

Evaluación de hongos y bacterias aislados de gallinaza en el biocontrol de *Sclerotium cepivorum* Berk

Gallinaza's isolated fungi and bacteria evaluation, in the *Sclerotium cepivorum* Berk biocontrol

Fecha de Recepción: 15 de marzo de 2013
Fecha de Aceptación: 11 de noviembre de 2013

Gladys Amparo Sarmiento¹, Jorge Velandía Monsalve²

Resumen

Objetivo. Seleccionar hongos y bacterias de la gallinaza por su capacidad antagónica en el biocontrol de *S. cepivorum* in vitro y en invernadero. **Materiales y métodos.** De dos fuentes de gallinaza, una pura y otra compuesta, se tomaron sendas muestras de 100 g, se colocaron en erlemeyers, se agregó agua destilada estéril hasta completar un litro y se agitó durante 5 minutos. A partir de esta suspensión se prepararon diluciones de 1×10^{-1} hasta 1×10^{-4} , y se evaluó el crecimiento y esporulación de *S. cepivorum*. Los microorganismos seleccionados in vitro fueron evaluados en el control de la enfermedad en invernadero. Se evaluó la incidencia de la enfermedad y el porcentaje de plantas muertas. **Resultados.** De las dos fuentes de gallinaza se aislaron 13 colonias de hongos y 26 de bacterias, para un total de 39 aislamientos, de los cuales, tras ser evaluados in vitro, fueron seleccionados tres aislamientos de hongos (H2, H5, H6) y una bacteria (B21) por su capacidad antagónica

Abstract

Objective. Two fungi and bacteria selected samples, were taken from a composted hen manure, in order to evaluate its antagonistic capacity as a biocontroller, both in vitro and in greenhouse, to the *Sclerotium cepivorum*, which rots the onion bulbs, a problem that has become a major production constraint for this crop in Boyacá. **Materials and methods.** Two pure and floor manure sources, were composted during three months. Some fungi and bacteria isolated samples, were selected for their antagonistic capacity for the biocontrol of *S. cepivorum* in vitro and greenhouse. For each of the composted hen droppings sources, were taken 100 g, and placed in an Erlenmeyer. Some sterile water was added to complete a liter, then stirred up for 5 minutes, and incubated during three days. This suspension was diluted from 1×10^{-1} to 1×10^{-4} , and 0.5 ml. Then, in vitro test evaluations were carried out with the colonized sources, by *S. cepivorum* sporulation, to measure both its growth and its bio-control effectiveness. The colonized

1 Ingeniera Agrónoma. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

2 Ingeniero Agrónomo MsC. Docente Programa de Ingeniería Agronómica. Universidad de los Llanos. e-mail jvelandi@hotmail.com

a *S. cepivorum*, a los 6, 9, 12 y 15 días, y la producción de esclerocios, con diferencias altamente significativas en comparación con el testigo. Los aislamientos H2 y H6 corresponden al género *Trichoderma*; el H5, a *Penicillium*, y B21, a *Bacillus*. Con H2, H5, H6 y B21, los síntomas de la enfermedad fueron observados en la semana 13, con una incidencia del 20%, y en el testigo, en la semana novena, con una incidencia del 70%, y 40% de muerte de plántulas. **Conclusión.** Las gallinazas son una fuente de microorganismos biocontroladores de *S. cepivorum*.

Palabras clave: Biocontrol, microorganismos, hongos antagónicos, bacterias antagónicas. (Fuente: USDA).

hen droppings sources were separated in 13 fungi colonies, from 26 of bacteria. Once isolated were tested in vitro samples, three fungi were selected (H2, H5, H6) and one of bacteria (B21) for their antagonistic capacity to *S. cepivorum*, at 6, 9, 12 and 15 days, and the sclerotia production, with highly significant differences compared with the biological control. The microorganisms selected were evaluated for their capability to operate as disease control, both in vitro as in greenhouse. Onion seedlings were dipped in the biocontrol suspension (1×10^{-6} conidia/ml for fungi, and 1×10^{-8} cfu/ml in the case of bacteria). The seedlings were transplanted into sterilized soil and inoculated with *S. cepivorum* (1 esclerocio/2 g of soil). The disease percentage incidence is shown in the dead plants rate. **Results.** In the H2, H5, H6 and B21 the diseases symptoms were observed at the week 13th, with a 20% incidence and the control in the ninth week, with a 70% and 40% incidence in the seedling death. The H2 and H6 isolations, belong to the gender *Trichoderma*, the H5 to *Penicillium* and the H21 to *Bacillus*. **Conclusion.** Hen droppings are a microorganism source for the *S. cepivorum* biological control.

Key words: Biocontrol, microorganisms, Hongos antagonics, antagonics bacteriy (Source: USDA).

Introducción

El hongo *Sclerotium cepivorum* es un habitante del suelo, de amplia distribución en clima templado y subtropical; causa amarillamiento general, continuado por muerte descendente de las hojas más externas, y retardo del crecimiento. El patógeno, que afecta específicamente al género *Allium* (1, 2), produce estructuras de resistencia denominadas esclerocios, las cuales le permiten sobrevivir en el suelo durante largos periodos (4 a 5 años) en condiciones climáticas adversas; cuando las condiciones del suelo son favorables, germinan e infectan las plantas a nivel del suelo; así, esas estructuras son de primordial importancia en la supervivencia y epidemiología del hongo (3). A pesar de su resistencia, investigaciones sobre agentes de biocontrol han demostrado que los esclerocios del fitopatógeno son vulnerables al ataque de muchos microorganismos, algunos de los cuales pueden ocasionarle la muerte (4).

Arcia y Acevedo (1989) determinaron el grado de parasitismo y la efectividad de *Trichoderma spp.* como agente de biocontrol de *S. cepivorum* in vitro; observaron que las hifas de *S. cepivorum* en contacto con las hifas de *Trichoderma* presentaron el contenido interno desorganizado, en algunos casos vacío, desarrollándose hifas de *Trichoderma* en su interior, que emergían de los ápices de las hifas del patógeno. Además, observaron cambios en las estructuras de los esclerocios mantenidos en contacto con *Trichoderma* durante 2 meses, presentando el pseudoparénquima (corteza) agrietado, necrosis en el parénquima y algunas veces vacío.

A pesar de los numerosos estudios para el control de este patógeno, el empleo indiscriminado de productos químicos sigue siendo una de las principales medidas utilizadas por los agricultores para reducir sus daños; pero el control del patógeno por medio de prácticas convencionales se ha revelado difícil, debido a sus características epidemiológicas, y, por otro lado, el uso indiscriminado de plaguicidas es cuestionado a diario debido al grave impacto que ocasiona sobre el medioambiente. Por su parte, el control biológico se ha evidenciado como una opción viable de comprobada eficiencia, principalmente, en el control de hongos del suelo (6, 7, 8). El presente

trabajo de investigación se realizó con el objetivo de seleccionar hongos y bacterias de la gallinaza por su capacidad antagonica en el biocontrol de *S. cepivorum* in vitro y en invernadero.

Materiales y métodos

Hongos y bacterias aislados de la gallinaza fueron evaluados en el biocontrol de *S. cepivorum*, en el Laboratorio de Fitopatología y en el invernadero del programa de Ingeniería Agronómica de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. De cada gallinaza (pura y de tres meses de compostada) se tomaron 100 g, que se depositaron en sendos erlemeyers que contenían un litro de agua destilada esterilizada; se agitó y se prepararon diluciones de 1×10^{-1} hasta 1×10^{-4} ; 0,5 ml de la mayor dilución se colocaron en los medios de cultivo PDA y AN, y se incubó a 25 °C durante tres días. Los aislamientos se identificaron con una letra y un número: los hongos con H y las bacterias con B.

Evaluación de biocontroladores de *S. cepivorum*.

Cada una de las colonias de hongos y bacterias fueron evaluadas por separado, con el fin de observar cuál de ellas afectaba en mayor proporción el crecimiento de *S. cepivorum* in vitro. Se utilizó el diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento. La unidad experimental consistió en una caja de petri con PDA. En el centro de la caja de petri se realizó la siembra de *S. cepivorum*, y sobre los ejes horizontal y vertical, a una distancia de 3 cm del centro, se colocó un disco de PDA de 7 mm de diámetro, colonizado por el biocontrolador. Las cajas se dejaron en incubadora a 25 °C, y el crecimiento de la colonia de *S. cepivorum* se registró cada tres días durante quince días. El testigo consistió en siembras del patógeno sin biocontroladores en el centro de las cajas de petri con PDA, y cuando el medio de cultivo fue invadido por el patógeno se dio por terminada la prueba. Al finalizar la prueba, sobre cada uno de los ejes horizontal y vertical y a 12 mm del centro de la caja se cortó el medio con un sacabocados de 7 mm, y se realizó el conteo de esclerocios, con la ayuda de un estereoscopio.

A los datos obtenidos del crecimiento y esporulación de *S. cepivorum* se les aplicó las pruebas estadísticas de Anava y Tukey. Los hongos

o bacterias que más afectaron el crecimiento y esporulación de *S. cepivorum* se evaluaron en el biocontrol de *S. cepivorum* en plántulas de cebolla en condiciones de invernadero.

Evaluación de biocontroladores de *S. cepivorum* en plántulas de cebolla bajo condiciones de invernadero. Los hongos seleccionados por la capacidad biocontroladora de *S. cepivorum* in vitro fueron propagados en arroz estéril, y las bacterias, en Agar nutritivo. Con cada uno de los hongos biocontroladores se utilizó una concentración de 1×10^6 conidias/ml, y con las bacterias, 1×10^8 células/ml, con las cuales se prepararon las correspondientes suspensiones. Las raíces de 10 plántulas de cebolla de 40 días fueron sumergidas durante 10 minutos en cada una de las suspensiones de hongos y bacterias preparadas; luego, las plántulas fueron trasplantadas a bolsas negras de 1 kg que contenían suelo esterilizado (a 120 °C, 15 PSI, durante 30 minutos), el cual fue inoculado con *S. cepivorum* a razón de 2 esclerocios por gramo de suelo, para un total de 500 esclerocios por kilo de suelo. Se utilizaron tres testigos: uno inoculado con *S. cepivorum*, otro sin inoculación y un tercero tratado con el fungicida Nativo con una concentración de 2 cm/L. Las plántulas se dejaron en el invernadero y se utilizó el diseño experimental DCA (Diseño Completamente al Azar) con un total de 7 tratamientos, cada uno con cinco repeticiones, para un total de 35 unidades experimentales. Se llevó un registro semanal de incidencia de la enfermedad y altura de las plántulas. Los resultados obtenidos fueron analizados por la prueba de Anava y Tukey, utilizando el paquete estadístico SPSS 11.5.

Identificación de microorganismos. Para identificar los hongos seleccionados por su eficiencia en el biocontrol de *S. cepivorum* se realizaron microcultivos, y con base en sus características morfológicas descritas en las claves taxonómicas de Imperfect Fungi de Barnett (2003), se realizó la identificación a nivel de género. La identificación de la bacteria se hizo por medio de pruebas bioquímicas complementadas con la descripción de las características culturales de las colonias en el medio de cultivo AN siguiendo el protocolo de Schaad (2001).

Resultados y discusión

El número total de colonias de bacterias aisladas duplicó al de los hongos (Tabla 1), y la población de hongos y bacterias fue mayor con la gallinaza compuesta; la diferencia entre hongos y bacterias se explica porque el proceso de reproducción de las bacterias es más rápido, en promedio, la bacteria se reproduce cada 20 minutos (10), y los hongos requieren de mayor tiempo. En la gallinaza compuesta se encontró el mayor número de hongos y bacterias porque contiene residuos de tejido vegetal, como cascarilla de arroz o aserrín, los cuales pueden mejorar las condiciones del medio para el crecimiento de los microorganismos.

TABLA 1. POBLACIÓN DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE DOS FUENTES DE GALLINAZA

Fuente de gallinaza	Hongos	Bacterias	Total
Gallinaza pura	5	13	18
Gallinaza compuesta	8	13	21
Total	13	26	39

Capacidad antagónica de los microorganismos en el biocontrol de *S. cepivorum*. De los 13 aislamientos de hongos evaluados por su eficiencia en el biocontrol de *S. cepivorum*, fueron preseleccionados 7, identificados con los códigos H1, H2, H3, H5, H6, H12 y H13, por su capacidad antagónica en el biocontrol de este fitopatógeno en el medio de cultivo PDA, debido a que a partir del tercer día de iniciado el experimento cubrieron totalmente el medio de cultivo, impidiendo el crecimiento y la esporulación de *S. cepivorum*, y tres, H2, H5 y H6, por presentar diferencias en el color y el crecimiento de la colonia en PDA; los demás presentaban características similares en el color y crecimiento de la colonia. De los 26 aislamientos de bacterias evaluadas en el biocontrol de *S. cepivorum* en PDA, el aislamiento B21 fue preseleccionado porque durante los 15 días del experimento fue el que más restringió el crecimiento de *S. cepivorum*; a los 12 días de iniciado el experimento se presentó un color negro en el borde de la colonia de *S. cepivorum*, impidiendo el crecimiento de este patógeno; con

este aislamiento la prueba se repitió 3 veces, verificando así el resultado anterior.

Evaluación de microorganismos preseleccionados en el biocontrol in vitro de *S. cepivorum*. Se estableció que los aislamientos de hongos H2 y

H6 y la bacteria B21, obtenidos de la gallinaza compuesta, y el aislamiento H5, obtenido de la gallinaza pura, afectaron el crecimiento de *S. cepivorum* con diferencias altamente significativas en comparación al testigo durante los 6, 9 y 12 días del experimento.

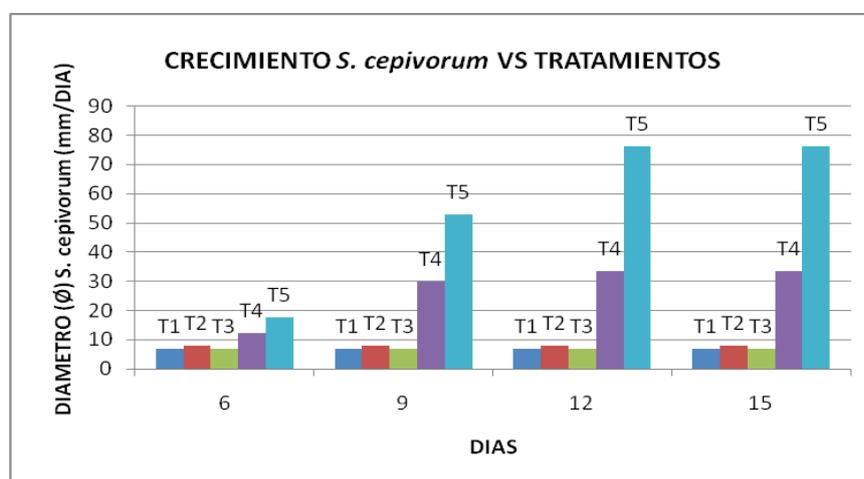
TABLA 2. EVALUACIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS POR SU CAPACIDAD ANTAGÓNICA EN EL BIOCONTROL DE *S. cepivorum*

TRATAMIENTOS	Diámetro de la colonia de <i>S. cepivorum</i> (mm/día)				N.º de esclerocios/ mm
	6	9	12	15	
T1 COMP. (Sc.x H2)	7c	7c	7c	7c	0 b
T2 PU. (Sc x H5)	8c	8c	8c	8c	0 b
T3 COMP. (Sc x H6)	7c	7c	7c	7c	0 b
T4 COMP. (Sc x B21)	12.2 b	29.8 b	33.6 b	33.6 b	5.4 b
T5 TESTIGO	17.8 a	53 a	76.2 a	76.2 a	50.8 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p > 0.05$)

Los aislamientos de los hongos fueron más eficientes que la bacteria B21 en el control del crecimiento de *S. cepivorum*. Con la bacteria B21 se observó el crecimiento de *S. cepivorum* hasta los 12 días, después de este tiempo apareció un color negro en el borde de la colonia de *S. Cepivorum*, impidiendo el crecimiento de este. Este resultado confirma lo expuesto por Bosah *et al.* (2009), quienes afirman que los antagonistas pueden actuar contra un patógeno por medio de

los mecanismos de la competencia, la antibiosis, el parasitismo y la depredación o inducir la resistencia en plantas; las enzimas hidrolíticas excretadas por los antagonistas son una característica bien conocida del micoparasitismo. La quitinasa y β -1, 3 glucanasa son enzimas especialmente importantes que controlan el hongo, como resultado de su capacidad para degradar los componentes fungicidas de la pared de la célula quitina y β -1, 3 glucan (12).



T1. Biocontrolador H2, T2. Biocontrolador H5, T3. Biocontrolador H6, T4. Biocontrolador B21, T5. Testigo Absoluto.

FIGURA 1. CRECIMIENTO DE *S. cepivorum* (mm/día) CON RESPECTO A LOS TRATAMIENTOS DE BIOCONTROLACIÓN

Eficiencia del biocontrol en plántulas de cebolla bajo condiciones de invernadero.

La producción de esclerocios de *S. cepivorum* fue menor con los biocontroladores H2, H5, H6 y B21 en comparación al testigo, con diferencias altamente significativas. Los biocontroladores con los hongos (H2, H5, H6) inhibieron la formación de esclerocios por *S. cepivorum* en mayor grado que con B21, sin presentar diferencias estadísticas entre sí. La evaluación de los microorganismos H2, H5, H6 y B21 en el biocontrol de la pudrición blanca en plántulas de cebolla bajo condiciones de invernadero demostró que los primeros síntomas de la enfermedad, caracterizados por un amarillamiento general, continuado por muerte descendente de las hojas más externas y retardo del crecimiento (1), se presentaron en los testigos químico e inoculado en la novena semana después de realizadas las inoculaciones, con una incidencia del 20% y del 20%, y con H2, H5, H6 y B21, en la semana 13. Al terminar la prueba, la incidencia de la enfermedad y el porcentaje de plantas muertas fue del 40% y el 20% en el testigo químico; del 80% y el 40% en el testigo inoculado con *S. cepivorum*, y del 20% y el 0% con los biocontroladores.

De estos resultados se concluye que los aislamientos H2, H5, H6 y B21 fueron efectivos en el biocontrol de *S. cepivorum* in vitro e invernadero.

Efecto del biocontrol de *S. cepivorum* sobre el crecimiento de las plántulas de cebolla.

De acuerdo con los resultados obtenidos del ANAVA, se evidencia que los tratamientos presentaron efectos estadísticos en la altura de plantas. La altura de las plantas fue mejor y consistente con la inoculación de los biocontroladores, superando al testigo con y sin inoculación de *S. cepivorum*, y al testigo químico con diferencias estadísticas desde la semana 4 hasta la 16. Entre los testigos, la altura de las plantas fue mejor con el testigo absoluto en comparación al testigo químico y testigo inoculado con *S. cepivorum*, presentando diferencias estadísticas desde la semana 10 a la 16; estos resultados corroboran los obtenidos por Galeano et al. (2006), que establecieron que algunos microorganismos biocontroladores estimulan el crecimiento de las plantas.

Referencias bibliográficas

- (1) Chupp C, Sherf AF. Vegetables diseases and their control. New York. Ronald Press 1960: 393-394.
- (2) Galli F, Torres-de-Carvalho PC, Tokeshi H, Balmer E, Kimati H, Nogueira CO et al. Manual de fitopatología: doenças das plantas cultivadas. Editora Agronômica Ceres, São Paulo; 1980.
- (3) Castellano M. Cátedra de Fitopatología. Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE), Sargento Cabral; 2000.
- (4) Cundom M, Mazza G, Silva M. Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y/o bactericida. Rev Cien Tec 2004; 1(2): 2000-2029.
- (5) Arcia A, Acevedo R. Control integrado de la pudrición blanca del ajo (*Sclerotium cepivorum Berk*). Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela; 1989.
- (6) Alcalá D, Vargas N. Efectos de extractos vegetales y fungicidas sobre el crecimiento micelial de *S. rolfsii* y *T. bassicola* in vitro. Memorias del XVI Congreso Venezolano de Fitopatología, Lara Venezuela; 1999.
- (7) Stauffer A, Orrego A, Aquino A. Evaluación de extractos vegetales para el control de patógenos. Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Protección Vegetal, Universidad Nacional de Asunción; 2004.
- (8) Zapata R, Sanabria M, Rodríguez D. Reducción del desarrollo de hongos fitopatógenos con extracto de Cardón lefaria (*Cereus deficiens* Otto & Diert). Interciencia 2003; 28(5): 302-306.
- (9) Barnett HL, Hunter BB. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota, USA; 2003.
- (10) Shad NW. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American

- Phytopathological Society, St. Paul Minnesota, USA; 2001.
- (11) Bosah O, Igeleke CA, Omorusi VI. *In vitro* microbial control of pathogenic *Sclerotium rolfsii*. *Int J Agric Biol* 2009; 12: 474-476.
- (12) Henis Y, Chet I. Microbiological control of plant pathogens. *Adv Appl Microbiol* 1975; 19: 85-111.
- (13) Galeano M, Méndez F, Urbaneja A. Efecto de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre cultivos hortícolas. *Rev Cien Tec* 2006; 3(1): 2345-2351.