



Actividad antagónica in vitro de *Clonostachys rosea* sobre *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*

Antagonistic in vitro activity of *Clonostachys rosea* on *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*

Walter Flores-Bazauri, Julio Chico-Ruíz y Lisi Cerna-Rebaza
Laboratorio de Fitopatología, Universidad Nacional de Trujillo-Perú.

RESUMEN

En el control fúngico se hace uso de sustancias químicas que producen deterioro del medio ambiente y esta actividad se puede disminuir utilizando controladores biológicos. Por ello, se propuso evaluar la capacidad antagónica de *Clonostachys rosea* sobre el crecimiento de: *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*. Se realizaron aislamientos, monocultivos y microcultivos de los hongos fitopatógenos así como de las cepas de *C. rosea* en medios de cultivo Agar Papa Dextrosa (DPA) y aplicando cultivos duales. Se comprobó el efecto antagónico de *C. rosea* sobre *B. cinerea* (grado 2) y *F. oxysporum* (grado 2), así como, poca capacidad antagónica frente *A. solani* (grado 3). Se concluye que *C. rosea* ejerce una franca actividad antagónica.

Palabras clave: Hongos, Antagonismo, *Clonostachys rosea*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*

ABSTRACT

In the fungal control using chemicals that cause environmental degradation and this activity can be decreased by using biological control is done. Therefore we decided to evaluate the antagonistic capacity of *Clonostachys rosea* on the growth of *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. Isolates, and microculture monocultures phytopathogenic fungi as well as strains of *C. rosea* in culture media Potato Dextrose Agar (DPA) and applying dual cultures were made. The antagonistic effect *Cl. rosea* on *B. cinerea* (grade 2) and *F. oxysporum* (grade 2) was found little addition antagonistic capacity check against *A. solani* (grade 3). It was concluded that *C. rosea* exerts evident antagonistic activity.

Keywords: Fungi, Antagonism, *Clonostachys rosea*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades producidas por hongos fitopatógenos causan pérdidas severas en la agricultura, éstas consisten en la reducción de la calidad y/o la cantidad de la cosecha obtenida⁵. La forma tradicional para el control de las enfermedades en cultivos es la aplicación de productos químicos, pero debido a su composición resultan tóxicos e inespecíficos, ya que además de eliminar los organismos fitopatógenos, dañan la flora del suelo⁶. Por ello es necesaria la búsqueda de alternativas orientadas al manejo de agentes antagonistas que sean eficientes y compatibles con el ambiente³.

Clonostachys rosea f. rosea, también conocido como *Gliocladium roseum*, es una especie de hongo que coloniza plantas vivas como endófito, digiere el material en el suelo como un saprofito y también se conoce como un parásito de otros hongos y nematodos; se reproduce una amplia gama de compuestos orgánicos volátiles que son tóxicos para los organismos, incluyendo otros hongos, las bacterias y los insectos, y es de interés como el controlador biológico de agentes plaga².

En Latinoamérica como en el resto del mundo, existen numerosos hongos que son parásitos obligados o facultativos de las plantas, y constituyen la principal causa de infecciones y enfermedades en ellas. En el Perú, el panorama es parecido encontrándose una gran variedad de hongos que atacan a plantas de interés económico; varios, tales como, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Pythium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Alternaria* y *Penicillium* son hongos que afectan a la planta¹.

Alternaria contiene especies cosmopolitas que se encuentran en un amplio rango de materiales y productos; como saprobias pueden deteriorar alimentos y forrajes, produciendo compuestos biológicamente activos y perjudiciales como las micotoxinas; al mismo tiempo, como patógenas reducen el rendimiento de las cosechas o afectan a los vegetales almacenados; por ello, resulta necesaria una identificación precisa de las especies porque cada nombre entraña un conjunto de características (preferencias para el crecimiento, patogenicidad, producción de metabolitos secundarios) que permiten predecir el comportamiento del hongo³,

Botrytis, patógeno que causa la enfermedad del moho gris en una amplia variedad de huéspedes^{14,15}, y es un grave problema económico en cultivos como uva, fresas, frambuesas, lechugas, pepinos, habas, tomates, frijoles, flores y plantas forestales producidas en contenedores¹⁵. Por ello, los problemas causados por miembros del género *Botrytis* se han observado en la mayoría de los viveros forestales en el hemisferio sur con diferentes niveles de incidencia y severidad de la enfermedad, causando pérdidas superiores al 50% en algunos casos⁴.

Por su parte, se ha registrado que *Fusarium* ataca a más de 100 especies de plantas entre gimnospermas y angiospermas, ya que puede formar tres estructuras de resistencia: macroconidios (estructuras distintivas del género), microconidios y clamidosporas, estas últimas son las que le permiten sobrevivir como saprofito de vida libre en ausencia de un hospedero y es el causante de la grave enfermedad de algunas especies vegetales, en particular del “pino”, sin que se haya podido encontrar un método eficaz de control^{5,6}. El uso de productos químicos a nivel agrícola en Perú se ha visto muy sobrecargado en los últimos años, y se prevé que su utilización en el futuro sea más extensa. Los hongos endófitos, aquellos que viven en el interior de los tejidos del hospedante sin causarle daño alguno, tienen potencial como controladores biológicos de algunas enfermedades de plantas. El objetivo del presente trabajo fue la evaluación del antagonismo de cepas de *Clonostachys rosea* sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*.

MATERIAL Y METODOS

Hongos

- Cepas certificadas de *Clonostachys rosea* adquiridas de SENASA
- Cultivos preparados de: *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*

Aislamiento y determinación de los hongos fitopatógenos

De frutos infectados con el hongo problema se tomaron las muestras de tejido enfermo las cuales se colocaron en medio PDA (agar papa) y luego se incubaron a temperatura ambiente durante una semana. Aislados y formando monocultivos se procedió a determinar los hongos fitopatógenos cultivados, utilizando claves taxonómicas¹⁰, microscopio compuesto y cámara fotográfica.

Aislamiento y obtención de cultivo puro de *Clonostachys rosea*^{7,9}

Se realizó siguiendo los pasos del manual adjunto a las cepas certificadas adquiridas del Servicio Nacional de Sanidad Agrícola (SENASA). Un frasco, conteniendo las cepas de *Cl. rosea* en un pedazo de papel de filtro, se procedió a retirar con ayuda de una pinza esterilizada y se colocó en una placa petri que contenía PDA, luego se vertió una gota de agua estéril y se dejó reposar por 3 minutos, posteriormente con una asa bacteriológica se realizó un frotis por toda la placa petri, para luego sellar la placa con pegafán. Luego de 7 días se pudo observar su crecimiento (Fig. 1).



Fig. 1. Cultivo puro de *Clonostachys rosea* en placa Petri a los siete días.

Prueba de antagonismo o cultivo dual

Para evaluar el efecto antagonista se colocaron a crecer individualmente los aislamientos de hongos fitopatógenos en placas Petri conteniendo PDA (30 gramos/L). Los cultivos puros de los hongos tenían 7 días de edad y se habían producido a 27° C en PDA. Para la prueba se tomó una porción de 3mm de diámetro del cultivo de cada hongo y se colocó en un extremo de la caja Petri y en el otro se sembró *C. rosea*. En el experimento se utilizaron tres repeticiones por aislamiento. Los testigos estuvieron representados por cada hongo sembrado por separado en placas Petri. Los cultivos duales se incubaron a 27°C durante una semana y para evaluar el efecto antagonista se midió el crecimiento de cada uno de los hongos diariamente, desde el punto de siembra hasta el borde de la colonia, y con los datos obtenidos se calculó la velocidad de crecimiento y el porcentaje de inhibición para cada hongo fitopatógeno. Utilizando la fórmula de Ezziyyani ¹⁹ se obtuvo el porcentaje de Inhibición (PI), para ello se midió el diámetro de la colonia control (D.C.C), diámetro de la colonia del hongo en interacción con su antagonista (D.C.P)

$$P.I = \frac{(D.C.C - D.C.P)}{D.C.C} \cdot 100$$

Para indicar el micoparasitismo (MICMO) como posible mecanismo de acción de *Cl. rosea* se realizaron observaciones macroscópicas del cultivo dual, tomándose como índice de micoparasitismo, la invasión del antagonista sobre la superficie del micelio del hongo fitopatógeno, teniéndose en cuenta la escala de Bell et al. (1982)¹⁹.

Diseño experimental¹⁸.

Se realizó un diseño al azar, con un número de siete tratamientos y tres repeticiones por tratamiento, incluyendo a un testigo (control) de cada uno.

Tabla 1. Escala de Bell para evaluar el micoparasitismo de *Clonostachys rosea*¹¹

GRADO	MICOPARASITISMO	% DE CUBRIMIENTO DEL ANTAGONISTA DE LA SUPERFICIE DEL MEDIO
1	El antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno.	100 %
2	El antagonista llega a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.	75 %
3	El antagonista y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno parece dominar al otro.	50 %
4	El patógeno sobrepasa al crecimiento del antagonista colonizando tres cuartas partes de la caja Petri.	25 %
5	El agente fitopatógeno llega a cubrir totalmente la placa Petri.	0 %

Tabla 2. Diseño experimental para demostrar el antagonismo de *Clonostachys rosea* sobre hongos fitopatógenos

TIPO DE CULTIVO	COMBINACIONES	TRATAMIENTOS
Monocultivos	<i>Clonostachys rosea</i> (testigo)	T1
	<i>Alternaria solani</i> (testigo)	T2
	<i>Botrytis cinérea</i> (testigo)	T3
	<i>Fusarium oxysporum</i> (testigo)	T4
Cultivos duales	<i>Cl. rosea</i> vs <i>A. solani</i>	T1 x T2 = T5
	<i>Cl. rosea</i> vs <i>B. cinerea</i>	T1 x T3 = T6
	<i>Cl. rosea</i> vs <i>F.oxysporum</i>	T1 x T4 = T7

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el enfrentamiento de *Cl. rosea* frente *A. solani* se registró un crecimiento de 6,6 cm y de manera aislada (control) en el mismo número de horas obtuvo 6,7 cm; mientras que *Cl. rosea* en el cultivo dual obtuvo 6,1 cm de crecimiento micelial y en la prueba control 6,9 cm; como se observa en la Tabla 3, Fig. 2 y 5.

Cl. rosea creció a una velocidad superior a la de *B. cinerea*, observándose que a las 168 horas en el cultivo dual obtuvo un crecimiento de 4,7 cm y, de manera aislada (control), alcanzó en el mismo número de horas un crecimiento de 5,3 cm; mientras, que *Cl. rosea* en el cultivo dual obtuvo un crecimiento de 8 cm y de manera aislada (control) su crecimiento fue de 8,4 cm; como se puede observar en la Tabla 4, Fig. 3 y 5.

En el caso de *Cl. rosea* frente *F. oxysporum*, también se observó una velocidad de crecimiento superior a *Cl. rosea*; éste creció casi a la par que las cepas de *Cl. rosea*, la diferencia se marcó a las 168 h de crecimiento donde *F. oxysporum* registró un crecimiento de 6,4 cm y de manera aislada (control) en el mismo número de horas obtuvo un crecimiento de 7,1 cm; mientras que *Cl. rosea* en el cultivo dual obtuvo un crecimiento de 7,1 cm mientras que de manera aislada (Control) su crecimiento fue de 8,1 cm.

El porcentaje de inhibición frente a estos fitopatógenos, a los 7 días de siembra, se presentó de la siguiente manera: *Cl. rosea* presentó los índices más bajos de inhibición del crecimiento micelial a las 24 horas de siembra frente a todos los fitopatógenos y después de 7 días sólo *B. cinerea* tuvo los índices más altos que *Cl. rosea* presentando un PCI de 11.3 % mientras que *Cl. rosea* presentó un PCI de 4.8 %, como se observan en las Fig. 2,3,4.

Tabla 3. Promedio del crecimiento en cm (diámetro) de *Clonostachys rosea* (Clr) y *Alternaria solani* (Als) en prueba de antagonismo y su respectivo control, tomado cada 72 horas.

Horas	Antagonismo		Control	
	Clr	Als	Clr	Als
24	0.4	0.1	0.6	0.2
96	4.4	4.2	4.6	4.4
168	6.1	6.6	6.9	6.7

Tabla 4. Promedio del crecimiento en cm (diámetro) de *Clonostachys rosea* (Clr) y *Botrytis cinérea* (Boc) en prueba de antagonismo y su respectivo control, tomado cada 72 horas.

Horas	Antagonismo		Control	
	Clr	Boc	Clr	Boc
24	0.4	0.2	1.2	0.9
96	4.5	3.4	4.7	4.0
168	8.0	4.7	8.4	5.3

Tabla 5. Promedio del crecimiento en cm (diámetro) de *Clonostachys rosea* (Clr) y *Fusarium oxysporum* (Fuo) en prueba de antagonismo y su respectivo control, tomado cada 72 horas.

Horas	Antagonismo		Control	
	Clr	Fuo	Clr	Fuo
24	0.4	0.1	0.9	0.5
96	5.2	4.7	6.3	5.2
168	7.1	6.4	8.1	7.1

La técnica del plato dual mostró que *Cl. rosea* tiene la capacidad de crecer sobre el micelio de *B. cinerea* y *F. oxysporum* indicando con ello la existencia del mecanismo de mico-parasitismo (Fig. 3,4,5), igual comportamiento se observa en condiciones de campo según las investigaciones de Chávez y Wang,⁸ Peng et al.,¹² Sutton y Yu,¹³ Molina et al.,¹⁶ Zaldúa y Sanfuentes,¹⁷ Morago et al.²¹ En cambio mostró una aparente acción de antibiosis contra *A. solani*, debido a su velocidad de crecimiento que logró causar una inhibición de 50% a las 24 horas (Fig. 2) comparados con el crecimiento de la colonia testigo (33,3%), resultados similares se obtuvo en plantas de guisante y en semillas de zanahoria imprimidas con *Cl. rosea*.^{20,22} Esta capacidad antagónica de *Cl. rosea* se basa en un rápido crecimiento y una rápida colonización del sustrato, degradando paredes celulares del patógeno probablemente por la secreción de numerosos enzimas líticas. Además los resultados de la prueba dual en su conjunto confirman la teoría inicial sobre la posible existencia de dos mecanismos de antagonismo: mico-parasitismo y antibiosis.²³

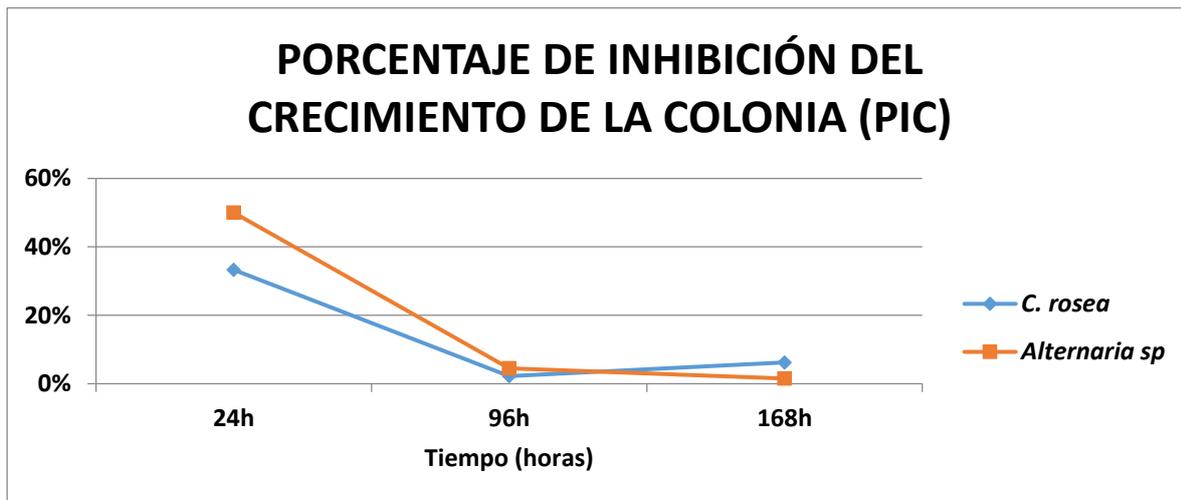


Fig. 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento de la colonia (PIC) de *Clonostachys rosea* y *Alternaria solani*, tomado cada 72 horas x 7 días

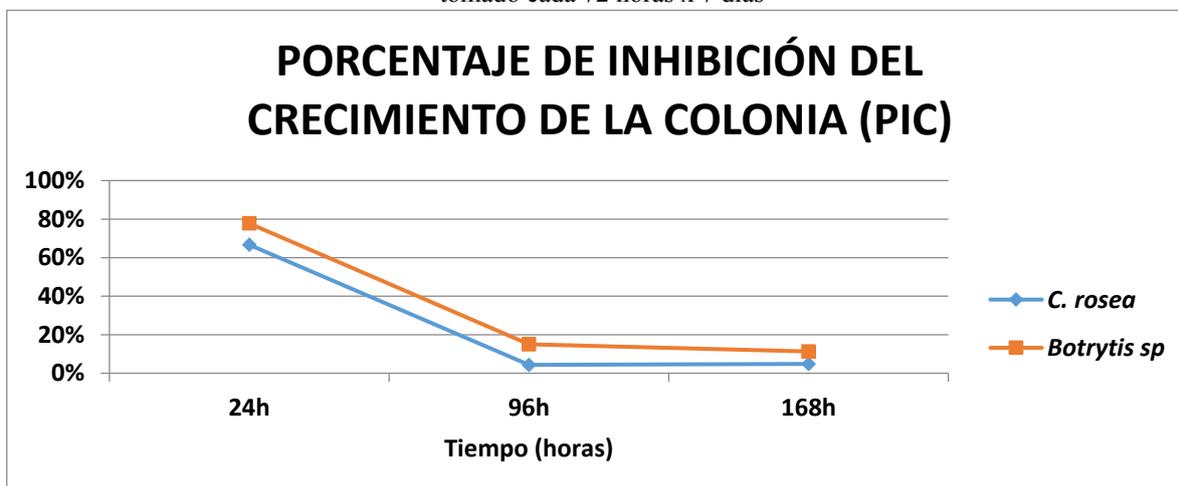


Fig. 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento de la colonia de *Clonostachys rosea* y *Botrytis cinerea*, tomado cada 72 horas x 7 días

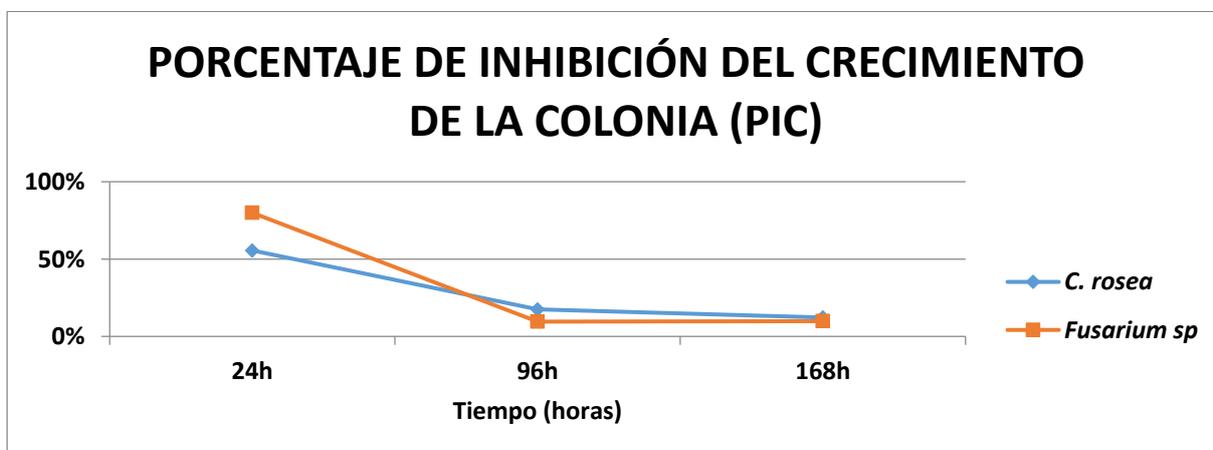


Fig. 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento de la colonia de *Clonostachys rosea* y *Fusarium oxysporum*, tomado cada 72 horas x 7 días



A. solani
Antagonismo tipo 3



F. oxysporum
Antagonismo tipo 2



B. cinerea
Antagonismo tipo 2

Fig. 5. Observación macroscópica del cultivo dual de *Clonostachys rosea* y los hongos fitopatógenos a los 7 días y creciendo en agar papa dextrosa (PDA). También se observa el tipo de antagonismo según la escala de Bell.

Al respecto, se debe tener en cuenta que el micoparasitismo es un proceso complejo de quimiotropismo cuya acción antifúngica específica es desconocida; sin embargo, se ha propuesto una serie de etapas por la que *Cl. rosea* lleva el antagonismo, las cuales son: (a)reconocimiento, (b)penetración de la hifa, (c) invasión y secreción de enzimas hidrolíticas²⁰, siendo éste último el de mayor interés, ya que no se ha determinado con exactitud el mecanismo mediante el cual se controla la expresión de cada una de las enzimas involucradas; así como, su orden. Durante la etapa de reconocimiento, se lleva a cabo un proceso de quimiotropismo, el cual es mediado por el reconocimiento de lectinas, que se encuentran incorporadas en el hongo fitopatógeno, y cuando el micoparásito reconoce al hongo, las hifas de *Cl. rosea* lo atrapan y lo rodean formando estructuras apresoras.³ Asimismo, en cuanto a la penetración de la hifa, ésta se realiza mediante la degradación de la pared celular del hongo fitopatógeno, por medio de la secreción de enzimas que actúan sinérgicamente, y a las que se les denomina en conjunto como las enzimas degradadoras de pared celular, conformado por β -1,3-glucanasas, quitinasas y proteasas, las cuales se inducen por la presencia de las paredes celulares de hongos fitopatógenos^{3,24}.

Las investigaciones sobre el controlador *Cl. rosea* es muy limitado y poco conocido sobre todo en el Perú. Hasta el momento los resultados indican la capacidad inhibitoria de *Cl. rosea* sobre *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *A. solani* en condiciones in vitro. El presente trabajo es un modelo para seguir investigando en busca de un biocontrolador para diferentes hongos fitopatógenos que causan daño económico en cultivos de “vid” en el Perú.

CONCLUSIONES

- El grado de antagonismo de *Cl. rosea* sobre *B. cinerea* corresponde al grado 2 y el porcentaje de inhibición fue de 11,3%.
- El grado de antagonismo de *Cl. rosea* sobre *A. solani* corresponde al grado 3 y el porcentaje de inhibición fue de 1,5%
- El grado de antagonismo de *Cl. rosea* sobre *Fusarium oxysporum* corresponde al grado 2 y el porcentaje de inhibición a los 15 días de sembrado, fue de 9,9%.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Agrios C. Fitopatología. 3ª ed. México DF: Edit. Limusa S.A. 2004.
2. Ordoñez V. Producción de enzimas microbianas y sus aplicaciones en la industria. En: II Cong Intern Microbiol Indust. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 2000
3. Hernández-Lauzardo A, Bautista-Baños S, Velásquez-Del Valle M. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. Rev Mex Fitopatol 2007; 25: 66-74
4. Arzate J, Michel A, Domínguez V, Santos O. Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka Negra del plátano (*Musa* sp.) in vitro e invernadero. Rev Mex Fitopatol 2006; 24: 98-104.
5. Fraire-Cordero M, Yáñez M, Nieto D, Vázquez G. Hongos patógenos en fruto de “fresa” (*Fragaria ananassa* Duch.) en postcosecha. Rev Mex Fitopatol 2003; 2: 285-91
6. Llácer G, López M, Trapero A, Bello A. Patología Vegetal. 2a ed. México DF: Edit. Grupo Mundi-Prensa, S.A. 2000.
7. Molina G, Zaldúa S, González G, Stowasser S. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. Laboratorio de Patología Forestal. Universidad de Concepción. Chile. 2006.
8. Chávez N, Wang A. Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la “fresa” mediante *Gliocladium roseum*. Rev Agron Costarricense 2004; 28(2): 73-85
9. Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA). Manual de procedimientos para verificación de calidad de agentes biológicos para el control de plagas agrícolas, producidos por laboratorios en convenio con el SENASA. Directiva General N° 24/2001-SENASA-DGSV-PNCB. Lima. Perú. 2001.
10. Barnett H, Hunter B. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4ª ed. The American Phytopathological Society, S.A. EE.UU. 1998.
11. Ezziyyani M. Biocontrol mediante una combinación de microorganismos antagonistas. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia-España. 2004.
12. Peng G, Sutton J, Evan P. Effectiveness of honeybees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. Canadian J Plant Pathol 1992; 14(2):117-129.
13. Sutton J, Yu H. *Gliocladium roseum*: a cosmopolitan antagonist of *Botrytis cinerea* and other pathogens in crops. In: Cong Annual APS, División Caribe. San José, Costa Rica. 1997.
14. Cota L, Maffia L, Mizubuti E, Macedo P, et al. Control biológico de la podredumbre gris de la fresa por *Clonostachys rosea* en condiciones de campo. Control Biológico 2008; 46: 515-522.
15. Elad Y, Malathrakakis N, Dik A. El control biológico de las enfermedades incitadas-*Botrytis* y mildiú de los cultivos de invernadero. Crop Protection 1996; 15: 229-240
16. Molina G, Zaldúa S, González G, Sanfuentes E. Selección de hongos Antagonistas. Control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros Forestales. Bosque 2006; 27(2): 126-134
17. Zaldúa S, Sanfuentes E. Control of *Botrytis cinerea* in *Eucalyptus globulus* mini-cuttings using *Clonostachys* and *Trichoderma* strains. Chilean J Agricul Res 2010; 70(4): 576-582
18. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/bosque/v27n2/art07.pdf>
19. Hidalgo N. Uso de *Trichoderma* spp. En combate biológico. San José. Universidad de Costa Rica; 1999. Disponible en: <https://www.ibun.unal.edu.co/r2r7e.html>
20. Jensen B, Knudsen I, Madsen M. Biopriming of Infected Carrot Seed with an Antagonist, *Clonostachys rosea*, Selected for Control of Seedborne *Alternaria* spp. Phytopathol 2004; 94(6): 551-560
21. Moraga-Suazo P, Opazo A, Zaldúa S, González G, Sanfuentes E. Evaluation of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. strains to control *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings. Chilean J Agricul Res 2011; 71(3): 412-417

22. Xue A. Biological Control of Pathogens Causing Root Rot Complex in Field Pea Using *Clonostachys rosea* Strain ACM941. *Phytopathol* 2003; 93(3): 329-335
23. Rodríguez Y, Osorio J. Evaluación de microorganismos por su potencial antagónico para el control biológico de *Moniliophthora roreri* (Cif) Evans et al. al agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Fitopatología Colombiana* 2004; 28(1):14-19
24. Rodríguez-Lacherre M, Chico-Ruíz J. Efecto antagónico in vitro de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* procedente de cultivos de *Vitis vinífera*. *REBIOL* 2013; 33(2): 42-49