

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Aislamiento, identificación y evaluación del efecto antagonista de hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. causante de la pudrición blanca de la cebolla, en la zona alta de Cartago, Costa Rica.**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales para optar al grado de Magister Scientiae.

MARIA DEL MILAGRO GRANADOS MONTERO

Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio", Costa Rica

2004

## **DEDICATORIA**

*A mis viejitos,  
por darme todo su cariño,  
por enseñarme el valor de la perseverancia y  
el amor de Dios.*

*Los llevo siempre en mi corazón.*

## ***AGRADECIMIENTOS***

A Dios todopoderoso, por permitirme vivir y dar vida, por darme la bendición de la salud y la felicidad del amor.

A mi madre, porque es una mujer digna de admiración, por ser el mayor ejemplo de lucha, sacrificio y dedicación a sus hijas.

A mi esposo, por darme siempre su sonrisa cargada de ilusión y su mirada llena de fortaleza. A mi hijo, por darme las sensaciones más hermosas de mi vida.

A don Edgar, por todo el tiempo, paciencia y consejos que amablemente me brindó, porque fueron de gran ayuda en la realización de este trabajo y en mi superación personal.

A Miguel Obregón, por su trabajo de revisión, por todo su apoyo y amistad. A Carmen Durán, por abrirme las puertas de una institución de prestigio y permitirme su amistad y confianza.

A mi directora de tesis, Amy Wang, por aceptar este proyecto, facilitar su realización y por su excelente trabajo de revisión y sugerencias.

A Gerardina Umaña, por ser miembro del Comité Asesor y por que siempre ha sido un ejemplo de persona de buena voluntad.

A Luis Salazar y a todas las personas del CIPROC y del Centro Especializado en Agricultura Orgánica del INA, que de una u otra forma participaron en la realización de este proyecto.

A los agricultores que facilitaron sus fincas para la ejecución de esta tesis.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Magister Scientiae

---

Dr. Felipe Arauz Cavallini  
Representante de la Decana de Estudios de Posgrado

---

M.Sc. Amy Wang Wong  
Directora de Tesis

---

Dr. Miguel Obregón Gómez  
Asesor de Tesis

---

M.Sc. Gerardina Umaña Rojas  
Asesora de Tesis

---

Dr. José Ramón Molina Villalobos  
Director del Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas y  
Recursos Naturales

---

Ing. María del Milagro Granados Montero  
Candidata

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	vii
<b>LISTA DE CUADROS</b>	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xi
<b>LISTA DE ANEXOS</b>	xii
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	1
<b>REVISION DE LITERATURA</b>	5
A) Generalidades del Cultivo	5
B) Pudrición Blanca o Torbó	6
1. Distribución de la enfermedad	6
2. Sintomatología	7
3. Agente causal	7
4. Hospederos	8
5. Ciclo de vida	9
6. Epidemiología	11
7. Combate	12
7.1. Combate por resistencia	13
7.2. Combate químico	14
7.3. Combate cultural	16
7.3.1. Rotación de cultivos	16
7.3.2. Inundación	16
7.3.3. Estimulantes de la germinación de los esclerocios	16
7.4. Combate físico	18
7.5. Combate biológico	19
7.6. Combate integrado	21
Literatura citada	22
<b>CAPITULO PRIMERO:</b>	30
<b>Aislamiento e identificación de hongos asociados a esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk. causante de la pudrición blanca de la cebolla, en la zona alta de Cartago, Costa Rica.</b>	
Introducción	31
Materiales y métodos	33
1. Trampeo	33
2. Muestro de plantas enfermas	34
3. Análisis complementarios	34
3.1. Cuantificación de la densidad de inóculo	34
3.2. Análisis microbiológico	34
3.3. Análisis químico, de textura y determinación de M. O.	35

Resultados	36
1. Trampeo	36
2. Muestro de plantas enfermas	40
3. Análisis complementarios	40
3.1. Cuantificación de la densidad de inóculo	40
3.2. Análisis microbiológico	41
3.3. Análisis químico, de textura y determinación de M. O.	44
Discusión	45
Conclusiones	50
Recomendaciones	51
Literatura Citada	52
<b>ANEXOS</b>	
<b>CAPITULO SEGUNDO:</b>	55
<b>Evaluación del efecto antagonista de hongos aislados en fincas productoras de cebolla de la zona alta de Cartago, sobre el patógeno <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk. causante de la pudrición blanca.</b>	
Introducción	56
Materiales y métodos	58
1. Pruebas <i>in vitro</i>	59
1.1. Inhibición del crecimiento de <i>Sclerotium cepivorum</i>	59
1.2. Prueba de colonización y parasitismo de esclerocios	61
2. Prueba en invernadero	62
Resultados	65
1. Pruebas <i>in vitro</i>	
1.1. Inhibición del crecimiento de <i>Sclerotium cepivorum</i>	65
1.2. Prueba de colonización y parasitismo de esclerocios	69
2. Prueba en invernadero	70
Discusión	76
Conclusiones	86
Observaciones	87
Recomendaciones	88
Literatura Citada	89
<b>ANEXOS</b>	

## RESUMEN

Granados Montero, M<sup>a</sup> del Milagro.

Aislamiento, identificación y evaluación del efecto antagonista de hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. causante de la pudrición blanca de la cebolla, en la zona alta de Cartago, Costa Rica.

Tesis de Maestría en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales. – San José, C. R.:

M. Granados. M., 2004.

92h.:13il.-106 refs.

Se aislaron e identificaron hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, causante de la pudrición blanca de la cebolla. Se evaluó *in vitro* y en invernadero el efecto antagonista de éstos, con el fin de determinar la existencia de hongos antagonistas nativos de la zona alta de Cartago.

Se colectaron muestras de suelo provenientes de las tres zonas productoras de cebolla, Bagaces, Santa Ana y la zona alta de Cartago, durante el período comprendido entre febrero y mayo del 2002. En las dos primeras se realizaron análisis de cuantificación de la densidad de inóculo, microbiológico, químico sencillo, de textura y determinación de materia orgánica; para la tercera zona se hizo, además, muestreo de plantas enfermas y trampeo de hongos por medio de la técnica de entierro de esclerocios. Se estudiaron 10 fincas de la zona alta de Cartago, cada una se dividió en tres áreas de acuerdo con el nivel de incidencia histórica de la enfermedad.

En cada finca se colocaron, durante 1 mes, 75 esclerocios a una profundidad entre 10 y 20 cm. Se analizaron en el laboratorio y se cultivaron en PDA para hacer el recuento e identificación de los hongos presentes. Además, se tomaron los esclerocios con signos de colonización provenientes de plantas enfermas. Los géneros encontrados a partir del trampeo fueron *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Gliocladium* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* spp., *Rhizoctonia* sp., *Rhizopus* sp. y *Trichoderma* spp.; en bulbos enfermos se aislaron *Fusarium* spp., *Monilia* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* spp., *Pythium* sp., *Rhizopus* sp., y *Trichoderma* spp. Los géneros *Gliocladium* sp., *Penicillium* spp. y *Trichoderma* spp. se hallaron también a partir de análisis microbiológico de suelo, el género *Paecilomyces* sp. solamente fue posible recuperarlo por medio de esta técnica.

Se realizaron dos ensayos *in vitro*, en el primero se evaluó la inhibición del crecimiento de *Sclerotium cepivorum* y en el segundo, se midió la capacidad de colonización y parasitismo de esclerocios, los aislamientos utilizados en ambas pruebas fueron: dos aislamientos de *Penicillium* spp., uno de *Paecilomyces* sp., uno de *Gliocladium* sp., uno de *Beauveria bassiana* y ocho de *Trichoderma* spp.

Los resultados mostraron que los hongos *B. bassiana*, *Gliocladium* spp. y *Paecilomyces* sp inhibieron el crecimiento de *S. cepivorum* por medio de antibiosis, además que *B. bassiana* y *Gliocladium* sp. tuvieron la capacidad de colonizar y parasitar esclerocios viables. *B. bassiana* parasitó el 5% de los esclerocios que colonizó, mientras que *Gliocladium* sp logró parasitar el 21,2%. Por otra parte, los aislamientos de *Trichoderma* se entremezclaron con el micelio del patógeno y se observó enrollamiento o desarrollo paralelo de las hifas, lo que puede reflejar algún grado de micoparasitismo.

Para el ensayo en invernadero se seleccionaron los hongos *B. bassiana*, dos aislamientos de *Gliocladium* spp. y uno de *Trichoderma* sp., aplicados solos y en mezcla. Se empleó suelo inoculado con 0.07 esclerocios/g de suelo y cada antagonista fue adicionado como "drench" mediante solución acuosa a una concentración de  $3,2 \times 10^6$  conidios/ml en la primera aplicación y de  $1.8 \times 10^7$  conidios/ml en la segunda aplicación. No fue posible evaluar el efecto de los antagonistas sobre la enfermedad ya que ésta no se presentó. Sin embargo, se pudo concluir que todos los aislamientos evaluados influyeron de forma positiva en el crecimiento de las plantas.

Palabras claves: *Sclerotium cepivorum*, control biológico, cebolla.

Directora de la investigación: M.Sc. Amy Wang Wong.

Facultad de Ciencias Agroalimentarias.



## LISTA DE CUADROS

### CAPITULO PRIMERO

Cuadro 1.	Porcentaje de esclerocios por categoría y por nivel de incidencia de la enfermedad, luego de permanecer enterrados un mes, en 10 fincas dedicadas al cultivo de la cebolla en la zona alta de Cartago.	36
Cuadro 2.	Frecuencia de aparición (ufc) de cada género identificado en el área de baja incidencia de la enfermedad (área verde), según la categoría de los esclerocios recuperados, luego de permanecer enterrados un mes en 10 fincas productoras de cebolla en la zona alta de Cartago.	37
Cuadro 3.	Frecuencia de aparición (ufc) de los géneros <i>Trichoderma</i> y <i>Gliocladium</i> , de acuerdo a su procedencia (número de finca) y a la categoría de los esclerocios recuperados, luego de permanecer enterrados un mes en 10 fincas productoras de cebolla en la zona alta de Cartago.	38
Cuadro 4.	Frecuencia de aparición (ufc) de cada género identificado en el área de incidencia intermedia de la enfermedad (área anaranjada), según la categoría de los esclerocios recuperados, luego de permanecer enterrados un mes en 10 fincas productoras de cebolla en la zona alta de Cartago.	39
Cuadro 5.	Frecuencia de aparición (ufc) de cada género identificado en el área de alta incidencia de la enfermedad (área roja), según la categoría de los esclerocios recuperados, luego de permanecer enterrados un mes en 10 fincas productoras de cebolla en la zona alta de Cartago.	39
Cuadro 6.	Densidad de inóculo de <i>Sclerotium cepivorum</i> (esclerocios/g de suelo seco), de acuerdo a las áreas de incidencia de la enfermedad en 10 fincas dedicadas al cultivo de la cebolla en la zona alta de Cartago.	41
Cuadro 7.	Población (ufc/g de suelo húmedo) promedio de microorganismos presentes en el suelo de las áreas de baja incidencia de la enfermedad (área verde) de las 10 fincas estudiadas, dedicadas al cultivo de la cebolla en la zona alta de Cartago.	42

Cuadro 8.	Población (ufc/g de suelo húmedo) promedio de microorganismos presentes en el suelo de las áreas de incidencia intermedia de la enfermedad (área anaranjada) de las 10 fincas estudiadas, dedicadas al cultivo de la cebolla en la zona alta de Cartago.	43
Cuadro 9.	Población (ufc/g de suelo húmedo) promedio de microorganismos presentes en el suelo de las áreas de alta incidencia de la enfermedad (área roja) de las 10 fincas estudiadas, dedicadas al cultivo de la cebolla en la zona alta de Cartago.	43

## **CAPITULO SEGUNDO**

Cuadro 1.	Procedencia de los aislamientos de posibles antagonistas utilizados en las pruebas de antagonismo, <i>in vitro</i> y en invernadero, contra <i>Sclerotium cepivorum</i> .	59
Cuadro 2.	Tipo de reacción que presentó cada uno de los posibles antagonistas evaluados en la prueba <i>in vitro</i> de inhibición del crecimiento de <i>Sclerotium cepivorum</i> .	65
Cuadro 3.	Crecimiento de <i>Sclerotium cepivorum</i> y de cada uno de los posibles antagonistas que produjeron halo de inhibición (expresado como porcentaje de área promedio de cobertura del plato), después de 14 días de incubación .	66
Cuadro 4.	Crecimiento de <i>Sclerotium cepivorum</i> y de cada uno de los posibles antagonistas que no produjeron halo de inhibición (expresado como porcentaje de área promedio de cobertura del plato), después de 14 días de incubación.	66
Cuadro 5.	Área promedio de cobertura del plato (en porcentaje) de las colonias de <i>Sclerotium cepivorum</i> y de cada uno de los aislamientos (posibles antagonistas), después de 14 días de crecimiento en los tratamientos testigo.	67
Cuadro 6.	Cantidad y porcentaje de esclerocios colonizados y/o parasitados por cada uno de los posibles antagonistas, luego de 14 días de incubación.	70

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO SEGUNDO

Figura 1.	Longitud radical promedio (cm) de plantas de cebolla obtenida por cada tratamiento evaluado, después de 11 semanas de crecimiento en invernadero.	71
Figura 2.	Longitud foliar promedio (cm) de plantas de cebolla obtenida por cada tratamiento evaluado, después de 11 semanas de crecimiento en invernadero.	72
Figura 3.	Número de hojas promedio de plantas de cebolla obtenido por cada tratamiento evaluado, después de 11 semanas de crecimiento en invernadero.	72
Figura 4.	Peso seco radical promedio (g) de plantas de cebolla obtenido por cada tratamiento evaluado, después de 11 semanas de crecimiento en invernadero.	73
Figura 5.	Peso seco promedio del follaje (g) de plantas de cebolla obtenido por cada tratamiento evaluado, después de 11 semanas de crecimiento en invernadero.	73
Figura 6.	Peso seco promedio de los bulbos (g) de plantas de cebolla obtenido por cada tratamiento evaluado, después de 11 semanas de crecimiento en invernadero.	74

## LISTA DE ANEXOS

### CAPITULO PRIMERO

- Anexo 1. Sintomatología de la pudrición blanca de la cebolla o torbó causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk.
- Anexo 2. Información general de las 10 fincas estudiadas, dedicadas a la producción de cebolla en la zona alta de Cartago.
- Anexo 3. Etapa de trampeo.
- Anexo 4. Análisis químico, textural y determinación de la materia orgánica del suelo en las 10 fincas estudiadas, dedicadas a la producción de cebolla en la zona alta de Cartago, según el área de incidencia de la enfermedad.
- Anexo 5. Análisis realizados a muestras de suelo tomadas de las zonas productoras de cebolla que hasta el momento se encuentran libres de la pudrición blanca o torbó.

### CAPITULO SEGUNDO

- Anexo 1. Ilustración de los cálculos necesarios para determinar el porcentaje de cobertura de cada aislamiento utilizado en la prueba *in vitro* de inhibición del crecimiento de *Sclerotium cepivorum*.
- Anexo 2. Halo de inhibición y colonias original y secundarias producidas por los aislamientos de *Beauveria bassiana*, *Gliocladium* sp. (Glio), *Paecilomyces* sp. y *Penicillium* sp. durante la prueba *in vitro* de inhibición del crecimiento de *S. cepivorum*.
- Anexo 3. Comportamiento de 5 de los tratamientos de *Trichoderma* spp. vrs *Sclerotium cepivorum*, después de 14 días de incubación, en la prueba *in vitro* de inhibición del crecimiento del patógeno.
- Anexo 4. Comportamiento de 3 de los tratamientos testigo en la prueba *in vitro* de inhibición del crecimiento del patógeno después de 14 días de incubación.

- Anexo 5. Colonia de *Gliocladium* sp. (Glio 2PA) recuperada a partir de esclerocios expuestos a una solución de esporas de *Beauveria bassiana*, en la prueba *in vitro* de colonización y parasitismo de esclerocios.
- Anexo 6. Análisis realizados al suelo utilizado en la prueba en el invernadero.
- Anexo 6a. Análisis químico, textural y determinación de materia orgánica.
- Anexo 6b. Análisis nematológico.
- Anexo 7. Resumen de los análisis estadísticos de los resultados de la prueba en invernadero.

## INTRODUCCION GENERAL

La cebolla (*Allium cepa* L.) es uno de los cultivos hortícolas más importantes de Costa Rica, se produce principalmente para suplir el consumo nacional, aunque parte de la producción se destina a la exportación.

En el 2002 se exportaron 2349,34 t a destinos como Nicaragua, El Salvador, Honduras y Guatemala; lo que representó un valor FOB de \$89.910 [CNP (Consejo Nacional de la Producción, CR), 2003a].

La producción de cebolla en Costa Rica es realizada por 441 agricultores, distribuidos en tres áreas geográficas: 1) la zona alta de Cartago, que abarca los cantones Central, Oreamuno y Alvarado (principalmente los distritos de Tierra Blanca, Cot y Llano Grande) donde se ubica el 78,2% de los agricultores; 2) el valle central o zona baja, que incluye los cantones de Belén, Escazú, Alajuela y Santa Ana con el 19,7% de los productores; y 3) la zona de Bagaces, Guanacaste, que comprende los distritos de Guayabo y La Fortuna, donde se ubica el restante 2,1% de los agricultores (Pessoa *et al.*, 1998).

La producción nacional de cebolla en el año 2002 fue de 28.404,53 t distribuidas en 1.020,3 hectáreas. Para ese año, en la zona alta de Cartago se cultivaron 833,90 ha, lo que corresponde a 81,73% del área total sembrada, y representó el 73,48% del total de la producción nacional. El valle central produjo el 16,82% en un área de 110,75 ha; mientras que la zona de Bagaces aportó el 9,70% de la producción en 75,60 ha cultivadas [CNP (Consejo Nacional de la Producción, CR), 2003b].

La producción se realiza en dos épocas de siembra denominadas: veranera (de enero a mayo) e inverniz (de mayo a diciembre). La cebolla de la zona alta de Cartago es considerada, por tradición, como inverniz y la producida en las otras zonas, como veranera. Sin embargo, las condiciones climáticas de Cartago hacen posible que en esta zona se realicen las dos siembras al año; así, la siembra veranera ocurre en todo el país,

mientras que la inverniz sólo en la zona alta de Cartago [MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería, CR), 1984; Pessoa *et al.*, 1998).

En esta zona, el cultivo es producido con un alto riesgo de ser afectado por enfermedades, por lo que los agricultores utilizan, en su mayoría, productos químicos como principal estrategia de combate, lo que incrementa la contaminación ambiental, el daño a la salud humana y los costos de producción<sup>1</sup>.

Una de las enfermedades más limitantes es la pudrición blanca o torbó, causada por el hongo *Sclerotium cepivorum*. Aunque no existen registros oficiales, aparentemente la enfermedad apareció en la zona en 1988 y no se conoce cómo fue introducida (Mesén, 1997).

La enfermedad es más severa en suelo frío y ligeramente húmedo. Ataca los bulbos, las raíces y el follaje de plantas adultas, aunque puede afectar desde el estado de plántula. El problema se encuentra principalmente en el campo. Sin embargo, en caso de que los bulbos sean infectados en las últimas etapas de su desarrollo, se produce una pudrición suave durante el almacenamiento (Romero, 1993; Agrios, 1996).

De acuerdo con Mesén (1997), muchos agricultores han cambiado de cultivo en forma definitiva debido a la alta infestación, o continúan sembrando en terrenos totalmente infestados, lo que les representa altos costos de producción y grandes pérdidas de cosecha; las que según Pinto *et al.* (1998) podrían llegar hasta 100% en algunos casos.

El combate de este tipo de enfermedades es difícil y las estrategias utilizadas actualmente son poco efectivas. La rotación de cultivos no es eficaz; hasta el momento no se cuenta con variedades resistentes; el combate químico no es técnica ni económicamente factible debido, principalmente, al riesgo de degradación de los productos en el suelo y a las altas dosis utilizadas, además, no es posible una adecuada cobertura de los sitios de infección, lo que provoca la presencia de residuos sobre las

---

<sup>1</sup> Mesén, R. 2001. Manejo de enfermedades en la producción de cebolla. Tierra Blanca, Cartago. Dirección Regional Oriental, MAG. Comunicación Personal.

partes comestibles y contaminación ambiental (Coley Smith, 1990; Mesén, 1997; Pinto *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2000).

Por otro lado, la posibilidad del combate biológico para el manejo de la pudrición blanca de la cebolla ha sido investigada desde 1969 por Ghaffar (citado por Kay y Stewart, 1994) y se han identificado tanto hongos como bacterias con potencial de control.

De Oliveira *et al.* (1984) cita que la introducción de antagonistas en el suelo es una alternativa no química de control para hongos que forman esclerocios; aunque menciona que una de las limitantes de esta técnica es la adaptación de los microorganismos a las condiciones ecológicas propias de la región, lo que puede provocar disminución en la eficiencia del agente antagonístico. Al respecto, Rai y Saxena (1975) citan que la microflora natural existente en el suelo representa un control biológico natural para estos patógenos, los cuales pueden ser afectados por antibiosis, competencia o hiperparasitismo, reduciendo el inóculo potencial presente en el suelo.

En Costa Rica, no se ha realizado investigación sobre los microorganismos antagonísticos a *Sclerotium cepivorum* que se encuentran de forma natural en las áreas productoras de cebolla, que eventualmente podrían estar ejerciendo algún grado de control biológico natural. No se ha hecho investigación sobre qué tipo de microorganismos (hongos, bacterias, actinomicetes, etc.), cuáles géneros, en qué cantidad, a qué profundidad y distribución espacial se encuentran los posibles controladores, o si en realidad los suelos dedicados al cultivo de cebolla no presentan actividad antagonística para este patógeno.

Este trabajo tuvo el objetivo de comprobar la existencia de hongos antagonísticos a *Sclerotium cepivorum*, nativos de la zona alta de Cartago, para así, crear las bases de otras posibles investigaciones, ya sea para optimizar las condiciones del suelo y propiciar el mejor desarrollo del organismo, o bien para producirlo en forma masiva en laboratorio y luego aplicarlo en campo, todo con el fin de mejorar la forma de combate de la enfermedad.



## OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum* colectados en la zona alta de Cartago y evaluar su efecto antagónico tanto en el laboratorio como en el invernadero.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Aislar y hacer recuentos de hongos, bacterias y actinomicetes presentes en suelos dedicados a la producción de cebolla de las tres áreas de siembra (zona alta de Cartago, Valle Central y Bagaces).
2. Aislar e identificar los hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum* colectados en fincas convencionales ubicadas en la zona alta de Cartago.
3. Evaluar *in vitro* cuáles de los hongos aislados con mayor frecuencia en esclerocios presentan potencial antagónico contra *Sclerotium cepivorum*.
4. Evaluar en el invernadero el efecto antagonista de los hongos promisorios del objetivo anterior, sobre la pudrición blanca.

## REVISION DE LITERATURA

### A. GENERALIDADES DEL CULTIVO

La cebolla (*Allium cepa* L.) pertenece a la familia Liliaceae. Es originaria de Asia Central y se conoce que formaba parte de la dieta de los Egipcios desde 3200 años A.C. Se utiliza principalmente como condimento, aunque tiene gran cantidad de propiedades medicinales, entre las más importantes se citan las diuréticas, pectorales, circulatorias, antiinflamatorias, laxantes y sedantes; además, se menciona como tratamiento para la varicela y la gripe (Artigas, 1983; Crowe, 1995).

Es un cultivo de crecimiento rápido, con un ciclo vegetativo de 4 meses. Se adapta a regiones con temperaturas que oscilan entre 10 y 20 C, favorables para la bulbificación, no obstante algunas variedades requieren temperaturas entre los 25 y 30 C (Gómez, 2002). De acuerdo a Bolaños (2001) en nuestro país se cultivan únicamente cebollas de día corto, ya que las de día largo no forman bulbos en condiciones tropicales.

Se adapta a distintos pisos altitudinales, desde los 100-200 metros sobre el nivel del mar (Guanacaste), hasta los 800-1000 msnm (Valle Central) y superiores a los 1000 msnm en el caso de Cartago (Gómez, 2002).

La cebolla es una planta típica de transplante, el semillero se hace generalmente a cielo abierto y se requiere alrededor de 200 m<sup>2</sup> de éste para sembrar una hectárea. El transplante se realiza cuando las plantas tienen entre 10 y 15 cm de altura. En las zonas altas, se realiza aproximadamente 2 meses después de la siembra. En la zona media y baja las plantas crecen un poco más rápido, realizándose el transplante entre los 40 y 50 días después de la siembra (Bolaños, 2001).

Previo al establecimiento del cultivo, se prepara el terreno con una anticipación de 2 meses, antes del transplante. Se recomienda suelos franco arenosos con alto contenido de materia orgánica, bien drenados y con un pH de 5,5 a 6,5 (Bolaños, 2001; Gómez, 2002),

al respecto Casseres (1984) menciona que son preferibles los suelos con pH entre 6,0 y 6,8.

En las siembras que se hacen durante la estación lluviosa o con riego por aspersión, el transplante se hace en eras, en el caso de las siembras veraneras se hace en bateas. Las distancias más comunes para la siembra son de 10 cm entre plantas y de 25 a 30 cm entre líneas (Bolaños, 2001).

El potasio y el nitrógeno son los elementos que requiere en mayor cantidad y entre los elementos menores, sobresale el hierro y el manganeso, además, se sabe que la cebolla es una de las hortalizas que consumen más azufre (Bornemisza,1990; Bolaños, 2001).

Entre las prácticas de manejo más comunes se encuentra el combate de malezas, ya sea de forma manual o con la aplicación de herbicidas como el oxifluorfen y el linurex (Bolaños, 2001).

Algunas de las enfermedades más problemáticas para este cultivo en la zona alta de Cartago son: la pudrición del cuello (*Botrytis* spp.), raíz rosada (*Pyrenochaeta terrestris*) y especialmente la pudrición blanca o torbó (*Sclerotium cepivorum*) (Mesén, 1997; Bolaños, 2001).

## **B. PUDRICION BLANCA O TORBO**

### **1. Distribución de la enfermedad**

Esta enfermedad ha sido encontrada en países de Europa, de Oceanía, de África y de América ocasionando pérdidas considerables en los cultivos de ajo y cebolla (Villar *et al.*, 1990; Romero, 1993). La pudrición blanca fue asociada primero con cebolla en el Reino Unido en 1841 y luego con ajo en Italia en el año 1903. Después de esos primeros informes, la enfermedad fue registrada en todo el mundo (Pinto *et al.*, 1998). Recientemente, Couch y Kohn (2000) encontraron, mediante estudios de filogenia, que el

centro de origen para la diseminación de este hongo en áreas productoras de cebolla fue Europa.

## **2. Sintomatología**

Esta enfermedad puede afectar plantas en cualquier estado de desarrollo y se incrementa conforme se desarrolla el sistema radical. Los síntomas usualmente se notan a los 60 días después de la siembra y difieren de acuerdo al estado de desarrollo de la planta y la duración de las condiciones favorables en el suelo, principalmente la temperatura (Crowe, 1995; Pinto *et al.*, 1998).

El primer síntoma coincide con el periodo de bulbificación y se presenta como un amarillamiento general, continuado por muerte descendente de las hojas más externas y retardo del crecimiento. El deterioro gradual se da por varios días o semanas hasta concluir con el colapso final de las hojas y una pudrición basal seca o semiacuosa. Simultáneamente, en las raíces y hojas inferiores hay abundancia de micelio blanco, lanoso y superficial que pronto produce esclerocios negros y esféricos sobre la superficie o dentro de los tejidos enfermos. En este grado de desarrollo de la enfermedad las plantas afectadas son fácilmente arrancadas del suelo (Chupp y Sherf, 1960; Waker, 1969; Weber, 1973; Galli *et al.*, 1980; Crowe, 1995; Pinto *et al.*, 1998).

Cuando hay alta densidad de inóculo las plantas pueden morir de forma repentina en grandes áreas del campo, si la infestación es baja pueden morir en grupos de 2 a 40, siendo las plantas centrales del parche las primeras en morir (Crowe, 1995).

Si los bulbos son atacados al final del ciclo del cultivo la enfermedad se expresa como una pudrición durante el almacenamiento (Romero, 1993; Agrios, 1996).

## **3. Agente causal**

*Sclerotium cepivorum* es un hongo Imperfecto perteneciente al Orden Mycelia Sterilia (Galli *et al.*, 1980), descrito en Inglaterra por Berkeley en 1841 (Romero, 1993). Aunque la

mayoría de la literatura indica que no tiene fase teleomórfica conocida, Weber (1973) cita a *Stromatinia cepivorum* como el estado de ascóspora. Se reproduce a través de la producción de gran cantidad de pequeños esclerocios que funcionan como propágulos e inóculo (Crowe, 1995). En ocasiones produce también conidios en esporodoquios, los que aparentemente son estériles (Agrios, 1996).

Los esclerocios son masas compactas de hifas que pueden o no contener tejido del hospedante, por lo común con una cubierta oscura y capaz de sobrevivir bajo condiciones desfavorables (Agrios, 1996). *Sclerotium cepivorum* forma en su mayoría, esclerocios de forma esférica uniforme, de cubierta negra y lisa que consiste de dos a cinco células de grosor que rodean una masa compacta y gruesa de micelio refractivo, por lo general tienen un tamaño de 0.3 a 0.6 mm de diámetro; aunque algunas veces se han reportado esclerocios de forma irregular y tamaños que van desde los 5 hasta los 25 mm (Crowe y Hall, 1980; Crowe, 1995). Ambos tipos de esclerocios pueden formar esclerocios secundarios, dentro o adyacentes a los esclerocios originales, que influyen fuertemente en su sobrevivencia (Coley Smith *et al.*, 1990).

#### **4. Hospederos**

*Sclerotium cepivorum* es un patógeno específico del género *Allium*; entre las principales especies que son afectadas se encuentran la cebolla (*Allium cepa* L.) y el ajo (*A. sativum* L.); además, puede atacar el puerro (*A. porrum* L.), las cebollinas (*A. fistulosum* L. y *A. schoenosprasum* L.), el chalote o ascalonia (*A. ascalonicum* L.), el ajo-porro (*A. ampeloprasum* L.) y ajo silvestre (*A. canadense* L.) (Chupp y Sherf, 1960; Walker, 1969 ; Galli *et al.*, 1980).

Young y Allen (1969) y Mukerji (1970) citados por Esler y Coley Smith (1984), mencionan que, en condiciones de laboratorio y con grandes cantidades de inóculo, este hongo puede afectar *Belamcanda chinensis* Lehman (Iridaceae), algunas especies de *Zephyranthes* (Amaryllidaceae), *Linum usitatissimum*, *Trifolium repens*, *Brassica oleracea* var *capitata* y *Lycopersicon esculentum*. Sin embargo, Esler y Coley Smith (1984) señalan que es posible que los autores citados, se hayan equivocado en la identificación del hongo que infectó esas especies, ya que describen signos y síntomas atípicos de la enfermedad

causada por *Sclerotium cepivorum* y más semejantes a los producidos por *Sclerotium rolfsii*.

## 5. Ciclo de vida

Los esclerocios representan el inóculo primario para el desarrollo de esta enfermedad, estos pueden permanecer viables de 10 a 20 años en condiciones de campo y sin necesidad del hospedero. De acuerdo a Coley Smith (1979) y Coley Smith *et al.* (1990) el porcentaje de sobrevivencia se mantiene por encima del 92% y la viabilidad puede llegar hasta un 96% entre los 5 a 10 años de entierro, si el período de entierro aumenta a 15 ó 20 años los porcentajes de viabilidad oscilan entre 72 y 96% dependiendo de la profundidad. Por otro lado, Adams (1987), en un estudio sobre el efecto de la temperatura del suelo, la humedad y la profundidad de entierro sobre la sobrevivencia de esclerocios, señala que los esclerocios de *Sclerotium cepivorum* son más sensibles al calor que los de *Sclerotinia minor*, indica que para matar el 50% de los propágulos ( $DL_{50}$ ) de *S. minor* se requieren de 624 hr a 35 C, mientras que para lograr el mismo efecto en esclerocios de *Sclerotium cepivorum* solo son necesarias 130 hr.

Los esclerocios de *Sclerotium cepivorum* tienen una latencia constitutiva de uno a tres meses (Coley Smith, 1990). La latencia es un período de descanso que interrumpe el desarrollo de un organismo y es mantenida por factores constitutivos que garantizan al organismo persistir en esta condición por un período mínimo necesario en su ciclo de vida (Lucas, 1998). Una vez que la latencia constitutiva es superada, los esclerocios pueden estar sujetos a una latencia exógena, la cual puede ser impuesta por una amplia variedad de factores, entre los que se encuentran: la micostasis, la temperatura, la luz y la aireación (Coley Smith y Cooke, 1971).

La germinación de los esclerocios es de forma eruptiva o miceliogénica (Somerville y Hall, 1987; Coley Smith, 1979), el primer signo de germinación es la aparición de una protuberancia en la superficie del esclerocio, luego la cáscara sufre una ruptura y uno o más tapones grandes y densos de micelio son empujados hacia fuera; las hifas empiezan a crecer y ramificarse a partir de cada tapón, produciéndose anastomosis libremente (Coley Smith y Cooke, 1971).

Este proceso es estimulado solamente por exudados de las raíces de las especies del género *Allium*. Los exudados están constituidos por sustancias no volátiles de sulfóxidos de alkyl y alkenyl-cisteína, los cuales son metabolizados por la microflora del suelo, especialmente por bacterias presentes en la rizosfera, para producir compuestos volátiles (sulfuros de *n* - propil y alil cisteína) que activan los esclerocios latentes hasta una distancia de 10 cm de la raíz y 30 cm de profundidad (Coley Smith y King, 1969; Crowe y Hall, 1980; Esler y Coley Smith, 1983; Ikeshoji, 1984; citado por Reddy *et al.*, 1992; Crowe, 1995). De acuerdo a Somerville y Hall (1987), sólo se requiere de un tiempo de exposición de 15 minutos para estimular la germinación y el nivel óptimo de germinación se alcanza después de 24 horas o más, los mismos autores indican que con una concentración de 2,5% (v/v) de alil sulfuro es posible obtener un 100% de germinación y que conforme aumenta la concentración hasta 20,0% (v/v) la germinación disminuye hasta el 47%.

Una vez que el esclerocio ha germinado, penetra en las raíces por medio de un apresorio, después crece intra e intercelularmente entre las células parenquimáticas, el tejido cortical se desintegra y luego el tejido vascular es invadido y macerado. La maceración es acompañada por la producción secuencial de enzimas que degradan la pared celular, sobretodo de poligaracturonasas (PG) y pectin transeliminadas. También, se produce la fitotoxina ácido oxálico que actúa de forma sinérgica con las PG, quelatan el  $Ca^{++}$  y bajan el pH cerca del óptimo para la acción enzimática, provocando la pudrición suave característica; sin embargo, la relación entre las hifas y la distribución de enzimas extracelulares que degradan la pared celular no ha sido bien investigada (Stone y Armentrout, 1985; Metcalf y Wilson, 1999).

Según Crowe (1995) el micelio se propaga planta a planta por el contacto de las raíces infectadas con las sanas, si se encuentran a una distancia de 1 a 2 cm. Unos pocos esclerocios pueden ser formados en las raíces, sin embargo, la mayoría es formada en la base del bulbo una vez que el hongo ha logrado invadir y desarrollarse en esta parte.

De acuerdo con Adams y Papavizas (1971), la temperatura y el pH óptimos para la germinación de esclerocios es 20 C con un rango óptimo de 15 a 25 y un pH de 4,8,

aunque pueden germinar en pH cercanos a 8. Por otro lado, la temperatura y el pH óptimos para el desarrollo de la enfermedad es de 15 C con un rango de 10 a 18 C y el pH es de 6,1 con un rango óptimo entre 5,4 y 7,8. Walker (1969) menciona que a temperaturas mayores de 24 C las plantas permanecen saludables aún en suelo fuertemente infectado y que la enfermedad se desarrolla más rápidamente en suelos secos (40% de humedad) que en suelos húmedos (60 a 80% de humedad). Galli *et al* (1980) confirman lo anterior al mencionar que una baja humedad del suelo es un factor de predisposición importante que favorece el desarrollo del patógeno y que la enfermedad es más severa en suelos de zonas altas y bien drenados. Al respecto, Hartman y Datnoff (1997) citan que suelos saturados pueden enmascarar por completo la enfermedad.

El problema se encuentra principalmente en el campo; sin embargo, en caso de que los bulbos sean infectados en las últimas etapas de su desarrollo se produce una pudrición suave durante el almacenamiento, sobretodo si son almacenados húmedos (Romero, 1993; Crowe, 1995).

## **6. Epidemiología**

La pudrición blanca es una enfermedad monocíclica y el patrón de diseminación es típicamente agregado (Hartman y Datnoff, 1997). Los esclerocios representan el inóculo primario, como se mencionó antes.

La diseminación a largas distancias se da por bulbos o almácigos contaminados; a escala local los esclerocios son diseminados por vientos fuertes, inundaciones e irrigación, además del movimiento de materiales y equipo agrícola, así como de animales y trabajadores, lo que podría resultar en una distribución generalizada en todo el terreno (Mordue, 1976; Galli *et al.*, 1980; Crowe, 1995). Al respecto, Adams (1979) menciona que los esclerocios pueden pasar a través de una bomba de irrigación y ser asperjados en el campo a razón de 0.2 esclerocios por litro de agua. Recientemente, Ramírez *et al.* (2002) citan que el ácaro *Rhizoglyphus robustus* (Astigmata:Acaridae) puede influir en la epidemiología de la pudrición blanca, ya que se descubrió que transporta fragmentos de micelio y esclerocios a través de sus piezas bucales y excretas.



Adams y Papavizas (1971) en sus primeros estudios sobre la relación entre densidad de inóculo y enfermedad, mencionan que 5 esclerocios por gramo de suelo pueden causar una cantidad apreciable de enfermedad. Más tarde, Crowe *et al.* (1980), citan que el inóculo de *Sclerotium cepivorum* es muy eficiente, debido a que muchos esclerocios germinan y cada esclerocio puede iniciar una infección. Así, reportan una incidencia de 10 a 100% debida a densidades de inóculo de 0,001 a 0,1 esclerocios por gramo de suelo.

Por otro lado, Adams (1981), encontró una correlación significativa ( $P = 0.01$ ,  $R = 0.71$ ) entre la densidad de inóculo al momento de siembra y la incidencia de torbó al momento de la cosecha, esta relación puede ser expresada por la siguiente ecuación  $Y = 6.41 + 12.38x - 0.65x^2$ , donde "Y" es el porcentaje de torbó presente en los bulbos y "x" es el número de esclerocios por 100 gramos de suelo; sin embargo el autor menciona que esta ecuación es inexacta para densidades de inóculo mayores a 9 esclerocios por 100 gramos de suelo. También, Crowe (1995) menciona que la densidad de esclerocios necesaria para provocar una elevada incidencia de pudrición blanca es generalmente baja.

## **7. Combate**

Los primeros intentos para el combate de la pudrición blanca datan aproximadamente del año 1920, en primera instancia se probó con prácticas de combate cultural como rotación de cultivos y exclusión de material contaminado; pero conforme la infestación se hizo más intensa y ampliamente distribuida, estas medidas fueron cada vez menos eficaces, por lo que se inició con el uso de fungicidas químicos (Locke, 1968). Hasta la fecha el control de *Sclerotium cepivorum* ha sido difícil, los intentos de combate empleando métodos químicos no han resultado del todo satisfactorios, al mismo tiempo de tener un elevado costo económico y ecológico (Pérez *et al.*, 2000).

### 7.1. **Combate por resistencia**

Utkhede y Rahe (1978 a y b) realizaron ensayos para evaluar la resistencia de la cebolla ante la infección por *Sclerotium cepivorum*. En el primero evaluaron 64 cultivares tanto en el laboratorio como en el campo y en el segundo utilizaron 294 cultivares analizados en campo. En ambos experimentos la conclusión fue la misma: "ninguno de los cultivares es inmune a la infección por pudrición blanca", mencionan que los cultivares comerciales difieren significativamente en susceptibilidad y rendimiento en presencia de niveles de inóculo altos y uniformes. Citan que, estas diferencias pueden ser debidas a las condiciones ambientales y/o variaciones en el patógeno.

Años más tarde, Coley Smith (1990) informó que las investigaciones concernientes a variedades resistentes han producido resultados inconsistentes, causados probablemente por no tomar en cuenta factores geográficos y climáticos durante la ejecución de los experimentos. Menciona, además, que la resistencia no ha sido descubierta y que los progenitores silvestres presentan poco potencial genético para hallarla, por lo que pensar en el combate por resistencia, como alternativa de manejo para esta enfermedad, es una posibilidad remota.

Crowe (1995) reafirma lo expuesto por Coley Smith (1990), al citar que no hay especies de *Allium* resistentes a la infección por *Sclerotium cepivorum* y que el mejoramiento ha sido limitado por la falta de fuentes de resistencia. Menciona también que los síntomas pueden ser menos severos en puerros que en ajo o cebolla. Además, que las diferencias entre especies parecen estar relacionadas con la producción relativa de estimulantes de la germinación a través de las raíces, por lo que recientemente se han hecho esfuerzos en seleccionar líneas que produzcan pocos estimulantes.

Recientemente, Hunger *et al* (2002) mencionan que la posible ruta para obtener cultivares resistentes es la ingeniería genética, por medio de ella se podrían producir materiales que no exuden estimulantes de la germinación y/o cultivares que produzcan compuestos inhibitorios a la pudrición blanca.

## 7.2. Combate químico

Muchos han sido los intentos por hallar un producto químico que brinde un adecuado control para esta enfermedad. El primer fungicida exitoso fue el cloruro de mercurio (Calomel), luego han sido usados el dicloran (Botran), el pentacloronitrobenceno (PCNB), los bencimidazoles y dicarboximidias (Coley Smith, 1990).

Locke en 1968, evaluó el efecto de tres químicos, a saber, 2,6-dicloro-4-nitroanilina (DCNA), el PCNB y el Calomel, sobre la pudrición blanca de cebolla y encontró que los tres combatieron la enfermedad de forma aceptable, el primero presentó entre 80 y 92% de control, mientras que los restantes controlaron entre el 56 y 72%; el autor concluye que es posible utilizar estos productos siempre y cuando las aplicaciones se realicen al surco de siembra, ya que la inmersión de las raíces resulta en severa fitotoxicidad. Fletcher y Knight (1971) reafirman lo expuesto por Locke (1968) al mencionar que el tratamiento con dicloran o Calomel parece ser preventivo o disminuye la infección causada por *Sclerotium cepivorum*.

Algunos años después, Utkhede y Rahe (1983a) probaron el vinclozolin (Ronilan) y el iprodione (Rovral) y concluyeron que proporcionan un control significativo cuando son aplicados como tratamiento presiembra. Luego, Resende y Zambolim (1987) y Resende *et al.* (1987), evaluaron el iprodione, el PCNB y el formaldehído, solos y en mezcla, en relación a la densidad de esclerocios presentes en un campo de cultivo de ajo. Estos autores encontraron que los químicos no reducen la población del hongo en el suelo y que el número de esclerocios viables era igual al número de esclerocios totales. Además, se pudo determinar que en los tratamientos en los que se aplicó el formaldehído sólo, la población de esclerocios aumentó al final del ciclo del cultivo.

Por otro lado, en un estudio sobre tolerancia cruzada llevado a cabo por Littlely y Rahe en 1984, se demostró que *Sclerotium cepivorum* presenta este tipo de tolerancia a los productos dicarboximidias iprodione, myclozolin (BCI 100F 50W) y vinclozolin, al dicloran y PCNB pero no al benomil, captan y tiram. Los autores apuntan que esto es de particular importancia debido a que la tolerancia al dicloran ya había sido encontrada para este

tiempo. Mencionan también que, el benomil parece ser un buen candidato para usar en mezcla o en forma alterna con otros productos para mejorar el combate de la enfermedad.

Sin embargo, Coley Smith (1990), cita que aunque se han probado gran cantidad de productos, ninguno ha dado resultados exitosos y que esto, en parte, es debido a la degradación de los fungicidas en el suelo, por acción de las poblaciones heterogéneas de microorganismos presentes en él. Otro aspecto importante que cita el autor, es que al existir productos que son más resistentes a la degradación microbiana, su persistencia en el suelo puede causar daños por la acumulación y contaminación que esto representa. Este es el caso del cloruro de mercurio o Calomel citado antes. Este producto está prohibido en Costa Rica desde 1960, ya que presenta una bioacumulación alta y es tóxico para peces y aves; se conoce del caso de muerte de personas en Japón por el consumo de peces contaminados con metilo de mercurio, que es el subproducto del Calomel una vez que entra en contacto con el suelo, el agua o el cuerpo [UNA-IRET (Universidad Nacional – Instituto regional de estudios en sustancias tóxicas, CR). 1999].

Más recientemente, Crowe (1995) cita que el iprodione es efectivo en períodos cortos de cultivo (siembra de bulbillos), en el establecimiento inicial de las plantaciones con bajas poblaciones de esclerocios y en zonas de cultivo que no favorezcan el desarrollo de la enfermedad. Además, confirma lo expuesto por Coley Smith (1990), al mencionar que la baja efectividad de algunos fungicidas se debe a la degradación microbiana y agrega además, que el control es más limitado conforme aumentan las poblaciones de esclerocios en el suelo. Al respecto, Hartman y Datnoff (1997) y Pérez *et al.* (2000) citan que los fungicidas frecuentemente tienen un costo elevado y proporcionan solamente control parcial de la enfermedad. Un ejemplo de lo anterior es el caso del tebuconazol (Folicur 250 EW), este producto fue probado en México por Delgadillo *et al.* (2002) para combatir el torbó en ajo, los autores encontraron que conforme aumentaba la densidad del inóculo, de 0 a 50 esclerocios/kg de suelo, la eficacia del producto disminuía en 42,6% y se requería de más aplicaciones para lograr el mismo porcentaje de control.

En Costa Rica, Bonilla (1993) citado por Mesén (1997), probó con éxito el cyproconazol (Atemi), por lo que se llevó a cabo su registro e inscripción y es en la

actualidad el producto que se utiliza con mayor frecuencia, aunque no con los mejores resultados.

### **7.3. Combate cultural**

#### **7.3.1. Rotación de cultivos**

Este método no puede ser usado en el manejo de la pudrición blanca debido a la extremada longevidad de los esclerocios y a que son estimulados por compuestos específicos del género *Allium* (Coley Smith, 1990).

#### **7.3.2. Inundación**

Crowe y Hall (1980) encontraron que el decaimiento de los esclerocios en suelos saturados ocurrió solamente en altas temperaturas. Al respecto, Leggett y Rahe (1985) mencionan la inundación como un posible método para reducir los niveles de inóculo de *Sclerotium cepivorum*. Esto, por cuanto la estructura como la fisiología del esclerocio se ve afectada por períodos prolongados de saturación del suelo, además de afectar la ecología de la microflora asociada, sobretodo en regiones con altas temperaturas.

Sin embargo, Crowe (1995) hace énfasis en que, los esclerocios eventualmente mueren bajo condiciones de prolongada saturación de humedad en el suelo, pero esto depende de la temperatura, menciona que en regiones con climas fríos aunque las inundaciones reducen el número de esclerocios no lo hacen lo suficiente como para controlar la enfermedad a nivel comercial

#### **7.3.3. Estimulantes de la germinación de esclerocios**

Se ha encontrado que al incorporar residuos de crucíferas al suelo se obtienen reducciones significativas de pudriciones radicales, ya que estos residuos poseen alto contenido de compuestos volátiles que contienen azufre en forma de sulfitos,

isotiocianatos, mercaptanos y otros; algunos de estos semejantes a los exudados por plantas del género *Allium* (Clapp *et al.*, 1959; Bailey *et al.*, 1961; citados por Villar *et al.*, 1990).

Villar *et al.* (1990) encontraron que la col (*Brassica oleracea* L. grupo Capitata) y la brócoli (*Brassica oleracea* L. grupo Italica) incorporadas en una proporción del 5% (P/V) en suelo infestado con *S. cepivorum* (4 esclerocios/g de suelo) redujeron significativamente el número de plantas muertas y el índice de enfermedad. Al respecto, Smolinska y Dyki (2002) mencionan que, la adición de residuos de mostaza (*Brassica juncea*) redujo el número de esclerocios debido a la alta concentración de isotiocianatos en esos tejidos, mientras que los residuos de nabo (*Brassica napus*) no afectaron la sobrevivencia de los propágulos.

En Canadá, Hovius y McDonald (2002) probaron la eficacia de dos compuestos estimulantes de la germinación de esclerocios en suelo orgánico. Los compuestos (diallyl disulfuro y di-N-propyl disulfuro), fueron diluidos en agua e inyectados a suelo naturalmente infestado tanto en el campo como en el invernadero. En ambos experimentos se obtuvo disminución de la sobrevivencia de los esclerocios, luego de uno a tres meses de exposición a las sustancias. Los autores concluyen que, el diallyl disulfuro fue considerablemente más efectivo bajo condiciones de moderada presión de la enfermedad que el di-N-propyl disulfuro. Sin embargo, Papavizas y Lumsden (1980) advierten que el uso de este tipo de compuestos podría acarrear serios problemas, debido a los "ofensivos" olores emanados por los azufres orgánicos, además de los potenciales riesgos a la salud.

El aceite artificial de cebolla también ha sido utilizado con éxito para provocar la germinación de esclerocios en momentos en que no está presente el cultivo (Merriman *et al.*, 1981; citados por Cook y Baker, 1983).

#### 7.4. Combate físico

Según Adams (1987) la alta temperatura combinada con baja humedad del suelo reducen la supervivencia y actividad de los esclerocios de *S. cepivorum*. Así, a una temperatura de 35 C es posible dañar completamente el 50% de los propágulos (DL<sub>50</sub>) en 129,6 horas, mientras que si la temperatura aumenta a los 50 C se requieren solamente de 0,8 horas para lograr el mismo efecto. Este hongo es más sensible al calor que otros que producen esclerocios, por ejemplo *Sclerotinia minor* tiene una DL<sub>50</sub> de 624 horas a 35 C. El autor indica que, la solarización con plástico claro debería aumentar la temperatura del suelo lo suficiente, como para reducir efectivamente la viabilidad de los esclerocios. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la localización de los propágulos en el perfil del suelo es un factor determinante para el éxito de esta práctica de combate.

En Australia y Egipto se han obtenido reducciones en la población de esclerocios mediante el uso de la solarización (Porter, 1983; citado por Coley Smith, 1990).

Este método es efectivo para reducir la densidad de inóculo inicial, tanto por el efecto físico del calor sobre los esclerocios, como por el favorecimiento de la microflora parasítica a *S. cepivorum* (Enwistle, 1992 citado por Mesén, 1997). En un estudio realizado por Lifshitz *et al.* (1983) con esclerocios de *S. rolfsii* se encontró un incremento en la colonización de estas estructuras tanto por bacterias como por actinomicetos (estreptomicetos). El calentamiento aumentó la frecuencia de rupturas superficiales de los esclerocios, así como las concentraciones de bacterias sobre o alrededor de estas grietas y se notó una disminución de 43% en la incidencia de la enfermedad.

Al respecto, McLean y colaboradores (2001) hallaron, en dos experimentos separados, que la solarización redujo significativamente la viabilidad de esclerocios de *S. cepivorum* y además que los esclerocios recuperados estaban colonizados superficialmente por especies de *Trichoderma*, *Verticillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Aspergillus* y cuatro especies de bacterias no identificadas.

Por otro lado, Thaning y Gerhardson (2001), citan que la viabilidad de los esclerocios de *S. cepivorum* no fue afectada, ni se presentó colonización sobre los mismos, luego de que se cubriera el suelo con láminas de plástico oscuro por un período de 10 a 13 semanas.

Recientemente, Castillo y Albarracín (2003) informan que en parcelas solarizadas se redujo entre 5 y 18% el número de esclerocios de *S. cepivorum*, así como su viabilidad y la incidencia de la enfermedad.

### **7.5. Combate biológico**

El combate biológico, en este tipo de enfermedades, está dirigido a disminuir la densidad de inóculo mediante antagonistas que destruyan los esclerocios o en algunos casos que eviten su formación (Cook, 1979). Estos antagonistas pueden ser bacterias, hongos, ácaros, nemátodos y/o pequeños anélidos (Ferguson, 1953), al respecto Coley Smith y Cooke (1971) señalan que dentro de los factores que afectan la sobrevivencia de los esclerocios están los parásitos y depredadores, entre ellos cienpies, caracoles y larvas, además de los citados antes.

Existen informes que describen la capacidad antagónica tanto de bacterias como de hongos sobre *Sclerotium cepivorum* y otros hongos que forman esclerocios. Rai y Saxena (1975) concluyen que un gran número de hongos fueron encontrados colonizando esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*, tanto *in vitro* como en condiciones de campo; los géneros que presentaron mayor actividad antagónica fueron *Penicillium* y *Aspergillus*.

Ayers y Adams (1981a) describen al hongo *Teratosperma oligocladum* como un micoparásito que se encuentra en forma natural en el suelo, que es capaz de invadir y destruir varias especies de hongos que forman esclerocios, entre los que se encuentra *Sclerotinia minor*. Los mismos autores (1981b) informan de la capacidad antagónica de *Sporidesmium sclerotivorum* para destruir los esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor* y *Sclerotium cepivorum*.



En 1982, Oliveira *et al.* evaluaron la acción antagónica de *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus* y *Penicillium* sp. sobre *Sclerotium cepivorum*. Los resultados mostraron alta eficiencia antagónica de los tres hongos; así, *Trichoderma harzianum* destruyó las hifas del patógeno e inhibió su crecimiento en 65,6%, mientras que *Paecilomyces lilacinus* y *Penicillium* sp. redujeron la colonia de *Sclerotium cepivorum* en 60,3%.

Por otro lado, Utkhede y Rahe (1983b) estudiaron cuatro aislamientos de la bacteria *Bacillus subtilis* como agente de combate biológico y demostraron que ésta presenta un alto grado de estabilidad en la formación de la zona de inhibición *in vitro*, lo que indicó que la bacteria es un antagonista potencial.

Posteriormente, Mesén (1997) encontró que los hongos *Penicillium italicum*, una especie de *Trichoderma* y bacterias no identificadas fueron capaces de colonizar esclerocios o restos no viables de ellos, provenientes de suelo enmendado, tanto en el campo como en el laboratorio. Por otro parte, Tsigbey y Nutsugah (1999) informan que *Gliocladium catenulatum* se desarrolló naturalmente sobre el micelio de *Sclerotium cepivorum* y suprimió por completo su crecimiento; además, colonizó y deterioró los esclerocios.

Más recientemente, McLean y Stewart (2000) confirmaron el poder antagonista de los hongos *Chaetomium globosum*, *Coniothyrium minitans*, *Trichoderma harzianum*, *T. koningii* y *T. virens* contra *Sclerotium cepivorum* en ensayos de invernadero. En el mismo año, Cotes indica que se obtuvo más del 60% de protección contra el patógeno, con la aplicación al suelo de suspensiones de esporas de aislamientos nativos de *Trichoderma* sp., *Chlonostachys* sp. (antes *Gliocladium*<sup>\*</sup>) y *Beauveria* sp. En el 2001, Obregón dice que *Trichoderma harzianum* es un antagonista potencial en el combate de la pudrición blanca en cebolla, ya que presentó capacidad de invasión entre 50 y 75% sobre el patógeno en ensayos *in vitro*. Al respecto, Peyghami (2001) cita que el mecanismo por el cual *Trichoderma harzianum* y *T. viride* actúan es el enrollamiento de hifas, la deformación y la lisis.

---

\* Información suministrada por el Dr. Miguel Obregón, agosto 2004. En este documento se utilizará el término *Gliocladium*.

Luego, Paris *et al.* (2002) evaluaron la efectividad de siete aislamientos nativos de cebolla y el biofungicida comercial TRICHODEX (*Trichoderma harzianum* T39) contra *S. cepivorum* en invernadero. Encontraron que, el actinomicete Ac001, la levadura *Pichia onychis* Lv031 y la bacteria *Serratia marcescens* Br3129 suprimieron el patógeno en 67,1, 65,8 y 63,5% respectivamente, siendo significativamente mejores que los otros tratamientos; mientras que las bacterias *Pantoea agglomerans* Br3124, *Bacillus subtilis* Br006, *B. lentus* Br3118 y *Paenibacillus alvei* Br3119 presentaron valores de supresión, entre el 40 y 56%; mientras que *Trichoderma harzianum* T39 suprimió el 68,2% y no presentó diferencias significativas con los demás tratamientos.

## **7.6. Combate integrado**

Ortiz (1985) probó la utilización conjunta y separada de solarización, adición de materia orgánica y de extracto de cebolla en el combate del torbó en México. De acuerdo a los resultados obtenidos, las parcelas que recibieron las tres tácticas de forma conjunta presentaron disminución de la incidencia y aumento en la producción de cebolla.

Más adelante, Pérez *et al.* (2000) evaluaron el metam (Methan Sodio), el TCMTB (Busan), el bromuro de metilo, el tebuconazol (Folicur) y el MYCOBAC (*Trichoderma lignorum*) solos o en mezcla. Hallaron que el porcentaje de viabilidad de esclerocios a los 60 días después de la aplicación fue cero para los tratamientos y 85 para el testigo.

Coley Smith (1990) afirma que esta enfermedad no se puede combatir con la utilización de uno de los métodos de forma separada. Se debe trabajar con una estrategia de integración de tácticas de combate, para lograr un control satisfactorio, que involucre en primera instancia el muestreo de suelo para medir la población de esclerocios.

## LITERATURA CITADA

- ADAMS, P. B. 1979. A rapid method for quantitative isolation of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *Sclerotium cepivorum* from soil. Plant Dis. Repr. 63: 349-351.
- ADAMS, P. B. 1981. Forecasting onion white rot disease. Phytopathology 71: 1178-1181.
- \_\_\_\_\_. 1987. Effects of soil temperature, moisture and depth on survival and activity of *Sclerotinia minor*, *Sclerotium cepivorum* and *Sporidesmium sclerotivorum*. Plant Dis. 71: 170-174.
- \_\_\_\_\_.; PAPAIVIZAS, G. C. 1971. Effect of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and some soil environmental factors on disease severity. Phytopathology 61: 1253-1256.
- AGRIOS, G.N. 1996. Fitopatología. Trad. M Guzmán. 2ed. México, DF, LIMUSA. p. 513.
- ARTIGAS, J. 1983. La cebolla: valiosa hortaliza como alimento y medicina. Madrid. EDAF. 85 p.
- AYERS, W. A.; ADAMS, P. B. 1981a. Mycoparasitism of sclerotial fungi by *Teratosperma oligocladium*. Can. J. Microbiol. 27: 886-892.
- \_\_\_\_\_.; ADAMS, P. B. 1981b. *Sporidesmium sclerotivorum*: distribution and function in natural biological control of sclerotial fungi. Phytopathology 71: 90-93.
- BOLAÑOS, A. 2001. Introducción a la olericultura. San José, CR. EUNED. p. 281-301.
- BORNEMISZA, E. 1990. Problemas del azufre en suelos y cultivos de Mesoamérica. San José, C. R. Editorial de la Universidad de Costa Rica. p. 52.
- CASSERES, E. 1984. Producción de hortalizas. San José, CR. IICA. p. 238-254.
- CASTILLO, M. A.; ALBARRACIN, M. 2003. Evaluación de la técnica de solarización en el control de *Sclerotium cepivorum* Berk. causante de la podredumbre blanca del ajo (*Allium sativum* L.) In Congreso Alianza Tecnológica para la Agricultura con Calidad. San José, CR. Ed. Meléndez, G. p. 271.
- CNP (Consejo Nacional de Producción, CR). 2003a. Exportación de cebolla amarilla 2002, partida 0703101100 (en línea). San José, CR. Consultado 26 ago. 2003. Disponible en <http://www.mercanet.cnp.go.cr>

- CNP (Consejo Nacional de Producción, CR). 2003b. Estimaciones de la producción de Cebolla (en línea). Consultado 28 ago. 2003. Disponible en <http://www.mercanet.cnp.go.cr>
- COLEY SMITH, J. R. 1990. White rot disease of *Allium*: problems of soil-borne diseases in microcosm. *Plant Pathology* 39: 214-222.
- \_\_\_\_\_. 1990. White rot disease of *Allium*: problems of soil-borne diseases in microcosm. *Plant Pathology* 39: 214-222. *Fuente original*: PORTER, I. J. 1983. Soil solarization in Victoria for control of white rot in onions caused by *Sclerotium cepivorum*. In Proceedings of the Second International Workshop on allium white rot. Beltsville, USA. p. 118-125.
- \_\_\_\_\_. 1979. Survival of plant pathogenic fungi in soil in the absence of host plant. In soilborne plant pathogens. Eds. Schippers, B y Gams, W. New York, Academic Press. p. 39-57.
- \_\_\_\_\_.; KING, J. E. 1969. The production by species of *Allium* of alkyl sulphides and their effect on germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. *Ann. Appl. Biol.* 64: 289-301.
- \_\_\_\_\_.; COOKE, R.C. 1971. Survival and germination of fungal sclerotia. *Ann. Rev. Phytopathol* 9: 65-92.
- \_\_\_\_\_.; MITCHELL, C. M.; SANSFORD, C. E. 1990. Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. *Plant Pathology* 39: 58-69.
- COOK, R.J. 1979. Antagonism and biological control: concluding remarks. In Soilborne plant pathogens. Eds. Schippers, B y Gams, W. New York, Academic Press. p. 653-657.
- \_\_\_\_\_.; BAKER, K. F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Minnesota. APS Press. 539 p.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Minnesota. APS Press. 539 p. *Fuente original*: MERRIMAN, P. R.; SAMSON, I. M.; SCHIPPERS, B. 1981. Stimulation of germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* at different depths in soil by artificial onion oil. *Neth. Jour. Plant Pathol.* 87: 45-53.
- COTES, A. M. 2000. Biocontrol of fungal plant pathogens from discovery of potential biocontrol agents to implementation of formulated products. In 6<sup>th</sup> IOBC/WPRS-EFPP Biocontrol Workshop: Biocontrol agents modes of action and their interaction with other means of control. Sevilla, 30 nov-3 dic. p. 24.
- COUCH, B.C.; KOHN, L. M. 2000. Clonal spread of *Sclerotium cepivorum* in onion production with evidence of past recombination events. *Phytopathology* 90: 514-521.

- CROWE, F. J. 1995. White rot. *In* Compendium of onion and garlic diseases. Eds. H.F. Schwartz y S.K. Mohan. Minnesota. APS Press. p 14-16.
- CROWE, F. J.; HALL, D. H. 1980. Soil temperature and moisture effects on *Sclerotium* germination and infection of onion seedlings by *Sclerotium cepivorum*. *Phytopathology* 70:74-78.
- \_\_\_\_\_.; HALL, D. H.; GREATHEAD, A. S.; BAGHOTT. 1980. Inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and the incidence of white rot of onion and garlic. *Phytopathology* 70: 64-69.
- CHUPP, C.; SHERF, A.F. 1960. Vegetables diseases and their control. New York. Ronald Press Company. p. 393-394.
- DELGADILLO, F.; ZAVALA, E.; KAWASOE, S. O.; AREVALO, A.; GONZALEZ, V. A.; 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(4): 349-354. *Sólo resúmen*.
- De OLIVEIRA, V. L.; BELLEI, M. M.; BORGES, A. C. 1984. Control of white rot of garlic by antagonists fungi under controlled environmental conditions. *Can. J. Microbiol.* 30: 884-889.
- ESLER, G.; COLEY SMITH, J. R. 1983. Flavour and odour characteristics of species of *Allium* in relation to their capacity to stimulate germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Plant Pathology* 33: 13-22.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 1984. Resistance to *Sclerotium cepivorum* in *Allium* and other genera. *Plant Pathology* 33: 199-204. *Fuente original*. YOUNG, J.M.; ALLEN, J.D. 1969. *In vitro* infection and pathogenesis of plant from several genera by the specific soilborne pathogen *Sclerotium cepivorum*. *Plant Dis. Repr.* 53: 821-823.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 1984. Resistance to *Sclerotium cepivorum* in *Allium* and other genera. *Plant Pathology* 33: 199-204. *Fuente original*. MUKERJI, K.G. 1970. A new disease-white rot of *Zephyranthes* herb. *Science and Culture* 36: 163-165.
- FERGUSON, J. 1953. Factors in colonization of sclerotia by soil organisms. *Phytopathology* 43: 471.
- FLETCHER, J. T.; KNIGHT, B. C. 1971. The control of white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk.) in salad onions with dicloran. *Plant Pathology* 20: 88-92.
- GALLI, F.; TORRES DE CARVALHO, P. C.; TOKESHI, H.; BALMER, E.; KIMATI, H.; NOGUEIRA, C. O.; LIMA-SALGADO, C.; KRUGNER, T.; NOGUEIRA, E.; FILHO, A. B. 1980. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo, Editora Agronômica Ceres. Vol II. p. 57-58.

- GOMEZ, A. 2002. Análisis económico de la cebolla (en línea). San José, CR. Consultado 04 Jul. 2002. Disponible en <http://www.mercanet.go.cr>
- HARTMAN, G.; DATNOFF, L. 1997. Vegetable Crops. *In* Soilborne diseases of tropical crops. Eds R.J. Hillocks y J.M. Waller. CAB INTERNATIONAL. Cambridge, University Press. p.161-162.
- HOVIUS, M.; McDONALD, M. 2002. Management of allium white rot (*Sclerotium cepivorum*) in onions on organic soil with soil applied diallyl disulfide and *N*-propyl disulfide. Can. J. Pl. Pathol. 24(3): 281-286. *Sólo resumen*.
- HUNGER, S. A.; McLEAN, K. L.; EADY, C. C.; STEWART, A. 2002. Seedling infection assay for resistance to *Sclerotium cepivorum* in allium species (en línea). New Zealand Plant Protection 55:193-196. Consultado 04 mar. 2004. Disponible en <http://www.hortnet.co.nz/publications/nzpps>
- KAY, S. J.; STEWART, A. 1994. Evaluation of fungal antagonists for control of onion white rot in soil box trials. Plant Pathology 43: 371-377.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 1994. Evaluation of fungal antagonists for control of onion white rot in soil box trials. Plant Pathology 43: 371-377. *Fuente original*: GHAFAR, A. 1969. Biological control of white rot of onion I. Interactions of soil microorganisms with *Sclerotium cepivorum* Berk. Mycopathologia et Micologia Applicata 38: 101-111.
- LEGGETT, M. E.; RAHE, J. E. 1985. Factors affecting the survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* in the Fraser Valley of British Columbia. Ann. Appl. Biol. 106 : 255-263.
- LIFSHITZ, R.; TABACHNIK, M.; KATAN, J.; CHET, I. 1983. The effect of sublethal heating on sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. Can. J. Microbiol. 29: 1607-1610.
- LITTLE, E. R.; RAHE, J. E. 1984. Specific tolerance of *Sclerotium cepivorum* to dicarboximide fungicides. Plant Dis. 68: 371-374.
- LOCKE, S. B. 1968. Experimental control of onion white rot by means of soil chemicals. Plant Dis. Repr. 52(4): 272-276.
- LUCAS, J.A. 1998. Plant pathology and plant pathogens. 3 ed. Berlin. Blackwell Science Ltd. p.49.
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería, CR). Dirección de Mercadeo Agropecuario. 1984. Consideraciones generales del cultivo de la cebolla y su comercialización en Costa Rica. Serie Análisis No DAPM 2-84. San José, Costa Rica. 50 p.

- McLEAN, K. L.; STEWART, A. 2000. Application strategies for control of onion white rot by fungal antagonists. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 28: 115-122. *Sólo resumen*.
- \_\_\_\_\_; SWAMINATHAN, J.; STEWART, A. 2001. Increasing soil temperature to reduce sclerotial viability of *Sclerotium cepivorum* in New Zealand soils. *Soil Biol. Bioch.* 33(2): 137- 143.
- MESÉN, R. 1997. Efecto de tres sistemas de labranza y una enmienda sobre la densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* y el manejo de la pudrición blanca de cebolla en Costa Rica. Tesis Mag. Sc. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 115 p.
- \_\_\_\_\_. 1997. Efecto de tres sistemas de labranza y una enmienda sobre la densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* y el manejo de la pudrición blanca de cebolla en Costa Rica. Tesis Mag. Sc. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 115 p. *Fuente original:* ENWISTLE, A. 1992. Controlling allium white rot (*Sclerotium cepivorum*) without chemical. *Phytoparasitica España.* 20: 120-125.
- \_\_\_\_\_. 1997. Efecto de tres sistemas de labranza y una enmienda sobre la densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* y el manejo de la pudrición blanca de cebolla en Costa Rica. Tesis Mag. Sc. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 115 p. *Fuente original:* BONILLA, N. 1993. Evaluación de fungicidas para el combate químico del torbó. *In 10<sup>o</sup> Congreso Agronómico Nacional, San José, CR.* 180 p.
- METCALF, D. A.; WILSON, C. R. 1999. Histology of *Sclerotium cepivorum* infection of onion roots and the spatial relationships of pectinases in the infection process. *Plant Pathology* 48: 445-452.
- MORDUE, J. E. 1976. *Sclerotium cepivorum*. *In CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria.* Surrey, England. Commonwealth Mycological Institute. Set 42, No 512.
- OBREGON, M. 2001. Evaluación *in vitro* del poder antagónico de *Trichoderma harzianum* Rifai con respecto al hongo fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* Berkeley causante de la enfermedad "Torbó en cebolla". *In XLVII Reunión Anual del PCCMCA Resúmenes.* San José, Costa Rica. p. 19.
- OLIVEIRA, V. L.; BELLEI, M. M.; MENEZES-SOBRINHO, J.; FERREIRA, F. A. 1982. Ação antagônica de *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus* e *Penicillium* sp. sobre *Sclerotium cepivorum*, causador da podridão branca do alho. *Fitop. Bras.* 7(3): 531.
- ORTIZ, R. 1985. Solarización, materia orgánica y extracto de cebolla para el control de *Sclerotium cepivorum* en cebolla. *In XII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Resúmenes.* Guanajuato, México. p. 135.

- PAPAVIZAS, G. C.; LUMSDEN, R. D. 1980. Biological control of soilborne fungal propagules. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18: 389-413.
- PARIS, M. A.; COTES, A. M.; ELAD, Y.; KOLH, J.; SHTIENBERG, D. 2002. Evaluation of microbial isolates for control of *Sclerotium cepivorum* in onion. *In* Proceedings of 7<sup>th</sup> working group meeting. IOBC-WPRS Working Group "Biological control of fungal and bacterial plant pathogens". Kusadasi, Turkey. 25(10): 311-314. *Sólo resúmen.*
- PEYGHAMI, E. 2001. Antagonic effects of several isolates of *Trichoderma* on fungi causing onion root rot, East Azarbaijan Province. *Iranian Journal of Agricultural Sciences.* 32(4): 747-755. *Sólo resúmen.*
- PEREZ, M. L.; HERNANDEZ, V. O.; CANTU, G. F.; ROMERO, R. A. 2000. Alternativas para el manejo integral de la pudrición blanca *Sclerotium cepivorum* Berk. en ajo *Allium sativum* L. en la zona del Bajío, México. *In* XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Puerto Vallarta, Jalisco, México. p. L67.
- PESSOA, M. X.; MIRANDA, R. L.; McHUGH, B. A.; GONZALEZ, A.C.; BARRIENTOS, Z. M. 1998. Los efectos de la apertura comercial en los productores de cebolla del valle central y la zona alta de Cartago. Tesis Lic. Sociología. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 176 p.
- PINTO, C. M. F.; MAFFIA, L. A.; BERGER, R. D.; MIZUBUTI, E. S. G.; CASALI, V. W. D. 1998. Progress of white rot on garlic cultivars planted at different times. *Plant Dis.* 82 : 1142-1146.
- RAI, J. N.; SAXENA, V. C. 1975. Sclerotial mycoflora and its role in natural biological control of "white rot" disease. *Plant and Soil* 43: 509-513.
- RAMIREZ, A.; ZAVALA, E.; KAWASOE, S.O.; SANCHEZ, M.; VALDEZ, J. 2002. A possible role for *Rhizoglyphus robustus* Nesbitt (Astigmata: Acaridae) in transmission of *Sclerotium cepivorum* Berk. (Deuteromycetes: Mycelia Sterilia). *Appl. Entomol. Zool.* 37(4): 663-669. *Sólo Resúmen.*
- REDDY, M. S.; RAHE, J. E.; LEVESQUE, C. A. 1992. Influence of onion seed bacterization on germination and mycosphere microflora of *Sclerotium cepivorum* sclerotia. *Can. J. Microbiol.* 38: 1135-1143.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 1992. Influence of onion seed bacterization on germination and mycosphere microflora of *Sclerotium cepivorum* sclerotia. *Can. J. Microbiol.* 38: 1135-1143. *Fuente original.* IKESHOJI, T. 1984. S-propenylcysteine sulfoxide in exudates of onion roots and its possible compartmentalization in root cells by bacteria into attractant of onion maggot, *Hylemya antiqua* (Diptera: Anthomyiidae). *Appl. Entomol. Zool.* 19: 159-169.



- RESENDE, M. L.; ZAMBOLIN, L. 1987. Flutuação populacional de escleródios de *Sclerotium cepivorum* no solo, em função do tratamento com diferentes fungicidas no plantio do alho. Fitopatol. Bras. 12: 65-70.
- RESENDE, M. L.; ZAMBOLIN, L.; DA CRUZ, J. 1987. Eficiência de fungicidas no controle da podridão branca do alho (*Allium sativum*), de acordo com o nível de escleródios de *Sclerotium cepivorum* no solo. Fitopatol. Bras. 12: 71-78.
- ROMERO, C.S. 1993. Hongos fitopatogénos. Ed. por L. Tress. México, Universidad Autónoma de Chapingo. p. 342.
- SMOLINSKA, U.; DYKI, B. 2002. Viability and micromorphology of *Sclerotium cepivorum* sclerotia in field soil after addition of *Brassica juncea* and *Brassica napus* plant residues. Phytopathologia Polonica. 23: 39-51. *Sólo resúmen*.
- SOMERVILLE, P.A.; HALL, D.H. 1987. Factors affecting sclerotial germination of *Sclerotium cepivorum*, secondary sclerotia formation and germination stimulants to reduce inoculum density. Plant Dis. 71: 229-233.
- STONE, H. E.; ARMENTROUT, V. N. 1985. Production of oxalic acid by *Sclerotium cepivorum* during infection of onion. Mycologia. 77(4) : 526-530.
- THANING, C.; GERHARDSON, B. 2001. Reduced sclerotial soil longevity by whole crop amendment and plastic covering. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 108(2): 143-151. *Sólo resúmen*.
- TSIGBEY, F. K.; NUTSUGAH, S. K. 1999. *Gliocladium catenulatum* in association with *Sclerotium cepivorum* on onion leaves in Ghana. Plant Dis. 83: 198.
- UNA-IRET (Universidad Nacional – Instituto regional de estudios en sustancias tóxicas, CR). 1999. Manual de plaguicidas : guía para América Central. 2ed. Heredia, CR. p. 97.
- UTKHEDE, R. S.; RAHE, J. E. 1978a. Screening commercial onion cultivars for resistance to white rot. Phytopathology 68: 1080-1083.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. 1978b. Screening world onion germplasm collection for resistance to white rot. Can. J. Plant. Sci. 58: 819-822.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. 1983a. Chemical and biological control of onion white rot in muck and mineral soils. Plant Dis. 67: 153-155.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. 1983b. Interactions of antagonist and pathogen in biological control of onion white rot. Phytopathology 73: 890-893.

VILLAR, A. C.; ZAVALETA, E.; GARCIA, R. 1990. Efecto de la incorporación de residuos de crucíferas (*Brassicae*) sobre fitopatógenos de suelo. II Efecto de la incorporación de col y brócoli sobre la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla, bajo condiciones de invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología 8: 160-165.

\_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 1990. Efecto de la incorporación de residuos de crucíferas (*Brassicae*) sobre fitopatógenos de suelo. II Efecto de la incorporación de col y brócoli sobre la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla, bajo condiciones de invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología. 8: 160-165. *Fuente original* : BAILEY, D. M.; BAZINET, M.; DRISCOLL, J.; McCARTHY, A. 1961. The volatile sulfur components of cabbage. J. Fd. Sci. 26: 163-170.

\_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 1990. Efecto de la incorporación de residuos de crucíferas (*Brassicae*) sobre fitopatógenos de suelo. II Efecto de la incorporación de col y brócoli sobre la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla, bajo condiciones de invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología. 8: 160-165. *Fuente original* : CLAPP, R. C.; LONG, J.; DATEO, G.; BISSETT, F. H.; HASSELSTROM. 1959. The volatile isothiocyanates in fresh cabbage. J. Amer. Chem. Soc. 81: 6278-6281.

WALKER, J. C. 1969. Plant pathology. 3 ed. New York, Mc Graw-Hill. p. 345-347.

WEBER, G. F. 1973. Bacterial and fungal diseases of plants in the tropics. Gainesville, University of Florida Press. p. 369.

## **CAPITULO PRIMERO**

**Aislamiento e identificación de hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. causante de la pudrición blanca de la cebolla, en la zona alta de Cartago, Costa Rica.**

## INTRODUCCIÓN

La pudrición blanca o torbó, causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* es una de las enfermedades más limitantes del cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.) en la zona alta de Cartago; la cual se sitúa como la principal zona productora del país, con el 73,48% del total en el año 2002 [CNP (Consejo Nacional de la Producción, CR), 2003] .

El hongo ataca los bulbos, las raíces y el follaje de plantas adultas, aunque puede afectar desde el estado de plántula. El problema se presenta principalmente en el campo; sin embargo, en caso de que los bulbos sean infectados en las últimas etapas de su desarrollo, se produce una pudrición suave durante el almacenamiento (Romero, 1993; Agrios, 1996).

El combate de esta enfermedad es difícil y las estrategias utilizadas actualmente son poco efectivas. La rotación de cultivos no es eficaz, no se cuenta con variedades resistentes y el combate químico utilizado por la totalidad de los productores no funciona, ya que no es posible una adecuada cobertura de los sitios de infección (base del bulbo) y ninguno de los fungicidas aplicados hasta el momento es eficaz en disminuir la densidad de inóculo; además, este tipo de manejo provoca la presencia de residuos sobre las partes comestibles y contaminación ambiental, debido a las altas dosis utilizadas. Por esto, muchos agricultores han cambiado de cultivo en forma definitiva o continúan sembrando en terrenos totalmente infestados, lo que les representa altos costos de producción y grandes pérdidas de cosecha (Coley-Smith, 1990; Mesén, 1997; Pinto *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2000).

Debido a la importancia económica del cultivo, a la ineficacia de los métodos de combate tradicionales y a que la producción de cebolla se orienta básicamente al consumo fresco; la posibilidad del combate biológico para el manejo de la pudrición blanca se perfila como una alternativa viable. De hecho, en otros países se han identificado tanto hongos como bacterias con potencial de control (Ghaffar, 1969; citado por Kay y Stewart, 1994).

De Oliveira *et al.* (1984) consideran que la introducción de antagonistas en el suelo es una alternativa no química de control para hongos que forman esclerocios; pero mencionan que una de las limitantes de esta técnica es la adaptación inadecuada de los microorganismos a las condiciones ecológicas propias de una determinada región, lo que puede disminuir la eficiencia del agente antagónico. Al respecto, Rai y Saxena (1975) mencionan que la microflora nativa existente en el suelo representa un control biológico natural para estos patógenos, los cuales pueden ser afectados por antibiosis, competencia o hiperparasitismo, reduciendo el inóculo potencial presente en el suelo.

En Costa Rica, no se ha realizado investigación sobre qué géneros de hongos antagónicos a *Sclerotium cepivorum* se encuentran en forma natural en las áreas productoras de cebolla, los cuales podrían estar controlando naturalmente la pudrición blanca. Los objetivos del presente estudio fueron: 1) aislar y hacer recuentos de hongos, bacterias y actinomicetes presentes en suelos dedicados a la producción de cebolla y 2) aislar e identificar los hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum* en la zona alta de Cartago.

## MATERIALES Y METODOS

Se muestrearon 10 fincas de la zona alta de Cartago y cada una se dividió en tres áreas de acuerdo con el nivel de incidencia histórica de la enfermedad, la cual se determinó con base en la experiencia del agricultor en los últimos 5 a 10 años. Se denominó como área roja el sector en que se ha presentado permanentemente el mayor nivel de incidencia de pudrición blanca, área anaranjada aquella que se considera de incidencia intermedia y área verde donde la incidencia ha sido baja o nula (Información general de las fincas en Anexo 2.).

### 1. Trampeo.

En cada finca se colocaron 75 esclerocios<sup>1</sup> a una profundidad entre 10 y 20 cm, divididos en tres grupos (25 esclerocios / grupo), uno en cada área de incidencia. Para esto, se utilizó bolsas confeccionadas con medias nylon, a las cuales se añadieron los esclerocios y se cerraron con hilo del mismo material. Luego se llevaron al campo y se colocaron en el sitio de muestreo sujetas con una estaca que sirvió como localizador.

Los esclerocios permanecieron enterrados durante 1 mes, luego se sacaron las bolsas de nylon y se colocaron en una bolsa plástica y en una hielera para ser transportados hasta el laboratorio, donde se procedió, con ayuda de un estereoscopio, a tomar los esclerocios para cultivarlos en PDA. Se observaron a los 2, 4, 7 y 14 días de incubación a 25 C, tiempo durante el cual se hizo el recuento e identificación de los hongos presentes (Anexo 3.).

---

<sup>1</sup> Se tomó micelio de plantas enfermas y se cultivó en papa-dextrosa-agar (PDA), se mantuvo a 24 C y 80 % de humedad relativa por aproximadamente 15 días, tiempo suficiente para la producción de gran cantidad de esclerocios.

## **2. Muestreo de plantas enfermas.**

Se colectaron plantas que presentaban síntomas y signos claros de la enfermedad y se examinaron los bulbos con apoyo de un estereoscopio. Se tomaron los esclerocios con signos de colonización que se encontraron en los bulbos enfermos y se procedió de la misma forma que en el caso anterior.

## **3. Análisis complementarios**

### **3.1. Cuantificación de la densidad de inóculo**

Este análisis se realizó para determinar la cantidad de esclerocios por gramo de suelo presentes en cada una de las áreas de incidencia señaladas anteriormente.

En cada área se tomaron 5 muestras de suelo de 20 gramos cada una, en 5 puntos de muestreo seleccionados al azar para conformar una muestra global de 100 gramos. Las muestras se tomaron con un barreno cilíndrico de 2 cm de diámetro, se colocaron en bolsas plásticas transparentes y se llevaron en una hielera hasta el laboratorio donde se procedió a extraer los esclerocios de acuerdo con la metodología propuesta por Vimard *et al.* (1986).

### **3.2. Análisis Microbiológico**

Este análisis permitió cuantificar las poblaciones de microorganismos en el suelo. Las muestras fueron tomadas de igual forma que en el punto anterior y llevadas al laboratorio donde se procedió a realizar series de diluciones para aislamiento de bacterias (aeróbicas y anaeróbicas), hongos, actinomicetes y levaduras. Se incubó por 48 horas a 30 C para el crecimiento de colonias bacterianas, por 7 días a 26 C y 80% de humedad relativa para el crecimiento de colonias de hongos y levaduras, y por 7 días a 30 C para el crecimiento de actinomicetes. Luego de ese período se hizo el recuento de las colonias desarrolladas y se estimó la población de cada organismo.

### 3.3. Análisis químico sencillo, de textura y determinación de materia orgánica

Se tomaron muestras de suelo de la misma forma que en los puntos 3.1 y 3.2, pero con la diferencia de que en cada punto de muestreo se tomó 100 g para una muestra total de 500 g, luego se llevaron al Laboratorio de Suelos y Foliar del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica, donde se realizaron los análisis respectivos.



## RESULTADOS

Es importante aclarar que en las fincas 5 y 6 sólo se presentan datos del área de baja incidencia de la enfermedad (área verde), ya que de acuerdo con la información proporcionada por los agricultores, estas fincas nunca han presentado niveles de incidencia intermedios o altos; por el contrario, para la finca 10, sólo se indican datos del área de alta incidencia (área roja), debido a que no se tiene historial de los otros niveles.

### 1. Trampeo<sup>2</sup>.

Al observar los esclerocios, se pudo notar diferencias en la condición de los mismos; de acuerdo con esto se clasificaron en 5 categorías que se describen a continuación: 1) enteros, aquellos que permanecían completos y de consistencia compacta; 2) suaves, aquellos que se encontraban enteros pero de consistencia blanda; 3) cáscara, esclerocios que parecían enteros pero que internamente estaban vacíos; 4) mitades, cuando se hallaba sólo la mitad de un esclerocio y 5) restos, se refiere a trozos de esclerocios.

El Cuadro 1 resume la frecuencia (en porcentaje) en la que se encontró cada una de las categorías descritas arriba, de acuerdo con la incidencia de la enfermedad en el campo.

**Cuadro 1.** Porcentaje de esclerocios por categoría y por nivel de incidencia de la enfermedad, luego de permanecer enterrados un mes, en 10 fincas dedicadas al cultivo de la cebolla en la zona alta de Cartago.

Categoría	Área de incidencia		
	BAJA (Verde)	INTERMEDIA (Anaranjada)	ALTA (Roja)
Enteros	71,50	80,12	87,40
Suaves	4,67	2,34	0,00
Cáscara	18,69	12,28	3,94
Mitades	0,00	0,00	0,79
Restos	4,67	4,68	7,09

<sup>2</sup> Este procedimiento corresponde a un muestreo y no a un ensayo, por lo que, procede realizar una distribución de frecuencias de las categorías seleccionadas y no es aplicable un análisis estadístico de datos para determinar diferencias significativas entre categorías.

En este cuadro se nota que en el área de incidencia baja fue en la que se presentó el menor porcentaje de esclerocios de la categoría enteros y los porcentajes más altos de esclerocios en las categorías suaves y cáscara.

Después de realizar los cultivos de los esclerocios o partes de ellos, se hizo la identificación y el recuento del total de hongos aislados. Los géneros identificados fueron: *Alternaria* sp., *A. radicina*, *Fusarium* sp., *F. roseum*, *Gliocladium* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* spp., *Rhizoctonia* sp., *Rhizopus* sp., *Sclerotium cepivorum* y *Trichoderma* spp.

La frecuencia de aparición de cada género de acuerdo con el nivel de incidencia de la enfermedad y con la categoría se muestra en los cuadros 2, 4 y 5.

**Cuadro 2.** Frecuencia de aparición (ufc\*) de cada género identificado en el área de baja incidencia de la enfermedad (área verde), según la categoría de los esclerocios recuperados, luego de permanecer enterrados un mes en 10 fincas productoras de cebolla en la zona alta de Cartago.

Género	Categoría			
	Entero	Suaves	Cáscara	Restos
<i>Alternaria radicina</i>	1	0	0	0
<i>Alternaria</i> sp.	2	0	0	0
<i>Fusarium</i> sp.	15	2	4	3
<i>Fusarium roseum</i>	31	2	4	0
<i>Gliocladium</i> sp.	3	3	6	0
<i>Mucor</i> sp.	7	0	2	0
<i>Penicillium</i> sp.	53	0	11	4
<i>Rhizopus</i> sp.	4	0	3	0
<i>Sclerotium cepivorum</i>	6	1	1	0
<i>Trichoderma</i> sp.	24	2	12	2

\*ufc : Unidades formadoras de colonia

El género que se encontró con mayor frecuencia en el área verde fue *Penicillium* sp. (68 ufc), seguido de *Trichoderma* spp. (40 ufc) y *Fusarium roseum* (37 ufc).

Se debe recalcar que el género *Trichoderma* fue identificado en todas las categorías del área de incidencia baja o nula y que *Gliocladium* sp. apareció en tres de las

cuatro categorías en esta área, pero no fue posible recuperarlo en las áreas de incidencia intermedia o alta, como se muestra en los cuadros 4 y 5.

El Cuadro 3. indica con mayor detalle, los sitios en que fueron aislados y la frecuencia de aparición de los géneros *Trichoderma* y *Gliocladium*.

**Cuadro 3.** Frecuencia de aparición (ufc) de los géneros *Trichoderma* y *Gliocladium*, de acuerdo a su procedencia (número de finca) y a la categoría de los esclerocios recuperados, luego de permanecer enterrados un mes en 10 fincas productoras de cebolla en la zona alta de Cartago.

Género	Finca	ufc	Area de Incidencia	Categoría del esclerocio
<i>Gliocladium</i> sp.	5	12	verde	entero, suaves y cáscara
<i>Trichoderma</i> spp.	9	11	verde	entero
		5	verde	cáscara
	6	9	verde	entero
		7	verde	cáscara
		2	verde	suaves
	3	4	verde	entero
1	2	verde	restos	

Tanto en el área de incidencia intermedia (Cuadro 4.) como en el área de alta incidencia de la enfermedad (Cuadro 5.) el género *Penicillium* es el que se presenta con mayor frecuencia (112 ufc y 73 ufc respectivamente), mientras que la frecuencia de aparición de los hongos *Gliocladium* sp. y *Trichoderma* spp. fue nula en esas áreas.

**Cuadro 4.** Frecuencia de aparición (ufc) de cada género identificado en el área de incidencia intermedia de la enfermedad (área anaranjada), según la categoría de los esclerocios recuperados, luego de permanecer enterrados un mes en 10 fincas productoras de cebolla en la zona alta de Cartago.

Género	Categoría			
	Entero	Suaves	Cáscara	Restos
<i>Alternaria radicina</i>	0	0	0	0
<i>Alternaria sp.</i>	0	0	5	0
<i>Fusarium sp.</i>	17	0	2	1
<i>Fusarium roseum</i>	21	0	0	1
<i>Gliocladium sp.</i>	0	0	0	0
<i>Mucor sp.</i>	5	1	3	1
<i>Penicillium sp.</i>	91	1	14	6
<i>Rhizopus sp.</i>	7	1	0	0
<i>Sclerotium cepivorum</i>	5	0	0	0
<i>Trichoderma spp.</i>	0	0	0	0

Es importante hacer notar que, 21 de las 112 ufc de *Penicillium sp.* corresponden a la finca 9.

**Cuadro 5.** Frecuencia de aparición (ufc) de cada género identificado en el área de alta incidencia de la enfermedad (área roja), según la categoría de los esclerocios recuperados, luego de permanecer enterrados un mes en 10 fincas productoras de cebolla en la zona alta de Cartago.

Género	Categoría			
	Entero	Suaves	Cáscara	Restos
<i>Alternaria radicina</i>	0	0	0	1
<i>Alternaria sp.</i>	0	0	0	0
<i>Fusarium sp.</i>	26	0	1	4
<i>Fusarium roseum</i>	12	0	0	0
<i>Gliocladium sp.</i>	0	0	0	0
<i>Mucor sp.</i>	0	0	0	0
<i>Penicillium sp.</i>	65	0	3	5
<i>Rhizoctonia sp.</i>	0	0	0	1
<i>Rhizopus sp.</i>	11	0	1	0
<i>Sclerotium cepivorum</i>	8	0	0	0
<i>Trichoderma sp.</i>	0	0	0	0

En los cuadros 2, 4 y 5 no se incluyó la categoría "Mitades", puesto que solamente apareció una colonia de *Penicillium* sp. en el área de incidencia alta.

## 2. Muestreo de plantas enfermas

Se presentan los resultados de 5 de las 10 fincas estudiadas ya que al momento del muestreo en algunas fincas no se encontró la enfermedad o en las plantas enfermas no se habían formado aún los esclerocios. Se cultivó un mínimo de 20 esclerocios por finca aunque el número de bulbos analizados varió de una finca a otra.

Los géneros encontrados fueron *Penicillium* sp. (28), *Fusarium* sp. (10), *Sclerotium cepivorum* (6) *Fusarium roseum* (5), *Rhizopus* sp. (5), *Pythium* sp. (4), *Trichoderma* sp. (4), *Mucor* sp. (3) y *Monilia* sp. (1). Los números entre paréntesis indican la cantidad de ufc que se desarrollaron. Todas las colonias de *Trichoderma* sp. fueron recuperadas de la finca 3.

## 3. Análisis complementarios

### 3.1. Cuantificación de la densidad de inóculo.

La mayor cantidad de esclerocios se encontró en el área intermedia de la finca 8 (0.16 esclerocios/ gramo de suelo seco); seguida de la finca 7 en la que se recuperaron esclerocios en todas las áreas, como se puede ver en el Cuadro 6.

**Cuadro 6.** Densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* (esclerocios/g de suelo seco), de acuerdo a las áreas de incidencia de la enfermedad en 10 fincas, dedicadas al cultivo de la cebolla en la zona alta de Cartago.

No de finca	Areas de incidencia		
	Baja (Verde)	Intermedia ( Anaranjada)	Alta (Roja)
Esclerocios/g de suelo seco			
1	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,05
3	0,00	0,06	0,05
4	0,05	0,00	0,00
5	0,00	nd	nd
6	0,00	nd	nd
7	0,10	0,09	0,05
8	0,00	0,16	nd
9	0,00	0,05	nd
10	nd	nd	0,05

nd: No dato.

### 3.2. Análisis microbiológico

Las poblaciones más altas de microorganismos se recuperaron en el área intermedia (Cuadros 7, 8 y 9). Así, la mayor población de hongos fue de  $5,4 \times 10^5$  ufc/ gramo de suelo húmedo, encontrada en la finca 3, el valor más alto de bacterias anaeróbicas fue recuperado en la finca 9 ( $2,3 \times 10^6$  ufc/ gramo de suelo húmedo), los actinomicetes se presentaron en mayor cantidad en la finca 8 ( $3,6 \times 10^5$  ufc/ gramo de suelo húmedo) y las levaduras ( $2,9 \times 10^6$  ufc/ gramo de suelo húmedo) en la finca 1. Solamente el valor de las bacterias aeróbicas ( $3,9 \times 10^8$  ufc/ gramo de suelo húmedo) fue mayor en el área verde (finca 4).

De la población total de hongos por finca, en el área verde, se debe hacer notar que en las fincas 3 y 6 se encontró  $3,3 \times 10^3$  ufc/g y  $2,7 \times 10^4$  ufc/g de *Trichoderma* sp. respectivamente.

En la finca 5 se recuperó una población de  $1,7 \times 10^4$  ufc/g de *Gliocladium* sp. y en la finca 9 la misma población pero de *Paecilomyces* sp.

**Cuadro 7.** Población (ufc/g de suelo húmedo) promedio de microorganismos presentes en el suelo de las áreas de baja incidencia de la enfermedad (área verde) de las 10 fincas estudiadas, dedicadas al cultivo de la cebolla en la zona alta de Cartago.

No de finca	pH	Hongos	Bacterias		Actinomicetes	Levaduras
			Aeróbicas	Anaeróbicas		
1	5,23	$1.4 \times 10^5$	$2.0 \times 10^7$	$2.5 \times 10^5$	$9.7 \times 10^4$	$6.7 \times 10^3$
2	4,70	$3.3 \times 10^4$	$3.3 \times 10^7$	0,00	$2.5 \times 10^5$	0,00
3	5,13	$9.0 \times 10^4$	$5.0 \times 10^7$	$5.3 \times 10^4$	$2.7 \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$
4	4,93	$2.3 \times 10^5$	$3.9 \times 10^8$	$8.8 \times 10^5$	0,00	$3.3 \times 10^3$
5	5,22	$3.7 \times 10^4$	$3.3 \times 10^6$	0,00	$1.9 \times 10^5$	$1.0 \times 10^4$
6	4,39	$7.3 \times 10^4$	$8.3 \times 10^7$	$1.7 \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$	$3.3 \times 10^3$
7	5,29	$5.0 \times 10^4$	$1.3 \times 10^8$	$>10^5$	$1.0 \times 10^4$	$2.5 \times 10^5$
8	5,62	$8.0 \times 10^4$	$4.7 \times 10^7$	$3.6 \times 10^5$	$1.20 \times 10^5$	0,00
9	5,28	$7.0 \times 10^4$	$2.3 \times 10^7$	$1.0 \times 10^6$	$8.7 \times 10^4$	$1.2 \times 10^5$
10	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<b>Promedio</b>	<b>5,08</b>	<b><math>9,2 \times 10^4</math></b>	<b><math>8,7 \times 10^7</math></b>	<b><math>4,0 \times 10^5</math></b>	<b><math>8.9 \times 10^4</math></b>	<b><math>4,6 \times 10^4</math></b>

En las fincas 7 y 9 (área intermedia) se recuperaron poblaciones de *Penicillium* sp. y *Trichoderma* sp. de  $6,0 \times 10^4$  y  $3,3 \times 10^3$  ufc/g, respectivamente. En la finca 7, área roja, se recuperó  $1,0 \times 10^4$  ufc/g de *Trichoderma* sp.

En las fincas 8 y 9 no se presentan los datos, ya que fue imposible tomar las muestras de suelo.

**Cuadro 8.** Población (ufc/g de suelo húmedo) promedio de microorganismos presentes en el suelo de las áreas de incidencia intermedia de la enfermedad (área anaranjada) de las 10 fincas estudiadas, dedicadas al cultivo de la cebolla en la zona alta de Cartago.

No de finca	pH	Hongos	Bacterias		Actinomicetes	Levaduras
			Aeróbicas	Anaeróbicas		
1	5,23	$8.0 \times 10^4$	$3.7 \times 10^7$	$>10^5$	0,00	$2.9 \times 10^5$
2	5,05	$1.0 \times 10^5$	$3.0 \times 10^7$	$1.1 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$	0,00
3	5,26	$5.4 \times 10^5$	0,00	$2.3 \times 10^4$	$5.3 \times 10^4$	$2.7 \times 10^4$
4	5,15	$1.4 \times 10^5$	$2.2 \times 10^8$	$1.9 \times 10^5$	$9.7 \times 10^4$	0,00
5	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7	4,83	$1.2 \times 10^5$	$9.7 \times 10^7$	$4.0 \times 10^5$	$8.0 \times 10^4$	$7.0 \times 10^4$
8	5,76	$5.3 \times 10^4$	$3.3 \times 10^7$	$4.2 \times 10^5$	$3.6 \times 10^5$	0,00
9	5,06	$6.0 \times 10^4$	$3.3 \times 10^7$	$2.3 \times 10^6$	$6.7 \times 10^3$	$1.7 \times 10^5$
10	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<b>Promedio</b>	<b>5,19</b>	<b><math>1.6 \times 10^5</math></b>	<b><math>6,4 \times 10^7</math></b>	<b><math>6,3 \times 10^5</math></b>	<b><math>1.0 \times 10^5</math></b>	<b><math>8.0 \times 10^4</math></b>

**Cuadro 9.** Población (ufc/g de suelo húmedo) promedio de microorganismos presentes en el suelo de las áreas de alta incidencia de la enfermedad (área roja) de las 10 fincas estudiadas, dedicadas al cultivo de la cebolla en la zona alta de Cartago.

No de finca	pH	Hongos	Bacterias		Actinomicetes	Levaduras
			Aeróbicas	Anaeróbicas		
1	5,39	$6.0 \times 10^4$	$2.0 \times 10^7$	0,00	$2.4 \times 10^5$	0,00
2	4,60	$1.3 \times 10^5$	$1.8 \times 10^8$	$2.0 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	$5.0 \times 10^3$
3	5,24	$2.1 \times 10^5$	$3.0 \times 10^7$	$2.2 \times 10^5$	$5.3 \times 10^4$	$1.7 \times 10^4$
4	5,13	$1.6 \times 10^5$	$2.3 \times 10^7$	$1.0 \times 10^5$	$8.0 \times 10^4$	$7.3 \times 10^4$
5	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7	5,16	$8.7 \times 10^4$	$7.3 \times 10^7$	$6.3 \times 10^4$	0,00	$1.7 \times 10^4$
8	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10	5,50	$6.7 \times 10^4$	$3.7 \times 10^7$	$1.1 \times 10^6$	0,00	$1.3 \times 10^4$
<b>Promedio</b>	<b>5,17</b>	<b><math>1.2 \times 10^5</math></b>	<b><math>6,0 \times 10^7</math></b>	<b><math>2.5 \times 10^5</math></b>	<b><math>8.0 \times 10^4</math></b>	<b><math>2,1 \times 10^4</math></b>



### 3.3. Análisis químico sencillo, de textura y determinación de materia orgánica.

Según los datos del Anexo 4, la mayoría de las fincas presentan valores de pH inferiores a 5,5; además, en el área verde de dos fincas, se presentan valores medios de acidez intercambiable (finca 2 con 0,87 y finca 6 con 1,14 cmol(+)/L).

La capacidad de intercambio catiónico (CICE) se encuentra en el ámbito intermedio (5,0 a 25 cmol(+)/L) en todas las fincas y áreas de incidencia.

El % de materia orgánica más alto se encontró en la finca 3 en todas las áreas (9,86%), mientras que en el área verde de la finca 5 se encontró la menor cantidad (1,31%) y fue precisamente en esta área donde se recuperó el género *Gliocladium*, tanto en la etapa de trampeo como en el análisis microbiológico de suelos.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la cuantificación de la densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum*, en la mayoría de los casos, concuerda con las observaciones realizadas por los agricultores, por lo que se podría decir que la selección de "áreas de incidencia" fue la correcta; excepto en la finca 7, donde el productor señaló de forma errada estas áreas, lo que se puede corroborar con el Cuadro 6, donde se nota que la mayor cantidad de esclerocios por gramo de suelo se encontró en el área de baja incidencia de la enfermedad y la menor cantidad en el área de alta incidencia; además, cuando se realizó el recorrido en el campo, se pudo observar mayor enfermedad en el área que el agricultor había catalogado como de baja incidencia.

No se detectó ningún esclerocio en las zonas de Bagaces y Santa Ana (Anexo 5), lo que en parte confirma el hecho de que en estas áreas de producción nunca se ha presentado la enfermedad.

De acuerdo con Adams y Papavizas (1971) se conoce poco acerca del nivel de inóculo de patógenos de suelo requerido para producir enfermedad, sin embargo, encontraron que 5 esclerocios / g de suelo pueden causar una cantidad apreciable de pudrición blanca. Por otro lado, en 1980, Crowe y colaboradores informaron que densidades entre 0.01 y 0.1 esclerocios por gramo de suelo pueden provocar entre 85 y 100% de incidencia y que densidades superiores a 1 esclerocio / g de suelo resultan en la muerte inmediata después de la emergencia de las plántulas; aunque mencionan que el porcentaje de plantas enfermas aumenta con incrementos en la densidad del inóculo. También citan que no se conoce con exactitud la relación entre estos factores.

Es importante tomar en cuenta que las variaciones en la densidad del inóculo pueden deberse en gran parte a la capacidad de sobrevivencia de los esclerocios, la que depende entre otras cosas de la degradación microbiológica y las condiciones físicas del suelo (Coley-Smith *et al.*, 1990). Desde muchas décadas atrás, se ha tratado de identificar cuáles hongos son capaces de colonizar y degradar esclerocios; Ferguson, en 1953, encontró que algunas especies de los géneros *Penicillium* y *Trichoderma* eran capaces de

colonizar esclerocios vivos, treinta años después Oliveira *et al.* (1982) encontraron que los hongos *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus* y *Penicillium* sp. mostraron ser antagonistas *in vitro*. En 1999, Tsigbey y Nutsugah, mencionan que *Gliocladium catenulatum* suprime por completo el crecimiento y la formación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*. Además, Obregón (2001) informa que existe un efecto antagónico *in vitro* de *Trichoderma harzianum* sobre el patógeno. En esta investigación se recuperaron e identificaron todos los géneros mencionados, aunque hasta el momento no se conoce el grado de antagonismo que pueden ejercer en nuestras condiciones.

*Penicillium* spp. fue recuperado en todas las áreas de incidencia de la enfermedad, tanto en el trapeo como en el análisis microbiológico y prácticamente en todas las categorías de esclerocio (Cuadros 2, 4 y 5), mientras que para los géneros *Trichoderma* y *Gliocladium* existe mayor especificidad en cuanto al sitio de hallazgo, lo que sugiere una relación más estrecha con el nivel de la enfermedad, como se discutirá más adelante. Por su parte, *Paecilomyces* no se encontró en la etapa de trapeo, solamente en el análisis microbiológico y en una finca (finca 9), esto indica que probablemente no esté cumpliendo un rol importante como antagonista en este caso.

De acuerdo a los cuadros 2, 4 y 5 la viabilidad de los esclerocios es muy similar en las tres áreas de incidencia de la enfermedad, pero se nota una diferencia de acuerdo a su condición, así, todos los propágulos que lograron germinar pertenecen a la categoría enteros, excepto uno en la categoría suaves y otro en la categoría cáscara del área de baja incidencia (área verde). Se debe recalcar que, en el área verde se presentó el menor porcentaje de esclerocios en la categoría enteros y los porcentajes más altos en las categorías suaves y cáscara (Cuadro 1). Además, como se observa en el Cuadro 2, en esta área se recuperó la mayor cantidad de esclerocios colonizados por *Trichoderma* y *Gliocladium*; lo anterior, aunado al hecho de que estos géneros prácticamente no fueron recuperados en las áreas de incidencia intermedia y alta (Cuadros 4 y 5), indica que la baja incidencia puede deberse a la presencia de estos hongos. Al respecto, Chet y Baker (1981) encontraron un comportamiento similar en un suelo supresor natural de *Rhizoctonia solani*, al hallar que la densidad de inóculo del patógeno fue inversamente proporcional a la de *Trichoderma harzianum*.

Los hongos *Trichoderma* y *Gliocladium* posiblemente se estén desarrollando en condiciones más favorables en esta área, debido a que tienen menor competencia por sustrato y espacio, como se nota en el análisis microbiológico presentado en el Cuadro 7, que cuantificó, para esta área, la menor población de hongos por gramo de suelo, y aunque se midió la mayor población de bacterias aeróbicas, éstas pueden estar asociadas a la desintegración de los esclerocios, ya que de acuerdo con observaciones no publicadas en la etapa de trampeo, se pudo notar que algunos esclerocios de esa área estaban colonizados por bacterias que provocaron su debilitamiento, situación que pudo ser aprovechada por estos hongos para colonizar los esclerocios, como lo anotan Coley-Smith y Cooke (1971).

Los mismos autores indican que la sobrevivencia de esclerocios de muchos hongos es afectada por el estado nutricional del suelo, sobre todo de su contenido de materia orgánica, mientras que el pH no tiene un efecto pronunciado. Sin embargo, para el caso de los antagonistas es diferente, de acuerdo con Kubicek-Pranz (1998), aunque existen pocos estudios detallados sobre el efecto del pH en el crecimiento de *Trichoderma* y *Gliocladium* en condiciones naturales, mencionan que generalmente el crecimiento es óptimo en un rango de pH entre 4 y 6,5. En este estudio los promedios generales, para los valores de pH, de las tres áreas de incidencia de la enfermedad se mantienen en este ámbito, lo que indica por un lado, la posibilidad de crecimiento y desarrollo favorable de estos antagonistas y por otro, la existencia de problemas de acidez, desde el punto de vista nutricional para el cultivo.

Por otro lado, Lyda (1984) cita que algunos patógenos no se establecen debido a la presencia de iones tóxicos como el aluminio en la solución del suelo. Indica que *Sclerotinia sclerotiorum* presenta tolerancia al Al, ya que creció de forma abundante y produjo gran cantidad de esclerocios en un medio con 32µg Al/ml. Aparentemente, este hongo tiene un mecanismo de detoxificación de aluminio por medio de la secreción de ácido oxálico y otros ácidos, situación que podría estar ocurriendo también con *Sclerotium cepivorum*, que como apuntan Stone y Armentrout (1985) produce ácido oxálico durante la invasión de las raíces.

En relación al efecto de la materia orgánica, un estudio realizado por Leggett y Rahe en 1985, mencionan que se observó un decaimiento sustancial en esclerocios de *Sclerotium cepivorum* enterrados en suelos orgánicos (20-50% de materia orgánica), sobre todo en los meses de invierno cuando se dan períodos extensos de saturación del suelo aunados con altas temperaturas. En el presente estudio, los porcentajes de materia orgánica se encuentran en el rango de 1,31 en el área de baja incidencia de la finca 5 (Anexo 4A) a 9,86 en todas las áreas de la finca 3 (Anexo 4 A, B y C), lo que indica que todas las fincas estudiadas poseen suelos típicamente minerales (contenido de materia orgánica menor a 20%), además, en la mayoría de los casos el porcentaje es menor a 5, valor que según Bertsch (1987) es bajo para suelos de tipo andisol, como estos. Los antagonistas identificados en este trabajo, pueden desarrollarse casi en todos los suelos y se ven favorecidos por suelos orgánicos o que contengan algún porcentaje de materia orgánica o en descomposición (Papavizas, 1985). Esto explica por qué se recuperaron colonias de los antagonistas en fincas con valores de materia orgánica tan diferentes.

Con respecto a las condiciones físicas del suelo, Linderman *et al.* (1983) citan que por ejemplo, las arcillas favorecen el desarrollo de microflora antagonista a *Fusarium oxysporum*, sin embargo, de conformidad con los resultados aquí mostrados (Anexo 4), no se nota este tipo de relación en el caso de *Sclerotium cepivorum*, ya que fue en las áreas de incidencia intermedia y alta donde se detectó el componente arcilloso. Según estos autores la ausencia de pudrición blanca se debe más a altos niveles de fungistasis que a las condiciones de temperatura o humedad.

Finalmente, conforme con los datos de las muestras tomadas en Guayabo y La Fortuna de Bagaces, así como en Matinilla de Santa Ana (Anexo 5), se nota que las poblaciones de microorganismos, así como las características físicas y químicas del suelo se mantienen muy similares a las encontradas en las fincas de la zona alta de Cartago, por lo que no se cuenta con información suficiente como para subrayar diferencias en esos aspectos.

Entonces, se proponen dos posibles hipótesis para explicar la ausencia de la enfermedad en esas zonas, primero que el patógeno no ha sido introducido, lo que podría justificarse con el hecho de que no se hallaron esclerocios, sin embargo, esto puede

deberse a una imprecisión del método, ya que en muchas de las áreas de las fincas estudiadas en la zona alta de Cartago, tampoco se detectaron esclerocios aunque la enfermedad se haya presentado. Segundo, que las condiciones ambientales y de manejo no permiten el desarrollo de la enfermedad, ya que no son favorables para el patógeno, debido, primero a las altas temperaturas y después a la forma de cultivo en bateas, que causa un estado de saturación del suelo que promueve la degradación de los esclerocios (si es que hay) y la dilución del estímulo radical para su germinación.

## CONCLUSIONES

- 1) Es posible aislar hongos con potencial antagónico, como *Trichoderma* spp., *Gliocladium* sp. y *Paecilomyces* sp. en suelos a los que por muchos años se les ha aplicado una gran cantidad de fungicidas.
- 2) El método de trapeo utilizado en este trabajo fue más eficaz que el muestreo de plantas enfermas, en cuanto a la recuperación de hongos asociados a esclerocios que puedan mostrar algún efecto antagónico.
- 3) De acuerdo al trapeo, la incidencia de la enfermedad se relaciona de forma inversa con la presencia de los hongos *Trichoderma* y *Gliocladium*.
- 4) El área de baja incidencia de la enfermedad presenta, desde el punto de vista microbiológico, condiciones favorables para que los hongos *Trichoderma* y *Gliocladium* sean capaces de colonizar esclerocios.
- 5) No hay evidencia de que las características físicas y/o químicas de los suelos estudiados (de las tres áreas de producción) promuevan la supresión o conductividad de la enfermedad.

## RECOMENDACIONES

- 1) Realizar más trampeos en diferentes épocas del año, para tratar de determinar si el género de hongos capaces de colonizar los esclerocios varía con la época.
- 2) Desinfectar los esclerocios colectados a partir de plantas enfermas, para evitar el crecimiento de microorganismos contaminantes y lograr la recuperación sólo de los que pueden estar parasitando el esclerocio internamente.
- 3) Realizar más análisis microbiológicos en diferentes épocas del año, orientados especialmente a medir la población de hongos como *Trichoderma* spp., *Gliocladium* sp. y *Paecilomyces* sp., para tratar de comprender su dinámica poblacional.
- 4) Realizar pruebas de sensibilidad de *Trichoderma* spp., *Gliocladium* sp. y *Paecilomyces* sp. a los fungicidas utilizados en cebolla, para determinar si han desarrollado resistencia.



## LITERATURA CITADA

- ADAMS, P. B.; PAPAIVIZAS, G. C. 1971. Effect of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and some soil environmental factors on disease severity. *Phytopathology* 61: 1253-1256.
- AGRIOS, G.N. 1996. Fitopatología. Trad. M Guzmán. 2ed. México, D.F, LIMUSA. p. 513.
- BERTSCH, F. 1987. Manual para interpretar la fertilidad de los suelos de Costa Rica. 2 ed., San José CR, Oficina de Publicaciones de la Universidad de Costa Rica. 78 p.
- CNP (Consejo Nacional de Producción, CR). 2003. Estimaciones de la producción de Cebolla (en línea). San José, CR. Consultado 28 ago. 2003. Disponible en <http://www.mercanet.cnp.go.cr>
- COLEY-SMITH, J. R. 1990. White rot disease of *Allium*: problems of soil-borne diseases in microcosm. *Plant Pathology* 39: 214-222.
- \_\_\_\_\_; COOKE, R. C. 1971. Survival and germination of fungal sclerotia. *Ann. Rev. Phytopathol* 9: 65-92.
- \_\_\_\_\_; MITCHELL, C. M.; SANSFORD, C. E. 1990. Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. *Plant Pathology* 39: 58-69.
- CROWE, F.J.; HALL, D. H.; GREATHEAD, A. S.; BAGHOTT. 1980. Inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and the incidence of white rot of onion and garlic. *Phytopathology* 70: 64-69
- CHET, I.; BAKER, R. 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 71: 286-290
- De OLIVEIRA, V. L.; BELLEI, M. M.; BORGES, A. C. 1984. Control of white rot of garlic by antagonists fungi under controlled environmental conditions. *Can. J. Microbiol.* 30: 884-889
- FERGUSON, J. 1953. Factors in colonization of sclerotia by soil organisms. *Phytopathology* 43: 471.
- KAY, S. J.; STEWART, A. 1994. Evaluation of fungal antagonists for control of onion white rot in soil box trials. *Plant Pathology* 43: 371-377.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. 1994. Evaluation of fungal antagonists for control of onion white rot in soil box trials. *Plant Pathology* 43: 371-377. *Fuente original*. GHAFFAR. A. 1969. Biological control of white rot of onion. Interactions of soil microorganisms with *Sclerotium cepivorum* Berk. *Mycopathologia et Micologia Applicata* 38: 101-111.

- KUBICEK-PRANZ, E. M. 1998. Nutrition, cellular structure and basic metabolic pathways in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol 1. Basic biology, taxonomy and genetics. Eds C. P. Kubicek y G. E. Harman. Padstow, UK. Taylor and Francis Ltd. p 101.
- LEGGETT, M.; RAHE, J. E. 1985. Factors affecting the survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* in the Fraser Valley of British Columbia. *Ann. Appl. Biol.* 106: 255-263.
- LINDERMAN, R. G.; MOORE, L. W.; BAKER, K. F.; COOKSEY, D. A. 1983. Strategies for detecting and characterizing systems for biological control of soilborne plant pathogens. *Plant Dis.* 67(10): 1058-1064.
- LYDA, S. D. 1984. Physical and chemical properties of suppressive soils. In *Suppressive soils and plant disease*. Ed R. W. Scheider. St. Pau, Minnesota. p. 9-22.
- MESEN, R. 1997. Efecto de tres sistemas de labranza y una enmienda sobre la densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* y el manejo de la pudrición blanca de cebolla en Costa Rica. Tesis Mag. Sc. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 115 p.
- OBREGON, M. 2001. Evaluación *in vitro* del poder antagónico de *Trichoderma harzianum* Rifai con respecto al hongo fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* Berkeley causante de la enfermedad "Torbó en cebolla". In XLVII Reunión Anual del PCCMCA Resúmenes. San José, Costa Rica. p. 19.
- OLIVEIRA, V. L.; BELLEI, M. M.; MENEZES-SOBRINHO, J.; FERREIRA, F. A. 1982. Ação antagônica de *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus* e *Penicillium* sp. sobre *Sclerotium cepivorum*, causador da podridão branca do alho. *Fitop. Bras.* 7(3): 531.
- PAPAVIZAS, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol* 23:23-54.
- PEREZ, M. L.; HERNANDEZ, V. O.; CANTU, G. F.; ROMERO, R. A. 2000. Alternativas para el manejo integral de la pudrición blanca *Sclerotium cepivorum* Berk. en ajo *Allium sativum* L. en la zona del Bajío, México. In XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Puerto Vallarta, Jalisco, México. p. L67.
- PINTO, C. M. F.; MAFFIA, L. A.; BERGER, R. D.; MIZUBUTI, E. S. G.; CASALI, V. W. D. 1998. Progress of white rot on garlic cultivars planted at different times. *Plant Dis.* 82 : 1142-1146.
- RAI, J. N.; SAXENA, V. C. 1975. Sclerotial mycoflora and its role in natural biological control of "white rot" disease. *Plant and Soil.* 43: 509-513.
- ROMERO, C.S. 1993. Hongos fitopatógenos. Ed. por L.Tress. México, Universidad Autónoma de Chapingo. p. 342.

- STONE, H. E.; ARMENTROUT, V. N. 1985. Production of oxalic acid by *Sclerotium cepivorum* during infection of onion. *Mycologia*. 77(4) : 526-530.
- TSIGBEY, F. K.; NUTSUGAH, S. K. 1999. *Gliocladium catenulatum* in association with *Sclerotium cepivorum* on onion leaves in Ghana. *Plant Dis.* 83: 198.
- VIMARD, B.; LEGGETT, M. E.; RAHE, J. E. 1986. Rapid isolation of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* from muck soil by sucrose centrifugation. *Phytopathology* 76: 465-467.

## CAPITULO SEGUNDO

**Evaluación del efecto antagonista de hongos aislados en fincas productoras de cebolla de la zona alta de Cartago, sobre el patógeno *Sclerotium cepivorum* Berk. causante de la pudrición blanca.**

## INTRODUCCIÓN

*Sclerotium cepivorum* es un patógeno específico del género *Allium*; entre las principales especies comerciales que son afectadas de forma natural se encuentran la cebolla (*Allium cepa* L.) y el ajo (*A. sativum* L.) (Walker, 1969 ; Galli *et al.*, 1980). Es un hongo Imperfecto perteneciente al Orden Mycelia Sterilia (Galli *et al.*, 1980). Se reproduce a través de la producción de pequeños esclerocios (0.3 a 0.6 mm de diámetro) que funcionan como propágulos y como inóculo (Crowe y Hall, 1980; Couch y Kohn, 2000).

Puede persistir con una viabilidad mayor de 90%, hasta por 20 años en condiciones de campo sin necesidad del hospedero y puede formar esclerocios secundarios, dentro o adyacentes a los esclerocios originales, que influyen fuertemente en su sobrevivencia (Coley-Smith *et al.*, 1990).

La posibilidad del combate biológico para el manejo de la pudrición blanca de la cebolla ha sido investigada desde 1969 por Ghaffar (citado por Kay y Stewart, 1994) y se han identificado tanto hongos como bacterias con potencial de control.

El combate biológico, en este tipo de enfermedades, está orientado a disminuir la densidad de inóculo mediante antagonistas que destruyan los esclerocios o en algunos casos que eviten su formación (Cook, 1979).

Existen informes que describen la capacidad antagónica tanto de bacterias como de hongos sobre *Sclerotium cepivorum* y otros hongos que forman esclerocios. Rai y Saxena (1975) concluyen que un gran número de hongos fueron encontrados colonizando esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*, tanto *in vitro* como en condiciones de campo; los géneros que presentaron mayor actividad antagónica fueron *Penicillium* y *Aspergillus*.

Ayers y Adams (1981 a y b) describen al hongo *Teratosperma oligocladum* como un micoparásito que se encuentra en forma natural en el suelo, que es capaz de invadir y

destruir varias especies de hongos que forman esclerocios, entre los que se encuentran *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotium cepivorum*.

En 1982, Oliveira *et al.* evaluaron la acción antagonista de *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus* y *Penicillium* sp. sobre *Sclerotium cepivorum*, los resultados mostraron alta eficiencia antagonista de los tres hongos. Recientemente, Mesén (1997) encontró que los hongos *Penicillium italicum*, una especie de *Trichoderma* y bacterias no identificadas fueron capaces de colonizar esclerocios o restos no viables de ellos, provenientes de suelo enmendado, tanto en el campo como en el laboratorio. Por otra parte, Tsigbey y Nutsugah (1999) informan que *Gliocladium catenulatum* se desarrolló naturalmente sobre el micelio de *Sclerotium cepivorum* y suprimió por completo su crecimiento; además, colonizó y deterioró los esclerocios.

Mc Lean y Stewart (2000) confirmaron el poder antagonista de los hongos *Chaetomium globosum*, *Coniothyrium minitans*, *Trichoderma harzianum*, *T. koningii* y *T. virens* contra *Sclerotium cepivorum* en ensayos de invernadero; mientras que Obregón (2001) informa que *Trichoderma harzianum* es un antagonista potencial en el combate de la pudrición blanca en cebolla, ya que presentó capacidad de invasión entre 50 y 75% sobre el patógeno en ensayos *in vitro*.

En Costa Rica, no existe información sobre la eficacia de hongos antagonistas a *Sclerotium cepivorum* que se encuentran de forma natural en las áreas productoras de cebolla, los que podrían estar ejerciendo algún grado de control biológico natural. Este trabajo pretende determinar el efecto antagonista a *Sclerotium cepivorum* de hongos aislados de suelo, plantas enfermas y esclerocios provenientes de la zona alta de Cartago; mediante pruebas *in vitro* y en invernadero.

## MATERIALES Y METODOS

### Hongos a evaluar

- Patógeno

Se utilizó un aislamiento obtenido a partir de plantas enfermas de una finca ubicada en Llano Grande de Cartago (Finca #4). Este aislamiento se identificó con las siglas Sc.

- Aislamientos para probar antagonismo *in vitro* y en invernadero

En las pruebas *in vitro* se utilizaron 12 aislamientos recuperados a partir de suelo, plantas enfermas y esclerocios de 10 fincas ubicadas en la zona alta de Cartago y un aislamiento de *Beauveria bassiana*, ya que este produjo una fuerte inhibición del crecimiento *in vitro* de *Sclerotium cepivorum* cuando contaminaba aislamientos en el laboratorio. Además, existe una referencia (Cotes, 2000) que informa del control de *Sclerotium cepivorum* por medio de aislamientos nativos de Colombia, entre los que destaca *Beauveria* sp.

Para la prueba en invernadero se seleccionaron los tres aislamientos que presentaron mejores resultados en las pruebas *in vitro*, además de un aislamiento de *Gliocladium* sp. (denominado como Glio 2PA) recuperado de algunos esclerocios usados en la prueba de colonización y parasitismo, como se explicará más adelante.

**Cuadro 1.** Procedencia de los aislamientos de posibles antagonistas utilizados en las pruebas de antagonismo, *in vitro* y en invernadero, contra *Sclerotium cepivorum*.

Género	Procedencia			Finca	
	Suelo	Planta enferma	Esclerocios	#	Incidencia*
<i>Penicillium</i> sp. (P1)			X	9	intermedia
<i>Penicillium</i> sp. (P2)	X			7	intermedia
<i>Paecilomyces</i> sp. (Pae)	X			9	baja
<i>Beauveria bassiana</i> ** (Bea)					
<i>Gliocladium</i> sp. (Glio)			X	5	baja
<i>Gliocladium</i> sp. (Glio2PA)***					
<i>Trichoderma</i> sp. (T1)****			X	3	baja
<i>Trichoderma</i> sp. (T2)			X	6	baja
<i>Trichoderma</i> sp. (T3)			X	6	baja
<i>Trichoderma</i> sp. (T4)			X	6	baja
<i>Trichoderma</i> sp. (T5)	X			7	alta
<i>Trichoderma</i> sp. (T6)			X	9	baja
<i>Trichoderma</i> sp. (T7)		X		3	nd
<i>Trichoderma</i> sp. (T8)	X			9	intermedia

\* indica el nivel de incidencia de pudrición blanca en el área de la finca donde se recuperó el hongo.

\*\* aislamiento propiedad del Centro Nacional de Agricultura Orgánica, Instituto Nacional de Aprendizaje.

\*\*\* aislamiento de *Gliocladium* sp. proveniente de la prueba de colonización y parasitismo de esclerocios (ver explicación en la sección de resultados).

\*\*\*\* los caracteres entre paréntesis se refieren al código que se utilizará para identificar cada aislamiento.

nd : no hay dato

Nota : las colonias de *Trichoderma* eran diferentes entre sí.

## 1. Pruebas *in vitro*

### 1.1. Inhibición del crecimiento de *Sclerotium cepivorum*

Se colocó un disco (0.6 cm de diámetro) de micelio en activo crecimiento (colonia entre 7 y 14 días de edad) de *Sclerotium cepivorum* en un lado de un plato Petri de 8 cm de diámetro que contenía PDA y otro disco, con las mismas características, del posible antagonista a evaluar, en el lado opuesto al patógeno. El momento y la distancia en que fueron colocados los discos dependió de la tasa de crecimiento de cada organismo, así, los hongos *Penicillium* sp., *Paecilomyces* sp., *Gliocladium* sp. y *Beauveria bassiana* fueron colocados el mismo día que el patógeno a una distancia de 2 cm entre discos; mientras que todos los aislamientos de *Trichoderma* sp. se colocaron tres días después que



*Sclerotium cepivorum* y a una distancia de 4 cm entre discos. Se incluyeron tratamientos testigo, tanto del patógeno como de los posibles antagonistas.

La prueba constó de tres repeticiones para cada posible antagonista, los platos se incubaron a 22 C por 14 días. Al final del periodo se midió el crecimiento de la colonia de cada uno de los posibles antagonistas y del patógeno para así obtener valores de área de cobertura de cada colonia.

A continuación se describe el procedimiento general de cálculo de áreas y porcentajes de área y en el Anexo 1 se presenta un ejemplo con datos reales.

1) Se calculó el área total de un plato Petri de 8 cm de diámetro por medio de la fórmula del área de un círculo ( $\pi r^2$ ), por lo tanto  $A_{\text{plato}} = p (4^2) = 50.27 \text{ cm}^2$ , valor que se mantendrá constante para los demás cálculos.

2) Con el dato del diámetro del halo total ( $\varnothing_{\text{HT}}$ ) se calculó el área del halo total ( $A_{\text{HT}}$ ), que incluye el área que cubrió el posible antagonista más el área del halo de inhibición, por medio de la fórmula:  $A_{\text{HT}} = p * [(\varnothing_{\text{HT}} / 2)]^2$ .

3) Se calculó el área que cubrió el micelio de *Sclerotium cepivorum* ( $A_{\text{Sc}}$ ) por medio de la siguiente fórmula:  $A_{\text{Sc}} = A_{\text{plato}} - A_{\text{HT}}$ .

4) El área de cobertura del posible antagonista se calculó como sigue:

$$A_{\text{AT}} = p * [(\varnothing_{\text{AT}} / 2)]^2.$$

5) El área del halo de inhibición se calculó de la siguiente forma:

$$A_{\text{Halo}} = A_{\text{HT}} - A_{\text{AT}}$$

6) Si el aislamiento no produjo halo de inhibición, entonces el área que cubrió el micelio de *Sclerotium cepivorum* ( $A_{\text{Sc}}$ ) se calculó así:  $A_{\text{Sc}} = A_{\text{plato}} - A_{\text{AT}}$ .

7) Se convirtió el valor de área de cobertura a porcentaje de área de cobertura de la siguiente manera:

$$\% A_{Sc} = (A_{Sc} * 100) / A_{plato}$$

$$\% A_{AT} = (A_{AT} * 100) / A_{plato}$$

$$\% A_{Halo} = (A_{Halo} * 100) / A_{plato}$$

## 1.2. Prueba de colonización y parasitismo de esclerocios

Se colocaron 10 esclerocios en un plato Petri con una suspensión de  $1,0 \times 10^6$  conidios/ml de cada uno de los posibles antagonistas por dos horas a 22 C. Luego, los esclerocios fueron transferidos a platos Petri con papel filtro estéril humedecido y se incubaron, en bolsas plásticas, por un período de 14 días a 22 C; la prueba constó de 4 repeticiones para cada posible antagonista y un tratamiento testigo, constituido de esclerocios sin aplicación.

Se llevaron a cabo observaciones a los 2, 4, 7 y 14 días de incubación, al final del período se realizó un recuento de los esclerocios colonizados (aquellos que presentaron crecimiento de cualquier tipo de micelio sobre la superficie). Luego se hizo una prueba de viabilidad a todos los esclerocios, en la que se desinfectaron superficialmente, con hipoclorito de sodio al 1% por un minuto y se cultivaron en PDA. Los platos de Petri se mantuvieron en incubación por 14 días a 22 C; luego de este tiempo se procedió a determinar si hubo crecimiento de micelio a partir de los esclerocios desinfectados. Se consideró que un esclerocio estaba parasitado cuando presentó desarrollo de micelio del posible antagonista que se estaba evaluando y no parasitado si el micelio correspondía a *Sclerotium cepivorum*.

Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de esclerocios colonizados y el porcentaje de parasitismo de la siguiente forma:

- Porcentaje de esclerocios colonizados =  $\frac{\# \text{ esclerocios colonizados} * 100}{\# \text{ esclerocios totales (40)}}$
- Porcentaje de esclerocios parasitados =  $\frac{\# \text{ esclerocios parasitados} * 100}{\# \text{ esclerocios colonizados}}$

## 2. Prueba en el invernadero

### Ubicación

El ensayo se llevó a cabo en la Estación Experimental Carlos Durán del Ministerio de Agricultura y Ganadería, ubicada en el distrito Potrero Cerrado de Oreamuno, a una altitud de 2440 msnm. Se empleó suelo natural proveniente de la estación experimental, el cual nunca había sido sembrado con cebolla.

Se utilizaron potes plásticos de 1,8 L de capacidad (12,5 cm de profundidad), a los que se les adicionó 2 kg de suelo inoculado con esclerocios a razón de 0,07 esclerocios/g de suelo húmedo\*, luego se procedió a sembrar 3 plántulas por maceta, las cuales fueron producidas en invernadero con suelo estéril. Una vez sembradas las plantas, se realizó la primera aplicación de los tratamientos, la segunda aplicación se hizo en la semana 6. La prueba se mantuvo en el invernadero por un período de 11 semanas, luego de las cuales se procedió a evaluar las variables abajo descritas.

### Tratamientos

Cada antagonista fue adicionado como "drench" (500 ml) a la base de las plantas, mediante suspensión acuosa a una concentración de  $3,2 \times 10^6$  conidios/ml en la primera aplicación y de  $1,8 \times 10^7$  conidios/ml en la segunda aplicación. A las soluciones de esporas fueron añadidos 5 g/l de almidón de yuca como fuente de carbono y 1 ml/l de adherente.

---

\* Densidad de inóculo promedio encontrada en las áreas de incidencia intermedia en las fincas estudiadas en el primer capítulo de esta tesis, datos no publicados.

Los tratamientos<sup>1</sup> aplicados fueron:

- 1) Testigo, sin aplicación de ningún antagonista.
- 2) *Beauveria bassiana* (**Bea**)
- 3) *Gliocladium* sp. (**Glio**)
- 4) *Gliocladium* sp. (**Glio2PA**)<sup>2</sup>
- 5) *Trichoderma* sp. (**T6**)<sup>3</sup>
- 6) *Beauveria bassiana* en mezcla con *Trichoderma* sp. (**T6+Bea**)
- 7) *Gliocladium* sp. en mezcla con *Trichoderma* sp. (**T6+Glio**)
- 8) *Gliocladium* sp. en mezcla con *Trichoderma* sp. (**T6+Glio2PA**)

### Variables

Las variables evaluadas fueron:

1. Incidencia y severidad de la enfermedad.
2. Longitud radical y foliar.
3. Número de hojas.
4. Peso seco radical, del bulbo y foliar.

### Diseño experimental y análisis de datos

El experimento fue diseñado como irrestricto al azar, con cinco repeticiones y con diseño grupal de tratamientos.

El análisis de los datos se hizo mediante Análisis de Varianza (ANDEVA) y análisis de contrastes ortogonales.

Es importante hacer notar que, para el análisis estadístico en diseños de estructura grupal no es requisito una prueba de F significativa en el ANDEVA, ya que en estos casos

---

<sup>1</sup> Ver descripción de códigos en el Cuadro 1.

<sup>2</sup> Aislamiento de *Gliocladium* sp. proveniente de la prueba de colonización y parasitismo de esclerocios, ver explicación en la sección de resultados.

<sup>3</sup> Aislamiento de *Trichoderma* sp. que mostró los mejores resultados en las pruebas *in vitro*, ver explicación en sección de resultados.

solamente es útil para obtener el cuadrado medio del error (varianza estimada) la cual es necesaria en la prueba de contrastes ortogonales, que es la técnica apropiada de análisis POST-ANDEVA de acuerdo al tipo de diseño (Blanco, 2001).

Para el análisis se identificó el tratamiento testigo como "Test", el conjunto de todos los tratamientos como "Antag", los tratamientos Bea, Glio y Glio2PA en conjunto como "Antibiosis", el tratamiento T6 como "Tricho" y como "Combin" al grupo de tratamientos T6+Bea, T6+Glio y T6+Glio2PA (Anexo 7).

Los datos se analizaron con ayuda del programa estadístico SAS para Windows 6.11.

#### Análisis complementarios

Antes de iniciar el experimento se realizó un análisis químico y otro microbiológico del suelo, éste con el único objetivo de determinar si existía alguna población natural de los hongos a evaluar. Al finalizar el ensayo se realizó una prueba de comprobación de la persistencia de los antagonistas evaluados, el cual consistió en un análisis microbiológico y en el cultivo de secciones radicales; también se hizo un análisis nematológico de suelo para cada tratamiento, con el fin de precisar si las poblaciones de nemátodos podrían influir en el desarrollo del cultivo o en la acción de los antagonistas.

## RESULTADOS

### 1. Pruebas *in vitro*

#### 1.1. Inhibición del crecimiento de *Sclerotium cepivorum*

Se pudo observar diferentes tipos de reacción de los hongos involucrados en la prueba (Cuadro 2). Los aislamientos P1, P2, Pae, Bea y Glio produjeron, en mayor o menor grado, una zona de inhibición (halo de inhibición) entre ellos y la colonia de *Sclerotium*, mientras que ninguno de los aislamientos de *Trichoderma* logró inhibir el crecimiento del patógeno, como se muestra en los cuadros 3 y 4.

**Cuadro 2.** Tipo de reacción que presentó cada uno de los posibles antagonistas evaluados en la prueba *in vitro* de inhibición del crecimiento de *Sclerotium cepivorum*.

Posible antagonista	Tipo de reacción*
P1, P2, Glio	Inhibición mutua al entrar en contacto. El espacio entre las dos colonias es pequeño, pero generalmente es bien marcado.
Pae, Bea, Glio	Inhibición de un organismo a distancia, se nota una marcada zona de inhibición.
P1, P2, T1 a T8	Los dos hongos se entremezclan mutuamente.

\* Según Johnson *et al.*, 1960.

En el Cuadro 3 se nota que bs tratamientos Sc/P1 y Sc/P2 presentan diferencias significativas con los tratamientos Sc/Pae, Sc/Bea y Sc/Glio, respecto al crecimiento del patógeno y del aislamiento, expresado como porcentaje de área de cobertura del plato, pero no con relación a la magnitud del halo de inhibición, expresado en los mismos términos.

**Cuadro 3.** Crecimiento de *Sclerotium cepivorum* y de cada uno de los posibles antagonistas que produjeron halo de inhibición (expresado como porcentaje de área promedio de cobertura del plato), después de 14 días de incubación .

Tratamientos	Área de cobertura del plato (%)		
	<i>Sclerotium cepivorum</i>	Posible antagonista	Halo
Sc/P1	73,19 <sup>a</sup>	25,46 <sup>a</sup>	1,33 <sup>NS</sup>
Sc/P2	81,34 <sup>a</sup>	18,66 <sup>a</sup>	0,00 <sup>NS</sup>
Sc/Pae	92,04 <sup>b</sup>	3,38 <sup>b</sup>	4,58 <sup>NS</sup>
Sc/Bea	94,69 <sup>b</sup>	1,47 <sup>b</sup>	3,84 <sup>NS</sup>
Sc/Glio	91,34 <sup>b</sup>	6,61 <sup>b</sup>	2,05 <sup>NS</sup>

Medias seguidas de una misma letra (entre columnas) no presentan diferencia significativa de acuerdo con prueba de T con alfa 0,05. NS = diferencia no significativa.

**Cuadro 4.** Crecimiento de *Sclerotium cepivorum* y de cada uno de los posibles antagonistas que no produjeron halo de inhibición (expresado como porcentaje de área promedio de cobertura del plato), después de 14 días de incubación.

Tratamientos	Área de cobertura del plato (%)	
	<i>Sclerotium cepivorum</i>	Posible antagonista
Sc/T1	73,19 <sup>b</sup>	26,81 <sup>b</sup>
Sc/T2	64,24 <sup>b</sup>	35,76 <sup>b</sup>
Sc/T3	83,76 <sup>a</sup>	16,24 <sup>a</sup>
Sc/T4	85,62 <sup>a</sup>	14,38 <sup>a</sup>
Sc/T5	88,82 <sup>a</sup>	11,18 <sup>a</sup>
Sc/T6	44,28 <sup>c</sup>	55,72 <sup>c</sup>
Sc/T7	63,21 <sup>b</sup>	36,79 <sup>b</sup>
Sc/T8	91,22 <sup>a</sup>	8,78 <sup>a</sup>

Medias seguidas de una misma letra (entre columnas) no presentan diferencia significativa de acuerdo con prueba de T con alfa 0,05.

Como se nota en el Cuadro 4 los tratamientos Sc/T3, Sc/T4, Sc/T5 y Sc/T8 no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos en cuanto al crecimiento de *Sclerotium cepivorum* y del posible antagonista correspondiente, pero sí con respecto a los tratamientos Sc/T1, Sc/T2 y Sc/T7, mientras que el tratamiento Sc/T6 es diferente a todos los demás.

Se debe recalcar que el aislamiento T6 fue el que presentó la mayor área de cobertura del plato, tanto de los aislamientos que produjeron halo de inhibición como de aquellos que no lo causaron.

**Cuadro 5.** Área promedio de cobertura del plato (en porcentaje) de las colonias de *Sclerotium cepivorum* y de cada uno de los aislamientos (posibles antagonistas), después de 14 días de crecimiento en los tratamientos testigo.

Tratamientos testigo	Área de cobertura del plato (%)
Sc	100,00
P1	37,70
P2	38,67
Pae	14,60
Bea	4,25
Glio	20,75
T1 a T8	100,00

Como se nota en los cuadros 3 y 5, el aislamiento de *Beauveria bassiana* fue el que creció más lentamente, por lo que mostró la menor área de cobertura, tanto en el tratamiento testigo (4,25%) como cuando se hallaba creciendo en el mismo plato que el patógeno (1,47%).

Ninguno de los aislamientos evaluados evitó la formación de esclerocios, sin embargo se notó la alteración de esas estructuras por parte de los aislamientos de *Trichoderma*, sobre todo de T2, T3, T4 y T6.



Los esclerocios que se formaron a partir de las colonias de *Sclerotium* que crecieron junto con estos aislamientos presentaban una o varias de las siguientes características: 1) deshidratación (aparición de “pasas”) y textura suave, 2) se encontraban vacíos y 3) forma de disco o plato. En conformidad con las observaciones realizadas, el aislamiento T6 fue el que mostró mayor cantidad de esclerocios vacíos y en forma de plato, además de que algunos esclerocios se notaron colonizados superficialmente por micelio esporulado de *Trichoderma*.

Como se anotó en el Cuadro 2 y se puede observar en el Anexo 3, todos los aislamientos de *Trichoderma* se entremezclaron con la colonia del patógeno. Con base en una prueba preliminar<sup>4</sup> se notó que los aislamientos T1 y T3 “enrollaban” las hifas de *Sclerotium cepivorum*, en el T1 no se observó ningún daño en las hifas del patógeno, mientras que en el T3 se pudo notar algún grado de constricción en algunas secciones de las hifas de *Sclerotium cepivorum*.

En los aislamientos T5 y T7 se vio que las hifas de *Trichoderma* se desarrollaron de forma paralela a las de *Sclerotium*, en el T5 las hifas del patógeno se notaban un poco más gruesas y oscuras, mientras que en el T7 las hifas parecían normales. Para los aislamientos T2, T4, T6 y T8 no se logró observar ningún comportamiento de este tipo, las hifas solamente se entrecruzaban.

---

<sup>4</sup> “Prueba del celofán” en la que se coloca un disco en activo crecimiento del patógeno y otro del posible antagonista en lados opuestos de un plato Petri con medio de cultivo apto para el crecimiento de ambos hongos. Se coloca un trozo de papel celofán de 1 cm<sup>2</sup> en la zona del plato donde ocurrirá el contacto de las hifas de ambos organismos. Una vez en contacto, el papel celofán es retirado y colocado en un portaobjetos para ser observado al microscopio y tratar de determinar el tipo de interacciones que se presentan entre los organismos. Metodología proporcionada por el Ing. Edgar Vargas, Laboratorio de Fitopatología, CIPROC, UCR. 2003.

## 1.2. Prueba de colonización y parasitismo de esclerocios

Los aislamientos P1, P2, Pae, Bea y Glio fueron los que colonizaron mayor cantidad de esclerocios (Cuadro 6), mientras que los aislamientos T1, T2, T3 y T4 fueron los que presentaron los valores más bajos de colonización. *Gliocladium* sp. fue el hongo que parasitó la mayor cantidad de esclerocios (7), seguido de *Beauveria bassiana* con 2 y por último los aislamientos T2, T3 y T6 de *Trichoderma* con un esclerocio cada uno, mientras que P1, P2 y Pae no registraron esclerocios parasitados.

Se debe aclarar que la colonización superficial no fue evidente para el aislamiento T2, sin embargo, un esclerocio resultó parasitado; por lo que en la columna de % de esclerocios parasitados correspondiente a este aislamiento no aplica ningún valor.

Por otro lado, es importante hacer notar que el elevado valor de % de esclerocios parasitados del aislamiento T3 se debe a razones aritméticas más que biológicas, por lo que se debe enfatizar en la cantidad de esclerocios parasitados y no en su porcentaje correspondiente, lo que permite observar que el aislamiento Glio fue el que parasitó la mayor cantidad de esclerocios como ya se había mencionado.

Otro aspecto a recalcar es que, en los esclerocios expuestos a suspensiones de esporas de *Beauveria*, así como a los aislamientos T3 y T4 de *Trichoderma* se encontró que habían esclerocios parasitados, pero no por los aislamientos evaluados sino por una especie de *Gliocladium* que se denominó como Glio2PA (Anexo 5). Este nuevo aislamiento colonizó el 10% de los esclerocios expuestos a *Beauveria* y parasitó el 100% de esos esclerocios colonizados, se desarrolló a partir de un esclerocio no colonizado de los que fueron expuestos al aislamiento T3 y en uno de los esclerocios colonizados del aislamiento T4. Estos datos no se incluyeron en el Cuadro 6.

**Cuadro 6.** Cantidad y porcentaje de esclerocios colonizados y/o parasitados por cada uno de los posibles antagonistas, luego de 14 días de incubación.

Posible antagonista	Esclerocios colonizados		Esclerocios parasitados	
	Cantidad	%	Cantidad	%
<b>P1</b>	40 <sup>a</sup>	100	0 <sup>b</sup>	0
<b>P2</b>	39 <sup>a</sup>	97,5	0 <sup>b</sup>	0
<b>Pae</b>	40 <sup>a</sup>	100	0 <sup>b</sup>	0
<b>Bea</b>	33 <sup>a b</sup>	82,5	2 <sup>b</sup>	6,0
<b>Glio</b>	33 <sup>a b</sup>	82,5	7 <sup>a</sup>	21,2
<b>T1</b>	8 <sup>e</sup>	20	0 <sup>b</sup>	0
<b>T2</b>	0 <sup>e</sup>	0	1 <sup>b</sup>	na
<b>T3</b>	4 <sup>e</sup>	10	1 <sup>b</sup>	25
<b>T4</b>	2 <sup>e</sup>	5	0 <sup>b</sup>	0
<b>T5</b>	22 <sup>c d</sup>	55	0 <sup>b</sup>	0
<b>T6</b>	23 <sup>c d</sup>	57,5	1 <sup>b</sup>	4,3
<b>T7</b>	30 <sup>b c</sup>	75	0 <sup>b</sup>	0
<b>T8</b>	17 <sup>d</sup>	42,5	0 <sup>b</sup>	0

Medias seguidas de una misma letra (entre columnas) no presentan diferencia significativa de acuerdo a prueba de T con alfa 0,05.  
na = no aplica

## 2. Prueba en el invernadero

### 1. Incidencia y severidad de la enfermedad.

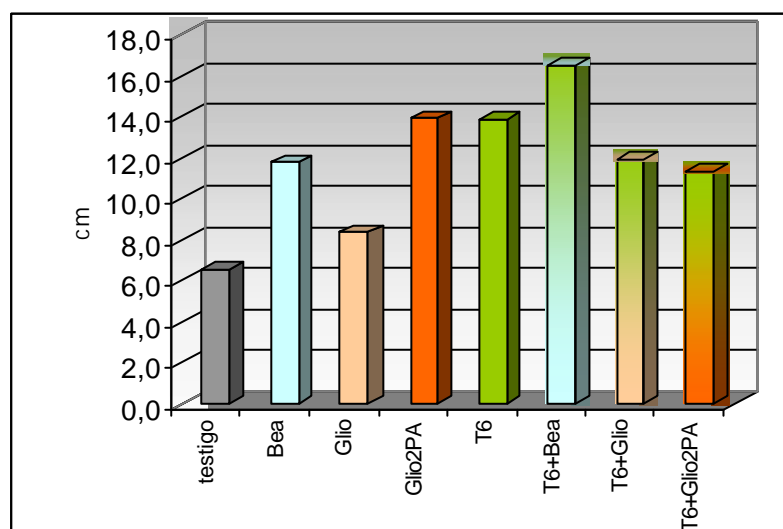
No fue posible evaluar estas variables ya que la enfermedad no se presentó durante el período del experimento.

## 2. Longitud radical, longitud foliar y número de hojas.

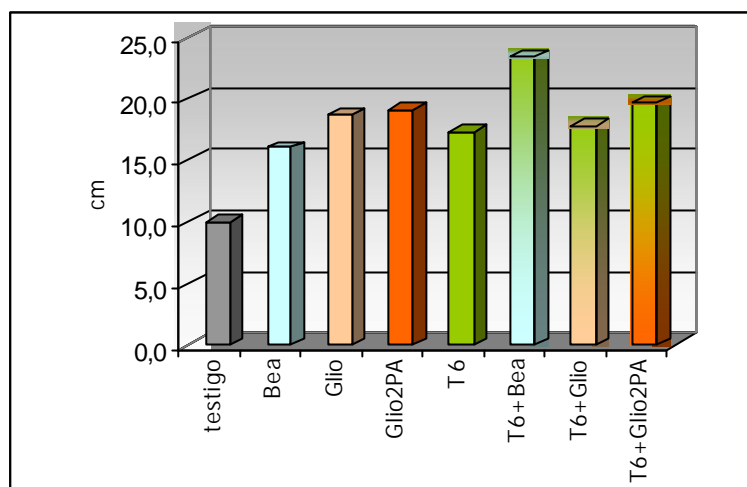
De acuerdo al análisis de varianza ( $\alpha=0,05$ ) de los datos obtenidos, no existe diferencia significativa entre medias de tratamientos con respecto a la longitud de la raíz ( $P = 0,13$ ) ni del número de hojas totales por tratamiento ( $P = 0,31$ ); mientras que sí se encontró diferencia en cuanto a la longitud foliar por tratamiento ( $P = 0,006$ ).

Al realizar la prueba de contrastes ortogonales se halló diferencia significativa para las tres variables cuando se comparó con el tratamiento testigo, así la probabilidad de que exista diferencia en la variable longitud radical del testigo versus longitud radical de todos los demás tratamientos fue  $P = 0,025$ , para la variable longitud foliar la probabilidad fue  $P = 0,0002$ , mientras que para la variable número de hojas totales por tratamiento la probabilidad fue de 0,031.

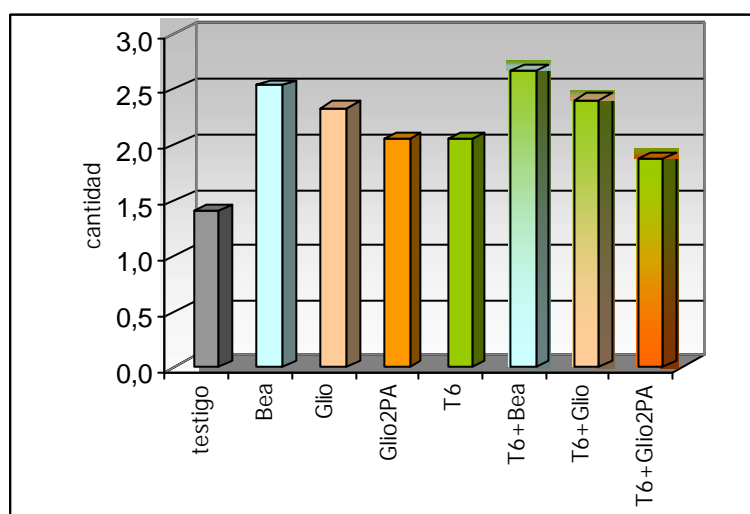
En las figuras 1, 2 y 3 se muestran los datos obtenidos para las variables descritas anteriormente.



**Fig 1.** Longitud radical promedio (cm) de plantas de cebolla obtenida por cada tratamiento evaluado, después de 11 semanas de crecimiento en invernadero.



**Fig 2.** Longitud foliar promedio (cm) de plantas de cebolla obtenida por cada tratamiento evaluado, después de 11 semanas de crecimiento en invernadero.

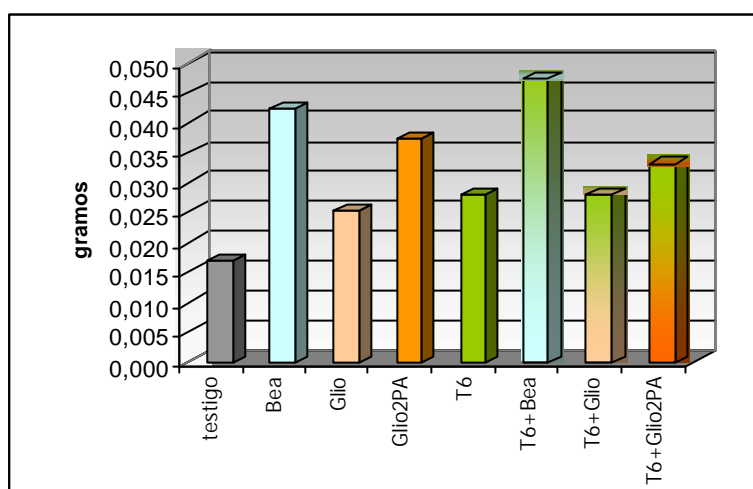


**Fig 3.** Número de hojas promedio de plantas de cebolla obtenida por cada tratamiento evaluado, después de 11 semanas de crecimiento en invernadero.

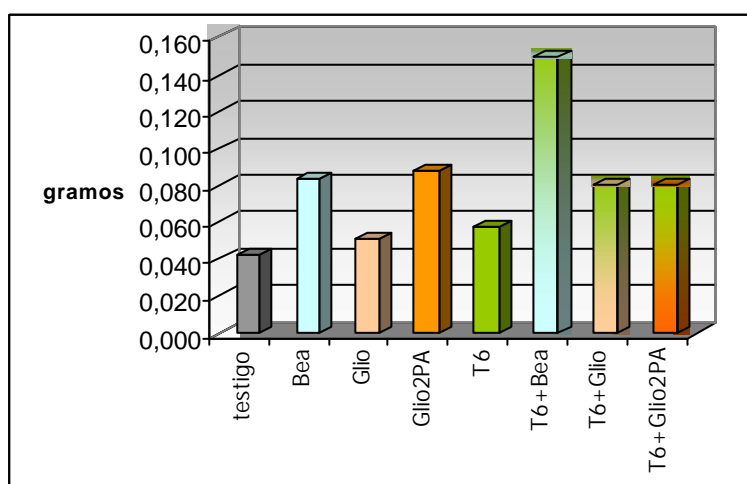
### 3. Peso seco radical, del bulbo y foliar.

Según los datos, para estas variables, no existe diferencia estadísticamente significativa para ninguna de ellas de acuerdo al análisis de varianza y a la prueba de contrastes ortogonales.

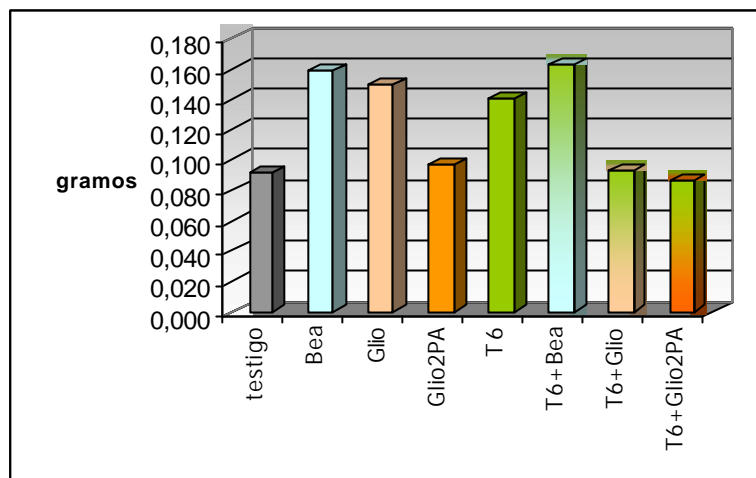
En las figuras 4, 5 y 6 se muestran los resultados para esas variables.



**Fig 4.** Peso seco radical promedio (g) de plantas de cebolla obtenido por cada tratamiento evaluado, después de 11 semanas de crecimiento en invernadero.



**Fig 5.** Peso seco promedio del follaje (g) de plantas de cebolla obtenido por cada tratamiento evaluado, después de 11 semanas de crecimiento en invernadero.



**Fig 6.** Peso seco promedio de los bulbos (g) de plantas de cebolla obtenido por cada tratamiento evaluado, después de 11 semanas de crecimiento en invernadero.

#### 4. Análisis complementarios.

##### 4.1. Análisis microbiológico de suelos.

No se halló ninguna colonia de los hongos evaluados en este ensayo.

##### 4.2. Análisis químico sencillo.

Este análisis detectó que los niveles de calcio y magnesio (3,38 y 0,74 cmol(+)/l, respectivamente) se encontraban por debajo del mínimo, al igual que el valor para la materia orgánica (3,84%). Los datos se presentan en el Anexo 6.

##### 4.3. Análisis nematológico.

Entre los nemátodos de importancia que se hallaron están: *Ditylenchus* sp., *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus* sp. y *Tylenchus* sp. El resultado completo del análisis se muestra en el Anexo 6.

#### 4.4. Análisis de persistencia.

Fue posible recuperar colonias de *Beauveria bassiana* del suelo de los tratamientos Bea y Bea+T6, colonias de *Gliocladium* sp. a partir de secciones de raíces de plantas del tratamiento Glio y colonias de *Trichoderma*, también de raíces, de los tratamientos T6, T6+Glio y del T6+Glio2PA.



## DISCUSIÓN

Los aislamientos de *Penicillium* spp. (P1 y P2), el de *Beauveria bassiana* (Bea) y *Paecilomyces* sp. (Pae) produjeron colonias secundarias a partir del disco de micelio original (Anexo 2), en el caso de los aislamientos de *Penicillium* las colonias (primaria o secundarias) dieron lugar, en algunos casos, a una zona de inhibición marcada y en otros no fue posible distinguirla con claridad. Algo similar ocurrió con *Gliocladium* sp. (Glio), el cual en una de las repeticiones mostró una amplia zona de inhibición, pero en las otras dos, aunque sí se presentó, fue menos evidente; mientras que, para los aislamientos Bea y Pae todas las colonias (primaria y secundarias) produjeron zonas de inhibición fácilmente observables; es por esta razón que los aislamientos P1, P2 y Glio muestran dos tipos de reacción (Cuadro 2).

Según Johnson *et al.* (1960) existe antagonismo cuando se expresa una o más de las siguientes condiciones: a) desarrollo de una zona de inhibición entre dos colonias, b) muerte de las hifas del patógeno una vez que se han puesto en contacto con las del antagonista, c) parasitismo del antagonista sobre las hifas del patógeno, d) "allanamiento" de la colonia del patógeno en las áreas más cercanas al antagonista y e) detención del crecimiento de la colonia del patógeno comparada con la colonia testigo en la cual el organismo crece sólo.

De acuerdo con lo anterior y a los resultados obtenidos en este trabajo, los aislamientos de *Paecilomyces* sp., *Beauveria bassiana* y *Gliocladium* sp. muestran un signo claro de antagonismo ya que presentaron marcados halos de inhibición, tanto en la colonia original como en las secundarias (Anexo 2).

Aunque estadísticamente no existe diferencia con respecto a los halos producidos por los aislamientos citados y los producidos por *Penicillium*, biológicamente sí es significativa la repetibilidad en la formación de la zona de inhibición por parte de los aislamientos de *Paecilomyces* sp., *Beauveria bassiana* y *Gliocladium* sp.

De Oliveira *et al.* (1984), confirman el comportamiento de *Paecilomyces* al encontrar que *P. lilacinus* indujo la formación de una zona de inhibición bien definida y que nunca ocurrió contacto entre las hifas de estos hongos y *Sclerotium cepivorum*, también informaron de un comportamiento similar para *Penicillium* sp., que en el caso de este trabajo no se comportó de forma consistente, como se nota en el Cuadro 2.

Por otro lado, los aislamientos Bea y Glio fueron los que lograron parasitar la mayor cantidad de esclerocios en la prueba de colonización y parasitismo, como se puede apreciar en el Cuadro 6, y se ubicaron entre los aislamientos con mayores porcentajes de colonización. Mientras que, Pae aunque obtuvo un 100% de colonización, no logró parasitar esclerocios.

Estos resultados sugieren que, el tipo de antagonismo presentado *in vitro* por el aislamiento de *Paecilomyces* sp. es la antibiosis, mientras que *Beauveria bassiana* y *Gliocladium* sp. muestran además, algún grado de parasitismo. Debido a que *Beauveria bassiana* y *Gliocladium* sp. presentan mecanismos complementarios se eligieron como parte de los hongos a utilizar en la prueba en el invernadero.

Acerca de los aislamientos de *Trichoderma*, como se explicó en la sección de resultados, todos se entremezclaron con la colonia del patógeno. Sin embargo, se notó que los aislamientos T1 y T3 "enrollaban" las hifas de *Sclerotium cepivorum*. Además, en los aislamientos T5 y T7 las hifas de *Trichoderma* se desarrollaron de forma paralela a las de *Sclerotium*, mientras que en los aislamientos T2, T4, T6 y T8 las hifas solo se entrecruzaron.

Lo anterior podría indicar, de acuerdo con De Oliveira *et al.* (1984) y Hjeljord y Tronsmo (1998), que los aislamientos que produjeron enrollamiento o desarrollo paralelo de las hifas presenten algún grado de micoparasitismo, ya que esas acciones se describen como parte del mecanismo que muestra *Trichoderma* spp. para parasitar otros hongos, como es el caso de *T. harzianum*, que produce estructuras especializadas, en forma de anillo o serpentina, para enrollar las hifas de *Sclerotium* después del contacto de ambos hongos.

Las especies de *Trichoderma* y *Gliocladium* ejercen control sobre los patógenos por tener la capacidad de parasitarlos, aún sin que ocurra la penetración al micelio del hospedero y por que colonizan rápidamente el sustrato disponible, gracias a sus características saprofiticas, lo que los convierte en competidores agresivos. Estos hongos emplean el mecanismo de antibiosis o micoparasitismo directo contra sus competidores. Sin embargo, en algunos casos la producción de toxinas se ve afectada dependiendo de la base nutricional del medio de crecimiento, de la cepa del antagonista, del patógeno y de las condiciones ambientales (Cook y Baker, 1983; Hjeljord y Tronsmo, 1998).

Tomando en cuenta lo anterior, así como el comportamiento de los aislamientos de *Trichoderma* (presentado en el Cuadro 4), podría decirse que el aislamiento T6 presenta la mayor habilidad saprofitica competitiva, ya que fue capaz de colonizar de forma más agresiva el medio de cultivo y disminuir en mayor grado el desarrollo de *Sclerotium cepivorum*.

Además, la mayoría de los esclerocios formados por el patógeno cuando se encontraba presente este aislamiento (tratamiento Sc/T6) presentaron deformaciones, deshidratación o se encontraban vacíos, así como tonos más opacos en el color de la cáscara; lo cual podría deberse a la liberación de algún tipo de metabolito tóxico por parte de *Trichoderma*, con el fin de lograr una colonización más eficiente.

El aislamiento T6 fue el único que logró colonizar esclerocios en las dos pruebas *in vitro*. Fue el único de los tres aislamientos de *Trichoderma* (Cuadro 6) que consiguieron parasitar al menos un esclerocio y que conjugó este hecho con la colonización de más del 50% de los esclerocios.

Otro aspecto a tomar en cuenta, es que este aislamiento fue recuperado en un área de baja incidencia de la enfermedad, tanto a partir de suelo como de esclerocios, y que se encontró en esclerocios enteros (de apariencia normal pero no siempre viables) y esclerocios vacíos. Además, de todos los aislamientos de *Trichoderma* recuperados en áreas de baja incidencia, el T6 fue el que se halló con mayor frecuencia (40%), mientras que los aislamientos T2, T3 y T4 en conjunto representaron el 45% y el T1 solamente el

10%. Lo anterior podría indicar que este aislamiento tiene un papel importante en la supresión de la enfermedad. Por todas las razones citadas antes, el aislamiento T6 fue el único aislamiento de *Trichoderma* que se eligió para ser usado en la prueba en el invernadero.

Es importante hacer notar que aunque el aislamiento T2 no mostró colonización superficial evidente, un esclerocio presentó crecimiento de *Trichoderma* (Cuadro 6) luego de la desinfección superficial. Esto hace pensar que el esclerocio podía presentar algún tipo de fisura al momento de la inoculación, la que permitió que las esporas de *Trichoderma* ingresaran a una capa interna del esclerocio. De esta forma, el hongo se desarrolló hacia la médula y luego salió por la cáscara del esclerocio, que para ese momento se encontraba vacío; similar a lo que ocurre, de acuerdo con Mischke (1998), con el micoparásito *Sporidesmium sclerotivorum*.

Otro aspecto a recalcar es la aparición de un nuevo aislamiento de *Gliocladium* sp. (denominado en este trabajo como Glio2PA), durante la prueba de colonización y parasitismo de esclerocios. Este *Gliocladium* sp. (Glio2PA), es distinto morfológicamente al *Gliocladium* sp. (Glio) que se utilizó en las pruebas *in vitro*, proveniente de esclerocios tomados del área de baja incidencia de la finca 5.

La aparición de este hongo puede deberse a que los esclerocios (tomados de la misma fuente para todos los tratamientos de la prueba de colonización y parasitismo) o más bien, las hifas a partir de las cuales se formaron estaban "contaminadas" con esporas de *Gliocladium*, desde que fueron extraídos del campo, y que por razones nutricionales, de temperatura, humedad o algún tipo de estrés no identificado, *Gliocladium* tuvo la capacidad para desarrollarse en ese momento específico.

Existe una referencia en Ghana (Tsigbey y Nutsugah, 1999), la cual menciona que luego de 10 días del aislamiento de micelio de *S. cepivorum* a partir de plantas enfermas, se observó el desarrollo de *Gliocladium catenulatum* sobre el punto de inoculación del patógeno. Este *Gliocladium* colonizó y ablandó esclerocios evitando el desarrollo de micelio por parte del patógeno. Los autores sugieren que podría tener un papel importante en el

control biológico de *S. cepivorum*. Aunque en este trabajo no se confirmó que la especie de *Gliocladium* encontrada era *G. catenulatum*, gracias a su capacidad de colonizar y parasitar esclerocios, Glio 2PA se seleccionó para ser utilizado en la prueba en el invernadero

Para la prueba en invernadero se decidió utilizar los aislamientos seleccionados de acuerdo con las pruebas *in vitro*, solos y en mezcla para lograr una "mayor cobertura de antagonismo". Con esto, se trató de evitar la variabilidad en el control biológico, la cual se da como resultado del efecto de factores bióticos o abióticos sobre el antagonista y que interfieren en su eficacia a nivel de campo. Según Guetsky *et al.* (2002) por medio de la aplicación de una estrategia de multimecanismos, en la que un mecanismo compensa a otro, se produce un efecto sinérgico de control, el que probablemente se traduce en un control más efectivo.

La severidad de la enfermedad es la medida más obvia de la efectividad de un tratamiento (Hjeljord y Tronsmo, 1998). Sin embargo, en la prueba realizada en el invernadero no fue posible evaluar esta variable ni la incidencia, debido a que la enfermedad no se presentó durante el período del ensayo. Esto pudo deberse a varias razones, principalmente a la influencia de las condiciones ambientales.

De acuerdo con datos obtenidos en la Estación Experimental<sup>5</sup>, se presentaron temperaturas atípicas, alrededor de 30 C, para esa época del año (Julio-Setiembre 2003). Esto probablemente afectó tanto el inóculo del patógeno como el desarrollo del sistema radical de la cebolla.

Como se sabe, la germinación de los esclerocios es óptima entre 14 a 18 C y termina abruptamente cerca de los 24 C. Además, el crecimiento micelial ocurre entre los 5 a 27 C y se detiene si la temperatura excede el máximo por varias horas al día (Crowe, 1995).

Ya que la temperatura se mantuvo alta para esos meses, las condiciones no fueron favorables para la pudrición blanca. De hecho, durante la prueba se desarrolló la bacteria

---

<sup>5</sup> Información suministrada por M.Sc. Yaneri Gómez, 2003.

*Pseudomonas cepacia*, patógeno que comúnmente se presenta en las siembras de las zonas del valle central, pero no en la zona alta de Cartago, ya que está asociada con la combinación de exceso de humedad en el suelo y altas temperaturas. Se debe recalcar que, en las plantaciones los agricultores notaron baja incidencia de Torbó y aumento de la enfermedad conocida como Raíz rosada (*Pyrenochaeta terrestris*) que se desarrolla entre 24 y 28 C.

Por otro lado, los cultivares de cebolla que se utilizan en la zona alta de Cartago requieren temperaturas entre 10 a 20 C (Gómez, 2002) para un desarrollo satisfactorio.

Además, se pueden mencionar otros factores como:

A) *El desarrollo radical*: como ya se conoce, los esclerocios solamente germinan al recibir el estímulo de los exudados radicales. Al respecto, Bowen y Rovira (1976), Curl (1982) y Lockwood (1986) están de acuerdo en que, generalmente, cualquier clase de estrés (salinidad, infección por nemátodos, compactación de suelo, enfermedades foliares, la sequía o inundación y temperaturas altas o bajas) sobre el crecimiento de la planta induce a un incremento en la exudación. Sin embargo, es posible que, al haberse dado pobre desarrollo radical, el volumen de exudado fuese también pobre o que la concentración de compuestos azufrados no fue suficiente para provocar el estímulo, ya que, según Somerville y Hall (1987), la concentración de los alil sulfuros tiene gran efecto sobre la germinación de los esclerocios.

B) *Las condiciones de manejo*: las características físicas del suelo, especialmente la textura, cambian al ser éste incorporado a macetas sin ningún tipo de material que permita una buena estructura (como granza de arroz, por ejemplo), lo que provocó que el suelo sufriera compactación y saturación de humedad en la mayoría de las macetas. Este fenómeno, según Hartman y Datnoff (1997) puede enmascarar por completo la enfermedad.

Al respecto, Coley Smith y Cooke (1971) mencionan que la sobrevivencia de los esclerocios es mejor en condiciones secas y que un incremento en la humedad del suelo la

reduce. Más específicamente, Crowe y Hall (1980) encontraron que ocurre de 88 a 100% de pérdida de viabilidad de los esclerocios (decaimiento) en suelos saturados (0 a -45 mb) cuando las temperaturas oscilan entre 27 a 30 C.

Con respecto a ese tema, Leggett y Rahe (1985) citan que, los cambios en la microflora, debidos a la saturación del suelo, pueden incrementar el decaimiento de los esclerocios por aumento en la germinación de estos o por promover el parasitismo.

C) *La condición de los esclerocios*: podría pensarse que los esclerocios no estaban lo suficientemente maduros como para germinar. Sin embargo, los esclerocios seleccionados tenían 3 meses o más de producidos, tiempo suficiente para asegurar que se diera la ruptura de la latencia constitutiva.

De acuerdo con Coley Smith (1960) citado por Crowe *et al.* (1980), esta latencia es de un mes o más en el campo, para esclerocios producidos *in vitro*; mientras que Coley Smith (1990) menciona que es de 1 a 3 meses para esclerocios producidos en campo. La prueba se mantuvo por casi tres meses en el invernadero, tiempo suficiente para la germinación de los propágulos, por lo que existe la posibilidad de que germinaron al final de este período, pero que no hubo el tiempo suficiente para que bgraran infectar las plantas, ya que, Somerville y Hall (1987) indican que las raíces de cebolla son capaces de estimular la germinación de esclerocios producidos en cultivo artificial.

Por otro lado, aunque existe la posibilidad de que los esclerocios hubieran perdido su patogenicidad, este proceso de pérdida de virulencia es menos probable en patógenos que no presentan reproducción de tipo sexual. Además, este proceso se da luego de mantener los aislamientos en cultivo por períodos relativamente largos o cuando pasan una o más veces a través de diferentes hospederos (Agris, 1996), situación que no ocurrió con el aislamiento de *Sclerotium* utilizado en esta prueba.

Como no fue posible medir el efecto de los antagonistas en el desarrollo de la enfermedad, se trató de evaluar su efecto sobre las plantas, ya que se conoce que *Trichoderma* y *Gliocladium* pueden actuar como estimuladores o inhibidores del

crecimiento, o bien como inductores de resistencia. Según Harman y Björkman (1998) algunas cepas de estos hongos incrementan la función y el vigor de las raíces, aumentan también el vigor general de la planta y su contenido de clorofila, mejorando el rendimiento y en algunos casos disminuyendo al máximo las aplicaciones de fertilizantes, sobre todo cuando se usan en conjunto con aplicaciones de compost a nivel de invernadero.

La prueba de contrastes ortogonales reveló que no existe diferencia estadística entre el conjunto de tratamientos "Antibiosis" (Bea, Glio y Glio2PA) contra el tratamiento "Tricho" (T6), ni entre "Antibiosis" contra los tratamientos combinados T6+Bea, T6+Glio y T6+Glio2PA, para ninguna de las variables evaluadas. Sin embargo, sí hay diferencias significativas ( $P = 0,025$ ,  $P = 0,0002$  y  $P = 0,031$  respectivamente) entre el tratamiento testigo y el conjunto total de tratamientos "Antag", para las variables longitud radical, longitud foliar y número de hojas (Anexo 7).

Lo anterior indica que, en algún grado, todos los antagonistas ejercieron un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, ya que, el testigo fue el que mostró los valores más bajos para las tres variables, 6,5 cm para la longitud radical, 10,0 cm en cuanto a longitud foliar y solo 1,4 hojas por tratamiento (Figuras 1, 2 y 3).

En relación con este tema, Windham *et al.* (1986) dicen que *Trichoderma* produce una sustancia que aumenta el crecimiento radical y que podría funcionar como una fitohormona. Además, Altomare *et al.* (1996) citados por Harman y Björkman (1998) mencionan que *T. harzianum* es capaz de reducir *in vitro* el manganeso insoluble ( $Mn^{+4}$ ) a manganeso soluble ( $Mn^{+2}$ ) y en las raíces reduce el  $Cu^{+2}$  a  $Cu^{+1}$  y el  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$ . Lo que según Björkman *et al.* (1998) citados por Harman y Björkman (1998) es un mecanismo de solubilización de elementos menores en el suelo, que hace que estos no sean una limitante para el crecimiento de la planta.

Como se sabe, la biología, taxonomía y ecología de *Trichoderma* y *Gliocladium* son muy similares, por lo que es posible que algo parecido esté ocurriendo con los aislamientos de éste último.



Respecto al comportamiento de los tratamientos con *Beauveria bassiana* (Bea y T6+Bea), el segundo fue el que presentó los valores más altos para las tres variables (Figuras 1, 2 y 3), lo que se confirma con los resultados del peso seco de raíz y follaje (Figuras 4 y 5). Aunque, no existe diferencia estadística entre tratamientos, desde el punto de vista biológico, esto podría sugerir que la combinación de mecanismos de acción de estos dos hongos, ya sea directamente sobre la planta o sobre la comunidad microbial, promueve el mejor desarrollo de las plantas. Se sabe que *Beauveria bassiana* produce una gran cantidad de antibióticos, sin embargo no se conoce su efecto sobre plantas o patógenos, ya que este hongo es típicamente entomopatógeno.

Por otra parte, el hecho de que se hallan podido recuperar colonias de la mayoría de los antagonistas aplicados sugiere, en alguna medida, que estos tuvieron la capacidad de establecerse en el suelo. Empero, no se recuperaron de todas las repeticiones, lo que implica que el establecimiento no fue muy efectivo y dependió quizás de las condiciones específicas presentes en cada maceta. Danielson y Davey (1973) citados por Hjeljord y Tronsmo (1998) indican que los conidios son sensibles a la fungistasis del suelo y dependen de una fuente exógena de nutrientes para iniciar su crecimiento; lo que pudo haber influenciado en su establecimiento y desarrollo.

Por último, de acuerdo con los análisis complementarios, no se consiguió relacionar la población de nemátodos con el pobre desarrollo de las plantas, ya que, de acuerdo con Bolaños (2001) en nuestro país el único nemátodo de importancia en el cultivo de cebolla es *Ditylenchus dipsaci*, el cual no fue detectado. Además, según Salazar<sup>6</sup> (2003) para este cultivo es mucho más confiable el análisis nematológico a partir de raíces y no de suelo, como se hizo en este caso.

Por otro lado, con respecto a la influencia que estos organismos podrían estar ejerciendo sobre los antagonistas, Bae y Knudsen (2001) mencionan que los nemátodos fungívoros como *Aphelenchoides*, *Aphelenchus*, *Ditylenchus* y *Tylenchus* pueden afectar negativamente el crecimiento y la eficacia de control de los organismos introducidos. Estos

---

<sup>6</sup> Salazar, L. 2003. Comunicación personal. Métodos de extracción de nemátodos en el cultivo de la cebolla. Laboratorio de Nematología, CIPROC, UCR.

autores encontraron una reducción significativa en el porcentaje de colonización de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* por una cepa de *Trichoderma*, luego de que nemátodos de esos géneros fueron introducidos tanto en suelo estéril como natural.

Sin embargo, el género *Ditylenchus* no fue hallado en el análisis y aunque sí se encontró *Tylenchus*, se registró en mayor cantidad en el tratamiento testigo (11 nemátodos/100 cc de suelo), como se puede ver en el Anexo 6.

## CONCLUSIONES

- 1) Es posible aislar hongos nativos de la zona alta de Cartago que sean antagónicos en el nivel *in vitro* a *Sclerotium cepivorum*.
- 2) Los aislamientos que tienen efecto antagonista *in vitro* contra *Sclerotium cepivorum* son *Beauveria bassiana*, *Gliocladium* spp., *Paecilomyces* sp. y *Trichoderma* spp.
- 3) Los hongos *Beauveria bassiana*, una cepa de *Gliocladium* sp. y otra de *Paecilomyces* sp. inhibieron el crecimiento *in vitro* de *Sclerotium cepivorum* por medio de antibiosis.
- 4) Los hongos *Beauveria bassiana* y *Gliocladium* spp. tienen la capacidad de parasitar *in vitro* esclerocios viables de *Sclerotium cepivorum*.
- 5) El aislamiento T6 de *Trichoderma* fue el que presentó la mayor habilidad saprofítica competitiva *in vitro*.
- 6) Todos los aislamientos evaluados en invernadero influyeron de forma positiva en el crecimiento de las plantas.

## OBSERVACIONES

1) Las anomalías que presentaron los esclerocios en la prueba de inhibición del crecimiento de *Sclerotium cepivorum*, se detectaron luego de un período de 3 meses de almacenamiento a una temperatura cercana a los 14 C, lo que sugiere que las bajas temperaturas podrían estar influyendo en la producción y liberación de metabolitos tóxicos por parte de *Trichoderma*.

2) Los aislamientos de *Sclerotium cepivorum* que se mantuvieron almacenados por ese mismo período y temperatura no presentaron esclerocios atípicos.

3) Algunos esclerocios formaron esclerocios secundarios durante la prueba de colonización y parasitismo. La producción de estos esclerocios no se pudo relacionar con ningún tratamiento específico.

## RECOMENDACIONES

**1)** Identificar a nivel de especie los aislamientos evaluados en este trabajo, con el fin de conocer mejor su biología y ecología, para poder utilizarlos de forma más eficiente en una posible estrategia de control biológico de la pudrición blanca.

**2)** Repetir las pruebas *in vitro* a temperaturas inferiores a las utilizadas, esto tomando en cuenta que en la zona alta de Cartago las temperaturas nocturnas podrían estimular un comportamiento más agresivo de los antagonistas, sobretodo de *Trichoderma*.

**3)** Efectuar una prueba de pregerminación de esclerocios antes de ser incorporados al suelo, como la propuesta por Metcalf y Wilson (1999), en el caso de realizar una prueba similar en el invernadero.

**4)** Realizar una prueba directamente en el campo para la evaluación del efecto antagonista de los aislamientos estudiados en este trabajo.

**5)** Utilizar un sustrato sólido como vehículo en las aplicaciones de los antagonistas en el campo. Esto con el fin de garantizar una base alimenticia, que les proporcione ventaja competitiva sobre la microflora existente, necesaria para el establecimiento efectivo de los hongos.

## LITERATURA CITADA

- AGRIOS, G.N. 1996. Fitopatología. Trad. M Guzmán. 2ed. México, DF, LIMUSA. p. 121-126.
- AYERS, W. A.; ADAMS, P. B. 1981a. Mycoparasitism of sclerotial fungi by *Teratosperma oligocladum*. Can. J. Microbiol. 27: 886-892.
- \_\_\_\_\_.; ADAMS, P. B. 1981b. *Sporidesmium sclerotivorum*: distribution and function in natural biological control of sclerotial fungi. Phytopathology 71: 90-93.
- BAE, Y. S.; KNUDSEN, G. R. 2001. Influence on fungus feeding nematode on growth and biological efficacy of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology. 91(3): 301-306.
- BLANCO, F. 2001. Métodos apropiados de análisis estadístico subsiguientes al análisis de varianza (ANDEVA). Agronomía Costarricense. 25(1): 53-60.
- BOLAÑOS, A. 2001. Introducción a la olericultura. San José, C.R. EUNED. p. 281-301.
- BOWEN, G. D.; ROVIRA, A. D. 1976. Microbial colonization of plant roots. Ann. Rev. Phytopathol. 14: 121- 144.
- \_\_\_\_\_.; COOKE, R.C. 1971. Survival and germination of fungal sclerotia. Ann. Rev. Phytopathol 9: 65-92.
- \_\_\_\_\_. 1990. White rot disease of *Allium*: problems of soil-borne diseases in microcosm. Plant Pathology 39: 214-222.
- \_\_\_\_\_.; MITCHELL, C. M.; SANFORD, C. E. 1990. Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. Plant Pathology 39: 58-69.
- COOK, R. J. 1979. Antagonism and biological control: concluding remarks. In Soilborne plant pathogens. Eds. Schippers, B y Gams, W. New York, Academic Press. p. 653-657.
- \_\_\_\_\_.; BAKER, K. F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Minnesota. APS Press. 539 p.
- COTES, A. M. 2000. Biocontrol of fungal plant pathogens from discovery of potential biocontrol agents to implementation of formulated products. In 6<sup>th</sup> IOBC/WPRS-EFPP Biocontrol Workshop: Biocontrol agents modes of action and their interaction with other means of control. Sevilla, 30 nov-3 dic. p. 24.

- COUCH, B.C.; KOHN, L. M. 2000. Clonal spread of *Sclerotium cepivorum* in onion production with evidence of past recombination events. *Phytopathology* 90: 514-521.
- CROWE, F. J. 1995. White rot. *In* Compendium of onion and garlic diseases. Eds. H.F. Schwartz y S.K. Mohan. Minnesota. APS Press. p 14-16.
- \_\_\_\_\_; HALL, D. H. 1980. Soil temperature and moisture effects on *Sclerotium* germination and infection of onion seedlings by *Sclerotium cepivorum*. *Phytopathology* 70:74-78.
- CROWE, F.J.; HALL, D. H.; GREATHEAD, A. S.; BAGHOTT. 1980. Inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and the incidence of white rot of onion and garlic. *Phytopathology* 70: 64-69.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. 1980. Inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and the incidence of white rot of onion and garlic. *Phytopathology* 70: 64-69. *Fuente original*. COLEY SMITH, J. R. 1960. Studies of the biology of *Sclerotium cepivorum* Berk. IV. Germination of sclerotia. *Ann. Appl. Biol.* 48: 8-18.
- CURL, E. A. 1982. The rhizosphere: relation to pathogen behavior and plant disease. *Plant Dis.* 66(7): 624-630.
- De OLIVEIRA, V. L.; BELLEI, M. M.; BORGES, A. C. 1984. Control of white rot of garlic by antagonists fungi under controlled environmental conditions. *Can. J. Microbiol.* 30: 884-889.
- GALLI, F.; TORRES DE CARVALHO, P. C.; TOKESHI, H.; BALMER, E.; KIMATI, H.; NOGUEIRA, C. O.; LIMA-SALGADO, C.; KRUGNER, T.; NOGUEIRA, E.; FILHO, A. B. 1980. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo, Editora Agronômica Ceres. Vol II. p. 57-58.
- GOMEZ, A. 2002. Análisis económico de la cebolla (en línea). San José, CR. Consultado 04 Jul. 2002. Disponible en <http://www.mercanet.go.cr>
- GUETSKY, R.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; FISCHER, E.; DINOOR, A. 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology*. 92(9): 976-985.
- HARMAN, G. E.; BJÖRKMAN, T. 1998. Potential and existing uses for *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. *In* *Trichoderma* and *Gliocladium* : enzymes, biological control and commercial applications. Eds G. E. Harman y C. P. Kubicek. Vol 2. Padstow, UK. Taylor y Francis Ltd. p 229-261.

- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 1998. Potential and existing uses for *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In *Trichoderma and Gliocladium : enzymes, biological control and commercial applications*. Eds G. E. Harman y C. P. Kubicek. Vol 2. Padstow, UK. Taylor y Francis. Ltd. p 229-261. *Fuente original*. ALTOMARE, C.; BJÖRKMAN, T.; NORVELL, W. A.; HARMAN, G. E. 1996. Solubilization of manganese dioxide by the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* strain 1295-22. Abstracts Int. Union Microbiol. Soc., Jerusalem, p. 171.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 1998. Potential and existing uses for *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In *Trichoderma and Gliocladium : enzymes, biological control and commercial applications*. Eds G. E. Harman y C. P. Kubicek. Vol 2. Padstow, UK. Taylor y Francis. Ltd. p 229-261. *Fuente original*. BJÖRKMAN, T.; BLANCHARD, L. M.; HARMAN, G. E. 1998. Growth enhancement of shrunken-2 sweet corn with *Trichoderma harzianum* strain 1295-22: effect of environmental stress. J. Am. Soc. Hort. Sci. 123: 35-40.
- HARTMAN, G.; DATNOFF, L. 1997. Vegetable Crops. In *Soilborne diseases of tropical crops*. Eds R.J. Hillocks y J.M. Waller. CAB INTERNATIONAL. Cambridge, University Press. p.161-162.
- HJELJORD, L.; TRONSMO, A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In *Trichoderma and Gliocladium : enzymes, biological control and commercial applications*. Eds G. E. Harman y C. P. Kubicek. Vol 2. Padstow, UK. Taylor y Francis Ltd. p 131-151.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In *Trichoderma and Gliocladium : enzymes, biological control and commercial applications*. Eds G. E. Harman y C. P. Kubicek. Vol 2. Padstow, UK. Taylor y Francis Ltd. p 131-151. *Fuente original*. DANIELSON, R. M.; DAVEY, C. B. 1973. Effects of nutrients and acidity on phialospore germination of *Trichoderma in vitro*. Soil Biol. Biochem. 5: 517-524
- JOHNSON, L. F.; CURL, E. A.; BOND, J. H.; FRIBOURG, H. A. 1960. Methods for studying soil microflora plant disease relationships. 2 ed. Minneapolis. Burgess Publishing Company. p 54-64.
- KAY, S. J. ; STEWART, A. 1994. Evaluation of fungal antagonists for control of onion white rot in soil box trials. Plant Pathology 43: 371-377.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 1994. Evaluation of fungal antagonists for control of onion white rot in soil box trials. Plant Pathology 43: 371-377. *Fuente original*. GHAFAR. A. 1969. Biological control of white rot of onion I. Interactions of soil microorganisms with *Sclerotium cepivorum* Berk. Mycopathologia et Micologia Applicata 38: 101-111.
- LEGGETT, M. E.; RAHE, J. E. 1985. Factors affecting the survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* in the Fraser Valley of British Columbia. Ann. Appl. Biol. 106 : 255-263.



- LOCKWOOD, J. L. 1986. Soilborne plant pathogens: concepts and connections. *Phytopathology*. 76(1): 20-27.
- MCLEAN, K. L.; STEWART, A. 2000. Application strategies for control of onion white rot by fungal antagonists. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 28: 115-122. *Sólo resumen*.
- MESÉN, R. 1997. Efecto de tres sistemas de labranza y una enmienda sobre la densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* y el manejo de la pudrición blanca de cebolla en Costa Rica. Tesis Mag. Sc. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 115 p.
- METCALF, D. A.; WILSON, C. R. 1999. Histology of *Sclerotium cepivorum* infection of onion roots and the spatial relationships of pectinases in the infection process. *Plant Pathology* 48: 445-452.
- MISCHKE, S. 1998. Mycoparasitism of selected sclerotia forming fungi by *Sporidesmium sclerotivorum*. *Can. J. Bot.* 76: 460-466.
- OBREGÓN, M. 2001. Evaluación *in vitro* del poder antagónico de *Trichoderma harzianum* Rifai con respecto al hongo fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* Berkeley causante de la enfermedad "Torbó en cebolla". In XLVII Reunión Anual del PCCMCA Resúmenes. San José, Costa Rica. p.19.
- OLIVEIRA, V. L.; BELLEI, M. M.; MENEZES-SOBRINHO, J.; FERREIRA, F. A. 1982. Ação antagônica de *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus* e *Penicillium* sp. sobre *Sclerotium cepivorum*, causador da podridão branca do alho. *Fitop. Bras.* 7(3): 531.
- RAI, J. N.; SAXENA, V. C. 1975. Sclerotial mycoflora and its role in natural biological control of "white rot" disease. *Plant and Soil* 43: 509-513.
- SOMERVILLE, P.A.; HALL, D.H. 1987. Factors affecting sclerotial germination of *Sclerotium cepivorum*, secondary sclerotia formation and germination stimulants to reduce inoculum density. *Plant Dis.* 71: 229-233.
- TSIGBEY, F. K.; NUTSUGAH, S. K. 1999. *Gliocladium catenulatum* in association with *Sclerotium cepivorum* on onion leaves in Ghana. *Plant Dis.* 83: 198.
- WALKER, J. C. 1969. *Plant pathology*. 3 ed. New York, Mc Graw-Hill. p. 345-347.
- WINDHAM, M. T.; ELAD, Y.; BAKER, R. 1986. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76: 518-521.