

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE COLLETOTRICHUM GLOESPORIOIDES EN RELACIÓN CON EL MEDIO DE CULTIVO Y TEMPERATURA

Data de aceite: 01/08/2023

Walter Flores-Bazauri

Laboratorio de Fitopatología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú

Lisi Cerna-Rebaza

Laboratorio de Biología. American School. Trujillo-Perú
<https://orcid.org/0000-0001-7654-3464>

Roger Veneros-Terrones

Laboratorio de Fitopatología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú
<https://orcid.org/0000-0002-9666-528X>

César Mejía-Llontop

Laboratorio de Biotecnología. Universidad Nacional del Santa. Chimbote-Perú

Luis Gonzales-Llontop

Laboratorio de Ciencias. Universidad Toribio Rodríguez de Mendoza. Chachapoyas-Perú
<https://orcid.org/0000-0001-7944-2642>

Vito Quilcat-León

Departamento de Química. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú
<https://orcid.org/0000-0003-1382-3324>

Julio Chico-Ruíz

Laboratorio de Fitopatología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú
<https://orcid.org/0000-0002-7287-321X>

RESUMEN: Las enfermedades en las plantas cultivadas son frecuentes y su control químico se utiliza en exceso originando problemas de contaminación en suelo, planta y atmósfera. Por ello se justifica un control biológico, con microorganismos capaces de evitar el ataque de los patógenos en plantas. Con ese antecedente se evaluó el control in vitro de un patógeno, *Colletotrichum gloeosporioides*, en cultivos duales con presencia de *Clonostachys rosea*, *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma harzianum* a diferentes temperaturas y en diferentes medios de cultivo. Se utilizó Agar Sabouraud Dextrosa (DSA) y Agar Papa Dextrosa (PDA), a temperaturas de 10°C, 20°C y 30°C. Después de 12 días se evaluó el porcentaje de inhibición, grado de antagonismo y velocidad de crecimiento de las colonias enfrentadas. Determinando que el antagonista más efectivo fue *T. harzianum*, el cual alcanzó un grado 2 en la escala de Bell, cultivado en PDA a 10°C 20°C y 30°C. También se demostró que *C. gloeosporioides* ejerce cierta resistencia a los antagonistas ensayados, pues a las temperaturas y medios de cultivos propuestos solo alcanzaron el grado 3 en la escala de Bell, y el porcentaje de inhibición evidenció valores: 14.18% y 14.54% en PDA

& 34.88% y 36.05% en SDA para *C. rosea* y *F. oxysporum*. Se concluye que hay influencia de la temperatura y medio de cultivo para un efectivo control del patógeno estudiado.

PALABRAS-CLAVE: Antagonismo, antracnosis, control biológico

CONTROLE BIOLÓGICO IN VITRO DE COLLETOTRICHUM GLOESPORIOIDES EM RELAÇÃO AO MEIO DE CULTIVO E TEMPERATURA

RESUMO: Doenças em plantas cultivadas são freqüentes e seu controle químico é usado excessivamente, causando problemas de contaminação no solo, planta e atmosfera. Por isso, justifica-se o controle biológico, com microrganismos capazes de evitar o ataque de patógenos às plantas. Com este pano de fundo, o controle in vitro de um patógeno, *Colletotrichum gloeosporioides*, foi avaliado em culturas duais com a presença de *Clonostachys rosea*, *Fusarium oxysporum* e *Trichoderma harzianum* em diferentes temperaturas e em diferentes meios de cultura. O Sabouraud Dextrose Agar (DSA) e o Potato Dextrose Agar (PDA) foram utilizados nas temperaturas de 10°C, 20°C e 30°C. Após 12 dias, foram avaliados o percentual de inibição, grau de antagonismo e taxa de crescimento das colônias opostas. Determinando que o antagonista mais eficaz foi o *T. harzianum*, que atingiu grau 2 na escala de Bell, cultivado em PDA a 10°C, 20°C e 30°C. Também foi demonstrado que *C. gloeosporioides* exerce alguma resistência aos antagonistas testados, pois nas temperaturas e meios de cultura propostos atingiram apenas grau 3 na escala de Bell, e o percentual de inibição apresentou valores: 14,18% e 14,54% em PDA. & 34,88% e 36,05% em SDA para *C. rosea* e *F. oxysporum*. Conclui-se que há influência da temperatura e do meio de cultura para um controle efetivo do patógeno estudado.

PALAVRAS-CHAVE: Antagonismo, antracnose, controle biológico

IN VITRO BIOLOGICAL CONTROL OF COLLETOTRICHUM GLOESPORIOIDES IN RELATION TO THE CULTURE MEDIUM AND TEMPERATURE

ABSTRACT: Diseases in cultivated plants are frequent and their chemical control is used excessively, causing contamination problems in the soil, plant, and atmosphere. For this reason, biological control is justified, with microorganisms capable of avoiding the attack of pathogens on plants. With this background, the in vitro control of a pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*, was evaluated in dual cultures with the presence of *Clonostachys rosea*, *Fusarium oxysporum*, and *Trichoderma harzianum* at different temperatures and in different culture media. Sabouraud Dextrose Agar (DSA) and Potato Dextrose Agar (PDA) were used at temperatures of 10oC, 20oC, and 30oC. After 12 days, the inhibition percentage, degree of antagonism, and growth rate of the opposing colonies were evaluated. Determining that the most effective antagonist was *T. harzianum*, which reached grade 2 on the Bell scale, grown in PDA at 10°C, 20°C, and 30°C. It was also shown that *C. gloeosporioides* exerts some resistance to the tested antagonists, since at the proposed temperatures and culture media they only reached grade 3 on the Bell scale, and the inhibition percentage showed values: 14.18% and 14.54% in PDA. & 34.88% and 36.05% in SDA for *C. rosea* and *F. oxysporum*. It is concluded that there is an influence of temperature and culture medium for effective control of the studied pathogen.

KEYWORDS: Antagonism, anthracnose, biological control

INTRODUCCION

Las enfermedades producidas por hongos fitopatógenos causan pérdidas severas en la agricultura y por el cual reducen la calidad y/o la cantidad de la cosecha obtenida (Monte, 2001; Rey et al., 2000). La forma tradicional para el control de las enfermedades en cultivos es la aplicación de productos químicos, pero debido a su composición resultan tóxicos e inespecíficos, ya que además de eliminar los organismos fitopatógenos, dañan la flora del suelo (Vinale et al., 2008; Cupull et al., 2003). Por ello es necesaria la búsqueda de alternativas orientadas al manejo de agentes antagonistas que sean eficientes y compatibles con el ambiente.

El control biológico es una estrategia de control más compatible con la conservación del medio ambiente y útil en aquellas enfermedades para las que no existen otras medidas fitosanitarias, o simplemente para poder reducir el empleo de pesticidas; sin embargo, muestra una serie de deficiencias y limitaciones que se deben solucionar para incrementar su aceptación en la agricultura actual (Fravel, 2005). Una alternativa es utilizando microorganismos antagonistas como bacterias y hongos.

Existen factores biológicos y ambientales que dominan las interacciones entre el hongo patógeno y el antagonista, afectando al control biológico de la enfermedad; una de ellas es la temperatura. La actividad antagonista de *T. harzianum*, *C. rosea* y *F. oxysporum* puede variar con la temperatura como lo reportan (Howell, 1998; Klein & Eveleigh, 1998).

Dentro del control biológico se han descrito el uso de diversos hongos antagonistas, tales como: *Trichoderma sp*, *Ulocladium oudemansii*, *Mucor sp*, *Penicillium sp* y *Clonostachys rosea*; además de nematodos y bacterias. Para el presente trabajo se ha elegido a: *C. rosea*, *Fusarium oxysporum* y *T. harzianum*, hongos con bastante potencial antagónico, con excepción de *F. oxysporum* el cuál se desconoce aún su poder antagónico (Suárez, 2008; Aquino et al., 2007; Molina et al., 2006; Chaves & Wang, 2004).

Clonostachys rosea, es un saprófito con acción antagónica frente a una amplia variedad de agentes fúngicos, dicha actividad está relacionada con la secreción de celulasas, β -1,3- glucanasas, proteasas e incluidas las quitinasas, las cuales actúan degradando la pared celular, retracción de la membrana plasmática y desorganización del citoplasma (Rivera-Fonseca, 2007). *T. harzianum* está presente en casi todos los suelos agrícolas y otros hábitats como madera en descomposición. Las colonias presentan un crecimiento rápido, y ha demostrado suprimir el desarrollo de fitopatógenos mediante el micoparasitismo, la competencia por el sustrato y nutrientes, y la actividad antibiótica producida por metabolitos que inhiben la actividad parasítica de los fitopatógenos. (Huamán, 2001). *F. oxysporum* es un hongo cosmopolita que existe en muchas formas patogénicas y se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento. Existe una gran diversidad

de cepas de *Fusarium spp.*, de las cuales algunas son patogénicas y su gran mayoría son saprófitas, las cuales pueden ser utilizadas como controladores biológicos. *Colletotrichum gloeosporioides* es un moho que forma conidios simples, produce la antracnosis (manchas pardas/negras) en muchos cultivos de importancia económica, como mangos y papayas cítricos, guanábana, aguacate, café, cultivos ornamentales, entre otros (Silva et al, 2006).

Por lo expuesto, el objetivo del presente trabajo fue determinar el mejor controlador biológico sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides* causante de la antracnosis, utilizando diferentes temperaturas.

MATERIAL Y METODOS

I. MATERIAL BIOLÓGICO:

Las cepas certificadas de: *C. rosea* y *T. harzianum* fueron adquiridas del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), Perú. Los cultivos de: *F. oxysporum* fueron obtenidos del fruto de tomate y *C. gloeosporioides* del epicarpio de la palta

II. DETERMINACIÓN DE LOS HONGOS

Se tomaron muestras del micelio de cada hongo y se colorearon con azul de lactofenol al 1%. Luego de la preparación en fresco, se observaron al microscopio a 40x para reconocer sus características morfológicas y poder determinarlas con auxilio de claves taxonómicas.

III. PROCEDIMIENTOS

a. Preparación del medio de cultivo “Agar Papa Dextrosa”

Con el filtrado obtenido de cocinar 10 g de papa, se mezcló con 3 g de sacarosa más 3 g de agar para 100ml de medio de cultivo; para preparar el agar Sabouraud se añadió 3gr en 100 ml agua destilada. Luego, ambos medios, se llevaron a la autoclave por un periodo de tiempo estimado de 30 min., a 1 atm y 150 libras de presión. Finalmente se procedió a dispensar en las respectivas cajas Petri y sembrar posteriormente los hongos (Fig. 1)

b. Control biológico in vitro (Prueba de antagonismo o cultivos duales)

Se colocaron en puntos opuestos de placas Petri con medio de cultivo, en distintas placas, micelios de siete días de desarrollo de: *C. gloeosporioides* y en el otro extremo, micelios de: *C. rosea*, *F. oxysporum* y *T. harzianum*. Posteriormente, los cultivos se incubaron a temperaturas de 10°C, 20°C y 30°C, durante 7 días, haciéndose mediciones cada 24 horas del crecimiento micelial correspondiente. (Fig. 2).

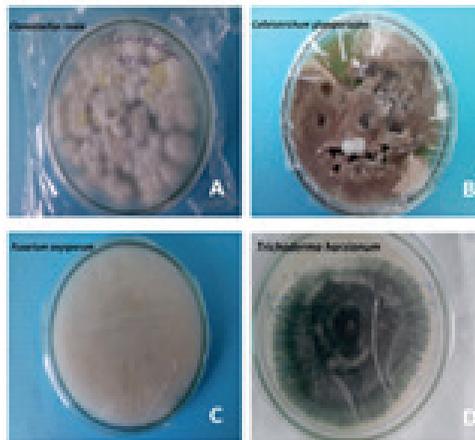


Figura 1. Crecimiento de los monocultivos puros de A) *C. rosea* B) *C. gloesporioides* C) *F. oxysporum* y D) *T. harzianum*, a los 12 días.

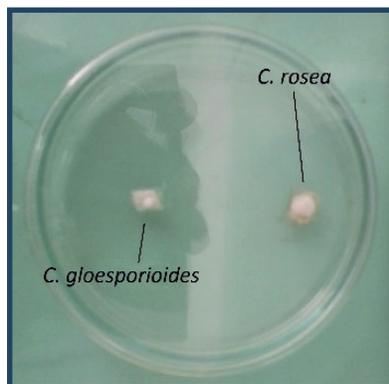


Figura 2. Siembra de micelios en los extremos de la placa Petri.

c. Tratamientos

Para el diseño experimental, se realizó un diseño al azar, con un número de 42 tratamientos y 3 repeticiones por tratamiento sometidos a diferentes medios de cultivo y distintas temperaturas, incluyendo a un testigo (control) de cada uno (Tabla 1).

AGAR PAPA DEXTROSA		
10° C	20° C	30° C
COMBINACIONES		TRATAMIENTOS
<i>T. harzianum</i> (Monocultivo)		T1
<i>C. rosea</i> (Monocultivo)		T2
<i>F. oxysporum</i> (Monocultivo)		T3
<i>C. gloeosporioides</i> (Monocultivo)		T4
<i>C. rosea</i> vs <i>C. gloeosporioides</i> (Cultivo dual)		T1 x T4 = T5
<i>F. oxysporum</i> vs <i>C. gloeosporioides</i> (Cultivo dual)		T2 x T4 = T6
<i>T. harzianum</i> vs <i>C. gloeosporioides</i> (Cultivo dual)		T3 x T4 = T7

AGAR SABOURAUD DEXTROSA		
10° C	20° C	30° C
COMBINACIONES		TRATAMIENTOS
<i>T. harzianum</i> (Monocultivo)		T1
<i>C. rosea</i> (Monocultivo)		T2
<i>F. oxysporum</i> (Monocultivo)		T3
<i>C. gloeosporioides</i> (Monocultivo)		T4
<i>C. rosea</i> vs <i>C. gloeosporioides</i> (Cultivo dual)		T1 x T4 = T5
<i>F. oxysporum</i> vs <i>C. gloeosporioides</i> (Cultivo dual)		T2 x T4 = T6
<i>T. harzianum</i> vs <i>C. gloeosporioides</i> (Cultivo dual)		T3 x T4 = T7

d. Evaluación

Se midieron los micelios colocados en las placas Petri en puntos opuestos entre sí de los hongos antagonistas frente a *C. gloeosporioides* y se incubaron a diferentes temperaturas de: 10°C, 20°C y 30°C. Después de 12 días del período de incubación del crecimiento del patógeno se registró y calculó el porcentaje de inhibición en relación con su control.

Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se calculó según la ecuación:

$$L = \frac{C - T}{C} * 100$$

Donde, **L** es la inhibición del crecimiento micelial, **C** es la medición del crecimiento micelial del patógeno en control, **T** es la medición del crecimiento micelial del patógeno en

presencia de antagonistas.

También se utilizó la escala de Bell para determinar el porcentaje de cubrimiento del antagonista en el medio de cultivo expresado en una escala (Tabla 2)

GRADO	MECANISMO DE ACCIÓN	PORCENTAJE DE CUBRIMIENTO DEL ANTAGONISTA DE LA SUPERFICIE DEL MEDIO
1	El antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno.	100 %
2	El antagonista llega a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.	75 %
3	El antagonista y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno parece dominar al otro.	50 %
4	El patógeno sobrepasa al crecimiento del antagonista colonizando tres cuartas partes de la caja Petri.	25 %
5	El agente fitopatógeno llega a cubrir totalmente la placa Petri.	0 %

Tabla 2. Escala de Bell (Ezziyani et al, 2004) utilizada para evaluar el grado de cubrimiento del antagonista (%).

RESULTADOS

Crecimiento en agar papa dextrosa (PDA)

Tabla 3. Promedio del crecimiento en centímetros de *C. gloesporioides* frente a *C. rosea*, *F. oxysporum* y *T. harzianum*, en pruebas de antagonismo y su respectivo control, tomado cada 24 horas hasta los 12 días de crecimiento en Agar Papa Dextrosa (PDA) a 10° C, 20°C y 30°C.

B: *C. rosea*

Días	10°C				20°C				30°C			
	PA		PC		PA		PC		PA		PC	
	(dual)				(dual)				(dual)			
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
3	1.1	1.0	1.2	1.2	1.1	0.9	1.4	1.8	1.1	1.1	1.2	1.4
6	1.4	1.4	1.6	2.0	1.7	1.4	2.2	3.4	1.3	1.4	1.9	2.3
9	1.5	1.8	1.8	2.9	2.6	2.4	2.9	4.7	1.7	1.9	3.0	3.4
12	1.8	2.2	1.9	3.6	3.4	3.3	4.2	5.5	2.7	2.9	4.2	4.6

B: *F. oxysporum*

Días	10°C				20°C				30°C			
	PA		PC		PA		PC		PA		PC	
	(dual)				(dual)				(dual)			
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
3	0.9	0.9	1.2	1.5	1.0	1.4	1.4	2.0	0.9	1.1	1.2	2.2
6	1.2	1.3	1.6	2.6	1.6	2.6	2.2	4.3	1.3	1.7	1.9	4.2
9	1.3	1.4	1.8	3.3	2.3	3.7	2.9	5.7	1.8	2.2	3.0	5.9
12	1.4	1.5	1.9	4.1	3.2	4.7	4.2	6.6	2.6	3.5	4.2	7.3

B: *T. harzianum*

Días	10°C				20°C				30°C			
	PA		PC		PA		PC		PA		PC	
	(dual)				(dual)				(dual)			
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
3	0.7	1.1	1.2	1.3	0.8	1.4	1.4	1.5	0.7	2.2	1.2	2.8
6	0.7	1.5	1.6	2.2	1.1	1.7	2.2	3.4	0.7	4.4	1.9	5.2
9	0.9	1.9	1.8	3.2	1.9	2.4	2.9	4.2	0.9	5.2	3.0	6.7
12	1.2	2.4	1.9	3.9	2.8	3.3	4.2	5.1	1.3	6.5	4.2	8.8

PA: Prueba antagonica

PC: Prueba control

A: *C. gloeosporioides*

Los organismos controladores crecen muy bien a 30°C, como se observa en la Tabla 1, siendo *T. harzianum* el que muestra un mayor diámetro de su colonia a los 12 días (8.8 cm) y *C. rosea* el de menor crecimiento (4.6 cm). En cambio *C. gloeosporioides* su crecimiento promedio es de 4.2 cm a los 30°C y de 1.9 cm a 10°C. Aquí podemos asumir que el mejor crecimiento está a la temperatura de 30°C. Cuando ambos organismos se enfrentan (cultivos duales) para *C. rosea* su mejor crecimiento es a los 20°C (3.3 cm), al igual que *F. oxysporum* 4.7 cm; en cambio para *T. harzianum* su mayor crecimiento es a los

30°C (6.5 cm). Hasta aquí observamos un rango más amplio de control para *T. harzianum* ya que en las temperaturas ensayadas su crecimiento es muy rápido si los comparamos con los otros controladores.

En lo que respecta a *C. gloeosporioides*, cuando crece solo, su crecimiento es menor a los controladores, pero cuando crece junto al controlador disminuye bastante con *T. harzianum*, casi el 50%. Con los otros controladores el crecimiento es similar entre ellos, no hay una gran diferencia entre ellos, pero si crece menos que los controladores.

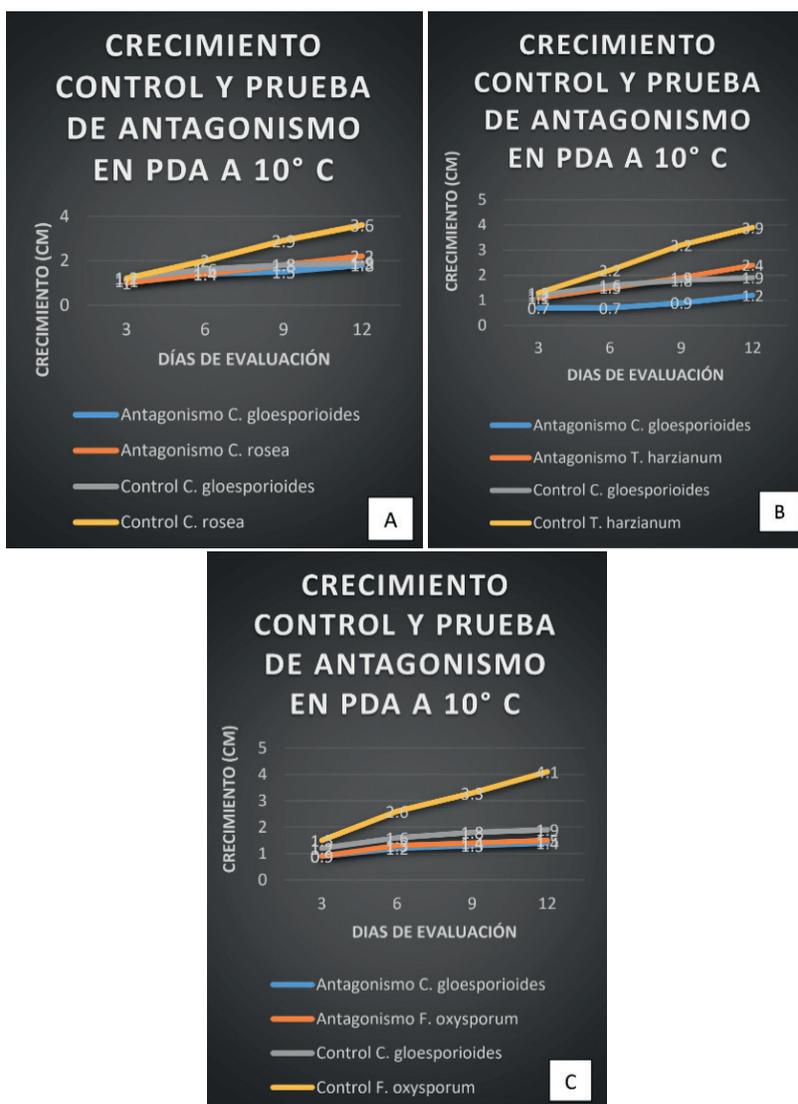


Figura 3 . Crecimiento en la prueba control y prueba de antagonismo (cm) en PDA a 10°C, tomado cada 24 horas por 12 días. Se observa que el crecimiento de los hongos antagonistas es mayor (línea anaranjada, A,B,C) que *C. gloeosporioides* (línea ploma) lo cual también coincide con los valores de crecimiento en el cultivo dual.

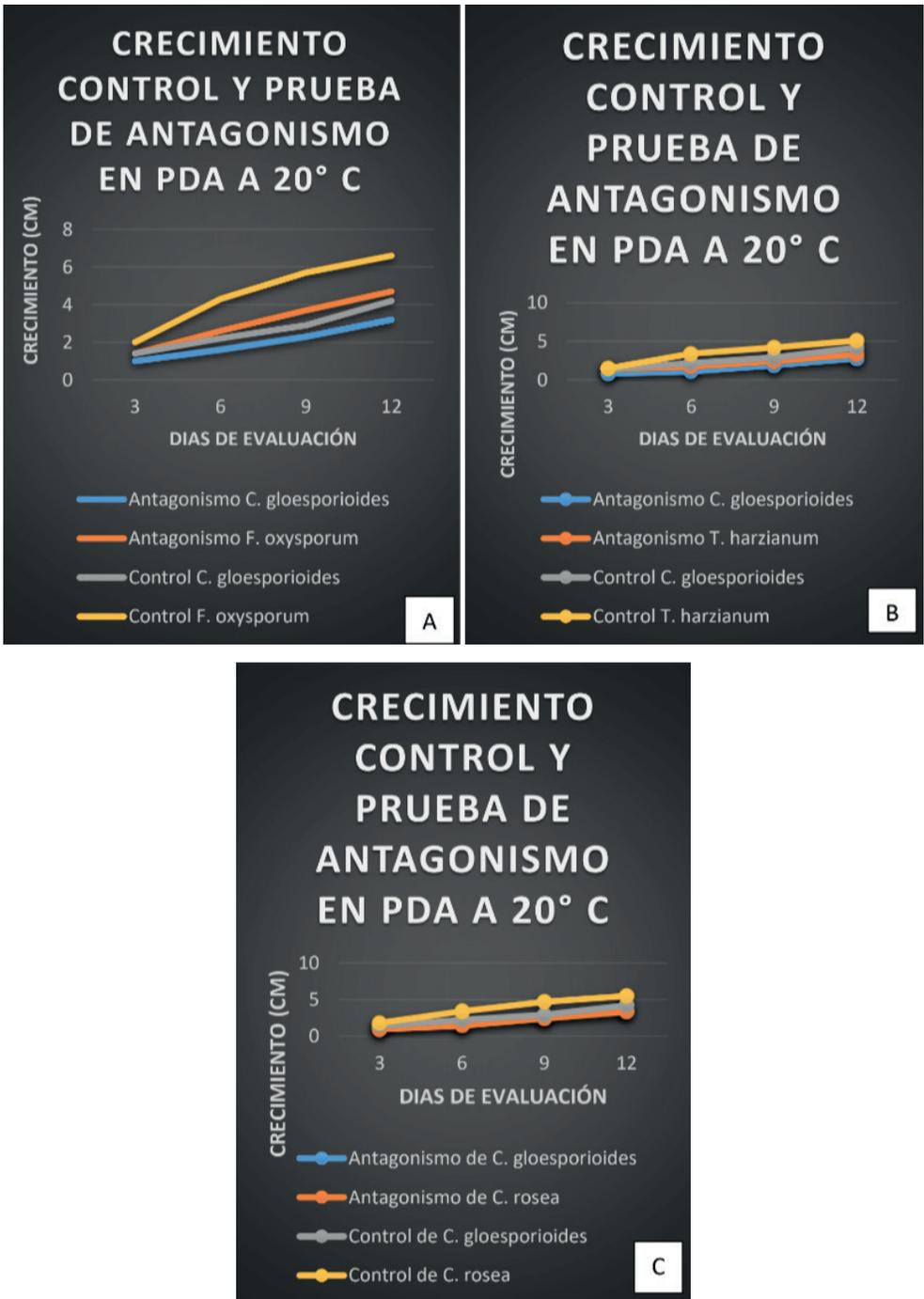


Figura 4. Crecimiento en la prueba control y prueba de antagonismo (cm) en medio PDA 20°C tomado cada 24 horas por 12 días. Se observa que *T. harzianum* y *C. rosea*, solos (línea anaranjada, B, C), tienen valores de crecimiento muy cercanos a *C. gloeosporioides* (línea ploma), igual se observa en los cultivos duales. *F. oxysporum* a esta temperatura (A) muestra valores de crecimiento muy elevados, solo o en cultivo dual (línea amarilla y anaranjada)

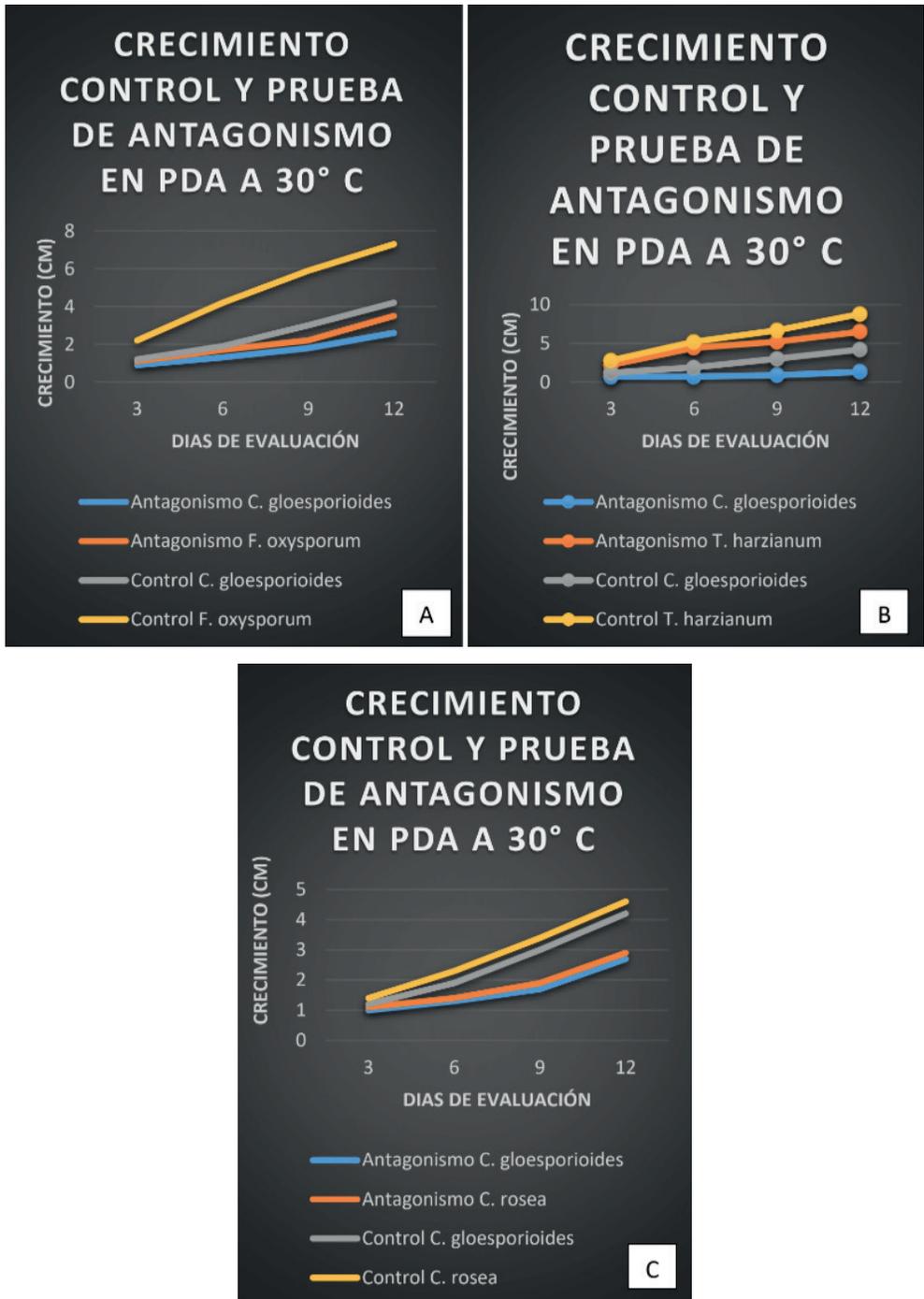


Figura 5. Crecimiento en la prueba control y prueba de antagonismo (cm) en PDA a 30°C, tomado cada 24 horas por 12 días. Cuando los hongos antagonistas crecen solos, es mayor el crecimiento de *F. oxysporum* (línea anaranjada, A), y los valores son cercanos en B (*T. harzianum*, solo o en cultivo dual) y en C (*C. rosea* y *C. gloesporioides*).

Crecimiento en agar Sabouraud dextrosa (DSA)

Tabla 4. Promedio del crecimiento en centímetros de *C. gloesporioides* frente a *C. rosea*, *F. oxysporum* y *T. harzianum* en prueba de antagonismo y su respectivo control, tomado cada 24 horas hasta los 12 días de crecimiento en Agar Sabouraud Dextrosa (DSA) a 10° C, 20°C, 30°C.

B: *C. rosea*

Días	10°C				20°C				30°C			
	PA		PC		PA		PC		PA		PC	
	(dual)				(dual)				(dual)			
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
3	1.0	0.9	1.1	1.2	2.2	1.6	2.3	1.9	2.1	1.9	2.6	2.0
6	1.2	1.0	1.2	1.3	3.6	3.0	5.2	3.4	3.6	3.0	5.3	3.9
9	1.2	1.1	1.5	1.3	5.0	4.0	6.9	4.6	4.8	4.0	6.7	5.4
12	1.3	1.2	1.7	1.4	6.3	5.1	8.4	5.4	5.7	4.9	7.7	6.3

B: *F. oxysporum*

Días	10°C				20°C				30°C			
	PA		PC		PA		PC		PA		PC	
	(dual)				(dual)				(dual)			
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
3	1.0	0.9	1.1	0.9	2.0	1.7	2.3	2.0	2.4	1.4	2.6	2.2
6	1.2	1.0	1.2	1.3	4.2	3.6	5.2	4.3	4.1	3.3	5.3	4.8
9	1.2	1.1	1.5	1.9	5.9	4.9	6.9	5.9	5.4	4.2	6.7	5.8
12	1.3	1.2	1.7	2.4	7.4	6.1	8.4	7.4	6.6	5.4	7.7	6.4

B: *T. harzianum*

Días	10°C				20°C				30°C			
	PA		PC		PA		PC		PA		PC	
	(dual)				(dual)				(dual)			
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
3	1.0	0.7	1.1	0.8	2.3	1.6	2.3	2.1	2.4	1.7	2.6	2.0
6	1.2	0.8	1.2	0.9	3.8	2.6	5.2	3.9	4.0	2.7	5.3	4.4
9	1.5	0.8	1.5	1.0	5.6	4.1	6.9	5.4	5.4	3.9	6.7	5.9
12	1.7	0.9	1.7	1.1	7.2	5.6	8.4	6.8	6.5	5.4	7.7	6.6

PA: Prueba antagónica

PC: Prueba control

A: *C. gloesporioides*

Cuando los controladores se siembran en DSA, y creciendo solos en el medio nutritivo, se observa en la Tabla 4 que *C. rosea* presenta su mejor crecimiento a los 30°C (con PDA es *T. harzianum*), en cambio para *F. oxysporum* y *T. harzianum* su mejor crecimiento es a los 20°C. Aquí ya se presenta una diferencia en el crecimiento debido a los medios de cultivo utilizados. Para el patógeno *C. gloesporioides* su mayor crecimiento se da a los 20°C (8.4 cm) similar a *T. harzianum* cuando crece en PDA.

En los cultivos duales (antagonismo) observamos que a 10°C el crecimiento es similar entre ambos organismos, pero a los 20°C el patógeno es el que crece más al igual que a los 30°C. Aquí se observa menor control que cuando se cultiva en PDA.



Figura 6. Crecimiento en la prueba control y prueba de antagonismo (cm) en DSA a 10°C, tomado cada 24 horas por 12 días. Se observa un mayor crecimiento de *C. gloesporioides* cuando está sólo en medio DSA (A, B) y en C sobresale *F. oxysporum*. Los hongos antagonistas exhibieron menor crecimiento en DSA (línea anaranjada, A, B,C).

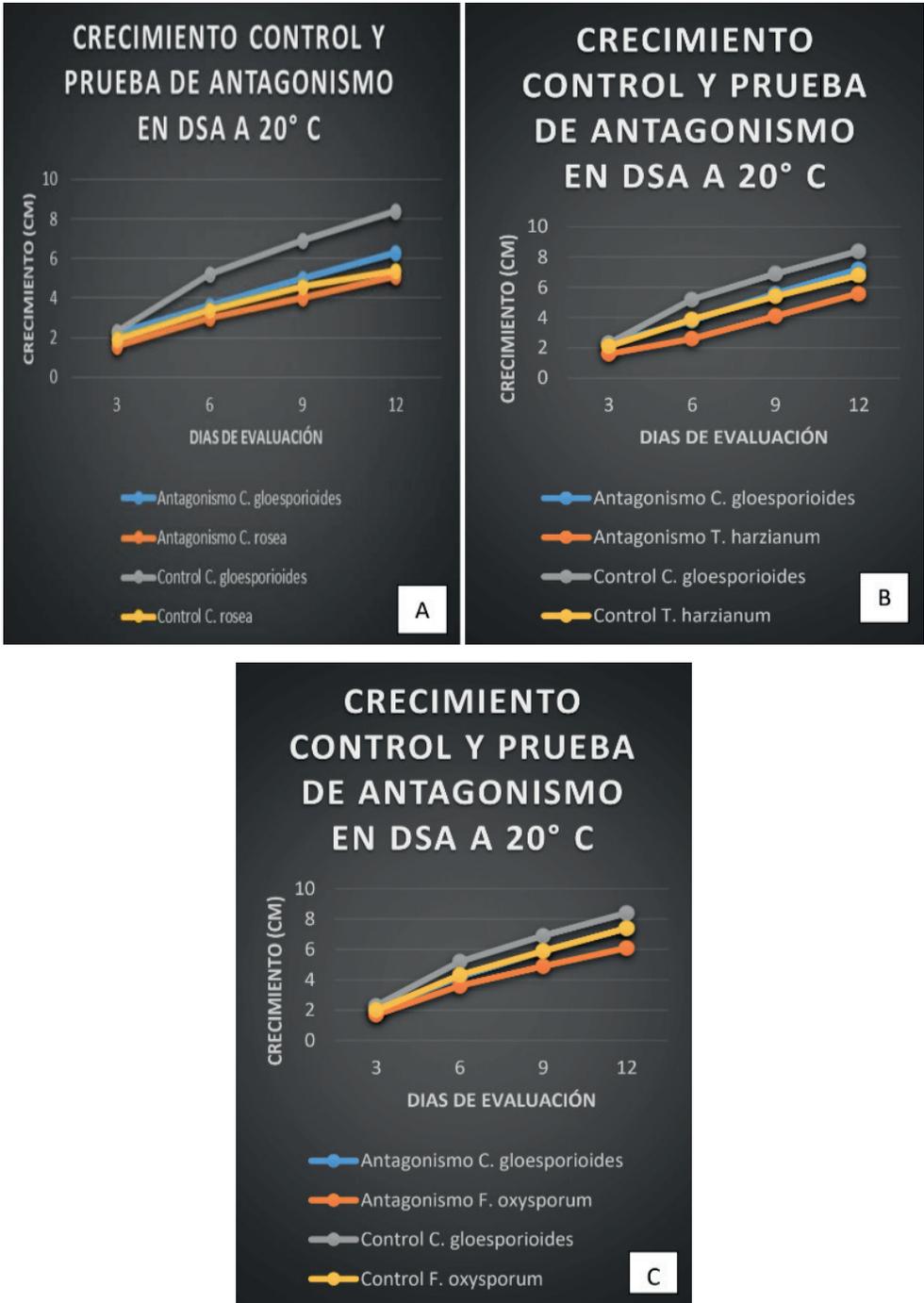


Figura 7. Crecimiento en la prueba control y prueba de antagonismo (cm) en DSA a 20°C tomado cada 24 horas por 12 días. Observamos que *C. gloesporioides* presenta el mayor crecimiento cuando está solo en el medio DSA y los hongos controladores son los que presentan menor crecimiento en los cultivos duales (A, B, C, línea anaranjada).

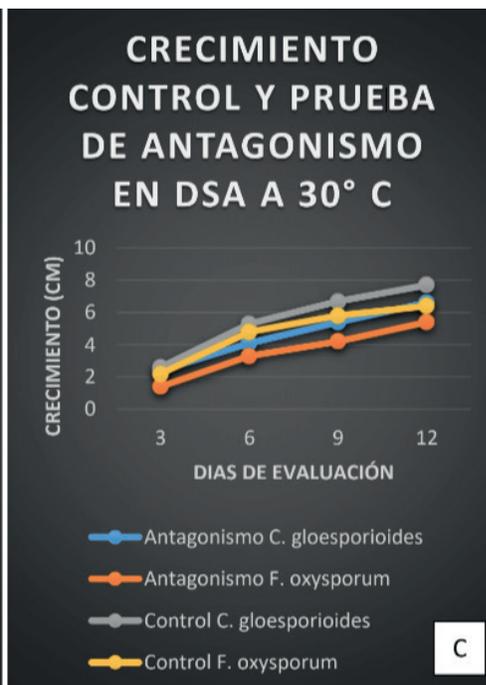


Figura 8. Crecimiento en la prueba control y prueba de antagonismo (cm) en DSA a 30°C, tomado cada 24 horas por 12 días. Como sucedió a los 20°C, observamos el mayor crecimiento de *C. gloesporioides* (línea ploma), seguido de los hongos controladores (línea amarilla, A, B, C). En los cultivos duales los hongos controladores presentan el menor crecimiento (línea anaranjada, A, B, C).

Tratamientos	Hongos Antagonistas	Grado de antagonismo		
		10°C	20°C	30°C
T5	<i>C. rosea</i>	3	3	3
T6	<i>F.oxysporum</i>	3	3	3
T7	<i>T. harzianum</i>	3	3	2

Tabla 5: Grado de antagonismo en cultivos duales de *C. gloesporioides* frente a *C. rosea*, *F. oxysporum* y *T. harzianum* en Agar Papa Dextrosa (PDA) a 10 °C, 20°C y 30°C y 12 días de evaluación, utilizando la escala de Bell.

Tratamientos	Hongos Antagonistas	Grado de antagonismo		
		10°C	20°C	30°C
T5	<i>C. rosea</i>	3	3	3
T6	<i>F.oxysporum</i>	3	3	3
T7	<i>T. harzianum</i>	3	3	3

Tabla 6: Grado de antagonismo en cultivos duales de *C. gloesporioides* frente a *C. rosea*, *F. oxysporum* y *T. harzianum* en Agar Sabouraud Dextrosa (DSA) a 10 °C y 12 días de evaluación, utilizando la escala de Bell.

Sobre el grado de antagonismo, todos los ensayos están en la escala del 3, salvo cuando *C. gloesporioides* se enfrenta a *T. harzianum* en la cual la escala es de 2 a 30°C.

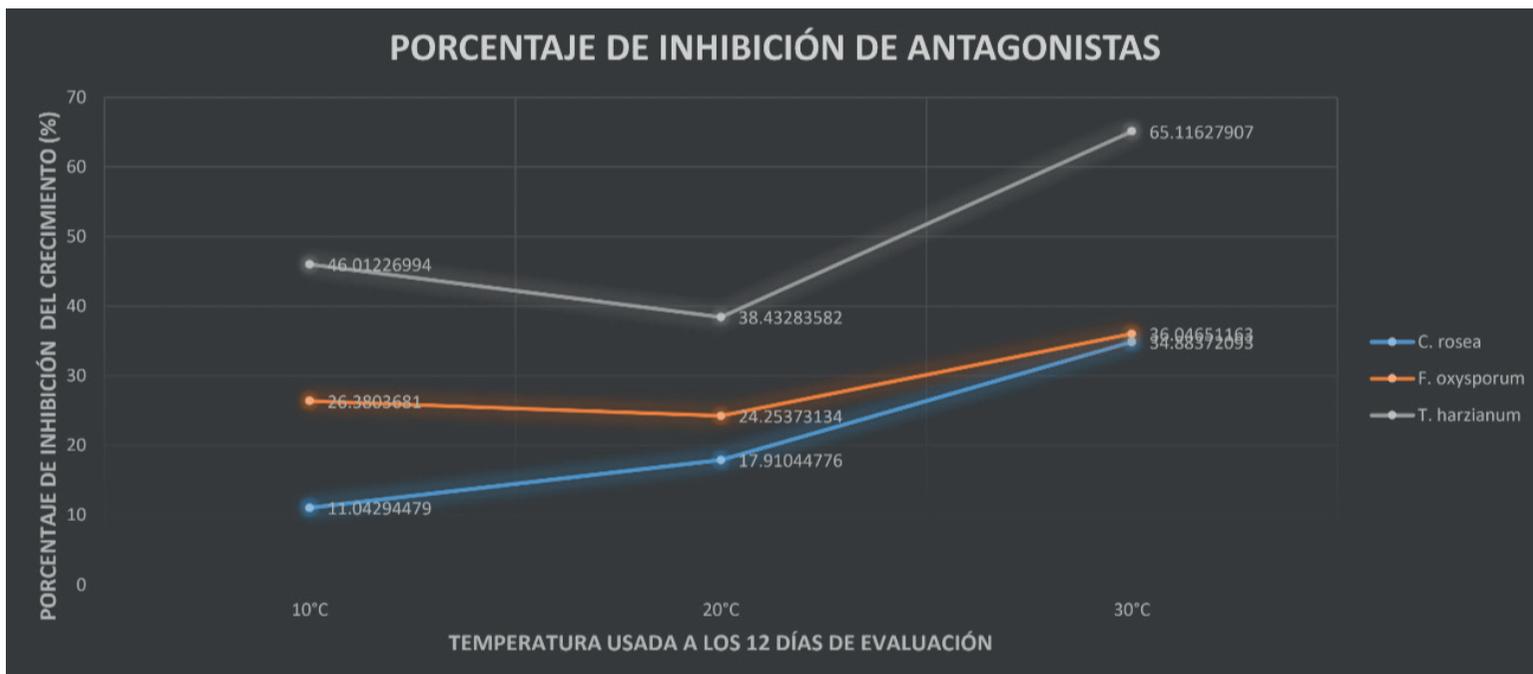


Figura 9. Porcentaje de inhibición en Agar Papa Dextrosa (PDA) a 10°C, 20°C y 30°C de *C. rosea*, *F. oxysporum* y *T. harzianum* frente a *C. gloesporioides* a los 12 días de evaluación. A los 10°C de evaluación *C. rosea*, *F. oxysporum* y *T. harzianum* enfrentados a *C. gloesporioides* en medio de cultivo PDA presentaron un porcentaje de inhibición de 11.04%; 26.38% y 46.01% respectivamente, mientras que a los 20°C presentaron un porcentaje de inhibición de 17.91%; 24.25% y 38.43% y a los 30°C de evaluación presentaron un porcentaje de inhibición de 34.88%; 36.05% y 65.12% respectivamente. El mayor porcentaje de inhibición lo realiza *T. harzianum* y el menor lo realiza *C. rosea*.

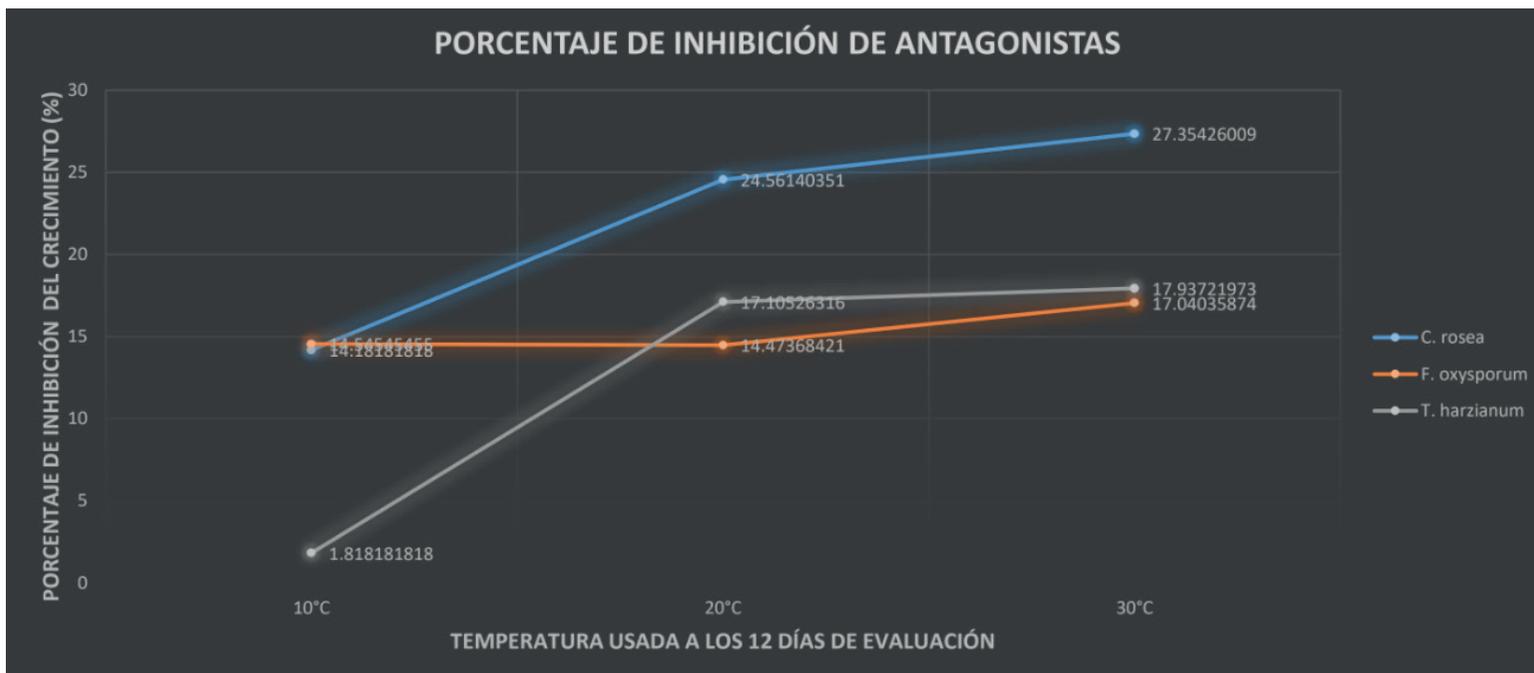
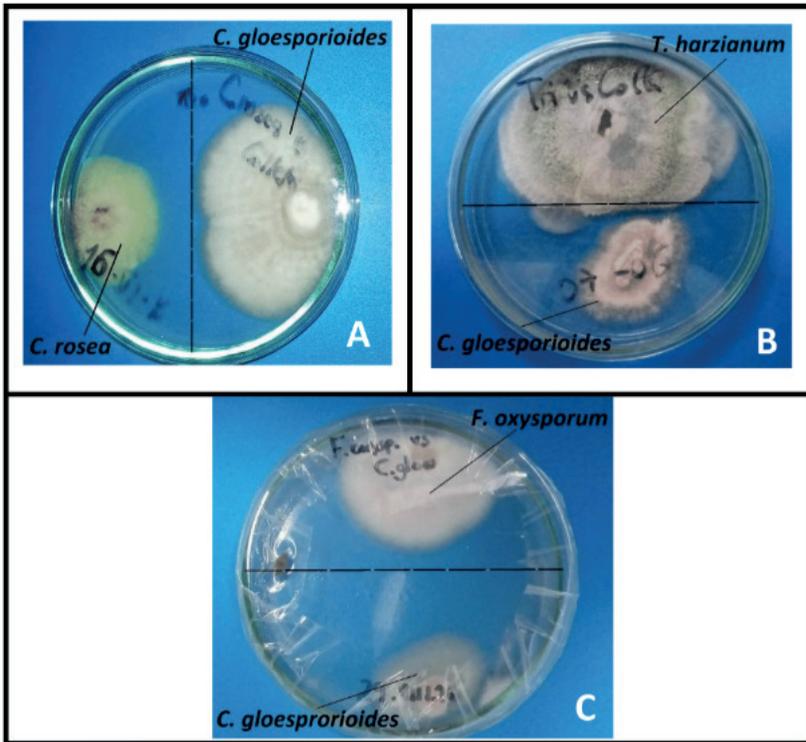


Figura 10. Porcentaje de inhibición en Agar Sabouraud Dextrosa (DSA) a 10°C, 20°C y 30°C de *C. rosea*, *F. oxysporum* y *T. harzianum* frente a *C. gloesporioides* a los 12 días de evaluación. A los 10°C de evaluación *C. rosea*, *F. oxysporum* y *T. harzianum* enfrentados a *C. gloesporioides* en medio de cultivo DSA presentaron un porcentaje de inhibición de 14.19%; 14.55% y 1.81% respectivamente, mientras que a los 20°C presentaron un porcentaje de inhibición de 24.56%; 14.47% y 17.11% y a los 30°C de evaluación presentaron un porcentaje de inhibición de 27.35%; 17.04% y 17.93% respectivamente. El mayor porcentaje de inhibición, en medio DSA, lo realiza *C. rosea* y el menor *F. oxysporum*



-- = Línea media de la placa Petri

Figura 11. Crecimiento en los cultivos duales A) *C. rosea* vs *C. gloesporioides* B) *T. harzianum* vs *C. gloesporioides* y C) *F. oxysporum* vs *C. gloesporioides*, a las 144 horas (6 días) de crecimiento.

El crecimiento de los cultivos duales de los hongos: *C. gloesporioides*, *C. rosea*, *F. oxysporum* y *T. harzianum* enfrentados, crecieron de forma muy irregular en comparación a lo largo de la siembra a las 24 horas de su crecimiento.

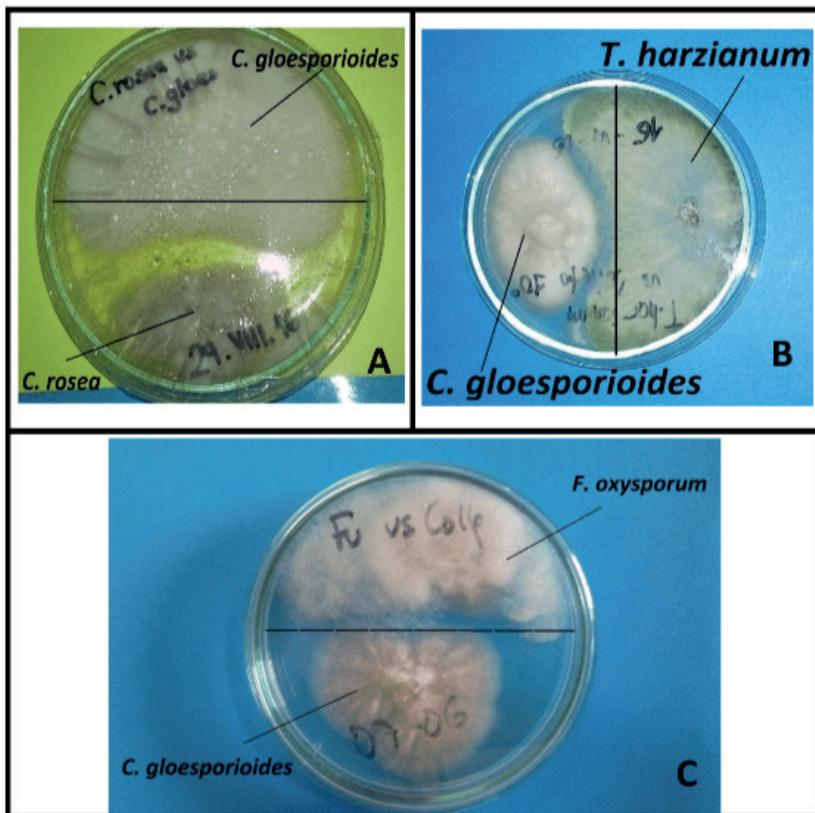


Figura 12. Crecimiento de los cultivos duales A) *C. rosea* vs *C. gloesporioides* B) *T. harzianum* vs *C. gloesporioides* y C) *F. oxysporum* vs *C. gloesporioides*, a las 288 horas (12 días) de crecimiento.

El crecimiento de los cultivos duales de los hongos: *C. gloesporioides*, *C. rosea*, *F. oxysporum* y *T. harzianum* enfrentados, crecieron de forma muy irregular en comparación a lo largo de la siembra a las 144 horas de su crecimiento.

DISCUSIÓN

Se relaciona el efecto del medio de cultivo y la temperatura para evaluar las actividades antagonistas de los hongos ensayados. De los antagonistas, *T. harzianum* crece muy bien en PDA, en cambio *F. oxysporum* es el que muestra mayor crecimiento a 20°C y 30°C (Tabla 3, Fig. 3,4,5). Otro antagonista, *C. rosea* crece muy bien a 30°C en DSA y a 20°C crecen muy bien *T. harzianum* y *F. oxysporum* en el mismo medio. Destaca el crecimiento de *C. gloesporioides* cuando está solo, mucho mayor que antagonistas (Tabla 4, Fig. 6,7,8). Cuando están en cultivos duales, *T. harzianum* controla muy bien en PDA, pero en DSA el control es menor por parte de los antagonistas (Tabla 5,6, Fig. 9,10,11,12) Sobre el porcentaje de inhibición en PDA, a medida que desarrollaba la colonia del patógeno por las

24 hr de anticipación de la siembra en relación a sus antagonistas mayor era el porcentaje de inhibición frente a los antagonistas enfrentados.

El hongo *T. harzianum* crece y controla muy bien en PDA y DSA, pero *C. gloeosporioides* crece mejor y hay más resistencia a ser inhibido en el medio DSA debido a que este contiene peptona, tripteína y glucosa que aprovecha mucho mejor el patógeno debido a su condición de nutrición hemibiótrofa. El género *Trichoderma* es un agente de control biológico muy eficiente debido a que presenta alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y una amplia gama de sustratos donde pueden crecer debido a las numerosas enzimas que posee; además es un excelente competidor por espacio y recursos nutricionales lo que evidencia el amplio rango de hospedante de este antagonista. (Fernández & Suárez, 2009; Mont, 2002). Asimismo, Sid et al (2003) y Harman (2002) refieren que *T. harzianum* tiene gran adaptabilidad a diferentes temperaturas, pudiendo crecer y reproducirse normalmente hasta los 35°C, a este nivel estas enzimas juegan un importante papel en el micoparasitismo.

Clonostachys rosea es un antagonista con rango de acción restringido por temperatura y medio de cultivo, según lo observado, solo crece muy bien a 30°C en DSA, su crecimiento y antagonismo a 10oC y 20oC es muy bajo ello se explica que en condiciones ambientales favorables, el antagonista incrementa su actividad supresiva según se incrementa la temperatura de 10° C a 25 °C y que a partir de los 15 °C la germinación de los conidios del biocontrolador es mayor al 80%, incrementándose también con el aumento de temperatura (Chaves & Wang, 2004). Además, la cantidad de metabolitos producido por *C. rosea* depende de los nutrientes y no siempre está relacionada con la habilidad para controlar la enfermedad. Entre los principales mecanismos de acción que presenta esta antagonista están: competencia por los nutrientes presentes en el suelo, el enrollamiento alrededor de las hifas del hospedante y la producción de enzimas hidrolíticas como β -1,3-glucanasas, β -1,6-glucanasas, quitinasas, y proteasas, para penetrar al hospedante y usar su contenido celular como fuente de nutrientes (Flores-Bazauri et al., 2015; Rodríguez & Chico-Ruíz, 2013)

F. oxysporum muestra actividad antagonista pero se ve limitado por la temperatura y el medio de cultivo, al igual que *Clonostachys*. En los cultivos duales se observa una competencia por nutrientes de *F. oxysporum* frente a *C. gloeosporioides*, donde el crecimiento de este hongo usado como antagonista, se limita ya que no se revela la patogenicidad exacta de este hongo fuera de un género hospedante, debido a que puede crecer como saprófito sobre muchas plantas no hospedantes; sobrevivencia saprofítica que contribuye a la longevidad del patógeno en el suelo. La temperatura óptima para el desarrollo del patógeno está entre 25 y 30° C, una temperatura mínima de 5°C y una temperatura máxima de 37°C, el punto termal de muerte en el suelo es de 57.5 a 60°C durante 30 minutos (Veneros-Terrones et al., 2017).

Se debe destacar que *C. gloeosporioides* crece muy bien en DSA lo cual lo fortalece

para enfrentar a los antagonistas de ahí que el porcentaje de inhibición es menor si lo comparamos cuando crece en PDA. la expresión de esta resistencia, puede deberse a que surjan alteraciones en algunos procesos metabólicos que son gobernados por un número reducido de genes como la cuantificación del crecimiento micelial, germinación de esporas en medio de cultivo adicionado con fungicidas, y pruebas in vivo de la efectividad biológica de dichos productos, como lo demostró en sus investigaciones Cerón et al., (2006). También se explica porque está estrechamente relacionado con la amplia gama de huéspedes, las infecciones cruzadas y coinfecciones por múltiples especies, y la amplia adaptación a la temperatura en el ambiente o específicamente sobre el organismo contribuye la presencia de una reproducción sexual atípica, estrategia que tanto los individuos homotáticos como los heterotáticos ocurren en la misma especie permitiendo poderosas mutaciones genéticas (da Silva et al. 2020, Gan et al. 2021)

La temperatura juega un papel indispensable en la infección de patógenos a los cultivos. Tiene efectos generalizados en muchos pasos de la infección por *Colletotrichum* al cultivo, que van desde la esporulación, el crecimiento del micelio, la virulencia, la expresión génica en las plantas huésped y la hibernación de inóculos, que es fundamental para las infecciones iniciales en posteriores temporadas de crecimiento de las plantas Chen et al. 2017; Dubrulle et al. 2020; Cordova et al. 2017; Gama et al. 2021).

Esto sugiere que es urgente investigar la adaptación a la temperatura de los patógenos, si asumimos que a mayor temperatura estos van desarrollando mejor y si el cambio climático promueve temperaturas elevadas, tenemos un problema en ciernes. Sin embargo, también se sugirió que existe un alto grado de individualidad, plasticidad y variación en la adaptación a la temperatura dentro del patógeno, especie y población en estudio (Lurwanu et al., 2021; Boixel et al. 2022).

El estudio de *C. gloesporioides* es muy limitado en nuestra región y poco conocido sobre todo en el Perú. Hasta el momento los resultados indican la gran capacidad de resistencia de este fitopatógeno, causante de la antracnosis, en distintos cultivos frente a algunos antagonistas, por lo cual este trabajo es un modelo a seguir para seguir investigando en busca de biocontroladores para los distintos tipos de hongos fitopatógenos que causan daño económico en la agricultura.

CONCLUSIONES

- Se determinó que el mejor controlador biológico sobre el crecimiento de *C. gloesporioides* causante de la antracnosis fue *T. harzianum* que alcanzó la clase 2 en la escala de Bell y un porcentaje de inhibición de 65.12% en PDA y 17.93% en DSA.
- La acción antagonónica in vitro de *C. rosea* y *F. oxysporum* sobre el crecimiento de *C. gloesporioides* fue negativa, determinándose así el grado 3, alcanzando

además un porcentaje de inhibición de 34.88% y 36.05% en PDA & 27.35% y 17.04%, respectivamente.

- El tipo de medio de cultivo y la temperatura son factores delimitantes en el desarrollo de las hifas, tanto de los antagonistas como del fitopatógeno.
- El crecimiento de los monocultivos fue de manera homogénea, a las condiciones ambientales sometidas, sin embargo, en los cultivos duales se presentaron deformaciones en las colonias, para los dos medios de cultivos usados.

REFERENCIAS

- Aquino M, Vásquez G, Reyes R. (2007). Biocontrol in vitro e in vivo de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. dianthi (Prill. Y Delacr.) Snyder y Hans. Con Hongos Antagonistas Nativos de la Zona Florícola de Villa Guerrero, Estado de México. Rev. mex. Fitopatol 26(2)
- Boixel AL, Chelle M, Suffert F (2022). Patterns of thermal adaptation in a globally distributed plant pathogen: local diversity and plasticity reveal two-tier dynamics. Ecol Evol 12(1):e8515.
- Cerón L, Higuera B, Sánchez J, Bustamante L, Buitrago G (2006). Crecimiento y desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* f. alatae durante su cultivo en medios líquidos. Acta Biológica Colombiana, 11 (1): 99 – 109
- Cordova LG, Madden LV, Amiri A, Schnabel G, Peres NA (2017). Meta-analysis of a web-based disease forecast system for control of anthracnose and botrytis fruit rots of strawberry in southeastern United States. Plant Dis 101:1910–1917.
- Cupull S, Andréu R, Pérez N, Delgado P, Cupull S (2003). Efecto de *Trichoderma viride* como estimulante de la germinación, en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn. Centro Agrícola 30 (1)
- Chaves N, Wang A (2004). Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum*. Agronomía Costarricense 28(2):73-85
- Chen F, Duan GH, Li DL, Zhan J (2017). Host resistance and temperature-dependent evolution of aggressiveness in the plant pathogen *Zymoseptoria tritici*. Front Microbiol 8:1217.
- da Silva LL, Moreno HLA, Correia HLN, Santana MF, de Queiroz MV (2020). *Colletotrichum*: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. Appl Microbiol Biotechnol 104(5):1891–1904.
- Dubrule G, Pensec F, Picot A, Rigalma K, Pawtowski A, Nicolleau S, Harzic N, Nodet P, Baroncelli R, Le Floch G (2020). Phylogenetic diversity and effect of temperature on pathogenicity of *Colletotrichum lupini*. Plant Dis 104(3):938–950.
- Ezziyyani M, Perez S, Rquena M, Rubio L, Candela M. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei* -Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capscicum annum L.*) causada por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología 26:69-78
- Fernandez J, Suarez C (2009). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum rifai* sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. 62(1): 4743-4748

- Flores-Bazauri W, Chico-Ruiz J, Cerna-Rebaza L (2015). Actividad antagonica in vitro de *Clonostachys rosea* sobre *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*. REBIOL 35(1): 34-42
- Fravel DR (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. Annual Review of Phytopathology 43: 337-359.
- Gama AB, Cordova LG, Rebello CS, Peres NA (2021). Validation of a decision support system for blueberry anthracnose and fungicide sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates. Plant Dis 105(6):1806–1813.
- Gan P, Hiroyama R, Tsushima A, Masuda S, Shibata A, Ueno A, Kumakura N, Narusaka M, Hoat TX, Narusaka Y, Takano Y, Shirasu K (2021). Telomeres and a repeat-rich chromosome encode effector gene clusters in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi. Environ Microbiol 23(10):6004–6018.
- Harman, GE (2002). *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* (Deuteromycetes: Moniliales). Cornell University, Geneva, N. Y. Disponible en: www.iicasaninet.net/pub/sanueg/html
- Howell, TA (1998). Using the PET network to improve irrigation water management. In: Triplett, L.L. (Ed.), The Great Plains Symposium 1998: The Ogallala Aquifer, Determining the Value of Water Proceedings of the 1988 Great Plains Symposium, March 10–12, 1998, Lubbock, TX, the Great Plains Foundation, Overland Park, KS, 1998; pp. 38–45.
- Huaman G (2001). *Trichoderma* spp. Including *T. harzianum* *T. viride* *T. koningii* and *T. hamatum*. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system): Universidad de Costa Rica; 2001. Disponible en: <http://www.scielo.sa.cr/scieloOrg/php/reflinks.php?refpid=S1651ng=es>.
- Klein D, Eveleigh DE (199). Ecology of *Trichoderma*. In: Kubicek CP, Harman GE, editors. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. London: Taylor and Francis Ltd.; pp. 57–74.
- Lurwanu Y, Wang YP, Wu EJ, He DC, Waheed A, Nkurikiyimfura O, Wang Z, Shang LP, Yang LN, Zhan J (2021). Increasing temperature elevates the variation and spatial differentiation of pesticide tolerance in a plant pathogen. Evol Appl 14(5):1274–1285.
- Molina M, Zaldúa F, Gonzalez V (2006). Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. *Bosque (Valdivia)* 27(2): 126-134
- Monte E (2001). Understanding *Trichoderma*: Between biotechnology and microbial ecology. Int. Microbiol 4: 1-4.
- Mont, R. (2002). Manejo integrado de las enfermedades de las plantas. SENASA. Lima-Perú, pp.50-56.
- Rey M, Delgado J, Rincón M, Limón M, Benítez T (2000). Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. Rev. Iberoam Micol 17: S31-S36.
- Rivera-Fonseca A. (2007). Evaluación y caracterización de la actividad antifúngica de la especie *Quillaja saponaria* Mol. cultivada in vitro en *Botrytis Cinerea* Pers. Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración. Temuco, Chile
- Rodríguez M, Chico-Ruiz J(2013). Efecto antagonico in vitro de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* procedente de cultivos de *Vitis vinifera*. REBIOL 33(2): 42-49

Sid Ahmed A., Ezziyani M, Pérez Sánchez C, Candela ME (2003). Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. *European Journal of Plant Pathology* 109 (6):633–637

Silva KS, Reboucas TNH, Lemos OL, Bomfim MP, Bomfim AA, Esquivel GL, Barreto APP, José ARS, Dias NO, Tavares GM (2006). Patogenicidad causada pelo fungo *Colletotrichum gloesporioides* (Penz) em diferentes especies fructíferas. *Revista Brasileira de Fruticultura* 28 (1):131-133.

Suarez M. (2008). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart) asociado a la marchitez en la maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología* X (5): 35-43.

Veneros-Terrones R; Cerna-Rebaza L; Chico-Ruiz J. (2017). Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani*. *SAGASTEGUIANA* 5(1): 1-6

Vinale F, Sivasithamparamb K, Ghisalbertic ML, Marra R, Woo SL, Lorito M (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1-10.