

## ASLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ASOCIADOS A ESCLEROCIOS DE *Sclerotium cepivorum*, CAUSANTE DE LA PUDRICIÓN BLANCA DE LA CEBOLLA, EN LA ZONA ALTA DE CARTAGO, COSTA RICA<sup>1/</sup>

María del Milagro Granados<sup>2/\*</sup>, Amy Wang\*

**Palabras clave:** *Sclerotium cepivorum*, esclerocios, pudrición blanca, torbó, cebolla, control biológico.

**Keywords:** *Sclerotium cepivorum*, sclerotia, white rot, onion, biological control.

Recibido: 21/10/04

Aceptado: 24/01/05

### RESUMEN

Se aislaron e identificaron hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, causante de la pudrición blanca de la cebolla, con el fin de determinar la existencia de hongos con potencial antagonístico nativos en la zona alta de Cartago. Se estudiaron 10 fincas durante febrero-mayo de 2002. Cada una se dividió en 3 áreas de acuerdo al nivel de incidencia histórica de la enfermedad (bajo, intermedio, alto). En cada área se realizó un trapeo de hongos mediante la técnica de entierro de esclerocios; además se hizo muestreo de plantas enfermas, se colectó suelo para cuantificar densidad de inóculo y para realizar análisis microbiológicos, químico sencillo, de textura y determinación de materia orgánica. Los géneros encontrados en el trapeo 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. también se hallaron en el análisis microbiológico de suelo. Las poblaciones más altas de microorganismos se recuperaron en el área intermedia de todas las fincas. Este trabajo comprueba que es posible aislar hongos con potencial antagonístico, como *Trichoderma* spp.

### ABSTRACT

**Isolation and identification of fungi associated to sclerotia of *Sclerotium cepivorum*, causal agent of white rot in onion, in the highlands of Cartago, Costa Rica.** A survey to determine the presence of fungi with possible antagonistic effect, associated with sclerotia of *Sclerotium cepivorum*, causal agent of white rot of onion, was performed in the highlands of Cartago province, the main onion-production area in Costa Rica. From February to May, 2002, 10 farms were studied. Each farm was divided into 3 areas according to the historical incidence of the disease: high, intermediate and low. In each of these areas, the fungus-trapping survey was performed using the sclerotia-burial technique. Besides, diseased plants were collected and a soil sample was taken to determine inoculum density and to perform microbiological, chemical, texture and organic matter analyses. *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Gliocladium* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* spp., *Rhizoctonia* sp., *Rhizopus* sp. and *Trichoderma* spp. were the most predominant fungus genera found in association with sclerotia; *Fusarium* spp., *Monilia* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* spp., *Pythium* sp., *Rhizopus* sp. and *Trichoderma* spp. were isolated from diseased onion bulbs and *Gliocladium* sp., *Penicillium* spp. and *Trichoderma* spp. were also found in the microbiological soil analysis. For all 10 farms,

1/ Este trabajo es parte de la tesis M. Sc. de la primera autora. Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales. Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica.

2/ Autor para correspondencia. Correo electrónico: migramo@hotmail.com

\* Centro de Investigación en Protección de Cultivos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

*Gliocladium* sp. y *Paecilomyces* sp., en suelos a los que por muchos años se les ha aplicado una gran cantidad de fungicidas.

## 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; que abarca los cantones Central, Oreamuno y Alvarado (principalmente los distritos de Tierra Blanca, Cot y Llano Grande) donde se ubica el 78% de los agricultores y la cual se sitúa como la principal zona productora del país, con el 73% del total en el año 2002 (Pessoa *et al.* 1998, CNP 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

the highest population of microorganisms was found in the area considered as intermediate in level of infection. This study indicates that it is possible to isolate fungi with antagonistic effect, such as *Trichoderma* spp., *Gliocladium* sp. and *Paecilomyces* sp., from soils where fungicides have been applied for several years.

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 hongos y 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 microorganismos 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 en la zona alta de Cartago y 2) aislar e identificar los hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum* en la zona alta de Cartago.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se muestrearon 10 fincas de la zona alta de Cartago y cada una se dividió en 3 áreas de acuerdo con el nivel de incidencia histórica de la enfermedad, según 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.

### Trampeo

Se tomó micelio de *Sclerotium cepivorum* proveniente de plantas enfermas y se cultivó en papa-dextrosa-agar (PDA), para producir esclerocios en el laboratorio. Los cultivos se mantuvieron a 24°C y 80% de humedad relativa por aproximadamente 15 días, tiempo suficiente para la producción de gran cantidad de estructuras.

En cada finca se colocaron 75 esclerocios de *S. cepivorum* a una profundidad entre 10 y 20 cm, divididos en 3 grupos de 25 esclerocios, 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 directamente en PDA no acidificado. 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.

### 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 por hongos que se encontraron en los bulbos enfermos y se procedió de la misma forma que en el caso anterior.

### Análisis complementarios

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

**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 dilución para el aislamiento de bacterias (aeróbicas y anaeróbicas), hongos, actinomicetes y levaduras. Se incubó por 48 horas a 30°C en agar nutritivo (AN) para el crecimiento de colonias bacterianas, por 7 días a 26°C y 80% de humedad relativa en PDA para el crecimiento de colonias de hongos y levaduras, y por 7 días a 30°C en “Actinomycete isolation agar” de Difco para el crecimiento de actinomicetes. Luego se hizo el recuento de las colonias desarrolladas y se estimó la población de cada organismo.

**Análisis químico sencillo, de textura y determinación de materia orgánica.** Se tomaron muestras de 100 g de suelo de la misma forma que en los puntos previos, para una muestra total de 500 g; se llevaron al Laboratorio de Suelos y Foliareales del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica, donde se realizaron los análisis respectivos.

## RESULTADOS

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.

### Trampeo

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.

Al observar los esclerocios, se pudo notar diferencias en su condición; de acuerdo con esto, se clasificaron en 5 categorías: 1) enteros, aquellos que permanecían completos y de consistencia compacta; 2) suaves, que se encontraban enteros pero de consistencia blanda; 3) cáscara, 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.

La figura 1 resume la frecuencia en la que se encontró cada una de las categorías descritas arriba, de acuerdo con la incidencia de la enfermedad en el campo.

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 1, 3 y 4.

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).

El género *Trichoderma* fue identificado en todas las categorías del área de incidencia baja o nula y *Gliocladium* sp. apareció en 3 de las 4 categorías en esta área, pero no fue posible recuperarlo en las áreas de incidencia intermedia o alta, como se muestra en los cuadros 3 y 4.

El cuadro 2 indica con mayor detalle, los sitios en que fueron aislados y la frecuencia de aparición de los géneros *Trichoderma* y *Gliocladium*.

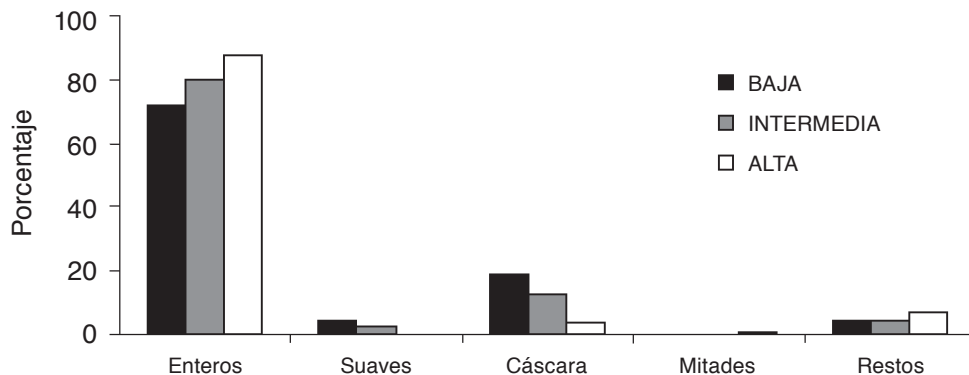


Fig. 1. Porcentaje de esclerocios por categoría y por nivel de incidencia de la enfermedad, luego de permanecer enterrados un mes, en 10 fincas dedicadas al cultivo de la cebolla en la zona alta de Cartago.

Cuadro 1. 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 1 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.

Tanto en el área de incidencia intermedia (Cuadro 3), como en el área de alta incidencia de la enfermedad (Cuadro 4), 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.

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

En los cuadros 1, 3 y 4 no se incluyó la categoría “mitades”, puesto que solamente apareció una colonia de *Penicillium* sp. en el área de incidencia alta; por otro lado, *Rhizoctonia* sp. no se encontró en los esclerocios provenientes de las áreas de incidencia baja e intermedia.

### 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

Cuadro 2. 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 1 mes en 10 fincas productoras de cebolla en la zona alta de Cartago.

Género	Finca	ufc	Área 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

\*ufc: Unidades formadores de colonia.

Cuadro 3. 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 1 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</i> sp.	0	0	5	0
<i>Fusarium</i> sp.	17	0	2	1
<i>Fusarium roseum</i>	21	0	0	1
<i>Gliocladium</i> sp.	0	0	0	0
<i>Mucor</i> sp.	5	1	3	1
<i>Penicillium</i> sp.	91	1	14	6
<i>Rhizopus</i> sp.	7	1	0	0
<i>Sclerotium cepivorum</i>	5	0	0	0
<i>Trichoderma</i> spp.	0	0	0	0

\*ufc:Unidades formadoras de colonia.

Cuadro 4. 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 1 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</i> sp.	0	0	0	0
<i>Fusarium</i> sp.	26	0	1	4
<i>Fusarium roseum</i>	12	0	0	0
<i>Gliocladium</i> sp.	0	0	0	0
<i>Mucor</i> sp.	0	0	0	0
<i>Penicillium</i> sp.	65	0	3	5
<i>Rhizoctonia</i> sp.	0	0	0	1
<i>Rhizopus</i> sp.	11	0	1	0
<i>Sclerotium cepivorum</i>	8	0	0	0
<i>Trichoderma</i> sp.	0	0	0	0

\*ufc:Unidades formadoras de colonia.

Cuadro 5. Densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* (esclerocios g<sup>-1</sup> de suelo seco) de acuerdo a las áreas de incidencia de la enfermedad en las fincas estudiadas.

No de finca	Áreas de incidencia		
	Baja (Verde)	Intermedia (Anaranjada)	Alta (Roja)
	Esclerocios g <sup>-1</sup> 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

**Nota:** Las fincas 5 y 6 no reportaron niveles de incidencia intermedios ni altos, mientras que la finca 10 no registró nivel bajo, por lo que no hay datos (nd) para estas áreas.

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 analizado varió de una finca a otra.

Los géneros encontrados fueron *Penicillium* sp. (28), *Fusarium* sp. (10), *S. cepivorum* (6) *F. 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.

### Análisis complementarios

**Cuantificación de la densidad de inóculo.** La mayor cantidad de esclerocios se encontró en el área intermedia de la finca 8 (0,16 esclerocios g<sup>-1</sup> de suelo seco); seguida de la finca 7 en la que se recuperaron esclerocios en todas las áreas (Cuadro 5).

**Análisis microbiológico.** Este análisis se realizó para todas las áreas de todas las fincas estudiadas, sin embargo, por razones de extensión del artículo, se describen los resultados globales, haciendo énfasis en las poblaciones de hongos antagonistas.

Las poblaciones más altas de microorganismos se recuperaron en suelo del área intermedia. Así, la mayor población de hongos fue de 5,4x10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> de suelo húmedo, encontrada en la finca 3; el valor más alto de bacterias anaeróbicas fue recuperado en la finca 9 (2,3x10<sup>6</sup> ufc g<sup>-1</sup> de suelo húmedo); los actinomicetes se presentaron en mayor cantidad en la finca 8 (3,6x10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> de suelo húmedo); y las levaduras (2,9x10<sup>6</sup> ufc g<sup>-1</sup> de suelo húmedo) en la finca 1. Solamente el valor de las bacterias aeróbicas (3,9x10<sup>8</sup> ufc g<sup>-1</sup> de suelo húmedo) fue mayor en el “área verde” (finca 4).

De la población total de hongos por finca, *Trichoderma* sp. se encontró en el “área verde” de las fincas 3 y 6, con cantidades de 3,3x10<sup>3</sup> ufc g<sup>-1</sup> y 2,7x10<sup>4</sup> ufc g<sup>-1</sup>, respectivamente; en el área intermedia de la finca 9 (3,3x10<sup>3</sup> ufc g<sup>-1</sup>) y en el “área roja” de la finca 7 (1x10<sup>4</sup> ufc g<sup>-1</sup>).

*Gliocladium* sp. se recuperó, solamente, en el “área verde” de la finca 5 (1,7x10<sup>4</sup> ufc g<sup>-1</sup>);

mientras que *Paecilomyces* sp presentó la misma población pero en el “área verde” de la finca 9. Entre tanto que, de *Penicillium* sp. se halló una población de 6x10<sup>4</sup> ufc g<sup>-1</sup>, en el área intermedia de la finca 7.

**Análisis químico sencillo, de textura y determinación de materia orgánica.** La mayoría de las fincas presentan valores de pH inferiores a 5,5; además, en el “área verde” de 2 fincas, se presentan valores altos de acidez intercambiable (finca 2 con 0,87 y finca 6 con 1,14 cmol(+) l<sup>-1</sup>). Las demás fincas presentan valores medios, desde 0,10 hasta 0,38 cmol(+) l<sup>-1</sup>).

La capacidad de intercambio catiónico (CICE) se encuentra en el ámbito intermedio (5-25 cmol(+) l<sup>-1</sup>) en todas las fincas y áreas de incidencia.

De acuerdo al análisis textural, la mayoría (76%) de las muestras de suelo estudiadas pertenecen a la categoría franco arenoso (áreas de baja incidencia de las fincas 1,2,3,6,7,8 y 9), el resto se divide en 14% franco (áreas intermedia y alta finca 4 y “área verde” finca 5) y 10% franco arcillo arenoso (las áreas intermedia y alta de la finca 2 e intermedia de la finca 9).

El porcentaje 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 *S. cepivorum*, en la mayoría de los casos, concuerdan con las observaciones realizadas por los agricultores, por lo que se podría decir que la selección de “áreas de incidencia” fue la correcta.

De acuerdo con Adams y Papavizas (1971), se conoce poco acerca del nivel de inóculo, de patógenos de suelo, requerido para producir la enfermedad; sin embargo, encontraron que 5 esclerocios g<sup>-1</sup> de suelo pueden causar una cantidad apreciable de pudrición blanca. Por otro



lado, Crowe *et al.* (1980) informaron que densidades entre 0,01 y 0,1 esclerocios  $g^{-1}$  de suelo pueden provocar entre 85 y 100% de incidencia y que densidades superiores a 1 esclerocio  $g^{-1}$  de suelo resultan en la muerte inmediata después de la emergencia de las plántulas; mencionan que el porcentaje de plantas enfermas aumenta con incrementos en la densidad del inóculo, aunque admiten 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 (1953), encontró que algunas especies de los géneros *Penicillium* y *Trichoderma* eran capaces de colonizar esclerocios vivos; 30 años después Oliveira *et al.* (1982) encontraron que en condiciones *in vitro* los hongos *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus* y *Penicillium* sp. son antagonistas. En 1999, Tsigbey y Nutsugah, mencionan que *Gliocladium catenulatum* suprime por completo el crecimiento y la formación de esclerocios de *S. 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 de campo.

*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 1, 3 y 4), 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 la finca 9; esto indica que probablemente no esté cumpliendo un rol importante como antagonista en este caso.

De acuerdo con los cuadros 1, 3 y 4, los esclerocios 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”); por lo que se nota una diferencia en viabilidad de los propágulos, de acuerdo a su condición. Así, aparentemente sólo en la condición de entero un esclerocio puede germinar; sin embargo, no todos los “enteros” germinan ya que pueden estar colonizados o parasitados por alguno de los géneros citados en los cuadros.

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 (Figura 1). Además, como se observa en el cuadro 1, en esta área se recuperó una cantidad considerable de esclerocios colonizados por *Trichoderma* y *Gliocladium*; lo anterior, aunado al hecho de que estos géneros no fueron recuperados en las áreas de incidencia intermedia y alta (Cuadros 3 y 4), indica que la baja incidencia de pudrición blanca 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*, donde 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 el área de baja incidencia, debido a que tienen menor competencia por sustrato y espacio. Para esta área se cuantificó, de acuerdo al análisis microbiológico, la menor población de hongos por gramo de suelo, y aunque se midió la mayor población de bacterias aeróbicas, estas pueden estar asociadas a la desintegración de los esclerocios, ya que de acuerdo con observaciones (no publicadas) en la etapa de trapeo, 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 por su contenido de MO, 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, generalmente el crecimiento es óptimo en un rango de pH de 4-6,5. En este estudio los promedios generales, para los valores de pH, de las 3 áreas de incidencia de la enfermedad se mantienen en este ámbito, lo que indica la posibilidad de crecimiento y desarrollo favorable de estos antagonistas.

Con relación al efecto de la MO, un estudio realizado por Leggett y Rahe (1985), menciona que se observó un decaimiento sustancial en esclerocios de *S. cepivorum* enterrados en suelos orgánicos (20-50% de MO), sobre todo en los meses de invierno cuando se dan períodos extensos de saturación del suelo aunados con bajas temperaturas (0-10°C). En el presente estudio, los porcentajes de MO se encuentran en el rango de 1,31% (en el área de baja incidencia de la finca 5) a 9,86% (en todas las áreas de la finca 3), lo que indica que todas las fincas estudiadas poseen suelos típicamente minerales (MO < 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 MO o en descomposición (Papavizas 1985). Esto explica por qué se recuperaron colonias de los antagonistas en fincas con valores de MO 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

obtenidos, no se nota este tipo de relación en el caso de *S. cepivorum*, ya que el componente arcilloso no se detectó en el área de baja incidencia, en la que sí se registraron hongos con potencial antagonístico.

De acuerdo con los resultados expuestos, es posible aislar hongos con potencial antagonístico a partir de suelos a los que por muchos años se les ha aplicado una gran cantidad de fungicidas, lo que indica la posibilidad de que hayan desarrollado algún grado de resistencia, convirtiéndolos en buenos candidatos para incorporarlos en una estrategia de combate integrado, ya sea propagándolos masivamente en el laboratorio para luego aplicarlos en el campo, o bien, mejorando las condiciones del suelo para aumentar las poblaciones existentes naturalmente. Además, es recomendable que antes de incorporarlos a la estrategia de combate, se realizaran algunas pruebas *in vitro* y de invernadero para tratar de cuantificar el grado de antagonismo que presentan contra *S. cepivorum*.

#### LITERATURA CITADA

- ADAMS P.B., PAPAVIDAS 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. México, D.F. LIMUSA. 513 p.
- BERTSCH F. 1987. *Manual para interpretar la fertilidad de los suelos de Costa Rica*. 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 agosto. 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.
- COLEY SMITH J.R., COOKE R.C. 1971. Survival and germination of fungal sclerotia. *Ann. Rev. Phytopathol* 9: 65-92.
- COLEY SMITH J.R., 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 A.S. 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.
- 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. Fuente original: GHAFAR 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. C.P. Kubicek and G. E. Harman (eds). 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, pp. 9-22. In: R. W. Scheider (ed). Suppressive soils and plant disease. St. Paul, Minnesota.
- 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 de maestría, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 115 p.
- OBREGON M. 2001. Evaluación *in vitro* del poder antagonístico 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 antagonística 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.
- 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.
- ROMERO C.S. 1993. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 347 p.
- 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.