

CAPITULO VIII

CONTROL BIOLÓGICO DEL MARCHITAMIENTO VASCULAR DEL CLAVEL OCASIONADO POR *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* CON AISLAMIENTOS NO PATOGENICOS DE *Fusarium oxysporum*

Juan Carlos Rodríguez¹, Pedro Rodríguez Lobo¹, Jaime Rojas¹, José Luis Sánchez¹ y Germán Arbeláez²

INTRODUCCION

Una de las estrategias para el control del marchitamiento vascular del clavel, ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, es mediante el uso de algunos métodos biológicos. Para dicho control, se han utilizado diversos organismos como *Pseudomonas putida* (Scher y Baker, 1982), *Serratia liquefaciens* (Sneh et al, 1985), *Bacillus subtilis* (Filippi et al, 1987), *Streptomyces griseoviridis* (Lahdempera, 1987) y algunas especies de *Trichoderma* (Elias et al, 1989).

Igualmente, diversos investigadores han encontrado resultados satisfactorios de control de algunas formas especiales de *Fusarium oxysporum*, con aislamientos no patógenos de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Fusarium* spp., tales como *F. oxysporum* f.sp. *gladioli* (Magie, 1980), *F. oxysporum* f.sp. *melonis* (Alabouvette, 1986; Li y Zhang, 1990), *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (Paulitz et al, 1987), *F. oxysporum* f.sp. *batatas* (Ogawa y Komada, 1988) y *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Louter y Edginton, 1990).

En Francia e Italia, algunos suelos supresivos a algunas formas especiales de *F. oxysporum* tienen poblaciones altas de formas saprófitas de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium* spp., las cuales son responsables, en gran parte, de esa supresividad (Alabouvette et al, 1979; Garibaldi et al, 1980; Tramier et al, 1983).

También, se ha observado algún grado de control entre formas patogénicas de *Fusarium oxysporum* y formas especiales o razas patogénicas en otra especie de planta o variedad (Davis, 1966; Cook y Baker, 1983). Wymore y Baker (1982) encontraron protección de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

en tomate con *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* y Gessler y Kuc (1980) observaron muy buen nivel de control de *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* en pepino cohombro con aislamientos patógenicos de *F. oxysporum* f.sp. *melonis* y *F. oxysporum* f.sp. *conglutinans*.

Varios investigadores, como Rattink (1987, 1991) en Holanda, Tramier et al (1988) en Francia y Garibaldi et al (1988) en Italia, han logrado un buen nivel de control de *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* en distintas variedades de clavel con aplicaciones al suelo y a los esquejes de diversos aislamientos no patógenicos de *Fusarium oxysporum*.

Diversas evidencias señalan que el mecanismo de acción de los aislamientos no patógenos de *F. oxysporum* se debe al fenómeno de resistencia inducida o protección cruzada, proceso mediante el cual la planta es protegida de la infección por el estímulo a las defensas de la planta, mediante la producción de fitoalexinas y otras sustancias que detienen o retardan el desarrollo de la enfermedad.

Los objetivos del trabajo fueron evaluar la eficiencia de tres aislamientos no patógenos de *F. oxysporum* en el control de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* en variedades resistentes y susceptibles de clavel estándar y clavel miniatura.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología y en los invernaderos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia en Santafé de Bogotá D.C., durante el segundo semestre del año 1991.

Las variedades de clavel estándar utilizadas en el trabajo fueron "U. Conn." (susceptible a la raza 2) y "Happy Candy" (resistente a la raza 2) y las variedades de clavel miniatura fueron "Tony" (susceptible a la raza 2) y "Bagatel" (resistente a la raza 2).

Como patógeno, se utilizó el aislamiento 18 de la Raza 2 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, caracte-

¹ Ingeniero Agrónomo, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490, Santafé de Bogotá D.C.

² Profesor Titular, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Santafé de Bogotá D.C.

terizado como uno de los aislamientos de mayor agresividad en el trabajo de Arbeláez y Calderón (1991). Como antagonistas, se utilizaron los aislamientos C5 CSU y C14 CSU suministrados por el profesor Ralph Baker de la Universidad Estatal de Colorado, Fort Collins, Estados Unidos y el aislamiento 618-9 enviado por el doctor Henk Rattink de la Estación Experimental de Floricultura de Aalsmeer, Holanda.

Los aislamientos patógenos y no patógenos, para la inoculación al suelo, se propagaron en granos enteros de avena; los granos se embebieron en agua destilada durante 24 horas, se colocaron en erlenmeyers de dos litros a la mitad de su capacidad y se esterizaron a 121°C durante 2 días consecutivos, luego, se inocularon con tres trozos de micelio del hongo en PDA y se incubaron a 24°C durante 30 días y, para lograr una colonización homogénea del sustrato se agitaron diariamente; posteriormente, los granos colonizados se secaron a la temperatura ambiente por 5 días y se molieron en una licuadora.

Para la inoculación a los esquejes, los hongos se propagaron en el medio de cultivo líquido Papadextrosa en erlenmeyers de 500 ml, llenados a la mitad de su capacidad y se esterizaron a 121°C por una hora; luego, se inocularon con un fragmento de micelio y se colocaron bajo agitación constante a 150 rpm durante siete días a 24°C.

Para evaluar la eficiencia de los tres aislamientos no patógenos en el control de la enfermedad, se estableció un experimento con tres formas diferentes de aplicación, cuatro variedades de clavel y cuatro dosis de los aislamientos patógenos y no patógenos.

Un diseño experimental de parcelas sub-subdivididas se utilizó, en donde las parcelas principales fueron las variedades de clavel, las subparcelas fueron las formas de aplicación y dentro de ellas se estableció un factorial 4x4, en donde se combinaron cuatro dosis de los aislamientos no patógenos y cuatro dosis del patógeno.

La enfermedad se evaluó semanalmente con la escala descrita en el Cuadro 8.1 y se hizo durante 14 semanas.

La unidad experimental consistió en una planta de clavel sembrada en una bolsa de polietileno negra de 1,5 Kg de capacidad, la cual se llenó con suelo de textura franco-limosa, tratado, previamente, con vapor a 82°C durante una hora.

Las plantas se colocaron en un banco de concreto elevado, bajo un invernadero metálico con cubierta de polietileno, similar a los usados en la producción comercial de clavel y se adoptó un sistema de

riego automático con goteros individuales para cada planta.

El ensayo se replicó tres veces, para un total de 864 plantas. Además, se realizaron fertilizaciones, riegos y demás labores culturales efectuadas en los cultivos comerciales de clavel.

Cuadro 8.1. Escala de evaluación de la enfermedad.

VALOR	SINTOMATOLOGIA OBSERVADA
0	Planta sin síntomas
1	Planta con síntomas en el primer tercio
2	Planta con síntomas en el segundo tercio
3	Planta con síntomas en el tercio superior
4	Planta muerta

El patógeno y los aislamientos no patógenos del hongo se aplicaron de tres formas:

1. Forma de aplicación "a". El aislamiento no patógeno se aplicó al suelo pasterizado un mes antes de la siembra y el patógeno se aplicó al suelo inmediatamente antes de la siembra.
2. Forma de aplicación "b". El aislamiento no patógeno se aplicó al suelo un mes antes de la siembra y el patógeno se aplicó al esqueje antes de la siembra.
3. Forma de aplicación "c". El aislamiento no patógeno se aplicó al esqueje en el momento de la siembra y el patógeno se aplicó al suelo inmediatamente antes de la siembra.

En los tratamientos "a" y "b", los aislamientos no patógenos se aplicaron al suelo pasterizado un mes antes de la siembra, se incorporaron de manera homogénea y para lograr una buena colonización, se cubrieron con un plástico.

En los tratamientos del patógeno y de los aislamientos no patógenos al suelo, el inóculo de los hongos se incorporó de manera uniforme al suelo, mezclándolo homogéneamente. Se usaron cuatro niveles: 0,0; 0,1; 0,5 y 2,5 % por peso.

La inoculación del patógeno y de los aislamientos no patógenos a los esquejes se hizo por inmersión de las raíces durante 30 segundos, los cuales se sembraron en seguida. El patógeno se inoculó con una suspensión de esporas en cuatro niveles: 0; 44.000; 220.000 y 1.100.000 esporas por mililitro. Los aislamientos no patógenos se aplicaron a los esquejes a una concentración de 0; 7.600; 38.000 y 190.000 esporas por mililitro.

RESULTADOS

Con la aplicación de los aislamientos no patógenos de *Fusarium oxysporum*, en el trabajo, se logró algún nivel de control de la enfermedad ocasionada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en clavel, lo cual dependió de las variedades ensayadas, de los aislamientos utilizados, de las formas de aplicación y de las dosis empleadas.

Efecto de las Variedades en el Desarrollo de la Enfermedad

La enfermedad se desarrolló de una manera diferente en las cuatro variedades de clavel utilizadas, siendo mayor en las variedades susceptibles U. Conn. y Tony y, menor en las variedades resistentes Happy Candy y Bagatel (Figura 8.1).

La variedad menos afectada fué la de clavel miniatura Bagatel, con un índice de enfermedad de 1,6, 14 semanas después de la siembra, seguida de la variedad de clavel estándar Happy Candy, con un índice de 1,7, luego, la variedad Tony con un índice de 2,2 y, por último, la variedad de clavel estándar U. Conn, con un índice de 2,5 (Figura 8.1).

En los dos tipos de clavel estándar y miniatura, las diferencias del índice de enfermedad fueron altamente significativas entre las variedades resistentes y susceptibles.

Efecto de los aislamientos no Patógenos de *Fusarium oxysporum*

El uso de dos de los tres aislamientos no patógenos de *Fusarium oxysporum*, aplicados al suelo o a los esquejes, ocasionó un control significativo de la enfermedad.

El aislamiento C 14 fué el más eficiente en el control de la enfermedad, seguido del aislamiento C 5 que

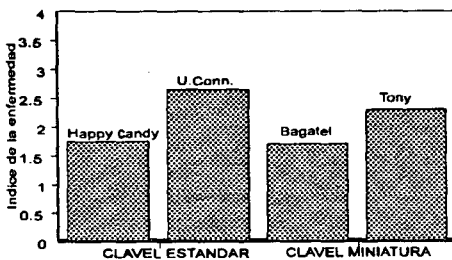


Figura 8.1. Índice de la enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en las cuatro variedades de clavel, 14 semanas después de la siembra

fué un poco menos efectivo y el aislamientos 618-9 fué el menos eficiente, pero, también ocasionó algún nivel de control (Figura 8.2).

Con el aislamiento C 14, los síntomas de la enfermedad se presentaron en el tercio inferior de las plantas en las dos variedades resistentes Bagatel y Happy Candy y, en el tercio medio, en las dos variedades susceptibles Tony y U. Conn. Con el aislamiento 618-9, los síntomas de la enfermedad se presentaron en el tercio medio en las variedades resistentes y, en el tercio superior en las variedades susceptibles.

Efecto de las Formas de Aplicación de los Organismos.

Las formas de aplicación de los aislamientos no patógenos de *Fusarium oxysporum* más efectivas para el control de la enfermedad fueron los tratamientos "a" y "c", en donde dichos aislamientos se aplicaron al suelo una mes antes de la siembra y, a los esquejes antes de la siembra; sin embargo, entre los dos tratamientos se observaron pocas diferencias entre si, pero si grandes diferencias con el tratamiento "b", en donde el aislamiento no patógeno se aplicó al suelo y el hongo patógeno se aplicó al esqueje antes de la siembra.

Efecto de la Interacción de los Dosis de los Aislamientos Patógenos y no Patógenos.

Los tratamientos al suelo y a los esquejes de los tres aislamientos no patógenos de *Fusarium oxysporum* y que no se inocularon con el patógeno (A_1P_0 , A_2P_0 , A_3P_0) ocasionaron algunos síntomas del marchitamiento vascular en las cuatro variedades inoculadas, es decir, fueron patogénicos bajo las condiciones en que se realizó el experimento (Figura 8.3).

El aislamiento C 14 fué ligeramente patogénico, con

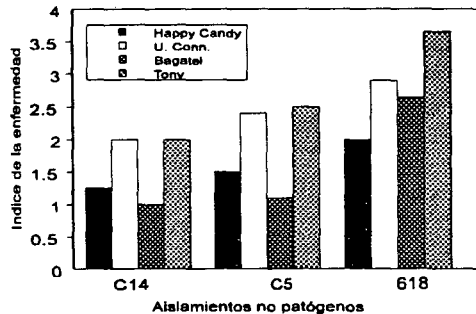


Figura 8.2. Efecto de los tres aislamientos no patógenos de *Fusarium oxysporum* en el control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en clavel, 14 semanas después de la siembra

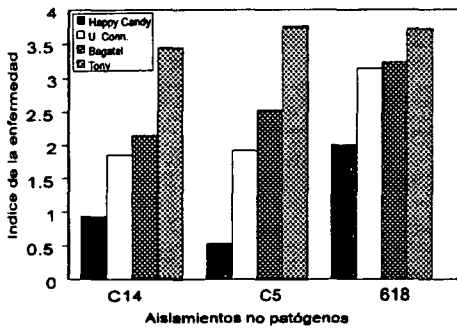


Figura 8.3. Índice de la enfermedad ocasionada por las dosis más altas de los aislamientos no patógenos (A_3) y sin aplicación del patógeno (P_0) para las cuatro variedades de clavel, 14 semanas después de la siembra.

un índice de enfermedad bastante bajo y el aislamiento C 5 fué un poco más patogénico que aquél. El aislamiento 618-9, procedente de Holanda, fué el de mayor capacidad de inducir la enfermedad, pero su patogenicidad fué mucho menor que la del aislamiento patogénico 18 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (Figuras 8.2 y 8.3).

En la interacción de las diferentes dosis de los aislamientos no patógenos con las dosis del patógeno, se observó, en general, que a mayor dosis de ambos organismos, se logró una mayor enfermedad, principalmente con el aislamiento 618-9.

El mejor control de la enfermedad se obtuvo en los tratamientos en donde las dosis de los aislamientos no patógenos fueron superiores a las dosis del patógeno, por ejemplo en los tratamientos A_3P_1 , A_2P_1 y A_3P_2 (Figura 8.4).

Los índices más altos de la enfermedad se observaron con el aislamiento 618-9 en dosis altas de ambos organismos, como con el tratamiento A_3P_3 .

DISCUSION

El uso de aislamientos no patógenos de *Fusarium oxysporum* ofrece una gran posibilidad de control del marchitamiento vascular del clavel ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*.

Los aislamientos C 5, C 14 y 618-9 de *Fusarium oxysporum*, determinados como no patógenos en diversos ensayos en Estados Unidos (Baker, 1991) y en Holanda (Rattink, 1991), presentaron alguna patogenicidad en las variedades de clavel utilizadas, aspecto no esperado en la investigación. Sin embargo, Cook y Baker (1983) consideran que aislamientos no patógenos pueden serlo en otros

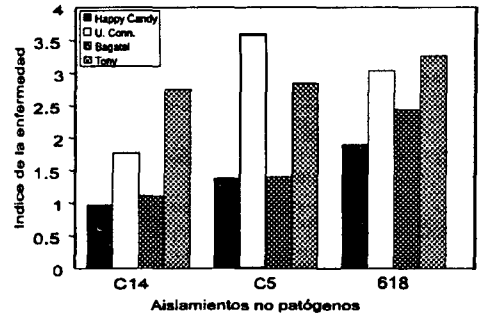


Figura 8.4. Índice de la enfermedad ocasionada por la dosis alta de los aislamientos no patógenos (A_3) y la dosis baja del patógeno (P_1), 14 semanas después de la siembra

ecosistemas.

En el control de la enfermedad, el aislamiento C 14 sobresalió entre los aislamientos no patógenos, seguido por el aislamiento C 5; además, el aislamiento C 14 fue el de menor patogenicidad, lo cual parece confirmar que el mecanismo de acción de ese aislamiento es por resistencia inducida, como lo consideran Cook y Baker (1983), Paulitz *et al* (1987) y Rattink (1991). Además, estos resultados coinciden con las apreciaciones de Baker (1991), quien considera que el aislamiento C 14 es mejor que otros aislamientos no patógenos del hongo, debido a que coloniza las raíces de la planta de forma tan eficiente como lo hace el patógeno, aspecto que no ocurre con el aislamiento C 5.

La inoculación al suelo de los aislamientos no patógenos un mes antes de la siembra en el tratamiento "a", para lograr una buena colonización, no dio los resultados de control esperados y, con este método de aplicación, apenas, se logró un efecto ligeramente superior a cuando dichos organismos se aplicaron a los esquejes antes de la siembra en el tratamiento "c". Aparentemente, la aplicación de dichos organismos al esqueje da protección a las puntas de las raíces y a las pequeñas heridas, que son los sitios de entrada del patógeno a la planta.

La aplicación de una suspensión de esporas de los organismos no patógenos a los esquejes antes de la siembra es un método fácil, práctico y que requiere menor cantidad de inóculo que si se aplica al suelo; por lo tanto, es el método de aplicación que debe explorarse en futuras investigaciones. Además, sería conveniente ensayar la aplicación de dichos organismos a los bancos de enraizamiento, pues se podría llevar a la producción de esquejes protegidos contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*,

que eventualmente podrían encontrar en el suelo.

La ineficiencia observada en el control de la enfermedad con el método de aplicación "b", en donde el patógeno se aplicó a los esquejes y el no patógeno se inoculó al suelo, refuerza la importancia de sembrar esquejes sanos, pues, cuando el patógeno vascular está dentro del esqueje, la eficiencia de la resistencia inducida es mucho menor, debido a que ya se está produciendo la colonización sistémica en la planta.

La aplicación del aislamiento 618-9 y del patógeno, principalmente en dosis altas, mostraron una acción patogénica aparentemente aditiva y, a su vez, de menor control de la enfermedad; estos resultados difieren de lo observado por Rattink (1987, 1991) e indican que dicho aislamiento no es adecuado para el control de la enfermedad bajo las condiciones ambientales y de suelo de la Sabana de Bogotá.

Una de las razones para la menor efectividad de algunas dosis de los aislamientos no patógenos fué el hecho de haber usado, en la inoculación a los esquejes, cantidades menores en casi seis veces con relación al patógeno, debido a que, en el medio líquido, no se lograron concentraciones de inóculo similares a las obtenidas con el patógeno.

La patogenicidad de los tres aislamientos no patógenos encontrada bajo las condiciones experimentales coincide con los resultados de las pruebas de compatibilidad vegetativa, pues dichos aislamientos no patógenos fueron compatibles vegetativamente con la mayoría de los aislamientos colombianos de la Raza 2 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, como se mencionó en el Capítulo IV.

El uso de los aislamientos no patogénicos de *Fusarium oxysporum* y de aislamientos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* de muy baja patogenicidad se vislumbra como un método biológico de gran potencial de control bajo las condiciones colombianas y debe evaluarse en cultivos comerciales, en contraste con el uso de otros agentes biológicos, como *Trichoderma* spp., *Pseudomonas putida* y *Serratia liquefaciens*, cuyos resultados de control de la enfermedad han sido inefectivos bajo condiciones de invernaderos comerciales de clavel y se presentan en el Capítulo IX.

BIBLIOGRAFIA

1. Alabouvette, C. *Fusarium* wilt-suppressive soils from the Chateaufort region: review of a 10-year study. *Agronomie* 6: 273-284. 1986.
2. Alabouvette, C., F. Rouxel and J. Louvet. Characteristics of *Fusarium*-wilt suppressive soils and prospects for their utilization in biological control. p. 165-182. In B. Schippers and W. Gams (Eds.). *Soil-borne plant pathogens*. Academic Press. New York. 1979.
3. Arbeláez, G. and O.L. Calderón. Determination of the physiological races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* on carnation in Colombia. *Acta Horticulturae* 307: 43-49. 1992.
4. Baker, R. Four horses of biological control. p. 1-16. *Proceedings of the Symposium War in the rhizosphere*. March 20, 1991. Minnesota Agricultural Experiment Station. 1991.
5. Cook, R.J. and K.F. Baker. The nature and practice of biological control of plant pathogens. *The American Phytopathological Society*. St. Paul, Minnesota. 1984.
6. Davis, D. Cross-infection in *Fusarium* wilt diseases. *Phytopathology* 56: 825-828. 1966.
7. Elías, R., O. Arcos and G. Arbeláez. Estudio del antagonismo de algunas especies de *Trichoderma* sobre *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. *Agronomía Colombiana* 6: 25-30. 1989.
8. Filippi, C., G. Bagnoli, M. Volterrani and G. Picci. Antagonistic effect of soil bacteria on *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (Prill. et Del.) Snyd. et Hans. III. Relation between protection against *Fusarium* wilt on carnation and bacterial antagonists colonization of roots. *Plant and Soil* 98: 161-167. 1987.
9. Garibaldi, A., G. Pergola and C. Dalla Guda. Sulla presenza in Italia di terreni repressivi nei riguardi della fusariosi del garofano. *Atti Giorn. Fitopatol.* 458-464. 1980.
10. Garibaldi, A., F. Brunatti and M.L. Gullino. Suppression of *Fusarium* wilt of carnation by competitive non pathogenic strains of *Fusaria*. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent* 51/2b: 633-638. 1986.
11. Garibaldi, A., F. Brunatti and M.L. Gullino. Evaluation of several antagonists and different methods of application against *Fusarium* wilt of carnation. *EPPO Bulletin* 17: 625-629. 1987.
12. Gessler, C. and J. Kuc. Induction of resistance to *Fusarium* wilt of cucumber by root and foliar pathogens. *Phytopathology* 73: 1339-1341. 1982.
13. Lahdenpera, M. L. The control of *Fusarium* wilt of carnation with a *Streptomyces* preparation. *Acta Horticulturae* 216: 85-92. 1987.
14. Li, J. and S. Zhang. Effects of preinoculation of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* on the growth of *Fusarium* wilt of watermelon. *Chinese Journal of Biological Control* 6: 165-169. 1990.
15. Magie, R.O. *Fusarium* disease of gladioli controlled by inoculation of corms with non-pathogenic fusaria.

- Proc. Florida State Horticultural Society 93: 172-175. 1980.
16. Ogawa, K. and H. Komada. Biological control of *Fusarium* wilt of sweet potato by non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. Ann. Phytopathol. Soc. Japan 50: 1-9. 1984.
 17. Paulitz, T.C., C.S. Park and R. Baker. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. Canadian Journal of Microbiology 33: 349-353. 1987.
 18. Rattink, H. Possibilities of cross-protection against *Fusarium* wilt by non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Acta Horticulturae 216: 131-140. 1987.
 19. Rattink, H. Biological control of *Fusarium* wilt of carnation by a non pathogen isolate of *Fusarium oxysporum*. Acta Horticulturae 307: 37-42. 1992.
 20. Scher, F.M. and R. Baker. Induction of suppressiveness in soil to *Fusarium* wilt pathogens with *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelate. Phytopathology 72: 1567-1573. 1982.
 21. Sneh, B., O. Agami and R. Baker. Biological control of *Fusarium* wilt of carnation with *Serratia liquefaciens* and *Hafnia alvei* isolated from rhizosphere of carnation. Phytopathol. Z. 113: 271-276. 1985.
 22. Tramier, R., C. Antonini and A. Bettachini. Biological control of *Fusarium* wilt of carnations with different *Fusarium oxysporum* strains. EPPO Bulletin 18: 13-18. 1988.
 23. Wymore, L.A. and R. Baker. Factors affecting cross-protection in control of *Fusarium* wilt of tomato. Plant Disease 66: 908-910. 1982.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
BIBLIOTECA