

ACCIÓN ANTAGÓNICA IN VITRO DE *Clonostachys rosea* F. SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Botrytis cinerea* PERS. Y *Fusarium oxysporum* F PROCEDENTE DE *Asparagus officinalis* L.

ANTAGONISTIC ACTION IN VITRO *Clonostachys rosea* F. ON THE GROWTH OF *Botrytis cinerea* Pers. AND *Fusarium oxysporum* F. FROM *Asparagus officinalis* L.

Milagros Vásquez-Sangay

RESUMEN

El espárrago es uno de los productos de mayor exportación en el Perú y están sujetas a estándares de calidad que supone la ausencia de plagas y enfermedades. En este trabajo se plantea evaluar la acción antagonista in vitro de *Clonostachys rosea* F. sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* Pers. y *Fusarium oxysporum* F procedente de cultivos *Asparagus officinalis* L. en la Empresa Agroindustrial Barraza. Los hongos: *B. cinerea* Pers., (Fam: Moniliaceae) y *F. oxysporum* F. son capaces de infectar a través de las raíces o las hojas destruyendo los haces vasculares lo que conlleva a la muerte de la planta. Una posible alternativa para el control de esta enfermedad es *C. rosea*, un hongo de acción antagonista contra una amplia variedad de hongos fitopatógenos, las cuales actúan degradando hifas. En el marco de esta investigación se realizó el presente trabajo con cinco tratamientos y tres repeticiones (T1: *C. rosea*, T2: *F. oxysporum*, T3: *B. cinerea*, T4: *F. oxysporum* Vs *C. rosea*, T5: *B. cinerea* Vs *C. rosea*). Sembrándose los hongos en placas Petri con agar Sabouraud al 4% y se evaluó a los 3, 7, 10, 13 y 15 días de incubación. Los datos fueron evaluados mediante la escala de Bell et al (1892) y la Fórmula de Ezziyani. El porcentaje de inhibición que se obtuvo para *F. oxysporum* fue de 81,38% y para fue de *B. cinerea* 61,93%. El grado de antagonismo obtenidos para los hongos fitopatógenos fueron de Clase 1 y Clase 2 para *F. oxysporum* y *B. cinerea*, respectivamente; se concluye que *C. rosea* efectúa acción antagonista in vitro sobre *F. oxysporum* y *B. cinerea*.

Palabras clave: Inhibición, antagonismo, pobredumbre gris, fusariosis del espárrago.

ABSTRACT

Asparagus is one of the major export products in Peru and are subject to quality standards that assumes the absence of pests and diseases. This paper proposes to evaluate the in vitro antagonistic action of *Clonostachys rosea* on the growth of *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum* Pers F from cultures *Asparagus officinalis* L. in the Agroindustrial Barraza. Fungi: *B. cinerea* Pers, (Fam: Moniliaceae) and *F. oxysporum* are able to infect the roots through or destroy the vascular sheets which leads to the death of the plant. One possible alternative for the control of this disease is *C. rosea*, a fungus antagonistic action against a broad range of phytopathogenic fungi, which act to degrade hyphae. As part of this research is conducted in this paper with five treatments and three replicates (T1: *C. rosea*, T2: *F. oxysporum*, T3: *B. cinerea*, T4: *F. oxysporum* vs *C. rosea*, T5: *B. C. rosea* Vs *B. cinerea*). Fungi being sown in Petri dishes with agar Sabouraud 4% and was evaluated at 3, 7, 10, 13 and 15 days of incubation. Data were evaluated using the scale of Bell et al (1892) and the formula Ezziyani. Percent inhibition was obtained for *F. oxysporum* was 81.38% and was *B. cinerea* 61.93%. The degree of antagonism obtained for the fungal pathogens were class 1 and class 2 for *F. oxysporum* and *B. cinerea*, respectively, it is concluded that *C. rosea* performed in vitro antagonistic action on *F. oxysporum* and *B. cinerea*

Key words: inhibition, antagonism, pobredumbre gray, fusariosis of asparagus.

Recibido: 9 Diciembre de 2012

Aceptado: 29 de Enero de 2013

INTRODUCCIÓN

El "espárrago" (*Asparagus officinalis*) pertenece a la familia Asparagaceae. Es una planta herbácea perenne cuyo cultivo dura bastante tiempo en el suelo, del orden de 8 a 10 años, desde el punto de vista de vida económica rentable. La planta de espárrago está formada por tallos aéreos ramificados y una parte subterránea constituida por raíces y yemas, que es lo que se

denomina comúnmente “garra”. De los brotes jóvenes se obtienen las verduras conocidas como “espárragos” (Stevens, 2008).

La producción de espárragos a nivel mundial se ha constituido durante los últimos años en una actividad con un creciente auge especialmente en las exportaciones, por ser un producto con un nivel preferencial en el mercado internacional que le permite obtener elevados beneficios (Agreda & Granda, 1999).

En la actualidad el Perú es el primer país exportador de espárragos del mundo, habiendo logrado desplazar a importantes países productores como China y Estados Unidos, debido a que las condiciones climáticas le permiten producir durante todo el año (CPE, 2000).

Las exigencias de calidad que impone el mercado externo están referidas a frutos de apariencia llamativa por su color y tamaño, ausencia de plagas y enfermedades y por supuesto, buen sabor. En términos fitosanitarios los problemas más serios que enfrentan los productores son las enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus y nematodos, las cuales inciden no sólo sobre la calidad sino también en la cantidad de la producción (Zapata y col., 2002).

Dentro de los principales problemas que afectan el cultivo de espárrago son las plagas y enfermedades que limitan su producción generando gastos por el uso de plaguicidas (González, 2005).

Las plagas más comunes que afectan al cultivo del espárrago son: *Prodiplosis longifila*, *Heliothis virescens*, *Copitarsia decolora*, *Spodoptera eridania*, *Elasmopalpus lignosellus*, etc. Dentro de las enfermedades tenemos a *Puccinia asparagi*, *Stemphillium vesicarium*, *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinérea* (Cisneros, 1995).

Una de las principales enfermedades es el moho gris causado por *Botrytis cinerea* Pers, perteneciente a la Familia Moniliaceae cuya fase infectante son los conidiosporas las cuales atacan especialmente al turión, dando lugar a una podredumbre blanda que posteriormente se cubrirá con un micelio grisáceo que posteriormente se tornará blanco. Esta es una enfermedad favorecida por la mala ventilación y el exceso de humedad ambiental. Los daños se reducen a la pérdida de turiones y a la disminución de la capacidad fotosintética (Guédez y col., 2009).

El hongo sobrevive al invierno en la corteza y yemas del espárrago; y en el suelo en restos en descomposición de órganos infectados. También forma estructuras de resistencia llamadas esclerocios, incrustadas en los sarmientos como pequeñas piedrecitas negras. La penetración es facilitada por daño de oídio y heridas causadas por insectos y pájaros. Los veranos secos reducen significativamente el riesgo de *Botrytis*, y las aplicaciones de rutina. Las plantas ubicadas en lomajes con exposición norte, tienen pocas posibilidades de desarrollar la enfermedad. Sin embargo, con la tendencia a cosechar tardíamente, en búsqueda de madurez, aumentan los riesgos de lluvias y pérdidas por este hongo (Rivera, 2007).

Otra enfermedad muy común es el hongo *Fusarium oxysporum* F., Tuberculariaceae, cuya fase infectante son clamidosporas las cuales se introducen en la planta a través de las heridas, cuyo origen puede ser desde el laboreo del suelo, tratamientos mecanizados, causados por accidentes naturales, ataques de plagas, etc. Generalmente ingresa por las raíces destruyendo los haces vasculares lo que conlleva a la muerte de la planta (Butin & Peredo, 1986). Los síntomas suelen manifestarse en verano, con la aparición de plumeros cloróticos, a continuación toman una apariencia plateada, pero sin sufrir caída de cladodios; si seccionamos transversalmente se observa la presencia de oxidaciones en los haces vasculares, además de necrosis en la zona cortical. A nivel del sistema radicular, las raíces principales muestran un vaciado total de las sustancias de reserva, dejando la epidermis hueca.

Durante la recolección puede tener lugar el decaimiento y marchitamiento rápido del turión, que se ve invadido superficialmente por una capa micelar blanca o rosada (Ellis, 1971). La temperatura

óptima para la infección (20-30 °C) es muy similar a la óptima para el crecimiento de las especies de "fusarium" patógenas de espárrago, siendo más favorecido por temperaturas más altas *F. solani* que *F. oxysporum* y *F. proliferatum*. El efecto de la temperatura en los síntomas aéreos se modifica en función de la humedad relativa, siendo aquellos más graves cuando esta supera el 90% (Corpas y col., 2006). Como métodos de control para estas enfermedades tenemos el control mecánico y cultural como prevención además del control biológico y químico que es muy utilizado. Control Biológico es la represión de las plagas mediante sus *enemigos naturales*; es decir, mediante la acción de predadores, parásitos y patógenos. Los *patógenos* son microorganismos: virus, rickettsias, bacterias, protozoarios, hongos y nemátodos, que causan enfermedades o epizootias entre las plagas (Cisneros, 1995).

Como una posible alternativa para el control biológico de esta enfermedad se han descrito el uso de diversos hongos antagonistas, tales como: *Trichoderma sp.*, *Ulocladium oudemansii*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.*; nemátodos y bacterias (Ellis, 1971). Estos agentes de control no se aplican de forma comercial o intensiva en este cultivo, sin embargo cabe resaltar los estudios realizados en *Clonostachys rosea* un hongo Hyphomycete ampliamente distribuido que a menudo actúa como un parásito de otros hongos del suelo y el cual también ha sido reportado como un parásito potencial contra nemátodos e insectos (Sutton, 1994).

C. rosea es un saprófito común en todo el mundo, con efectos destructivos en diversos hongos fitopatógenos, es decir, presenta acción antagónica contra una amplia variedad de agentes fúngicos, dicha actividad está relacionada con la secreción de celulasas, β -1,3-glucanasas, proteasas e incluidas las quitinasas, las cuales actúan degradando las hifas de otros hongos (Papavizas, 1985). Otro aspecto importante de mencionar es que *C. rosea* no crece a la temperatura del cuerpo humano y sus efectos toxicológicos (dermales, oculares) mediante pruebas de alimentación en conejos y ratas han sido nulos, es decir es un producto inocuo para los seres humanos (Sutton y col., 1993).

En Costa Rica *C. rosea* también ha reportado como un importante micoparásito contra *B. cinerea* en "fresa" la cual es una importante enfermedad en este cultivo, logrando reducir pérdidas de la fruta cuando se utiliza como biocontrolador (Chaves & Wang, 2004). En Chile, un estudio realizado en el uso de diversos biocontroladores contra *B. cinerea* en viveros forestales en plantas de *Eucalyptus* y *Pinus*, determinó que la aplicación de cepas de *C. rosea* tiene un efecto positivo en el control de *B. cinerea* (Molina y col., 2006).

Aquino y Martínez (2007) obtuvieron 45 aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* y 45 de hongos antagonistas (T01- T45): *Trichoderma* spp. (35) y *Gliocladium* spp. (10), de plantaciones comerciales de clavel. Las cepas nativas son una alternativa para controlar la "dormilona" del clavel por *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, fomentar el biocontrol de patógenos, además Suarez Meza (2008), realizó un estudio de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium solani* en cultivos de maracuyá obteniendo valores de antagonismo de 70,56, 68,52 y 65,32% respectivamente.

Tradicionalmente el principal método de control de *B. cinerea* y *F. oxysporum* ha sido mediante el uso de fungicidas. Aunque estos continúan siendo el soporte del manejo de estas enfermedades, recientes estudios han constatado una menor efectividad en las aplicaciones, producto del abrupto aumento de los niveles de resistencia del patógeno a fungicidas benzimidazoles, como también un desarrollo paulatino de resistencia a dicarboximidias, por el uso repetitivo de estos grupos de fungicidas (Ferreira y col., 1989).

El público evidencia un descontento con residuos de fungicidas en el follaje y frutos; asimismo, se percibe una animadversión de la población contra la aplicación de productos químicos que dañan al hombre y al ambiente.

En este contexto, aparece como una alternativa viable la aplicación de un método biológico, especialmente diseñado como una estrategia dentro del concepto de manejo integrado de enfermedades.

A pesar que *C. rosea* es considerado un parásito antifúngico específico para *F. oxysporum* y más aun para *B.cinerea*, se tiene muy poca información como biocontrolador en cultivos de espárrago tanto a nivel experimental como comercial.

Por lo tanto, considerando la importancia biológica y agroecológica de presentar una alternativa diferente al uso del control químico para estos hongos patógenos, se ha creído conveniente realizar el presente trabajo para determinar el efecto antagónico in vitro de *Clonostachys rosea* F sobre *Botrytis cinerea* Pers y *Fusarium oxysporum* F. de cultivos de *Asparragus officinalis* L “espárrago” procedentes de la Empresa Agroindustrial Barraza, utilizando la escala de Bell, 1982 y el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), empleando la fórmula de Ezziyiani, 2004.

MATERIAL Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE LAS CEPAS:

Se recolectaron muestras de turiones y hojas infestadas de la Empresa Agroindustrial Barraza, distrito Moche, Provincia de Trujillo y fueron trasladados en hojas de papel a los laboratorios de Fitopatología de la UNT.

Luego de ser ubicados en el microscopio compuesto se procedió a colocarlos en cámaras húmedas con el fin de acelerar el crecimiento de los hongos.

La cepa del biocontrolador *C. rosea* fue obtenido de la subdirección del Servicio Nacional de sanidad Agraria (SCB_SENASA), consistente en papeles con las esporas del hongo.

Las cepas aisladas fueron replicadas en frascos de penicilina con agar Sabouraud para su enfrentamiento posterior.

PREPARACIÓN DEL MATERIAL DE VIDRIO:

El material a utilizar como: placas petri, frascos de penicilina, y vasos de precipitación fueron esterilizados en estufa ubicada en los laboratorios de Microbiología y Parasitología por 1 hora a una temperatura de 180 °C.

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO:

Se pesaron 10 gr de agar deshidratado Sabouraud- Dextrosa 4% en 250 ml de H₂O d. y fue esterilizado en autoclave en los Laboratorios de Microbiología y Parasitología por 15 min a una presión de 15 lb.

SIEMBRA DEL MATERIAL FÚNGICO:

En cada placa Petri esterilizada fue depositado aprox. 15 ml de agar Sabouraud, se esperó 10 minutos para la solidificación del agar, luego se procedió a sembrar el inóculo del hongo en cada placa Petri. En los tres primeros tratamientos se depositó una punteadura miceliar de cada hongo en el centro de la placa y en los dos restantes se depositó la punteadura miceliar de los hongos en cada extremo de la placa.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Monocultivos	<i>C. rosea</i> (testigo)	T₁
	<i>F. oxysporum</i> (testigo)	T ₂
	<i>B. cinerea</i> (testigo)	T ₃
Cultivos duales	<i>C. rosea vs F.oxysporum</i>	T ₁ X T ₂
	<i>C. rosea vs B. cinerea</i>	T ₁ XT ₃

El diseño experimental consistió en cinco tratamientos y las tres repeticiones y resume en la siguiente tabla: El crecimiento de los hongos se realizó a temperatura ambiente de 19-23°C y las mediciones se realizaron a los 3, 7, 10, 13 y 15 días de sembrado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se realizó el cálculo de los promedios obtenidos con respecto al crecimiento miceliar por cada tratamiento y para observar si existe diferencia significativa en dicho crecimiento a nivel de los tratamientos se realizó un Análisis de Varianza y para la comparación de medias la prueba de Tukey.

El grado de antagonismo del biocontrolador se evaluó mediante la escala de Bell y para evaluar el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), se empleó la fórmula de Ezziyani:

$$PICR = \frac{(R_1 - R_2)}{R_1} \times 100$$

RESULTADOS

Tabla 1. Diferencias en el crecimiento de las colonias (monocultivos y duales), de *C. rosea* F., *B. cinerea* Pers. y *F. oxysporum* F. a los 15 días de sembrado.

		CRECIMIENTO	COLOR	CONSISTENCIA
Mono cultivos	<i>C. rosea</i> (testigo)	Radial	Blanca	Pulverulenta
	<i>F. oxysporum</i> (testigo)	Radial	INICIAL: crema FINAL: melón	Pulverulenta
	<i>B. cinerea</i> (testigo)	Radial	INICIAL: blanca FINAL: Grisácea	Pulverulenta
Cultivos duales	<i>C. rosea</i> vs <i>*F.oxysporum</i>	Radial-difusa Pálido con regiones	A medida que avanza pierde la intensidad siendo un color rosado claro.	Suelta y licuefacta
	<i>C. rosea</i> vs <i>*B. cinerea</i>	Radial-difusa	A medida que avanza pierde la intensidad siendo un color ceniciento.	Suelta y licuefacta

Se observa que el crecimiento de los monocultivos es radial, sin embargo cuando están enfrentados los hongos presentan deformaciones a lo largo de su superficie. *C. rosea* presenta un color blanco, mientras que *F. oxysporum* presenta un color crema que luego se va tornando melón y *B. cinerea* presenta un color blanca, después del cual se torna en un color grisáceo. En los cultivos duales el color de los hongos patógenos va perdiendo su intensidad de manera que se vuelven pálidos. Los monocultivos presentan una consistencia pulverulenta, mientras que los hongos enfrentados presentan una consistencia suelta y licuefacta junto con el medio de cultivo.

Tabla 2. Evaluación del grado de antagonismo de *B. cinerea* Pers. Y *F. oxysporum* F. a los 15 días de incubación a temperatura ambiente.

HONGOS PATÓGENOS	GRADO DE ANTAGONISMO
<i>Fusarium oxysporum</i>	Clase 1
<i>Botrytis cinerea</i>	Clase 2

Se muestra el grado de antagonismo de *F. oxysporum* en donde se observa que el antagonista invadió mas de las ¾ partes del patógeno por lo cual el grado de antagonismo se considera de

clase 1; otro lado se observa a *B.cinerea*, en donde el antagonista invade solo el ½ parte del patógeno, esto corresponde a la clase 2 de la escala de Bell.

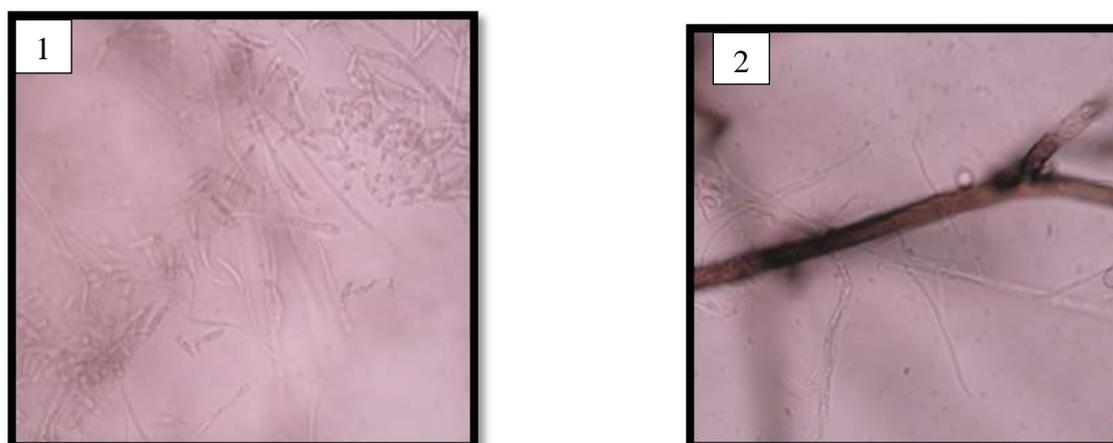


Fig. 1 y 2. Observación microscópica de la inhibición de *C. rosea* sobre *F. oxysporum* y *B. cinerea* a los 15 días de sembrado.

El método de antagonismo de *C.rosea* se realiza por competencia de nutrientes donde se observa la licuefacción de las esporas del hongo patógeno (Fig 1) y por micoparasitismo donde la hifa de *C. rosea* envuelve la hifa de *B.cinerea* (Fig 2).

Tabla 3. Mediciones promedio del diámetro de los monocultivos y cultivos duales de *C. rosea* F., *B. cinerea* Pers. y *F. oxysporum* F. a los 3, 7, 10, 13 y 15 días de sembrado.

TRATAMIENTOS DÍAS	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅
	<i>C. rosea</i>	<i>F.oxysporum</i>	<i>B. cinerea</i>	* <i>F.oxysporum</i>	* <i>B. cinerea</i>
3	1,97±0,51	3,77±0,25	3,97±0,05	3,73±0,12	3,4±0,40
7	3,33±0,21	8,00±0,20	8,40±0,17	3,33±0,50	3,8±0,86
10	4,33±0,15	8,40±0,10	8,50±0,10	2,17±0,31	4,83±0,76
13	5,70±0,30	8,43±0,06	8,50±0,00	2,00±0,50	3,50±0,50
15	6,37±0,32	8,97±0,06	8,93±0,21	1,67±0,29	3,40±0,10

**F.oxysporum*: enfrentado con el controlador, **B.cinerea*: enfrentado con el controlador

Se observa el crecimiento creciente de los hongos, los tratamientos T4 y T5 representa el crecimiento de los hongos patógenos enfrentados al controlador *C.rosea*. Para los monocultivos se observa que el crecimiento a los 15 días es tres veces mayor que en el 1 día. Sin embargo para *F.oxysporum* el crecimiento decrece dos veces y para *B. cinerea* el crecimiento asciende y desciende hasta llegar al valor original a los 3 días.

Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) de las mediciones promedio de los halos de inhibición de *C. rosea F* sobre *F. oxysporum F* y *B. cinerea Pers.* a los 15 días de sembrado.

FUENTES DE VARIACIÓN	G.L	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F_{cal}	VALOR F_{tab}
ENTRE TRATAMIENTO	4	128,45	32,11	16,98	3,48
DENTRO DE TRATAMIENTO	10	18,91	1,89		
TOTAL	14	147,36			

Para las mediciones a los 15 días de sembrado de *C. rosea F* sobre *F. oxysporum F* y *B. cinerea Pers.* se determinó que hay diferencia significativa por lo cual las medias entre tratamientos son diferentes.

Tabla 5. Comparación de las mediciones promedio de los halos de inhibición de *C. rosea F* sobre *F. oxysporum F* y *B. cinerea Pers.* mediante TUKEY a los 15 días de incubación.

TRATAMIENTOS	VALOR TABULADO	VALOR CALCULADO	DISCUSION
T ₁ vs T ₂	0,39	2,60	Rechaza H ₀
T ₁ vs T ₃	0,39	2,56	Rechaza H ₀
T ₂ vs T ₃	0,39	0,04	Acepta H ₀
T ₄ vs T ₅	0,39	1,64	Rechaza H ₀
T ₁ vs T ₄	0,39	4,61	Rechaza H ₀
T ₁ vs T ₅	0,39	2,97	Rechaza H ₀

Según los datos obtenidos, se demuestra que al comparar el crecimiento de *C. rosea* y *F. oxysporum Pers.*(T₁ y T₂), se presenta una diferencia significativa, lo mismo ocurre cuando se comparan a *C. rosea* y *B. cinerea* (T₁ y T₃). Sin embargo al comparar los el crecimiento de *F. oxysporum* y *B. cinerea* (T₂ y T₃) presenta un crecimiento similar. Al comparar los tratamientos *C. rosea F* sobre *F. oxysporum F* y *B. cinerea* enfrentado (T₁ y T₄), se observa la diferencia significativa en su crecimiento lo mismo que ocurre en los tratamientos *C. rosea* y *B. cinerea* enfrentado; esto, nos deja en claro la inhibición de los hongos fitopatógenos.

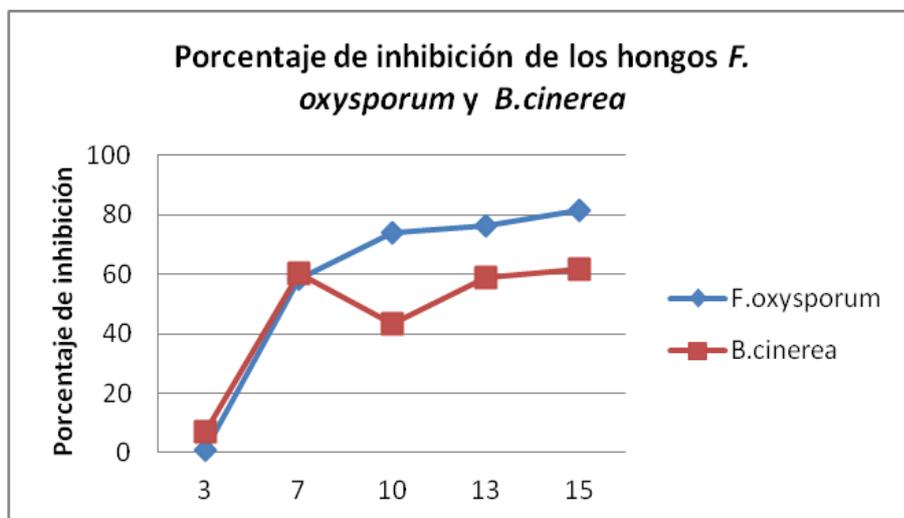


Fig 3. Evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *C. rosea F* sobre *F. oxysporum F* y *B. cinerea Pers.* a los 3, 7, 10, 13 y 15 días de sembrado.

El porcentaje de inhibición de *F. oxysporum* llega a un valor máximo de 80%, mientras que *B. cinerea* alcanza un valor de 60%.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación detallan que *C. rosea* inhibe el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*. Esto confirma lo encontrado por otros autores en sus investigaciones, quienes determinaron que la invasión de *B. cinerea* con *G. roseum* en fresa (tanto en hojas como en frutos) siempre fue igual o superior al logrado con fungicidas según Sutton y col., (1993).

En la Tabla 1, se observa que el crecimiento de los monocultivos es radial, sin embargo cuando están enfrentados los hongos presentan deformaciones a lo largo de su superficie, asimismo los monocultivos presentan una consistencia pulverulenta, mientras que los hongos enfrentados presentan una consistencia suelta y licuefacta junto con el medio de cultivo de acuerdo con lo que afirma Bruce y col., (1995).

C. rosea presenta un color blanco, mientras que *F. oxysporum* presenta un color crema que luego se va tornando melón y *B. cinerea* presenta un color blanca, después del cual se torna en un color grisáceo. En los cultivos duales el color de los hongos patógenos van perdiendo su intensidad de manera que se vuelven pálidos coincidiendo con Stefanova y col. (1999); quien afirma que las enzimas líticas causan a nivel celular: vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis, siendo estas las causantes de la palidez en las colonias de hongos. Asimismo en la Tabla 2 se observa que el antagonista invadió más de las $\frac{3}{4}$ partes de *F. oxysporum* por lo cual el grado de antagonismo se considera de clase 1; otro lado se observa que en *B. cinerea*, el antagonista invade solo el $\frac{1}{2}$ parte del patógeno, esto corresponde a la clase 2 de la escala de Bell. y col. (1982). Estos resultados demuestran que *B. cinerea* presenta una mayor resistencia al control de *C. rosea* mientras que *F. oxysporum* es más proclive a ser controlado, esto es contrastado según Bell y col. (1982) quien obtuvo resultados similares con más del 65% de diferentes aislados *C. rosea* ubicados en el grado 1 frente a *R. solani* AG-2 y más del 85% para *R. solani* AG-3. Los mecanismos de inhibición de *C. rosea* comprenden los fenómenos de antibiosis y micoparasitismo con las cuales degradan la pared celular y micoparasitan al hospedero.

En la Fig. 2 y 3 se observa el método de antagonismo de *C. rosea* se realiza por competencia de nutrientes donde se observa la licuefacción de las esporas del hongo patógeno y por micoparasitismo donde la hifa de *C. rosea* envuelve la hifa de *B. cinerea*, estos cambios morfológicos en las estructuras de los hongos patógenos causados por la acción del antagonista han sido observados en otros estudios que han considerado diferentes especies de hongos tanto antagonistas como patógenos. Por ejemplo, Benhamou y col. (1997) reportaron algunos eventos del micoparasitismo entre *Phythium oligandrum* y varios oomycetos fitopatógenos (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora megasperma*, *Pythium ultimum*). Los daños ocasionados en las diferentes estructuras fúngicas de los patógenos se relacionaron con la presencia de enrollamientos de hifas, aumento de tamaño de las células producto de la desorganización del citoplasma, retracción y ruptura de la membrana plasmática, alteración y distorsión de la pared celular en los sitios de penetración de hifas del antagonista, desencadenando con todo ello, la colonización masiva en el hospedante y su posterior lisis celular.

En la Tabla 3, se observa el crecimiento creciente de los hongos, los tratamientos T4 y T5 representa el crecimiento de los hongos patógenos enfrentados al controlador *C. rosea*. Para los monocultivos se observa que el crecimiento a los 15 días es tres veces mayor que en el 1 día. Sin embargo para *F. oxysporum* el crecimiento decrece dos veces y para *B. cinerea* el crecimiento asciende y desciende hasta llegar al valor original a los 3 días. Se puede observar además que el crecimiento de *B. cinerea* no es uniforme ya que en los primeros días no presentaba ningún tipo de inhibición puesto que la colonia continuaba creciendo, estos datos pueden ser contrastados con la Fig 3, se puede observar que el mayor porcentaje de inhibición corresponde al hongo *F.*

oxysporum; mientras, que *B. cinerea* es más resistente por lo cual el grado de antagonismo para *Fusarium oxysporum* es de clase 1 mientras que *B. cinerea* es de grado 2; esto coincide con Rivera (2007), el cual afirma que *B. cinerea* presenta enzimas antioxidantes (CAT y SOD), además de producir cutinasa y poligalacturonasa que le hace ser más resistente al ataque a *C. rosea*, es por ello, que se observó en el día 10 que la colonia de *B. cinerea* se resiste y trata de desplazar a *C. rosea*; en este momento se da un incremento en la incidencia de la enfermedad y hace que se note más el efecto del biocontrolador en el combate de la misma. Según (Schickler y Chet, 1997).

Según Hannusch y Boland (1996), Peng & Sutton (1993), las condiciones que pueden afectar el desempeño de *G. roseum* como biocontrolador están: la concentración del inóculo del antagonista y del patógeno; y las condiciones ambientales mencionan que *C. rosea* incrementa su actividad supresiva según se incrementa la temperatura de 10 a 25 o C y que a partir de los 15 o C la germinación de los conidios del biocontrolador es mayor al 80%, incrementándose también con el aumento de temperatura. Debido a ello, la cepa de *C. rosea* creció menos que las cepas de los hongos patógenos, pero esto no influyó en la inhibición debido a que *C. rosea* sólo actúa efectivamente cuando es aplicado al mismo tiempo o antes de que ocurra la infección por parte de *B. cinerea* (Yu & Sutton, 1997) o cualquier otro patógeno.

El estudio del controlador *C. rosea* es muy limitado y poco conocido sobre todo en el Perú. Hasta el momento los resultados indican la capacidad inhibitoria de *C. rosea* sobre *F. oxysporum* y *B. cinerea* por lo cual este trabajo es un modelo a seguir para seguir investigando en busca de un biocontroladores para muchos y diferentes hongos que causan daño económico en cultivos de espárrago en el Perú.

CONCLUSIONES

- ❖ Según análisis estadístico de Anova se determinó que existe efecto antagónico de *C. rosea* sobre *F. oxysporum* y *B. cinerea*,
- ❖ El grado de antagonismo para *Fusarium oxysporum* corresponde la clase 1 mientras que para *Botrytis cinerea* corresponde la clase 2.
- ❖ El porcentaje de inhibición para *Fusarium oxysporum* fue más eficiente que *B. cinerea*, a los 15 días de sembrado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agreda, V. & A. Granda.** 1999. Análisis social de los potenciales usuarios del INCAGRO en el Valle de Chincha. Proyecto INCAGRO. Lima (Perú).
- Aquino, J.; L. Vásquez & G. Reyes.** 2007. Biocontrol in vitro e in vivo de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. dianthi (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans. con Hongos Antagonistas Nativos de la Zona Florícola de Villa Guerrero, Estado de México. Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX), Laboratorio de Fitopatología, Conjunto Sedagro s/n, Metepec, Edo. México CP 52140. Rev. mex. fitopatol vol.26 no.2.
- Bell, D. K.; H. D. Wells & C. R. Markham.** 1982. In Vitro Antagonism of Trichoderma Species Against Six Fungal Plant Pathogens, Phytopathology 72: 379-382.
- Benhamou, N. & I. Chet.** 1997. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. App. Environ. Microbiol. 63: 2095- 2099.
- Bruce, A.; U. Srinivasan; H.J. Staines & T.L. Highley.** 1995. Chitinase and laminarinase production in liquid culture by *Trichoderma* spp. and their role in biocontrol of wood decay fungi. Intern. Biodet. & Biodeg. 23: 337-353.
- Butin, H. & H. Peredo.** 1986. Hongos parásitos en coníferas de América del Sur con especial referencia a Chile. Biblioteca Mycológica. Berlin- Stuttgart, Alemania. 100 pp.
- Chaves, N. & A. Wang.** 2004. Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum*. Agronomía Costarricense. Julio-Diciembre. Vol 28, N°002. Universidad de Costa Rica. San José Costa Rica pp 73-85.
- Cisneros, F.** 1995. Principios de Control de Plagas Agrícolas. 2da. ed. Edit. Gráfica Pacific Press S.A. Lima, Perú.
- Comisión para la Promoción de Exportaciones (CPE).** 2000. Perfil del Espárrago Peruano para el Mercado Alemán, Lima PROMPEX. Perú.pp. 53.

- Corpas, C.; M.E. Rubio; A.M. Prados-Ligero; J.M. Melero-Vara & M.J. Basallote-Ureba.** 2006. Influencia de las condiciones ambientales sobre *Fusarium* spp. y la podredumbre de rizomas y raíces de espárrago. Resúmenes del XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, p. 37, Murcia.
- Ellis, M.B.** 1971. Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey. Inglaterra. 167 pp.
- Ezziyyani, M.; S.C. Perez; M.E. Requena; L. Rubio & M.E. Candela.** 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología 26: 69-78.
- Ferreira, F.** 1989. Patología Florestal. Principias Doenças Florestais no Brasil. Viçosa, Brasil. Sociedade de Investigações Florestais. 570 p.
- González, C.; M. Maruri & A. González.** 2005. Evaluación de las concentraciones de *Trichoderma* spp contra *Fusarium oxysporum*, agente causal de la pudrición de las plántulas en papaya. Rev. UDO Agrícola. 5(1): 45-47
- Guédez, C.; L. Cañizalez; C. Castillo & R. Olivar.** 2009. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). Rev RSVM 29:34-38.
- Hannusch, D. & G. Boland.** 1996. Influence of air temperature and relative humidity on biological control of white mold of bean (*Sclerotinia sclerotiorum*). Phytopathology 86:156-162.
- Molina-Mercader, G.; S. Zaldúa-Flores & G. Gonzalez-Vargas.** 2006. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. *Bosque (Valdivia)* 27(2): 126-134.
- Papavizas, G.** 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology 23:23-54.
- Peng, G.; J. Sutton J. & P. Kevan.** 1993. Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. Canadian Journal of Plant Pathology 14(2):117-129.
- Rivera, E.** 2007. Evaluación y caracterización de la actividad antifúngica de la especie *Quillaja Saponaria* Mol. cultivada *in vitro* En *Botrytis Cinerea* Pers. Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración. Temuco, Chile.
- Stevens, R.** 2008. «You should know, you're a medic: Why does urine smell odd after eating asparagus?». Consultado el 1 de setiembre de 2008.
- Schickler, H. & I. Chet.** 1997. Heterologous chitinase gene expression to improve plant defense against phytopathogenic fungi. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 19: 196-201.
- Stefanova, M.; A. Leiva; L. Larriganaga & M.F. Coronado.** 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Revista Facultad de Agronomía 16: 509-516.
- Sutton, J.** 1994. Biological control of strawberry diseases Advances in Strawberry Research 13: 1-12.
- Suarez, C.** 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart) asociado a la marchitez en la maracuya. Revista Colombiana de Biotecnología. Vol X, Num. pp 35-43. Universidad Nacional de Colombia. Bogota, Colombia.
- Yu, H.** 1997. *Gliocladium roseum*: a cosmopolitan antagonist of *Botrytis cinerea* and other pathogens in crops. Pág. 22-24. In Congreso Annual APS, División Caribe. Noviembre 10-12, 1997. San José, Costa Rica. 40 p.
- Zapata, J.L.; A. Saldarriaga & A. Londoño.** 2002. Manejo del cultivo de uchuva en Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), Regional 4, Centro de Investigación La Selva. Boletín Técnico. Rionegro, Antioquia. 42 p.