

CONTROL BIOLÓGICO DE *Rosellinia bunodes* EN HELECHO HOJA DE CUERO (*Rumohra adiantiformis*), CON EL HONGO *Trichoderma lignorum*

Bernardo Mora¹, José Arturo Solórzano¹

RESUMEN

Una formulación comercial del hongo (*Trichoderma lignorum*) (Mycobac® 50 WP) se evaluó en el cultivo de Helecho Hoja de Cuero, en Follajes El Espino, Sabanilla de Alajuela, entre setiembre del 2002 y abril del 2003, para medir su eficacia como controlador biológico del hongo *Rosellinia bunodes*. El producto biológico formulado comercialmente se evaluó en las dosis de 40 y 20 gramos de producto comercial en cinco metros cuadrados (cinco repeticiones de un metro cuadrado cada una). Ambas dosis se aplicaron de forma curativa y preventiva en el cultivo, con el objetivo de realizar un control práctico del patógeno. El estudio se realizó de setiembre a abril con el fin de observar el desarrollo de la enfermedad durante los meses lluviosos (12 aplicaciones) y los meses de menor precipitación (seis aplicaciones). En el Laboratorio de Protección de Cultivos del INTA se determinó mediante la técnica de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (Uribe 1999, Vélez y Montoya 1997), una buena recuperación del hongo *Trichoderma lignorum* en la dosis de 40 gramos en cinco metros cuadrados, aplicados de forma preventiva sobre plantas de *Rumohra adiantiformis* afectadas por *Rosellinia bunodes*, ejerciendo el hongo *Trichoderma* biocontrol de esta enfermedad (Freeman y Szejnberg 1997). Los resultados del estudio determinaron que el Mycobac® 50 WP fue eficiente para controlar al hongo *Rosellinia bunodes*, en el cultivo de Helecho Hoja de Cuero, al cabo de seis meses, aplicado de forma curativa o preventiva, en las dosis de 40 y 20 gramos de la formulación del hongo.

INTRODUCCIÓN

El Helecho Hoja de Cuero *Rumohra adiantiformis* constituye una especie ornamental de gran importancia económica, que se cultiva de forma intensiva en las faldas de la Cordillera Volcánica Central, en alturas que oscilan entre los 900 y los 1.800 metros sobre el nivel del mar; las plantaciones están distribuidas desde Juan Viñas en Cartago a San Ramón en Alajuela. La agroindustria de esta actividad genera gran cantidad de empleo, constituyendo un factor de desarrollo social y económico muy importante, en las comunidades donde se encuentran establecidas las plantaciones.

El cultivo de helecho tiene varias limitaciones agronómicas donde las plagas y las enfermedades de follaje y rizoma constituyen un papel importante, causando grandes pérdidas en el rendimiento, ya que el mercado internacional es bastante exigente en la calidad del producto.

El hongo *Rosellinia bunodes* y *R. pepo*, producen en Helecho Hoja de Cuero la pudrición del rizoma, que constituye una enfermedad de importancia económica, también muy conocida en el cultivo de café, cultivos maderables y otros frutales tropicales, donde *R. necatrix* = *Demathophora necatrix* es la de mayor importancia económica por su amplio

¹ Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), Costa Rica.

grupo de hospederos (Sztejnberg 1980). En el cultivo de Helecho, el patógeno ha sido reportado pero aún no se conoce una forma eficiente de manejo de la enfermedad. El microorganismo se caracteriza por producir un marchitamiento gradual de las frondas, en cualquier etapa de desarrollo de la planta. Cuando la fronda es afectada en la fase de violín, su crecimiento se afecta de forma drástica. La fronda se marchita en el lapso de tres a cuatro semanas, su ráquis adquiere una coloración café y se dobla a la altura de la primera pinnula. Las pinnulas adquieren un color amarillento, y algunas personas lo denominan como "Vena amarilla". Cuando el rizoma es afectado en la fase adulta y la fronda esta totalmente abierta, se hace presente la característica vena amarilla de forma notoria (Mora 2003).

El hongo puede avanzar en los rizomas de uno a dos metros por año, razón por la cual algunos productores realizan cortes en las camas de helecho para aislar su avance. Se considera un habitante que puede sobrevivir de forma saprofítica atacando gran cantidad de hospederos. Se reporta en cultivos como café, papa, cacao, ornamentales y algunos árboles forestales. Prácticas culturales y control químico del hongo sí se conocen al presente, pero el control del hongo es muy limitado (Freeman y Sztejnberg 1997). Los Funguicidas Cloraneb, Penta cloro nitrobenzeno (PCNB), así como la fumigación con Bromuro de metilo, se reportan como productos eficaces para evitar el avance del hongo. El control biológico del hongo en el cultivo de Helecho de Cuero no se ha investigado en Costa Rica. Las pérdidas económicas causadas por esta enfermedad no se han cuantificado, pero en los parches afectados la pérdida es del 100 %.

El objetivo general del presente experimento fue evaluar una formulación del hongo *Trichoderma lignorum*, Mycobac® 50 WP para medir su eficacia biológica sobre el hongo *Rosellinia bunodes* en el cultivo de Helecho Hoja de Cuero.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en la Empresa Follajes El Espino localizada en Sabana de Alajuela, a una altura de 1.425 msnm. Los suelos son de origen volcánico del Orden Andisol. La zona presenta dos épocas climáticas bien definidas. Una lluviosa, de fines de abril a principios de diciembre, caracterizada por una alta humedad relativa; la otra se extiende de mediados de diciembre a fines de abril, la cual es de mínima o escasa precipitación y de menor humedad relativa. La temperatura mínima promedio en ambas épocas del año es inferior a 20 °C; lo cual ayuda en gran medida a la colonización del hongo; además de una Humedad Relativa apropiada para la infección del patógeno. El Cuadro 1 presenta los datos de clima durante la época en que se realizó el experimento.

El experimento se realizó durante los meses de setiembre del 2002 a abril del 2003, en los que se valoró el desarrollo del hongo en dos épocas climáticas bien definidas. El producto formulado Mycobac® 50 WP se evaluó con un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA), con cinco repeticiones. La parcela total estuvo constituida por una área de 1,0 m x 1,0 m.

Los bloques para la evaluación de los diferentes tratamientos, se establecieron en áreas de baja, mediana y alta presión de inóculo, para mantener la homogeneidad de los bloques. Los tratamientos que se evaluaron fueron:

Tratamiento 1. 40 gramos de Mycobac® 50 WP para 20 litros de agua en cinco metros cuadrados de parcela útil, aplicados de forma preventiva. En la parcela se eliminaron todos los rizomas y posteriormente se sembraron de nuevo con helecho sano.

Tratamiento 2. 40 gramos de Mycobac® 50 WP para 20 litros de agua en cinco metros cuadrados de parcela útil, aplicados de forma curativa. En la parcela se dejó el helecho con

Cuadro 1. Datos de precipitación, temperatura y humedad relativa, en los meses de setiembre del 2002 a abril del 2003. Follajes el Espino, Sabanilla, Alajuela.

Mes	Precipitación	Temperatura		Humedad relativa	
		Mínima	Máxima	Mínima	Máxima
Setiembre	467,4	16,3	24,5	63,5	80,0
Octubre	488,0	18,3	27,9	66,5	80,0
Noviembre	176,7	15,5	26,4	55,1	79,3
Diciembre	14,1	15,9	26,4	52,5	71,8
Enero	11,6	15,5	26,7	47,6	61,9
Febrero	1,0	16,0	28,1	43,9	63,2
Marzo	73,1	15,9	27,4	45,0	68,0
Abril	42,3	14,6	28,2	48,8	68,0
Total / media	1.273,5	16,0	27,0	52,9	71,5

el objetivo de recuperarlo de la infección causada por el hongo.

Tratamiento 3. 20 gramos de Mycobac® 50 WP para 20 litros de agua en cinco metros cuadrados de parcela útil, aplicados de forma preventiva. (igual forma que en 1).

Tratamiento 4. 20 gramos de Mycobac® 50 WP para 20 litros de agua en cinco metros cuadrados de parcela útil, aplicados de forma curativa (igual forma que en 2).

Tratamiento 5. Testigo transplantado. En la parcela útil se eliminaron los rizomas y posteriormente se sembraron de nuevo con helecho sano.

Tratamiento 6. Testigo Absoluto. La parcela útil no recibió tratamiento.

Al Mycobac® 50 WP se le adicionó, Kemkol® 99 EC como activador para mejorar su eficacia. Las dosis a emplear y el orden de mezcla se realizaron siempre de la siguiente manera:

A. 1 litro de agua + 5 cc de Kemkol® 99 EC + buena agitación + 40 gramos de Mycobac® 50 WP + buena agitación. La mezcla se agregó a los restantes 19 litros de agua para la aplicación de los dos primeros tratamientos (100 %).

B. 1 litro de agua + 5 cc de Kemkol® 99 EC + buena agitación + 20 gramos de Mycobac® 50 WP + buena agitación, luego esta premezcla se adicionó a los restantes 19 litros de agua para la aplicación de los dos segundos tratamientos (50 %).

Se realizaron doce aplicaciones de Mycobac® 50 WP en el período de septiembre a diciembre (época lluviosa). En la época de verano se hicieron seis aplicaciones de enero a marzo (dos mensuales). La intensidad de la enfermedad se determinó por medio del conteo del total de plantas y plantas enfermas por parcela. El análisis de los resultados se realizó por medio de un análisis de variación (ANDEVA) y una prueba de rango múltiple de separación de medias (Duncan $P \leq 0,05$).

Análisis de Laboratorio: Recuperación del hongo

En el Laboratorio del Departamento de Protección de Cultivos del INTA se determinó las poblaciones del hongo aplicado, mediante cultivo en medio de Agar Nutritivo® en el cual se realizaron las evaluaciones y cuantificación de las Unidades Formadoras de Colonia UFC del hongo (Loynachan 1985).

La técnica de determinación de la eficacia biológica *in vitro* de los fungicidas según

Unidades Formadoras de Colonia (UFC), se realizó según metodología descrita por Loynachan, 1985 así como por Parkison y Coleman (1991), la cual se emplea para enumerar las poblaciones de microorganismos en diferentes productos (Vélez *et al.* 1997).

Este protocolo también es utilizado para cuantificar la calidad de los bioplaguicidas (Vélez y Montoya 1998, López *et al.* 1995). Consiste en la realización de diluciones seriadas 1/10 (10 ml del hongo en 90 ml de agua destilada esteril) hasta la dilución de 1×10^{-7} . Las diluciones se agitan a 80 rpm (Eberbach model 60 CY) durante 30 minutos y del sobrenatante se toman alícuotas de 0,1 ml que se siembran en medio de cultivo específico para el desarrollo de las colonias del hongo, después se dejan en incubación (Napco incubador model 303) a 23 °C por 96 a 120 horas. En general la composición del medio depende del microorganismo que se requiera identificar y enumerar (Parkison y Coleman 1991, Uribe 1999). Se cuenta el número de unidades de colonias formadas (UFC) que aparece en las placas de petri. En la Figura 1 se describe la metodología empleada.

El término UFC se refiere al momento en el que un microorganismo entra en contacto con el medio de cultivo y empieza a multipli-

carse formando una colonia de microorganismos que pueden verse y contarse. Por lo tanto, se determina que cada una de estas colonias es un microorganismo en la muestra inicial. Como en algunos de los casos una sola colonia puede formarse por más de un microorganismo, y se adoptó el término de unidades formadoras de colonia.

La preparación de los medios de cultivo se realizó en medio MARTIN®, y se adicionaron diluciones seriadas de las muestras tomadas de campo. Se colocó una alícuota de 0,1 ml en cada placa petri con medio de cultivo con las dosis correspondientes de cada producto evaluado. Los tratamientos se compararon con un testigo absoluto el cual consistió tanto del testigo del ensayo como un testigo de los bordes (testigo límite) de la plantación cercano al cultivo comercial, donde no se marcaron parcelas. Todos los tratamientos se colocaron en una incubadora a una temperatura de 23°C, la cual es la óptima para el desarrollo de las colonias del hongo. Los resultados se evaluaron a los cinco días después de inoculadas las placas petri. Se cuantificó únicamente las poblaciones del hongo de interés (*Trichoderma lignorum*). El mismo se confirmó mediante la observación en microscopio de luz.

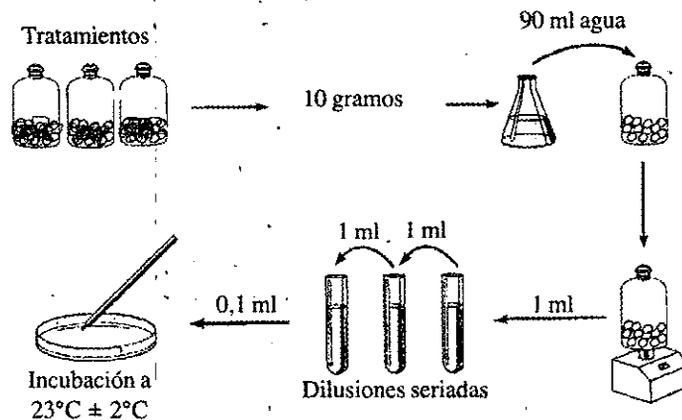


Figura 1: Metodología para la evaluación de microorganismos en el control biológico de plagas (Adaptado de Loynachan 1985 y Vélez y Montoya 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el campo se evaluó la incidencia de la enfermedad en los diferentes tratamientos, además se determinó mediante análisis de laboratorio la colonización del medio donde se cultiva el helecho hoja de cuero. Los resultados se muestran en dos etapas: laboratorio y campo.

El comportamiento de los patógenos de suelo es impredecible, máxime si el microorganismo presenta un período de incubación prolongado.

Es posible que *Rosellinia* spp. sea un patógeno que en el cultivo de helecho su período de incubación sea de uno a dos meses. En el Cuadro 2, se presentan los datos de incidencia de la enfermedad obtenidos de setiembre del 2002 a abril del 2003.

Cuadro 2. Tratamientos y promedios de incidencia de *R. bunodes* en el cultivo de helecho hoja de cuero en dos fechas de evaluación. Hda. Alsacia, Follajes el Espino. Sabanilla, Alajuela. 2003.

Tratamiento	Primera evaluación 23-12-02	Segunda evaluación 10-04-03
Preventivo 40g (P 100)	0 a	2,6 a
Curativo 40 g (C 100)	10,2 ab	8,0 a
Preventivo 20g (P 50)	0 a	4,8 a
Curativo 20 g (C 50)	7,2 ab	13,2 a
Testigo de trasplante	0 a	10,4 a
Testigo Absoluto	15 b	25,6 b

Medias con igual letra en la misma columna, no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$) (SAS 1998).

En la primera evaluación los dos Tratamientos Preventivos (40 y 20 g) y el Testigo de Trasplante, no presentaron incidencia de marchites del patógeno, a pesar de haber transcurrido más de tres meses de realizada la primera aplicación del controlador biológico. La explicación se debe a que los tres tra-

tamientos fueron sembrados con helecho sano, obtenido de áreas libres del patógeno.

El hongo presente en el suelo, debió causar la infección e iniciar un prolongado período de incubación, desarrollando los primeros síntomas de la enfermedad. La primera aplicación de Mycobac® 50 WP, se realizó el 10 de setiembre del 2002 y la primera evaluación se hizo el 23 de diciembre (104 días después). Es importante mencionar que entre los 55 y 60 días después de la primera aplicación se empezó a notar un amarillamiento alrededor de la vena de la pínula, lo cual se considera un síntoma inicial de la enfermedad. Es probable que el período de incubación del hongo en el cultivo de Helecho, sea cerca de dos meses, máxime si se considera que en cultivos leñosos dura varios meses e incluso años, para que inicien los primeros síntomas, dependiendo del nivel de inóculo en el suelo

Los dos tratamientos aplicados en forma curativa con Mycobac® 50 WP a las dosis de 40 y 20 g PC (producto comercial) tuvieron promedios muy similares. El tratamiento del Testigo Absoluto mostró la mayor incidencia con definida diferencia estadística con los tratamientos preventivos y el Testigo de Trasplante.

En la evaluación realizada en abril se aprecia que los dos tratamientos preventivos con Mycobac® 50 WP, mostraron niveles relativamente bajos de infección y que el tratamiento Testigo de Trasplante presentó un nivel de incidencia de la enfermedad de 10,4. Estos tres tratamientos en la primera evaluación no tuvieron presencia de la enfermedad debido al largo período de incubación del hongo como se explicó anteriormente. El tratamiento Testigo Absoluto se diferenció estadísticamente de los demás tratamientos, exhibiendo la mayor incidencia de la enfermedad. También es importante señalar la tendencia que existe en el tratamiento preventivo de superar al tratamiento curativo. Sin embargo, desde el punto de vista práctico el tratamiento curativo es el tratamiento ideal y económico en una plantación afectada por

parches de la enfermedad. Además, ambos tratamientos en un período de ocho a diez meses se llegan a uniformizar, debido a que el tratamiento transplantado se comporta de la misma manera que el no transplantado en cuanto al crecimiento fenológico del cultivo.

En el laboratorio se determinó las unidades formadoras de colonia del hongo aplicado *Trichoderma* sp. (Cuadro 3). En el mismo se observa que los tratamientos que mejor se adaptaron son Preventivo 40 g (P100) y Curativo 40 g (C100) tienen una recuperación muy buena del hongo *Trichoderma* sp. Los tratamientos testigo absoluto y testigo límite no mostraron unidades formadoras de colonia del hongo aplicado.

En el Cuadro anterior se observa que en los tratamientos testigo absoluto y testigo límite no hubo presencia del hongo *Trichoderma* spp. Esta conclusión nos permite visualizar el efecto supresivo de *Rosellinia bunodes* que se ejerció sobre las parcelas aplicadas por el hongo *Trichoderma lignorum*. En el caso de los tratamientos Curativo 100 y 50 no se produjo esporulación a los cinco días de evaluación (Figura 2), por lo tanto este tratamiento no se adaptó de la forma en que sí lo hizo el tratamiento P100 en el cual se determinaron altas poblaciones del hongo esporulado (conidias), esta situación permite una mayor reproducción en campo del controlador biológico aplicado. El tratamiento Preventivo P50 no mostró poblaciones del hongo *Trichoderma*, por lo que su dosis aplicada dista

de la requerida para ejercer un buen control de la enfermedad en campo (Figura 2).

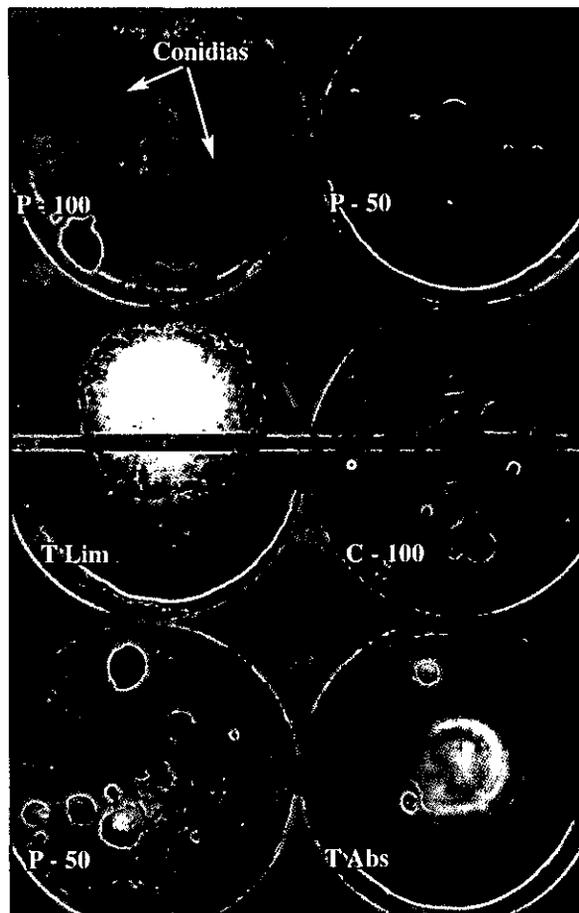


Figura 2: Unidades formadoras de colonia de hongos según tratamientos aplicados (1X10⁵) en medio de cultivo Martin. Follajes el Espino, Sabanilla, Alajuela, 2003.

Cuadro 3. Crecimiento en medio de cultivo Martin del hongo *Trichoderma* spp. según tratamiento y dilución. Laboratorio de Protección de Cultivos. INTA, 2003.

Tratamiento/ días	Diluciones				Observaciones
	1X10 ³	1X10 ⁴	1X10 ⁵	1X10 ⁶	
1. Preventivo 100	>100	4	8	13	Diluciones 5 y 6 muy esporuladas
2. Preventivo 50	0	0	0	0	Pocos contaminantes
3. Testigo Límite	0	0	0	0	Contaminantes, <i>Aspergillus</i>
4. Curativo 100	>50	>40	5	0	No esporulado, solo micelio
5. Curativo 50	Cont	2	6	3	No esporulado varios contaminantes
6. Testigo Absoluto	0	0	0	0	Pocos contaminantes

CONCLUSIONES

Del presente estudio se concluye que el controlador biológico Mycobac® 50 WP, cuyo ingrediente activo es el hongo *Trichoderma lignorum* fue efectivo para controlar a *Rosellinia bunodes*, en helecho, en su forma preventiva o curativa, en las dosis de 40 y 20 gramos, distribuidos en cinco metros cuadrados, en un volumen de 20 litros de agua aplicados con regadera. Además, no se observaron otros efectos colaterales dañinos al cultivo que pudiera causar el controlador biológico sobre el cultivo.

LITERATURA CITADA

- Bianchini, C. 1958. Las llagas del café en Costa Rica. San José. Ministerio de Agricultura e industrias. Boletín Técnico N° 21. 30 p.
- Bermúdez, M., Carranza, J. 1990. Patogenicidad de *Rosellinia bunodes* en el jaúl (*Alnus acuminata*). Agronomía Costarricense 14 (2): 181-188
- García, J., y Tora R. 1995. Las enfermedades del manzano. Vida Rural: Revista de Campo. Año II N° 18: pp 62-68.
- Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café, 1996. Manejo integrado de la podredumbre negra de la raíz del cafeto (*Rosellinia* sp). Boletín Técnico N° 2. 8 p.
- Freeman, S.; Szejnberg, A. 1997. *Rosellinia*. In Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. Ed Singleton, L.; Mihail, J.; Rush, C. APS. St Paul Minnesota. USA. 71-73.
- López, J.C.; Rivera, A.; Bustillo, A.; Chávez, B. 1995. Persistencia de *Beauveria bassiana* (Bals.) en el suelo con el transcurso del tiempo. Revista Colombiana de Entomología 21(4): 173-176.
- Loynachan, T.E. 1985. Soil biology: Laboratory manual for agronomy No. 485. Iowa State University, Ames, Iowa, USA. 78p.
- Mora, B. 2003. Actualización sobre aspectos fitosanitarios y regulaciones comerciales en el cultivo de helecho hoja de cuero (*Rumorha adiantiformis*). Seminario Servicio Fitosanitario del Estado. MAG. San José, Costa Rica. 45p.
- Parkison, D; Coleman, D.C. 1991. Methods for assessing soil microbial populations, activity and biomass. Agriculture, Ecosystems and Environment 34:3-33
- Ruiz, Serna. L; Leguizamón C, J. 1996. Efecto del contenido de materia orgánica del suelo sobre el control de *Rosellinia bunodes*, con *Trichoderma* spp. Cenicafé 47 (4): 179-186. 1996.
- Szejnberg, A., Madar, Z. 1980. Host range of *Dematophora necatrix*, the cause of white roots in fruit trees. Plant Dis. 64:662-664.
- Uribe. L. 1999. Técnicas microbiológicas para determinar la calidad de suelos y productos biológicos. In: Memorias Taller Manejo de la Biología del suelo para la agricultura de hoy. CIA Centro de Investigaciones Agronómicas, Microbiología de suelos, Universidad de Costa Rica, San José. Costa Rica. p. 1-13.
- Velez, A. P.; Montoya, R. E. 1998. Supervivencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en dos localidades cafeteras colombianas. CENICAFE, 49(1):51-71
- Velez, A.P., Posada, F.; Marín, P.; González, M^{AT}.; Osorio, E.; Bustillo, A. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Boletín Técnico. No. 17 CENICAFE. Chinchina, Caldas. Colombia. 37p.