

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA AGRICOLA
MAESTRIA EN PROTECCION VEGETAL

**CONTROL BIOLOGICO DE *Fusarium roseum* (Lk) SNYDER Y
HANSEN HONGO DEL SUELO QUE ATACA LA RAIZ DEL
CLAVEL *Dianthus caryophyllus* L.** //



T E S I S
QUE COMO REQUISITO PARCIAL

DIRECCION ACADEMICA PARA OBTENER EL GRADO DE
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES MAESTRO EN CIENCIAS
EN PROTECCION VEGETAL

P R E S E N T A :

FRANCISCO PERDOMO ROLDAN

DX 62802
-100567



Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Comité asesor indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

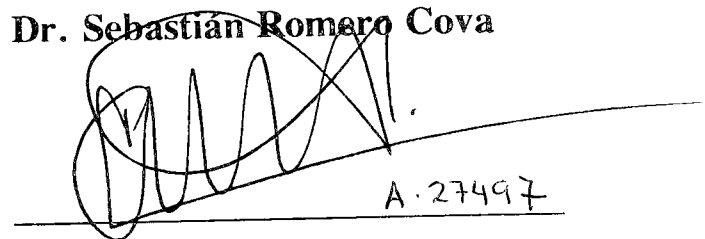
MAESTRO EN CIENCIAS
EN
PROTECCION VEGETAL

PRESIDENTE



Dr. Sebastián Romero Cova

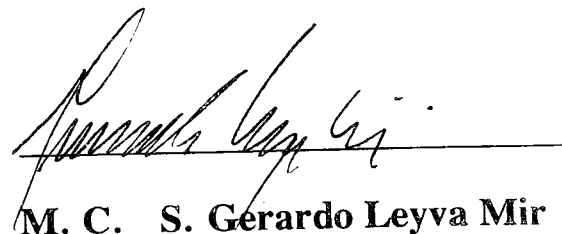
ASESOR



A. 27497

M. C. Cecilio Mendoza Zamora

ASESOR



M. C. S. Gerardo Leyva Mir

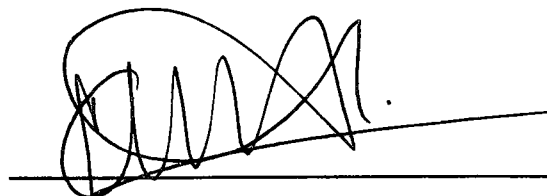
El jurado del examen de grado de Maestría en Ciencias en
Protección Vegetal, estuvo constituido por:

PRESIDENTE



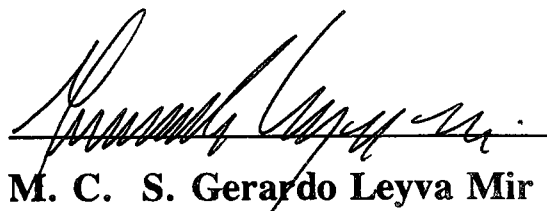
Dr. Sebastián Romero Cova

ASESOR



M. C. Cecilio Mendoza Zamora

ASESOR



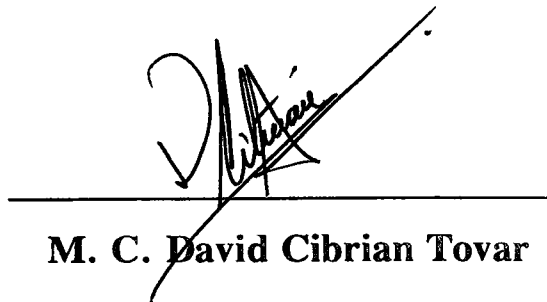
M. C. S. Gerardo Leyva Mir

**REPRESENTANTE DE LA
COORDINACION DE POSTGRADO
EN PROTECCION VEGETAL**



M.C. Ma. de Lourdes Rodriguez M.

**REPRESENTANTE DE LA
COORDINACION GENERAL
DE ESTUDIOS DE POSGRADO
DE LA UACH**



M. C. David Cibrian Tovar

Cada uno de los cuales revisó y aprobó la tesis presentada.

Chapingo, México, febrero de 1995.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Chapingo, por el apoyo económico brindado para la realización de estudios de postgrado.

AL Departamento de Parasitología Agrícola que me concedió la oportunidad de actualizar y ampliar mis conocimientos en esta área del conocimiento.

Al Dr. Sebastián Romero Cova, por su amistad brindada en todo momento, enseñanzas, consejos y dirección durante los estudios y ejecución de la presente investigación.

A los Profesores M.C. Cecilio Mendoza Zamora, M.C. Gerardo Leyva Mir, M.C. María de Lourdes Rodríguez Mejía y M.C. David Cibrián Tovar, por las sugerencias y empeño demostrado en la revisión del escrito.

Al Lic. Mario S. Najera F. por su amistad y tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo.

Al personal Docente del Departamento de Parasitología Agrícola por haber compartido conmigo su amistad y conocimientos.

..

A mis compañeros de estudio Blancanieves Lara Chávez, Yesenia Alvarés Negrete, Wili de la Rosa, Fco. Lara, Agustín Cruz, Wilson Avilés, José I. Rincón, Raúl Ríos, Joe Gallegos, Juventino Cuevas O. por su apoyo y amistad en los momentos difíciles de mi vida de estudiante.

A todo el personal de apoyo del Departamento de Parasitología Agrícola.

Al Agricultor Norberto López y al Ing. Enrique Ortega Solís, por su amistad y apoyo brindado en los viajes a Villa Guerrero, Estado de México.

DEDICATORIA

Con amor y eterno agradecimiento a mi esposa Berta de la Cruz G. e hijos, Vladímir Perdomo y EN ESPECIAL A TI TE RECORDAREMOS CON CARIÑO, que con paciencia y gran sacrificio permitieron la culminación de este trabajo.

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMEN	IX
1. INTRODUCCION Y REVISION DE LITERATURA	1
1.1. Control biológico	5
1.1.1. Micoparasitismo	5
1.1.2. Competencia	7
1.1.3. Antibiosis	8
1.1.4. La compostación y su relación con el control de enfermedades	8
1.1.4.1. Ventajas y deventajas de la compostación	8
1.1.4.2. Cambios bioquímicos en el sustrato durante la compostación	10
1.1.4.3. Las compostas y su acción supresiva sobre diferentes patógenos del suelo	11
1.1.4.4. Control biológico de algunas especies de <i>Fusarium</i>	13
1.2. Control químico de la "dormilona del clavel"	16
1.3. Objetivos	18
2. MATERIALES Y METODOS	19
2.1. Colecta de material	19
2.2. Aislamiento y purificación de patógenos	19
2.3. Pruebas de patogenicidad	20
2.4. Identificación de los hongos patógenos	20
2.5. Preparación de compostas	20
2.6. Pruebas de fitotoxicidad <i>in vitro</i>	21
2.7. Prueba para detectar sustancias inhibitorias a <i>F. roseum</i>	22
2.8. Evaluación de la capacidad supresiva de las compostas bajo condiciones de invernadero	23
2.9. Multiplicación masiva de <i>F. roseum</i>	23
2.10. Aislamiento de agentes biocontroladores	24
2.11. Identificación de la cepa bacteriana No. 13	25
2.12. Prueba de termoestabilidad del metabolito bacteriano	25
3. RESULTADOS Y DISCUSION	26
3.1. Identificación de los organismos aislados	26
3.2. Pruebas de patogenicidad	27

	Pág.
3.3. Pruebas de fitotoxicidad <i>in vitro</i> y detección de sustancias inhibitorias del crecimiento de <i>F. roseum</i>	28
3.4. Evaluación de la capacidad supresiva de las compostas a <i>F. roseum</i>	28
3.5. Multiplicación masiva de <i>F. roseum</i>	31
3.6. Identificación del agente biocontrolador	31
3.7. Termoestabilidad del metabolito bacteriano	32
4. CONCLUSIONES	41
5. LITERATURA CITADA	42
6. APENDICES	49

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1 Vista general de una plantación de clavel	3
2 Síntomas producidos por <i>Fusarium spp</i>	3
3-4 Aspecto de las colonias aisladas de las variedades Flamingo y White Sim	34
5-6 Aspecto de las colonias aisladas de las variedades Scania y Vanesa.	35
7 Colonia reaislada de las variedades White Sim y Scania (arriba), en la parte de abajo se observa los macroconidios de <i>Fusarium roseum</i> , agente causal de la "dormilona del clavel".	36
8 Panorámica del biensayo efectuado con <i>Bacillus subtilis</i> cepa No. 13 y <i>Fusarium roseum</i> Snyder y Hansen. Nótese que el hongo detiene su crecimiento debido a la acción de ciertas sustancias excretadas por la bacteria.	37
9 Crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> cepa No. 13 en agar nutritritivo y el aspecto de la bacteria en suspensión (derecha)	38
10 Evaluación del índice de germinación en <i>Lepidium sativum</i> con los diferentes extractos acuosos estudiados. Por encima de la línea (82%) se considera como no fitotóxico (Pera y Filippi, 1987).	39
11 Efecto supresivo de las compostas con 90 días de madurez sobre <i>F. roseum</i> .	40
12 Efecto supresivo de las compostas con 120 días de madurez sobre <i>F. roseum</i> .	40

RESUMEN

Ante la alarmante pérdida de efectividad de los agroquímicos para controlar a los patógenos del suelo que atacan al clavel, se propone el presente trabajo para buscar alternativas de control, con los siguientes objetivos: encontrar posibles enemigos naturales de *Fusarium roseum* y evaluar a nivel de invernadero la capacidad supresiva de cuatro materiales compostados durante 90 y 120 días.

Se colectaron 20 muestras de suelo de la rizósfera de clavel procedentes de diferentes invernaderos ubicados en la zona florícola de Villa Guerrero, Estado de México. De ellas, se consiguió aislar y determinar la efectividad *in vitro* de una bacteria caracterizada como *Bacillus subtilis*, la cual controla a *F. roseum* en 82.88%. El metabolito bacteriano es termoestable y logró reducir el crecimiento *in vitro* de *F. roseum* en 83.80%.

De los cuatro materiales compostados, el bagazo de caña y el aserrín de madera con 90 días de madurez lograron proteger al cultivar White Sim por 60 días a un nivel de 90 y 80% de plantas vivas, observando un rápido detrimento en el nivel de protección entre los 60 y 120 días posteriores al trasplante, hasta alcanzar una mortalidad de 85 y 90%, respectivamente. Por otra parte, estas mismas compostas con 120 días de madurez tuvieron un efecto supresivo sobre *F. roseum*, proporcionando un nivel de protección de 90 y 88% de plantas vivas. Además, manifestaron un patrón de comportamiento similar entre los 60 y 120 días posteriores al trasplante, alcanzando una mortalidad de 80 y 85%, el porcentaje restante logró producir tallos florales sumamente raquíticos.

Las compostas a base de cascarilla de arroz y paja de trigo con 90 días de madurez, ofrecieron una baja protección durante los primeros 60 días posteriores al trasplante, con

una mortalidad de 50 y 45%, a los 120 días alcanzaron una mortalidad de 95 y 100% respectivamente. Estas mismas compostas con 120 días de madurez tuvieron un comportamiento parecido al observado en el tratamiento con 90 días de intemperización; durante los primeros 60 días se observó un nivel de protección de 55 y 60%, logrando alcanzar a los 120 días posteriores al trasplante una mortalidad de 90 y 95% respectivamente.

1.INTRODUCCION Y REVISION DE LITERATURA

La industria agrícola del clavel ha tenido un gran auge en los últimos años, en su cultivo se han invertido más de 20,000 millones de pesos (Ortega, 1992). A esta actividad se dedican un gran número de familias, ya que en condiciones favorables de desarrollo es una planta ornamental económicamente más rentable que los básicos como el maíz, trigo, frijol, etc. (Arellano, 1992; Comunicación personal) (Figura 1).

Los principales Estados productores de clavel son: México, Michoacán, Puebla, Tlaxcala y Morelos.

La siembra de clavel se establece a la intemperie, empleando 40,000 plantas por hectárea, con una distancia entre plantas de 25 centímetros, y entre surcos, de 100 centímetros. Cuando se establece en condiciones de invernadero es con una densidad de 180,000 plantas por hectárea; el alto número de plantas por metro cuadrado permite obtener altos rendimientos.

La flor se comercializa principalmente en la Central de Abastos, el Mercado de Jamaica en el D. F.; Mercado de Guadalajara; Tepic, Nay.; Culiacán, Sin.; Hermosillo, Son.; Torreón, Coah. y Monterrey, N. L. (Ortega, 1992). La producción de más alta calidad se canaliza al mercado de los Estados Unidos de Norte América (Henkel, 1989).

Las condiciones óptimas para el desarrollo del clavel, son: suelos ricos con buen drenaje, fertilización bien balanceada, labores de cultivo apropiadas y variedades que el mercado exige. Estos factores también contribuyen al desarrollo de marchitez (Figura 2) producida por *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*, la pudrición del tallo por *Fusarium*

roseum f. sp. cerealis y *Rhizoctonia solani* los cuales causan los siguientes síntomas.

Marchitez causada por *F. oxysporum f. sp. dianthi*. Este es un hongo que daña y bloquea los haces vasculares del tallo del clavel, ocasionando su marchitez y muerte. La primera indicación de ataque es el marchitamiento de los brotes más jóvenes, con frecuencia los de un solo lado; como consecuencia, es común observar que el tallo se distorsiona o encorva hacia el lado afectado. Finalmente, el color verde del follaje cambia a amarillo paja, indicando su muerte. Mediante un corte transversal del tallo puede observarse que una parte del anillo xilemático tiene color café, lo cual es debido a que los haces vasculares están obstruidos por micelio y conidios del hongo, así como por algunas sustancias gomosas que impiden la circulación del agua y otros nutrimentos esenciales para la planta. De esta manera, la planta se marchita y muere. Las raíces permanecen intactas. Los síntomas de marchitez por *Fusarium* se desarrollan más rápida y severamente durante el verano cálido (Romero, 1992).

Pudrición del tallo causada por *F. roseum f. sp. cerealis*. El clavel es muy susceptible al ataque de este hongo en la fase propagativa y, en menor grado, inmediatamente después del trasplante. Las plantas enfermas se marchitan y mueren a causa de la pudrición del tallo al nivel del suelo. Las lesiones avanzan de la superficie a la parte interna, resquebrajando la corteza, y a medida que aumentan, van adquiriendo una coloración rosácea y apariencia seca; el xilema no se decolora. Además de la base del tallo, el hongo pudre todas las raíces (Romero, 1992).

Pudrición del tallo por *Rhizoctonia solani*. Este hongo ataca preferentemente a las plantas jóvenes, y los síntomas aparecen de una a seis semanas después de la plantación. El primer síntoma es generalmente el marchitamiento de la planta atacada y las hojas rápidamente se tornan de color verde grisáceo. Normalmente las raíces no son atacadas,

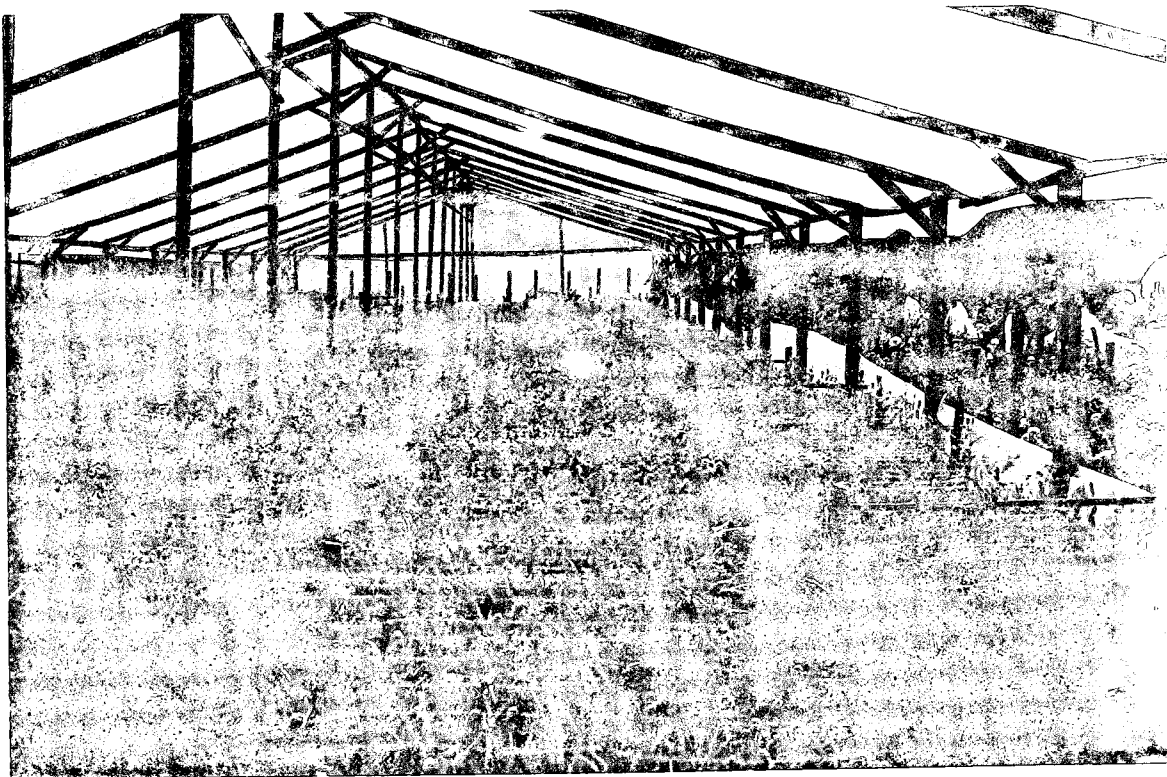


Figura 1. Vista general de una explotación comercial de clavel.

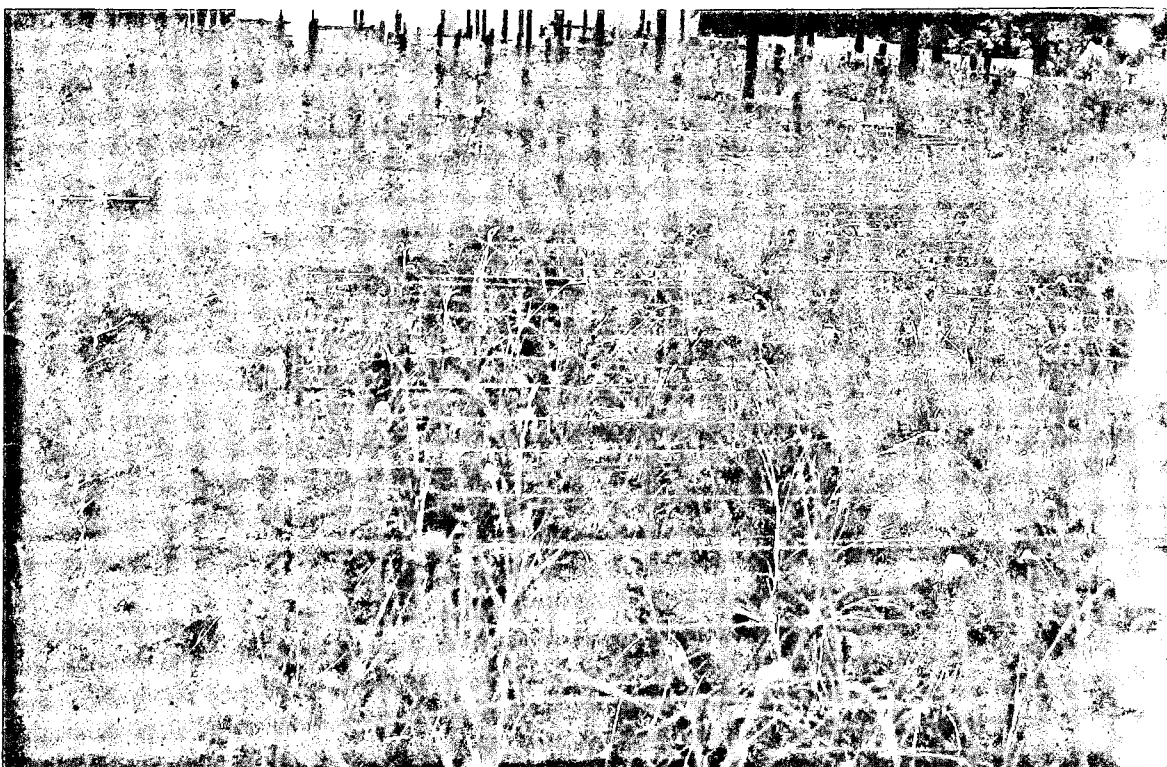


Figura 2. Síntomas producidas por *Fusarium* spp. en clavel.

pero suele desarrollarse una lesión a nivel del rizopiano o justamente por encima. La lesión al principio es seca, corchosa y de un color marrón pálido.

Una vez establecido el hongo en la corteza, crece e invade la médula, donde forma unas estructuras negras de forma irregular llamadas esclerocios. Cuando el suelo permanece húmedo por varios días aparece superficialmente parte del micelio del hongo en forma de filamentos gruesos de color café, pero cuando el tejido dañado llega a ser colonizado por organismos secundarios, puede desarrollarse una podredumbre más oscura (Fosberg, 1963). English (1974) menciona que a menudo *Fusarium culmorum* coloniza las lesiones producidas por la "viruela del clavel" *R. solani*.

Michael y Nelson (1972) señalan a *F. roseum* (Lk) Snyder y Hansen "*culmorum*" como la causa de la pudrición basal del tallo del clavel (*Dianthus cariophyllus* L.). Estudios efectuados en México por Espinoza, en 1973; Nuñez, en 1978 y Murguía, 1992, indican que el agente etiológico de la "dormilona del clavel" es *Fusarium roseum* (Lk.) Snyder y Hansen.

Para el control de patógenos del suelo se han implementado diferentes medidas, las cuales involucran patrones libres de enfermedad, tratamiento químico al suelo, producción de material vegetativo en medio de cultivo aséptico, producción de variedades resistentes, etc. (Baker, 1980); también, se ha investigado e intentado el control biológico, adicionando al suelo microorganismos antagónicos o sustratos que estimulen el desarrollo de éstos (Aldrich y Baker, 1970; Apodaca, 1990; Beker, 1980; Chef *et al.*, 1983; Hoitink, 1980; Koths y Gunner, 1967; Ko, 1982; Michael y Nelson, 1972; Núñez y Romero, 1980; Pera y Calvet, 1989).

1.1. Control biológico

El antagonismo es un fenómeno natural, el cual juega un importante papel en la interacción de microorganismos del suelo; en líneas generales, puede ocurrir por parasitismo, antibiosis y competencia (Elad *et al.* 1984). La actividad antagónica de los microorganismos benéficos reduce la actividad y/o densidad del inóculo de los fitopatógenos del suelo, disminuyendo sustancialmente su potencial de causar enfermedad.

1.1.1. Micoparasitismo.

Los micoparásitos pueden penetrar la pared celular del hospedante por medio de diferentes mecanismos; el más sobresaliente es mediante la producción de enzimas que degradan la pared celular. v.g. *Trichoderma harzianum*, *T. hamatum* y *Pythium numm* parásitos de hifas de *Sclerotium rolfii*, *Pythium spp.*, *Phytophthora spp.*, ambos tanto *Trichoderma* como *Pythium* degradan la pared celular del hospedante por medio de enzimas como la β (1, 3) glucanasa y quitinasa. Su habilidad para controlar los organismos fitopatógenos del suelo dependerá de los niveles de producción de enzimas (Elad, 1985; Elad, *et al.*, 1983; Papavizas, 1985; Ordentlich, *et al.*, 1988).

Después de los trabajos pioneros de Weindling, en 1934, sobre *Trichoderma* y *Gliocladium* se han efectuado una serie de esfuerzos para promover ideas sobre su potencial como agentes efectivos de biocontrol. Una revisión sobre su biología, ecología y su potencial como biocontroladores fue realizada por Papavizas en 1985.

El biocontrol eficiente de *Rhizoctonia solani* en *Phaseolus vulgaris* depende en gran medida de la reacción del suelo y la concentración del inóculo del patógeno. Marshal, en 1982, inoculó semillas de frijol cv Blue Lake con una suspensión de 1×10^6 conidios

de *T. harzianum* , y al sembrarlos en suelo infestado con *R. solani* a una proporción de 0.035-0.318 g/kg a un pH de 3.5 y 5.6; obtuvo los mejores resultados cuando el frijol se desarrolló a un pH de 3.6.

T. hamatum es activo como hiperparásito contra *R. solani* y *Sclerotium rolfsii*; su interacción hifal ha sido estudiada a nivel de microscopio electrónico de sondeo. En cultivos duales, *T. harzianum*/*S. rolfsii*, se ha detectado tanto en suelo como en cultivos *in vitro* una alta concentración de β (1,3) glucanasa y quitinasa, en comparación con las bajas concentraciones encontradas en los cultivos por separado (Elad, *et al.*, 1983). La actividad micoparasítica también se ha observado en *Serratia marcescens* , la cual se desarrolla sobre la pared celular de *S. rolfsii* usando β glucanasa y quitinasas como medios de penetración; además, emplea como fuente de carbón la quitina y la lignina (Ordentlich, *et. al.*, 1988).

Sivan y Chet (1985) afirman que en condiciones de campo *T. harzianum* controla efectivamente a *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* y *F. oxysporum f. sp. radicans* *licopersici*, incrementado la cosecha de melones 53%, y la de tomates, en 34% (Sivan y Chet, 1985). En trigo puede reducir la enfermedad causada por *F. culmorum* hasta en 83% (Chet, 1987). Sivan y Chet (1989) cubrieron semillas de *Gossypium barbadense* cv Pima y Cucumis melo cv 56 con una suspensión de 5×10^9 esporas por mililitro de *T. hamatum*; colateralmente enriquecieron suelo con clamidosporas de *F. oxysporum f. sp. vasinfectum* y *F. oxysporum f. sp. melonis*, fortificándolo con diferentes concentraciones de glucosa y asparagina; la máxima germinación de clamidosporas fue obtenida en suelo enriquecido con 0.4 mg de glucosa y 0.08 mg de asparagina por gramo de suelo. *T. harzianum* redujo significativamente la germinación de clamidosporas de ambas especies, observando que la inhibición fue nulificada a concentraciones de 0.3 y 0.06 mg/g de suelo con glucosa y asparagina.

En Egipto, en condiciones de campo, se observó que una cepa de *Talaromyces flavus* redujó entre 67 y 76% la marchitez de la berenjena causada por *Verticillium dahliae*, incrementando el peso de la cosecha entre 18 a 54%, y el número de frutos, en 22 a 71% (Marois, *et. al.*, 1982).

Teratosperma oligandrum reduce hasta en 94% la densidad de inóculo de *Sclerotinia minor* y *Coniothirium minutans*, y también ejerce una reducción intermedia del número de esclerocios en el suelo, el efecto persiste por 30 semanas (Adams, 1989). Gees y Coffey (1989) afirman que algunas cepas de *Myrothecium roridum* logran controlar a *Phytophthora cinnamomi* en aguacate.

1.1.2. Competencia.

El más grande motivo de competencia es por sustratos en el suelo, específicamente por ciertos nichos ecológicos (Baker, 1980). En la mayoría de los hongos del suelo los elementos mayores son esenciales para la germinación de sus propágulos; por ejemplo, algunas cepas de *Pseudomonas spp.* pueden crear deficiencia de carbón en el medio, de tal forma que inhiben la germinación de algunos aislamientos de *F. oxysporum*, *F. solani*, y *F. graminearum*. Se ha observado que ciertas cepas de *Pseudomonas fluorescens* producen gran cantidad de componentes quelantes conocidos como sideróforos (Alad, 1985) que al limitar el suministro de cationes, inhiben la germinación de clamidosporas de *F. oxysporum f. sp. cucumerinum* al competir por Fe^{+3} , contrarrestando la inhibición de la germinación al corregir la deficiencia (Sneh, *et. al.*, 1984).

1.1.3. Antibiosis.

Se ha demostrado en campo y laboratorio que muchos microorganismos producen sustancias que inhiben el crecimiento y desarrollo de otros. La capacidad de generar estos productos antimicrobiales le permite al antagonista colonizar más rápido, competir por nutrientes y espacio en la rizósfera (Cook y Baker, 1983; Elad, 1985). Así, podemos citar a *Pseudomonas fluorescens* cepa PF-5, la cual produce una sustancia antibiótica conocida como Pirrolnitrina (4,5-dicloro-1,4-pirrol-2-y 1-2- dihidroxifenil ketona) antagónica a *Pythium ultimum* y otros patógenos de la semillas del algodón (Howell y Stipanovic, 1979 y 1980). *T. harzianum* produce sustancias que inhiben el desarrollo de *Pythium aphanidermatum*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani* (Sivan, et. al., 1984). *Pythium numm* parasita diversos hongos y es capaz de inhibir la producción de esporangios en diversas especies de *Pythium* (Elad, et. al., 1983). Kempf y Wolf (1989), al tratar semillas de trigo con una suspensión bacteriana de *Erwinia herbicola*, lograron suprimir en 90 % la enfermedad causada por *Fusarium culmorum*; además, cuando las hojas fueron tratadas con un incremento de $1-2 \times 10^5$ ufc/ml, también se logró controlar la infección producida por *Puccinia recondita f. sp. tritici*.

1.1.4. La compostación y su relación con el control de enfermedades.

1.1.4.1. Ventajas y desventajas de la compostación.

La compostación es una práctica agrícola necesaria por varias razones, las más importantes son: reduce la proporción carbono-nitrógeno, elimina muchos organismos patógenos, desdobra sustancias fenólicas, especialmente los monoterpenoides, los cuales son tóxicos a la plantas. Sin embargo, cuando se desarrollan plantas en composta pueden surgir varios problemas debidos a inmovilización de nitrógeno, causada

por microorganismos, repercutiendo en una deficiencia de N; además, pueden ocurrir altos niveles de Mg, conduciendo a una toxicidad por Mg y/o deficiencia de Fe; la capacidad hídrica se ve descompensada, pudiendo ser mejorada por la adición de varios materiales p.e. perlita, vermiculita, etcétera. Las compostas inmaduras a base de madera son altas en celulosa y retardan el crecimiento por inmovilización del N (Hoitink *et al.*, 1985), el proceso de compostación tiene influencia sobre las propiedades físicas y químicas de la composta, así el espacio poroso total es bajo, reduciendo el porcentaje volumétrico de aire, lo cual puede producir condiciones anaeróbicas en la rizósfera, por lo que se recomienda el uso de acondicionadores para mejorar las propiedades del sustrato (Pages, *et al.*, 1985). Tradicionalmente se han usado diversas compostas a base de aserrín de diferentes árboles, turba, suelo tratado con calor húmedo, etcétera; recientemente, se ha industrializado su producción, extendiéndose a cultivos como el clavel y las hortalizas (Louvét, 1981). Las compostas a base de aserrín de madera y otros desechos orgánicos han reemplazado a muchos de los sustratos usados tradicionalmente en la floricultura (Hoitink, 1980). Algunas de estas compostas suprimen a diversos e importantes patógenos del suelo, eliminando parcialmente la necesidad de esterilizar el sustrato y los efectos negativos de los fungicidas. La infección no es completamente prevenida por la composta.

Los componentes orgánicos usados en la manufacturación de compostas afecta la severidad de las enfermedades producidas por patógenos del suelo. Varias de las compostas a base de aserrín liberan sustancias inhibidoras a varias especies de *Phytophthora*. Pero se ha observado que las compostas maduras no liberan inhibidores, y una vez fría ocurre una rápida recolonización por antagonistas específicos (Hoitink y Kuter, 1985). No obstante, algunas compostas de aserrín tienen un amplio espectro supresivo y otras no son tan efectivas a ciertos patógenos, observándose que el efecto debido a sustancias que libera la composta puede desaparecer gradualmente

después de la compostación (Hoitink, 1980; Nelson y Hoitink, 1983).

1.1.4.2. Cambios bioquímicos en el sustrato durante la compostación.

Estaun y Calvet (1985) analizaron por medio de cromatografía de gas y cromatografía líquida de alta resolución los cambios cuantitativos en ácidos grasos, ácidos orgánicos y fenoles ocurridos durante la compostación del orujo de olivo; advirtiendo una reducción progresiva en los niveles de concentración de estas tres fracciones. Después de 120 días de compostación ninguna de estas sustancias fitotóxicas fue detectada por medio de los métodos usados. Otros trabajos revelan que durante el proceso de compostación del orujo de olivo por un período de 70 días y condiciones controladas, se observaron cambios cuantitativos en la flora microbiana, los cuales fueron ligados a factores físicos y químicos. En general, durante el proceso las levaduras decrecen gradualmente mientras que las bacterias y hongos tienden a estabilizarse después de un período de fluctuación correlacionado con la temperatura. Los actinomicetes fueron detectados sólo en un corto período después de un mes de compostación (Pera, *et al.*, 1986). Los ácidos orgánicos y grasos decrecen progresivamente y el pH incrementa de 5.9 a 7.5, es notorio que la germinación de semillas de pepino y lechuga es baja en composta de orujo de olivo con 63 días de madurez, por la presencia de 400 ppm de ácido acético; pero no advirtiendo fitotoxicidad en compostas con 120 días de edad, aunado a un alto porcentaje de germinación (Calvet, *et al.*, 1985).

La corteza de pino es un sustrato de crecimiento común de varias ornamentales; muchos floricultores prefieren usar la corteza de pino compostada, a causa del pobre crecimiento obtenido cuando se usa fresca, por lo cual se sugiere la compostación reforzada con nitrógeno para proveer las necesidades de las plantas y microorganismos (Cobb y Keever, 1984).

1.1.4.3. Las compostas y su acción supresiva sobre diferentes patógenos del suelo

Van Assche y Uyttendaele (1981) aseguran que la composta a base de desechos domésticos-suelo arenoso-arcilloso en una proporción de 24:76 (V/V) redujo la infección causada por *Rhizoctonia solani* en frijol, también fue notorio el detrimento de la incidencia de la enfermedad causada por *Pythium ultimum* en chicharo.

Nelson y Hoitink (1983), al experimentar con compostas de aserrín de 11 semanas de madurez, encontraron una alta supresividad de *R. solani*. Este mismo medio esterilizado por calor y reforzado con *Trichoderma harzianum* no redujo la viabilidad de los propágulos. Estos autores opinan que la supresión de *Rhizoctonia* en medio de aserrín con 11 semanas de madurez es producida por la actividad microbiana, mientras que los bajos niveles de supresión en la composta verde (menos de 11 semanas) pueden estar involucrados inhibidores químicos.

En un bioensayo Kwok, et. al. (1987) probaron por separado la habilidad supresiva de la composta de encino (*Quercus spp.*) enriquecida con ocho diferentes microorganismos. La combinación de algunas cepas bacterianas como *Enterobacter cloacae*, *Flavobacterium holostinum*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri* con *Trichoderma hamatum* fueron considerablemente más efectivos en la supresión de *R. solani*, en comparación con el hongo solo. Por su parte, Hung y Hoitink (1990) aseguran que la capacidad de *T. hamatum* para suprimir a *R. solani* varía significativamente cuando las macetas se llenan con composta de aserrín removido de diferentes zonas de temperatura (40-50 °C, 50-60 °C y mayores de 60 °C). Los mejores resultados fueron observados en la zona de compostación 50-60 °C y mayor de 60 °C, argumentando que la reducción de la eficiencia de *T. hamatum* puede estar relacionada a

un componente específico o subespecífico de la microflora asociada a cada temperatura.

Spencer y Benson (1982) evaluaron en laboratorio e invernadero la capacidad supresiva de las compostas a base de aserrín de pino, madera dura y turba contra *Phytophthora cinnamomi*; observaron que la composta de madera dura resultó más efectiva. La composta de pino suprimió y retardó más la enfermedad a un pH de 4.5 que a 6.0. Los suelos arenosos y limosos reforzados con composta de pino resultaron menos supresivos. Generalmente la producción de esporangios de *Phytophthora citricola* y *P. cinnamomi* fue alta en extractos no estériles, a comparación con los esterilizados, donde la producción de esporangios fue baja.

Por su parte, Pera y Calvet (1989) ensayaron la capacidad supresiva de tres compostas contra *F. oxysporum f. sp. dianthi* raza 2, haciendo mezclas por separado (1:1 V/V) de turba, composta de pino y composta de orujo de olivo-piedra pómez con arena esterilizada a 80 °C durante 60 minutos y ajustado a un pH de 6.8 con CaCO₃ ; ellos usaron esquejes de clavel cv Lena trasplantados en las compostas inoculadas con 10⁴ ufc/cm³ de *F. oxysporum f. sp. raza 2*. Después de cinco meses las compostas de orujo de olivo-piedra pómez y composta de pino observaron una incidencia de 20 y 40%, respectivamente. Además, los extractos acuosos no afectaron el desarrollo in vitro de *F. oxysporum f. sp. dianthi* raza 2.

Couteaudier y Alavaulette (1981) afirman que la receptividad de un sustrato refleja el efecto global de los factores abióticos y bióticos. El nivel de receptividad de los sustratos puede ser alterada por la adición de pequeñas cantidades de suelo naturalmente supresivo a diferentes especies de *Fusarium*.

1.1.4.4. Control biológico de algunas especies de *Fusarium*.

Michel y Nelson (1972) señalan que *Fusarium roseum* 'culmorum' fue controlado eficientemente *in vitro* e *in vivo* por una bacteria que aislaron del suelo.

Olivas (1970) afirma que las variedades de frijol con diferentes grados de resistencia a *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* se encuentran fuertemente correlacionadas con la cantidad de actinomicetos presentes en su rizósfera. Aislando el mayor número de antagonistas de las variedades resistentes, además de lograr un control más o menos eficiente de la enfermedad mediante la adición de paja de cereales, harina de alfalfa y melaza de caña al suelo.

Núñez y Romero, en 1980, al efectuar un estudio microbiológico de la rizósfera del clavel, encontraron que *Streptomyces* sp., *Bacillus subtilis* y *Trichoderma lignorum* mostraron antibiosis contra *Fusarium roseum*, y señalan que el bagazo de café es un sustrato adecuado para el desarrollo de microorganismos del suelo, pues los actinomicetos son los principales productores de antibióticos, y que el tratamiento bagazo de café a 1% más benlate 1% controla especies de *Fusarium* a un nivel aceptable.

Ramírez-Villapudúa (1985) cita el efecto de la solarización y enmienda del suelo con residuos de col (1% peso/peso), indicando que juntos reducen significativamente el amarillamiento de la col producido por *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* raza 5.

Pera y Filippi (1987) probaron la habilidad de la composta de aserrín para controlar *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* en plantas de clavel. El material fue compostado y previamente inoculado con una bacteria antagónica en una proporción 10^8 células/ml; la composta fue mezclada con suelo infestado con 3000 ufc/g de suelo. En invernadero se observó a los

60 días posteriores al trasplante una protección de 60% en comparación con el testigo sembrado en suelo infestado. En cuanto el efecto protector de la composta no se encontró diferencia significativa a las concentraciones 15 y 30% de composta. Fue notorio un rápido incremento en el número de plantas enfermas después de los 60 días posteriores al trasplante, alcanzando más de 90% a los 120 días.

Filippi y Pera (1989) analizaron el efecto supresivo de la composta de aserrín esterilizada y no esterilizada sobre *F. oxysporum f. sp. dianthi*. La composta fue mezclada con suelo infestado con 3000 ufc/g de suelo. Los mejores resultados se obtuvieron con la composta esterilizada, atribuyendo la diferencia en protección a una diferente proporción de crecimiento de la fracción zymogénica del suelo a consecuencia de las diferentes cantidades de materia orgánica asimilable contenida en los dos tipos de composta. También señalan un rápido incremento de la enfermedad después de los 60 días posteriores al trasplante. En 1990, estos mismos autores que realizaron su trabajo bajo condiciones experimentales semejantes y variando la temperatura del suelo a 16, 23 y 30 °C, concluyen que la temperatura no tiene un efecto apreciable sobre la patogenicidad de *F. oxysporum f. sp. dianthi*, y que la adición apropiada de nutrientes a la composta causa una respuesta favorable de la microflora del suelo, la cual es responsable de la protección efectiva durante los primeros 60 días posteriores al trasplante, por lo que sería recomendable una segunda inoculación con organismos antagonicos al sustrato a los 40 días después del trasplante.

Dentro de los hongos fitopatógenos, *Fusarium* es específicamente interesante para la investigación de control biológico. En 1984, Filippi *et al.* indicaron que la cepa M51 de *Bacillus subtilis* es particularmente activa contra *F. oxysporum f. sp. dianthi* tanto *in vitro* como *in vivo*, además de ser antagonista a *F. roseum var. arthrosporoides* (S. FRAR), *F. roseum var. avenaceum* (S. FRA). Usando diferentes métodos; de ellos, la aspersión

de la cepa M51 sobre perlita ofreció los mejores resultados, siendo notorio que en este tratamiento y el control trasplantado en suelo infestado a una proporción de 3000 ufc/g se observó un rápido incremento en el número de plantas enfermas después de los 60 días posteriores al trasplante. Las evidencias señalan que la protección de las plantas de clavel depende de la presencia física de *B. subtilis* M51 sobre las células de la raíz (Filippi, *et. al.*, 1987; 1989).

En 1985, Filippi *et al.* probaron la actividad antimicótica de 160 cepas bacterianas habitantes de la rizósfera, encontrando que la cepa M51, correspondiente al género *Bacillus*, es activa contra varios hongos, entre ellos *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* y *Fusarium roseum*. *F. oxysporum f. sp. dianthi* es un patógeno del clavel, altamente sensible a la inhibición por *Bacillus subtilis* M51. La infección fue anulada durante dos meses después del tratamiento de plantas con la bacteria.

Garibaldi (1989) afirma que los mejores resultados para controlar *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* se logran cuando se agrega (200 g/m²) de cepas saprofitas de *Fusarium* aisladas de suelos supresivos o de la rizósfera de claveles silvestres. Los antagonistas se pueden aplicar en suspensión de conidios o en una mezcla de granos de trigo o trigo más perlita inoculados con las cepas, encontrándose mejores resultados cuando el control biológico es combinado con un tratamiento de 20 g de benomyl/m².

Las variedades Alice, Manon, Oscar y White Sim han sido empleadas para evaluar la actividad antagónica de *Trichoderma spp* y *Penicillium spp.* contra *F. oxysporum f. sp. dianthi* en suelo naturalmente infestado y suelo infestado artificialmente. *Trichoderma* no fue muy efectivo, en cambio *Penicillium*, desarrollado en paja picada en condiciones no estériles, redujo la severidad de *F. oxysporum f. sp. dianthi*; el

efecto antagónico se incrementa cuando el tratamiento es empleado por dos años consecutivos (Guda, 1989).

En laboratorio se ha observado la actividad antagónica de bacterias del género *Pseudomonas*. La bacterización del cultivar Pallas en condiciones de invernadero, reduce significativamente el número de plantas enfermas (Peer, 1989).

La supresión de microorganismos en suelos naturalmente infestados por medio del reforzamiento del sustrato con sustancias orgánicas ha sido considerado en las ultimas décadas, y se ha convertido en una práctica interesante dadas las políticas actuales de reducir el uso de agroquímicos. Filippi *et al.*, (1989) estudiaron la importancia de la asociación microbiana en el control de fitopatógenos que atacan plantas de clavel. En 1990, Filippi, Bagnoli y Citterio evaluaron el efecto protector de algunas sustancias orgánicas contra *F. oxysporum f. sp. dianthi*, empleando como planta indicadora de fitotoxicidad a *Lepidium sativum*. Las compostas de aserrín aderezadas con diferentes compuestos hidrosolubles tiene un efecto positivo sobre el desarrollo de bacterias, hongos, actinomycetes y organismos celulolíticos; por el contrario, *F. oxysporum f. sp. dianthi* y sus antagonistas no exhiben un desarrollo significativo.

Particularmente Filippi y Pera (1990) señalan que las plantas protegidas tienen una apariencia de estrés similar al estrés nutricional, argumentando que esto se debe a una menor disposición de nutrientes cerca de la raíz, causada por un incremento en la población microbial, la cual requiere una mayor cantidad de nutrientes.

1.2. Control químico de la enfermedad

En la zona florícola de Villa Gro., Estado de México, comúnmente se han

usado fungicidas para el control de la "dormilona del clavel". Entre ellos, el benlate, benomyl:(metil-1- butil carbomoi)-2-benzimidazol carbamato; Busan 30, TCMC: (tiosianato metiltio) benzotiazol y Tecto 60, thiabendazole: 2- (4-tiasolil) benzimidazol. Pero son caros, además en poco tiempo (3-4 años) pierden efectividad, debido a que no todas las esporas son destruidas y las esporas remanentes forman rápidamente poblaciones resistentes (Núñez, 1978). En otras partes del mundo se ha evaluado la sensibilidad de *F. oxysporum f. sp. dianthi* a la aplicación de benzimidazoles al suelo; después de varios años se encontró que la dosis mínima inhibitoria incrementó de 3.3 a 5.5 mg/ml, sobresaliendo que la raza 4 resultó menos sensible que otras, lo cual puede atribuirse al desarrollo de cepas resistentes (Gulino, et. al., 1986).

En México, los patógenos del suelo que atacan clavel se han convertido en un gran problema que está limitando la producción de clavel en campo e invernadero, incrementando los costos de cultivo y ocasionando abandono del mismo. Esto se debe a la pérdida de efectividad de los agroquímicos usados para su control, y a que son pocos los trabajos que se han efectuado para controlar enfermedades radicales por medio de biocontroladores.

1.3. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue encontrar posibles enemigos naturales de *Fusarium roseum* (Lk) Snyder y Hansen agente causal de la "dormilona del clavel".

Evaluar, a nivel de invernadero, la capacidad supresiva de cuatro materiales (aserrín, bagazo de caña, cascarilla de arroz y paja de trigo) compostados durante 90 y 120 días.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Colecta de material infectado

El material fue colectado en Villa Guerrero, Edo. de México de plantas que manifestaron síntomas típicos de marchitez. Se tomaron muestras de cinco variedades comerciales (Flamingo, White Sim, Vanesa, Scania y Sir Arthur) todas susceptibles en mayor o menor grado, transportándolas en bolsas de plástico al Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma de Chapingo.

2.2. Aislamiento y purificación de patógenos

Los aislamientos se hicieron mediante desinfestación superficial de trocitos de material de la zona de transición entre tejido sano y tejido enfermo, por un minuto en hipoclorito de sodio a 1% y transferidos a cajas con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA, Apéndice 2). Además, parte del material fue colocado en cámara húmeda y, posteriormente, se efectuaron preparaciones semipermanentes para detectar los diferentes agentes, colocando por separado en cajas Petri con PDA una rodaja de 5 mm de diámetro de cada uno de ellos e incubando a 25 °C, durante 6 días; luego, en un vial de vidrio con agua estéril se preparó una suspensión de conidios diluyendo hasta poder contar al microscopio 50 conidios por gota de agua. Una vez lograda esta concentración, los aislamientos se sembraron por separado en tres cajas de Petri con PDA, colocando una gota de suspensión en cada una de ellas, las colonias se incubaron a 25 °C por 24 a 48 h, observándolas continuamente al microscopio estereoscópico. Una vez germinados los conidios, fueron transferidos individualmente a cajas con el mismo medio.

2.3. Pruebas de patogenicidad

Para efectuar estas pruebas se emplearon esquejes de la variedad White Sim (blanco) y Rojo Scania (rojo), con tres semanas de enraizamiento, facilitados por el productor Norberto López, del Municipio de Villa Guerrero, Edo. de México.

El suelo empleado como sustrato se esterilizó por una hora a 120 libras de presión, dejándolo reposar durante 48 h; pasado este tiempo se sometió nuevamente a esterilización; después de 24 h se trasplantaron cuatro esquejes por maceta, de cinco kg, con cuatro repeticiones y un testigo, los cuales se inocularon 20 días después, provocando una herida en bisel cerca del callo de enraizamiento, aplicando un disco de 5 mm de una colonia del hongo desarrollada en PDA con 15 días de edad y obtenida monospóricamente.

2.4. Identificación de los hongos patógenos

Del material colectado se obtuvieron y purificaron cuatro aislamientos de *Fusarium spp.* con diferente hábito de crecimiento y coloración del medio de cultivo. Para la correcta identificación se efectuaron preparaciones semipermanentes. Las características de cada cepa fueron observadas al microscopio compuesto. Su identificación se basó en las claves de Snyder y Hansen, citadas por Romero (1988).

2.5. Preparación de compostas

Los materiales orgánicos para la preparación de las compostas fueron: bagazo de caña, aserrín de madera, paja de trigo y cascarilla de arroz.

El aserrín se compostó de acuerdo con lo propuesto por Kwork *et. al.* (1987), mejorando con 2 kg de nitrato de amonio y 1.5 kg de urea por metro cúbico de material más agua equivalente a 55% del peso seco del material.

Para el caso del bagazo de caña, cascarilla de arroz y paja de trigo, se agregó 1.5 kg de nitrato de amonio y un kilogramo de superfosfato simple, humedeciendo posteriormente con agua equivalente a 55% del peso seco del material. Los residuos se picaron finamente y se procedió a formar pilas de altura y longitud variable, colocando una capa de 10 cm de espesor después una capa ligera del fertilizante; de esta forma, al terminar se humedeció y compactó. Además, para que el proceso se efectuara en forma óptima fue necesario remover periódicamente la pila cada cinco días para proporcionar el oxígeno necesario para el desarrollo de microorganismos y regular la temperatura de compostación. A las pilas de los diferentes materiales se les determinó periódicamente la temperatura, cuidando que ésta no excediera los 70 °C y manteniendo la humedad a 55%. Durante cuatro meses se tomaron muestras de cada una de las compostas para su posterior experimentación, observando claramente que aún después de 120 días de intemperización en las condiciones de Chapingo los tratamientos no tenían un buen grado de compostación. Por esta razón fueron examinadas sólo las compostas con 90 y 120 días de intemperización; a éstas se les determinó su grado de fitotoxicidad *in vitro*, su habilidad supresiva contra *F. roseum* en condiciones de invernadero, además de una prueba para detectar sustancias inhibitorias a *F. roseum*.

2.6. Prueba de fitotoxicidad *in vitro*

La fitotoxicidad de las compostas fue probada *in vitro* por medio del método de Zucconi *et. al.*, (1981 a, b) citado por Pera y Filippi (1987) y Filippi *et. al.*, (1990). Consiste en preparar extractos acuosos de la composta siguiendo una relación

volumen/volumen, el extracto es pasado a través de papel filtro, luego en cajas Petri se coloca papel filtro al cual se le agregan 2 ml del extracto. Posteriormente se sembraron 100 semillas de *Lepidium sativum*. De cada sustrato se hicieron cuatro repeticiones y un testigo con agua destilada.

2.7. Prueba para detectar sustancias inhibitorias a *F. roseum*

Se tomó un disco de papel filtro y se sumergió en el extracto acuoso de la composta, luego se colocó en el fondo de una placa Petri, agregándole medio Waksman agar con 0.7% de agar (Apéndice 1) y dejándola por 4 a 5 minutos a temperatura ambiente; pasado este tiempo las placas se inocularon con una suspensión de conidios de *F. roseum* y se incubaron por 24 a 48 h a temperatura ambiente. La presencia de inhibidores se notó por la presencia o ausencia de halos de inhibición en las placas; la prueba constó de cinco placas por composta y un control con agua estéril.

2.8. Evaluación de la capacidad supresiva de las compostas en condiciones de invernadero.

Con este trabajo se pretendió observar la capacidad supresiva del bagazo de caña, aserrín de madera, paja de trigo y cascarilla de arroz con 90 y 120 días de compostación. Para esto, se preparó una mezcla por separado con cada uno de los materiales intemperizados, la cual constó de 80% de suelo esterilizado (como se citó anteriormente) más 20% del material compostado; de cada material se llenaron diez macetas, el volumen total de cada mezcla fue inoculado con 3000 ufc/ml de mezcla, también se incluyó un testigo positivo que constó de suelo estéril inoculado a la misma concentración (Filippi y Pera, 1987; 1990). Veinticuatro horas después de la inoculación en cada maceta se trasplantaron cuatro esquejes de la variedad White Sim con tres semanas de enraizamiento. El porcentaje de mortalidad de las plantas de clavel se calculó por medio

de una inspección visual efectuada cada 15 días; a todas las plantas muertas se les practicó una necropsia con la finalidad de reaislar el patógeno, usando PDA para el crecimiento y esporulación del agente causal.

2.9. Multiplicación masiva de *Fusarium roseum*

La cepa empleada en el experimento fue reaislada de las pruebas de patogenicidad. Diversas metodologías fueron usadas, pero sólo se describen las que dieron mejores resultados, éstas son: Incremento de *Fusarium roseum* en bolsas de polipapel con maíz, y la propuesta por Pera y Calvet en 1989, a la cual se le hicieron algunos ajustes, que consistieron en lo siguiente: se preparó un medio a base de tejidos de clavel cortados finamente, la mezcla se distribuyó a razón de 750 ml en matraces de 1000 ml y se ajustó a 50% con agua destilada en relación peso a peso. Se esterilizó dos veces a 120 °C durante una hora a intervalos de 24 hr, 24 hr después de la última esterilización se agregó a cada matraz cinco discos de 5 mm de diámetro de una colonia de *F. roseum* de ocho días de edad cultivada en PDA, incubando a 25 °C y agitando cada 3 días para tener un crecimiento uniforme de la colonia a través del medio. Después de 28 días el medio se esparció en capas delgadas en una bandeja y se secó a 25 °C por cinco días. Los cultivos secos se mezclaron con perlita estéril (1:10 v/v) y se almacenaron a 5 °C.

Preparación de bolsas de polipapel con *F. roseum*. El polipapel es un material que soporta la presión y la temperatura de esterilización; por esta razón fue seleccionado para este experimento. En una bolsa de polipapel se colocaron 500 ml de maíz, previamente lavado, más 50 ml de agua, se sometió a esterilización durante dos horas, se dejó enfriar y se inoculó con cinco mililitros de suspensión de conidios obtenidos de una colonia de nueve días de edad, desarrollada en PDA.

2.10. Aislamiento de agentes biocontroladores

Para aislar los posibles agentes biocontroladores existentes en la rizósfera del clavel, se tomaron 20 muestras de suelo procedentes de diferentes invernaderos y campos de clavel de Villa Guerrero, Estado de México; las muestras fueron transportadas y almacenadas en bolsas de polietileno, conservándolas a temperatura ambiente.

El método empleado fue el de dilución en placa (Olivas, 1970; Núñez, 1980; Dingra y Sinclair, 1985). Dicho método consiste en disolver 10 g de suelo y 90 ml de agua destilada estéril, se agita con un agitador magnético durante 20-30 minutos, se deja reposar, se toma una alícuota de 10 ml de suspensión colocándola en 90 ml de agua destilada; luego se agita por un minuto y se transfiere en 10 ml de la suspensión en otros 90 ml de agua destilada estéril; esta operación se repite hasta obtener la dilución deseada. En general, la dilución conveniente es de 10^{-3} a 10^{-4} para actinomicetes, 10^{-6} a 10^{-8} para bacterias y 10^{-4} a 10^{-5} para hongos.

Se dispersó un mililitro de la suspensión sobre la superficie de la caja con medio de cultivo, la rotación o inclinación facilitó la dispersión uniforme sobre el agar, además se agregaron unas gotas de una suspensión de conidios de una colonia de *Fusarium roseum* de 15 días de edad, reaislada de las pruebas de patogenicidad; las cajas se incubaron a 25 °C. Se emplearon los medios selectivos Czapek, para actinomicetos; Agar nutritivo, para bacterias; y Peptona dextrosa ácido, para hongos (Ver sus fórmulas en el Apéndice).

Los organismos que mostraron una reacción de antibiosis a *F. roseum* fueron aislados y multiplicados; posteriormente, se bioensayaron en cajas Petri, rayando las bacterias y colocando en los extremos una rodaja de 5 mm de diámetro con el hongo, la

prueba se efectuó por triplicado. Las cajas se incubaron a 25 °C durante nueve días, tiempo que tardó el control (*Fusarium* solo) en llenar la caja. La lectura se tomó a los nueve días. A la cepa número 13, que ofreció los mejores resultados, se le efectuó una tercer prueba de efectividad, usando 10 placas inoculadas en la forma que se citó anteriormente.

2.11. Identificación de la cepa bacteriana No. 13

La bacteria fue identificada en el Laboratorio de Bacteriología del Colegio de Postgraduados.

2.12. Prueba de la termoestabilidad del metabolito bacteriano

La termoestabilidad del metabolito bacteriano a la esterilización se estableció evaluando la capacidad de crecimiento de *F. roseum* sembrado en Agar nutritivo. Las colonias de nueve días de edad fueron sometidas al autoclave a 120 lb de presión durante 15 minutos. Una vez solidificado el medio, se sembró en cada caja una rodaja de cinco milímetros de diámetro de una colonia de ocho días de edad de *F. roseum*. Las lecturas del diámetro fungoso se evaluaron a los seis y ocho días de hecha la siembra.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Identificación de los organismos aislados

La colonia aislada de la variedad Flamingo mostró: un micelio algodonoso de color blanco y una tinción del medio de color violeta ligeramente oscuro (Figura 3). Al microscopio se observaron conidióforos alargados, microconidios pequeños, elípticos y formando cadenitas, macroconidios angostos septados transversalmente, en forma de canoa y con pared delgada, no produjo clamidosporas . En base a estas estructuras y de acuerdo con las claves de Snyder y Hansen, citadas por Romero (1988), se trata de *Fusarium moniliforme* Snyder y Hansen.

Las colonias aisladas de las variedades White Sim y Sir Arthur mostraron: micelio algodonoso color de rosa y una tinción del medio de color rosa, macroconidios con pie y terminaciones puntiagudas, formó clamidosporas, y en cultivos viejos se observó una gran cantidad de esporodoquios y fue clara la ausencia de microconidios. Estas características corresponden a las de *Fusarium roseum* Snyder y Hansen (Figura 4). Cabe mencionar que éste hongo fue aislado con mayor frecuencia en la mayoría de las muestras y las pruebas de patogenicidad fueron enfocadas particularmente a este organismo.

A partir de la variedad Scania se aisló una colonia que presentó micelio color blanco con aspecto algodonoso con tinción del medio de color violeta tenue que tiende a oscurecerse con la edad, fue notoria la presencia de microconidios pequeños y elípticos, conidióforos alargados, formó clamidosporas, sus macroconidios fueron gruesos no puntiagudos con pared gruesa. Estas estructuras son similares a las de *Fusarium solani* Snyder y Hansen (Figura 5).

De la variedad Vanesa, aparentemente resistente a nivel de campo, se aisló un hongo que produjo: un micelio algodonoso de color de rosa y una tinción del medio color rosa tenue, el cual produjo conidióforos alargados, microconidios pequeños elípticos, formó clamidosporas intercalares, desarrollándose incluso entre las células de los macroconidios, los macroconidios eran finos, alargados, puntiagudos y con pared delgada. Todas estas estructuras describen a *Fusarium oxysporum* Snyder y Hansen (Figura 6).

La presencia de diferentes patógenos se ha correlacionado con diversas enfermedades radicales del clavel. Fosberg (1963) asegura que la lesión causada por *R. solani* es invadida por patógenos secundarios, pudiéndose desarrollar una podredumbre más oscura. De acuerdo con English (1974), a menudo *Fusarium culmorum* coloniza las lesiones producidas por la "viruela del clavel" causada por *R. solani*.

3.2. Pruebas de patogenicidad

Durante estas pruebas los primeros síntomas fueron observados a los 40 días posteriores a la inoculación, aunque algunas plantas manifestaron síntomas hasta después de 70 días. De las plantas enfermas se tomaron trocitos de material infectado, los cuales se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio a 1%, se secaron en papel y se sembraron en caja de Petri con PDA y se incubaron a 25 °C. El hongo recuperado, usando las claves de Snyder y Hansen, citadas por Romero (1988), fue identificado como *Fusarium roseum* (Figura 7), lo cual concuerda con lo citado por Michael y Nelson (1973); Espinoza (1973), Núñez (1978) y Murguía, (1992), en el sentido de que esta especie de *Fusarium* es la principal causante de la "dormilona del clavel".

3.3. Pruebas de fitotoxicidad *in vitro* y detección de sustancias inhibitorias del crecimiento de *F. roseum*.

Las pruebas de fitotoxicidad, *in vitro*, de los sustratos resultaron negativas, teniendo una germinación media de 90% de las semillas de *Lepidium sativum* (Figura 10). Además, se establece que en las mismas compostas no se encontraron presentes sustancias que inhibieran el crecimiento de *F. roseum*. Resultados similares fueron obtenidos por Spencer y Benson (1982) concluyendo que los extractos acuosos no esterilizados de la composta de aserrín de pino y madera dura permiten una alta producción de esporangios de *Phytophthora citricola* y *P. cinnamomi*. Se ha observado que varias compostas (no maduras) a base de aserrín liberan sustancias inhibitorias a varias especies de *Phytophthora*, siendo notorio que las compostas maduras no liberan inhibidores y una vez fría ocurre una rápida recolonización por antagonistas específicos (Hoitink y Kuter 1985). Pera y Calvet (1989), al experimentar con las compostas de pino y orujo de olivo-piedra pómez, aseguran que sus extractos no afectan el desarrollo *in vitro* de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2.

3.4. Evaluación de la capacidad supresiva de las compostas a *Fusarium roseum*.

En la Figura 11 se observa el efecto supresivo de las compostas con 90 días de madurez, al analizarla observamos que el bagazo de caña y el aserrín de madera lograron proteger al cultivar White Sim por 60 días a un nivel de 90 y 80% de plantas vivas. Las observaciones entre 60 y 120 días muestran que la protección decreció rápidamente hasta permitir una mortalidad de 85 y 90%, respectivamente. El efecto protector de los tratamientos cascarilla de arroz y paja de trigo fue bajo durante los primeros 60 días posteriores al trasplante, con una mortalidad de 50 y 45% y más bajo aún a los 120 días, alcanzando la mortalidad de 95 y 100%, respectivamente.

Por otra parte, la Figura 12 muestra el efecto supresivo de las compostas con 120 días de madurez sobre *F. roseum*. El bagazo de caña y el aserrín de madera proporcionan un buen nivel de control de *F. roseum* hasta los 60 días, con 90 y 88% de plantas vivas. Durante los 60 días restantes la mortalidad ascendió rápidamente hasta alcanzar niveles de 80 y 85%, el porcentaje restante de plantas produjo tallos y flores sumamente raquíticos. Las compostas con base de cascarilla de arroz y paja de trigo mantuvieron un patrón similar al observado en el tratamiento con 90 días de intemperización; durante los primeros 60 días se observó un nivel de protección de 55 y 60%, pero a los 120 días posteriores al trasplante la mortalidad fue de 90 y 95%, respectivamente.

El incremento de la poblaciones microbianas reduce la virulencia de los patógenos en el suelo a través de su actividad antagonista; esta actividad puede ser por medio de la producción de antibióticos, competencia por espacio y nutrientes, producción de cambios físicos y químicos en el suelo, etcétera (Cook y Baker, 1983; Elad, 1984).

Los resultados obtenidos, a nivel de invernadero, sobre el control de *F. roseum* usando las compostas de bagazo de caña y aserrín requieren de ser confirmados y posteriormente tratar de transferir estos resultados al campo.

Varios autores han observado un efecto supresivo de las compostas a base de aserrín de madera y otros materiales orgánicos contra hongos del suelo (Hoitink 1980; Kuter, *et al.*, 1983; Nelson y Hoitink, 1983).

Pera y Filippi (1987), trabajando la enfermedad causada por *F. oxysporum f. sp. dianthi*, observaron resultados semejantes al usar composta de aserrín de madera a una proporción de 20%. Para el caso del bagazo de caña no se encontraron reportes que

apoyen o refuten los resultados encontrados, y dada la cercanía de la zona cañera de Morelos es factible emplear el bagazo de caña como una posible alternativa de control de *F. roseum*.

Referente al patrón de comportamiento de la fusariosis en claveles, algo similar fue observado por Pera, *et. al.* (1986) y Pera y Calvet (1987, 1989) en experimentos de invernadero donde se usó composta de madera para controlar la fusariosis producida por *F. oxysporum f. sp. dianthi*. Durante los primeros 60 días posteriores al trasplante se observó un nivel de protección superior a 70%; denotando que el porcentaje de plantas muertas puede alcanzar una mortalidad superior a 90% entre los 60 y 120 días posteriores al inicio del experimento. Resultados similares son señalados por Filippi *et. al.* en 1989 y 1990, ellos explican este fenómeno con base en un estudio tempoespacial de los microorganismos presentes durante y después de la compostación. Luego del trasplante las poblaciones de bacterias, hongos y actinomycetos es alta durante los primeros 60 días, decreciendo rápidamente después de este período. Guda (1989) opina que el efecto antagónico de la composta se incrementa sustancialmente cuando el tratamiento es usado por dos años consecutivos.

Filippi y Pera (1990), al experimentar con la acción supresiva de la composta de madera sobre *F. oxysporum f. sp. dianthi* a diferentes temperaturas, encontraron este mismo patrón de desarrolló, siendo más marcado a 16 °C, temperatura cercana a la cual se desarrollo el presente estudio.

Por su parte, Núñez (1978) sostiene que la aplicación de 1% bagazo de café a la rizosfera del clavel tiene un efecto significativo en la incidencia de la "dormilona del clavel", dando mejores resultados cuando se refuerza con 1% de benomyl. *F. solani f. sp. solani* se ve limitado en su desarrollo cuando el suelo es fortalecido con paja de cereales,

harina de alfalfa y/o melaza de caña (Olivas, 1970).

En el área florícola de Villa Gro., Méx. se puede implementar la rotación con col, incorporando sus residuos o toda la cosecha, pues se ha observado que las sustancias volátiles que se liberan tienen un efecto letal sobre *F. oxysporum f. sp. conglutinans* raza 5 (Ramírez-Villapudúa, 1985).

La producción de tallos no comerciales en los tratamientos con algunas compostas es indicada por Filippi y Pera (1990), señalando que las plantas protegidas tienen una apariencia similar al estrés nutricional. Se puede hipotetizar que el estrés depende de la deficiencia de macronutrientes, principalmente nitrógeno; esta deficiencia es probablemente debida a que la fracción zimogénica que se desarrolla más de lo usual, consumiendo más nitrógeno del suelo, por lo cual provoca deficiencia de nitrógeno, en lugar de digerir la celulosa presente en la composta.

3.5. Multiplicación masiva de *Fusarium roseum*

Se emplearon diversas metodologías para la multiplicación masiva del inóculo de *Fusarium roseum*, las técnicas con las que mejores resultados se obtuvieron fueron las propuestas por Pera y Calvet 1987; y la de propagación en granos de maíz esterilizados.

3.6. Identificación del agente biocontrolador.

Las 16 cepas bacterianas aisladas que mostraron cierto nivel de antibiosis fueron bioensayadas para seleccionar la(s) mejor(es). La gran mayoría fue poco eficiente en el control *in vitro* de *Fusarium roseum*; es decir, el hongo desarrolló en la placa Petri más de 85% de la superficie total; motivo por el cual fueron excluidas del experimento. Por su

parte, la cepa No. 13 resultó sumamente agresiva pues, al hacer el cálculo del área de un casquete circular: $A = (\pi \cdot r^2 \cdot n)/360 - (c(r-h))/2$,

donde: $\pi = 3.1415$

r = Radio

n = Número de grados

c = Cuerda

h = Altura

tenemos que *F. roseum* tuvo un desarrollo medio de 17.12% de la superficie de la placa, esto es igual a 10.41 cm de un total de 60.82 cm (Figura 8).

La cepa número 13 fue identificada como *Bacillus subtilis* (Figura 9).

Michael y Nelson (1970), en una de las primeras referencias, hacen alusión al control biológico de *F. roseum* "*culmorum*" por medio de una bacteria que aislaron del suelo. Núñez (1978) señala la eficiencia de *Bacillus subtilis* para controlar a *Fusarium roseum*. Además, cita el efecto antagónico de ciertas cepas de *Streptomyces* y *Trichoderma lignorum* contra el mismo hongo. Según estudios efectuados por Filippi *et al.* (1984, 1985, 1987 y 1989) en Italia, han demostrado la efectividad de *Bacillus subtilis* en el control de *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*.

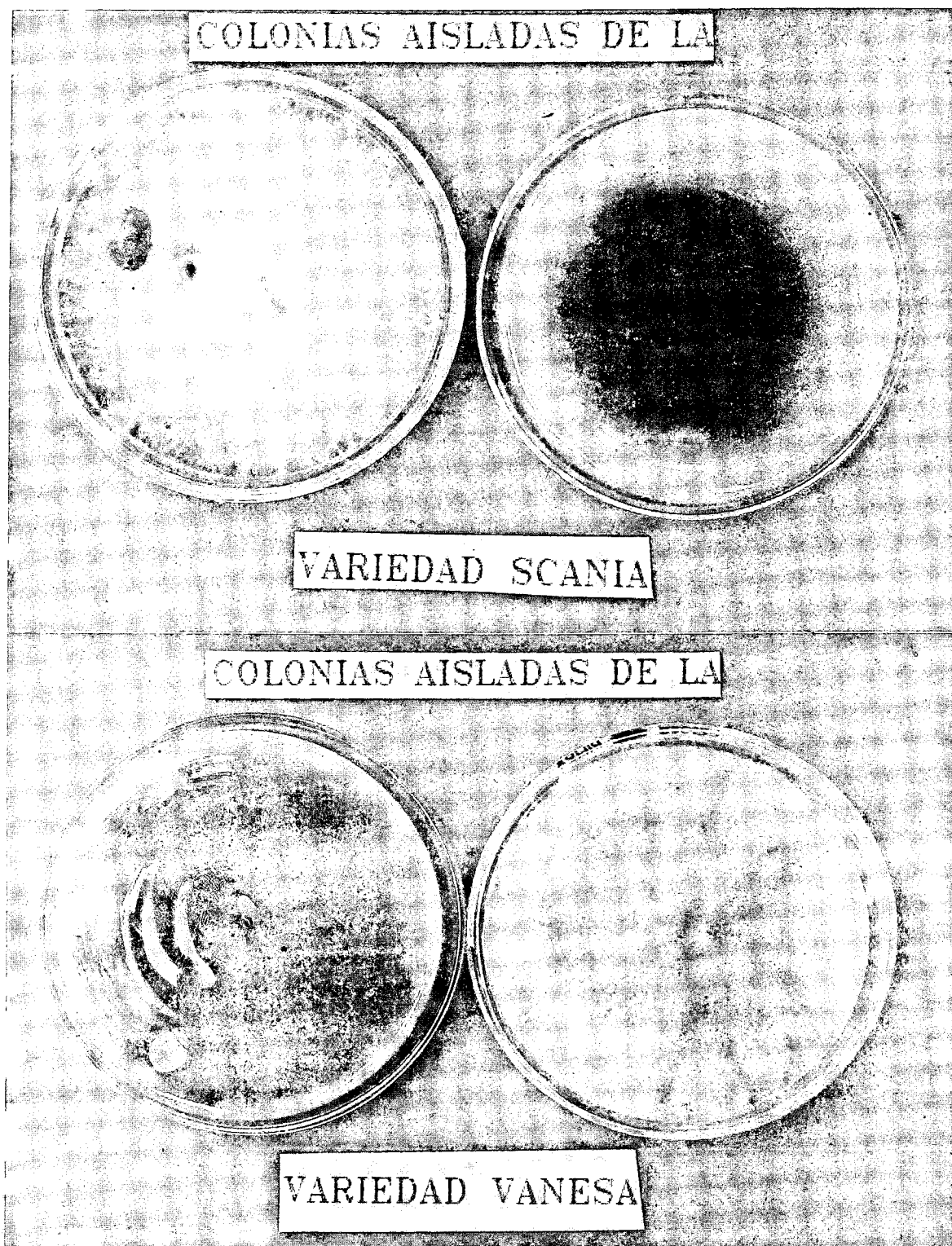
3.7. Termoestabilidad del metabolito bacteriano

Se estableció evaluando la capacidad de crecimiento de *F. roseum*. Los resultados señalan que el hongo sembrado en agar nutritivo conteniendo el metabolito solo, logró tener un desarrollo medio de 16.20% del área total de la placa; esto es igual a 9.85 cm de un total de 60.82 cm. La clara inhibición del crecimiento del hongo es un indicador de la termoestabilidad del metabolito bacteriano. El nivel de control se puede calificar como

bueno. Si pensamos en implementar una estrategia de manejo integrado de la enfermedad, la incorporación de este metabolito resultaría de gran utilidad en la solución del problema.



Figuras 3 (arriba) y 4 (abajo). Aspecto de las colonias aisladas de las variedades de clavel Flamingo y White Sim.



Figuras 5 (arriba) y 6 (abajo). Aspecto de las colonias aisladas de las variedades de clavel Scania y Vanesa.

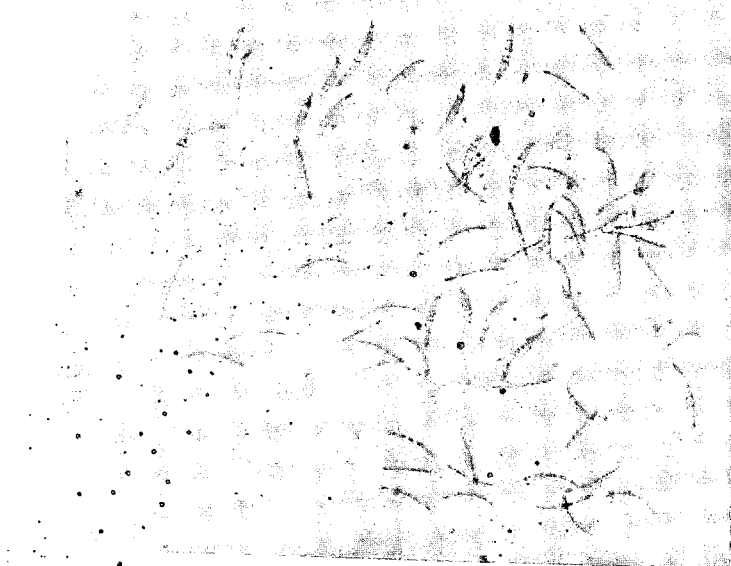
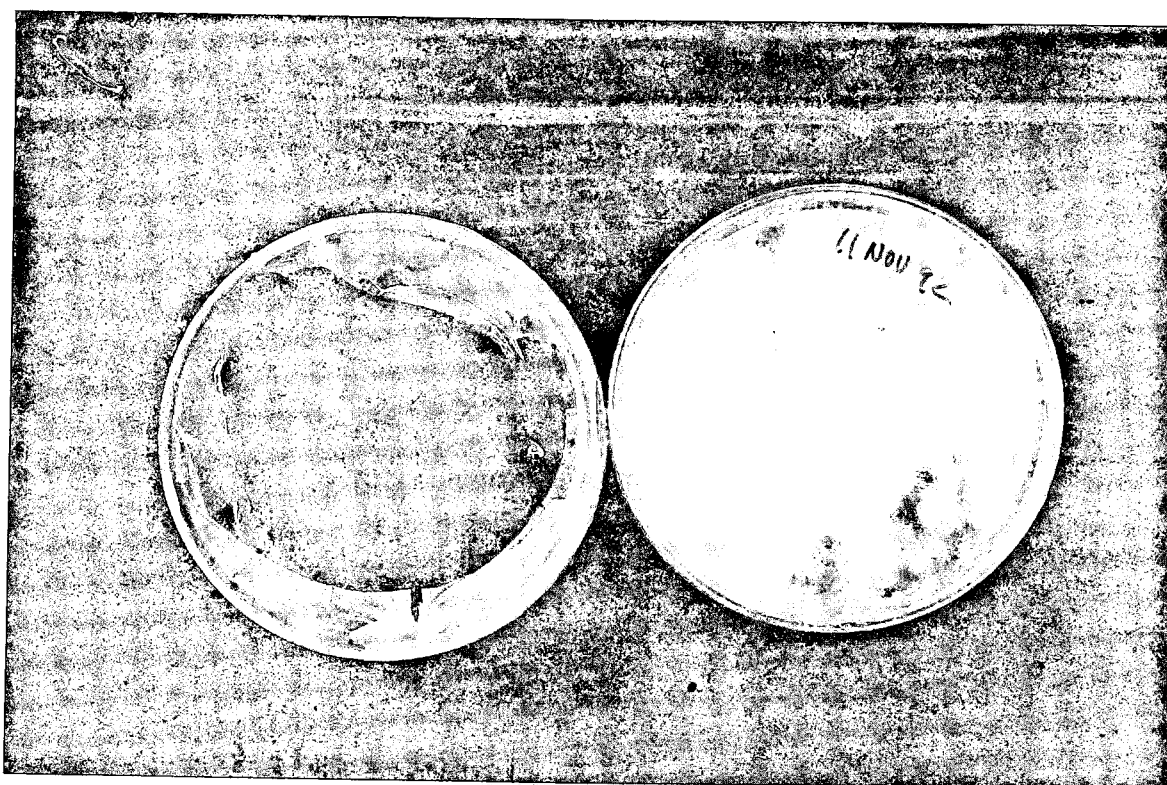


Figura 7. Colonia reaislada de las variedades White Sim y Scania. (arriba), en la parte de abajo se observa las macroconidios correspondientes a *Fusarium roseum* agente casual de la "dormilona del clavel".

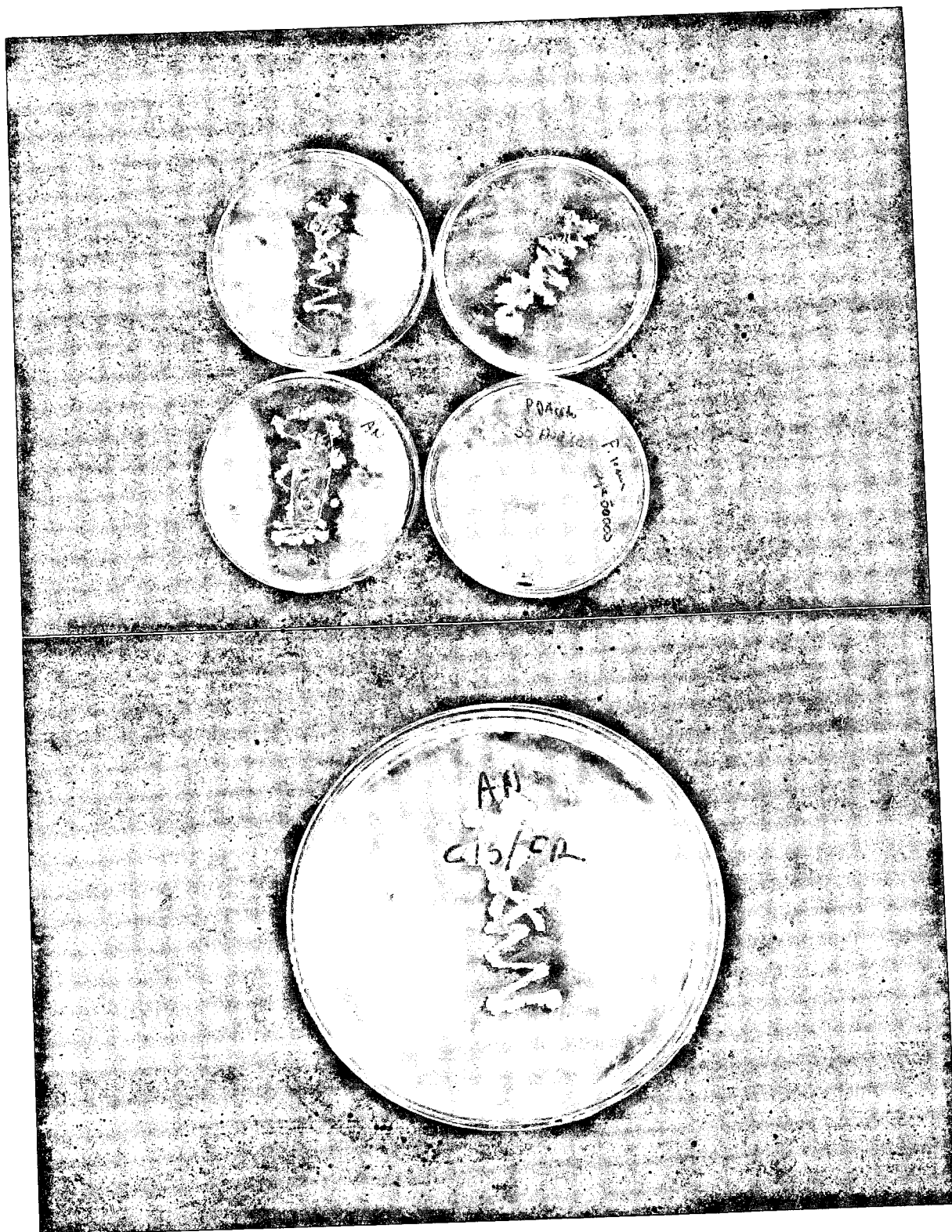


Figura 8. Panorámica del bionsayo efectuado con *Bacillus subtilis* cepa No. 13 y *Fusarium roseum* Snyder y Hansen. Nótese que el hongo detiene su crecimiento debido a la acción de ciertas sustancias excretadas por la bacteria.



Figura 9. Crecimiento de la cepa bacteriana No. 13 Correspondiente al género *Bacillus* sp. y su aspecto de la suspensión bacteriana (derecha).

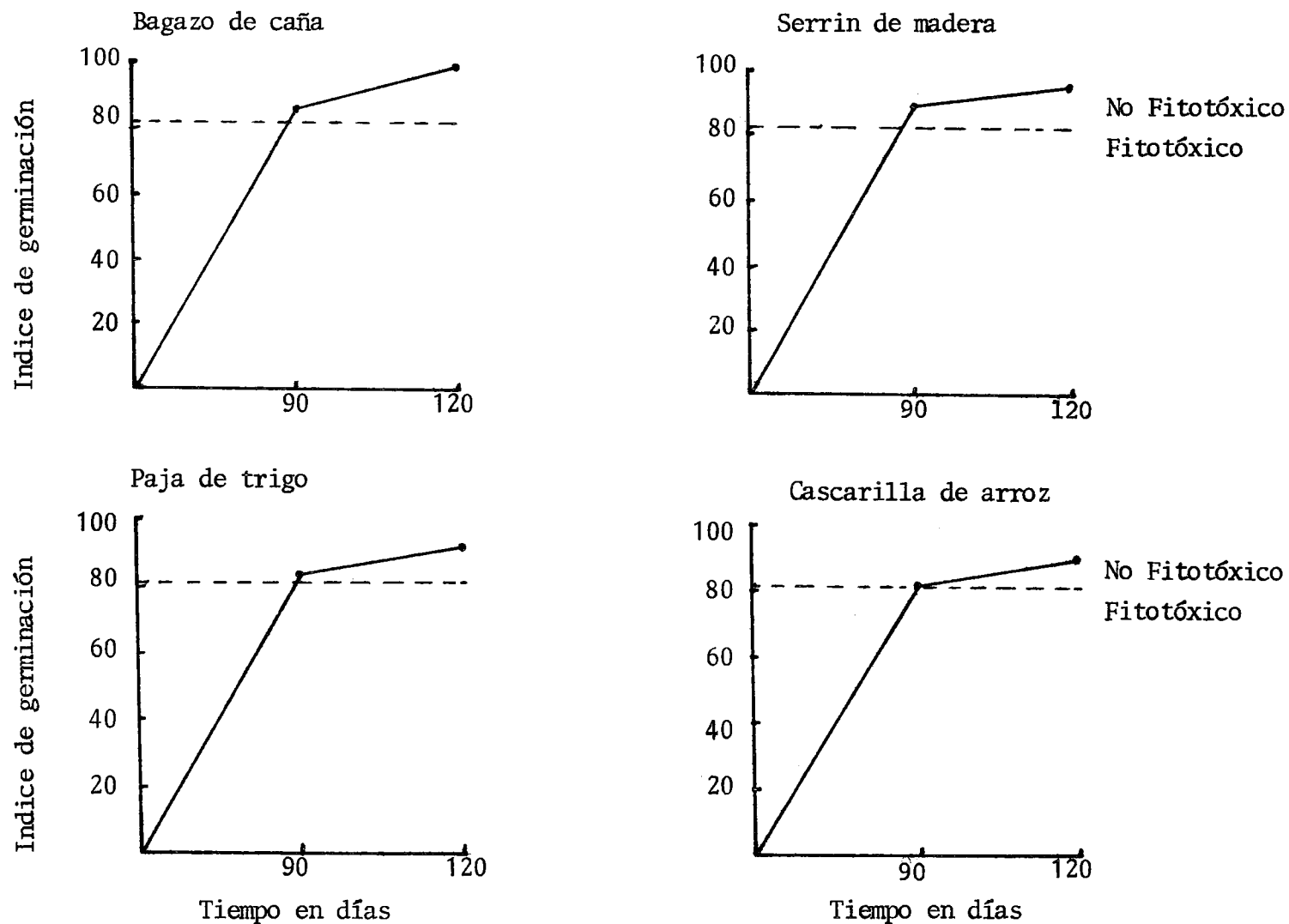


Figura 10. Evaluación del índice de germinación el *Lepidium sativum* con los diferentes extractos acuosos estudiados. Por encima de la línea punteada (82%) se considera como no fitotóxico (Pera y Filippi, 1987).

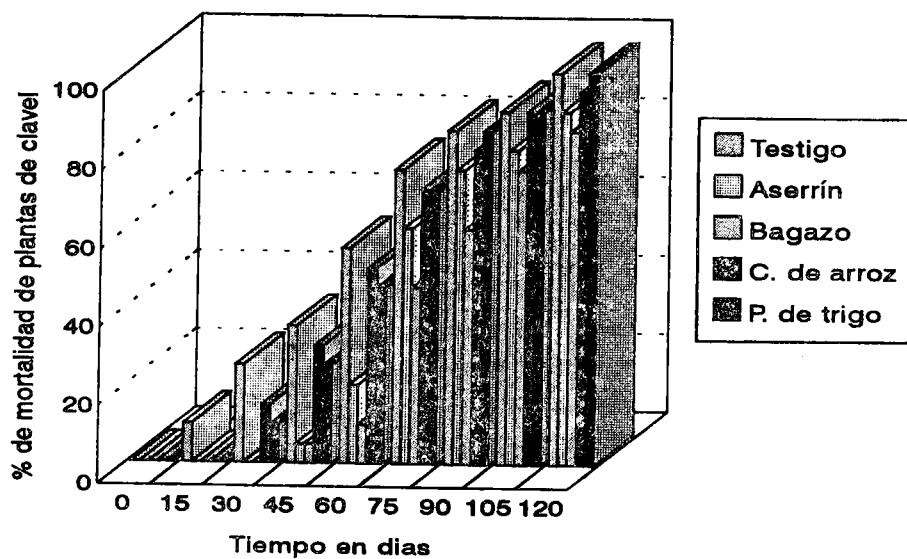


Figura 11. Efecto supresivo de las compostas con 90 días de madurez sobre *Fusarium roseum*.

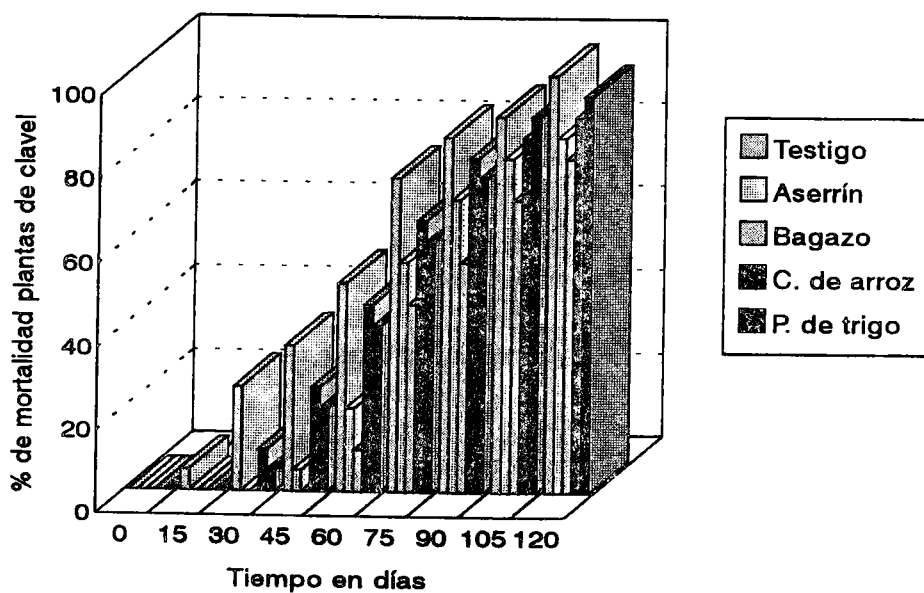


Figura 12. Efecto supresivo de las compostas con 120 días de madurez sobre *Fusarium roseum*.

4. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

- 1. El principal patógeno de la "dormilona del clavel" es *Fusarium roseum* (Lk.) Snyder y Hansen.**
- 2. Las pruebas *in vitro* señalan a *Bacillus subtilis* como un excelente organismo para controlar biológicamente a *Fusarium roseum*.**
- 3. Las compostas a base de bagazo de caña y aserrín de madera, con 90 y 120 días de madurez, no mostraron fitotoxicidad *in vitro*.**
- 4. Bajo condiciones de invernadero el bagazo de caña y el aserrín de madera protegieron al clavel contra *Fusarium roseum* durante los primeros 60 días posteriores al trasplante.**
- 5. Las compostas a base de bagazo de caña y aserrín de madera necesitan de 90 a 120 días de madurez para controlar *Fusarium roseum* a nivel de invernadero.**
- 6. Las compostas de paja de trigo y cascarilla de arroz no controlaron a *Fusarium roseum*.**
- 7. Las pruebas de fitotoxicidad *in vitro* de las cuatro compostas y la detección de sustancias inhibitorias a *Fusarium roseum* resultaron negativas.**

5. LITERATURA CITADA

- ADAMS, P. B. 1989. Comparison of antagonists of *Sclerotia* species. *Phytopathology* 79: 1345-1347.
- ALDRICH, J., and R., BAKER. 1970. Biological control of *Fusarium roseum f.sp.dianthi*; by *Bacillus subtilis*. *Plant Dis.* 54:446-448.
- APODACA S., M. 1990. Efecto de la rotación de cultivo e incorporación residuos sobre la pudrición de la corona del tomate causada por *Fusarium oxysporum f. sp. radicylucopersici*. Tesis de Maestría en Ciencias, CEFIT, Colegio de Postgraduados. Montecillos, Méx. 80pp.
- BAKER, R. 1980. Measures to control *Fusarium* and *Phialophora* wilt pathogens of carnations. *Plant Dis.* 64: 743-749.
- CALVET, C., M. PAGES, and V. ESTAUN. 1985. Composting of olive marc. *Acta Horticulturae* 172:255-261.
- CHEF, D. G., H. A. J. HOITINK, and L. V. MADDEN. 1983. Effects of organic components in container media on suppression of *Fusarium* wilt of chrysanthemum and flax. *Phytopathology* 73: 279-281.
- CHET, I. 1987. *Trichoderma*-application, mode of action and potential as biocontrol agent of soilborne plant pathogens Pág. 137-160.
- CHUNG, Y. R. and H. A. J. HOITINK. 1990. Interactions between thermophylic fungi and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia* damping-off in a bark compost-amended container medium. *Phytopathology* 80:73.77.
- COOB, G., and G. J. KEEVER. 1984. Effect of supplemental N on plant growth in fresh and aged pine bark. *Hort Science* 19: 127-129.
- COOK, R. J., and K. F. BAKER. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Soc. St. Paul, Minnessota. 539 pp.

- COUTEAUDIER, Y., and C. ALABOUVETTE. 1981. *Fusarium* wilt diseases in soilless cultures. *Acta Horticulturae* 126:153-158.
- DHINGRA, D. O., and B. J. SINCLAIR. 1985. Basic plant pathology methods. CRS Press. Boca Raton, Florida. 353 pp.
- ELAD, Y. 1985. Mechanisms of interaction between rhizosphere microorganisms and soilborne plant pathogens. Pág. 49-59. In: JENSEN, V., A. KJOLLER, and L. H. SORENSEN (ed.), Microbial communities in soil. Elsevier Applied Science Publishers.
- ELAD, Y., I. CHET, P. BOYLE, and Y. HENIS. 1983. Parasitisms of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfii* scanning electron microscopy. *Phytopathology* 73:85-88.
- ENGLISH, S. W. 1974. Producción comercial de claveles. Manual de Técnicas Agropecuarias. Ed. Acriba. 176-177.
- ESPINOZA M., A. 1973. Estudios preliminares sobre la marchitez y la pudrición del tallo del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) en Villa Guerrero, Méx. Tesis de M. en C. Especialista en Fitopatología, Colegio de Postgraduados Escuela Nal. de Agricultura. 71 pp.
- ESTAUN, V., C. CALVET, and J. M. GRASES. 1985. Chemical determination of fatty acids, organic acids and phenols, during olive marc composting process. *Acta Horticulturae* 172: 263-269.
- FILIPPI, C., G. BAGNOLI, C. TREGGI, and G. PICCI. 1984. Antagonistic effects of soil bacteria on *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *dianthi* (Prill. and Del.) Snyd. and Hans. *Plant and Soil* 80: 119-125.
- FILIPPI, C., G. BAGNOLI, and G. PICCI. 1985. Effetto antagonista di batteri terricoli su *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *dianthi* (Prill e Del.) Snyd. e Hans. II- Effetto antimicotico ad ampio spettro di un batterio del terreno nei riguardi di specie fitopatogene, opprtunistiche e saprofite. Estratto da: L'Agricoltura Italiana- 1985-

1/2. Pacini Editore - Pisa : 27-40.

FILIPPI, C., G. BAGNOLI, M. VOLTERRANI, and G. PICCI. 1987. Antagonistic effects of soil bacteria on *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *dianthi* (Prill and Del.) Snyd. and Hans. Plant and Soil 98: 161-167.

FILIPPI, C., G. BAGNOLI, and G. PICCI. 1989. Antagonistic effects of soil bacteria on *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *dianthi* (Prill and Del.) Snyd. and Hans. IV- Studies on controlled *Solanum lycopersicum* L. and *Dianthus caryophyllus* L. rhizosphere. Agr. Med. 119: 327-336.

FILIPPI, C., G. BAGNOLI, and B. CITTERIO. 1990. Protective effect of soil microbial response due to organic substance addition in radical phytopathies. Zentralbl. Microbiol. 145: 539-598.

FILIPPI, C., and A. PERA. 1990. Effect of soil temperature on infective capacity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in presence of poplar bark compost. Zentralbl. Mikrobiol. 145: 23-29.

FOSBERG, J. L. 1963. Diseases of ornamental plants. University of Illinois. College of Agriculture. Special Publication No. 3.

GARIBALDI, A., F. BRUNATTI, and M. L. GULLINO. 1989. Evaluation of several antagonists and different methods of application against *Fusarium* wilt of carnation. Bulletin OEPP 17 (4): 625-629.

GEES, R., and COFFEY, M. D. 1989. Evaluation of strains of *Myrothecium roridum* as a potential biocontrol agent against *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 79:1079-1084.

GUDA, C. D. 1989. Trials on the biological control of vascular wilt of carnations. Annali Dell' Istituto Sperimentale per la Floricoltura 17 (1):3-12..

GULLINO, M. L., G. LENTO, and A. GARIBALDI. 1986. Sensitivity to benomyl of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* isolated in Italia over 17 years. Revista della Ortoflorofrutticoltura Italiana 70:139-144.

- HENKEL, R. P. 1989. Estudio de mercado en los Estados Unidos de América para la exportación de flores mexicanas. Memorias del Primer Congreso Nal. sobre Floricultura en Méx., UAEM. Toluca. 36-54.
- HOITINK, H. A. J. 1980. Composted bark, a lightweight growth medium with fungicidal properties. Plant Dis. 64:142-147.
- HOITING, H. A. J., and G. A. KUTER. 1985. Effect of compost in container media on disease caused by soil borne plant pathogens. Acta Horticulturae 172: 191-198.
- HOWELL, C. R., and R. D. STIPANOVIC. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. Phytopathology 69:480-482.
- HOWELL, C. R., and R. D. STIPANOVIC. 1980. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. Phytopathology 70: 712-715.
- KEMPF, H. J., and G. WOLF. 1989. *Erwinia herbicola* as a biocontrol agent of *Fusarium culmorum* and *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* on wheat. Phytopathology 79:990-994.
- KO, W. 1982. Biological control of *Phytophthora* root rot of papaya with virgin soils. Plant Dis. 66: 446-448.
- KOTHS, J. S., and H. B. GUNNER. 1967. Establishment of rhizosphere microflora on carnation as a mean of plant protection in steamed greenhouse soils. Amer. Soc. Hort. Sci. 64:617-626.
- KUTER, G. A., E. B. NELSON, H. A. HOITINK, and L. V. MADDEN. 1983. Fungal populations in container media emended with composted hardwood bark suppressive and conductive to *Rhizoctonia* damping-off. Phytopathology 73:1450-1456.
- KWOK, O. C., P. C. FAHY, H. A. J. HOITINK, and G. A. KUTER. 1987. Interactions between bacteria and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia*

- solani* damping-off in bark compost. *Phytopathology* 77:206-212.
- LOUVET, J. 1981. The relationships between substrates and plant disease. *Acta Horticulturae* 126:147-152.
- MAROIS, J. J., S. A. JOHNSTON, M. T. DUMM, and G. C. PAPAVIZAS. 1982. Biological control of *Verticillium* wilt of eggplant in the field. *Plant Disease* 66:1166-1168.
- MARSHALL, D. S. 1982. Effect of *Trichoderma harzianum* seed treatment and *Rhizoctonia solani* inoculum concentration on damping-off of snap bean in acid soils. *Plant Disease* 66: 788-789.
- MICHAEL, A. H., and P. E. NELSON. 1972. Antagonistic effect of soil bacteria on *Fusarium roseum "culmorum"* from carnations. *Phytopathology* 62: 1052-1056.
- MURGUIA G., J. 1992. Efecto del nitrógeno sobre la "dormilona" (*Fusarium spp.*) del clavel (*Dianthus cariophyllus* L.). Tesis de M. en C. Centro de Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. 63 pp.
- NELSON, E. B., and H. A. J. HOITINK. 1983. The role of microorganisms in the suppression of *Rhizoctonia solani* in container media amended with composted hardwood bark. *Phytopathology* 73:274-278.
- NUÑEZ C., R. D., y S. ROMERO C. 1980. Estudio sobre el control biológico de *Fusarium roseum* (Lk.) Snyder & Hans el causante principal de la "dormilona del clavel" en Villa Guerrero, Edo. de Méx. *Agrociencia* 39: 25-33.
- OLIVAS E., E. 1970. Estudio sobre el control biológico de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. Tesis de M. en C. Colegio de Postgraduados, Escuela Nal. de Agricultura. Chapingo, Méx. 51 pp.
- ORDENTHICH, A., Y. ALAD, and I. CHEF. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biological control of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 78: 84-88.
- ORTEGA S., E. 1992. Clavel distribución e importancia de las ornamentales en México. Memorias del II Curso de Acreditación Técnica en el Manejo y Certificación

Fitosanitaria de Ornamentales. Universidad Autónoma de Chapingo. Metepec, Edo. de Méx. 5-11.

PAGES, M., V. ESTAUN, and C. CALVET. 1985. Physical and chemical of olive marc compost. Acta Horticulturae 172: 271-276.

PAPAVIZAS, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. Ann. Rev. Phytopathol. 23:23-54.

PEER, R., T., H. XU, B. RATTINK, and B. SCHIPPERS. 1989. Biological control of carnations wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in hydroponic systems. In. Proceedings International Congress on Soilless Culture. International Soc. for Soilless Culture. 361-373. Wageningen, Netherlands.

PERA, J., and C. CALVET. 1989. Suppression of *Fusarium* wilt of carnation in a composted pine bark and composted olive pumice. Plant Dis. 73: 699-700.

PERA, J., C. CALVET, and A. CAMPRUBI. 1986. Succession of microbial populations during olive marc composting. Acta Horticulturae 178:271-277.

PERA, A., and C. FILIPPI. 1987. Controlling of *Fusarium* wilt in carnations with bark compost. Biological Wastes 22:219-228.

RAMIREZ-VILLAPUDUA, J. 1985. Identification of a new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Wr.) Snyder & Hans. from cabbage and its control by means of solarization of soil amended with cabbage residues. Tesis de Ph. D. University of California Riverside. 125 pp.

ROMERO C., S. 1988. Hongos fitopatógenos. Dirección del Patronato Universitario, A. C. Universidad Autónoma de Chapingo. p.347.

ROMERO C., S. 1992. Enfermedades del clavel. Memorias del II Curso de Acreditación Técnica en el Manejo y Certificación Fitosanitaria de Ornamentales. Universidad Autónoma de Chapingo. Metepec, Edo. de Méx. p. 12-22.

SNEH, B., M. DUPLER, Y. ALAD, and R. BARKER. 1984. Chlamidospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic

- bacteria from *Fusarium*-suppressive soil. *Phytopathology* 74:1115-1124.
- SIVAN, A., Y. ALAD, and I. CHET. 1984. Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. *Pytopathology* 74: 498-501.
- SIVAN, A., and I. CHET. 1985. *Trichoderma harzianum*: an effective biocontrol agent of *Fusarium spp.* Pág. 89-95. In.: JENSEN, V., A. KJOLLER, and L. H. SORENSEN (ed), microbial communities in soil. Elsevir Science Publishers.
- SIVAN, A., and I. CHET. 1989. The possible role between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology* 79:198-203.
- SPENCER, S., and D. M. BENSON. 1982. Pine bark, hardwood bark compost and peat amendment effects on development of *Phytophthora spp.* and lupine root rot. *Phytopathology* 72:346- 351.
- VAN ASSCHE, C., and P. UYTTEROECK. 1981. The influence of domestic waste on plant disease. *Acta Horticulturae* 126:169-178.
- WEINDLING, R. 1934. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology* 24:1153-1179.
- WILSON, E. C. S. 1981. Bark compost for pot chrysanthemums. *Acta Horticulturae* 126:95-118.
- ZUCCONI, F., A. PERA, M. FORTE, and M. DE BERTOLDI. 1981a. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* 22:52-57.
- ZUCCONI, F., M. FORTE, A. MANOCO, and M. DE BERTOLDI. 1981b. Biological evaluation of compost maturity. *Biocycle* 22: 27-29.

APENDICES

APENDICE 1

Medio Waksman agar

Ingredientes:

Bacto caseitone (Difco)	5 g
Glucosa	10 g
Extracto de carne	3 g
Bacto agar (Difco)	20 g
Agua destilada	1 l

Preparación: Disolver por separado el bactoagar en 500 ml de agua y los ingredientes restantes en el orden citado en otros 500 ml de agua destilada, posteriormente son mezclados perfectamente y sometidos a esterilización durante 15 minutos a 120 lb

APENDICE 2

Medio Papa dextrosa agar (PDA)

Ingredientes:

Papas peladas y rebanadas	200 g
Dextrosa	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 l

Forma de preparar: Los trozos de papa son hervidos por una hora en 500 ml de agua destilada y el extracto es tamizado en tela de cielo. Por separado se disuelve el agar y la dextrosa en 500 ml de agua destilada. Se juntan todas las sustancias, se afora a un litro con agua destilada y se esteriliza a 120 lb durante 15 minutos. Se vacía en cajas de Petri y se deja solidificar.

APENDICE 3

Agar nutritivo (AN)

Ingredientes:

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 l

Preparación: Después de disolver los ingredientes en el agua destilada, se esteriliza a 120 lb durante 15 minutos. El medio esterilizado se dispensa en cajas de Petri y se deja solidificar.

APENDICE 4

Medio Czapek

Ingredientes:

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	1.3 g
Na NO_3	3.0 g
$\text{K}_2 \text{HSO}_4$	1.0 g
Mg SO_4	0.5 g
Na Cl	0.5 g
Fe SO_4	0.01g
Sucrosa	30.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1.0 l

Forma de preparar: Disolver el agar en 500 ml de agua destilada, enseguida se disuelven cada uno de los ingredientes restantes se afora a un litro con agua destilada y se esteriliza a 120 lb durante 15 minutos. El medio esterilizado se vacia en cajas de Petri y se deja enfriar.

APENDICE 5

Medio peptona dextrosa ácido

Ingredientes:

Glucosa	10 g
Peptona	5 g
$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	1 g
Mg $\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
Agar	15 g
Agua	1 l

Forma de preparar: Una vez hecha la solución, se separa en fracciones de 100 ml y se esteriliza a 120 lb durante 15 minutos, se deja enfriar y se ajusta el pH a 3.8 agregando aséticamente una solución 0.1 N de $\text{H}_2 \text{SO}_4$.



IMPRENTA SAGITARIO
PLAZA TEK "S"
ALLENDE 116 LOCAL 6
TEL. 4-97-79
TEXCOCO MEX.