

# Efecto del momento de inoculación sobre la supervivencia de las esporas de *Gliocladium roseum* sobre las hojas de geranio

Cecilia Mónaco<sup>1</sup>, Hai Yu<sup>2</sup> y John Sutton<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Laboratorio de Fitopatología, Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Argentina y <sup>2</sup>Department of Environmental Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canadá

## Summary

*Gliocladium roseum* es un exitoso antagonista de *Botrytis cinerea* y se considera que tiene el mayor potencial para el biocontrol del patógeno en sistemas de cultivo. A fin de establecer el momento del día óptimo para la aplicación del agente de biocontrol, se inocularon plantas de geranio con una suspensión de  $10^7$  conidios de *G. roseum* por ml de agua destilada + Tritón 100X hasta chorreo. Los momentos de inoculación fueron las 9, 12, 15 y 18 h. En todos los casos se estimaron las ufc por cm<sup>2</sup> de hoja al momento de la inoculación (tiempo 0) y a las 3, 6 y 9 h desde ese momento, con el objeto de estimar el porcentaje de infección sobre las hojas. Luego, las plantas inoculadas se mantuvieron a un 100% de humedad relativa durante 24 h, se extrajeron discos de 8 mm y se colocaron en medio paraquat. El porcentaje del área del disco de la hoja con conidióforos de *G. roseum* se estimó utilizando una escala confeccionada para tal fin. De acuerdo con los resultados obtenidos la longitud del período de sequía después del momento 0 de inoculación, provoca una disminución significativa en el número de ufc por cm<sup>2</sup> de hoja, no observándose diferencias entre 3, 6 y 9 h desde la inoculación.

## Key words

*Gliocladium roseum*, Supervivencia de esporas, Geranio

## Effect of inoculation time on the survival of spores of *Gliocladium roseum* on geranium leaves

## Resumen

*Gliocladium roseum* is a successful antagonist of *Botrytis cinerea* and is considered to have the major potential for biocontrol of the pathogen in cropping systems. In order to elucidate the optimal moment of the day to apply the biological control agent, geranium plants were inoculated until run off with a suspension containing  $10^7$  conidia of *G. roseum* + Tritón 100X. The inoculation times were 9 am, 12 am, 3 pm and 6 pm. The number cfu per cm<sup>2</sup> of leaves at inoculation time (time 0) and at 3, 6 y 9 h after inoculation were estimated. Then, the inoculated plants were kept in a Plexiglas, humidity chamber for 24 h. Discs of 8 mm in diameter were cut off from the inoculated leaves and put then into a paraquat medium to examine the development of *G. roseum*. According to the results dry period length after inoculation time, shows a significant decrease in number of c.f.u. by cm<sup>2</sup> of leaf. No difference was observed between 3, 6 y 9 h. after inoculation time.

## Palabras clave

*Gliocladium roseum*, Spore survival, Geranium

### Dirección para correspondencia:

Dra. Cecilia Mónaco  
Laboratorio de Fitopatología,  
Fac. de Cs. Agrarias y Forestales, (U.N.L.P),  
Calle 60 y 119. CC 31, (1.900) La Plata, Argentina  
Fax: +54-221-4252346; E-mail: cmonaco@cadema.com.ar

Aceptado para publicación el 3 de marzo de 1999

*Gliocladium roseum* Bainier es un exitoso antagonista de *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. en mas de 15 hospedantes de importancia económica y se considera que tiene el mayor potencial para el biocontrol del patógeno en sistemas de cultivo [1]

Este antagonista es capaz de controlar a *B. cinerea* en hojas, tallos, flores y frutos de numerosas plantas bajo diferentes condiciones de cultivo. La adaptabilidad de *G. roseum* como agente de control biológico contra *B. cinerea* podría estar relacionada a la fuerte adaptación ecológica del antagonista a la planta huésped y a la gran variedad de modos de antagonismo del hongo hacia el patógeno [1,2]

Conocer la relación de *G. roseum* con el huésped y las interacciones entre el antagonista y *B. cinerea* en el tejido del hospedante y la capacidad del antagonista para crecer y sobrevivir, es fundamental para desarrollar estrategias racionales para el biocontrol del patógeno [2].

Por estas razones el objetivo del presente trabajo fue observar el efecto que produce sobre la supervivencia de las esporas de *G. roseum* el momento del día en que se aplica el agente de biocontrol.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se trasplantaron plantines de geranio en macetas de 25 cm de diámetro que contenían suelo artificial (Promix Plant products Co Ltd Canadá) en un invernáculo experimental. Las plantas fueron mantenidas en invernáculo, con un tomador de datos ("data logger" Campbell Cr-21), y con sensores apropiados se midió continuamente la temperatura del aire, la humedad relativa y la radiación recibida por las plantas (irradiancia).

Las plantas de geranio se inocularon con  $10^7$  conidios de *G. roseum*/ml de agua destilada estéril + Tritón 100X. Las plantas se mantuvieron en invernáculo y se colocaron de acuerdo a un diseño experimental completamente aleatorio.

Los momentos de inoculación fueron los siguientes: 9; 12; 15; y 18 h. En todos los casos se estimó el número ufc por  $\text{cm}^2$  de hoja al momento de la inoculación y a las 18 h, a fin de estimar la presencia de *G. roseum* después de 3, 6 y 9 h de la inoculación en planta (período de sequía).

El número de ufc se calculó de la siguiente manera: se colocó una hoja por planta en 100 ml de agua destilada estéril + Tritón X100 en recipientes erlenmeyer de 250 ml, los mismos se colocaron en un rotador magnético a 110 rpm durante 1h. Se realizaron diluciones a partir de la solución inicial y se sembraron 0,3 ml de la última dilución en placas de Petri que contenían 9 ml de APG + Tritón X100 (0.2%) + estreptomycin (100 ppm) (APGTS).

Se realizaron cuatro repeticiones de cada tratamiento y dos lecturas de cada repetición. A las 18 h se inocularon cuatro plantas con agua destilada estéril + Tritón X100 (tratamiento testigo), manteniéndolas en las mismas condiciones de humedad y temperatura.

Las placas de Petri se mantuvieron a temperatura ambiente durante cinco días. Al cabo de ese tiempo se contó el número de ufc por  $\text{cm}^2$  de hoja de cada tratamiento.

A fin de estimar el porcentaje de "infección" (esto indica la presencia de *G. roseum* dentro de la hoja = esporulación) sobre las hojas, todas las plantas inoculadas fueron mantenidas durante 24 h en una cámara húmeda Plexiglas, (modelo 207 Campbell Scientific Inc.) situada dentro de una cámara de cría que opera con 14 h de fotoperiodo con una densidad lumínica de  $175 \text{ mE/m}^2/\text{s}$ , dentro de la cámara la temperatura del aire fue de  $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$ .

Pasado ese lapso, se extrajeron de cada planta en el laboratorio discos de 1 cm de diámetro con sacabocado, se desinfectaron superficialmente con alcohol 70% e hipoclorito de sodio al 1%, se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril. Los discos se colocaron en placas de Petri que contenían 9 ml de medio de cultivo con Paraquat + cloranfenicol (para provocar la senescencia de la hoja y así favorecer la esporulación de *G. roseum*) [3]. Las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 7 días. Luego se estimó el porcentaje de área del disco de hoja con conidióforos de *G. roseum*, para ello se utilizó la siguiente escala (Sutton, comunicación personal): 0, 1-10, 11-20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90 y 91-100.

En las mismas plantas mantenidas en invernáculo se determinó el porcentaje del área de la hoja colonizada naturalmente por *B. cinerea* (siguiendo la escala utilizada para *G. roseum*). El ensayo se repitió una vez. Los datos fueron analizados estadísticamente por análisis de la varianza y las medias se compararon con el test LSD ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de germinación de los conidios de *G. roseum* mantenidos a  $5^\circ\text{C}$  fue de 82%, por lo que se tuvo en cuenta al preparar las diluciones. De acuerdo a los resultados obtenidos la longitud del período de sequía después de la inoculación provoca una disminución significativa en el número de ufc/ $\text{cm}^2$  de hoja, esto podría deberse a una pérdida de la viabilidad de los mismos ó a una mayor adherencia de los conidios de *G. roseum* en las hojas de geranio (Figuras 1 y 2). Young y Kaus [3] y Hammer *et al.* [4] demostraron que la adhesión fúngica es un proceso metabólicamente activo que ocurre durante las primeras horas de la inoculación. Estos autores evaluaron el reaslamiento desde la superficie después de 6 h desde la inoculación y sugirieron la secreción ó síntesis de un material específico adhesivo.

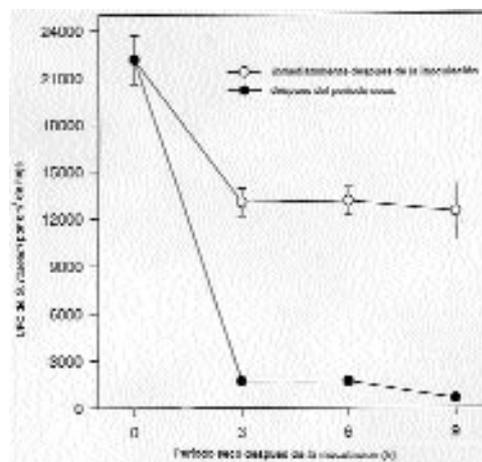


Figura 1. Unidades formadoras de colonia de *Gliocladium roseum* por  $\text{cm}^2$  de hoja de geranio, inmediatamente después de la inoculación y después de 3, 6 y 9 h de sequía. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente según test LSD ( $p < 0,05$ )

No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en el porcentaje de colonización de *B. cinerea*, pero si entre estos y el testigo. Si bien la capacidad de *G. roseum* para colonizar las hojas de geranio, mostró una disminución a medida que es mayor el período

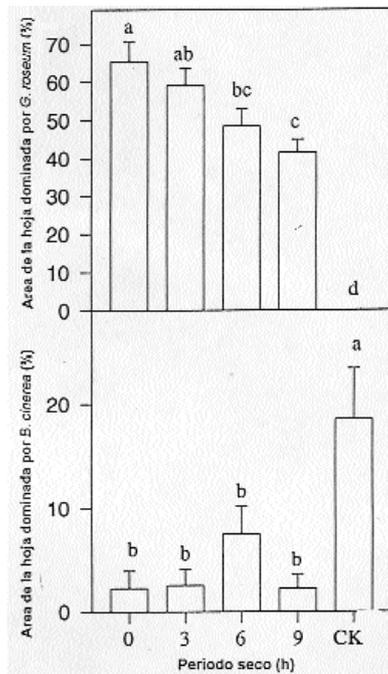


Figura 2. Area de la hoja de geranio dominada por *G. roseum* y *B. cinerea* (en porcentaje), luego del período de sequía (3, 6 y 9 h). CK: testigo inoculado con agua destilada. Columnas seguidas por la misma letra no difieren significativamente de acuerdo al test LSD ( $p < 0.05$ ).

de sequía desde el momento de la inoculación con el antagonista (Figura 2), es importante resaltar que aún después de 9 h de la inoculación con *G. roseum*, el porcentaje del área de la hoja colonizada por *B. cinerea* era tan bajo, como al momento de la inoculación. Esto estaría indicando que como *G. roseum* es capaz de colonizar los órganos de la planta sin producción de síntomas [2], la humedad sobre las hojas no juega un papel importante en su éxito como agente biocontrolador. De manera que nosotros consideramos que no habría un momento óptimo para la inoculación de *G. roseum*, sino que el agente podría aplicarse en cualquier momento ya que, como se mencionó anteriormente, *G. roseum* es capaz de penetrar y comportarse como un verdadero endofito.

De todos modos esto es el inicio del estudio ecológico de un agente de control biológico, es necesario realizar estudios futuros a fin de establecer las estrategias del control biológico de *B. cinerea* en geranio y otras plantas ornamentales.

## Bibliografía

- Sutton J, Li D, Peng G, Yu H, Zhang P, Valdebenito-Sanhueza R. *Gliocladium roseum* a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Dis* 1997; 81: 315-328.
- Peng G, Sutton J. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Can J Plant Pathol* 1991; 13: 247-257.
- Young D, Kaus E. Adhesion of *Colletotrichum lindemuthianum* spores to *Phaseolus vulgaris* hypocotyls and to polystyrene. *Appl Environ Microbiol* 1984; 47: 616-619.
- Hammer J, Howard R, Chummbly F, Valent B. A mechanism for surface attachment of a plant pathogenic fungus. *Science* 1987; 239: 288-290.
- Muller J, Sinclair J. Occurrence and role of *Gliocladium roseum* in field grown soybeans in Illinois. *Trans Br Mycol Soc* 1986; 86: 677-680.