

ASPECTOS BIOLÓGICOS DE AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* sp. ANTAGÓNICOS A *Rosellinia bunodes*

Jenny Caroline Valencia -Abello*; Bertha Lucía Castro-Caicedo**

RESUMEN

Valencia A., J.C.; Castro C., B.L. Estudio de algunos aspectos biológicos de aislamientos de *Trichoderma* sp. antagonísticos a *Rosellinia bunodes*. Cenicafé 55 (1):16-28. 2004.

Se determinó *in vitro* la tasa de crecimiento diametral, la esporulación y la germinación de aislamientos de *Trichoderma* sp., bajo tres condiciones de temperatura, luz y pH. Se utilizaron colonias en PDA y dos concentraciones de inóculo en sustrato de arroz. Se seleccionaron los de mejor efecto evaluándolos luego en invernadero contra *R. bunodes*. El análisis estadístico mostró mayor crecimiento diametral de los aislamientos de *Trichoderma* sp. a 26°C, con 0, 8 y 12 horas de luz al octavo día después de la siembra del hongo. Los aislamientos T-10, T-Rb y T-Nim produjeron 10,6; 14,7 y 48,3 x 10⁷ esporas por caja de Petri, y 92, 76 y 80% de germinación a 26°C, con 8 horas de luz/16 horas de oscuridad; 30°C con 0 horas de luz/24 horas de oscuridad y 21°C con 8 horas de luz/16 horas de oscuridad, respectivamente. No hubo diferencias entre los valores de pH de 4, 5 y 6 y las concentraciones de inóculo (1x10⁶ y 1x10⁸) esp/ml por gramo de arroz. En invernadero hubo infección de *R. bunodes* en raíces de chapolas de café del 20 al 28%, cuando se trataron con aislamientos de *Trichoderma* sp. (T-Nim, T-Mac-lis, T-Nar-ver, T-10, T-Rb, T-1, y T-Valdepeñas), mientras que el testigo de referencia presentó el 64%, treinta días después de la inoculación del patógeno y el antagonista a la siembra de chapolas.

Palabras claves: Crecimiento diametral, esporulación, germinación, *Trichoderma*, *Rosellinia bunodes*, control biológico, llaga negra del caféto

ABSTRACT

The average diametrical growth rate, sporulation rate and germination percentage of several *Trichoderma* sp. isolates with two inoculum concentrations was determined under three temperature, light and pH conditions *in vitro*. PDA colonies and two inoculum concentrations in rice substrates were used. The best treatments were later evaluated against *R. bunodes* under greenhouse conditions. The statistic analysis showed higher diametrical growth rate of *Trichoderma* sp. reached at 26°C, with 0.8 and 12 light/dark hours, eight days after sowing the fungi in PDA plates. The isolates T-10, T-Rb and T-Nim showed a spore production/Petri plate of 10,6x10⁷; 14,7x10⁷; 48,3x10⁷ and germination rates of 92, 76 and 80% at 26°C, 8:16 light/dark hours; 30°C, 0:24 light/dark hours and 21°C, 8:16 light/dark hours, respectively. There were no statistical differences between the pH conditions of 4, 5 and 6 and the inoculum concentrations (1x10⁶ and 1x10⁸) spores/ml/g of rice. Under greenhouse conditions infection rates of *R. bunodes* in coffee seedling roots were registered when treated with *Trichoderma* sp. isolates (T-Nim, T-Mac-lis, T-Nar-ver, T-10, T-Rb, T-1 and T-Valdepeñas) between 20-28%, whereas the reference treatment presented 64% of infection, thirty days after settlement of the pathogen and antagonist in the soil, before sowing the coffee seedlings.

Keywords: Diametrical growth, sporulation, germination, *Trichoderma*, *Rosellinia bunodes*, biological control, coffee root rots.

* Bacterióloga. Año rural. Pontificia Universidad Javeriana.

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

Rosellinia bunodes es considerado un patógeno del suelo de gran importancia y causa la enfermedad conocida como "llaga negra", no sólo en café sino también en otros cultivos ocasionando daños de consideración y grandes dificultades en su manejo (1).

Durante los últimos años esta enfermedad se ha incrementado en la zona cafetera colombiana especialmente en áreas de establecimiento de cultivos tecnificados y eliminación de árboles de sombrío. El crecimiento de focos ocasionados por el patógeno con la consecuente destrucción de árboles en plena producción causa preocupación entre los agricultores; además, la inutilización de éstas áreas debido a la contaminación y al riesgo de infección de las nuevas siembras que ocasionarían grandes pérdidas económicas (9).

El control biológico se presenta como alternativa importante para el manejo de las llagas radicales. Se ha demostrado que especies de hongos benéficos como *Trichoderma* sp., tienen un efecto controlador sobre el patógeno evitándose así la utilización de fungicidas que contaminan el ambiente y afectan a la fauna y al hombre, con lo cual se favorece en el largo plazo el mantenimiento del equilibrio en el sistema de producción, costos más bajos y la protección del ecosistema cafetero (7).

Trabajos adelantados en Cenicafé por autores como Esquivel *et al.* (5), Castro (4) y López (9), indican que el manejo de *R. bunodes* utilizando el antagonista *Trichoderma* sp., es promisorio en sistemas de producción cafeteros, bien sea como un componente de los sistemas integrales de manejo de enfermedades o mediante el desarrollo de fungicidas biológicos. Los objetivos propuestos en este trabajo consistieron en optimizar las condiciones de crecimiento del hongo *Trichoderma* sp. en laboratorio mediante evaluaciones de temperatura, luz y pH en cajas de petri con medio de cultivo papa - dextrosa - agar (PDA) y sustrato

de arroz para ser aplicado contra el hongo *R. bunodes* en invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo en los laboratorios e invernaderos de la Disciplina de Fitopatología de Cenicafé y se desarrolló en cinco fases que a continuación se describen:

Obtención del patógeno *Rosellinia bunodes*. Se aisló de raíces infectadas por el patógeno, que presentaron síntomas y signos típicos de la enfermedad, según metodología descrita por Valencia (15). El inóculo para incorporar al suelo en los ensayos posteriores se cultivó en semilla de sorgo, según metodología descrita por Castro (3).

Obtención de aislamientos de *Trichoderma* sp. A partir de suelo procedente de cafetales con o sin presencia de la enfermedad como de raíces de árboles de café afectadas por *R. bunodes*, según metodología descrita por Castro (4) y Esquivel (*et al.*, 5). También se incluyeron los aislamientos: T-Nim (de raíces del árbol de Neem *Azadirachta indica*, de la subestación de Naranjal afectadas por llaga negra y T-10 (de raíces de cafetos afectados por llaga negra de una finca del Municipio de Palestina, Caldas) y referenciados en anteriores trabajos con buen nivel antagonístico contra *R. bunodes* (4, 5).

PRUEBAS DE LABORATORIO

PRIMERA FASE: Efecto de la temperatura y la luz. Se utilizaron tres aislamientos de *Trichoderma* sp. (T-10, T-Nim y T-Rb). Inicialmente, se evaluaron a 21°C interactuando con tres períodos de luz/oscuridad, durante 11 días, luego a 26°C y finalmente a 30°C. A partir de un cultivo puro en PDA de 8 días de edad se hizo dilución de 1×10^5 esporas/ml. Se tomó una

gota de 5ml que se depositó en el centro de cajas de Petri con PDA y se colocaron en cámara bioclimática a las temperaturas antes mencionadas. Se utilizó un diseño completamente aleatorio con arreglo factorial 3 x 3, con 3 aislamientos y 3 condiciones de luz/oscuridad, siendo la caja de Petri la unidad experimental, con 5 repeticiones por tratamiento (Tabla 1). Se seleccionaron las condiciones de temperatura y horas luz que le permitieron a cada aislamiento obtener alta producción de esporas y germinación de éstas cercana al 100%.

SEGUNDA FASE: Efecto del pH. Con cada uno de los tres aislamientos de *Trichoderma* sp. de 8 días de edad, se preparó una concentración de 1×10^5 esp/ml y se tomó una alícuota de 5ml que se depositó en el centro de cajas de Petri con PDA ajustadas a pH de 4,0, 5,0 y 6,0, las cuales se llevaron a cámara bioclimática bajo las condiciones de luz y temperatura óptimas encontradas en el ensayo anterior. Se utilizó un diseño completamente aleatorio con arreglo factorial 1 x 3, con 1 aislamiento y 3 condiciones de pH, siendo la caja de Petri la unidad experimental, con 5 repeticiones por tratamiento (Tabla 2). Se escogió el pH que

permitió obtener los mejores resultados de esporulación y germinación.

TERCERA FASE: Producción y germinación de esporas en sustrato de arroz. Se utilizó arroz contenido en bolsas apropiadas para tratamiento en autoclave, en proporción de 100g/100ml de agua destilada estéril. Este material se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 120°C. Se inoculó con el hongo previamente preparado, bajo las condiciones óptimas de temperatura, luz y pH en PDA según resultados obtenidos anteriormente, en concentraciones de 1×10^6 y 1×10^8 esp/ml por gramo de arroz, adicionando en cada bolsa 1ml de cada concentración. Las bolsas se mantuvieron bajo las mismas condiciones de temperatura y luz encontradas para su crecimiento en cajas de Petri, hasta observar el cubrimiento total de los granos de arroz por el hongo. Se utilizó un diseño completamente aleatorio con arreglo factorial 1x2, con 1 aislamiento y 2 concentraciones de inóculo, siendo la bolsa la unidad experimental, con 5 repeticiones por tratamiento (Tabla 3). Se seleccionó la concentración de inóculo que proporcionó mayores resultados de esporulación y germinación.

Tabla 1. Tratamientos para evaluar el efecto de temperatura y luz sobre el crecimiento de los aislamientos de *Trichoderma* sp.

Tto	Aislamiento	Luz/Osc (horas)
1	<i>Trichoderma</i> -10	12/12
2	<i>Trichoderma</i> -Nim	12/12
3	<i>Trichoderma</i> -Rb	12/12
4	<i>Trichoderma</i> -10	0/24
5	<i>Trichoderma</i> -Nim	0/24
6	<i>Trichoderma</i> -Rb	0/24
7	<i>Trichoderma</i> -10	8/16
8	<i>Trichoderma</i> -Nim	8/16
9	<i>Trichoderma</i> -Rb	8/16

Tabla 2. Tratamientos para evaluar el efecto del pH sobre el crecimiento de los aislamientos de *Trichoderma* sp.

Tto	Aislamiento	T°	Luz/osc	pH
1	<i>Trichoderma</i> -Nim	21	8/16	4,0
2	<i>Trichoderma</i> -Nim	21	8/16	5,0
3	<i>Trichoderma</i> -Nim	21	8/16	6,0
4	<i>Trichoderma</i> -10	26	8/16	4,0
5	<i>Trichoderma</i> -10	26	8/16	5,0
6	<i>Trichoderma</i> -10	26	8/16	6,0
7	<i>Trichoderma</i> -Rb	30	0/24	4,0
8	<i>Trichoderma</i> -Rb	30	0/24	5,0
9	<i>Trichoderma</i> -Rb	30	0/24	6,0

Tabla 3. Tratamientos para evaluar la esporulación y germinación de esporas en sustrato de arroz.

Tto	Aislamiento	Conc (esp/ml)*g arroz
1	<i>Trichoderma</i> -Nim	1X10 ⁶
2	<i>Trichoderma</i> -Nim	1X10 ⁸
3	<i>Trichoderma</i> -10	1X10 ⁶
4	<i>Trichoderma</i> -10	1X10 ⁸
5	<i>Trichoderma</i> -Rb	1X10 ⁶
6	<i>Trichoderma</i> -Rb	1X10 ⁸

CUARTA FASE: Evaluación y selección de otros aislamientos de *Trichoderma* sp. Se evaluaron otros aislamientos con las mejores condiciones de temperatura, luz y pH encontradas en anteriores pruebas, en cajas de Petri, con el fin de obtener información sobre la variabilidad entre ellos. A partir de la concentración 1x10⁵esp/ml del hongo se tomó una alícuota de 5ml que se depositó en el centro de las cajas de Petri con PDA ajustadas a pH = 5,0 y se colocaron en cámara bioclimática. Se evaluaron a 21 y 26°C, con 8 horas luz/16 horas de oscuridad y 30°C con 0h luz/24h oscuridad durante 8 días, cada una. Se utilizó un diseño completamente aleatorio con la caja de Petri como unidad experimental y 5 repeticiones por tratamiento (Tabla 4). Se seleccionaron los aislamientos que presentaron alta producción de esporas y germinación de éstas cercana al 100%.

VARIABLES DE RESPUESTA. a) Tasa media de crecimiento diametral de la colonia. Se midió con un noniómetro de precisión (0,02 mm) marca Mitutoyo, a partir de las 48 horas después de la siembra, cada 24 horas hasta completar 90 mm correspondientes a la caja de Petri. Los resultados se dieron en mm/día (13).

b) Producción de esporas. Se evaluó a los 5, 8 y 11 días después de la siembra en las cajas de Petri y en sustrato de arroz. A cada caja se adicionaron 30ml de agua destilada estéril raspando con una asa de argolla su contenido y llevando el material colectado a erlenmeyeres de 100 ml. Esta solución madre se homogeneizó en un vórtex durante 1 minuto y se realizaron diluciones en tubos de ensayo hasta que fue posible el conteo de esporas (hasta 10⁻³). De esta suspensión se tomó una alícuota la cual se llevó a la cámara de Neubauer en donde se realizó el conteo de esporas utilizando el cuadrante central (6, 16). Con respecto a la producción de esporas en sustrato de arroz se siguió la metodología descrita por Vélez *et al.* (16).

c) Germinación. Se evaluó a los 5, 8 y 11 días después de la siembra en las cajas de Petri y en sustrato de arroz. Para ello se utilizó la dilución 10⁻³ de cada submuestra preparada en la prueba de esporulación, se tomaron 5ml que se inocularon en cada caja con agar-agua al 1,5%

Tabla 4. Descripción de los aislamientos de *Trichoderma* sp. evaluados en la cuarta fase del experimento.

Aislamiento	Procedencia	Características colonia
T-Mac lis	Raíces macadamia afectadas por <i>R. pepo</i> Chinchiná (Caldas)	Compacta, lisa, verde
T-Mac gr	Raíces macadamia afectadas <i>R. pepo</i> Chinchiná (Caldas)	Granulosa, verde
T-Nar am	Suelo Estación Central Naranjal - Cenicafé	Compacta, amarilla-verdosa
T-Nar ver	Suelo Estación Central Naranjal - Cenicafé	Granulosa, verde
T-95	Suelo Inglaterra (Lab Fitopatología - Cenicafé)	Granulosa, verde
T-1	Raíces café afectadas <i>R. bunodes</i> (Lab - Cenicafé)	Algodonosa, verde
T-x	Raíces café afectadas <i>R. bunodes</i> Chinchiná (Caldas)	Granulosa, verde
T-Valdepeñas	Suelo finca cafetera. Palestina-Caldas (Lab-Cenicafé)	Algodonosa, amarilla-verdosa

sin acidificar, a razón de 5 alícuotas por caja y se incubaron a 26°C, durante 17 horas. Luego se adicionó a cada sitio inoculado una gota de azul de lactofenol. Se determinó entonces en cinco campos microscópicos por alícuota el número de esporas germinadas y no germinadas (16).

QUINTA FASE: Pruebas de antagonismo en invernadero. Se utilizaron los tres aislamientos de *Trichoderma* evaluados en las tres primeras fases del trabajo y los aislamientos seleccionados en la cuarta fase del experimento. Se inocularon en cajas de Petri con PDA y se colocaron bajo las mejores condiciones de temperatura, luz y pH encontradas a lo largo del trabajo durante 8 días. Luego se multiplicaron en sustrato de arroz adicionando en cada bolsa 1ml de la concentración adecuada de esporas del hongo encontrada en la tercera fase. Se mantuvieron en cámara bioclimática bajo las condiciones mencionadas anteriormente, hasta observar el cubrimiento total de los granos de arroz por el hongo.

PRIMERA PRUEBA: Siembra de chapolas en suelo con adición inicial del patógeno *R. bunodes* y posterior aplicación del antagonista *Trichoderma* sp. Se utilizaron plantas de café variedad Caturra con un par de hojas cotiledonales (chapolas) en vasos de plástico de 16 onzas. Cada vaso se llenó hasta la mitad con 150g de suelo natural mas pulpa de café,

en proporción 3:1. La otra mitad del suelo se mezcló con el patógeno en dosis de 8g del sustrato/kg de suelo. Se sembraron dos chapolas por vaso y 15 días después se sacaron y a la mezcla se adicionó el antagonista *Trichoderma* sp. en proporción de 20g del sustrato/kg de suelo mezclándolo homogéneamente y se volvieron a sembrar las mismas chapolas por vaso, las cuales se dejaron en invernadero 15 días. (Tabla 5).

SEGUNDA PRUEBA: Mezcla simultánea antagonista *Trichoderma* sp. vs patógeno *Rosellinia bunodes*. Los aislamientos de *Trichoderma* en proporción de 20 g del sustrato/kg de suelo y el patógeno en dosis de 8g del sustrato/kg de suelo se mezclaron simultáneamente con 150g de suelo natural más pulpa. Esta mezcla homogénea se llevó a los vasos los cuales contenían 150g de suelo y se sembraron 2 chapolas dejándose en invernadero durante 30 días (9). Los tratamientos evaluados son los mismos referenciados en la primera prueba (Tabla 5).

TERCERA PRUEBA: Establecimiento del patógeno en el suelo y posterior acción del antagonista. Se utilizaron vasos desechables con suelo natural más pulpa, con establecimiento del patógeno durante 15 días y posterior incorporación del antagonista, para dejarlos interactuar durante quince días, cuando se sembraron 2 chapolas por vaso. Se hizo

Tabla 5. Tratamientos para evaluar el efecto de los aislamientos de *Trichoderma* sp. sobre el patógeno.

Tto	Antagonista		Patógeno
1.	<i>Trichoderma</i> Nim	+	<i>Rosellinia bunodes</i>
2.	<i>Trichoderma</i> Mac lis	+	<i>Rosellinia bunodes</i>
3.	<i>Trichoderma</i> Nar ver	+	<i>Rosellinia bunodes</i>
4.	<i>Trichoderma</i> 1	+	<i>Rosellinia bunodes</i>
5.	<i>Trichoderma</i> 10	+	<i>Rosellinia bunodes</i>
6.	T-Valdepeñas	+	<i>Rosellinia bunodes</i>
7.	<i>Trichoderma</i> Rb	+	<i>Rosellinia bunodes</i>
8.	Testigo referencia		Sólo <i>Rosellinia bunodes</i>
9.	Testigo absoluto.		Sin adición de microorganismos

la evaluación a los 30 días después de realizado este último paso. Los tratamientos evaluados son los mismos referenciados en la primera prueba (Tabla 5).

Diseño experimental: Se utilizó un diseño completamente aleatorio, con 2 chapolas por vaso como unidad experimental y 10 repeticiones por tratamiento.

Variable evaluada: Porcentaje de infección en raíces de café atacadas por *R. bunodes*. Se utilizó la escala de evaluación desarrollada por Castro (3), donde grado 0 es raíz sana, grado 1: raíz afectada 20%, grado 2: raíz afectada 40%, grado 3: raíz afectada 60%, grado 4: raíz afectada 80% y grado 5: raíz completamente descompuesta o putrefacta y la planta muerta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PRIMERA FASE: Efecto de Temperatura y luz.

Los aislamientos T-10, T-Rb y T-Nim registraron la mayor tasa media de crecimiento diametral con temperaturas de 26 y 30°C, tanto con 0, 8 y 12 horas de luz (Tabla 6), lo cual está de acuerdo con resultados encontrados por Esquivel *et al.*, (5), quienes encontraron que *Trichoderma* obtuvo crecimiento óptimo a temperaturas entre los 25 y 30°C y, con respecto a la luz, ésta no afectó su crecimiento.

El análisis de varianza mostró mayores resultados de esporulación y germinación de los tres aislamientos de *Trichoderma* sp., a los 8 días después de la siembra en cajas de Petri con 11×10^7 esporas por caja de Petri y 35,2% de germinación en promedio frente a $2,13 \times 10^7$ y 27,5 % del quinto día y $10,2 \times 10^7$ y 21,6% del décimo primer día. La producción de esporas por caja de Petri de los aislamientos T-10 y T-Rb fue de 10,6 y $14,7 \times 10^7$ con 92 y 76% de germinación a 26°C con 8 h de luz/16 h de oscuridad y 30°C con 0 horas de luz/24 h de oscuridad, respectivamente (Tabla 7). Resulta-

dos similares obtuvieron Miranda *et al.* (10) al aplicar la metodología de «superficie de respuesta» en la optimización del crecimiento y esporulación de dos cepas de *Trichoderma* sp. en donde determinaron que la temperatura óptima para el crecimiento de éstas estuvo alrededor de 32,5°C y que la esporulación fue favorecida a temperaturas cercanas a 33°C.

El aislamiento T-Nim alcanzó el máximo de esporulación con respecto a los otros dos aislamientos, con una concentración de $48,3 \times 10^7$ esporas/caja Petri a 21°C con 8h de luz/16 h de oscuridad y 80% de germinación (Tabla 7).

SEGUNDA FASE: Efecto del pH. En cuanto al crecimiento diametral de las colonias, el análisis de varianza no mostró diferencias estadísticas ($P=0,05$) entre los valores de pH evaluados. Sin embargo, se observó que los aislamientos T-10 y T-Rb a 26 y 30°C, crecieron en el menor tiempo a diferencia del aislamiento T-Nim a 21°C (Tabla 8).

El análisis de varianza mostró mayores resultados de esporulación y germinación de los tres aislamientos de *Trichoderma* sp., a los 8 días después de la siembra en cajas de Petri con $43,8 \times 10^7$ esporas por caja de Petri y 84,4% de germinación en promedio frente a $7,81 \times 10^7$ y 87,0% del quinto día y $40,1 \times 10^7$ y 63,5% del décimo primer día (Tabla 9). La prueba de Tukey ($P=0,05$) a dicho tiempo no mostró diferencias estadísticas con respecto a la esporulación en los tres aislamientos. El aislamiento T-10 con pH 4,0 inhibió su germinación. No obstante, según Papavizas (12), las conidias de *Trichoderma* requieren de una fuente de nutrimentos para la germinación *in vitro*. La respuesta de la conidia a los nutrimentos se ve afectada por la concentración de iones de hidrógeno, con mayor germinación bajo condiciones ácidas que en condiciones neutras.

Los tres aislamientos obtuvieron los mayores resultados de esporulación y germinación

Tabla 6. Tasa media de crecimiento diametral diario de colonias de *Trichoderma*. sp. bajo tres condiciones de temperatura y luz.

Aisl	T°	CRECIMIENTO DIAMETRAL (mm/día)						
		Luz (horas)	Lectura 1 (2 ^{do} día)	Lectura 2 (3 ^{er} día)	Lectura 3 (4 ^{to} día)	Media	Límite inferior	Límite superior
T-10	21°C	0	18,1	45,0	61,2	41,4	31,2	51,6
		8	17,8	44,8	61,4	41,3	30,9	51,7
		12	16,9	43,5	59,6	40,0	29,9	50,1
	26°C	0	48,4	80,6	90	64,5	52,3	76,7
		8	46,7	76,9	90	61,8	50,4	73,3
		12	41,8	71,0	90	56,4	45,2	67,6
	30°C	0	35,2	59,6	77,7	57,5	47,3	67,7
		8	33,1	58,9	81,6	57,9	46,0	69,7
		12	31,4	56,3	78,6	55,4	43,98	66,9
T-Rb	21°C	0	17,6	44,8	67,2	43,2	31,5	54,8
		8	15,9	45,2	67,2	42,8	30,7	54,8
		12	15,7	43,6	64,6	41,3	29,8	52,8
	26°C	0	47,6	84,6	90	66,1	52,1	80,0
		8	43,0	78,7	90	60,8	47,1	74,5
		12	41,0	75,1	90	58,1	45,0	71,1
	30°C	0	37,3	61,9	85,3	61,5	49,9	73,0
		8	35,1	57,5	83,9	58,8	47,3	70,4
		12	30,4	54,2	75,4	53,3	42,4	64,3
T-Nim	21°C	0	19,9	45,8	64,8	43,5	33,0	54,1
		8	19,1	45,8	65,0	43,3	32,4	54,2
		12	18,8	45,1	63,5	42,5	31,9	53,1
	26°C	0	46,5	82,7	90	64,6	50,8	78,4
		8	42,8	77,2	90	60,0	46,9	73,1
		12	42,3	76,5	90	59,4	46,4	72,3
	30°C	0	35,1	60,4	79,5	58,3	47,9	68,8
		8	31,6	53,5	70,9	52,0	42,8	61,3
		12	28,6	49,3	69,3	49,2	39,5	58,8

T° 21°C [CV= 4,12] T° 26 °C [CV=4,24] T° 30 °C [CV=7,79]

CV= Coeficiente de variación

21 y 30°C (grados libertad)= 14

26 °C (grados libertad)= 9

Nivel significancia de todas las temperaturas= 95

con pH 5,0. Resultados similares a los encontrados por Miranda *et al.* (10), al aplicar la metodología de superficie de respuesta en la optimización del crecimiento y esporulación de dos cepas de *Trichoderma* sp.

TERCERA FASE: Producción y germinación de esporas en sustrato de arroz. Según el Test

LSD «mínima diferencia significativa» (P=0,05), no se presentaron diferencias estadísticas en la producción de esporas y porcentaje de germinación en los tres aislamientos de *Trichoderma* sp. bajo dos concentraciones de inóculo (1x10⁶ y 1x10⁸)esp/ml por gramo de arroz. Resultados similares encontraron Bahamón (2) y Olarte (11) con respecto a la

Tabla 7. Esporulaci3n y germinaci3n de tres aislamientos de *Trichoderma* sp. en diferentes condiciones de temperatura y horas luz.

Producci3n de esporas/caja petri (10 ⁷) vs porcentaje de germinaci3n								
T°	Luz(horas)	Aislamiento	(5° d3a)		(8° d3a)		(11° d3a)	
			ESP	GER	ESP	GER	ESP	GER
21 °C	0	T-10	0	0	0,06	63,1	0,09	70,4
		T-Nim	0,3	73,5	12,9	81,0	20,6	63,3
		T-Rb	0	0	2,4	73,2	13,0	36,1
	8	T-10	0	0	0,1	56,1	0,1	10,4
		T-Nim	0,4	78,7	48,3	81,2	12,5	66,2
		T-Rb	0	0	2,5	66,9	1,4	67,8
	12	T-10	0	0	0,1	84,4	0,1	82,0
		T-Nim	0,2	66,5	26,6	77,5	14,0	46,6
		T-Rb	0	0	3,0	74,2	15,0	65,5
26 °C	0	T-10	0,07	52,8	0,01	87,4	16,2	15,6
		T-Nim	1,0	98,0	10,4	71,0	14,4	12,0
		T-Rb	0,7	97,5	4,7	41,7	8,2	40,3
	8	T-10	0,007	36,0	10,6	92,3	16,7	9,3
		T-Nim	2,0	89,0	17,2	42,3	11,9	15,8
		T-Rb	0,1	96,2	8,1	32,6	19,1	26,5
	12	T-10	0,04	86,1	6,0	75,7	14,9	12,3
		T-Nim	2,8	90,1	11,6	49,9	18,0	13,5
		T-Rb	0,4	96,2	11,7	65,5	24,1	21,4
30 °C	0	T-10	7,3	58,2	13,9	28,3	17,6	62,3
		T-Nim	6,3	53,5	16,3	62,0	17,1	77,8
		T-Rb	5,6	60,3	14,7	76,0	28,9	65,6
	8	T-10	6,2	53,5	16,6	45,2	19,8	60,5
		T-Nim	4,5	56,7	11,6	45,0	15,7	78,6
		T-Rb	4,6	52,2	22,2	54,9	20,2	75,3
	12	T-10	4,8	63,4	15,0	32,1	16,0	65,4
		T-Nim	5,0	53,5	11,0	50,0	16,7	81,8
		T-Rb	5,4	56,7	26,9	58,5	17,5	76,3

ESP= Esporulaci3n.

GER= Germinaci3n.

CV= Coeficiente de variaci3n.

evaluaci3n de concentraciones de in3culo para el cultivo de *Beauveria bassiana*, infiri3ndose que a m3s baja concentraci3n se produjo una capa delgada de micelio que esporul3 completamente, d3ndoles mayor viabilidad a las esporas, mientras que a valores mayores de in3culo la capa micelial formada aument3 su espesor y solamente esporul3 la fracci3n micelial expuesta en la superficie debido al estr3s sometido por espacio, induci3ndose como consecuencia la terminaci3n del ciclo. Seg3n los

resultados anteriores, la concentraci3n de 1x10⁶esp/ml por gramo de arroz ser3a apropiada para el incremento del hongo a gran escala, disminuyendo as3 el tiempo de incubaci3n y los costos de producci3n.

El aislamiento T-Rb a 30°C disminuy3 la producci3n de esporas y el porcentaje de germinaci3n en comparaci3n con los otros dos aislamientos, que no se vieron afectados a 21 y 26°C (Tabla 10).

Tabla 8. Tasa media de crecimiento diametral diario de aislamientos de *Trichoderma* sp. en tres condiciones de pH a partir de las 48 horas de exposición a las diferentes temperaturas y horas de luz.

Aisl	pH	Crecimiento diametral (mm/día)								
		Lectura 1 (2 ^{do} día)		Lectura 2 (3 ^{er} día)		Lectura 3 (4 ^o día)		Media	Límite inferior	Límite superior
		\bar{x}	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV			
T-10	4	37,79 a*	1,92	80,02 a	2,24	90 a	0,0	69,2	56,2	82,2
	5	38,34 a	4,35	81,80 a	2,60	90 a	0,0	69,8	56,7	82,9
	6	37,91 a	2,67	81,71 a	1,63	90 a	0,0	70,0	57,0	83,0
T-Rb	4	42,81 a	10,9	75,72 a	9,39	90 a	0,0	72,3	62,0	82,6
	5	47,78 a	2,95	73,05 a	9,91	90 a	0,0	69,9	58,6	81,2
	6	44,17 a	13,5	75,72 a	9,39	90 a	0,0	68,6	57,1	80,0
T-Nim	4	16,24 a	3,29	43,42 a	4,17	78,03 a	2,30	45,9	31,3	60,4
	5	19,40 a	20,3	46,51 a	9,26	79,96 a	6,39	46,4	32,1	60,7
	6	17,08 a	3,79	44,10 a	2,88	78,12 a	2,64	48,6	34,2	63,0

* Valores seguidos de la misma letra en la misma columna, son iguales estadísticamente de acuerdo con la prueba de Tukey al 5%.

CV= Coeficiente de variación.

Grados de libertad= 14 y Nivel de significancia= 95%

Tabla 9. Producción de esporas/caja de petri (10^7) y porcentaje de germinación de los tres aislamientos de *Trichoderma* sp. en tres condiciones de pH.

Aisl	PH	Esporulación 5 ^o día		Germinación 5 ^o día		Esporulación 8 ^o día		Germinación 8 ^o día		Esporulación 11 ^o día		Germinación 11 ^o día	
		\bar{x}	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV
		T-10	4	12,2a	43,5	77,9b	11,5	50,5a*	43,9	71,8b	3,54	50,3a	6,51
5	9,63a		26,8	93,6a	3,69	48,2a	32,7	94,6a	1,48	56,8a	27,6	39,8a	66,2
6	8,45a		58,7	90,9a	6,80	47,6a	17,6	94,0a	3,82	59,4a	18,6	21,2b	42,6
T-Rb	4	11,5a	33,5	85,4a	2,46	41,7a	15,7	83,6a	7,14	45,6a	11,2	85,1a	5,88
	5	15,9a	32,6	91,8a	12,4	45,6a	15,5	89,4a	8,09	36,3a	22,8	87,0a	6,01
	6	11,4a	39,7	85,6a	8,90	38,9a	23,4	85,5a	3,99	30,2a	8,42	85,2a	6,72
T-Nim	4	0,15b	134,8	70,2b	26,0	40,4a	38,0	72,7a	10,3	32,3a	23,9	71,8a	14,1
	5	0,47a	63,9	94,4a	4,05	41,1a	15,5	85,2a	11,2	21,8a	16,7	81,7a	12,2
	6	0,65a	110,6	93,7a	1,54	41,0a	46,3	83,3a	9,63	28,7a	23,4	80,6a	7,11

* Valores seguidos de la misma letra en la misma columna, son iguales estadísticamente de acuerdo con la prueba de Tukey al 5%. CV= coeficiente de variación.

CUARTA FASE: Evaluación y selección de otros aislamientos de *Trichoderma* sp. El análisis de varianza mostró que a 26 y 30°C los ocho aislamientos crecieron rápidamente, pero con menor producción y germinación de esporas, mientras que a 21°C, el crecimiento fue lento pero con mayor esporulación y germinación.

A 21°C los aislamientos T-Mac lis, T-Nar ver y T-1 presentaron los mejores resultados en producción y porcentaje de germinación de esporas por caja Petri, con concentraciones de: 27,8; 34,5 y 32,8x10⁷ y 90,3; 75,1 y 91,5%, respectivamente. A 26°C, el aislamiento T-Valdepeñas con 29,3x10⁷esp/caja Petri y 50,1% de germinación, fue el mejor. A 30°C los resul-

Tabla 10. Producción de esporas por gramo de arroz (10^7) y porcentaje de germinación de cada aislamiento de *Trichoderma* sp. en dos concentraciones de inóculo, 15 días después de la siembra.

Aislam	Inóculo	Esporulación		Germinación	
		\bar{x}	CV	\bar{x}	CV
T-10	1 x 10^6	50,0 a*	37,8	82,7 a	10,0
	1 x 10^8	33,8 a	23,7	85,1 a	9,70
T-Rb	1 x 10^6	7,2 a	77,8	30,6 a	26,9
	1 x 10^8	8,1 a	75,1	41,4 a	30,7
T-Nim	1 x 10^6	47,1 a	28,9	73,5 a	9,62
	1 x 10^8	31,8 a	34,4	75,6 a	7,95

* Valores seguidos de la misma letra en la misma columna, son iguales estadísticamente de acuerdo con la prueba de Tukey al 5%.
CV= Coeficiente de variación.

tados fueron relativamente bajos con respecto a las otras dos temperaturas de análisis.

QUINTA FASE: Pruebas de Antagonismo en invernadero:

PRIMERA PRUEBA: Siembra de chapolas en suelo con adición inicial del patógeno *R. bunodes* y posterior aplicación del antagonista *Trichoderma* sp. Quince días después de la aplicación del antagonista ningún aislamiento había controlado la enfermedad, registrándose

entre 80 a 90% de infección en las raíces y haciéndose evidente el alto poder patogénico de *R. bunodes* (Tabla 11; Figura 2 (b)). Esto resultados son similares a los encontrados por Ibarra *et al.* (8), quienes demostraron alta patogenicidad del hongo al cabo de 15 días de establecido en el suelo, ocasionando putrefacción de la raíz y muerte de la plántula. Por tal motivo, se vió reducida la acción de *Trichoderma* sobre el estado avanzado de la enfermedad. El análisis de varianza mostró diferencias estadísticas ($P=0,05$) entre los aislamientos T-Mac lis y T-Rb con 89 y 91% de

Tabla 11. Porcentajes de infección en raíces de chapolas de café atacadas por *R. bunodes*

TRATAMIENTO	PRIMERA PRUEBA		SEGUNDA PRUEBA		TERCERA PRUEBA	
	% INFECCIÓN 15 DÍAS		% INFECCIÓN 30 DÍAS		% INFECCIÓN 30 DÍAS	
	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV
1. T-Nim + <i>R. bunodes</i>	84ab*	6,99	81ab	19,1	22b	6,32
2. T-Mac lis + <i>R. bunodes</i>	89a	8,75	85ab	13,5	25b	12,6
3. T-Nar ver + <i>R. bunodes</i>	85ab	7,07	80ab	12,4	23b	9,48
4. T-1 + <i>R. bunodes</i>	82ab	6,32	66b	22,2	21b	3,16
5. T-10 + <i>R. bunodes</i>	81ab	3,16	82ab	19,8	27b	14,9
6. T-Valdepeñas + <i>R. bunodes</i>	84 ab	6,99	84 ab	15,0	28b	16,1
7. T-Rb + <i>R. bunodes</i>	91a	11,0	64b	24,1	26b	10,7
8. Testigo Referencia	77b	6,74	93a	9,48	64a	5,16
9. Testigo Absoluto	0c	0	0 c	0	0c	0

* Valores seguidos de la misma letra en la misma columna, son iguales estadísticamente de acuerdo con la prueba de Tukey al 5%. CV= Coeficiente de variación.

infección respectivamente, en relación con el testigo de referencia que presentó 77% de infección, resultando el menor porcentaje observado. Las diferencias pueden deberse a la desuniformidad en la forma de realizar la mezcla física del suelo con el inóculo de *R. bunodes*. De esta forma, en el tratamiento testigo de referencia el patógeno pudo ubicarse más lejos de las raíces, retardando la llegada y por ende la infección, mientras que para los dos tratamientos el patógeno posiblemente se localizó más cerca de las raíces. El riego variable aplicado a los vasos podría también incidir en los resultados afectando el desarrollo del patógeno y/o los antagonistas, además de la presencia de organismos micófitos como ácaros, moscas, etc, que al alimentarse de hongos disminuyen la cantidad de inóculo patogénico y/o antagonista.

SEGUNDA PRUEBA: Mezcla simultánea del antagonista *Trichoderma* sp. vs el patógeno *Rosellinia bunodes*. Treinta días después de la inoculación se observaron porcentajes de infección en las raíces en tratamientos donde se aplicaron T-Nim, T-Mac-lis, T-Nar ver, T-10 y T-Valdepeñas oscilando entre 80 a 85%, y haciéndose evidente el bajo efecto antagónico de estos aislamientos y el alto poder patogénico de *R. bunodes*. (Figura 1b). El análisis de varianza mostró diferencias estadísticas

($P=0,05$) entre los tratamientos con aplicación de T-Rb y T-1 presentando 64 y 66% de infección en raíces, respectivamente, en relación con el testigo de referencia que presentó 93% de infección (Tabla 11). Según estos resultados, puede existir amplia variabilidad genética entre aislamientos de *Trichoderma* sp., manifestada por su afinidad hacia el patógeno.

TERCERA PRUEBA: Establecimiento del patógeno en el suelo y posterior acción del antagonista. Con esta prueba se registró un control aceptable de la enfermedad por los siete aislamientos de *Trichoderma* sp. El análisis de varianza mostró diferencias estadísticas ($P=0,05$) entre tratamientos con aplicación del antagonista, registrándose porcentajes de infección en raíces de 20 a 28%, treinta días después de la siembra de chapolas y se evidenció la colonización del mismo sobre la raíz (Figura 2a). El testigo de referencia presentó 64% de infección. Estos resultados corroboran el efecto antagónico de *Trichoderma* contra el patógeno, registrado por otros autores (7, 5, 4). (Tabla 11; Figura 1a). Considerando la agresividad de *R. bunodes*, el antagonismo de los aislamientos de *Trichoderma* sp. en el suelo puede ser explicado por la interacción de ambos microorganismos antes de la siembra de chapolas, dándoles tiempo y espacio para demostrar su alta tasa de crecimiento, capaci-

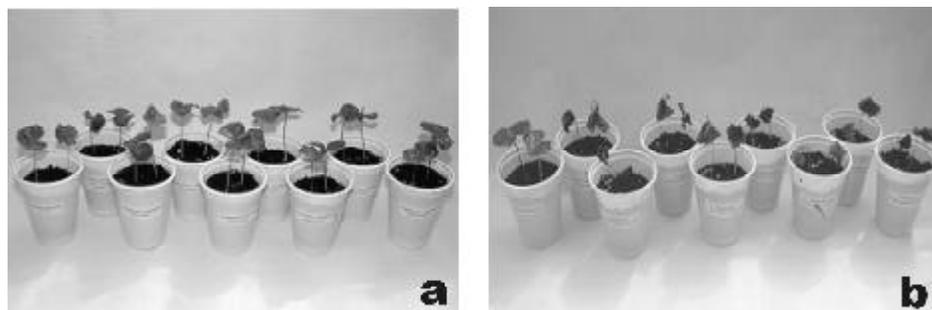


Figura 1. Pruebas de antagonismo en invernadero 30 días después de la inoculación. (a) Plantas de café variedad Caturra en buen estado debido al efecto antagónico de los aislamientos de *Trichoderma* sp. sobre *R. bunodes*. (b) Plantas de café variedad Caturra con síntomas de marchitamiento por efecto de *R. bunodes*.

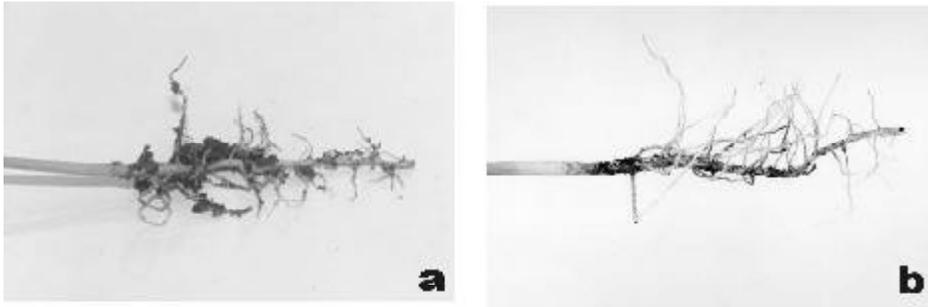


Figura 2. (a) Colonización de *Trichoderma* sp. sobre raíz con adición de patógeno. (b) Grado 4 de infección por efecto de *R. bunodes*: 80% de colonización (micelio del patógeno distribuido a lo largo de la raíz principal).

dad parasítica y competitiva sobre el patógeno, evitando así que el patógeno se desarrolle ya que carece de las ventajas que le proporciona el hospedante. De esta forma, las bondades de este tipo de control utilizando este hongo antagonista pueden ser incluidas como complemento a las prácticas de manejo integrado de la llaga negra del café, para lograr los resultados deseables a largo plazo mediante la reducción inicial de la población de inóculo patogénico.

AGRADECIMIENTOS

Al personal auxiliar de la Disciplina de Fitopatología por su valiosa y oportuna colaboración. A la Dra Elena Velásquez por sus valiosos aportes en la investigación. A la Dra. Esther Cecilia Montoya y al Dr. Bernardo Chávez, de la Disciplina de Biometría de Cenicafé, por su colaboración en los análisis estadísticos.

LITERATURA CITADA

1. ARANZAZU H., F. Seguimiento epidemiológico de la llaga estrellada del cacao producida por *Rosellinia pepo*. 1987-1992. In: Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología, 13 Villavicencio, Agosto 12-14, 1992. Memorias. Santafé de Bogotá, Ascolfi, 1992. p. 36-37.
2. BAHAMÓN S., T.R. Establecimiento de las condiciones de cultivo para la conservación *in vitro* de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Santafé de Bogotá, Pontificia Universidad Javeriana, 1994. 114 p. (Tesis: Bacteriología).
3. CASTRO C., B. L. Manejo integrado y control de llaga negra del café. In: CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ-CENICAFE. CHINCHINÁ. COLOMBIA. Informe anual de labores de la Disciplina de Fitopatología. Octubre de 1990 - Septiembre de 1991. Chinchiná, Cenicafé, 1991. 13 p.
4. CASTRO C., B. L. Antagonismo de algunos aislamientos de *T. koningii*, originados en suelo colombiano contra *Rosellinia bunodes*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Pythium ultimum*. Fitopatología Colombiana 19 (2): 7-18. 1995.
5. ESQUIVEL R., V. H.; LEGUIZAMÓN C., J. E.; ARBELÁEZ T., G. Búsqueda y evaluación de antagonistas a *Rosellinia bunodes*, agente causante de la llaga negra del café. Cenicafé 43 (2): 33-42. 1992.
6. ESTRADA V., M. N. Obtención y caracterización de cultivos monoespóricos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Manizales, Universidad Católica, 1995. 65 p. (Tesis: Bacteriología y Laboratorista Clínico)
7. FREEMAN, S.; SZTEJNBERG, A.; CHET, I. Evaluation of *Trichoderma* as a biocontrol agent for *Rosellinia necatrix*. Plant and Soil 94: 163-170. 1986.

8. IBARRA G., N. L.; CASTRO C., B. L.; PONCE, C.A. Estudio del proceso infectivo de *Rosellinia bunodes* Berk y Sacc en café. Popayán, Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Programa Biología, 1998. 146 p. (Tesis: Licenciada en Biología).
9. LÓPEZ U., A. B.; CASTRO C., B. L. Evaluación de diferentes sustratos para la multiplicación de *Trichoderma koningii* antagonista de *Rosellinia bunodes*. In: CENTRONACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ. CHINCHINÁ. COLOMBIA. Informe anual de labores de la Disciplina de Fitopatología. Octubre de 1996-septiembre de 1997. Chinchiná, Cenicafé, 1997. 17 p.
10. MIRANDA, I.; MARTÍNEZ, B.; SUSANA, P. Aplicación de la metodología de superficie de respuesta en la optimización del crecimiento y esporulación de *Trichoderma* sp. Revista de Protección Vegetal 11 (2): 99-103. 1996.
11. OLARTE, D. Optimización de un medio de cultivo para la producción masiva en superficie del hongo *Beauveria bassiana*. Santafé de Bogotá, Corporación Tecnológica de Bogotá, 1993. 150 p. (Tesis: Tecnóloga Química).
12. PAPAIVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for bio-control. Annual Review of Phytopathology 23: 23-54. 1985.
13. PÉREZ L., E. J. Descripción biología y patogenicidad de una especie de *Fusarium* que infecta a la broca del café (*Hypothenemus hampei*). Manizales, Universidad Católica, 1994. 48 p. (Tesis: Bacteriología y Laboratorista Clínico).
14. RESTREPO G., C. I. Selección de aislamientos de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhiziumanisopliae* (Metschnikoff) Sokorin por tolerancia a la temperatura. Manizales, Universidad Católica, 1996. 63 p. (Tesis: Bacteriología y Laboratorista Clínico).
15. VALENCIA C., M. Estudio del antagonismo de *Pseudomonas* spp. fluorescentes a *Rosellinia bunodes* (Berk. y Br.) Sacc. Manizales, Universidad Católica, 1996. 62 p. (Tesis: Bacteriología y Laboratorista Clínico).
16. VÉLEZ, P. E.; POSADA, F. J.; MARÍN, P.; GONZÁLEZ, M. T.; OSORIO, E.; BUSTILLO, A. E. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Chinchiná, Boletín Técnico Cenicafé No 17: 7-16. 1997.