

Evidencia de un antagonismo *in vitro* de especies de *Trichoderma* contra *Hemileia vastatrix* (roya del café)

Carlos E. Rolz Asturias, Luis Roberto De León Fajardo & Ofelia Paniagua

Centro de Ingeniería Bioquímica, Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala
carlosrolz@uvg.edu.gt

Introducción

La roya del café inducida por el hongo *Hemileia vastatrix* es considerada como una de las enfermedades más serias de este cultivo (Agrios, 1988). Se considera que se originó asociada al café silvestre en Etiopia, siendo reportada su presencia en café cultivado en Sri Lanka en 1869. En ese país el efecto fue devastador, a tal grado que se abandonó el cultivo de café en la isla (McCook 2006).

Fue detectada en el continente americano en 1970 en plantaciones en Brazil (Kushalappa y Eskes, 1989). Desde entonces se ha extendido al resto de países latinoamericanos productores de café, encontrándose en Guatemala en diciembre de 1980 (Schieber y Zentmyer, 1984). En América los efectos fueron relativamente más leves, posiblemente debido a las prácticas agrícolas, al uso puntual de fungicidas químicos, y la presencia de antagonistas naturales en el ecosistema cafetalero, que se tradujo en un relativo control (Vandermeer et al 2009; Jackson et al 2012). Algunos opinan que el efecto del cambio climático, traducido a una mayor temperatura del ambiente y una concentración de CO₂ en la atmósfera, podría favorecer la incidencia de la roya (Ghini et al, 2012). Es posible que esto haya causado, entre otros factores indudablemente, la situación prevaleciente en estos últimos años en la que sobresale la severidad de la enfermedad y la agresividad del hongo con efectos notorios. Recientemente Cristancho et al (2012) en Colombia informaron que aislados de *H. vastatrix* en las plantaciones colombianas siguen perteneciendo a la raza II conservando la virulencia original, y por lo tanto, la reciente epidemia en ese país, se ha debido a condiciones óptimas del ambiente y en la plantación para la propagación masiva del hongo.

El control de la enfermedad se ha basado principalmente en el uso de fungicidas químicos, tanto en aspersiones de fungicidas a base de cobre durante la estación de lluvias, como también en fungicidas sistémicos (Waller, 1985; Kushalappa y Eskes, 1989). Con esta metodología se mantiene un nivel bajo de infección en el rango de un 15-20 % del control sin tratamiento

químico. También se emplean: a) diversas prácticas agrícolas como la densidad de siembra, la cantidad de sombra y otras descritas en detalle por Avelino et al (2004; 2006); b) empleo de variedades de café resistentes (Silva et al, 2002), c) productos naturales, como el extracto metanólico de las semillas de neem (*Azadirachta indica*) (Costa et al, 2007), aceites esenciales, especialmente el de citronela (*Cymbopogon nardus*) (Pereira et al, 2012a;b) y d) aspersiones foliares de minerales como el silicato de potasio (Carré-Missio et al, 2012a;b).

Las metodologías de control anteriores tienen algunos efectos adversos. Se ha informado que el empleo continuo del control con fungicidas a base de cobre ha causado: a) apariciones bruscas y masivas del minador de hoja *Leucoptera coffeella* (Eskes et al, 1991), b) una acumulación de cobre en los suelos de las plantaciones y c) concentraciones foliares de cobre en niveles tóxicos para la propia planta (Loland y Singh, 2004). Los efectos de estos fungicidas sobre la salud humana están en evaluación. Como explica Hadadd et al (2009) las plantaciones certificadas como café orgánico y otros cafés especiales o gourmets tienen prohibido el uso de estos compuestos químicos, por lo tanto tendrían que recurrir a productos naturales u otras alternativas.

El control de la roya por el uso de variedades resistentes es prometedor, pero la variabilidad genética del patógeno reduce la durabilidad de la resistencia inicial manifestada (Gouveia et al, 2005). Un estudio reciente ha demostrado una reproducción sexual dentro de la espora (*criptosexualidad*), la cual podría explicar el surgimiento tan frecuente de nuevas razas del hongo (Carvalho et al, 2011).

La existencia de hongos hiperparásitos a la roya del café se ha demostrado en el laboratorio (Carrión, 1988; Carrión y Ruiz-Belin, 1988; Leguizamón et al, 1989; Eskes et al, 1991; Alarcón y Carrión, 1994; Vélez et al, 1995; Rivas et al, 1996; Carrión et al 1999). Todos los estudios anteriores se refieren al hiperparásito *Lecanicillium lecanii* (antes denominado *Verticillium lecanii*). Sin embargo se han aislado otros hiperparásitos. En Guatemala, Arriola et al (1998) aislaron de lesiones de *H. vastatrix* en el campo los hongos siguientes: *Aphanocladium*

meliiolae, *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium leptobactrum*, y *Verticillium sp.* En Xalapa, Veracruz, Carrión y Rico-Gray (2002) aislaron los hongos siguientes: *Acremonium byssoides*, *Calcarisporium arbuscula*, *C. ovalisporum*, *Sporothrix guttuliformis*, *Fusarium pallidoroserum*).

Sin embargo, las pruebas de preparaciones del hiperparásito en el campo han demostrado resultados antagónicos y conflictivos. Posiblemente se ha debido a una formulación inadecuada y el uso de la metodología usual de aspersión empleada con los fungicidas químicos. Como ha demostrado Vandermeer et al (2009; 2010) y Jackson et al (2012a; b), para que el parásito realice el control que se desea deben facilitarse las condiciones naturales de su acción. Los ensayos demuestran que para que haya un parasitismo son necesarias, además de condiciones atmosféricas y del ecosistema del cafetal, dos condiciones que son: a) que se mantenga permanentemente en el suelo de las plantaciones una densidad elevada del hiperparasito y b) que estén presentes los vectores (principalmente insectos) que transportan el hongo del suelo a las hojas infectadas.

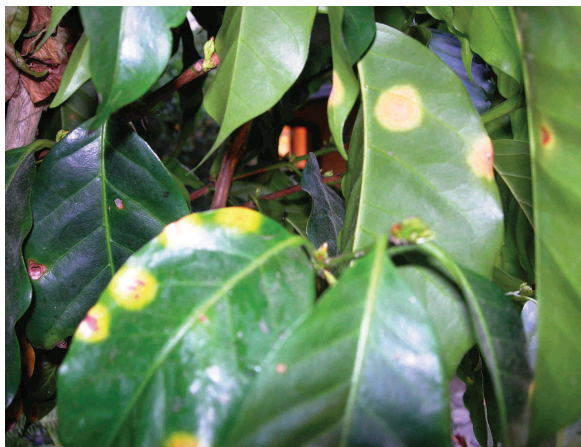
También se ha aislado bacterias endófitas de las plantaciones de café que han mostrado una actividad biológica de control sobre *H. vastatrix* y los resultados en campo han sido prometedores (Shiomi et al, 2006; Haddad et al, 2009; Silva et al, 2012).

Por otro lado, especies del hongo *Trichoderma spp.*, común en el suelo asociado al sistema de raíces de las plantas, ha mostrado ser un parásito para otros hongos. El mecanismo empleado por el hiperparásito ha sido estudiado y se han identificado pasos clave en el mismo (Howell, 2003; Harman et al, 2004). En la fase final, el *Trichoderma* aprisiona los filamentos o la estructura del hongo patógeno, excreta enzimas y posiblemente antibióticos, con el objeto de crear orificios de entrada en la pared celular del hongo que sufre el ataque, y finalmente penetra y/o extrae nutrientes. El resultado de esta acción es prácticamente el fin del hongo patógeno.

A continuación se presenta evidencia gráfica de la acción de especies de *Trichoderma* sobre la hoja de café infectada por *H. vastatrix*.

Métodos

Las hojas infectadas fueron obtenidas de un árbol de café localizado en un jardín de Vista Hermosa, ciudad de Guatemala, ver Gráfica 1. Los ensayos se llevaron a cabo en cajas de Petri en agar PDA. Se colocaron secciones circulares de la hoja infectada sobre el agar. Luego, en un espacio libre de la caja se depositó una asada del hongo en prueba obtenida de un cultivo puro del mismo. Las cajas cerradas se colocaron en una incubadora a 32 °C (*Imperial III Incubator Lab-Line*). Se observó el crecimiento del hongo en prueba en función del tiempo y cuando cubrió la hoja infectada se registró la confrontación entre los dos hongos por medio de un estereoscopio (*Olympus SZX12*). La metodología con discos de hoja sobre superficie de agar ha sido empleada previamente en confrontaciones con *H. vastatrix* (Eskes et al, 1991; Arriola et al, 1998), siendo de uso



Gráfica 1. Cafetal con hojas infectadas por *H. vastatrix*

frecuente en casos parecidos, por ejemplo, el antagonismo de *Trichoderma harzianum* sobre *Uromyces appendiculatus*, la roya del frijol (Burmeister y Hau, 2009).

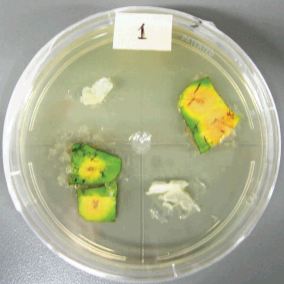
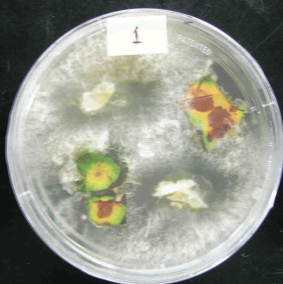

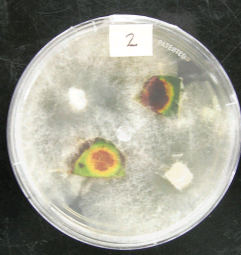
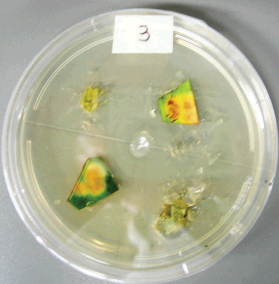
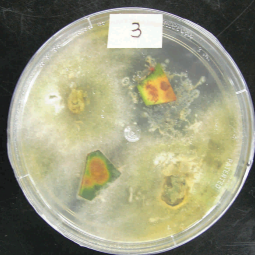
Los hongos ensayados como posibles hiperparásitos fueron: *Trichoderma hamatum* CBS123055, *Trichoderma harzianum* CBS 130681 y *Trichoderma harzianum* DSMZ63059.

Resultados

En la Gráfica 2 se presenta en la tercera columna el estado de desarrollo de los hongos *Trichoderma* a las 48 h de haber sido colocados sobre el agar conteniendo los discos de hoja de café infectados con *H. vastatrix*. El nivel del crecimiento puede evaluarse al comparar la superficie de agar en el momento de incorporar los dos hongos, mostrado en la segunda columna. En todos los casos se observa un crecimiento del *Trichoderma*, sin impedimento y en forma de micelio, en las zonas libres de la superficie del agar, prácticamente rodeando a los discos de hoja de café. Las dos cepas de *T. harzianum* mostraron un crecimiento más rápido que el *T. hamatum*. Es de notar que las dos cepas de *T. harzianum* mostraron una coloración de micelio diferente. Posiblemente causada por una esporulación precoz de la cepa (3) *T. harzianum* CBS130681. Así mismo, se observa el aumento de la necrosis de la hoja en la zona infectada.

En la Gráfica 3 se observa la esporulación masiva de las cepas de *Trichoderma* con su color verde amarillo característico y la penetración del micelio en las zonas de infección de la hoja de café, la cual muestra una zona total de necrosis.

La Gráfica 4 muestra un acercamiento de la zona infectada. En la primera fila correspondiente al *T. hamatum* se observa claramente un masivo crecimiento y tejido miceliar en la zona infectada de la hoja y la esporulación directamente sobre la *H. vastatrix*. Por el contrario, las dos cepas de *T. harzianum* muestran poco crecimiento miceliar en la zona infectada, pero si se observa una esporulación sobre *H. vastatrix*. Es posible, entonces, que exista un mecanismo diferente al parasitismo entre las dos especies.

Microorganismo	Inicio	48 h
<i>T. hamatum</i> CBS 123055		
<i>T. harzianum</i> DSMZ 63059		
<i>T. harzianum</i> CBS130681		

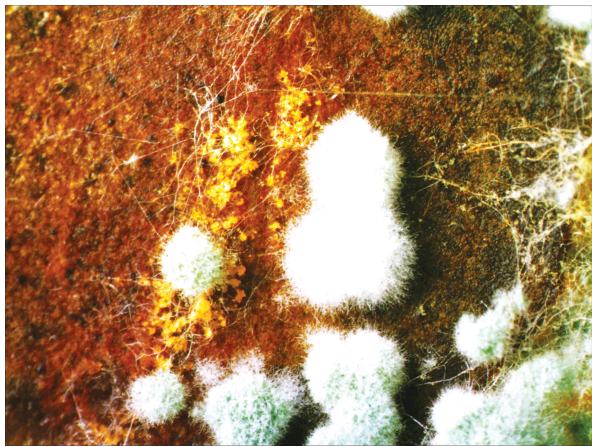
Gráfica 2. Preparación de la confrontación de los hongos en la superficie de agar y desarrollo inicial del crecimiento



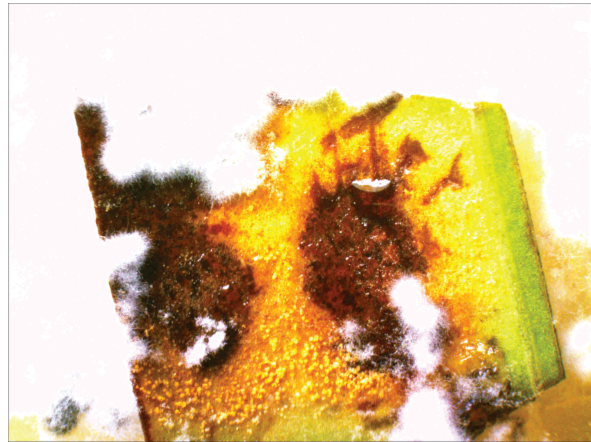
Gráfica 3. Estado de la confrontación de los hongos en la superficie de agar a los 6 días



T. hamatum CBS 123055



T. harzianum DSMZ 63059



T. harzianum CBS130681

Gráfica 4. Acercamiento del crecimiento de *Trichoderma* sobre la zona de la hoja de café infectada por *H. vastatrix*

Lamentablemente no se muestran imágenes con microscopía electrónica por la ausencia en la disponibilidad de dicho equipo ya que como fue ilustrado por Arriola et al (1998), la visión electrónica permite visualizar la manera de como el hongo hiperparásito aprisiona los filamentos o la estructura del hongo patógeno para luego penetrar.

El ataque de *Trichoderma* sobre *H. vastatrix* en los hojas de un árbol en el cafetal podría ser diferente al parasitismo clásico, por ejemplo, podría ser una competencia por sitios o por nutrientes existentes sobre la hoja; o también podría ser que *Trichoderma* induzca resistencia en la planta a la infección.

Informes recientes ilustran las maneras de acción en diferentes plantas y hongos fitopatógenos. Primero, el parasitismo es común contra hongos filamentosos, *T. harzianum* como hiperparásito de *Rhizoctonia solani* (Almeida et al, 2007; Huang et al, 2011), de *Fusarium oxysporum* (Dubey et al, 2007), de *Fusarium verticilloides* (Chandra Nayaka et al, 2010) y *T. atroviride*, *T. koningiopsis* y *T. harzianum* de *Macrophomina phaseolina* (Larralde-Corona et al, 2008). Segundo, la producción de antibióticos contra el hongo fitopatógeno, *T. harzianum* contra *Leptosphaeria maculans*, *Phytophthora cinnamoni* y *Botrytis cinerea* (Vinale et al, 2009). Tercero, la competencia por espacio y por nutrientes, *T. longibrachiatum* contra *Botrydiodia theobromae* (Sobowale et al, 2010), *T. asperellum* contra *Fusarium oxysporum* (Segarra et al, 2010).

El trabajo de Burmeister y Hau (2009) demuestra que el ataque de *T. harzianum* sobre el hongo causante de la roya del frijol, *U. appendiculatus* se debe a la producción de antibióticos, descartando el posible parasitismo clásico.

Conclusión y Sugerencias

El estudio demuestra un posible antagonismo de cepas de *Trichoderma* sobre *Hemileia vastatrix* como resultado de una invasión del micelio de *Trichoderma* sobre la *H. vastatrix* en la lesión de la hoja. De las observaciones efectuadas es posible deducir que el mecanismo del antagonismo podría ser diferente entre *T. hamatum* y *T. harzianum*.

En base a lo anterior se sugiere: a) incluir a este género dentro del arsenal disponible de hongos hiperparásitos de la roya del café, b) comprobar en ensayos futuros el parasitismo a escala de invernadero empleando plantas jóvenes de café e indicadores cuantitativos para evaluar el grado de protección logrado, y c) diseñar pruebas de campo en donde se establezca una densidad de la población del hiperparásito adecuada y sostenible en el suelo del cafetal que permita evaluar si los mecanismos de control naturales funcionan.

Agradecimiento

Agradecemos la colaboración del MSc. Luis Andrés Arévalo por las fotografías de acercamiento empleando el estereoscopio.

Bibliografía

- Agrios GN (1988) *Plant pathology* Academic Press pp. 466-468
- Alarcón R, G Carrión (1994) *Uso de Verticillium lecanii en cafetales como control biológico de la roya del café* Fitopatol (Perú) **29**: 82-85
- Almeida FBd R, FM Cerqueira, RdN Silva, CJ Ulhoa, AL Lima (2007) *Mycoparasitism studies of Trichoderma harzianum strains against Rhizoctonia solani: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme* Biotechnol Lett **29**: 1189-1193
- Arriola MC d, I Chet, C Rolz (1998) *Hongos que atacan la roya del café: un breve comentario* Revista de la Universidad del valle de Guatemala **8**: 2-6
- Avelino J, L Willocquet, S Savary (2004) *Effects of crop management patterns on coffee rust epidemics* Plant Pathol **53**: 541-547
- Avelino J (2006) *The intensity of a coffee rust epidemic is dependent on production situations* Ecol Modell **197**: 431-447
- Burmeister L, B Hau (2009) *Control of the bean rust fungus Uromyces appendiculatus by means of Trichoderma harzianum: leaf disc assays on the antibiotic effect of spore suspensions and culture filtrates* BioControl **54**: 575-585
- Carré-Missio V, FA Rodrigues, DA Schurt, WR Moreira, DC Rezende, GH Korndörfer, L Zambolim (2012) *Proteção local, não sistêmica, do silicato de potássio reduz os sintomas da ferrugem do cafeeiro* Trop Plant Pathol **37**: 275-280
- Carré-Missio V, (2012) *Componentes epidemiológicos da ferrugem do cafeeiro afetados pela aplicação foliar de silicato de potássio* Trop Plant Pathol **32**: 50-56
- Carrión G (1988) *Estudio sobre el control biológico de la roya del café mediante Verticillium lecanii* Micol Neotrop Aplic **1**: 79-86
- Carrión G, F Ruiz-Belin (1988) *Inoculación en el laboratorio de Verticillium lecanii sobre la roya del café (Hemileia vastatrix)* Rev Mex Micol **4**: 317-321
- Carrión G, V Rico-Gray *Mycoparasites on the coffee rust in Mexico* Fungal Diversity, Chiang Mai **11**: 49-60
- Chandra Nayaka S, SR Niranjana, AC Uday Shankar, S Niranjan Raj, MS Reddy, HS Prokash, CN Mortensen (2010) *Seed biopriming with novel strain of Trichoderma harzianum for the control of toxigenic Fusarium verticillioides and fumonisins in maize* Arch Phytopathol Plant Prot **43**: 264-282
- Costa MJN, L Zambolim, FA Rodrigues (2007) *Avaliação de Produtos Alternativos no Controle da Ferrugem do Cafeeiro* Fitopatol Brasil **32**: 150-155
- Cristancho MA, (2012) *Outbreak of coffee leaf rust (Hemileia vastatrix) in Colombia* New Dis Rep **25** (19)
- Dubey SC, M Suresh, B Singh (2007) *Evaluation of Trichoderma species against Fusarium oxysporum f. sp. ciceris for integrated management of chickpea wilt* Biol Control **40**: 118-127
- Eskes A, M Mendes, C Robbs (1991) *Laboratory and field studies on parasitism of Hemileia vastatrix with Verticillium lecanii and V. leptobactrum* Café Cacao Thé **35**, 275-282
- Ghini R, W Bettiol, E Hamada (2011) *Diseases in tropical and plantation crops as affected by climate changes: current knowledge and perspectives* Plant Pathol **60**: 122-132
- Gouveia MMC, A Ribeiro, VMP Varzea, CJ Rodriguez (2005) *Genetic diversity in Hemileia vastatrix based on RAPD markers* Mycol **27**: 396-404
- Haddad F, LA Maffia, ESG Mizubuti, H Teixeira (2009) *Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil* Biol Control **49**: 114-119
- Harman GE, CR Howell, A Viterbo, I Chet, M Lorito (2004) *Trichoderma species – Opportunistic, avirulent plant symbionts* Nature Rev Microbiol **2**: 43-56
- Howell CR (2003) *Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts* Plant Dis **87**: 4-19
- Huang X, L Chen, W Ran, Q Shen, S Yang (2011) *Trichoderma harzianum strain SQR-T37 and its bio-organic fertilizer could control Rhizoctonia solani damping-off disease in cucumber seedlings mainly by the mycoparasitism* Appl Microbiol Biotechnol **91**: 741-755
- Jackson D, J Skillman, J Vandermeer (2012) *Indirect biological control of the coffee leaf rust, Hemileia vastatrix, by the entomogenous fungus Lecanicillium lecanii in a complex coffee agroecosystem* Biol Control **61**: 89-97
- Jackson D, K Zemenick, G Huerta (2012) *Occurrence in the soil and dispersal of Lecanicillium lecanii, a fungal pathogen of the green coffee scale (Coccus viridis) and coffee rust (Hemileia vastatrix)* Trop Subtrop Agroecosyst **15**: 389-401
- Kushalappa AC, AB Eskes (1989) *Advances in coffee rust research* Ann Rev Phytopathol **27**: 503-531
- Laralde-Corona CP, MR Santiago-Mena, AM Sifuentes-Rincón, IC Rodríguez-Luna, MA Rodríguez-Pérez, K Shirai, JA Narváez-Zapata (2008) *Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native Trichoderma strains against Macrophomina phaseolina isolated from sorghum and common bean* Appl Microbiol Biotechnol **80**: 167-177
- Leguizamón J, P Vélez, A Gonzalez (1989) *Efecto de extractos metabólicos de Verticillium lecanii sobre Hemileia vastatrix* Cenicafe **40** (2):31-39
- Loland JØ, BR Singh (2004) *Copper contamination of soil and vegetation in coffee orchards after long-term use of Cu fungicides* Nutr Cycl Agroecosyst **69**: 203-211
- McCook S (2006) *Global rust belt: Hemileia vastatrix and the ecological integration of world coffee production since 1850* J Global History **1**: 177-196
- Pereira RB, GC Lucas, FJ Perina, E Alves (2012) *Essential oils for rust control on coffee plants* Ciênc. agrotec., Lavras **36** (1): 16-24
- Pereira, RB, GC Lucas, FJ Perina, PM Ribeiro Júnior, E Alves (2012) *Citronella essential oil in the control and activation of coffee plant defenses response against rust and brown eye spot* Ciênc. agrotec., Lavras, **36** (4): 383-390
- Rivas S, J Leguizamón, C Ponce (1996) *Estudio histológico, anatómico y morfológico de Verticillium lecanii y Talaromyces wortmannii con Hemileia vastatrix* Cenicafe **47** (1): 16-31
- Schieber E, GA Zentmyer (1984) *Distribution and spread of coffee rust in Latin America* In: Coffee rust in the Americas Fulton RH (ed) pp.1-14 The American Phytopathological Society, St. Paul, Minn. Symposium Book No.2
- Segarra G, E Casanova, M Avilés, I Trillos (2010) *Trichoderma asperellum strain T34 controls Fusarium wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron* Microb Ecol **59**: 141-149
- Shiomi HF, HSA Silva, IS de Melo, FV Nunes, W Bettiol (2006) *Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust* Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.) **63** (1): 32-39
- Silva HSA, JPL Tozzi, CRF Terrasan, W Bettiol (2012) *Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust* Biol Control **63**: 62-67
- Sobowale A A, SG Jonathan, BO Odu, ADV Ayansina, TK Ojokuto (2010) *Trichoderma longibrachiatum as an antagonist of Botrydiplodia theobromae* Arch Phytopathol Plant Prot **43**: 479-484
- Vandermeer J, I Perfecto, H Liere (2009) *Evidence for hyperparasitism of coffee rust (Hemileia vastatrix) by the entomogenous fungus, Lecanicillium lecanii, through a complex ecological web* Plant Pathol **58**: 636-641
- Vandermeer, J, I Perfecto, S Philpot (2010) *Ecological Complexity and Pest Control in Organic Coffee Production: Uncovering an Autonomous Ecosystem Service* BioScience **60**: 527-537
- Vélez P, AG Rosillo (1995) *Evaluación del antagonismo del hongo Verticillium lecanii, sobre Hemileia vastatrix, en condiciones de invernadero y de campo* Cenicafe **46** (1): 45-55
- Vinale F, EL Ghisalberti, K Sivasithamparam, R Marra, A Ritiene, R Ferracane, S Woo, M Lorito (2009) *Factors affecting the production of Trichoderma harzianum secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens* Lett Appl Microbiol **48**: 705-711
- Waller, J. M. (1985) *Control of coffee diseases* In: Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage Clifford MN, KC Willson (eds) Chapter 9 pp.219-229 AVI Publishing