

EFFECTIVIDAD *in vitro* E *in situ* DE FUNGICIDAS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS EN EL CONTROL DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* y *Uromyces transversalis* EN GLADIOLA

In vitro AND *in situ* EFFECTIVENESS OF CHEMICAL AND BIOLOGICAL FUNGICIDES ON CONTROL OF *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* AND *Uromyces transversalis* IN GLADIOLA

Michel-Aceves, A.C.¹; Ariza-Flores, R.², Otero-Sánchez, M.O.¹
Barrios-Ayala, A.²; Quiroz-Millán, A.M.¹

¹Centro de Estudios Profesionales del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, Av. Vicente Guerrero No. 81, Colonia Centro, Iguala, Guerrero. CP 40000, México. ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Guerrero), Campo Experimental Iguala. Carretera Iguala-Tuxpan km 2. Iguala, Gro. México.

Autor responsable: amichelaceves@yahoo.com.mx

RESUMEN

Se evaluó la efectividad *in vitro* e *in situ* de los fungicidas sintéticos Procloraz+Tiofanato-metilico y Metalaxil+Clorotalonil y los biológicos (*Trichoderma* spp., y *Bacillus subtilis*) en el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (*Fog*) y *Uromyces transversalis* en gladiola. *In vitro* se realizaron tres ensayos: prueba de celofán, cultivo dual y prueba de fungicidas. Un ensayo *in situ* con cinco tratamientos: dos fungicidas sintéticos, dos biológicos y un testigo, unidad experimental de cuatro surcos de 0.8 m de ancho por 7 m de largo. Las variables: altura de planta, incidencia, severidad y rendimiento. Los datos de cada bioensayo se sometieron a un análisis de varianza y prueba de Tukey. *In vitro*, de los productos biológicos, *Trichoderma asperellum* cepa 8 inhibió 60.6% el micelio de *Fog* con antagonismo clase dos y *Bacillus subtilis* no fue efectivo; de los químicos la mezcla de Procloraz+Tiofanato-metilico, 98.3%. *In situ*, la incidencia y severidad de *U. transversalis* fue nula donde se aplicaron los productos. En *Fog*, la mezcla Procloraz+Tiofanato-metilico logró reducir la severidad 47% y 30.9% con *T. asperellum*. En esta zona, donde la incidencia y severidad de *Fog* es alta, se tiene un producto sintético que es bueno y requiere seguir buscando cepas nativas efectivas.

Palabras clave: *Trichoderma asperellum*, *Bacillus subtilis*, control biológico.



ABSTRACT

The *in vitro* and *in situ* effectiveness of Prochloraz+Tiofanato-methylc synthetic fungicides and Metalaxil+Clorotalonil, as well as biological ones (*Trichoderma* spp., and *Bacillus subtilis*), on control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (*Fog*) and *Uromyces transversalis* in gladiola, was evaluated. For *in vitro* three assays were carried out: cellophane test, dual cultivation and fungicide test. An *in situ* assessment with five treatments: two synthetic fungicides, two biological and one control, with an experimental unit of four furrows, 0.8 m wide by 7 m long. The variables: plant height, incidence, severity and yield. The data from each bioassay underwent variance analysis and Tukey test. *In vitro*, of the biological products, strain 8 of *Trichoderma asperellum* inhibited the *Fog* mycelium with antagonism class two in 60.6%, and *Bacillus subtilis* was not effective; of the chemicals, the mixture of Prochloraz+Tiofanato-methylc in 98.3%. *In situ*, the incidence and severity of *U. transversalis* was null where the products were applied. In *Fog*, the Prochloraz+Tiofanato-methylc mixture reduced the severity in 47% and *T. asperellum* in 30.9%. In this area, where the incidence and severity of *Fog* is high, there is a synthetic product that is good and it is required to continue searching for effective native strains.

Key words: *Trichoderma asperellum*, *Bacillus subtilis*, biological control.

INTRODUCCIÓN

La gladiola (*Gladiolus grandiflorus*) es una flor económicamente importante en el mundo, apreciada como ornamental por su diversidad de colores llamativos; se utiliza como planta de paisaje en jardines, exhibición y como flor de corte. En México las condiciones agroclimáticas son favorables para su cultivo; la superficie sembrada en 2011 alcanzó un total de 3,714.5 ha⁻¹, con una producción de 3,858,073.32 t ha⁻¹. Los estados productores son Puebla, México, Morelos, Veracruz, Michoacán, Oaxaca y Guerrero; este último cuenta con 365 ha⁻¹ cultivadas, equivalentes a 698.8 t ha⁻¹ de producción (SIAP, 2012), y representa la fuente de empleo y sustento de hasta 80% de la población en comunidades como La Concepción, Guerrero.

En la producción de la gladiola existen problemas fitosanitarios que conllevan a pérdidas económicas y las de mayor importancia por su incidencia son *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (*Fog*), que ocasiona la pudrición del cormo; *Uromyces transversalis* (*Ut*), que provoca la roya en el follaje. De las variedades comerciales, las de color rojo y blanco son más susceptibles y para su control se aplican diversos agroquímicos, tales como carbendazim, clorotalonil (Chandel y Bhardwaj, 2000) y benomilo (Ram et al., 2004), y su uso continuo contamina el ambiente; tienen efecto residual y generan resistencia a los patógenos (Riaz et al., 2008; Nazir y Riazuddin, 2008). En este sentido se requiere evaluar métodos de control más eficientes y sustentables, tales como los biológicos y de manejo cultural que faciliten reducir o eliminar el uso de agroquímicos de origen sintético, además de integrar métodos para un manejo cultural de la enfermedad (Chandel y Deepika, 2010). Dentro de las alternativas biológicas se han evaluado especies como *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. koningii* y *T. virens*, así como al hongo micorrízico arbuscular *Glomus mosseae*, la bacteria *Bacillus subtilis*, extractos vegetales e, inclusive, se ha recurrido a la transformación genéti-

ca para resistencia a la enfermedad (Chandel y Deepika, 2010). Autores como Khan y Mustafa, (2005) han reportado que, aplicada al suelo, la mezcla de *T. harzianum* (T014) y *Pseudomonas fluorescens* (PS07) reduce la infección por *Fog* e incrementa el rendimiento, comparado con el uso de carbendazim a 200 ppm; sin embargo, se requiere un uso más extensivo del control biológico y la búsqueda de agentes bio-controladores eficientes y preferentemente nativos que sean capaces de competir con el patógeno en el mismo nicho ecológico. Con base en lo anterior se evaluó la efectividad biológica de *B. subtilis*, cepa comercial y cepas nativas de *Trichoderma* spp., como alternativa de control biológico, y fueron comparados con los fungicidas sintéticos de uso común por el productor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo, aislamiento e identificación de microorganismos

Para aislar *Trichoderma* spp. nativo, en el mes de octubre se colectó suelo de un terreno donde el ciclo anterior se había sembrado gladiola en la comunidad de La Concepción, municipio de Pilcaya, Guerrero (18°46' N y 99°44' O) a 1370 m de altitud. Para aislar a *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* se utilizaron cormos recién cosechados con síntomas de la enfermedad. En el caso de *U. transversalis* no fue posible cultivarlo en laboratorio por tratarse de un hongo parásito obligado. El aislamiento e identificación de *Trichoderma* spp. nativo se hizo directamente del suelo por el método de dilución en placa (Singleton et al., 1992; Michel-Aceves et al., 2009) y las colonias se identificaron por su crecimiento típico y características

morfológicas (Barnett y Hunter, 1999). *F. oxysporum* f sp *gladioli* (Fog) se aisló de cormos recién cosechados con síntomas de la enfermedad (Leslie y Summerell, 2006). Las colonias se identificaron por la forma y dimensión de micro y macroconidios con claves del género (Nelson et al., 1983; Seifert, 1996; Leslie y Summerell, 2006). Para la extracción de ADN se utilizó la metodología propuesta por Arhens y Seemüller (1992), donde las secuencias de nucleótidos se compararon con las de la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Bioensayo *in vitro* I. Prueba de celofán

Se evaluaron los metabolitos de *Trichoderma* spp., (Dennis y Webster, 1971), se sembró al hongo antagonista en cajas Petri con medio de cultivo PDA y papel celofán, a los dos días se retiró el celofán y en esa misma caja se sembró a *Fog*. Se midió el diámetro del crecimiento radial hasta que el testigo llenó la caja Petri (12 días). Se tuvieron nueve tratamientos que correspondieron a ocho cepas nativas de *Trichoderma* spp., aisladas, y el testigo *Fog*, distribuido en un diseño experimental completamente al azar, con ocho repeticiones. El crecimiento micelial de *Fog* se midió en cm y el porcentaje de inhibición se calculó con la ecuación: % de inhibición = $[(D1-D2)/D1 \times 100]$ (Arzate-Vega et al., 2006); donde: D1=diámetro de la colonia de *Fog* creciendo en cajas con PDA libre de inhibidores y D2 =diámetro de la colonia fungosa de *Fog* creciendo en cajas con PDA, donde anteriormente creció *Trichoderma* spp., sobre el papel celofán, impregnando al medio de cultivo enzimas y metabolitos secundarios producidos.

Bioensayo *in vitro* II. Actividad antagonista de *Trichoderma* spp., sobre *Fog*.

Se utilizó la técnica de cultivo apareado o dual (Cherif y Benhamou, 1990). Para cada tratamiento se sembró en un extremo de cajas Petri con PDA a *Fog* y se dejó crecer durante tres días; posteriormente, en el otro extremo de la caja se sembró *Trichoderma* spp. Se tuvieron ocho tratamientos que correspondieron a las cepas nativas de *Trichoderma* spp., distribuidas bajo un diseño completamente al azar con ocho repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por una caja petri. Se tomaron lecturas cada 24 h para observar el número de días al primer contacto entre las hifas de los hongos, medir el crecimiento de *Trichoderma* spp., de *Fog* y la zona de intersección. A los 15 días después de la siembra se clasificó el tipo de antagonismo según Bell et al. (1982).

Bioensayo *in vitro* III. Evaluación de fungicidas

Se utilizaron los productos sintéticos Metalaxil+Clorotalonil (Blazon®), Procloraz (Sportak®)+Tiofanato metílico (Cercobin®) y el producto biológico a base de *Bacillus subtilis* (Serenade®) y un testigo sin productos. Los cuatro tratamientos se distribuyeron bajo un diseño experimental completamente al azar con ocho repeticiones; se generaron 32 unidades experimentales (una caja Petri). Los fungicidas se depositaron en el fondo de cada caja petri y se les agregó 15 mL de PDA líquido; se agitó suavemente hasta disolverlos y se dejó solidificar a temperatura ambiente. En el centro de la caja se sembró a *Fog* y el diámetro de la colonia se midió diariamente por diez días. Las variables fueron el crecimiento micelial y el porcentaje de inhibición.

Bioensayo *in situ*: Control biológico y químico de *Fog*. Material vegetal

Se utilizó la variedad de gladiola roja borrega (*Gladiolus grandiflorus*), la cual tiene tallo vigoroso de color verdoroso con buena aceptación en el mercado por su vistosidad y vida de anaquel; sin embargo, es muy susceptible a enfermedades.

Tratamientos y diseño experimental en campo

Se evaluaron cinco tratamientos. Los fungicidas sintéticos Metalaxil+Clorotalonil (Blazon®) y (Procloraz (Sportak®)+Metil Tiofanato (Cercobin®), así como los biológicos *Bacillus subtilis* (Serenade®), *Trichoderma asperellum* nativo (Ta8) y el testigo, distribuidos bajo un diseño experimental de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. La unidad experimental consistió de cuatro surcos de 0.8 m de ancho por 7 m de largo y la parcela útil en los dos surcos centrales, dejando 0.5 m en cada extremo por efecto de orilla. Antes del sembrado se desinfectaron los cormos por inmersión de 15 min en un contenedor que contenía el producto, según su tratamiento. Éstos se sembraron en hilera a 5 cm de distancia cada uno. Se realizó la primera fertilización con nitrógeno, fósforo y potasio (N-P-K) al momento de la siembra con 10 kg de la mezcla 71_N-52_P-00_K y la segunda 45



días después con 30 kg de $17_N-17_P-17_K$, además de aplicaciones foliares de micro-nutrientes con los productos comerciales Viretrol 20500 y PK Suprem.

Preparación y aplicación de los productos

La cepa de *Trichoderma* spp., fue multiplicada de la cepa nativa 8 (*T. asperellum*) en olote molido estéril (Arzate-Vega *et al.*, 2006). Se contabilizó el número de esporas en una cámara de Neubauer y se ajustó a 1×10^8 esporas mL^{-1} . El fungicida biológico con *Bacillus subtilis* (Serenade®) (3 kg ha^{-1}) y los fungicidas sintéticos Procloraz (Sportak®)+Tiofanato-metil (Cercobin®) ($0.5 \text{ L ha}^{-1}+1.0 \text{ kg ha}^{-1}$) y Metalaxil+Clorotalonil (Blasón®) ((Blasón®) (dosis 3 kg ha^{-1}), fueron adquiridos comercialmente y se aplicaron en las dosis indicadas. Los productos se aplicaron al momento de la siembra y cada 10 días por siete ocasiones en el nudo vital de la planta y al follaje. La cosecha se realizó cada tercer día durante 10 cortes. Se contabilizó el número de tallos florales por corte y el total para ser transportados y comercializados en la Central de Abastos (CEDA) del estado de México.

Variables de Estudio

Altura de la planta, incidencia de *Fog* (% de incidencia = número de plantas con síntomas $\times 100$ / número total de plantas), severidad (% de severidad = número de plantas muertas $\times 100$ / número total de plantas) y rendimiento. Los datos obtenidos de cada ensayo se sometieron a un análisis de varianza (ANVA) y la prueba de rangos múltiples de Tukey ($P \leq 0.05$) con el paquete estadístico SAS (1999). En el caso de los datos en porcentajes, antes de someterlos al ANVA y prueba de Tukey, se les realizó la transformación con la fórmula: raíz cuadrada del promedio más 0.5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del tejido infectado del cormo de gladiolo se aisló, purificó e identificó la especie de *Fog* en PDA. El micelio es blanco con ligera pigmentación violeta pálido al reverso de la caja, microconidios de forma oval divididos en su mayoría por un septo, macroconidios de tamaño corto dividido por tres septos, de forma apical enganchado, la forma basal claramente con muesca, con una longitud de 50.5 a 67.5 μm . No se observaron clamidosporas (Nelson *et al.*, 1983; Leslie y Summerell, 2006). Se confirmó con la identificación molecular al comparar las secuencias con el banco de genes (*F. oxysporum* f. *gladioli* DQ279795 *F. oxysporum* FJ545244). Se aislaron ocho cepas nativas de *Trichoderma* spp. con las características típicas del género (Barnett y Hunter, 1999). Se identificó a

nivel de especie la cepa nativa ocho que fue mejor en los ensayos *in vitro*, primero con base en las características morfológicas con las claves de Rifai (1969) y Bisset (1991), y correspondió a la especie *T. asperellum*. Se confirmó con la identificación molecular al comparar secuencias con las del banco de genes (gi|169117643|gb|EU280122.1|*Trichoderma asperellum* strain GJS.1110 0.0).

Estos resultados son relevantes, tal como los obtenidos por Arzate-Vega *et al.* (2006) quienes aislaron 25 cepas en 15 huertas de plátano (*Musa* spp.) en Tenexpa, Guerrero, y similares a los obtenidos por Michel-Aceves *et al.* (2009) de suelo colectado en otoño de la huerta de mango en Tuxpan, Guerrero. Es importante señalar y resaltar que la estación del año pudo influir en la densidad de población de *Trichoderma* spp. Harman (2002) ha reportado altas poblaciones en primavera y verano, comparado con otoño e invierno de zonas templadas en suelos forestales donde la temperatura y la humedad fueron parámetros de importancia en la distribución natural de *Trichoderma* spp. en suelo, además de la influencia del manejo de huertas mediante el uso excesivo de productos químicos sobre la dinámica poblacional; tal es el caso del fungicida Benomilo (Ahmad y Baker, 1987) y la aplicación de citrolina (aceite agrícola), o bien, por presencia de saprofitos que compiten por espacio y nutrientes. En el bioensayo I la cepa 8 sobresalió significativamente a los 21 días ($P \leq 0.0281$) con el menor crecimiento (Cuadro 1) y el mayor porcentaje de inhibición (60.6%). Las cepas dos y tres mostraron crecimiento semejante al del testigo y no manifestaron inhibición. En

Cuadro 1. Crecimiento micelial y porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* por *Trichoderma* spp. a los 21 días después de la siembra.

| No. Tratamiento | Crecimiento (cm) | Inhibición (%) |
|-----------------|---------------------|----------------|
| Cepa 1 | 3.7 ab ² | 18.3 bcd |
| Cepa 2 | 4.5 a | 0.0 d |
| Cepa 3 | 4.5 a | 0.0 d |
| Cepa 4 | 3.2 b | 37.8 b |
| Cepa 5 | 3.8 ab | 12.2 cd |
| Cepa 6 | 3.6 ab | 23.9 bc |
| Cepa 7 | 3.6 ab | 20.6 bc |
| Cepa 8 | 1.6 c | 60.6 a |
| Testigo | 4.5 a | 0.0 d |

² Medias dentro de cada columna seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey ≤ 0.5).

trabajos similares realizados por diferentes autores se reportan valores superiores e inferiores a los obtenidos en esta investigación; por ejemplo, Michel-Aceves *et al.* (2005a) indicaron 77.8% de inhibición en *Fo* f. sp. *lycopersici* con cepas nativas de *Trichoderma* spp. Otros, como Aquino-Martínez *et al.* (2008), evaluando *in vitro* la inhibición de aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* con cepas de *Trichoderma* spp., obtuvieron valores de 42.08% a 64.81%. En otra investigación Michel-Aceves *et al.* (2009) indicaron un porcentaje de inhibición sobre *Fo* de 62.9%. Estas diferencias podrían deberse entre otras causas a la especie de *Trichoderma* spp., sitio de procedencia y potencial antagonístico ante la producción de quitinasas y glucanasas, las cuales son diferentes en cada una de ellas e inclusive en cepas de la misma especie (Harman, 2002).

Al respecto, Vargas-Hoyos *et al.* (2012) indica que de 27 aislamientos de *Trichoderma* spp., las cepas T46 y T109 de *T. asperellum* crecieron en un amplio rango de temperaturas y mostraron capacidad de adaptación a condiciones ambientales cambiantes, registrando el mayor porcentaje de inhibición entre 20 °C y 30 °C, el cual fue superior a 75% sobre *Rhizoctonia* sp. y *Colletotrichum* sp.

En el cultivo dual el crecimiento de ambos hongos fue significativamente diferente a los 17 días después de siembra (dds) (Cuadro 2); en el caso de *Trichoderma* spp. sobresalió ($P \leq 0.0032$) la cepa seis con 4.37 cm, mientras que en *Fog* ($P \leq 0.0100$) la cepa dos obtuvo el mayor crecimiento con 1.22 cm. Es importante observar la zona de intersección pues entre mayor sea el

área de contacto, mayor es la agresividad por parte del hongo antagonístico (Michel-Aceves *et al.*, 2005a). La colonización del área compitiendo por espacio y nutrientes es una manera de ejercer biocontrol, al reducir o detener completamente el desarrollo del micelio (Dennis y Webster, 1971). Esta variable fue visible para las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. y de las ocho aisladas, solo tres en diferente medida a *Fog*, y en cinco de ellas no existió zona de intersección. Las cepas dos y tres fueron estadísticamente significativas ($P \leq 0.0094$) con 3.22 cm y 3.00 cm, respectivamente (Cuadro 2).

Sousa Rocha y Oliveira (1998) reportan de 1.93 a 4.5 cm de la zona de intersección de diferentes especies de *Trichoderma* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Asimismo, Michel-Aceves *et al.* (2008) obtuvo valores de 0.54 y de 2.47 cm entre *Trichoderma* con *Alternaria solani* y *Phytophthora infestans*, respectivamente. Utilizando un producto comercial a base de *Trichoderma*

lignorum, *T. harzianum* cepa Thzcf-12 y *T. harzianum* Thzn-2 nativa en el control *in vitro* de *Fo* y *F. subglutinans*, agentes causales de la "escoba de bruja" del mango (Michel-Aceves *et al.*, 2009) reporta la mayor zona de intersección con *T. lignorum* (0.87 cm) contra *Fo*, Thzcf-12 (0.77 cm) y la cepa nativa Thzn-2 con 0.85 cm, todos ellos menores a los obtenidos en la presente investigación.

Las hifas de *Trichoderma* spp., tuvieron contactos con las hifas de *Fo* en diferentes tiempos; a pesar de que se dieron dos días de ventaja a *Fog* por su lento crecimiento, y se observó que *Trichoderma* spp., se comportó de forma agresiva. Los valores oscilaron significativamente entre uno y seis días para la mayoría de las cepas, excepto la cepa cinco que no mostró contacto alguno. Yates *et al.* (1999) registraron en una cepa aislada de *T. virens* seis días para el contacto en *F. moniliforme*. Michel-Aceves *et al.* (2005b), reportó sobre *Fo* f. sp. *lycopersici* valores entre cinco y siete días, y

Cuadro 2. Valores de crecimiento de las cepas en cultivos duales de *Trichoderma* spp. y *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* a 17 días después de siembra.

| Cepas | Crecimiento <i>Trichoderma</i> spp. | Crecimiento <i>Fog</i> | Zona de intersección (cm) | Días 1 ^{er} contacto | Clase Antagonismo |
|--------|-------------------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------|
| Cepa 1 | 3.15 b ^x | 1.05 ab | 0.00 b | 1 cd | 2 ^y |
| Cepa 2 | 3.40 b | 1.22 a | 3.22 a | 5 ab | 1 |
| Cepa 3 | 3.55 b | 1.00 abc | 3.00 a | 6 a | 1 |
| Cepa 4 | 3.50 b | 0.82 bc | 0.00 b | 4 ab | 2 |
| Cepa 5 | 3.52 b | 0.80 bc | 0.00 b | 0 d | 2 |
| Cepa 6 | 4.37 a | 0.77 c | 1.07 b | 4 ab | 2 |
| Cepa 7 | 3.55 b | 0.87 bc | 0.00 b | 3 bc | 2 |
| Cepa 8 | 3.37 b | 0.75 c | 0.00 b | 5 ab | 2 |

^x Medias dentro de cada columna seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey ≤ 0.5). ^y Clase de antagonismo según Bell *et al.*, 1982 (1=*Trichoderma* sobrecrece al patógeno y cubre toda la superficie del medio; 2=*Trichoderma* crece en 75% de la superficie del medio, detiene el crecimiento del fitopatógeno y no lo puede sobrecrecer).

Arzate-Vega *et al.* (2006) reportaron contacto a las 24 h después de la inoculación de ocho cepas de *Trichoderma* spp., a pesar de haber dado 16 días de ventaja a *M. fijiensis*. Finalmente, Michel-Aceves *et al.* (2009) registraron valores entre tres y cuatro para *Fo*, donde las cepas de *T. harzianum* Thzn-2 nativa y Thzcf-12 fueron más agresivas en comparación con *T. lignorum*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Sánchez *et al.* (2007), quienes observaron inhibición de crecimiento de micelio y sobre posición de las colonias de *Thielaviopsis paradoxa* por cepas nativas de *Trichoderma* spp., atribuyendo este modo de acción al micoparasitismo.

Las cepas dos y tres presentaron antagonismo clase uno y todas las cepas restantes clase dos (Cuadro 2). Sousa Rocha y Oliveira (1998) reportaron de 20 cepas de *Trichoderma* spp para *C. gloeosporioides* y *Sclerotium rolfsii* sólo tres de clase uno y dos; en las demás cepas el fitopatógeno fue más agresivo con clase cinco (Michel-Aceves *et al.*, 2005b) y Arzate-Vega *et al.* (2006) reportaron antagonismo tipo uno en seis cepas de *Trichoderma* spp., sobre *M. fijiensis*.

En la prueba *in vitro* de los fungicidas (valores medidos a los dos, ocho y 16 dds) fueron ascendentes conforme pasaron los días (Cuadro 3). El porcentaje de inhibición a los 16 dds para la mezcla Procloraz+Tiofanato metílico provocó el menor crecimiento para *Fog* con 0.07 cm y, por consiguiente, la mayor inhibición con 98.33%, mientras que los biológicos como *B. subtilis* registraron 58.89%. Al respecto, El-Hassan *et al.* (2004) indican que *B. subtilis* presentó 69% de control de *F. oxysporum* f. sp. *Lentis* bajo condiciones de invernadero y Cao *et al.* (2011) reportaron control *in vitro* de *Fo* f. sp. *cucumerinum* con *B. subtilis* SQR 9 al obtener 65% de inhibición.

En ensayos *in vitro* con *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. contra fitopatógenos comunes en cultivos de tomate, chile y cebolla, Izzeddin y Medina (2011) demostraron que el crecimiento de *Fusarium*, *Rhizoctonia* spp. y *Phytophthora* spp. se inhibe. *Trichoderma viride* mostró la mayor eficiencia significativa que *B. subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*. En este sentido, algunos autores señalan que *Trichoderma* spp. debe ser estudiada con una mayor atención en temas de control biológico, ya que su actividad resulta de una combinación de micoparasitismo y una producción de metabolitos capaces de controlar un gran número de plagas (Stefanova *et al.*, 1999).

En el ensayo de campo, la altura de planta osciló entre 69 cm y 95 cm a los 77 dds, sin diferencias estadísticas; la mayor altura se presentó donde se aplicó *T. asperellum* (Cuadro 4). Al respecto, al aplicar micorrizas (*Glomus* sp.) Zac. 19 y *G. aggregatum* para el control de *F. oxysporum* en el cultivo de gladiola variedad Fany Roja, Khalil *et al.* (2001) reportaron alturas de 80 cm a 90 cm a los 120 dds, lo cual fue coincidente con los valores registrados en esta investigación, pero en menor tiempo. Se observaron diferencias evidentes de incidencia y severidad para los fitopatógenos en estudio. En el caso de *U. transversalis* fue nula en los tratamientos, excepto en el testigo, donde se presentó al final del ciclo del cultivo en una incidencia de 10% y severidad de 1%. En cambio, la incidencia de *Fog* fue de 90% en todos los tratamientos (Cuadro 4). Respecto a la severidad, la mezcla de Procloraz+Tiofanato metílico presentó la menor cantidad de plantas enfermas (639) y redujo la severidad 47% respecto al testigo con 1206 plantas enfermas.

Vergara (2010) aplicó en árboles de manzano *B. subtilis* en dosis de 8 kg ha⁻¹ y cepas nativas de *Trichoderma* spp., en floración, cosecha y postcosecha. No reportan daños en floración; sin embargo,

Cuadro 3. Efectividad de fungicidas *in vitro* sobre el crecimiento e inhibición de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*.

| Tratamiento | Crecimiento (cm) | | | Inhibición (%) | | |
|--------------------------|--------------------|-------|--------|----------------|----------|---------|
| | Día 2 | Día 8 | Día 16 | Día 2 | Día 8 | Día 16 |
| Metalaxil+Clorotalonil | 0.1 c ^z | 0.4 c | 1.05 c | 82.32 b | 87.03 b | 76.67 b |
| Procloraz+Tiofanato M | 0.0 d | 0.0 d | 0.07 d | 100.00 a | 100.00 a | 98.33 a |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 0.2 b | 0.1 b | 1.85 b | 70.72 c | 66.39 c | 58.89 c |
| Testigo | 0.6 a | 2.9 a | 4.50 a | 0.00 d | 0.00 d | 0.00 d |

^z Medias dentro de las columnas seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey \leq 0.5).

Cuadro 4. Efectividad de productos sobre la altura de planta, porcentaje de severidad y rendimiento ha^{-1} en condiciones de campo.

| Tratamiento | Altura planta | Plantas enfermas | | Plantas Cosechadas ha^{-1} |
|--------------------------------------|---------------|------------------|---------------|-------------------------------------|
| | | No. | Severidad (%) | |
| Procloraz+Tiofanato Metílico | 83.70 | 639 | 28.53 b | 178,683 a |
| Metalaxil+Clorotalonil | 90.20 | 923 | 41.21 ab | 146,987 ab |
| <i>Trichoderma asperellum</i> nativo | 95.00 | 924 | 41.25 ab | 146,875 ab |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 74.00 | 975 | 43.53 a | 141,183 b |
| Testigo | 90.25 | 1206 | 53.84 a | 115,402 b |

^z Medias seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey \leq 0.5).

en cosecha indicaron una baja incidencia de *Alternaria alternata* y la ausencia total de *Botrytis cinérea*. En postcosecha (tres meses de almacenamiento más siete días a temperatura ambiente) indicaron buen control, con incidencia de *B. cinérea* y de *A. alternata* de 3% y 22% respectivamente. Estos resultados fueron más relevantes en el control de la enfermedad a los obtenidos en el presente trabajo con incidencia de 90% de *Fog*.

Debe existir gran cantidad de esporas de *Fog* en los suelos de la Concepción, Guerrero, a pesar de que realizan rotación de cultivos (gladiola-frijol-maíz-cebolla) porque los beneficios de los fungicidas sintéticos y más aún de los biológicos no se ven reflejados; sin embargo, es importante seguir aplicando biológicos para que se establezcan en el lugar. En este sentido, bajo condiciones de invernadero, Cao *et al.* (2011) evaluaron el efecto del bio-fertilizante orgánico (BIO) con *B. subtilis* SQR 9 en el control de la pudrición por *Fo* f. sp. *cucumerinum*, registrando reducción significativa de la incidencia (49%-65%) de la pudrición en comparación con el testigo cuando se aplicó el BIO. Más aún, detectó por PCR la población del fitopatógeno en la rizosfera (10^6 cfu g^{-1} de raíz) y

fue significativamente menor en las plantas tratadas con BIO que en el testigo. Estos resultados indican que la cepa es capaz de sobrevivir en la rizosfera y proteger a la planta del fitopatógeno.

Se cosecharon 145,826 plantas en promedio; el tratamiento donde se aplicó la mezcla de los fungicidas sintéticos Procloraz+Tiofanato metílico obtuvo significativamente la mayor cantidad de plantas por hectárea, con 178,683 (Cuadro 4), mientras que *B. subtilis* y el testigo obtuvieron las menores cantidades. De acuerdo con Sierra (2009), en el estado de Michoacán, México se obtienen 1000 gruesas ha^{-1} de gladiolas (140,000 tallos florales), partiendo de 140,000 plantas ha^{-1} , cantidad inferior a la obtenida en la presente investigación, en la que se cosecharon 145,826 plantas ha^{-1} en promedio, a pesar de los altos porcentajes de severidad por *Fog*.

CONCLUSIONES

La evaluación *in vitro* de los productos biológicos *Trichoderma asperellum* cepa 8 inhibió 60.6% el micelio de *Fog* con antagonismo clase dos, mientras que *Bacillus subtilis* no fue efectivo; de los agroquímicos sintéticos, la mezcla de Procloraz+Tiofanato-metílico fue

efectiva en 98.3%. En la evaluación *in situ*, la incidencia y severidad de *U. transversalis* fue nula donde se aplicaron los agroquímicos. En *Fog*, la mezcla Procloraz+Tiofanato-metílico logró reducir la severidad en 47% y con *T. asperellum* en 30.9%. En ésta zona, donde la incidencia y severidad de *Fog* es alta, se tiene un producto sintético que es eficiente y se requiere continuar buscando cepas nativas con mayor efectividad.

LITERATURA CITADA

- Ahrens U., Seemüller N. 1992. Detection of DNA plant pathogenic mycoplasma by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16SrRNA gene. *Phytopathology* 82:828-832.
- Ahmad J.S., Baker R. 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77:182-189.
- Aquino-Martínez J.G., Vázquez-García L.M., Reyes-Reyes B.G. 2008. 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. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26:127-137.
- Arzate-Vega J., Michel-Aceves A.C., Domínguez-Márquez V.M., Santos-Emética O.A. 2006. Antagonismo de *Trichoderma* spp., sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la sigatoca negra

- del plátano (*Musa* sp.) *in vitro* e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24:98-104.
- Andrews J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology* 30:603-635
- Barnett H.L., Hunter B.B. 1999. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4a Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA. 218 p.
- Bell D.K., Well H.D., Markham C.R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72:379-382.
- Bissett J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can. J. Bot.* 69: 2357-2372.
- Cao Y, Zhang Z, Ling N, Yuan Y, Zheng X, Shen B and Shen Q. 2011. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. *Biology and Fertility of Soils* 47: 495-506.
- Chandel SS and Bhardwaj LN. 2000. Effect of sowing dates and fungicidal treatment on the management of *Fusarium* wilt of gladiolus. *Plant Disease Research* 15(1):24-27.
- Chandel S.S., Deepika R. 2010. Recent advances in management and control of *Fusarium* yellows in *Gladiolus* species. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 18(2):361-380.
- Chérif M., Benhamou N. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*. *Phytopathology* 80:1406-1414.
- Dennis C., Webster J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society* 57:25-39.
- El-Hassan S., Gowen S.R., Bayaa B. 2004. Antifungal activity of *Bacillus subtilis* filtrate to control *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*, the causal organism of lentil vascular wilt. *IOBC Bulletin* 27(1): 53-58.
- Harman G.E. 2002. *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* (Deuteromycetes: Moniliales). Cornell University, Geneva, N.Y. www.iicasaninet.net/pub/sanueg/html (Consulta: Octubre 29/10/05).
- Harman GE. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96:190-194.
- Izzeddin A.N., Medina T.L. 2011. Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. *Salus* 15:8-18.
- Khalil G.A., Centina A.V.M., Ferrera-Cerrato R., Velásquez M.J., Pérez M.C.A., Larqué S.M. 2001. Hongos micorrízicos arbusculares como componente de control biológico de la pudrición causada por *Fusarium* sp., en gladiola. *Terra* 19:259-264.
- Khan M.R., Mustafa U. 2005. Corm rot and yellows of gladiolus and its biomanagement. *Phytopathologia Mediterranea* 44: 208-215.
- Leslie J.F., Summerell B.A. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. First edition. Blackwell Publishing Profesional. Ames, Iowa, USA. 388 p.
- Michel-Aceves A.C., Rebolledo-Domínguez O., Lezama-Gutiérrez R., Ochoa-Moreno M.E., Mesina-Escamilla J.C., Samuels G. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por "escoba de bruja" y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:154-160.
- Michel-Aceves A.C., Otero-Sanchez M.A., Rebolledo-Domínguez O., Lezama-Gutiérrez R., Ariza-Flores R., Barrios-Ayala A. 2005a. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp., en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* *in vitro*. *Revista Chapingo, Serie Horticultura* 11(12):273-27.
- Michel-Aceves A.C., Reyes-De La Cruz A., Otero-Sánchez M.A., Rebolledo-Domínguez O., Lezama-Gutiérrez R. 2005b. Potencial Antagónico de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc) Snyder y Hansen y *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) *in vitro* e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:284-291.
- Michel-Aceves A.C., Otero-Sánchez M.A., Martínez-Rojero R.D., Ariza-Flores R., Barrios-Ayala A., Rebolledo-Martínez A. 2008. Control biológico *in vitro* de enfermedades en tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. *Avances en Investigación Agropecuaria* 12:55-68.
- Michel-Aceves A.C., Otero-Sanchez M.A., Solano-Pascacio L.Y., Ariza-Flores R., Barrios-Ayala A., Rebolledo-Martínez A. 2009. Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., agentes causales de la "Escoba de Bruja" del Mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 27:18-26.
- Nazir I.A., Riazuddin S. 2008. New approaches to generate disease resistant gladiolus. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 367-378.
- Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O. 1983. *Fusarium* species, an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press. University Park and London. 193 p.
- Ram R., Manuja S., Dhyani D., Mukherjee D. 2004. Evaluations of fortified fungicide solutions in managing corm rot disease of gladiolus caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection* 23:783-788.
- Riaz T., Khan S.N., Javali N. 2008. Antifungal activity of plant extracts against *Fusarium oxysporum*. The cause of corm rot disease of gladiolus. *Mycopathology* 6: 13-15.
- Rifai M.A. 1969. A Revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological papers* 116:1-56
- Sánchez V., Rebolledo O., Picaso R.M., Cárdenas E., Córdova J., González O., Samuels G.J. 2007. *In vitro* antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. *Mycopathologia* 163:49-58.
- SAS. 1999. SAS user's guide: Statistics. Release 6.03. Ed. SAS Institute Incorporation. Cary, NC USA. 1028 p.
- Seifert K. 1996. *Fusarium* interactive key. Agriculture and Agri-Food Canada. Ottawa, Ontario. 65 p. Obtenido de la red: http://res.agr.ca/brd/fusarium/home_1.html. (consulta, febrero 2013).
- SIAP. 2012. Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Producción Agrícola en ciclos y perennes modalidad riego más temporal para la gladiola (gruesa). Organismo de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. Obtenido de la red: www.siap.sagarpa.gob.mx (consulta, febrero 2012).
- Sierra A.J. 2009. La región, Periódico de la zona oriente de Michoacán. Tuxpan la cuna de la gladiola. En la red: www.laregionenlinea.com/index.php?option=com.content&view=article&id=759:tuxpan-cuna-de-la-gladiola&catid=86:tuxpan&Itemid=97. (Consulta, septiembre 2011).

- Singleton L.L., Mihail J.D., Rush Ch.M. 1992. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. The American Phytopathological Society. APS Press. St. Paul, Minnesota. USA. 265 p.
- Sousa-Rocha R.J., Oliveira N.T. 1998. In vitro antagonistic potential of *Trichoderma* spp. Against *Colletotrichum gloeosporioides* agent of antracnosis in the passion fruit (*Passiflora*). Boletín Micológico 13:103-110.
- Stefanova M., Lleiva A., Larrinaga L., Coronado M.F. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Rev. Facultad Agronomía (LUZ) 16: 509-516.
- Vargas-Hoyos H.A., Rueda-Lorza E.A., Gilchrist-Ramelli E. 2012. Actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* (Fungi: Ascomycota) a diferentes temperaturas. Actualidades Biológicas 34(96):103-112.
- Vergara P.V. 2010. Evaluación de la efectividad biocontroladora de *Trichoderma* spp y *Bacillus subtilis* sobre las enfermedades *Botrytis calicinal* y corazón mohoso de la manzana. Universidad de TALCA. En la red: <http://www.bionativa.cl/pdf/bacillus-trichonativa/t6.pdf>. (consulta, agosto 2011).



AP
AGRO
 PRODUCTIVIDAD