



Efecto *in vitro* de controladores biológicos sobre *Colletotrichum* spp. y *Botrytis* spp.

In vitro effect of biological controllers on *Colletotrichum* spp. and *Botrytis* spp.

Malluri Goñas Goñas^{1*}, Leidy Gheraldinne Bobadilla Rivera¹, Jesús Rascón Barrios¹ y Nora Yessenia Vera Obando¹

RESUMEN

La presente investigación, realizada en el Laboratorio de Investigación de Entomología y Fitopatología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, tuvo el objetivo de evaluar el efecto *in vitro* de cuatro controladores biológicos (*Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. asperellum* y *Clonostachys rosea*) frente a los hongos patógenos *Colletotrichum* spp. y *Botrytis* spp. Se utilizó la metodología de cultivos duales, que consiste en enfrentar el enemigo biológico en un extremo de una placa Petri y el hongo patógeno en el otro. Se establecieron seis tratamientos que incluyeron un testigo absoluto y un testigo químico (propineb 1000 ppm) por patógeno, con cinco repeticiones por tratamiento. Se logró el aislamiento de los fitopatógenos *Colletotrichum* spp., agente causal de la antracnosis del mango, y *Botrytis* spp., agente causal de la racha en azucenas. Al comparar el crecimiento radial cada 24 horas, se encontró que 96 horas después del enfrentamiento, las cepas de *Trichoderma* inhibieron el crecimiento radial de los patógenos, diferenciándose significativamente del testigo absoluto. Al evaluar el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) en *Botrytis* spp., las cepas de *Trichoderma* spp. presentaron mayor PICR, sin embargo, no presentaron diferencias significativas con el testigo químico. En *Colletotrichum* spp., las cepas de *Trichoderma* spp. presentaron mayor PICR, y además diferencias significativas estadísticas con el testigo químico. Finalmente, cabe destacar que la cepa de *C. rosea* no inhibió el crecimiento radial de los patógenos, mostrando los PICR más bajos.

Palabras clave: Antracnosis, controlador biológico, crecimiento radial, azucena, mango.

ABSTRACT

The present research was carried out in the Laboratory of Entomology and Phytopathology Research of the National University Toribio Rodríguez de Mendoza of Amazonas, and had the objective to evaluate the *in vitro* effect of four biological controllers (*Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. asperellum* and *Clonostachys rosea*) against pathogenic fungi *Colletotrichum* spp. and *Botrytis* spp. We used the dual crops methodology, which consisted of facing the biological enemy at one end of a Petri dish and the pathogenic fungus at the other. Six treatments were established that included an absolute control and a chemical control (propineb 1000ppm) per pathogen, with five replicates per treatment. Isolation of phytopathogens *Colletotrichum* spp., causal agent of anthracnose of mango, and *Botrytis* spp., causal agent of the late blight in lilies. When comparing the radial growth in 24 hours, it was found that 96 hours after the confrontation, the *Trichoderma* strains inhibited the radial growth of the pathogens, differing significantly from the absolute control. When evaluating the percentage of inhibition of radial growth (RCIP) in *Botrytis* spp., the strains of *Trichoderma* spp. presented higher RCIPs, however, they did not present significant differences with the chemical control. In contrast, in *Colletotrichum* spp., strains of *Trichoderma* spp. presented higher RCIP and also significant statistical differences with the chemical control. Finally, it should be noted that the strain of *C. rosea* did not inhibit the radial growth of the pathogens, showing the lowest RCIPs.

Keywords: Anthracnose, biological controller, radial growth, lily, mango.

¹Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, Chachapoyas, Amazonas, Perú

* Autor de correspondencia. E-mail: malluri.gonas@untrm.edu.pe

I. INTRODUCCIÓN

Hay un interés muy grande en identificar la capacidad de los patógenos para evolucionar y adaptarse a nuevos hábitats, especialmente en el caso de enfermedades emergentes devastadoras (Archie *et al.*, 2009). En este sentido, los hongos están entre los patógenos más devastadores de las plantas causando, principalmente, importantes pérdidas en la agricultura, (Anderson *et al.*, 2004)

Colletotrichum spp. es un hongo cosmopolita reconocido como causante de daños a los órganos de muchos cultivos agrícolas, forestales y especies ornamentales. El control de las enfermedades causadas por especies de *Colletotrichum* depende del uso de semillas sanas, semillas tratadas con agua caliente, selección de variedades resistentes, rotación de cultivos, gestión de los productos durante y después de la cosecha, y tratamiento del embalaje y de los contenedores donde se trasladan los frutos (Hernández *et al.*, 2013)

La susceptibilidad que muestran los frutos de mango a las enfermedades, la cual se incrementa después de la cosecha, en post cosecha, es un factor limitante para las exportaciones y comercialización, debido a la pudrición que ocasiona el patógeno en el fruto, y la consiguiente pérdida de su valor comercial, lo que puede ocasionar pérdidas que fluctúan entre el 30% y el 60% del total de la producción (Santander, 2012).

Por otro lado, Flores *et al.* (2015) mencionan que *Botrytis* spp, es el patógeno que causa la enfermedad del moho gris en una amplia variedad de huéspedes, y es un grave problema económico en cultivos como uvas, fresas, frambuesas, lechugas, pepinos, habas, tomates, frijoles, incluso flores y plantas forestales producidas en contenedores y en algunos casos en algunos casos causan pérdidas superiores al 50%.

Otra especie ampliamente afectada por el género *Botrytis* es la azucena (*Lilium* spp.), y es que tanto su producción como su propio rendimiento pueden estar afectados por el ataque de hongos de este género (Leyva-Mir *et al.*, 2009). Actualmente se considera que el control biológico de patógenos de plantas, con el uso de microorganismos benignos o beneficiosos como

agentes antagonistas es un componente importante del manejo integrado de plagas en cultivos agrícolas (Ryu *et al.*, 2014). También es una práctica muy importante para el manejo de plagas, al utilizar organismos vivos para reducir y mantener la abundancia poblacional de una plaga por debajo de los niveles de daño económico, ya que su valor recae en que puede resultar en un control eficiente de una plaga tanto a mediano como a largo plazo, compatible con un bajo riesgo ambiental y una producción sustentable (Farooq *et al.*, 2011). En este sentido, resulta fundamental para los programas de control biológico considerar la ecología, biología y comportamiento de los enemigos naturales de la plaga y de la plaga misma, además de aquellos factores que podrían ser causantes de cambios poblacionales (Fischbein, 2012).

Los mecanismos de biocontrol atribuidos a *Trichoderma* spp. son: micoparasitismo, competencia por los nutrientes y antibiosis, siendo el micoparasitismo el principal mecanismo de acción de este hongo. Este biocontrolador cubre al hongo, ataca y penetra en sus células causándole un daño extensivo alterando y degradando la pared celular, causa retracción de la membrana plasmática y desorganización del citoplasma (Guédeza *et al.*, 2009), a esto se suma la secreción de enzimas y la producción de compuestos inhibidores (Infante *et al.*, 2009)

Además se conoce que *Trichoderma* presenta otros mecanismos, cuya acción biorreguladora es de forma indirecta. Entre estos se pueden mencionar los que elicitán o inducen mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos como es la activación en la planta de compuestos relacionados con la resistencia (Inducción de Resistencia), con la detoxificación de toxinas excretadas por patógenos y la desactivación de enzimas de estos durante el proceso de infección (Infante *et al.*, 2009)

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto *in vitro* de controladores biológicos (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma asperellum* y *Clonostachys rosea*) sobre el agente causal de la antracnosis del mango (*Colletotrichum* spp) y la rancha

en azucena (*Botrytis* spp.), en Chachapoyas (Departamento de Amazonas).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación de la investigación

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación de Etimología y Fitopatología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, situado en la ciudad de Chachapoyas, capital del Departamento Amazonas.

Aislamiento de fitopatógenos

Para aislar en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) e identificar *Colletotrichum* spp. a partir de frutos de mango, y *Botrytis* spp. a partir de hojas de azucena, se siguió la metodología descrita por Krugg y Requejo-Valdivieso (2012), con algunas modificaciones para el desarrollo de esta investigación. Se procedió a hacer cortes en cuadrados de aproximadamente 0,5 cm de lado a partir del borde de la lesión que contengan tanto tejido sano como enfermo. Estos cortes fueron puestos en agua corriente durante una hora. Transcurrido este tiempo fueron tratados durante tres minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 1%. A continuación, se lavaron tres veces con agua destilada estéril para dejarlos secar en placas Petri con papel toalla estéril. Finalmente fueron colocados en placas Petri conteniendo PDA, e incubadas a 26 °C por 5 a 7 días.

Identificación de fitopatógenos

De cada una de las colonias que se desarrollaron en las placas con PDA, se realizaron observaciones microscópicas con azul de lactofenol, y paralelamente, se sembraron en tubos conteniendo PDA, con el fin de obtener cultivos puros.

Prueba de antagonismo

Para la prueba de antagonismo se utilizó la metodología de cultivos duales utilizando placas Petri conteniendo medio de cultivo PDA, en las cuales se sembró el enemigo biológico en un extremo de la placa y el hongo fitopatógeno en el otro (aproximadamente a 7 cm de distancia). Se utilizaron cinco placas Petri por cada tratamiento, incubándolas a una temperatura de

25°C ± 2°C. Posteriormente, para la comparación del crecimiento radial de los fitopatógenos enfrentados a los biocontroladores con los testigos patógenos, se realizaron observaciones y mediciones cada 24 horas, hasta que el desarrollo fúngico de los testigos absolutos cubriera completamente la placa Petri. En esta etapa se calculó el Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial (PICR), utilizando la fórmula:

$$\text{PICR} = \frac{R_1 - R_2}{R_2} \times 100$$

Donde:

R₁= radio en cm del patógeno testigo absoluto

R₂= radio en cm del patógeno enfrentado.

Diseño experimental

Se trabajó con un Diseño Completo al Azar (DCA), utilizando cuatro cepas comerciales de controladores biológicos: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma asperellum*, *Clonostachys rosea*, enfrentados a *Colletotricum* spp y *Botrytis* spp. Las cepas de los controladores biológicos se obtuvieron del Laboratorio de Control Biológico del Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Los tratamientos de estudio para *Colletotricum* spp. fueron: T1, *Colletotrichum* spp. vs *T. harzianum*; T2, *Colletotrichum* spp. vs *T. viride*; T3, *Colletotrichum* spp. vs *T. asperellum*; T4, *Colletotrichum* spp. vs *Clonostachys rosea*; T5, *Colletotrichum* spp. testigo químico (Propineb a 1000ppm); T6, (*Colletotricum* spp. Testigo absoluto). Los tratamientos de estudio para *Botrytis* spp. fueron: T1, *Botrytis* spp. vs *T. harzianum*; T2, *Colletotrichum* spp. vs *T. viride*; T3, *Botrytis* spp. vs *T. asperellum*; T4, *Botrytis* spp. vs *C. rosea*; T5, *Botrytis* spp. testigo químico; T6, *Botrytis* spp. testigo absoluto.

III. RESULTADOS

Aislamiento e identificación de *Botrytis* spp. y *Colletotrichum* spp.

De hojas de azucena se logró aislar e identificar a *Botrytis* spp. como el agente causal de la mancha en

azucenas; seis días después de la incubación el crecimiento micelial llenó por completo la placa Petri, el color de las colonias fue de blanco a gris claro, y al observar estas colonias en el microscopio se identificaron conidióforos en forma de racimo, característico de *Botrytis* spp. (Figura 1).

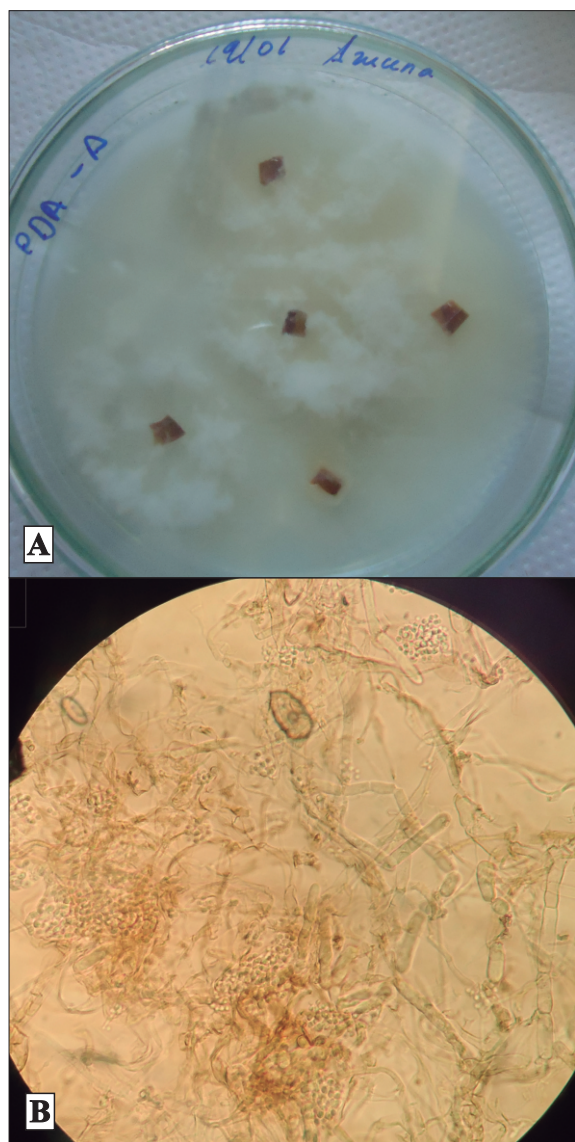


Figura 1. Colonias de *Botrytis* spp. aisladas de hojas de azucena (A), conidios en forma de racimo de *Botrytis* spp. en el microscopio a 63x (B).

Del mismo modo se logró aislar e identificar el agente causal de la antracnosis en los frutos de mango, en este caso *Colletotrichum* spp; ocho días después de la incubación, el crecimiento micelial llenó la placa Petri, el color del micelio fue anaranjado claro, y al observarse estas colonias en el microscopio se identificaron

conidios cortos y erectos en forma de bala, morfología característica de este género (Figura 2).

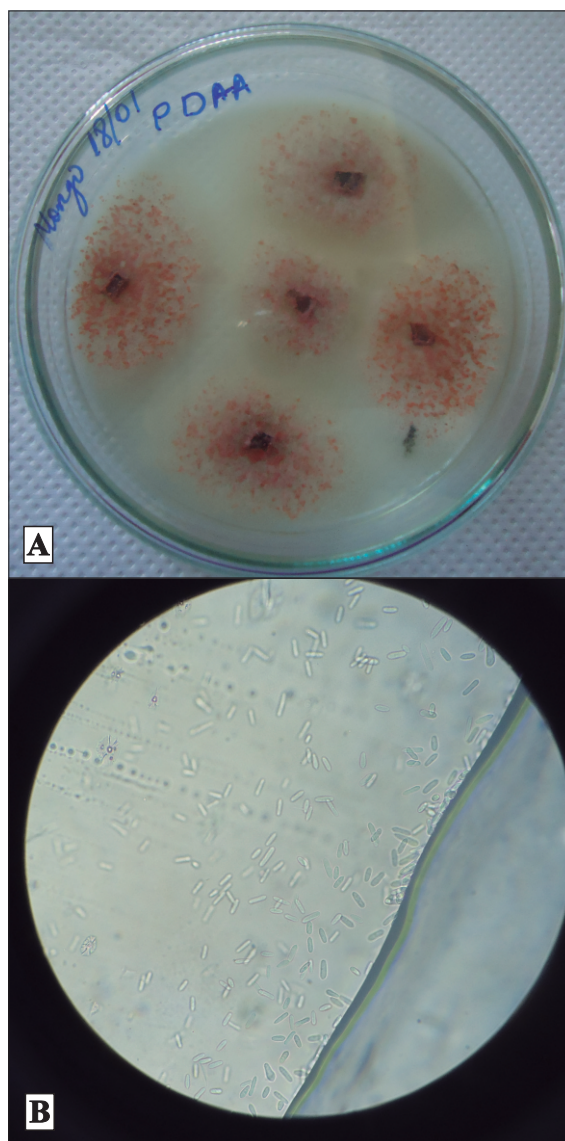


Figura 2. Colonias de *Colletotrichum* spp. aislado de frutos de mango (A), conidios cortos y erectos en forma de bala de *Colletotrichum* spp. vista en el microscopio a 63x (B).

Comparación del crecimiento radial de *Botrytis* spp. y *Colletotrichum* spp. enfrentados a los controladores biológicos

La figura 3 muestra el crecimiento micelial de *Botrytis* spp al día seis (144 horas) después del enfrentamiento. Los tratamientos T6 (testigo absoluto) y T4 (*Clonostachys rosea*), reportaron mayor crecimiento radial del patógeno (4,0 cm y 3,7 cm, respectivamente), que además presentan diferencias significativas estadísticas con los tratamientos T1 (1,4cm), T2 (1,5 cm), T3

(1,4cm) y T5 (2,5 cm).

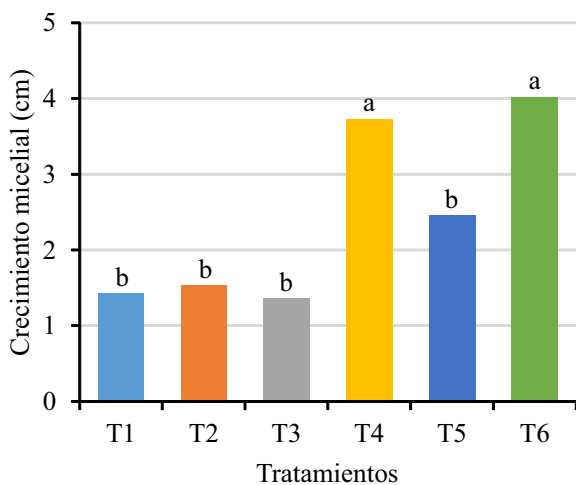


Figura 3. Crecimiento micelial en cm de *Botrytis* spp. al día seis (144 horas) después del enfrentamiento.

Los datos del crecimiento micelial de *Colletotrichum* spp. al día ocho (192 horas) después del enfrentamiento, se muestran en la figura 4, donde se puede observar que el tratamiento T6 presenta el mayor crecimiento micelial (3,83 cm), seguido del T4. Sin embargo, no se evidencian diferencias estadísticas significativas entre ellos. En el otro extremo está el tratamiento T3, que reporta el menor crecimiento micelial (1,15cm).

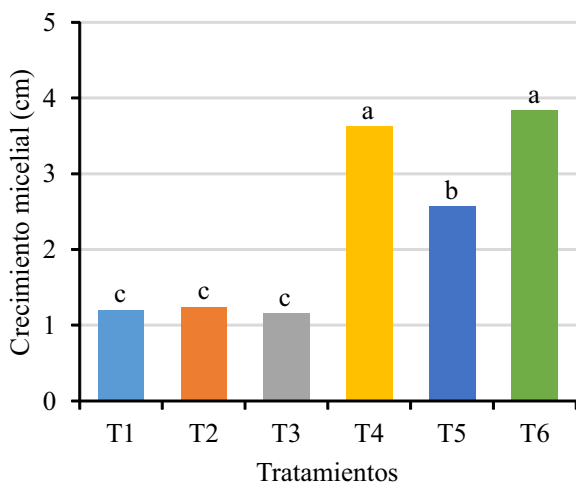


Figura 4. Crecimiento micelial de *Colletotrichum* spp al día ocho (192 horas) después del enfrentamiento.

Porcentaje de inhibición del crecimiento radial

El porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Botrytis* spp. se muestra en la figura 5, en la cual se puede observar que con el tratamiento T3 (*T. asperellum*) presenta el mayor porcentaje de inhibición

(65,6%). De nuevo, no presenta diferencias significativas estadísticas con los tratamientos T1 (64,2%) y T2 (61,8%). Por otro lado, el T5 (testigo químico) exhibe el menor porcentaje de inhibición del crecimiento radial (38,2%), seguido del T4 (6,3%).

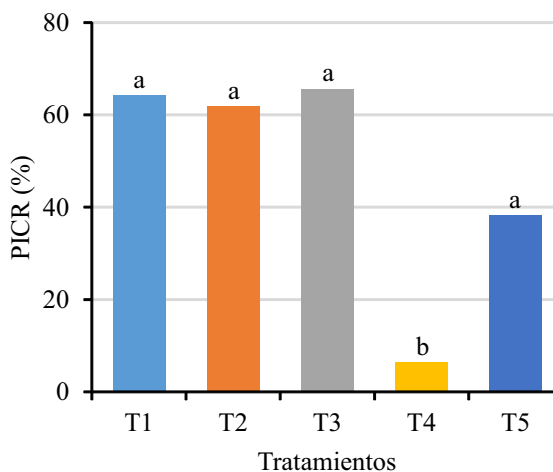


Figura 5. Efecto de los controladores biológicos en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Botrytis* spp. al día seis después del enfrentamiento.

El porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Colletotrichum* spp. se muestra en la figura 6, donde se puede observar que el tratamiento T3 (*T. asperellum*) presenta el mayor porcentaje de inhibición (69,4%), sin presentar diferencias estadísticas significativas con los tratamientos T1 (68,7%) y T2 (67,1%). A su vez, el T5 (testigo químico) exhibe el menor porcentaje de inhibición del crecimiento radial (28,1%), seguido del T4 (18,2%), con el cual no se evidenciaron diferencias estadísticas significativas.

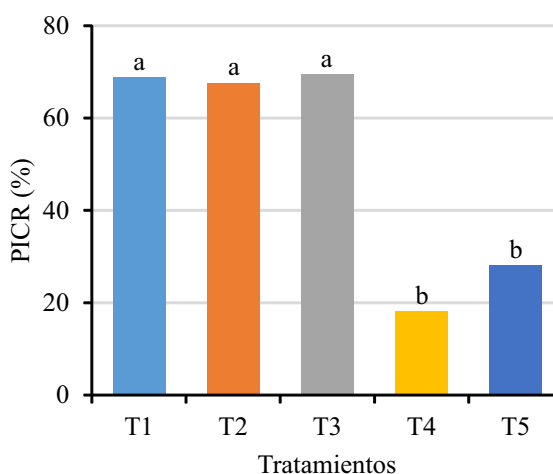


Figura 6. Efecto de los controladores biológicos en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Colletotrichum* spp. al día ocho después del enfrentamiento.

IV. DISCUSIÓN

El mayor crecimiento micelial de los patógenos en el testigo absoluto es debido a la ausencia de controladores, ya que en los tratamientos que se enfrentó a un controlador, el crecimiento micelial del patógeno fue menor, sin embargo, tanto para *Colletotrichum* spp. como para *Botrytis* spp., de los cuatro controladores biológicos a los que fueron enfrentado, las cepas del género *Trichoderma* son las que presentaron menor crecimiento de los patógenos, diferenciándose significativamente ($p \leq 0,5$) de los tratamientos con *C. rosea*.

En el caso del porcentaje de inhibición del crecimiento radial, las cepas de *Trichoderma* alcanzaron los mayores porcentajes de inhibición sobre *Colletotrichum* y *Botrytis* spp., que oscilaron entre 65,6-61,8% y 96,4%-67,2% respectivamente. Resultados similares obtuvieron Astorga-Quirós *et al.* (2013) al evaluar la capacidad antagonica de cepas de *Trichoderma* spp. sobre *Penicillium* spp. estos mostraron que las cepas de *Trichoderma* inhibieron el crecimiento radial en un 49%. Así mismo Calvo-Araya *et al.* (2012), al evaluar *in vitro* diversos aislamientos de antagonistas sobre *Botrytis cinerea*, encontraron que las cepas de *Trichoderma* spp. presentaron los valores más altos de crecimiento radial con respecto al patógeno, así como un porcentaje de inhibición de *B. cinerea* superior al 90%, mostrando que pueden ser potencial de control biológico para este patógeno.

En un estudio realizado por Ghosh y Chakraborty (2012), al estudiar el control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides*, llegaron a la conclusión que las cepas de *Trichoderma viridae* son buenos agentes de control, ya que sus esporas se localizaron adheridas en la pared y la contracción de protoplasto de *C. gloeosporioides*, ocasionando malformaciones e hinchamiento.

Por otro lado la cepa de *C. rosea* alcanzó un PICR de 6,3 a 18,2% para *Botrytis* spp y *Colletotrichum* sp, respectivamente. Resultados similares obtuvieron Flores *et al.* (2015) al evaluar el porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *C. rosea* sobre *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani* y *Fusarium Oxysporum*,

donde encontraron que los PICR fueron de 11,3%, 1,5% y 9,9%, respectivamente; sin embargo, los estudios con *C. rosea* son limitados y poco conocidos (Costa *et al.*, 2013).

V. CONCLUSIONES

Se logró identificar al agente causal de la antracnosis de los frutos de mango (*Colletotrichum* spp.) y el agente causal de la racha en azucena (*Botrytis* spp.).

El crecimiento micelial de *Botrytis* spp. y *Colletotrichum* spp. fue menor que el de los testigos al ser enfrentados con las cepas de *Trichoderma* spp., con mayores porcentajes de inhibición del crecimiento radial de los patógenos, lo que significa que pueden ser una buena alternativa de control biológico para estos dos patógenos, y de esta manera, disminuir el uso de productos químicos, que son los principales causantes de la contaminación ambiental y además, perjudican la salud humana.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, P.K., A.A. Cunningham, N.G. Patel, F.J. Morales, P.R. Epstein, y P. Daszak. "Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers". *Trends Ecol. Evol.*, Vol. 19(2004): 535-544.
- Archie, E.A., G. Luikart, y V.O. Ezenwa. "Infecting epidemiology with genetics: a new frontier in disease ecology". *Trends Ecol. Evol.*, Vol. 24(2009): 21-30.
- Astorga-Quirós, K, K. Meneses-Montero, C. Zúñiga-Vega, J. Brenes-Madriz, y W. Rivera-Méndez. "Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo". *Tecnología en Marcha*, Vol. 27 (2013): 82-91.
- Calvo-Araya, J.A., G. Rivera-Coto, S. Orozco-Cayasso, y R. Orozco-Rodríguez. "Aislamiento y evaluación *in vitro* de la antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora". *Agron. Mesoam*, Vol. 23(2012): 225-231.

- Costa, L.B., D.E. Rangel, M.A. Morandi, y W. Bettiol. "Effects of UV-B radiation on the antagonistic ability of *Clonostachys rosea* to *Botrytis cinerea* on strawberry leaves". *Biological Control*, Vol. 65(2013): 95-100.
- Farooq, M., K. Jabran, Z. Cheema, A. Wahid, y K.H. Siddique. "The role of allelopathy in agricultural pest management". *Pest management science*, Vol. 67(2011): 493-506.
- Fischbein, D. "Introducción a la teoría del control". Buenos Aires (Argentina), 2012.
- Flores, W., J. Chico, y L. Cerna. "Actividad antagónica in vitro de *Clonostachys rosea* sobre *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*". *Revista REBIOL*, Vol. 35(2015): 34-42.
- Ghosh, S.K., y N. Chakraborty. "In vitro biological control of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal organism of anthracnose of sarpagandha (*Rouwolfia serpentina*)". *Agricultural Biological Journal of North America*, Vol. 3(2012): 306-310.
- Guédeza, C., L. Cañizález, C. Castilho, y R. Olivarb. "Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria spp*)". *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, Vol. 29(2009): 34-38.
- Hernández, M., M. Murace, J. Ringuet, I. Petri, D. Gallo, y A. Arambarri. "Effect of aqueous and alcohol extracts of *Phytolacca tetramera* (*Phytolaccaceae*) leaves on *Colletotrichum gloeosporioides* (*Ascomycota*)". *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, Vol. 48(2013): 201-209.
- Infante, D., B. Martínez, N. González y Y. Reyes. "Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos". *Revista de protección vegetal*, Vol. 24(2009): 14-21.
- Krugg, J.W., y H. Requejo-Valdivieso. "Aislamiento de hongos fitopatógenos en lesiones de hoja y tallo de cultivos de vid, *Vitis viticola*, de Cascas, La Libertad (Perú)". *Revista REBIOL*, Vol. 32(2012): 56-51.
- Leyva-Mir, S.G., Y. López-Hernández, B. Tlapal-Bolaños, y R. Flores-Martínez. "Etiología del tizón descendente de las ramas de azucena híbrida (*Lilium spp.*) en Villa Guerrero, Estado de México". *Revista Chapingo. Serie horticultura*, Vol. 15(2009): 5-8.
- Santander, A.J. "Uso de *Trichoderma harzianum* Rifai y *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn para el control de (*Colletotrichum gloeosporioides* Pens.) causante de la antracnosis en mango (*Mangifera indica* L.)". Maracay (Venezuela), 2012.
- Ryu, H., H. Park, D.S. Suh, G.H. Jung, K. Park, y B.D. Lee. "Biological control of *Colletotrichum panacicola* on *Panax ginseng* by *Bacillus subtilis* HK-CSM-1". *Journal of ginseng research*, Vol. 38(2014): 215-219.