Research*, 19(8), 743-756.
- Merillón, J.M. & Gopal, K. (2012). *Plant Defense: Biological Control*. Londres: Springer Science & Business Media.
- Nanda, P., Babu, P.J., Fernandes, J., Hazarika, P. & Dhabre, R.R. (2012). Studies on Production, Optimization and Purification of Uricase from *Gliocladium viride*. *Research in Biotechnology*, 3(4).

- Narayanasamy, P. (2013). *Biological Management of Diseases of Crops: Vol. 1: Characteristics of Biological Control Agents*. India: Springer Science & Business Media.
- Roskov, Y., Abucay, L., Orrell, T., Nicolson, D., Kunze, T., Culham, A., Bailly, N., Kirk, P., Bourgoin, T., DeWalt, R.E., Decock, W. & De Wever, A. (Eds.) (2015). *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 21st April 2015*. Obtenido de www.catalogueoflife.org/col. Species 2000: Naturalis, Leiden, Holanda.
- Saputra, H., Puspota, F. & Tjandrawati, T. (2013). Production of an antibacterial compound against the plant pathogen *Erwinia carotovora subs. carotovora* by the biocontrol strain *Gliocladium* sp. T.N.C73. *Journal of Agricultural Technology*, 9(5), 1157-1165.
- Shannon, U., Morath, R., Hung, R. & Bennett, J. (2012). Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, 26, 78-83.
- Situmorang, E.C., Prameswara, A., Sinthya, H.C., Toruan-Mathius, N. & Liwang, T. (2014). Morphology and Histology Identification of Fungal Endophytes from Oil Palm Roots in *Ganoderma boninense* Endemic Area. *Microbiology Indonesia*, 7(4), 198.
- Sreekanth, D., Syed, A., Sarkar, S., Sarkar, D., Santhakumari, B., Ahmad, A. & Khan, M. (2009). Production, Purification, and Characterization of Taxol and 10-DABIII from a new Endophytic Fungus *Gliocladium* sp. isolated from the Indian Yew Tree, *Taxus baccata*. *Journal of Microbiol. Biotechnol.*, 19(11), 1342-1347.
- Sreekanth, D., Sushim, G., Syed, A., Khan, B. & Ahmad, A. (2011). Molecular and Morphological Characterization of a Taxol-Producing Endophytic Fungus, *Gliocladium* sp., from *Taxus baccata*. *Mycobiology*, 39(3), 151-157.
- Stinson, M., Ezra, D., Hess, E., Sears, J. & Strobel, G. (2003). An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. *Plant Science*, 165, 913-922.
- Strobel, G.A., Knighton, B., Kluck, K., Ren, Y., Livinghouse, T., Griffin, M., Spakowicz, D. & Sears, J. (2008). The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladium roseum* (NRRL 50072). *Microbiology*, 154(11), 3319-3328.
- Tahir, A. (2012). *Resistant Fungal Biodiversity of Electroplating Effluent and Their Metal Tolerance Index*. Obtenido de <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/35386.pdf>
- Vargas, G., Pastor, S. & March, G. (2009). Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. *Microbiological Research*, 164, 196-205.
- Walsh, E. (2010). Estudio de la productividad del cultivo de *Delphinium*, variedad *Sea Waltz*, con la aplicación de microorganismos benéficos (*Trichoderma harzianum*, *Gliocladium* spp., *Bacillus subtilis*, *Azospirillum* spp. y *Azotobacter* spp.) bajo condiciones de campo, Cusubamba-2008. Escuela Politécnica Nacional, Quito.

Aislamiento, identificación y patogenicidad de *Hirsutella* en *Planococcus citri*

Isolation, identification and *pathogenicity* of *Hirsutella* in *Planococcus citri*

Kevin Asdrúbal-Quesada-Sojo¹, William Rivera-Méndez²

Fecha de recepción: 15 de junio del 2015

Fecha de aprobación: 13 de octubre del 2015

Quesada-Sojo, K; Rivera-Méndez, W. Aislamiento, identificación y patogenicidad de *Hirsutella* en *Planococcus citri*. *Tecnología en Marcha*. Edición Especial Biocontrol. Pág 74-84.

1 Estudiante de Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tel. (506)8407-9592, correo electrónico: kequesada@estudiantec.cr

2 Profesor. Ingeniero en Biotecnología. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tel. (506)2550-9094, correo electrónico: wirivera@itcr.ac.cr

Palabras clave

Hirsutella; *Planococcus citri*; control biológico; hospedero; cochinillas.

Resumen

Las especies de hongos pertenecientes al género *Hirsutella* son capaces de infectar y parasitar gran variedad de invertebrados. *Planococcus citri* es una peste polífaga importante en diversos cultivos. El objetivo de este proyecto fue aislar, identificar y determinar la patogenicidad de *Hirsutella* sobre individuos adultos de *P. citri* a partir de muestras de campo. El micelio se produjo en medio sólido PDA acidificado al 2%, que cubrió la placa a los 11 días de haber sido cultivado. Se preparó una solución conidiógena a partir del micelio producido y se asperjó sobre individuos adultos de *P. citri* para determinar los porcentajes de patogenicidad de las cepas aisladas; estos fueron: 90%, 78,6% y 90,9% a los seis días de haberse iniciado el bioensayo de patogenicidad, lo que confirma las cualidades biocontroladoras del género *Hirsutella* para su utilización en el manejo tanto de *P. citri* como de otras plagas importantes agrónomicamente.

Keywords

Hirsutella; *Planococcus citri*; host; biological control; mealybug.

Abstract

Fungal species belonging to the genus *Hirsutella* are capable to infect and parasite a wide variety of pathogen invertebrates. *Planococcus citri* is an important polyphagous plague in various crops of agronomic importance. The project objective was to conduct a study related to processes of isolation, identification and pathogenicity determination of *Hirsutella* genus over *P. citri* from 21 field samples. The mycelium was produced on PDA solid medium acidified (2%), which covered the plate at 11 days being cultivated. A conidiogenous solution was prepared from the mycelium and was sprinkled on adult life stage individuals of *P. citri* to determine the percentages of pathogenicity of isolates. These were: 90%, 78,6% and 90,9% at 6 days after of begin the bioassay, which confirm the biocontrol qualities of the genus *Hirsutella* for its use in handling both *P. citri* as other agronomically important pests.

Introducción

Hirsutella es uno de los géneros de hongos más abundantes e importantes para el control de insectos plaga en el campo. *H. thompsonii* se reportó por primera vez en asociación con *Phyllocoptruta oleivora* y Fisher lo describió como una nueva especie en 1950 (Vacante, 2010).

Hirsutella incluye alrededor de 90 especies capaces de infectar y parasitar una gran variedad de invertebrados como ácaros, nemátodos e insectos, muchos de los cuales se consideran plagas económicamente importantes (Toledo et al., 2013).

En insectos, esa capacidad se ha demostrado en especies como *Diaphorina citri*, transmisora de la bacteria *Candidatus liberibacter*, *Homalodisca vitripennis*, transmisora de la bacteria fitopatogénica *Xylella fastidiosa*, y *Delphacodes kuscheli*, transmisora del virus del Mal de Río Cuarto (MRCV).

Planococcus citri es un polífago importante de cultivos como cítricos, viñedos, café y plantas ornamentales, siendo probablemente la especie más destructiva de la familia *Pseudococcidae*.

Se alimenta succionando la savia presente en las células del tallo, ramas y hojas, ocasionando su caída prematura, retraso en el crecimiento y en ocasiones la muerte en plantas infestadas tanto de manera completa como parcial. Se caracteriza por producir una secreción de consistencia melosa en grandes cantidades, que se incrusta en las hojas y racimos de los frutos, ocasionando daños visibles en los cultivos. Algunos de esos daños incluyen oscurecimiento de los tejidos foliares, así como pérdida de su vitalidad y turgencia. Todos estos elementos afectan la calidad del fruto y disminuyen la capacidad fotosintética de la planta, lo que desencadena una reducción de su vigorosidad. (Demirci et al., 2011b).

Por otra parte, se conoce que *P. citri* es vector de varias enfermedades virales a bajos niveles de infestación. La cochinilla transmite el Virus 3 Asociado al Enrollado de la Vid (GLRaV-3) (Demirci et al., 2011b) perteneciente al género *Ampelovirus* de la familia *Closteroviridae*, responsable de causar el enrollamiento hacia el envés en los viñedos (figura 1), así como enrojecimiento en variedades tintas. Además, es capaz de causar amarillamiento de las zonas internerviales (figura 2), mientras que en los racimos genera maduración heterogénea y menor contenido de azúcar (Vega et al., 2011).



Figura 1. Enrollamiento hacia el envés producido por la presencia de GLRaV-3 en una variedad blanca de vid.
Fuente: Gobierno de la Rioja, Consejería de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente.



Figura 2. Enrojecimiento internervial producido por GLRaV en una variedad tinta. Fuente: Gobierno de la Rioja, Consejería de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente.

El control de insectos se realiza comúnmente con insecticidas, no obstante, las cochinillas son capaces de oponer altos niveles de resistencia a este tipo de método. Por otro lado, su control con agentes químicos presenta dificultades porque se encuentran en sitios protegidos de la corteza, donde es difícil que penetre el plaguicida. Además, este insecto usualmente está cubierto por una secreción blanca de consistencia cerosa que cubre su cuerpo por completo, imposibilitando la penetración del insecticida.

El control biológico de plagas utilizando agentes entomopatógenos se usa con frecuencia en programas de manejo integrado de plagas (MIP), dado que su toxicidad para animales no objetivos y humanos es extremadamente baja. Los hongos entomopatógenos como *Hirsutella* son capaces de sobrevivir en la naturaleza y pueden ocasionar infecciones repetitivas, siempre y cuando se tomen las precauciones pertinentes en campos con aplicaciones previas de fungicidas (Demirci et al., 2011a).

El objetivo del presente proyecto consistió en aplicar un método de aislamiento e identificación de *Hirsutella*, para estudiar su efecto biocontrolador en *P. citri*.

Materiales y métodos

Aislamiento y caracterización de *Hirsutella*

El muestreo se llevó a cabo en una plantación de cítricos ubicada en la Quinta Santa Mónica, en Paraíso de Cartago, Costa Rica, que poseía una gran variedad de especies vegetales, entre ellas naranjos (*Citrus x sinensis*) y árboles de limón (*Citrus x limón*). Se recolectaron hojas de árbol de limón entre los meses de febrero y abril de 2015 que presentaban cochinillas de *P. citri* parasitadas por el hongo (figura 3).

Las muestras se conservaron en bolsas de papel aluminio almacenadas en recipientes plásticos a una temperatura de 10 °C.

La identificación macroscópica del hongo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología del Tecnológico de Costa Rica, mediante la visualización en el estereoscopio. Sus características morfológicas se compararon con los esquemas, diagramas y dibujos de la literatura (Verena et al., 2011).

Aislamiento e identificación microscópica de *Hirsutella*

Para el aislamiento del hongo a partir de las muestras de campo, se utilizó el medio de cultivo PDA acidificado con ácido láctico al 2%. Durante el estudio se realizaron tres subcultivos, con el objetivo de asegurar el aislamiento y tener material suficiente para las pruebas posteriores.

Se utilizaron escamas de cochinillas parasitadas e hifas presentes en las muestras. La desinfección de las cochinillas se efectuó con dos soluciones: alcohol de 70% durante un minuto y cloro al 3% durante 30 segundos. Posteriormente, las muestras se lavaron con agua destilada estéril durante dos minutos en cámara de flujo laminar. De forma consecutiva al lavado, el material se colocó en papel filtro estéril para secarlo y evitar el exceso de humedad antes de ubicarlo en el medio de cultivo. Se dispuso de un total de 20 muestras de escamas y por cada escama un total de cuatro hifas, que se sembraron en medio de cultivo de forma separada y luego se incubaron a temperatura ambiente (25 °C) durante una semana para evaluar su desarrollo. A nivel microscópico, se prepararon para la visualización e identificación de los conidios del hongo.

Efectos patogénicos de *Hirsutella* sobre la cochinilla *P. citri*

P. citri se aisló a partir de hojas de *Carica papaya* durante los meses de mayo y abril de 2015 del mismo lugar del que se aisló *Hirsutella*. Las cochinillas fueron removidas del follaje afectado utilizando un pincel y colocadas en recipientes separados, según el estadio de desarrollo.

Bioensayo de patogenicidad preliminar en *P. citri*

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología y en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Tecnológico de Costa Rica, en Cartago, durante el primer semestre de 2015.

Se realizó una prueba de patogenicidad preliminar para evaluar la capacidad patogénica de los aislamientos. El protocolo utilizado se basó parcialmente en el estudio desarrollado por Demirci et al. (2011a), dado que el bioensayo se enfocó en estudiar el efecto patogénico del hongo sobre adultos de *P. citri*. Para ello se diluyó un gramo de micelio en 5 ml de agua destilada estéril y se agitó por dos minutos en vórtex. Luego se retiró el micelio y la solución conidiógena resultante fue asperjada sobre la porción de hoja infestada por cochinillas, en una placa Petri con papel toalla húmedo. Se hicieron tres repeticiones y un control, evaluándose el grado de patogenicidad al sexto día. Para el control se aplicó agua destilada sobre las cochinillas, mientras que para el cálculo del porcentaje de patogenicidad se usó la siguiente fórmula:

$$\%P = \left(\frac{\text{ácaros micosados}}{\text{ácaros totales}} \right) \times 100$$

Resultados y discusión

Aislamiento y caracterización de *Hirsutella*

La presencia de *Hirsutella* sobre cochinillas parasitadas en las muestras foliares se caracterizó por el recubrimiento del hongo sobre escamas de adultos muertos, los cuales presentaban una coloración amarillenta (figura 3A). Por su parte, las hifas presentaron una coloración blanca, además de una morfología alargada y algodonosa que brotaba del tegumento de la cochinilla muerta (figura 3B).

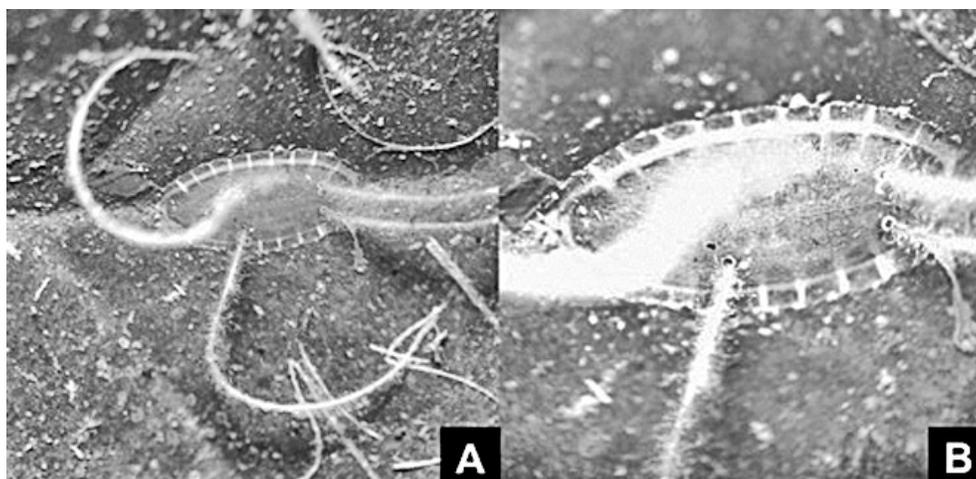


Figura 3. Estructura de la cochinilla parasitada por *Hirsutella*. Se observa la coloración amarillenta del individuo muerto (A) (30X), del cual brotan hifas de coloración blanca (B) (35X).

Aislamiento e identificación microscópica de *Hirsutella*

El cuadro 1 muestra el aislamiento llevado a cabo a partir de escamas e hifas provenientes de las muestras de campo.

Cuadro 1. Aislamientos de *Hirsutella* llevados a cabo a partir de escamas e hifas provenientes de muestras de campo.

Escamas				Hifas			
Muestra	Desarrollo	Muestra	Desarrollo	Muestra	Desarrollo	Muestra	Desarrollo
E1	NA	E11	NA	H1	NA	H11	NA
E2	NA	E12	A	H2	NA	H12	A
E3	NA	E13	NA	H3	NA	H13	NA
E4	NA	E14	NA	H4	NA	H14	NA
E5	NA	E15	NA	H5	NA	H15	NA
E6	NA	E16	A	H6	NA	H16	A
E7	NA	E17	NA	H7	NA	H17	NA
E8	NA	E18	NA	H8	NA	H18	NA
E9	NA	E19	A	H9	NA	H19	NA
E10	NA	E20	NA	H10	NA	H20	NA

*Simbología: E= Escama, H= Hifa, A= Aislado, NA= No aislado.

A partir de las escamas E12, E16, E19 (figura 4) y las hifas H12 y H16 se obtuvieron aislamientos del hongo estudiado después de 11 días de haber sido cultivado. Según Sánchez et al. (2011), *Hirsutella* es un hongo de crecimiento lento que presenta bajos porcentajes de conidiación. En condiciones de laboratorio, su crecimiento radial es una variable que depende principalmente de factores como: tipo de cepa, características genéticas, naturaleza del substrato en el que se desarrolla, especialmente por las proporciones de C/N que puedan llegar a presentarse en este. Se evidenció que el requerimiento nutricional resultó ser poco demandante por parte del hongo, ya que cubrió toda la placa de Petri en los 11 días de crecimiento. Van der Geest et al. (2000) indican que *Hirsutella* es un hongo de cultivo sencillo en medio artificial, en contraste con otros entomopatógenos, capaz de crecer en una gran variedad de medios con agar y medios líquidos.

La identificación a nivel microscópico se basó principalmente en los estudios de caracterización morfológica y molecular de *Hirsutella* desarrollados por Toledo et al. (2013). Se observaron conidios sobre la superficie del sinema, que surgían a partir de este como células laterales, distribuyéndose de manera intercalada a lo largo de las hebras miceliales (figura 5).

Los conidios de tipo hialino no presentaban septos, además eran elípticos y solitarios (figura 6A), no obstante, se observaron algunos dispuestos en parejas (figura 6B). Se logró ver la capa mucilaginososa externa de los conidios, la cual es importante por su actividad enzimática, y está relacionada con procesos de adhesión, antisequedad y protección contra los fenoles tóxicos producidos por el hospedero (Rosas, 2003).

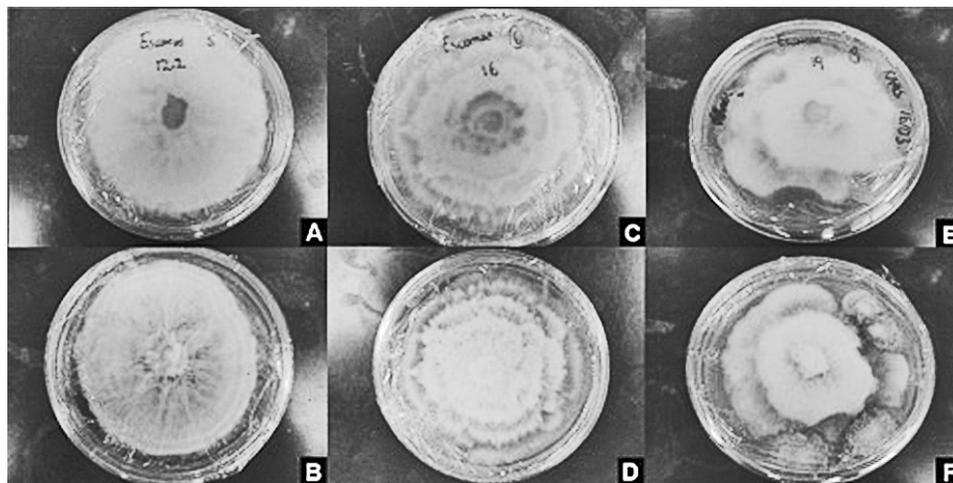


Figura 4. Aislamientos satisfactorios llevados a cabo con escamas de cochinillas parasitadas por *Hirsutella* a los 11 días de haber sido cultivados. E12: (A) y (B) E16: (C) y (D) E19: (E) y (F).

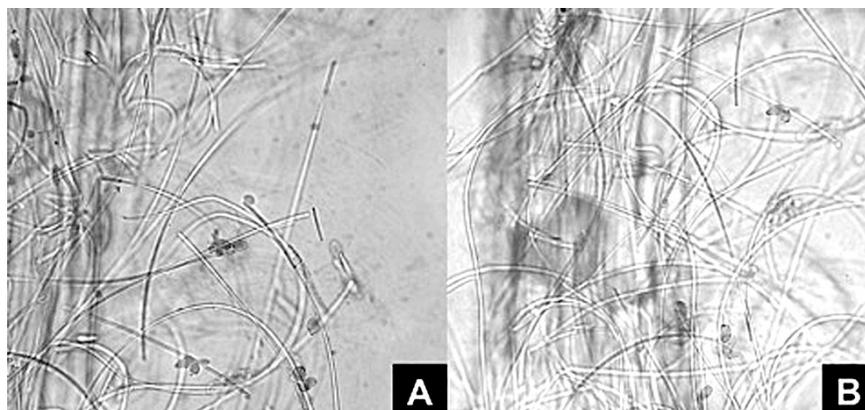


Figura 5. Conidios sobre la superficie del sinema de *Hirsutella* (A) (100X). Distribución intercalada de los conidios a lo largo de las hebras miceliales (B) (100X).

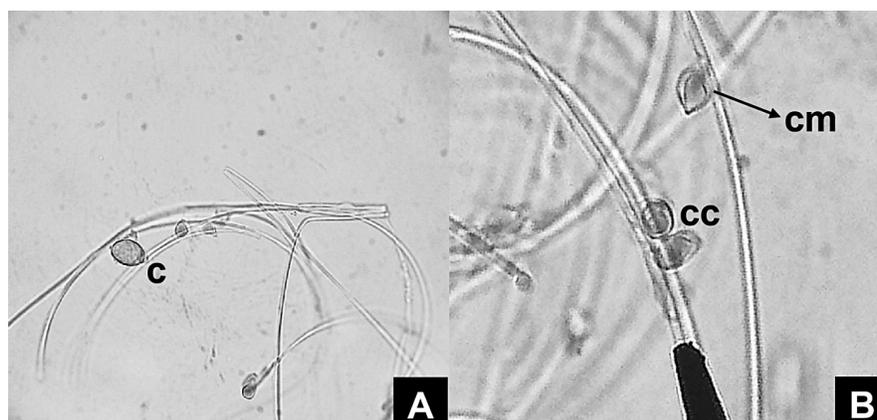


Figura 6. Célula conidiógena solitaria de morfología elíptica (c). Conidios de *Hirsutella* dispuestos en pares (cc). Capa mucilagínosa externa rodeando el conidio (cm). Hifas de *Hirsutella* (A y B) (100X).

Efectos patogénicos de *Hirsutella* sobre la cochinilla *P. citri*

El dimorfismo sexual ha alcanzado niveles muy avanzados en *P. citri*. Las diferencias morfológicas comienzan a ser evidentes en los periodos finales del estadio larval. Las hembras adultas no poseen alas, a diferencia del macho, y pueden llegar a tener un peso 90 veces superior a éste, además son capaces de alcanzar una longevidad de más de 100 días si no se aparean. Por el contrario, el macho adulto es un díptero neometabólico de vida corta, que no se alimenta durante la época de apareamiento. Además de ello, requiere de 1 a 2 días para completar la maduración sexual y el desarrollo de filamentos cerosos para ser capaz de volar y responder a las feromonas sexuales durante la reproducción (Da Silva et al., 2013).

En los individuos observados, la hembra se caracterizó por presentar un cuerpo ovalado, blando y con un tamaño promedio que rondaba los 3 mm de largo; su coloración era amarillenta y se encontraba cubierta por un polvo ceroso blanco. El macho, a diferencia de la hembra, presentaba un cuerpo más pequeño (1 mm, aproximadamente) de color amarillento y con dos largos filamentos en el extremo posterior del abdomen similares a alas (figura 7) (Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas, 2015).

Se evidenció la presencia de huevos depositados en un ovisaco cuyo aspecto se asemejaba al de una masa algodonosa. Los huevos eran ovales y de color amarillo claro. Por su parte, las ninfas recién nacidas eran móviles, ovales, aplanadas y de color amarillo pálido (figura 8). Todos los individuos se aislaron de la cara abaxial de hojas de *C. papaya*. Se observó, además, la producción de excrecencias líquidas azucaradas atrayentes de hormigas.

Los resultados del bioensayo de patogenicidad se pueden observar en el cuadro 2:

Cuadro 2. Resultados del bioensayo de patogenicidad de *Hirsutella* sobre adultos de *P. citri* al sexto día de haberse iniciado la prueba.

Repetición	Muertos	Vivos	Total	% P
1	18	2	20	90,0
2	11	3	14	78,6
3	10	1	11	90,9
Control	1	6	7	14,3

Los porcentajes de patogenicidad de *Hirsutella* frente a la plaga al sexto día de haberse aplicado la solución conidiógena fueron altos (90%, 78,6% y 90,9%), con un promedio de 86,5% en comparación al control, que fue de 14,3%. Los porcentajes de mortalidad de 84,14% obtenidos por Demirci et al. (2011b) con adultos de *P. citri* después de seis días de haber sido inoculados con el hongo entomopatógeno *Isaria farinosa* fueron similares al promedio obtenido en el presente estudio, lo que demuestra el efecto de las toxinas y enzimas que participan en la interrelación patógeno-hospedero según Rosas (2003).

Los postulados de Koch (Schönbach, 2013) se demostraron desde la identificación y aislamiento del hongo hasta la aplicación del bioensayo de patogenicidad in vitro.

La figura 9 muestra el resultado obtenido del bioensayo de patogenicidad aplicado sobre *P. citri* con tres repeticiones y un control. En 1 y 3 se observa el recubrimiento generado por el micelio blancuzco y afelpado de *Hirsutella* sobre el dorso de *P. citri*, mientras que en 2 se aprecia el

desarrollo de hifas sobre el tegumento de la cochinilla sin cubrirlo por completo. A diferencia del tratamiento anterior, el control (c) presentó una mortalidad poco significativa, según se detalló anteriormente. En (c) se observa un individuo de *P. citri* sano como parte de dicho tratamiento.

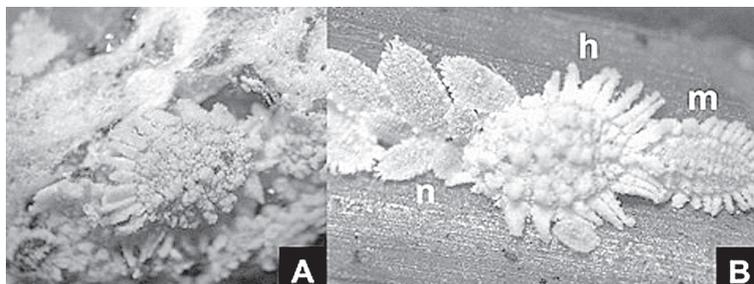


Figura 7. Hembra de *P. citri* depositando huevos sobre un ovisaco (A) (30X). Morfología diferencial (B) (30X) entre ninfas (n), hembra (h) y macho (m) de *P. citri* sobre muestras de tejido vegetal.

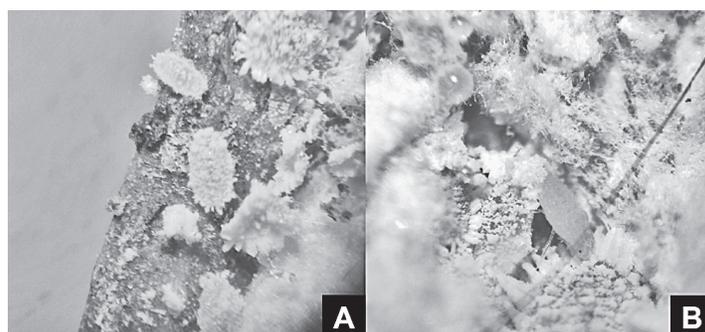


Figura 8. Ninfas de *P. citri* de morfología oval, aplanada y de color amarillo pálido (A) (30X). Ninfa recién nacida a partir de un ovisaco algodonoso (B) (30X).

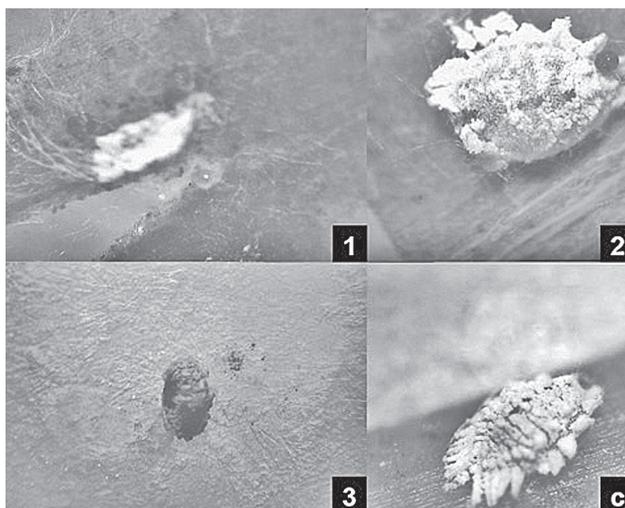


Figura 9. Resultado del bioensayo de patogenicidad aplicado sobre *P. citri*. Las imágenes 1, 2 y 3 muestran el efecto patogénico de *Hirsutella* a los seis días de haberse asperjado la solución conidiógena sobre cochinillas de *P. citri*. Se evidencia en dichos casos el cubrimiento micelial sobre el tegumento de la cochinilla. La imagen C corresponde al tratamiento control. (30X).

A diferencia de lo mencionado anteriormente por Sánchez et al. (2012) con respecto al lento desarrollo de *Hirsutella*, los resultados obtenidos con el bioensayo de patogenicidad reafirman que la presencia y abundancia del hospedero tienen un nivel de influencia muy significativo, tanto en el crecimiento de *Hirsutella* como en su capacidad biocontroladora (Micali et al., 2014).

Estos resultados demuestran que *Hirsutella* posee un alto potencial para ser utilizado en programas de manejo integrado de plagas que busquen controlar *P. citri* y otras especies importantes como *Tetranychus urticae* y *Diaphorina citri*, entre otras; paralelamente al creciente desarrollo de herramientas biológicas modernas. La integración de estrategias de control biológico basadas en el accionar de los hongos entomopatógenos constituye una herramienta valiosa para Costa Rica desde un punto de vista técnico-ambiental, en aras de promover la reducción de los insecticidas que producen contaminación.

Conclusiones

Mediante el presente trabajo se demostró la capacidad biocontroladora que el hongo *Hirsutella* posee sobre cochinillas adultas de *P. citri*, al obtenerse porcentajes de patogenicidad altos en condiciones simuladas de laboratorio. Además, se logró caracterizar al hongo en su estado natural, tanto macro como microscópicamente.

Las diferencias concernientes al dimorfismo sexual que presenta la cochinilla fueron examinadas y señaladas, permitiendo respaldar la información existente en la literatura acerca del tema. Junto con ello, el análisis y estudio morfológico de *P. citri* permitió describir con mayor detalle las estructuras sobre las cuales se desarrolla el micelio de *Hirsutella* posterior al contacto patógeno-hospedero.

Hirsutella demostró tener una capacidad biocontroladora significativa para el control de insectos importantes como *P. citri*, útil para fomentar un manejo compatible con los programas de manejo integrado de plagas. El conocimiento de los materiales activos que participan en la relación patógeno-hospedero debe mejorarse, con el objetivo de entender no solo su configuración sino también su conducta ante la influencia de factores ambientales importantes.

Se recomienda, para efectos de una investigación posterior, estudiar la patogenicidad de *Hirsutella* sobre estadios larvales de *P. citri*, así como optimizar el ciclo biológico de la especie para que sea posible correlacionar las diversas etapas de crecimiento con los efectos biocontroladores que se derivan de cada uno de ellos, obteniendo de esa manera información de la etapa más eficiente para aplicar en biocontrol de plagas.

Bibliografía

- Da Silva, E., Branco, M., Mendel, Z. & Franco, J. (2013). Mating behavior and performance in the two cosmopolitan mealybug species *Planococcus citri* and *Pseudococcus calceolariae* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal of Insect Behavior*, 26(3), 304-320. doi: 10.1007/s10905-012-9344-6
- Demirci, F., Mustu, M., Kaydan, M. & Ülgentürk, S. (2011a). Effects of some fungicides on *Isaria farinosa*, and in vitro growth and infection rate on *Planococcus citri*. *Phytoparasitica*, 39(4), 353-360. doi: 10.1007/s12600-011-0168-2
- Demirci, F., Mustu, M., Kaydan, M., & Ülgentürk, S. (2011b). Laboratory evaluation of the effectiveness of the entomopathogen *Isaria farinosa* on citrus mealybug, *Planococcus citri*. *Journal of Pest Science*, 84(3), 337-342. doi: 10.1007/s10340-011-0350-9
- Gobierno de la Rioja-Consejería de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente. (2012). *Virosis en vid*. Obtenido de https://www.larioja.org/upload/documents/717557_201204_PrincipalesVirosis_Vid.pdf.
- Micali, F., Barbosa, E. & Fazzio, R. (2014). The role of native vegetation on infective rates of *Clacarus heveae* (Acari: Eriophyidae) by *Hirsutella thompsonii* (Ascomycota: Ophiocordycipitaceae). *Experimental and Applied Acarology*, 63(2), 157-169.

- Rosas, J. (2003). *Actividad biológica de los exudados y filtrado crudo de Hirsutella thompsonii Fisher (CepaHtM120I) sobre Tetranychus urticae Koch y otros artrópodos*. Colima: Universidad de Colima, Área de Biotecnología.
- Sánchez, S., Casique, R., Bidochka, M., Reyes, A. & López, I. (2011). Pathogenicity of *Hirsutella citriformis* (Ascomycota: Cordycipitaceae) to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) and *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Florida Entomologist*, 94(3), 703-705.
- Schönbach, C. (2013). *Koch's postulates*. En W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, K. Cho & H. Yokota (Eds.), *Encyclopedia of Systems Biology*, (pp. 1086-1087). New York: Springer. doi: 10.1007/978-1-4419-9863-7_746
- Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. (Junio, 2015). *Planococcus citri*. Obtenido de <http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/planococcus-citri>
- Toledo, A., Simurro, M. & Balatti, P. (2013). Morphological and Molecular Characterization of a Fungus, *Hirsutella* sp., isolated from planthoppers and psocids in Argentina. *Journal of Science*, 13. Art. 18.
- Vacante, V. (2010). *Citrus mites: Identification, Bionomy and Control*. Oxford: CABI Publishing.
- Van der Geest, L., Elliot, S., Breeuwer, J. & Beerling, E. (2000). Diseases of mites. *Experimental and Applied Acarology*, 24, 497-560.
- Verena, L., Mizell, R. & Boucias, D. (2011). Transmission of the Mycopathogen, *Hirsutella* spp. to Nymphs and Adults of the Glassy-Winged Sharpshooter, *Homalodisca vitripennis* (= Coagulata), in the Greenhouse. *Florida Entomologist*, 94(1), 106-108.

***Hirsutella*, agente biocontrolador de ácaros e insectos de importancia agronómica**

***Hirsutella* as biological controller agent of mites and insects of agricultural importance**

Kevin Asdrúbal Quesada-Sojo¹, William Rivera-Méndez²

Fecha de recepción: 27 de marzo del 2015
Fecha de aprobación: 6 de agosto del 2015

Quesada-Sojo, K; Rivera-Méndez, W. *Hirsutella*, agente biocontrolador de ácaros e insectos de importancia agronómica. *Tecnología en Marcha*. Edición Especial Biocontrol. Pág 85-93.

1 Estudiante de Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tel. (506) 8407-9592, correo electrónico: kequesada@estudiantec.cr

2 Profesor. Ingeniero en Biotecnología. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tel. (506) 2550-9094, correo electrónico: wirivera@itcr.ac.cr



Palabras clave

Hirsutella; biocontrolador; ITS; ácaros; insectos; hirsutellinas.

Resumen

El manejo integrado de plagas constituye una solución integral a los procesos de producción agrícola, en especial cuando integran mecanismos biológicos ecoamigables. Las especies de hongos pertenecientes al género *Hirsutella* son capaces de infectar y parasitar gran variedad de invertebrados patógenos. Su desarrollo sobre el hospedero produce un micelio amarillento grisáceo con porcentajes bajos en formación de conidios. La caracterización morfofenética de *Hirsutella* se ha realizado utilizando regiones conservadas de ARNr denominadas ITS, lo que ha permitido develar homologías con géneros biocontroladores importantes como *Beauveria* o *Cordyceps*.

Las propiedades biocontroladoras del hongo actúan sobre diversas especies de ácaros e insectos que ocasionan enfermedades en cultivos de importancia agronómica. En ácaros se ha registrado la capacidad de colonizar y controlar especies como *Aceria guerreronis* (daños en frutos del cocotero), *Acalitus vaccinii* (ácaro del brote del arándano), *Tetranychus urticae* y *Calacarus heveae* (patógeno del árbol de caucho). En insectos, esa capacidad se ha demostrado en especies como *Diaphorina citri*, transmisor de la bacteria *Candidatus liberibacter*, *Homalodisca vitripennis*, transmisor de la bacteria fitopatogénica *Xylella fastidiosa*; y *Delphacodes kuscheli*, transmisor del virus Mal de Río Cuarto (MRCV). Se ha detectado que la patogenicidad de *Hirsutella* se debe a toxinas metabólicas complejas que se desarrollan durante la fase vegetativa, como lo son las hirsutellinas en *H. thompsonii*.

La revisión bibliográfica que se presenta en este artículo tiene como objetivo ilustrar los beneficios de utilizar hongos con potencial biocontrolador como *Hirsutella*, lo que constituye un mecanismo alternativo al uso de productos químicos para el control de plagas.

Keywords

Hirsutella; biological control; its; mites; hirsutellines.

Abstract

Integrated pest management is an integral solution to agricultural production processes, especially when it integrates eco-friendly biological mechanisms. Fungal species belonging to the genus *Hirsutella* are capable to infect and parasite a wide variety of invertebrates and pathogens. Its development on the host generates a grayish yellow mycelium with low percentages in formation of conidia. Morphogenetic characterization of *Hirsutella* been used conserved regions of rRNA called ITS allowing reveal homologies with significant biocontrol genres as *Beauveria* and *Cordyceps*.

It has been possible to detect that the pathogenicity of *Hirsutella* is due to complex metabolic toxins that developed during the vegetative stage as are Hirsutellin in *H. thompsonii*.

The biocontrol properties for the fungus act on various species of mites and insects that cause diseases in crops of agronomic importance. In Mites is registered the ability of *Hirsutella* to colonize and control species such as *Aceria guerreronis* (damage to coconut fruit), *Acalitus vaccinii* (blueberry bud mite), *Tetranychus urticae*, and *Calacarus heveae* (pathogen rubber tree). In insects that capacity has been demonstrated in species such as *Diaphorina citri*,

transmitter of the bacterium *Candidatus liberibacter*, *Homalodisca vitripennis*, transmitter of the phytopathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* and *Delphacodes kuscheli* transmitter of Mal de Río Cuarto virus (MRCV). This literature review aimed to enlighten the reader the benefits of using fungi with biocontrol potential as *Hirsutella*, which is an alternative mechanism to the indiscriminate use of chemicals to control pests.

Manejo integrado de plagas

El manejo integrado de plagas y enfermedades es una parte fundamental del proceso de producción agrícola en cualquier esquema económico que se presente, tanto en el de subsistencia variable como en la industria agrícola. Actualmente, los bioplaguicidas son una alternativa natural al combate de plagas y enfermedades a un costo razonable y sin causar efectos negativos sobre el usuario o el ambiente (CIA, 2010). El uso de microorganismos como los hongos entomopatógenos constituye una tendencia actual para el manejo de ácaros e insectos fitoparásitos. Existen varios géneros que parasitan ácaros, tales como *Hirsutella*, *Neozygetes* y *Entomophaga* (Zoebisch et al., 1993).

Características del género *Hirsutella*

Hirsutella es uno de los hongos más abundantes y más importantes para el control de insectos plaga en el campo. Incluye aproximadamente 90 especies que son capaces de infectar y parasitar una gran variedad de invertebrados tales como ácaros, nemátodos e insectos, muchos de los cuales se consideran plagas importantes (Toledo et al., 2013).

H. thompsonii fue descrita e ilustrada por Samson en 1980, quien propuso tres grupos o variedades con base en sus características morfológicas: *H. thompsonii* var. *thompsonii*, *H. thompsonii* var. *vinacea* y *H. thompsonii* var. *synnematosus* (Rosas, 2003). Minter y Brady dividieron este género en dos secciones: sinematógeno (*Synnematous*) y mononematógeno (*Mononematous*), basados en la presencia o ausencia de sinema. La mayoría de las especies de *Hirsutella* poseen sinema, además muchos miembros están catalogados como anamorfos o teleomorfos.

Hirsutella es un hongo de crecimiento lento, caracterizado por un bajo porcentaje de generación de conidios. En condiciones de laboratorio, su crecimiento radial es una variable y depende de factores como tipo de cepa, características genéticas, naturaleza del substrato en el que se desarrolla el hongo y las proporciones de C/N presentes en el mismo. El crecimiento sobre psílidos de *Diaphorina citri* se caracteriza por el cubrimiento del hongo sobre los adultos con un micelio amarillento grisáceo, con tonos lilas en especímenes frescos; en la base de los sinemas con frecuencia se generan protuberancias cónicas-cilíndricas similares a peritecios. Los sinemas se encuentran cubiertos por fiálides (células conidiógenas) no contiguas, con una base esférica ovalada de aproximadamente 5 μm de diámetro. Cada conidio está recubierto por una capa mucilaginosa de 8 μm de largo y 6 μm de ancho con forma ovoide que frecuentemente se disuelve en agua (figuras 1 y 2) (Sánchez et al., 2012).

Pérez y colaboradores (2015) determinaron que la temperatura de crecimiento óptima para *Hirsutella citriformis* es de 25 °C para un crecimiento radial aproximado de 0,083 cm diarios en medio PDA Sabouraud enriquecido (Sánchez et al., 2012). *Hirsutella thompsonii* forma colonias de forma afelpada, color gris o gris oliváceo y en ocasiones blanco; los conidios se producen de manera solitaria o en agrupaciones de dos o tres y presentan una morfología ovoide y verrugosa (figura 2) (Rosas, 2003).

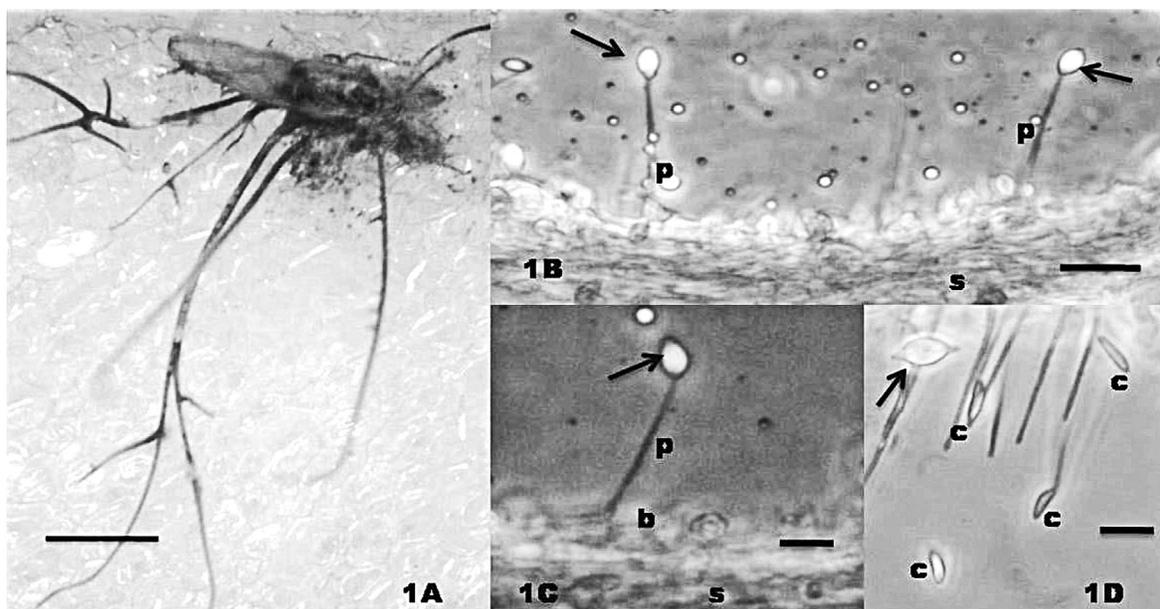


Figura 1. Morfología de *H. citrifomis*. A, sinema esporulado creciendo sobre *Bactericera cockerelli* 15 días después de haber sido inoculado. B-D, micrografías del hongo en PDA con extracto de levadura; en B se observan fiálides, formadas por un cuello (p) y una base (b), el conidio presenta una capa mucilaginosa alrededor, mientras que en (c) dicho material se encuentra ausente. Fuente: Sánchez et al. (2011).

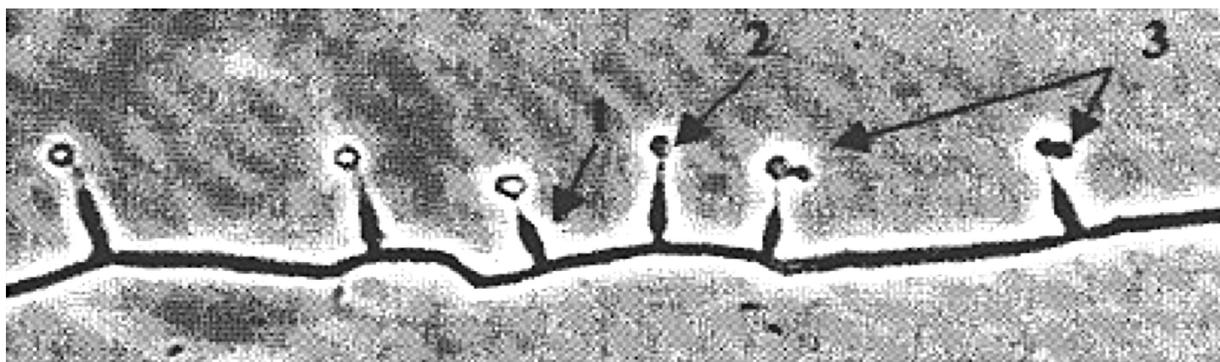


Figura 2. Crecimiento en placa de cepa HtM120I de *Hirsutella thompsonii*. En la imagen es posible observar 1: fiálides, 2: conidios, 3: gotas de exudado. Fuente: Rosas (2003).

Toledo et al. (2013) determinaron que los conidios de esta especie forman una capa compacta sobre la superficie del sinema, surgiendo como células laterales emanadas de éste y llegando a distribuirse de manera intercalada a lo largo de las hebras miceliales (figura 3). Se caracterizan por ser monofialídicos, con una base elipsoidal estrecha a lo largo del esterigmata fialídico. Los conidios son de tipo hialino, sin septos, fusiformes o elípticos, solitarios y en algunas ocasiones dispuestos en pares. Cuando se cultivan in vitro, presentan tonalidades que van del blanco al marrón, con la presencia de exudados amarillentos y marrones. En cuanto a la composición química, la capa mucilaginosa externa de los conidios posee actividad enzimática relacionada con procesos de adhesión y tiene propiedades antisecantes y protectoras de los fenoles tóxicos del hospedero (Rosas, 2003).

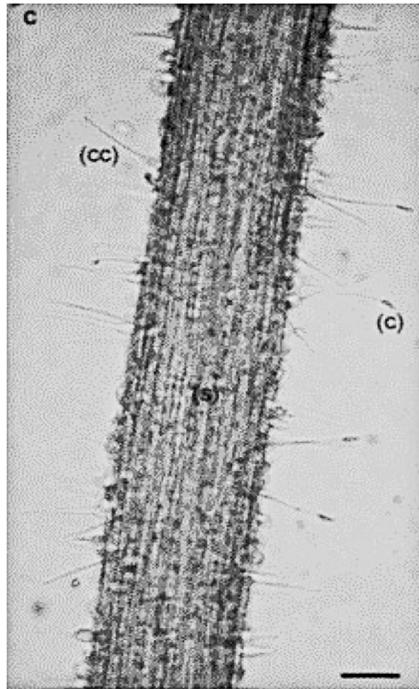


Figura 3. Células conidiógenas (cc) y conidio de *Hirsutella* sp. (c) emanando como células laterales a lo largo de todo el sinema (s). Fuente: Toledo et al. (2013).

Caracterización molecular y genética

Toledo et al. (2013) identificaron muestras de *Hirsutella* utilizando regiones conservadas de ARN ribosomal denominadas ITS (región transcrita interna). Sus análisis permitieron constatar un 87% de semejanza entre los géneros de *Hirsutella* y *Cordyceps* que, aunado al análisis de máxima parsimonia (figura 4), logró develar la homología existente de las muestras con *Beauveria*, conocido por ser un eficiente agente entomopatógeno en programas de manejo integrado de plagas (Toledo et al., 2013).

Patogenicidad

Los hongos secretan una amplia variedad de metabolitos, algunos de importancia para la medicina y como herramientas en protocolos de investigación, como es el caso de la proteinasa K. Otros son altamente tóxicos (fumonisinas, ocratoxinas, patulin, zeralena) o carcinogénicos (moniliformin y aflatoxinas).

Hirsutella posee gran cantidad de toxinas, enzimas y compuestos aún no identificados asociados con la interrelación patógeno-hospedero, con potencial para el control biológico de los ácaros. Las toxinas hirsutellinas A y B (HtA y HtB) de *H. thompsonii* producidas durante la fase vegetativa así como otro tipo de metabolitos aún no detectados poseen en conjunto posibilidades de ser incluidos en los programas de control de plagas. Se ha reportado que diferentes productos metabólicos secretados por el desarrollo micelial de *Hirsutella* en caldos de cultivo con agitación han resultado tóxicos para larvas de *Galeria mellonella* y adultos de *Drosophila melanogaster* (Rosas, 2003).

Las toxinas se clasifican en dos grupos: compuestos de bajo peso molecular y moléculas proteómicas de alto peso molecular, ambos especializados en el control de insectos plagas. La caracterización de exudados producidos durante la etapa esporulativa de *Hirsutella* es

necesaria, para conocer la toxicidad contra artrópodos plaga (Rosas, 2003). La HtB aún no se encuentra totalmente caracterizada, a diferencia de la HtA, proteína extracelular residual de 130 aminoácidos perteneciente al género de las ribotoxinas (toxinas producidas como resultado de la actividad ribonucleótida) (Viegas et al., 2009). El phomalactona posee efectos tóxicos contra la larva de la palomilla de la manzana *Rhagoletis pomonella* y adultos de la mosca de la fruta del mediterráneo *Ceratitis capitata*. Además presenta actividad fungicida, dado que inhibe la germinación de los conidios de algunas especies de hongos como *Beauveria bassiana*, *Toypocladium* y *Metarhizium anisopliae*.

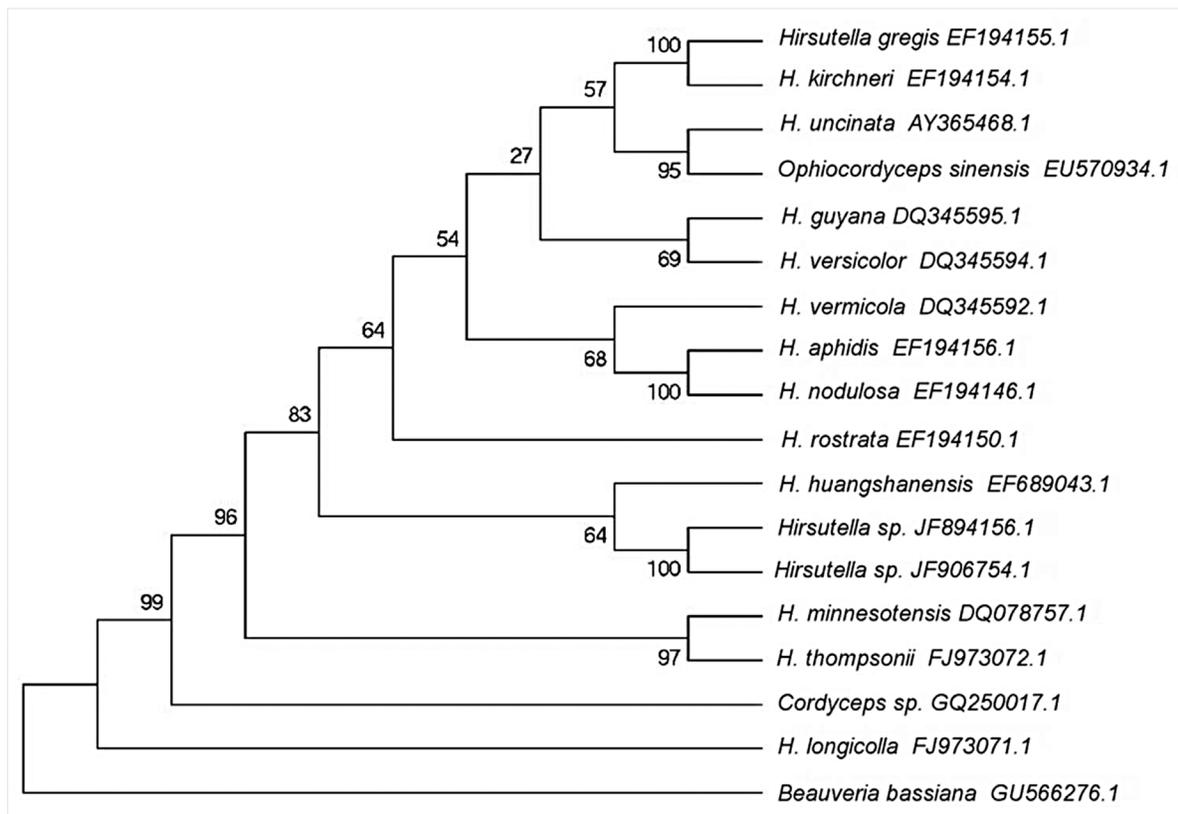


Figura 4. Árbol de máxima parsimonia que relaciona las secuencias ITS generadas a partir de muestras de campo de *Hirsutella* con sus géneros relacionados. El nombre de las especies viene dado por la accesión que brinda el GenBank. Se detalla la homología existente de las muestras de campo con géneros importantes de agentes biocontroladores como *Beauveria* y *Cordyceps*. Fuente: Toledo et al. (2013).

Ácaros e insectos de importancia agronómica sensibles al efecto biocontrolador de *Hirsutella*

Entre los procesos de producción masiva, *Hirsutella* muestra grados altos de patogenicidad sobre ácaros como *Aceria guerreronis* (figura 5), *Tetranychus urticae* y *Brevipalpus* sp., durante las etapas de conidiación.

Rosas (2003) destaca el potencial patogénico de *H. thompsonii* sobre ácaros de las siguientes familias: Eriophyidae, Tetranychidae, Tenuipalpidae, Tarsonimidae y Brevipalpidae, por lo que con sus tres variedades, este hongo se considera el más importante para la regulación natural de artrópodos plaga. *Hirsutella* ha sido aislado de diferentes ácaros hospederos en regiones tropicales y templadas.



Figura 5. *A. guerreronis* parasitado por *H. thompsonii* (560x). Fuente: Cabrera et al. (2008).

Asimismo, se ha observado el efecto de *Hirsutella* sobre ciertos grupos taxonómicos de insectos como Coleóptera, Lepidóptera, Hymenóptera y Díptera (Rosas et al., 2003).

El dragón amarillo (*huanglobing*) es una de las enfermedades más importantes de los árboles de cítricos en el mundo. Esta enfermedad es causada por la bacteria *Candidatus liberibacter*, que se transmite a partir de especímenes enfermos a sanos por medio del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri*. Además de los detalles mencionados en la sección de morfología y crecimiento de esta revisión, según los resultados obtenidos por Sánchez et al. (2012), las pruebas establecidas por Orquídea y su equipo de trabajo (2015) dieron a conocer tasas de mortalidad de 1,5 a 10,6% en psílicos adultos de *D. citri* inoculados con conidios de *H. citriformis*, después de 10 días de iniciado el ensayo.

Es por ello que *H. citriformis* es uno de los pocos hongos reportados con posible uso potencial para el control de hemípteros, incluyendo a *D. citri*.

El género *Hirsutella* sp. ha sido descrito por Verena et al. (2011) como biocontrolador de las poblaciones de *Homalodisca vitripennis*, un hemíptero cicadélido, responsable de transmitir la bacteria fitopatogénica *Xylella fastidiosa*, a la cual infecta a través de los tejidos, causando síntomas como la quema de hojas y posterior defoliación. Es bien conocido que *X. fastidiosa* induce estrés osmótico en las plantas, además de ser capaz de secretar oligosacáridos que causan bloqueos xilemáticos. Como mecanismo de resistencia, produce enzimas degradadoras de paredes celulares vegetales que inhiben el bloqueo defensivo que estas generan por medio de sus láminas, compuestas por hemicelulosa y pectina (Beattie, 2011) (figura 6).

Potencial a futuro

La actividad biológica de los exudados fúngicos se ha estudiado con gran detalle, así como el efecto de cada uno de ellos contra diversos tipos de artrópodos, especialmente aquellos derivados a partir del crecimiento de *Hirsutella*. Los esfuerzos actuales buscan descubrir la naturaleza de los materiales activos presentes en los exudados. Dependiendo de su identidad, las moléculas orgánicas pequeñas podrían llegar a utilizarse como modelo para la síntesis química, mientras que los péptidos o proteínas podrían mejorarse mediante la manipulación genética. Los estudios de alineamiento genético y filogenético realizados por Herrero et al. (2013) permitieron incluir la hirsutellina HtA en la familia de las ribotoxinas, que son un grupo de proteínas pertenecientes a la familia de las barnasas, las cuales comprenden pequeñas ribonucleasas de una sola cadena polipeptídica. Esta familia incluye otras ribotoxinas

importantes, tales como α -sarcina, restrictocina y mitogilina, conocidas y estudiadas por ejercer efectos antitumorales en células malignas de cáncer de colon.

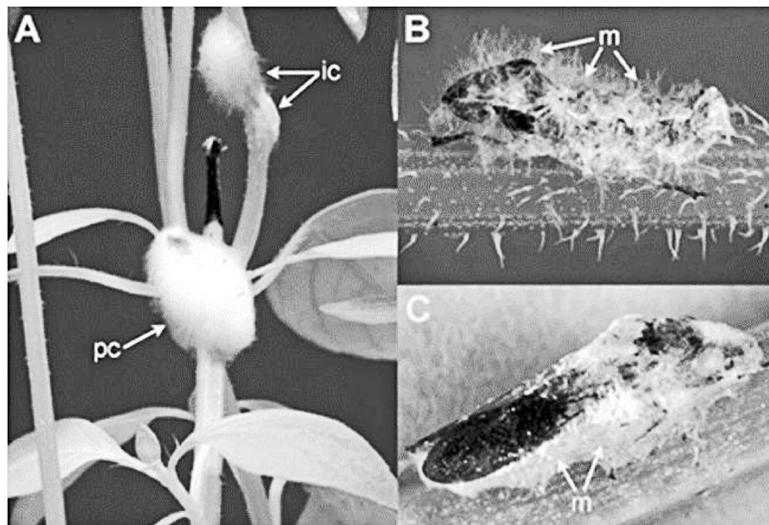


Figura 6. Cadáveres de *H. vitripennis* colonizados por *Hirsutella*. (A) Cadáver de ninfa (ic) y adulto (pc) sobre una hoja de albahaca de limón en estados avanzados de colonización. En (B) y (C) se aprecia el desarrollo de una capa fina y delgada de micelio sobre una ninfa y un adulto, respectivamente. Fuente: Verena et al. (2011).

Es por ello que a futuro se plantea llevar a cabo estudios que permitan ampliar el espectro de acción de HtA como una ribotoxina capaz no solo de actuar como compuesto insecticida sino también como un posible agente antitumoral en diversos tipos de cáncer. Es importante recalcar que la bibliografía actual documenta muy poco acerca de los principales efectos que las hirsutellinas, como compuestos derivados de *Hirsutella*, ocasionan sobre las plagas, especialmente de la HtB, por lo que es importante realizar investigaciones en el campo y de esa forma obtener mejores resultados en la comprensión de los mecanismos empleados por los hongos para controlar especies plagas.

Conclusiones

Hirsutella es de los hongos con mayor potencial para controlar plagas que generan grandes pérdidas en el mundo. El entendimiento de aspectos como su metabolismo y crecimiento en ambientes naturales resulta clave para definir la mejor estrategia para su cultivo y posterior inoculación en el medio ambiente, asegurando así un antagonismo eficiente contra insectos y ácaros perjudiciales.

La información disponible con respecto a sus mecanismos de colonización y desarrollo en ácaros e insectos es abundante, más no suficiente para dar respuesta a todas las interrogantes que giran en torno a aspectos tan importantes como su metabolismo y genética reproductiva una vez presente en el hospedero. Es por tales razones que debe realizarse un mayor esfuerzo en la investigación de los efectos biocontroladores, no solamente en *Hirsutella*, *Cordyceps* o *Beauveria*, sino también en especies alternativas con potencial biocontrolador. El ser humano encuentra y seguirá encontrando en el control biológico una opción interesante y atractiva en ánimos de reducir las consecuencias negativas que genera contra la naturaleza y contra sí mismo, derivadas del abuso de productos químicos en la agricultura.

Bibliografía

- Beattie, G. (2011). Water Relations in the Interaction of Foliar Bacterial Pathogens with Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 533-555.
- Cabrera, R., Cueto, J. & Otero, G. (2008). Los enemigos naturales de *Aceria guerreronis* Keifer (Acari: Eriophyidae) en Cuba y sus perspectivas para el manejo de la plaga. *Fitosanidad*, 12(2), 99-107.
- CIA (Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica). (2010). *Boletín: Biocontroladores*. San José: Universidad de Costa Rica.
- Herrero, E., García, L., Olombrada, M., Lacadena, J., Martínez, Á., Gavilanes, J. & Oñaderra, M. (2013). Hirsutellin A: A Paradigmatic Example of the Insecticidal Function of Fungal Ribotoxins. *Insects*, 4(3), 339-356.
- Pérez, O., Rodríguez, R., López, I., Sandoval, C. & Maldonado, M. (2015). Radial growth, sporulation, and virulence of Mexican isolates of *Hirsutella citriformis* against *Diaphorina citri*. *Southwestern Entomologist*, 40(1), 111-120.
- Rosas, J. (2003). *Actividad biológica de los exudados y filtrado crudo de Hirsutella thompsonii Fisher (CepaHtM120I) sobre Tetranychus urticae Koch y otros artrópodos*. Colima: Universidad de Colima, Área de Biotecnología.
- Sánchez, S., Casique, R., Bidochka, M., Reyes, A. & López, I. (2011). Pathogenicity of *Hirsutella citriformis* (Ascomycota: Cordycipitaceae) to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) and *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Florida Entomologist*, 94(3), 703-705.
- Sánchez, S., Casique, R., Bidochka, M., Reyes, A., & López, I. (2012). *Hirsutella cirtriformis*: caracterización morfológica y molecular, y patogenicidad hacia psilloideos vectores. *Ponencias del 2° Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México*, (p. 356). Saltillo.
- Toledo, A., Simurro, M. & Balatti, P. (2013). Morphological and Molecular Characterization of a Fungus, *Hirsutella* sp., isolated from planthoppers and psocids in Argentina. *Journal of Science*, 13(18), 3, 5, 6.
- Verena, L., Mizell, R. & Boucias, D. (2011). Transmission of the Mycopathogen, *Hirsutella* spp. to Nymphs and Adults of the Glassy-Winged Sharpshooter, *Homalodisca vitripennis* (=Coagulata), in the Greenhouse. *Florida Entomologist*, 94(1), 106-108.
- Viegas, A., Herrero, E., Oñaderra, M., Macedo, A. & Bruix, M. (2009). Solution structure of hirsutellin A—new insights into the active site and interacting interfaces of ribotoxins. *The Febs Journal*, 276(8), 2381-2390.
- Zoebisch, T., Ochoa, R., Vargas, C. & Gamboa, A. (1993). Identificación y potencial del hongo *Hirsutella thompsonii* Fisher para el control de ácaros de importancia económica en América Central. *Manejo Integrado de Plagas*, 23, 9-12.

La revista *Tecnología en Marcha* es publicada por la Editorial Tecnológica de Costa Rica, con periodicidad trimestral. Su principal temática es la difusión de resultados de investigación en áreas de Ingeniería. El contenido de la revista está dirigido a investigadores, especialistas, docentes y estudiantes universitarios de todo el mundo.

1. Los artículos deberán ser originales, inéditos y no pueden participar simultáneamente en otros procesos de publicación.
2. La extensión de los trabajos debe oscilar entre 10 y 20 páginas de 21,59 x 27.94 cm (8,5 x 11 pulgadas). Se debe presentar en un documento de Microsoft Word, con interlínea de espacio y medio, en una columna, en letra Times 12 pts.
3. Los títulos de los artículos deben ser sencillos, claros, cortos y estar en español e inglés.
4. Es necesario indicar claramente el nombre y los dos apellidos del autor, nacionalidad, profesión, teléfonos, correo electrónico, dirección exacta, lugar de trabajo y país de origen de dicha entidad.
5. Las palabras clave deben presentarse en español y en inglés. Además, el resumen debe estar compuesto por 250 palabras y aparecer en ambos idiomas.
6. Las imágenes se deben enviar en un archivo aparte del documento principal. En caso de ser escaneadas, la resolución mínima es de 300 ppi. Los formatos permitidos son: .jpg, .tiff, .eps, .psd y .ai.
7. Las fórmulas y ecuaciones matemáticas deben realizarse con el editor de ecuaciones de Word.
8. En lo pertinente, se usará el Sistema Internacional de Unidades.
9. La bibliografía debe aparecer al final del documento, ordenada según su aparición en el documento y utilizar el formato IEEE.
10. Los documentos deberán enviarse a las direcciones electrónicas editorial@itcr.ac.cr o alvarez@itcr.ac.cr
11. La Comisión editorial no dará trámite de edición al artículo que no cumpla con estos requisitos.

Nota importante

Los originales serán sometidos a un proceso editorial que se desarrollará en varias fases. En primer lugar, serán objeto de una evaluación preliminar por parte de los miembros del Comité Editorial, quienes determinarán la pertinencia de su publicación. Una vez establecido que cumple con los requisitos temáticos y formales indicados en estas instrucciones, será enviado a dos pares académicos externos para decidir en forma anónima (doble ciego) si debe publicarse, si necesita cambios o si se rechaza. En caso de que ambos llegaran a discrepar, el artículo será enviado a un tercer evaluador, para tomar la decisión. Los resultados del dictamen académico serán inapelables en todos los casos. En caso de que el artículo sea aprobado para su publicación, el autor autoriza a la Editorial Tecnológica de Costa Rica para que lo incluya en la revista y pueda editarlo, reproducirlo, distribuirlo, exhibirlo y comunicarlo en el país y en el extranjero mediante medios impresos y electrónicos bajo la licencia *Creative Commons*.

Instructions to publish in **TECNOLOGÍA** *en marcha*

The journal *Tecnología en Marcha* is published by the Editorial Tecnológica de Costa Rica every three months. It focuses mainly in disseminating the results of research of engineering areas. The journal's contents are intended for researchers, experts, teachers and university students around the world.

1. All articles must be originals, unpublished, and cannot be simultaneously used in other processes.
2. Papers may be 10-20 pages long (8.5 x 11 in, or 21.59 x 27.94 cm). All documents must be submitted in MS Word, 1.5 line spacing, using Times 12 pts. font and in one column.
3. Article titles must be simple, clear, short, and be included in both Spanish and English.
4. The name and (two) last names of the author should be clearly indicated, along with their profession, telephone numbers, email, physical address, place of work (organization, department, school), and where the organization is based.
5. The key words must be included in both Spanish and English. Furthermore, the abstract must be 250 words long, and should also be submitted in both languages.
6. The images must be delivered in a separate document. If scanned, the minimum resolution is 300 ppi. The formats allowed are .jpg, .tiff, .eps, .psd, and .ai.
7. Mathematical equations and formulas must be done with MS Office's Equation Editor.
8. Where necessary, use the International System of Units.
9. Bibliography will be included at the end of the document, arranged order based on IEEE format.
10. Papers should be sent to the following emails: editorial@itcr.ac.cr, or alamirez@itcr.ac.cr
11. The Editorial Committee will only consider for publication the articles meeting the above requirements.

Important note

All originals will be subject to an editorial process consisting of several phases. First, a preliminary assessment will be done by members of the Editorial Committee, the Director, and the editors, who will jointly determine whether the article would make a relevant publication. After determining that an article meets the thematic and formal requirements established in these Instructions, it will be sent to two outside academic peers who will decide anonymously (double-blind) whether it should be published, if it needs any changes, or whether it should be turned down. In case of disagreement between these peers, the article will be sent to a third evaluator in order to reach a decision. In no case may the results of this decision be appealed. If the article is accepted for publication, the author authorizes the Editorial Tecnológica de Costa Rica to edit, reproduce, distribute, exhibit and communicate at the country and abroad through print media and electronic equipment under the *Creative Commons* license.

Cronograma 2016

	Vol. 29-1	Vol. 29-2	Vol. 29-3	Vol. 29-4	Vol. 30-1	Vol. 30-2	Vol. 30-3
Recepción de artículos	Mayo - julio 2015	Agosto - octubre 2015	Noviembre 2015 - enero 2016	Febrero - abril 2016	Mayo - julio 2016	Agosto - octubre 2016	Noviembre 2016 - enero 2017
Evaluación de expertos y aprobación	Agosto - setiembre 2015	Noviembre - diciembre 2015	Febrero - marzo 2016	Mayo - Junio 2016	Agosto - setiembre 2016	Noviembre - diciembre 2016	Febrero - marzo 2017
Revisión de estilo y corrección	Octubre 2015	Febrero 2016	Abril 2016	Julio 2016	Octubre 2016	Enero 2017	Abril 2017
Diagramación y correcciones finales	Enero 2016	Marzo 2016	Mayo - junio 2016	Agosto - setiembre 2016	Noviembre - diciembre 2016	Febrero - marzo 2017	Mayo - junio 2017
Publicación del número	Febrero 2016	Mayo 2016	Julio 2016	Octubre 2016	Febrero 2017	Abril 2017	Julio 2017