

---

# CAPACIDAD ANTAGÓNICA *IN VITRO* DE *TRICHODERMA spp.* FRENTE A *COLLETOTRICHUM* *GLOEOSPORIOIDES* CAUSANTE DE LA ANTRACNOSIS EN CAFÉ (*COFFEA ARABICA L.*)

Gómez Robert, Sanabria Nelly, Pérez Helen.

Laboratorio de Micología. Cátedra de Fitopatología. Departamento de Botánica Agrícola. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela.

nellyhortensia@gmail.com

## Resumen

En la mayoría de las zonas productoras del mundo, la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* es una de las enfermedades más importantes en el cultivos de café (*Coffea arabica L.*). Ésta es combatida con agroquímicos poco específicos, pero la mayoría de los agricultores no cuentan con suficiente información del manejo adecuado de dichos productos químicos, lo cual ha motivado la búsqueda de otros métodos menos contaminantes para combatir los patógenos de plantas. El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad antagónica *in vitro* de seis aislamientos de *Trichoderma spp.* (LA1, LA2, 06146, 06141, Punta Larga y Tricobiol), para ello se realizaron pruebas de cultivos duales donde se enfrentaron con *Colletotrichum gloeosporioides*, luego de comprobar su patogenicidad. Para demostrar la capacidad antagónica de *Trichoderma spp.* con el patógeno, se realizó la prueba *in vitro*, haciendo mediciones diarias del crecimiento micelial del patógeno, para obtener el porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC), y finalmente a los siete días se determinó el número de conidios/cc para calcular el porcentaje de inhibición de esporulación (PIE). Se empleó un diseño completamente al azar con seis repeticiones por tratamiento. El aislamiento LA2 identificado como *Trichoderma harzianum*, fue el que mejor controló el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, con un PIC de 64.09%. Los aislamientos de *Trichoderma harzianum* que mejor controlaron la esporulación del patógeno fueron 06146 y LA2, con un PIE de 98.76% y 97.83 % respectivamente. El aislamiento de *Trichoderma harzianum* (LA2), se considera el mejor por ser nativo de la zona.

**Palabras clave:** *Trichoderma spp.*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Coffea arabica L.*, antracnosis en café, crecimiento micelial.

## Introducción

En la mayoría de las zonas productoras del mundo, la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* es una de las enfermedades más importantes en el cultivos de café (*Coffea arabica* L.). Ésta es combatida con agroquímicos poco específicos, pero la mayoría de los agricultores no cuentan con suficiente información del manejo adecuado de dichos productos químicos, lo cual ha motivado la búsqueda de otros métodos menos contaminantes, para combatir los patógenos de plantas (Guanipa, 2000). En los últimos años han aparecido nuevas alternativas de control de fitopatógenos, como es el uso de biocontroladores, de gran interés agronómico. Aunque ya en 1951 se había demostrado que podía limitarse el desarrollo de algunos patógenos mediante controladores biológicos, no fue sino hasta la década de los 70 que se logró desarrollar el control biológico de *Colletotrichum sp.* Desde los primeros estudios hasta la fecha, se ha establecido el efecto de *Trichoderma spp.* como antagonista de distintas cepas del hongo en diferentes cultivos (Abbott, 1997).

Por lo tanto, el objetivo general de esta investigación fue evaluar bajo condiciones *in vitro* la efectividad del hongo *Trichoderma spp.* para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* causante de la antracnosis del café (*Coffea arabica* L.).

## Materiales y Métodos

### Recolección de muestras

Se recolectaron muestras de suelo, de hojas y frutos de café con síntomas de antracnosis en la Estación Experimental

Jaime Henao Jaramillo (El Laurel) perteneciente a la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, ubicada en el municipio Cecilio Acosta, Distrito Guaicaipuro del estado Miranda. Las mismas fueron colocadas en bolsas de papel y llevadas para ser procesadas y evaluadas a la Clínica de Enfermedades de Plantas de la Sección de Fitopatología del Instituto de Botánica de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, estado Aragua.

### Procesamiento de las muestras

#### Aislamiento e identificación de *Colletotrichum gloeosporioides*

Se tomaron muestras de hojas en diversos estados de desarrollo con los síntomas de la enfermedad, se lavaron abundantemente con agua corriente, inmediatamente fueron tratados por 3 minutos con hipoclorito de sodio (NaClO) al 3%, se lavaron con agua destilada estéril y fueron secados con papel absorbente estéril. se seleccionaron trozos de tejido del margen de la lesión seguidamente se cortaron entre 3 y 5mm de diámetro, estos trozos se colocaron en forma equidistante en placas Petri conteniendo medio papa dextrosa agar (PDA), finalmente, se incubaron a temperatura de 28 a 30 °C durante 5 días hasta observar el desarrollo de las colonias. Luego las colonias se replicaron en tubos de ensayo con PDA en forma de cuña y una vez evidenciado el crecimiento del patógeno se conservaron en refrigeración a 8°C.

Para establecer la identidad del organismo patógeno, a partir de las placas almacenadas en refrigeración con medio de cultivo PDA en forma de cuña, se procedió a replicar en placas

con PDAA, una vez desarrolladas las colonias, se realizó preparados microscópicos para ser observados y hacer descripciones tales como color del micelio, forma y tamaño de los conidios en un microscopio de luz. Finalmente se comparó con lo descrito por Sutton (1992).

#### Aislamiento de los Antagonistas

#### Dilución en plato de Agar

Se preparó una solución madre con la muestra de suelo, es decir, se colocaron 100 g. de la muestra de suelo en 100 ml de agua destilada estéril (ADE) y se agitó fuertemente. A partir de esta solución madre se realizaron las posteriores diluciones. Las muestras de suelo previamente tamizadas se fraccionaron en submuestras de 10 g cada una. Cada submuestra fue colocada en un frasco de vidrio y se agitó fuertemente con 90 mL de agua destilada esterilizada (ADE). A partir de ésta solución madre, en una cámara de flujo laminar se realizaron diluciones seriadas, en la cual se tomó 1 mL con una pipeta esterilizada y se vertió en el interior de un tubo de ensayo que contenía 9 mL de ADE (dilución  $10^{-1}$ ). Este procedimiento se repitió hasta llegar a la dilución  $10^{-5}$ .

De la dilución ( $10^{-5}$ ), se tomó 1 ml, el cual se colocó en una caja de Petri; posteriormente se le añadieron 15 ml. de papa dextrosa agar acidificado (PDAA) licuado; se dejó solidificar y se colocó en una incubadora a 28 °C. Después de 4 días de incubación se procedió a purificar en platos Petri con PDAA y posteriormente fueron transferidas a tubos de ensayo con PDA para conservarlas, identificarlas y usarlas en las respectivas pruebas.

#### Identificación de *Trichoderma* spp

Para realizar las caracterizaciones se tomó en cuenta tanto las observaciones macroscópicas como las observaciones microscópicas. En la caracterización macroscópica se consideraron las características como color y forma de la colonia y relieve del micelio (ralo, denso o aéreo tupido) de las colonias. Para la caracterización microscópica se consideró la estructura del hongo: forma y tamaño de los conidios, conidióforos, fiáldes, y clamidosporas; a fin de identificar el antagonista con lo descrito en la literatura [Rifai, (1969); Bisset, (1991)].

#### Prueba de patogenicidad

#### Procedencia de las plantas

Para esta prueba se utilizaron seis (6) plantas sanas del cultivar Catuai rojo, provenientes de la Estación Experimental El Laurel, las cuales fueron llevadas a la Clínica de Enfermedades de Plantas de la Cátedra de Fitopatología. Se tomaron tres (3) plantas, las cuales fueron inoculadas y las tres (3) restantes se utilizan como testigo.

#### Preparación del inóculo del microorganismo patógeno

A un aislamiento puro del patógeno proveniente de los tubos con PDA en cuña fueron colocados en placas Petri con el mismo medio acidificado (PDAA) con ácido láctico al 50% a razón de 50 gotas/L para evitar el desarrollo de colonias bacterianas. Todas las cápsulas se colocaron en cámara de crecimiento durante 10 días. Una vez desarrollado el patógeno; se agregaron 20 ml de agua destilada estéril (ADE) en una placa Petri, luego se realizó un raspado de la colonia para desprender los conidios,

filtrando con gasa estéril la suspensión del inóculo; seguidamente se tomó una gota de esa suspensión con la ayuda de una pipeta Pasteur y se colocó en una cámara de Neubauer o hematocímetro, en la cual se ajustó la concentración a  $10^6$  conidios/cc.

### **Inoculación de las plantas por aspersión**

Se realizó la inoculación del hongo sobre las plantas usando un aspersor con una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/cc. Las plantas se colocaron en cámara húmeda durante 7 días, donde a través de observaciones diarias se evaluó la aparición de los síntomas de la enfermedad. A partir de las plantas inoculadas, se hicieron reaislamientos para verificar el cumplimiento de los postulados de Koch.

### **Pruebas de enfrentamiento**

A partir de aislamientos del patógeno y el antagonista de ocho y tres días de edad respectivamente, se procedió a realizar los enfrentamientos entre ambos en placas Petri con medio de cultivo PDAA, para lo cual, con la ayuda de una pipeta Pasteur previamente esterilizada, se cortaron discos de 5mm de diámetro del patógeno y el antagonista, luego cada disco, se colocó de forma equidistante en la placa Petri, se identificaron y se colocaron en incubación a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 7 días. Se realizó un tratamiento testigo que consistió en colocar en placas Petri con PDAA un disco con micelio del hongo patógeno. Se realizaron un total de 5 repeticiones del enfrentamiento del patógeno vs. antagonista y 5 repeticiones de los testigos. Todas las placas se incubaron durante 7 días con una temperatura promedio de  $28^{\circ}\text{C}$ .

Se realizaron mediciones diarias del crecimiento radial del patógeno (cm/día) el cual se tomó desde el borde del disco hasta el borde del halo de inhibición del antagonista, empleando estas mediciones para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC). En la última evaluación, se determinó además, el número de conidios/cc, para obtener el porcentaje de inhibición de esporulación (PIE). Ambos porcentajes vienen dados por las siguientes fórmulas de J. M. Vicent citadas por Mentel *et al.*, (1976).

### **Porcentaje de inhibición de crecimiento**

$$\text{PIC (\%)} = \frac{(\text{crec. del testigo} - \text{crec. del tratamiento})}{\text{crec. del testigo}} \times 100$$

(Crecimiento del testigo)

### **Porcentaje de inhibición de esporulación**

$$\text{PIE (\%)} = \frac{(\text{esporulación del testigo} - \text{esporulación del tratamiento})}{\text{esporulación del testigo}} \times 100$$

(Esporulación del testigo)

### **Diseño de experimentos**

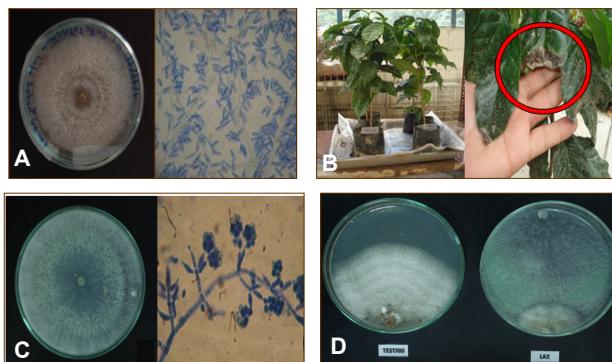
Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con seis tratamientos y seis repeticiones. El programa estadístico empleado fue Statistix 8.0. A los datos obtenidos se les verificó los supuestos de los análisis de varianza, por no cumplirse éstos, se analizaron por vía no paramétrica aplicando la prueba de Kruskal y Wallis (con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ ).

## Resultados y Discusión

### Aislamiento e identificación de *Colletotrichum gloeosporioides*

De las muestras de hojas de café se aislaron consistentemente colonias de aspecto algodonoso, de color blanco y ligeramente grisáceo hacia los extremos, con el centro de color gris verdoso y crecimiento moderadamente lento, que cubrió la placa de Petri al noveno día, en el centro de la colonia se observaron pequeñas masas de acérvulos de color anaranjado. Las observaciones al microscopio revelaron que estas colonias presentaban un micelio hialino, conidios unicelulares alargados

y con extremos redondeados de 13.6 x 3 $\mu$ m, coincidiendo ésta descripción con la reportada por la literatura para *Colletotrichum gloeosporioides* (Sutton, 1992), [Figura 1 (A) y (B)].



**Figura 1.** A.- Colonia y conidios del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en PDA. B.- Plantas inoculadas con *Colletotrichum gloeosporioides*, mostrando manchas. C.- Colonia y conidióforos del hongo *Trichoderma harzianum* (LA2) en PDA. D.- Enfrentamiento entre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Trichoderma harzianum* (LA2) y testigo.

### Aislamiento e identificación de los antagonistas *Trichoderma* spp

Se evaluaron seis aislamientos de los antagonistas, de los cuales, dos se colectaron de la rizósfera de las plantas de café muestreadas (LA1 y LA2) y las

restantes suministradas por el banco de cepas de la Clínica de enfermedades en plantas (Tabla 1).

**Tabla 1.** Aislamientos de *Trichoderma* spp. de diferentes localidades del estado Aragua y el estado Miranda.

Denominación	Identificación	Cultivo	Procedencia
LA1	<i>Trichoderma</i> sp.	Café	Estación experimental El Laurel, estado Miranda
LA2	<i>Trichoderma harzianum</i>	Café	Estación experimental El Laurel, estado Miranda
Punta Larga	<i>Trichoderma</i> sp.	Pimentón	Finca punta larga, estado Aragua
6141	<i>Trichoderma crassum</i>	Tomate	Arenales, estado Aragua
6146	<i>Trichoderma harzianum</i>	Caraota	Finca los Dolores, Tucutunemo, estado Aragua
Tricobiol	<i>Trichoderma harzianum</i>	-----	Formulación Comercial

### Prueba de patogenicidad

En las pruebas para comprobar la **patogenicidad** del aislamiento de *Colletotrichum*, se obtuvo como resultado que todas las plantas inoculadas con el patógeno mostraron a los 15 días síntomas similares a los causados por la antracnosis tales como manchas de forma irregular, de color pardo, que empiezan desde el margen de la hoja, comparado con el testigo que no mostró síntomas. Los síntomas aquí descritos coinciden con los señalados por Guanipa (2000). Luego de realizar los reaislamientos correspondientes, la colonia aislada coincide con los originalmente inoculados, resultando así la prueba positiva, ratificando que este aislamiento de *Colletotrichum* es patogénico y virulento en plantas de café.

### Prueba de enfrentamiento

El aislamiento LA2 identificado como *Trichoderma harzianum*, fue el mas efectivo en controlar el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, con un PIC de 64.09%.

Los aislamientos de *Trichoderma harzianum* que mejor controlaron la esporulación del patógeno fueron 06146 y LA2, con un PIE de 98.76% y 97.83% respectivamente [Figura. 1. (C) y (D)]. Esto coincide con los resultados obtenidos en otras investigaciones similares donde se observó alto PIE *in vitro* al realizar enfrentamientos de *Trichoderma harzianum*. Contra *Colletotrichum gloeosporioides* obtenido de aislamientos en plantaciones de mango (*Mangifera indica*), (Sarmiento, 2009).

### Conclusiones

La prueba de patogenicidad, demostró que el aislamiento de *Colletotrichum gloeosporioides* es patogénico en plantas de café.

En cuanto a los antagonistas obtenidos de muestras de suelo de la E.E. “Jaime Henao Jaramillo - El Laurel” (UCV) fueron identificados como *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma* sp.

Los aislamientos de *T. harzianum* (LA2) y (06146) resultaron los más efectivos

para inhibir el crecimiento micelial y la esporulación de *Colletotrichum gloeosporioides*.

El aislamiento de *Trichoderma harzianum* (LA2), se considera el más efectivo por ser nativo de la zona.

## Referencias Bibliográficas

Abbott, L. (1997). Nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en frutales. Facultad de Ciencias. Agrarias, Universidad de Chile. Santiago, Chile. pp. 82-88.

Bisset, J. (1991). A review of the genus *Trichoderma* II. Infrageneric classification. Can. J. Bot. 69 (11): 2357-2372.

Guanipa, J. M. (2000). Café, Plagas y Enfermedades. Servicios Gráficos. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 43 pp.

Mentel, L.; Machado, C.; Minussi, E.; Castro, C.; Kimati, H. (1976). Efecto de algunos fungicidas en el crecimiento micelial de *Macrophomina phaseolina* (TASS) Goid *in vitro*. Revista de Fitopatología Brasileira. 1(2): 57-66.

Rifai, M. A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. Commonwealth Mycological Institute. England. 116 pp.

Sarmiento, A. (2009). Control biológico *in vitro* e *in vivo* de *Colletotrichum gloeosporioides* causante de la antracnosis en mango (*Mangifera indica*) con el uso de *Trichoderma* spp. Tesis de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 25 pp.

Sutton, B.C. (1992). The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (eds) *Colletotrichum-Biology. Pathology and Control*. CAB International. Wallingford. 1-26.