

EFFECTO DE *Verticillium chlamydosporium* EN EL CONTROL DE *Meloidogyne* spp. EN ALMÁCIGOS DE CAFÉ, Var. CATURRA

Doris Hincapié-R.*; Jairo Eduardo Leguizamón-Caycedo**

RESUMEN

HINCAPIÉ R., D.; LEGUIZAMÓN C., J.E. Efecto del *Verticillium chlamydosporium* en el control de *Meloidogyne* spp. en almácigos de café, var. Caturra. Cenicafé 50(4): 286-298. 1999

Se evaluó el control de *Meloidogyne* spp. en almácigos de café (*Coffea arabica*) var. Caturra por *Verticillium chlamydosporium*, en cuatro etapas: En la primera se midió la patogenicidad *in vitro* de los aislamientos Vc 25, Vc 72 y Vc 78 sobre huevos de *Meloidogyne* spp., según Cardona, 1995. No se encontraron diferencias ($P < 0,05$) entre aislamientos (parasitismo superior al 70%). En la segunda se determinó la DL50 sobre 2500 huevos de *Meloidogyne* spp. (Giraldo, 1996). Las dosis causaron patogenicidad superior al 50%. Vc 78 mostró mayores porcentajes de parasitismo en las dos primeras etapas y en la tercera se evaluó en almácigo el control de dosis diferentes sobre *Meloidogyne* spp., frente a un nematocida químico y un testigo no tratado. 130 días después del trasplante se obtuvo control y hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) con el testigo no tratado; los porcentajes de control fueron iguales al químico. En la cuarta etapa se midió la persistencia de Vc 78 mediante la metodología UFC/g y la patogenicidad de Vc 78 a los 0, 45, 90 y 130 días después de la inoculación. El hongo permaneció en el almácigo durante el experimento, y su patogenicidad sobre el nematodo no mostró variación, con un promedio de 80% de parasitismo sobre huevos de *Meloidogyne* spp. Vc 78 controló *Meloidogyne* spp. en almácigos.

Palabras claves: Control biológico, hongos, parasitismo, nematodos, patógenos del café, var. Caturra, almácigos.

ABSTRACT

Control of *Meloidogyne* spp. with *Verticillium chlamydosporium* in coffee nurseries was evaluated in four stages: In the first stage, pathogenicity *in vitro* of isolates Vc25, Vc72, and Vc78 on *Meloidogyne* spp. eggs was determined according to Cardona (1995). There were no differences ($P < 0,05$) among isolates (parasitism above 70%). In the second stage, LD50 on 2500 *Meloidogyne* spp. eggs was determined (Giraldo, 1996). The doses caused pathogenicity above 50%. Isolate Vc78 showed higher percentages of parasitism in the first two stages. In the third stage, control of *Meloidogyne* was evaluated in nurseries, as compared to a chemical nematocide. One hundred and thirty days after transplant there were significant differences ($P > 0,05$) with the control treatment and biocontrol percentages were similar to those obtained with the chemical nematocide. In the fourth stage, persistence of Vc78 was evaluated by CFU/g of soil and pathogenicity was evaluated 0, 45, 90, and 130 days after inoculation. The fungus remained in the soil during the experiment, and its pathogenicity did not show any variation, with an average 80% parasitism on *Meloidogyne* spp. eggs, where Vc78 gave the highest control.

Keywords: Biological control, fungi, parasitism, nematodes, coffee pathogens, Caturra variety, nurseries.

* Especialista en Microbiología. Universidad Católica de Manizales.

** Investigador Principal I. Fitopatología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

El nematodo del nudo radical *Meloidogyne* spp. es uno de los patógenos más estudiados en el mundo en virtud a su amplia distribución geográfica, variedad de hospedantes y diversidad de especies (10, 11, 13, 26).

De las trece especies registradas en café, *M. incognita*, *M. coffeicola* y *M. javanica*, son las de mayor agresividad por el tipo de daño que ocasionan (11), y dos de ellas, se han encontrado en la zona cafetera colombiana (6, 20).

La importancia económica del patosistema *Meloidogyne*-café radica en la disminución de la producción; Barriga (8), registró pérdidas de US\$ 800 millones/año y Leguizamón (23), en investigaciones realizadas durante un período de cuatro cosechas concluyó cómo por cada 1% de infección radical por nematodos del género *Meloidogyne* en plántulas de café de la variedad Caturra sembradas en el campo, se reduce la producción en 78g de café cereza por planta.

Los estudios realizados en café han demostrado que los nematicidas de acción sistémica no son absorbidos ni transportados por un sistema radical severamente dañado por el nematodo, y que los productos de acción de contacto, reducen sólo provisionalmente las poblaciones existentes las cuales, en la mayoría de los casos, vuelven a sus niveles iniciales haciéndose necesario aplicar de nuevo el producto (5, 19).

El sistema radical de la planta de café en la etapa de almácigo es susceptible a la infección por nematodos y en cortos períodos de tiempo (tres o cuatro meses), la infección genera grados de daño irreversibles que se incrementan en el campo, con atrofia de la raíz pivotante y cuello. Estos, reducen además la población de raíces secundarias y absorbentes (23). Ensayos de campo han demostrado que los cafetales con síntomas severos de daño por *Meloidogyne* no responden a la aplicación de nematicidas (22). Al respecto Arango (2), explica como es prefe-

rible el tratamiento nematicida preventivo, ya que su acción curativa dependerá del área de la raíz infectada y de la especie del nematodo; cuando éste se establece en los tejidos radicales altera los vasos del xilema de manera irreversible.

Resultados obtenidos en investigaciones recientes indican que la medida de control más recomendable es la de producir plántulas sanas, ya que el inóculo natural del nematodo presente en el suelo no afectará la productividad final del cultivo (14, 16, 22).

Sayre (32), sugiere que en las alternativas de control estudiadas se involucre todo el entorno donde el nematodo se desarrolla, buscando conformar una propuesta de manejo que integre al nematodo con el ambiente y sus hospedantes.

En los últimos años se han incrementado las investigaciones para determinar el potencial de los agentes de control biológico de nematodos, especialmente con el hongo endoparásito *Verticillium chlamyosporium* (Vc), el cual ha sido asociado con el control natural de *Heterodera avenae* en cultivos de cereales en Europa (17). También, se ha registrado como un parásito de huevos y hembras de *M. arenaria* (28). Este hongo tiene un gran potencial como controlador por la producción de dictioclamidiosporas (estructuras de resistencia); lo cual permite una fácil manipulación, almacenamiento y una mayor supervivencia en el suelo (18, 24, 31).

En la etapa de almácigo del café, período en el cual se presenta la mayor susceptibilidad de las variedades atacadas por el nematodo de nudo radical *Meloidogyne* spp, es el momento propicio para tomar las medidas de manejo integrado, con el propósito de obtener plántulas sanas y vigorosas (14, 22).

Por lo anteriormente expuesto, en esta investigación se evaluó *in vitro*, la patogenicidad

de *V.c* sobre huevos de *Meloidogyne* spp.; se estudio la DL50 de los aislamientos *V.c.25*, *V.c.72* y *V.c.78*, el efecto de diferentes dosis de *V.c.78* en el control de *Meloidogyne* spp. en almacigos de café, y finalmente, se determinó la viabilidad y persistencia del hongo en el suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en los laboratorios de Biología del Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafe, con temperatura promedio ambiente registrada de 21,5°C y humedad promedio relativa de 79,5%. La etapa de almáximo se llevó a cabo en una casa de mallas construida para tal efecto, con una temperatura promedio ambiente registrada de 21,4°C y humedad relativa promedio de 79,4%.

Los procedimientos seguidos en la realización de cada una de las etapas de la investigación fueron los siguientes:

Producción del inóculo del nematodo. El inóculo se incremento en raíces de tomate *Lycopersicon esculentum* variedad Rutgers, sembrado en un suelo de la Unidad Chinchiná, esterilizado en autoclave a 15PSI. y 121°C, durante 30 minutos. A los 25 días de sembradas las plántulas se inocularon con 1g de raíces de tomate afectadas por *Meloidogyne*, y obtenidas de raíces de café colectadas en la Finca "La Bamba" (Vereda la Estrella, Santa Rosa de Cabal, Risaralda). Después de 65 días de la inoculación, las raíces presentaron daño severo, con un alto porcentaje de nudosidades y abundantes masas de huevos, condiciones óptimas para obtener de ellas los huevos de *Meloidogyne* spp., necesarios en los diferentes experimentos.

PRIMERA ETAPA. Pruebas de patogenicidad *in vitro* sobre huevos de *Meloidogyne* spp. Las pruebas de patogenicidad se realiza-

ron con los tres aislamientos *Vc25*, *Vc72* y *Vc78* de *V. chlamydosporium*. Los aislamientos se incrementaron en arroz según metodología descrita por Antia (1), y a cada uno de ellos se le determinó la concentración de esporas por mililitro, y se ajustó a una concentración de 5×10^7 esporas/ml.

Para la extracción de los huevos de *Meloidogyne* spp. se siguió la metodología descrita por Hussey y Barker, citada por Barker (7), en la cual se toman raíces de plantas de tomate infectadas, se lavan con agua corriente y se cortan en trozos de 1 a 2cm. Luego se sumergen en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%, el cual actúa como agente extractor. Posteriormente se agitan durante 5 minutos y se pasan por mallas de 200 y 500 mesh, donde quedan retenidos los huevos, los cuales se lavan con abundante agua destilada para eliminar los residuos de hipoclorito. Se hizo el recuento de los huevos recolectados en ADE, con la ayuda de una cámara de recuento de 1ml de capacidad y las observaciones se realizaron en microscopio óptico con objetivo 10x, ajustando la suspensión hasta obtener una concentración a 200huevos/ml. Las suspensiones se dejaron en agitación magnética constante hasta su uso.

Posteriormente en cajas de Petri se pusieron en contacto 3ml de la suspensión de esporas con 1ml de la suspensión de huevos. Los huevos y el hongo se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días, después de los cuales, se evaluó la patogenicidad del hongo adicionando 15 gotas de azul de lactofenol al 1% a cada caja y observando al microscopio invertido con los objetivos 10 y 25X. Se realizó el recuento de los huevos que no presentaban signos de parasitismo (12).

Este experimento se realizó utilizando un diseño de clasificación simple, con cuatro tratamientos y 20 repeticiones por tratamiento. La unidad experimental la constituyó la caja de Petri con la suspensión de esporas y huevos. La

variable evaluada fue el número de huevos sanos encontrados. La diferencia entre los huevos sanos encontrados y los inoculados determinó el grado de parasitismo efectuado por el hongo. Se calculó la mortalidad para cada uno de los tratamientos aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Mortalidad corregida} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de HNP en el testigo} - \text{N}^\circ \text{ de HNP en el tratamiento}}{\text{N}^\circ \text{ de HNP en el testigo}} \times 100$$

donde:

HNP= Huevos no parasitados

Con los valores obtenidos se estimaron los porcentajes de parasitismo para cada aislamiento. Posteriormente se realizó un análisis de varianza y una prueba de Tukey al 5%.

SEGUNDA ETAPA: Estimación de la DL50 de *Verticillium chlamydosporium*, aislamientos Vc 25, Vc 72 y Vc 78 sobre huevos de *Meloidogyne spp.* En esta etapa se evaluó la mortalidad causada por los aislamientos de *V. chlamydosporium* multiplicados en sustrato de arroz, en dosis crecientes, sobre una cantidad constante de huevos del nematodo, en un suelo

esterilizado y se determinó así su patogenicidad *in vivo*. De esta manera se seleccionó el mejor aislamiento para ser evaluado en almácigo.

Como sustrato del ensayo se empleó suelo de la unidad Chinchiná esterilizado en autoclave durante 30 minutos a 15PSI y 121°C, a razón de 150g de suelo contenido en vasos de icopor de 300g de capacidad.

Los tres aislamientos, Vc 25, Vc 72 y Vc 78 del hongo se cultivaron en sustrato de arroz a partir de un cultivo puro y activo del mismo, el cual se obtuvo colocando en contacto una suspensión de esporas del hongo con huevos de *Meloidogyne*. Posteriormente los huevos parasitados se sembraron en el medio papa-dextrosa-agar (PDA) y también las colonias obtenidas puras y activas. Después de 30 días de inoculado el arroz se efectuó el recuento de esporas en cada uno de los aislamientos, para determinar su concentración por gramo. Se determinó una concentración de $3,9 \times 10^8$ esporas/g para el aislamiento Vc 25, $1,8 \times 10^8$ esporas/g para el aislamiento Vc 72 y $4,8 \times 10^8$ esporas/g para el aislamiento Vc 78. Se emplearon las dosis descritas en la Tabla 1.

Las dosis propuestas del hongo se mezclaron con 150g de suelo en vasos de icopor. El suelo se humedeció con agua destilada estéril (ADE) y los vasos se llevaron a un cuarto a

TABLA 1. Dosis en gramos de arroz colonizado por 150g de suelo de los aislamientos Vc 25, Vc 72 y Vc 78 de *Verticillium chlamydosporium*, para el control de *Meloidogyne spp.*

Tratamiento	g de Vc 25/150g de suelo	g de Vc 72/150g de suelo	g de Vc 78/150g de suelo
6	0	0	0
1	2	2	2
2	4	4	4
3	8	8	8
4	16	16	16
5	32	32	32

Vc 25 concentración de $3,9 \times 10^8$ esporas/g de arroz.

Vc 72 concentración de $1,8 \times 10^8$ esporas/g de arroz.

Vc 78 concentración de $4,8 \times 10^8$ esporas/g de arroz.

temperatura ambiente (21,5°C), durante 4 días. Después de este período se inocularon todos los tratamientos con 2500 huevos de *Meloidogyne* spp., depositando 5ml de la suspensión que los contenía, en un orificio efectuado en el centro y el fondo de cada vaso (15).

En esta etapa se empleó un diseño experimental completamente al azar para cada uno de los tres aislamientos, con seis tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento. La unidad experimental fue el vaso con 150g de suelo y la variable evaluada, la mortalidad causada por las diferentes dosis de cada uno de los aislamientos del hongo. Los estados juveniles (J2) recuperados mediante la extracción determinaron el grado de parasitismo del hongo sobre los huevos de *Meloidogyne* spp.

El porcentaje de mortalidad causado por el hongo en los diferentes tratamientos se calculó en relación con los juveniles presentes en el testigo y los datos obtenidos se corrigieron por la fórmula de Schneider-Orelli (9), la cual corrige los valores según la mortalidad del testigo.

$$\text{Mortalidad corregida} = \frac{b - k}{100 - k} \quad \langle\langle 2 \rangle\rangle$$

donde:

- b = % Individuos muertos tratamiento.
- K = % individuos muertos, sin tratamiento (testigo).

La evaluación de la DL50 se realizó a los 10 días de ser inoculados los nematodos, tomando el contenido de cada vaso por tratamiento y para cada uno de los aislamientos y procesándolo de acuerdo a la metodología del tamiz plástico-papel facial doble modificada por Baeza y Leguizamón (4), a partir del método del Filtro de algodón de Oostenbrink.

En esta metodología es necesaria la movilidad de las formas activas para su extracción, lo cual se utilizó como criterio de selección, ya que permite determinar el parasitismo del hongo en los huevos del nematodo. Esta consiste en pasar los 150g de suelo contenido en cada vaso por un tamiz de cocina a un recipiente plástico A, de 2L de capacidad, utilizando un chorro de agua a presión hasta completar 1,5L, el contenido del recipiente se agitó 20 segundos y posteriormente se dejó decantar 10 segundos. El sobrenadante se pasó a través de un tamiz de 44 micras a otro recipiente B. Este proceso se repitió tres veces, llevando previamente el contenido de B a A, sin adicionar agua. A un plato plástico se le adicionaron 250ml de agua y sobre éste se colocó un tamiz plástico cubierto con papel facial doble, donde se depositó a través de un pequeño chorro de agua la totalidad del material acumulado en el tamiz de 44 micras. Cuatro días más tarde la suspensión del plato plástico se depositó en un recipiente y se aforó el volumen a 80ml. La suspensión se homogeneizó en el momento de su uso con la ayuda de un agitador magnético.

De cada suspensión se tomaron dos muestras de 1ml para el recuento de las formas activas; los J2 se cuantificaron con la ayuda de una cámara para el recuento de nematodos y las observaciones se realizaron en microscopio óptico con objetivo 10x.

TERCERA ETAPA: Evaluación de diferentes dosis de inóculo del aislamiento V.c.78 en almacigo de café variedad Caturra para el control de *Meloidogyne* spp. En esta etapa se evaluó el control que ejerció el aislamiento Vc 78 de *V. chlamydosporium* sobre *Meloidogyne* spp. en condiciones de almacigo, en diferentes dosis. El control efectuado se comparó con el de un nematicida comercial aplicado en dosis recomendada para café (5). Las dosis se seleccionaron con base en los valores obtenidos para la DL50 en la etapa dos y se describen en la Tabla 2.

TABLA 2. Dosis en gramos de arroz colonizado del *de Verticillium chlamydosporium* (Vc 78) por 1700g de suelo, empleadas para el control de *Meloidogyne spp.* en almácigo de café variedad Caturra.

Tratamiento	g de Vc 78/1700g de suelo
1	12
2	6,0
3	3,0
4	1,5
5	0
6	Testigo químico

Como sustrato del ensayo se empleó suelo de la unidad Chinchiná esterilizado en autoclave durante 1 hora, a 120°C y 15PSI y una hora más al día siguiente, bajo iguales condiciones. Con el suelo estéril se llenaron materas de 1700g de capacidad. En cada matera se sembró una chapola de café variedad Caturra, y antes de cubrir la chapola con el suelo, alrededor de ésta, se depositó la cantidad de inóculo del hongo de acuerdo con el tratamiento. Después de 15 días de trasplantadas las chapolas, se inóculo el suelo con huevos de *Meloidogyne spp.* haciendo cinco orificios en el suelo alrededor de ella y depositando un mililitro de una suspensión que contenía 500 huevos/ml de huevos en cada uno de ellos, para un total de 2500 huevos por matera. Diez días después de la inoculación de los nematodos se aplicó el tratamiento químico carbofuran (Furadan 3G^{MR}) en dosis de un gramo de producto comercial por matera (5).

Las plantas se humedecieron diariamente y se fertilizaron con DAP, 2g/planta a los tres meses y con úrea a razón de 10g/litro en aplicación foliar, tres veces a partir del tercer mes cada 15 días, según prácticas de manejo de almácigos de café.

En esta etapa se empleó un diseño completamente al azar con seis tratamientos y 20 repeticiones por tratamiento. La unidad experimental la conformó una planta de café sembrada en una matera de 1700g de capacidad. Las

variables evaluadas fueron: el grado de infección y el peso seco de raíces.

La infección de las raíces ocasionada por el nematodo se calificó 130 días después del trasplante de las chapolas, utilizando la escala de calificación propuesta por la Universidad de Carolina del Norte (Estados Unidos) del proyecto internacional de *Meloidogyne* (30) y modificada por Leguizamón para café (21), (Tabla 3). Posteriormente se obtuvo el peso seco de las raíces.

Los datos obtenidos en la calificación se procesaron mediante un análisis de varianza unifactorial por rangos de Kruskal-Wallis, prueba descrita por Siegel y Castellán (33), en estadística no paramétrica. Los tratamientos se compararon mediante la ecuación 3, que ejecuta la prueba de comparación múltiple:

$$R_y - R_v \quad a/k \quad (k-1) \quad N(N+1) \quad 1 + 1$$

$$12 \quad n_u \quad n_v$$

$$\ll<3>>$$

donde:

- N = Número total de observaciones entre todos los tratamientos.
- n_u = Número de observaciones para el tratamiento u.
- n_v = Número de observaciones para el tratamiento v.
- $R_y - R_v$ = Diferencias de la media de los rangos de los tratamientos a comparar.
- Z= Valor de la abscisa de la distribución normal sobre el cual se ubica el porcentaje.
- a = Número de comparaciones posibles entre los tratamientos

Los valores obtenidos para el peso seco de raíces se procesaron mediante un análisis de varianza y la prueba de Tukey al 5%.

TABLA 3. Escala de calificación para la infección de *Meloidogyne*, modificada para café por Leguizamón (22).

Grado	Descripción del daño
Grado 1	Ausencia de daño.
Grado 2	Con una nudosidad y hasta el 10% de las raíces laterales afectadas. Sin daño en cuello o raíz pivotante.
Grado 3	Entre el 11 y el 25% de las raíces laterales con nudosidades. Cuello y raíz pivotante sin daño.
Grado 4	Entre el 26 y el 50% de las raíces laterales con nudosidades. Ataque en la raíz pivotante, cuello sin daño, presencia ocasional de masas de huevos.
Grado 5	Entre el 51 y 75% de las raíces laterales con nudosidades. Ataque en la raíz pivotante, menos del 50% del perímetro del cuello afectado, presencia de masas de huevos externas.
Grado 6	Más del 76% de las raíces laterales con nudosidades. Ataque en la raíz pivotante, más del 50% del perímetro del cuello afectado (tejido suberizado), presencia de masas de huevos externas.

CUARTA ETAPA: Persistencia de *Verticillium chlamydosporium* aislamiento 78, en el suelo y evaluación de su patogenicidad a través del tiempo. En esta etapa se determinó la capacidad de establecimiento en suelo del aislamiento Vc 78, bajo condiciones de almácigo. Los valores de las UFC/g recuperadas en los diferentes tiempos de evaluación se analizaron mediante un modelo de regresión lineal simple, y se comparó la patogenicidad de los aislamientos recuperados a través del tiempo mediante análisis de varianza y prueba de Tukey al 5%.

Cuantificación de *Verticillium chlamydosporium* aislamiento 78 por gramo de suelo. Con el fin de realizar el recuento de unidades formadoras de colonias se tomó una muestra de 500g de suelo de una planta elegida al azar del tratamiento uno (12g de arroz colonizado por Vc 78/1700g de suelo) en el momento de la inoculación del hongo al almácigo (tiempo 0); de esta muestra se tomaron cinco submuestras de 50g y se prepararon diluciones seriadas en ADE hasta la dilución 10^4 , de la cual se sembraron 10 cajas en medio PDA, por el método de siembra en

superficie. Las cajas se incubaron a 25 °C, en oscuridad, durante 15 días. Después de este tiempo se efectuó el recuento de las UFC de *V. chlamydosporium* en cada caja y se estimó el número de éstas por gramo de suelo. Este procedimiento se repitió en todos los tiempos de evaluación.

Evaluación de la patogenicidad de *Verticillium chlamydosporium*, aislamiento 78, en los tiempos: 0, 45 y 90 días después de inoculado al suelo. Se purificaron e incrementaron en arroz cinco aislamientos de Vc 78, de los recuperados en la evaluación de la persistencia del hongo en el suelo en cada tiempo de evaluación. Después de 30 días se determinó para cada aislamiento la concentración de esporas por mililitro y se ajustó a una concentración de 5×10^7 esporas/ml. Los huevos de *Meloidogyne* spp. se obtuvieron según la metodología de Hussey y Barker citado por Giraldo *et al.* (16), ajustando la suspensión hasta obtener una concentración de 200 huevos/ml de agua destilada estéril (ADE). Se empleó el mismo procedimiento descrito para las pruebas de patogenicidad *in vitro*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas de patogenicidad *in vitro* sobre huevos de *Meloidogyne* spp. El análisis de varianza para la variable huevos de *Meloidogyne* spp. recuperados detectó diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$) entre el aislamiento *Vc 78* y los aislamientos *Vc 25*, *Vc 72* y el testigo. Los aislamientos *Vc 25*, *Vc 72* y *Vc 78* redujeron significativamente el número de huevos de *Meloidogyne* spp., resultando mayor la reducción con el aislamiento *Vc 78*, tal como se aprecia en la Tabla 4.

Se detectaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$) (Tabla 5), con la variable porcentaje de mortalidad, entre el aislamiento *Vc 78* y los aislamientos *Vc 25*, y *Vc 72*. El aislamiento *Vc 78* mostró mayor control sobre *Meloidogyne* spp. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los trabajos realizados por Leij y Kerry (24), con diferentes aislamientos de *V. chlamydosporium*, donde registra marcadas diferencias entre ellos según el criterio de patogenicidad. Sin embargo, es importante tener en cuenta al seleccionar un aislamiento por patogenicidad *in vitro*, la opinión de otros autores entre ellos Rodríguez-Kabana *et al.* (29), quienes mencionaron cómo las pruebas *in vitro*

TABLA 4. Número de huevos de *Meloidogyne* spp. observados después de permanecer 7 días en contacto con una suspensión acuosa de 5×10^7 esporas/ml esporas de los aislamientos *Vc 25*, *Vc 72* y *Vc 78* de *Verticillium chlamydosporium*.

Aislamiento	N° de huevos de <i>Meloidogyne</i> Spp.
<i>Vc 25</i>	31,3 b *
<i>Vc 72</i>	32,4 b
<i>Vc 78</i>	24,9 c
Testigo (sin inocular)	105,8 a

* Letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey al 5%.

Tratamientos corregidos con base en la población testigo. Coeficiente de Variación experimental = 8,04%.

TABLA 5. Porcentaje (%) de mortalidad de huevos de *Meloidogyne* spp. observado después de permanecer 7 días en contacto con una suspensión acuosa de 5×10^7 esporas/ml de los aislamientos *Vc 25*, *Vc 72* y *Vc 78* de *Verticillium chlamydosporium*.

Aislamiento	% de mortalidad de huevos de <i>Meloidogyne</i> spp.
<i>Vc 25</i>	70,41b*
<i>Vc 72</i>	69,37b
<i>Vc 78</i>	76,46c
Testigo (sin inocular)	00,0c

* Letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey al 5%.

Tratamientos corregidos con base en la población testigo.

Coeficiente de Variación experimental = 9,47 %.

sólo sirven para preseleccionar aislamientos y no para medir su nivel de competencia con otros microorganismos del suelo, o para evaluar la capacidad de colonización de huevos en condiciones naturales.

Con el fin seleccionar el aislamiento con mayor potencial y evaluarlo en condiciones de almácigo se realizaron pruebas de patogenicidad *in vivo* con los tres aislamientos, para contar con otro criterio de selección, ya que los porcentajes de mortalidad en las pruebas *in vitro* fueron superiores al 60%.

Estimación de la DL50 de *Verticillium chlamydosporium* sobre huevos de *Meloidogyne* spp. En la Tabla 6 se observa cómo a medida que se incrementó la dosis de arroz colonizado por *V. chlamydosporium*, en cada uno de los aislamientos evaluados, se redujo la población de estadios juveniles de *Meloidogyne* spp. en el suelo.

Los porcentajes de mortalidad obtenidos para los aislamientos *Vc 25*, *Vc 72* y *Vc 78* no se sometieron a análisis probit, ya que en la mayoría de las dosis evaluadas los porcentajes de mortalidad fueron superiores al 50%, como se aprecia en la Tabla 7.

TABLA 6. Promedio del número de estadios juveniles de *Meloidogyne* spp. extraídos de suelo inoculado con diferentes dosis de los aislamientos Vc 25, Vc 72 y Vc 78 de *Verticillium chlamydosporium* en sustrato de arroz.

Dosis (g arroz colonizado)	A25 J2/150 g suelo	A72 J2/150 g suelo	A 78 J2/150 g suelo
0	800,6	1425,0	1583,0
2	558,0	452,2	306,5
4	285,4	368,0	210,2
8	275,5	239,0	207,0
16	99,9	125,8	102,5
32	98,0	36,0	83,5

Vc 25 concentración de $3,9 \times 10^8$ esporas / g de arroz,

Vc 72 concentración de $1,8 \times 10^8$ esporas / g de arroz,

Vc 78 concentración de $4,8 \times 10^8$ esporas / g de arroz.

TABLA 7. Porcentaje (%) de mortalidad corregida por el testigo de estadios juveniles de *Meloidogyne*spp, de suelo inoculado con diferentes dosis de los aislamientos Vc 25, Vc 72 y Vc 78 de *Verticillium chlamydosporium* en sustrato de arroz.

Dosis (g arroz colonizado)	% de Mortalidad Vc 25	% de Mortalidad Vc 72	% de Mortalidad Vc 78
0 (Testigo)	0,0	0,0	0,0
2	30,30	68,26	80,63
4	64,35	74,17	86,92
16	87,52	91,17	93,52
32	87,75	97,47	94,72

Con base en los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad *in vivo* e *in vitro*, se seleccionó el aislamiento Vc 78 (1g/150g de suelo) para evaluarlo en condiciones de almácigo. Se realizaron las conversiones para 1700g de suelo y a partir de este valor, se evaluaron tres dosis menores.

La dosis evaluada en almácigo se encuentra dentro de los rangos aceptados según Backman y Rodríguez (3), quienes exponen cómo los tratamientos con agentes de control biológico que excedan a 200kg/ha tienen que ser evitados por los inconvenientes costos de producción, prácticas de almacenamiento y las técnicas de aplicación; Kerry *et al.* (18), mencionan cómo los porcentajes de aplicación pueden ser reducidos si los agentes de control proliferan después de ser introducidos en el suelo, lo cual sería una ventaja de *V. chlamydosporium*.

Evaluación de diferentes dosis de inóculo del aislamiento Vc 78 en almácigo de café para el control de *Meloidogyne* spp. Grado de infección. En las pruebas de comparación múltiple del análisis de varianza unifactorial por rangos de Kruskal-Wallis, se detectaron diferencias estadísticas ($P > 0,05$) entre el grupo de tratamientos 12g, 6g, 3g, y 1,5g del hongo y el tratamiento químico con el tratamiento testigo inoculado con nematodos. No hubo diferencias en el grado de infección entre las dosis aplicadas, las cuales fueron estadísticamente iguales al nematocida. Todas las dosis redujeron significativamente el grado de infección radical causado por el nematodo a las plantas de café (Tabla 8).

La aplicación dirigida del inóculo del nematodo alrededor de las raíces de las plántulas de café fue una condición favorable para la

TABLA 8. Numero de plántulas de café variedad Caturra por grados de infección por *Meloidogyne* spp. Después de 130 días de ser inoculadas con diferentes dosis de *Verticillium chlamydosporium* (Vc 78).

Tratamiento	Número Repetición	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5	Grado 6
1 (12g)	20	19	-	1	-	-	-
2 (6g)	20	16	2	-	2	-	-
3 (3g)	20	16	3	-	1	-	-
4 (1,5g)	20	8	-	-	9	2	1
5 (0g)	20	-	-	-	-	3	17
Químico	20	16	-	2	2	-	-

infección, y de mayor exigencia para que el hongo realizara su control.

Las dosis superiores a 3g de arroz colonizado por el hongo probadas bajo condiciones de almácigo de café redujeron la infección por *Meloidogyne*, obteniéndose un mayor número de plantas con grados de infección 1, comparados con el testigo, el cual presentó un mayor número de plantas con grado de infección radical 6. Sin embargo, con la dosis de 1,5g, el mayor número de plántulas estuvo en el grado de infección 4 siendo éste más bajo que el obtenido en el testigo.

Peso seco de raíces. Para esta variable los tratamientos inoculados con dosis superiores a 3g de arroz colonizado por el hongo presentaron diferencias estadísticas ($P > 0,05$) con el tratamiento químico y con el tratamiento testigo, presentando los mayores pesos promedio, lo cual permite seleccionarlos como los mejores tratamientos (Tabla 9).

El tratamiento inoculado con 1,5g de arroz colonizado por el hongo y el tratamiento químico, presentaron los más bajos pesos en promedio para esta variable, resultando estadísticamente similar con el tratamiento testigo.

El control efectuado por el producto químico fue estadísticamente similar al observado en los mejores tratamientos, lo cual demuestra que *V. chlamydosporium* es efectivo en esta etapa del cultivo de café para el control de *Meloidogyne* spp.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Campos *et al.* (11), en el control de *Meloidogyne* spp. en Feijoa (*Feijoa sellowiana*, Berg), Leij y Kerry (24), en el control de *M. incognita*, *M. hapla* y *M. javanica*, en tomate y Mertens y Stirling (27), en el control de *Meloidogyne* spp. en uva (*Vitis vinifera*) y kiwi (*Actinidia deliciosa*).

Persistencia de *Verticillium chlamydosporium*, aislamiento 78, y evaluación de su patogenicidad a través del tiempo. Cuantificación de *Verticillium chlamydosporium* por gramo de suelo. Los resultados de los análisis de regresión muestran una pérdida de 587 UFC/día del hongo en el suelo a medida que transcurre el tiempo después de su inoculación en el almácigo, como se observa en la Tabla 10. Esta pérdida puede ser explicada por la técnica de recuperación. Al respecto Rodríguez-Kabana *et al.* (29),

TABLA 9. Peso seco promedio de las raíces de café var. Caturra inoculadas con diferentes dosis de *Verticillium chlamydosporium* (Vc 78).

Tratamiento	Número de Repeticiones	Peso en gramos
1 (12g)	20	0,1710a*
2 (6g)	20	0,1745a
3 (3g)	20	0,1655a
4 (1,5g)	20	0,1550ab
5 (0g)	20	0,1270b
Químico	20	0,1505ab

* Letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey al 5%.

Coefficiente de variación experimental = 20,42%

en trabajos de campo, encontraron que no es posible recuperar todo el hongo del suelo empleando la metodología de diluciones, y explica cómo algunas de las estructuras reproductivas pueden estar en forma de clamidiosporas en el momento de determinar los niveles de presencia del hongo en el suelo.

Otros autores, entre ellos Leij y Kerry (24), mencionan que el crecimiento de *V. chlamydosporium* en la rizosfera puede ser afectado por factores que inciden en el crecimiento de la planta, como la humedad o la intensidad de la luz. Estos resultados concuerdan con los expuestos por Leij y Kerry (25) quienes registran una permanencia del hongo en el suelo por más de 123 días.

Determinación de la patogenicidad de los aislamientos de *Verticillium chlamydosporium*, aislamiento 78, recuperados del suelo 0,45 y 90 días después de inoculado en el almácigo.

El parasitismo sobre huevos del nematodo mostrado por el hongo en el tiempo cero de la evaluación, no presentó diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$), con el tiempo 45 y 90 días, conservando los porcentajes de patogenicidad superiores al 80% en todos los tiempos de evaluación, como se puede observar en la Tabla 11.

No se realizó esta prueba para los aislamientos del hongo recuperados 130 días después de inoculado debido al alto grado de contamina-

TABLA 10. Unidades Formadoras de Colonia (UFC) del aislamiento Vc A78 recuperadas 0, 45, 90 y 130 después de la inoculación en el suelo del almácigo.

Día	U F C x 10 ⁴
0	813
40	709
90	504
130	450

Ecuación de regresión estimada
 $Y = 16,3084 - 0,0587x10^4 \times X$ $R^2: 61,83$

TABLA 11. Patogenicidad del aislamiento Vc 78 de *Verticillium chlamydosporium* recuperado 0, 45, 90 y 130 después de la inoculación en el suelo del almácigo.

Día	Patogenicidad (%)
0	85,32
45	84,36
90	83,29

ción que presentaron las cajas por otros microorganismos presentes en las muestras de suelo tales como *Penicillium* y *Trichoderma*.

Se debe investigar la interacción del hongo con otros microorganismos benéficos del suelo, así como su compatibilidad con los agroquímicos empleados en las diferentes prácticas del cultivo del café. Así mismo, la búsqueda y selección de nuevos aislamientos patogénicos a *Meloidogyne* spp. en diferentes regiones geográficas y condiciones naturales, permitirán disponer de un cepario amplio con el cual contrastar la información del aislamiento Vc 78

Es necesario realizar estudios con respecto a la formulación del hongo y producción industrial, para evitar el empleo de dosis altas y aprovechar eficientemente su potencial parasítico; además, se deben realizar estudios básicos sobre la ecología del hongo que permitan obtener un mejor conocimiento del comportamiento que presenta bajo condiciones de campo, y la influencia que tienen los diversos factores ambientales en el control que realiza sobre el nematodo, criterios que permitirán la incorporación de este hongo en los programas de manejo integrado de *Meloidogyne* spp.

LITERATURA CITADA

1. ANTIA L., O.P.; POSADA F., F.; BUSTILLO P., A.E.; GONZALEZ G., M.T. Producción en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. Avances Técnicos Cenicafé No 182: 1-12. 1992.

2. ARANGO B., L.G. Estudio del proceso infectivo y la histopatología del complejo de nematodos *Meloidogyne incognita-Meloidogyne javanica* sobre plantas del café. Bogotá. Universidad Nacional-ICA, 1977. 37p. (Tesis: Magister Science)
3. BACKMAN, P.A.; RODRIGUEZ K., R.A. A system for the growth and delivery of the biological control agents to the soil. *Phytopathology* 65: 819-821. 1975.
4. BAEZA A., C.A.; LEGUIZAMÓN C., J.E. Evaluación de cuatro métodos de extracción de formas activas de nematodos del suelo. *Cenicafé* 24(4): 90-99. 1973.
5. BAEZA A., C.A.; LEGUIZAMÓN C., J.E. Evaluación de nematicidas para el control de *Meloidogyne exigua* Goeldi en plántulas de *Coffea arabica* var. Caturra. *Cenicafé* 28(3): 108-116. 1977.
6. BAEZA A., C.A.; LEGUIZAMÓN C., J.E. Síntomas debidos a nematodos de las especies de *Meloidogyne* en café. *Avances Técnicos Cenicafé* No 90: 1-4. 1979.
7. BARKER, K.R. An advanced treatise on *Meloidogyne*. International *Meloidogyne* project. Vol 2. North Caroline State. p. 127-134. 1985.
8. BARRIGA, R. Reports by regional investigators : B. South América *In: International Meloidogyne* project. Proceedings of the research planning conference on root knot nematodes *Meloidogyne* spp. N.C.J.U. USA ; 1976, p. 7-9
9. BLEIHOLDER, H. Methods for the layout and evaluation of field trials. 2. ed., BASF Aktiengesellschaft, 1989. p.163.
10. BRADY, N. C. Agricultural research and food production. *In: SASSER, J. N.; CARTER, C. C. An advanced treatise of Meloidogyne*. vol 1. Raleigh, North Caroline State University, 1985. p. 3-12.
11. CAMPOS, V.; SIVAPALAN, P.; GNAPRAGASAM, N. C. Nematodes parasites of coffee, cocoa and tea. *In: LUC, M.; SIKORA, R. and BRIDGE, J. eds. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. St. Albans. C. A. B. International. Institute of Parasitology. 1990. p. 387-401.
12. CARDONA B., N.L. Aislamiento de hongos y bacterias y pruebas de patogenicidad al nematodo del nudo radical del café *Meloidogyne* spp. Goeldi. Manizales, Universidad de Caldas. Facultad de Agronomía, 1995. 129p. (Tesis: M.Sc. en Fitopatología).
13. HIRSCHMANN H. ; EISENBACK, D.J.D. Root knot nematodes : *Meloidogyne* species and races *In: Nickle, M.R. Manual of Agricultural Nematology*. New York Marcel Dekker inc. 1991 p. 191-275.
14. FIGUEROA M. A. Reconocimiento de nematodos en almácigos de café. *Investigaciones Agrícolas* 3 (1): 26-29. 1989.
15. GIRALDO F., M.A. Evaluación de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson. en el control de *Meloidogyne* spp. Goeldi en almácigos de café (*Coffea arabica* L). Manizales, Colombia, Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 1996. 102p. 82 Refs. Esp. (Tesis : Ingeniero Agrónomo).
16. GIRALDO F., M.A.; LEGUIZAMÓN C., J.E.; CHÁVES C., B. Evaluación de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson. para el control de *Meloidogyne* spp. Goeldi, en almácigos de café (*Coffea arabica* L). Variedad caturra. *Fitopatología Colombiana* 21(2): 104-117. 1998.
17. KERRY, B. R.; SIMON, A.; ROVIRA, A.D. Observations on the introduction of *Verticillium chlamydosporium* and other parasitic fungi into soil for control of the cereal cyst - nematode *Heterodera avenae*. *Ann Appl. Biol.* 105: 509-516. 1984
18. KERRY, B. R.; SIMON, A.; ROVIRA, A.D.; BROWN, N. H. Principles and practices of nematode control in crops. Sidney. Academic Press. 1987. 447p.
19. KUMAR, A.C. Evaluation of nemacur 5g against the coffee root-lesion nematode *Pratylenchus coffeae*. *Journal of Coffee Research* 12(1);1-7, 1982. 3 Refs. Ing.
20. LEGUIZAMÓN C., J.E. ; LOPEZ D., S. Nematodos en plantaciones de café en Colombia. *Avances Técnicos Cenicafé* No. 20: 1-4. 1972.
21. LEGUIZAMÓN C., J.E. Efecto de *Meloidogyne* spp. en plantaciones establecidas de café var. Caturra. *In: Centro Nacional de Investigaciones de Café. Informe anual de actividades Disciplina Fitopatología 1991-1992*. Chinchiná, Cenicafé, 1991. (Proyecto PAT-0305)
22. LEGUIZAMÓN C., J.E. Efecto de *Meloidogyne* spp. en plantaciones establecidas de café variedad Caturra. *In : Centro Nacional de Investigaciones de Café. Informe anual de la Disciplina de Fitopatología. Octubre 1992 - Septiembre 1993*. Chinchiná, Cenicafé, 1993. sp. (Proyecto PAT- 0305).

23. LEGUIZAMON C., J.E. Efecto de *Meloidogyne* spp. en plantaciones establecidas de café variedad Caturra. In : Centro Nacional de Investigaciones de Café. Informe anual de la Disciplina de Fitopatología. Octubre 1996 - Septiembre 1997. Chinchiná, Cenicafé, 1997. sp. (Proyecto PAT- 0305).
24. LEIJ, F.A.A.M. ; KERRY, B.R. The nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. Revue de Nematologie 14: 157-164. 1991.
25. LEIJ, F.A.A.M. ; KERRY, B.R. The significance of ecology in the development of *Verticillium chlamyosporium* as a biological control agent against root-knot nematodes. Wageningen, Van de Landbouw Universitet Wageningen, 1992. 27p.
26. MAI, W.F. Plant parasitic nematodes : their threat to agriculture. An advanced treatise on *Meloidogyne*. International *Meloidogyne* project. Vol 2. North Caroline State. p.11-17. 1985.
27. MERTENS, M.C.A.; STIRLING, G.R. Parasitism of *Meloidogyne* spp on grape and kiwifruit by the fungal egg parasites *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamyosporium*. Nematologica 39: 400-410 1993.
28. MORGAN-JONES, G.; GODOY, G.M.; RODRIGUEZ-KABANA, R. *Verticillium chlamyosporium*, fungal parasite of *Meloidogyne arenaria* females. Nematropica 11: 115-119. 1981.
29. RODRIGUEZ-KABANA, R.; GODOY, G.; GINTIS, B.O. Effectiveness of species of *Gliocladium*, *Paecilomyces* and *Verticillium* for control of *Meloidogyne arenaria* in field soil. Nematropica 14(2): 155-169. 1984.
30. SASSER, J.N.; TAYLOR, A.L. Biology identification and control of root knot nematode. Raleigh, North Carolina State University. 1978. 130p.
31. SASSER, J.N.; CARTER, C.E. Eds. An advanced treatise on *Meloidogyne*. Biology and control. In: International *Meloidogyne* project. Vol.1. North Caroline State University graphics. p. 303-308. 1985.
32. SAYRE, R.M. Influencial factors on biological control of plant parasitic nematodes. Annual Review of Phytopathology 29:149-166. 1991.
33. SIEGEL, S ; CASTELLAN, N.J. Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. México, Trillas, 1995. 437p.