

PRONATTA



**ESTUDIOS DE LA INTERACCIÓN BIOLÓGICA DE
MICROORGANISMOS RELACIONADOS CON
Colletotrichum gloeosporioides (PENZ.) PENZ. SACC,
AGENTE CAUSAL DE LA ANTRACNOSIS EN TOMATE
DE ÁRBOL (Solanum betaceae (CAV.) SENDT.)**



MANIZALES, SEPTIEMBRE/1999



PROYECTO

**"ESTUDIOS BIOLÓGICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS DE LA ANTRACNOSIS
(*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) EN TOMATE DE ÁRBOL Y DESARROLLO DE
ALTERNATIVAS PARA SU MANEJO INTEGRADO EN COLOMBIA"**

SUBPROYECTO

**"ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN BIOLÓGICA DE MICROORGANISMOS
RELACIONADOS CON *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Sacc.,
AGENTE CAUSANTE DE LA ANTRACNOSIS EN TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum
betacea* (Cav.) Sendt.)".**

INFORME PARCIAL DE TESIS M.Sc.

RESPONSABLE: MARÍA JOSÉ BOTERO OSPINA

PRESIDENTE DE TESIS: FABIO ARANZAZU HERNÁNDEZ

FINANCIADO POR PRONATTA

MANIZALES, SEPTIEMBRE DE 1999

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
TÍTULO: Estudios de la interacción biológica de microorganismos relacionados con <u>Colletotrichum gloeosporioides</u> (Penz.) Penz. Sacc, agente causal de la Antracnosis en Tomate de árbol (<u>Solanum betaceae</u> (Cav.) Sendt).	1
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 GENERALES	4
2.2 ESPECÍFICOS	4
3. ANTECEDENTES	5
4. JUSTIFICACIÓN	13
5. MARCO TEÓRICO	15
5.1 Taxonomía	15
5.2 Biología. Características del género <i>Colletotrichum</i>	16
5.3 Condiciones que favorecen el desarrollo de <u>C. gloeosporioides</u> .	18
5.4 Ciclo de vida de <u>C. gloeosporioides</u> .	21
5.5 Control biológico	22
5.6 Antagonismo	23
5.6.1 Características generales del género <u>Bacillus</u>	23
5.6.1.1 Clasificación	23
5.6.2 Características generales del género <u>Pseudomonas</u>	24
5.6.2.1 Clasificación	30
5.6.3 Características generales del género <u>Trichoderma</u>	30

	Pag.
5.6.3.1 Clasificación	31
5.7 Sinergismo	31
6 MATERIALES Y MÉTODOS	34
6.1 Localización del experimento	34
6.2 Metodología	34
6.2.1 Primera etapa. Aislamiento, identificación y selección de microorganismos más promisorios con propiedades antagonistas y sinergistas.	34
6.2.1.1 Muestreo, aislamiento, identificación de microorganismos sinergistas a partir de frutos de tomate de árbol con síntomas de Antracnosis.	35
6.2.1.2 Detección y aislamiento de <i>Trichoderma</i> a partir de frutos de tomate de árbol sanos colocados en un suelo cultivado con tomate de árbol.	37
6.2.1.3 Aislamiento de <i>Colletotrichum</i>	38
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
7.1 Primer etapa: Aislamiento, identificación y selección de microorganismos más promisorios con propiedades antagonistas y sinergistas.	43
7.1.1 Muestreo, aislamiento, identificación de microorganismos sinergistas a partir de frutos de tomate de árbol con síntomas de Antracnosis.	43
7.1.2 Detección y aislamiento de <i>Trichoderma</i> a partir de frutos de tomate de árbol colocados en un suelo cultivado con tomate de árbol.	44
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Caracterización de <u><i>Pseudomonas</i></u> no fluorescentes.	27
Tabla 2. Esquema para la determinación de <u><i>Pseudomonas fluorescentes</i></u> .	28
Tabla 3. Especies de <u><i>Pseudomonas fluorescentes</i></u> saprofitas asociadas con plantas.	29
Tabla 4. Cepas aisladas de hojas y frutos de tomate de árbol.	44
Tabla 5. Resumen de los resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas obtenidas para la caracterización de <u><i>Pseudomonas fluorescentes</i></u> aislada de hojas y frutos de tomate de árbol.	45
Tabla 6. Resumen de los resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas obtenidas para la caracterización de <u><i>Bacillus</i></u> aislado de hojas y frutos de tomate de árbol.	46
Tabla 7. Cepas aisladas de frutos de tomate de árbol enfermos por Antracnosis.	47
Tabla 8. Resumen de los resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas obtenidas para la caracterización de <u><i>Pseudomona</i></u> no fluorescente aislado de frutos de tomate de árbol.	48
Tabla 9. Detección y aislamiento de <u><i>Trichoderma</i></u> a partir de frutos de tomate de árbol colocados en un suelo cultivado con tomate de árbol.	49
Tabla 10. Antibiograma para crecimiento micelial en (mm) de <u><i>C. gloeosporioides</i></u> .	50
Tabla 11. Comportamiento de algunas cepas promisorias sobre la germinación y formación de apresorios de <u><i>C. gloeosporioides</i></u> .	52

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Efecto de algunos microorganismos asociados al crecimiento micelial de <u>C. gloeosporioides</u> .	51

RESUMEN

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN BIOLÓGICA DE MICROORGANISMOS RELACIONADOS CON *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Sacc., AGENTE CAUSANTE DE LA ANTRACNOSIS EN TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betacea* (Cav.) Sendt.).

Botero O., M. J., Aranzazu H., F. Corpoica Regional 9. Carrera 30 No. 65-15.
Tel. 8860552. Fax. (0968)860393. E-mail: corpoica@col2telecom.com.co
Manizales, Caldas.

La antracnosis en tomate de árbol causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, continúa siendo uno de los problemas más limitantes en este cultivo, siendo necesario profundizar los estudios sobre la interrelación biológica de algunos microorganismos con énfasis en organismos sinergistas de los cuales se tiene indicios que estimulen la germinación y formación de apresorios; así como de organismos antagonistas que pueden ser utilizados en un futuro en el manejo de la enfermedad. El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Corpoica Manizales. Para la recolección de los microorganismos se seleccionaron 18 árboles de una plantación de tomate de árbol, de 4 años de edad, afectada por la antracnosis, recolectando de cada árbol muestras de hojas nuevas, viejas y de frutos de varios tamaños. El género *Trichoderma* se obtuvo empleando frutos colocados en el suelo. Las cepas colectadas se clasificaron por género y su potencial sinergista o antagónico contra *C. gloeosporioides* se evaluó mediante pruebas de germinación *in vitro*, antibiogramas y mediante conidias, formación de apresorios y crecimiento micelial a las 24 y 48 horas. Inicialmente se obtuvieron 38 cepas con potencial antagonista y 15 con potencial sinergista. Finalmente como organismos antagónicos promisorios se seleccionaron tres cepas: una del género *Bacillus* sp., otra del tipo *Pseudomonas fluorescens* y otra del género *Trichoderma* sp. A su vez se encontró una cepa con propiedades sinergistas del tipo *Pseudomonas* sp. no fluorescente, que estimuló la germinación, formación de apresorios de *C. gloeosporioides* en porcentajes superiores al 20%.

Palabras claves: Sinergismo, antagonismo, antracnosis.

3. ANTECEDENTES

La mayoría de los estudios de interacción entre organismos patógenos con hongos y bacterias han sido relacionados con el antagonismo y especialmente para la inhibición del crecimiento micelial. Estudios han revelado que existen bacterias que estimulan la germinación de conidias y el desarrollo de apresorios de algunos hongos entre los que se encuentra el género Colletotrichum (Me Cracken y Swinburne, 1979).

Igualmente existe gran interés por conocer las relaciones de sinergismo de C. gloeosporioides frente a otros microorganismos. Stakman y Marrar (1968), afirman que el sinergismo es la facultad que tienen dos clases de organismos para desarrollarse mejor o producir mayores efectos cuando están asociados que cuando lo hacen cada uno por separado, por ejemplo, Diplodia natalensis y Colletotrichum gloeosporioides producen juntos mayor efecto en la corteza de los cítricos que el que pueden producir cada uno de ellos por sí solo.

Dos mohos, Oospora citrí aurentii y Penicillium digitatum, son capaces de podrir independientemente los frutos de cítricos, pero cuando actúan juntos los pudren más rápidamente (Stakman y Marrar, 1968).

Las relaciones existentes entre los microorganismos pueden resultar en beneficios recíprocos cuando se combinan íntimamente, esto sucede en algas verde-azuladas y

TITULO

Estudios de la interacción biológica de microorganismos relacionados con Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. Sacc., agente causal de Antracnosis en tomate de árbol (Solanum betacea (Cav.) Sendt.).

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de las especies frutícolas ubicadas en los climas frío y frío moderado, sobresale en Colombia el tomate de árbol (Solanum betacea (Cav.) Sendt.), cultivo que mediante un manejo orgánico apropiado y un mercado bien establecido, es una alternativa de sostenimiento para comunidades de cordillera donde el café es marginal o aún en zona cafetera (Corpoica, 1996).

Las enfermedades causadas por hongos del género Colletotrichum han sido encontradas en casi todos los países del mundo, ocasionando daños en muchas especies de frutales y especies vegetales (Bailey y Jeger, 1992).

Por lo tanto, es necesario efectuar investigaciones sobre frutales como éste que van a incrementar la economía doméstica de estas zonas para lograr así la diversificación y tecnificación de otras ramas de la agricultura (Salazar, 1988).

En dicho cultivo uno de los problemas fitosanitarios más limitantes es la Antracnosis causando pérdidas hasta un 90%, incrementando los costos de producción (Girard, 1977). La Antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Sacc., quien afecta hojas y ramas siendo un daño más notorio en frutos, los cuales son afectados en todos sus estados (Saldarriaga et al., 1997); los síntomas se manifiestan con mayor frecuencia en el ápice o en los puntos en que varios frutos de una misma Inflorescencia quedan en contacto, debido a que allí se presenta acumulación de agua, por tiempo más largo, lo cual favorece el desarrollo inicial del hongo (Girard, 1980; Pérez, 1993).

El manejo de la enfermedad está basado fundamentalmente en la aplicación de fungicidas como: Thiabendazol, Benomyl, Carbendazym, Thiophanatos y Dithane, con aplicaciones tipo calendario (Pérez, 1993). Como es obvio, el impacto económico y ambiental es grande, ya que se ha abusado en la aplicación de químicos originando una resistencia por parte del patógeno (Bailey y Jeger, 1992).

Hasta el momento, en Colombia y específicamente para los cultivos de Tomate de árbol, son muy pocos los estudios epidemiológicos y biológicos que traten de conocer en nuestro medio el comportamiento del hongo. Además se desconoce la relación antagonista y sinergista de varios microorganismos procedentes del filoplano frente a *C. gloeosporioides*.

Tampoco existe una oferta sobre su manejo mediante el empleo de control biológico, el cual intervendrá en la reducción del uso de fungicidas, favoreciendo a largo plazo la existencia de un equilibrio en el sistema de producción.

El presente trabajo contribuye a tener un conocimiento sobre la interacción de *C. gloeosporioides* con ciertos microorganismos, especialmente sobre bacterias que pueden estar estimulando la germinación de conidias y desarrollo de apresorios, potenciando más su efecto. El estudio además de la información básica, contribuirá para el diseño de nuevas estrategias de manejo de la enfermedad, tanto en el aspecto de prácticas culturales como en el control biológico.

Esta investigación hace parte de un objetivo específico del Proyecto " Estudios epidemiológicos de la Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz Sacc) en tomate de árbol y desarrollo de alternativas de control para su manejo integrado en Colombia, el cual es liderado por el Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas, bajo la responsabilidad del doctor Guillermo Rondón C., ha sido cofinanciado con recursos Pronatta.

2. OBJETIVOS

2.1 GENERAL

Estudiar la interacción biológica de microorganismos relacionados con Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. Sacc., agente causal de Antracnosis en tomate de árbol (Solanum betacea (Cav.) Sendt.).

2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar el inóculo natural y la biota del filoplano para determinar la existencia de posibles organismos sinergistas y antagonistas a *C. gloeosporioides* en Tomate de árbol.
- Evaluar in vitro tanto los organismos antagonistas como los sinergistas a C. gloeosporioides aislados del filoplano en Tomate de árbol y del inóculo natural.
- Evaluar las cepas más prometedoras de sinergistas y antagonistas en condiciones de laboratorio y en campo sobre frutos de Tomate de árbol inoculados con C. gloeosporioides.

hongos de la clase Ascomycetes, los cuales crecen juntos en una asociación tan íntima que los caracteres del talo del líquen son propios de esta combinación particular. Las algas pueden elaborar por fotosíntesis alimentos básicos, los hongos absorben aparentemente agua y elementos disueltos que suministran a las algas, a cambio de los azúcares y de otros productos de la fotosíntesis, se demuestra que ambos microorganismos crecen mejor asociados que separados (Stakman y Marrar, 1968).

Bacterias procedentes del filoplano como las cepas 14 y UV3 de *Pseudomonas* spp., estimularon la formación de apresorios de *Colletotrichum acutatum* aislado de fresas en Australia, dicho estímulo se relaciona con un estrés por nutrientes (Blakeman, 1977).

La habilidad de bacterias procedentes del filoplano para estimular la germinación de conidias de *C. musae* está relacionada con la concentración de hierro (Mc Cracken y Swinburne, 1979).

Mc Cracken y Swinburne (1979), encontraron que *Bacillus* sp. aislado de hojas de cítricos promueve la formación de apresorios en *C. goeosporioides*. Así mismo *Pseudomonas* spp. aislada de hojas de remolacha muestra también este efecto sobre *C. dematium* y *C. acutatum*; debido a la competencia por nutrientes de bacterias procedentes del filoplano.

Brown y Swinburne (1981), determinaron que agentes quelatores como los sideróforos bacteriales, procedentes de la cepa de *Pseudomonas* UV3, presentan alta afinidad por el hierro contenido en la matriz conidia! y siendo un factor importante en la estimulación de la germinación de *Colletotrichum musae* aislado de bananos.

Los sideróforos son compuestos sintetizados por *Pseudomonas* spp. fluorescentes para la captura del hierro. Los pigmentos hidrosolubles fluorescentes producidos por estas bacterias actúan como sideróforos (Leong, 1986).

Hansen (1992), define el control biológico como la reducción del patógeno, con el fin de mantener estos organismos por debajo del umbral económico. Actualmente se conocen un sin número de métodos de control biológico para combatir plagas, enfermedades y malezas, que utilizan diferentes organismos como virus, bacterias, hongos, nematodos e insectos para su control.

Stakman y Marrar (1968), indican que las bacterias, hongos, nematodos e insectos, no solo toman los nutrientes del otro simbión, sino que en muchas ocasiones durante este proceso perjudican o destrozan los tejidos. Muchos microorganismos producen antibióticos y actúan a distancia produciendo sustancias tóxicas, difusibles y, algunos saprofitos lo hacen, probablemente, como poblaciones que frenan a los patógenos de las plantas en el suelo.

Papavizas (1985), determinó que la pudrición de algunos frutos en postcosecha, se reduce al aplicar las esporas de *Trichoderma viridae*. Este hongo reduce en forma significativa la pudrición verde de los cítricos causada por *Penicillium digitatum*.

En Estados Unidos se han realizado muchas pruebas de biocontrol con diferentes cepas de *Trichoderma* sp.. sin embargo, éstas no han sido registradas para uso comercial, debido a las grandes cantidades poblaciones de los antagonistas ya presentes; por esta razón el control de las enfermedades es bastante limitado (Agrios, 1995).

Los estudios *in Vitro* con organismos antagónicos que parasitan las hifas de otros hongos, detallan que estos ocasionan muchos cambios morfológicos a su alrededor como engollamientos, formación de haustorios, desorganización de los contenidos celulares del hospedero y penetración del hospedero (Papavizas, 1985).

En el caso de las bacterias se han ensayado diferentes cepas como *Pseudomonas cepacia* y *Bacillus subtilis* contra *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* ; de dichas bacterias se aislaron sustancias activas que están en condición de reprimir algunos patógenos de plantas (Hansen, 1992).

También se han llevado a cabo pruebas de antagonismo para la evaluación de 20 cepas de *Bacillus subtilis* con el fin de lograr el control biológico en la Roya del geranio, causada por la *Puccinia pelargonii zonalis*. Estas pruebas se trabajaron con los metabolitos y con las bacterias, las cuales fueron sembradas en agar nutritivo y en caldo Eugon. De las cepas trabajadas sólo tres presentaron efecto inhibitorio (Rytter et al., 1989).

Pseudomonas spp. han sido aplicada eficientemente para suprimir *Fusarium oxysporum* en varias especies de plantas; estas bacterias tienen efectos directos e indirectos contra *Fusarium. oxysporum* (Lemanceau, 1993).

Austin et al. (1977), describen los mecanismos que operan en el control biológico con *Pseudomonas. fluorescens* como antagonista se cree que reduce en el patógeno la germinación de esporas y el crecimiento del tubo germinal.

Existen cepas de *Pseudomonas* spp. fluorescentes que producen sideróforos, los cuales inhiben el crecimiento de otros microorganismos de las raíces al competir por el hierro disponible en el suelo (Schroth y Hancock, 1982).

Especies de *Pseudomonas* como *P. putida* y *P. fluorescens* compiten con los hongos *Pythium aphanidermitum* y *P. ultimum* por el hierro y otros nutrientes disponibles en el suelo, debido a la producción de quelatantes como los sideróforos (Chet, 1990).

Varios aislamientos de *P. fluorescens* presentan dos tipos de antibióticos pirrolnitrina el cual es activo contra *Rizoctonia solani* y pioluteorina es activo contra *Pythium ultimum* (Hawell y Stipanovic, 1980). Pueden también tener un efecto inductor, mediante algún producto de su metabolismo que genera en las plantas mecanismos de protección y defensa contra organismos patógenos (Porras, 1996).

Kempe y Sequeira (1983), afirman que cepas de *Pseudomonas* spp., inducen resistencia en el marchitamiento bacterial de la patata, causado por *Pseudomonas solanacearum*, provocando una reducción en la severidad de la enfermedad.

Bacterias como *Bacillus* sp. y *Pseudomonas fluorescens* persisten en la rizosfera de plantas de trigo, inclusive después de 150 días de haber sido inoculadas las semillas con estos microorganismos (Kim et al., 1997).

El empleo de antagonistas contra las enfermedades que se originan durante el almacenamiento de frutas ha dado buenos resultados, ya que las bodegas pueden

ajustarse, con el fin de obtener un microclima óptimo con alta humedad del aire y temperaturas por debajo de 30°C, de tal forma que su aplicación sólo es posible bajo condiciones de invernadero (Hansen, 1992).

En Gran Bretaña se realizaron pruebas de antagonismo in vitro, con el fin de evaluar el efecto de Bacillus sp. frente a C. gloeosporioides, encontrándose lisis celular y reducción en el porcentaje de germinación de conidias de Colletotrichum (Lenné y Parbery, 1976).

En Colombia, Bravo (1993) ha realizado pruebas de antagonismo bacteriano in vitro, con el fin de evaluar el comportamiento de B. subtilis frente a varios hongos fitopatógenos, incluyendo a C. gloeosporioides aislado de cítricos, encontrándose disminución en la germinación de conidias, e inhibición en el crecimiento micelial de Colletotrichum.

En Brasil se realizaron pruebas de antagonismo contra C. gloeosporioides con diferentes cepas de hongos como Cladosporium sp., Fusarium sp. y Trichoderma sp.; según el antibiograma se encontró inhibición en el crecimiento micelial de Colletotrichum con algunas cepas de Trichoderma (Silvana, 1994).

Lenne et al. (1991), realizaron pruebas con cepas de B. subtilis y Pseudomonas no fluorescente, procedentes de regiones tropicales húmedas, las cuales ejercieron un efecto antagonista in vitro frente a los aislamientos de C. gloeosporioides reduciendo la Antracnosis sobre hojas de Stylosanthes guianensis en condiciones de invernadero.

Leben (1964), registró una reducción en los niveles de Antracnosis en pepino con la cepa A

180 de *Pseudomonas espacia*, en los estudios realizados *in vitro* y en el invernadero observándose gran producción de antibiótico.

Se han realizado pruebas de antagonismo con el fin de evaluar el efecto de *Trichoderma viride* sobre *C. gloeosporioides* aislado de bananas, encontrándose inhibición en el crecimiento micelial *in vitro* (Khetmalas et al, 1984).

Así mismo, Leben (1965) afirma que *Pseudomonas cepacia* produce *in vitro* butanol soluble que es un compuesto antifungal, el cual reduce el desarrollo de la Antracnosis causada por *Collectotrichum lagenarium* en pepino.

Bacillus subtilis aislado de la superficie de la leguminosa forrajera *Stylosanthes quianensis* en la región de Pucallpo (Perú), exhibió una actividad antifúngica contra *Collectotrichum gloeosporioides* reduciendo significativamente el crecimiento micelial, la germinación y la producción de conidias (Badel, 1994).

Douville y Boland (1992), mostraron que el filtrado libre de células del aislamiento de *Bacillus subtilis* redujo significativamente la incidencia de la Antracnosis causada por *Collectotrichum trifolii* en plántulas de alfalfa de 56% a 16% y la severidad de 2 a 12. *B. Subtilis* o el producto antifúngico puede ser útil en el tratamiento de semillas o en el control directo de la enfermedad de la planta.

Dennis (1971) reporta que existen cepas de *Trichoderma* de crecimiento rápido que inhiben el desarrollo de *C. gloeosporioides* aislado de maracuyá causando tisis celular de la hifa,

reduciendo el desarrollo de la enfermedad.

4. JUSTIFICACIÓN

La Antracnosis puede considerarse como la enfermedad más cosmopolita en el mundo, su severidad es mayor en regiones tropicales y subtropicales y esto es debido a la capacidad de *Colletotrichum* para afectar un gran número de plantas entre las cuales se encuentran guanábana, cítricos, mango, tomate de árbol, aguacate, cucurbitáceas, cafeto, catleya, tomate, cacao, frijol, habas, entre otras. Los síntomas son muy diversos y varían según el huésped afectado y de acuerdo al órgano o tejido atacado teniendo un efecto devastador a nivel de inflorescencias y frutos (Bailey y Jeger, 1992; Pérez, 1993).

Girard (1977), menciona que la Antracnosis en condiciones de alta severidad causa pérdidas hasta un 90% de la cosecha y posiblemente la dificultad que hasta el momento se viene presentando para lograr un manejo eficiente, se debe a la acción sinergista con otros organismos especialmente de tipo bacterial.

El tomate de árbol ha tenido gran acogida y aceptación en el consumo nacional, considerándose con un gran potencial para la exportación (Salazar, 1988). La Antracnosis ha limitado la producción de la fruta por el incremento en los costos de producción y las pérdidas presentadas en postcosecha por el daño en la calidad de la fruta (Buriticá, 1995).

En el Departamento de Antioquia ocupa el primer lugar en cuanto a producción, posee 1.600 ha cultivadas en tomate de árbol, en los municipios de Santa Rosa de Osos y

pesos (Corpoica Creced Altiplano Norte, 1997). En Caldas, Risaralda y Quindío se estima para el tomate de árbol 384 ha sembradas, con rendimiento de 13.7 ton/ha (Corpoica, 1996).

El control de este hongo se realiza mediante la aplicación de fungicidas a base de Maneb, como Manzate, Dithane M-22, Maneb creditario y otros, en dosis de 4 grs por litro de agua, aplicándolo cada semana en época de lluvia y cada dos semanas en tiempo seco (Girard, 1980).

En el control de la enfermedad se debe aplicar los fungicidas después de la poda sanitaria y de la recolección de frutos afectados (Saldarriaga et al., 1997). No existe referencia del manejo de la enfermedad por medio del control biológico a nivel nacional y mundial, sin desconocer que es viable y factible encontrar para nuestras condiciones algunos microorganismos ya sean antagonistas o sinergistas; por lo tanto el estudio del patógeno y su interacción con dichos organismos es fundamental para posteriores estudios relacionados con el manejo integrado de la Antracnosis.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 TAXONOMÍA

Barnett (1960), señala que Collectotrichum presenta acérvulos en forma de disco o almohadilla, cerosos, subepidermales, típicamente color salmón, setas en el borde del acérvulo y entre los conidióforos conidias hialinas, unicelulares, ovoides u oblongas.

Collectotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. Sacc., es un microorganismo importante en la zona tropical, pertenece a la clase Deuteromycetes, orden Melanconiales, familia Melanconiaceae. Se caracteriza por presentar conidias hialinas (7-20 x 2.5-5 um), unicelulares, de forma ovoide u oblonga, ubicadas en una estructura reproductiva llamada acérvulo (500 um de diámetro). Estos cuerpos son en forma de disco, cerosos, subepidermales. Además de conidióforos y conidias, presentan setas en el borde del acérvulo o entre conidióforos, aunque a veces están ausentes (Bailey y Jeger, 1992).

La taxonomía de Collectotrichum es confusa, hay cerca de 900 especies descritas o asignadas a Collectotrichum. La identificación ha sido estudiada por sus características morfológicas, culturales, especialmente características conidiales, presencia de setas, esclerocios y forma de los apresorios. Las conidias pueden ser cilíndricas o elípticas (Bailey y Jeger, 1992). Los métodos tradicionales no han sido satisfactorios para diferenciar entre especies de Collectotrichum. Ahora se sugiere utilizar pruebas moleculares como la

reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis de ADN ribosomal; estos métodos han sido utilizados exitosamente para diferenciar poblaciones de Colletotrichum (Kaufmann y Weidemann, 1996).

Agrios (1995), clasifica al género Colletotrichum como un hongo imperfecto, que carece de reproducción sexual, pertenece a la clase Coelomycetes, orden Melanconiales y lo describe como un organismo que posee esporas asexuales que se forman en acérvulos.

5.2 BIOLOGÍA. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO Colletotrichum.

Colletotrichum, se encuentra en la naturaleza en su estado asexual (o fase conidial), produce unas estructuras en forma de disco, con un diámetro de 300 micras, en forma subepidermal en la lesión llamados acérvulos; estos cuerpos presentan varias espinas o setas con cuatro a nueve micras de diámetro y menos de 100 micras de longitud, los cuales están ubicados al borde o entre la masa de conidióforos simples y alargados; las conidias son hialinas, unicelulares y de forma ovoide; estas conidias tienen una vacuola cerca del centro y miden 2.5 a 5.5 por 11 a 20 micras. Bajo ciertas condiciones ambientales las setas pueden no presentarse; si se presentan, esta característica puede servir para diferenciarlo de otro género bastante similar, conocido como Gloeosporium (Bailey y Jeger, 1992).

Uno de los problemas fitosanitarios más limitantes en el tomate de árbol es la Antracnosis, causada por el hongo Colletotrichum gloeosporioides, el cual ataca frutos en cualquier estado de desarrollo, los síntomas se manifiesta con mayor frecuencia en el ápice o en los puntos en que varios frutos de un mismo racimo quedan en contacto, debido a que allí hay

acumulación de agua por tiempo más prolongado, lo cual favorece el desarrollo inicial del hongo. El daño consiste en manchas ligeramente hundidas de color negro, que pueden llegar a cubrir todo el fruto. Bajo condiciones favorables al hongo, aparece un polvillo rosado en la superficie de la lesión, formado por esporas del patógeno. Cuando el ataque ocurre sobre frutos pequeños, estos se momifican y quedan adheridos al árbol. Si se presenta en frutos ya formados pero todavía verdes, aparece una coloración amarillenta de maduración prematura, con exhibición posterior de las manchas negras en el exterior, En caso de afectar frutos próximos a recolección, las manchas son pequeñas o aun inexistentes, pero el daño se manifiesta durante el transporte o el almacenamiento (Girard, 1980).

En frutos maduros, los síntomas son fácilmente distinguibles, apreciándose manchas de color marrón oscuro, hundidas en la superficie y acompañadas de cierta emisión de gomas; frecuentemente aparece sobre la superficie del fruto un chorreado oscuro, debido a la acción de las esporas al ser arrastradas por el agua (rocío o lluvias); en su interior, los frutos presentan áreas negruzcas que inicialmente son blandas, pero que después se endurecen; finalmente estos órganos se pudren totalmente y se desprenden del árbol con facilidad (Agrios, 1995).

El hongo crece con facilidad en papa dextrosa agar (PDA), inicialmente la colonia es cremosa y de color salmón, emitiendo un micelio blanco en sus bordes que con el tiempo se torna grisáceo. Su desarrollo completo se alcanza en 15 días a una temperatura de 25°C (Bailey y Jeger, 1992).

Las fructificaciones del hongo se pueden encontrar en numerosos órganos como ramas

secas, partes muertas de las hojas, superficie de los frutos caídos y podridos; el hongo vive en todos estos órganos como saprofito (Kranz et al., 1982).

5.3 CONDICIONES QUE FAVORECEN EL DESARROLLO DE C. gloeosporioides.

El proceso infectivo que desarrolla el patógeno causante de la Antracnosis es favorecido por altas precipitaciones, alta humedad ambiental y altas temperaturas. Sin embargo, es obvio que cada uno de esos componentes deben estar presentes en niveles óptimos en forma simultánea, ya que con uno solo de ellos que no esté en el rango requerido por el patógeno se afecta negativamente el proceso de infección (Hartung et al, 1981).

Con respecto a la temperatura, la mayoría de los aislamientos tropicales de C. gloeosporioides se desarrollan a temperaturas de 25°C y una humedad de 10 h continuas en la hoja se favorece la germinación de conidias del hongo. La diferenciación en la patogenicidad de la cepa puede ser consecuencia de las interacciones del medio ambiente, secreción de enzimas del hongo y el genotipo del hospedante (Dodd et al., 1991). Respecto al efecto de la temperatura en el crecimiento radial del C. gloeosporioides la temperatura óptima para su desarrollo es a 20°C, con un menor crecimiento a 27°C y un escaso desarrollo a los 5°C, 10°C y 30°C (Hartung et al., 1981).

El apresorio es importante en la penetración porque es el sitio donde se acumulan las enzimas (celulasas, cutinasas y pectinasas), que degradan la pared celular de la planta, la temperatura ideal para la formación de apresorio oscuro es de 25°C, ello ocurre 12 h después de colocarse a incubar. La formación de hifas infecciosas, la cual se mide en el

laboratorio cuando la hifa penetra una membrana de celulosa, se da en mayor proporción a temperatura de 25°C, y comienza a las 30 h. Las temperaturas comprendidas entre 10°C-12.5°C reducen la formación de apresorio oscuros (Fitzell et al., 1984).

En cuanto a la precipitación, en estado lluvioso se aumenta la incidencia y la severidad de la enfermedad. Estos resultados reafirman que la estación seca es la época más favorable para la producción de Tomate de árbol, puesto que las condiciones de sequía disminuyen la incidencia y la severidad de la Antracnosis al desfavorecer la diseminación y germinación del patógeno (Arauz, 1986; Girard, 1987).

La humedad en forma de salpicaduras de lluvia y agua corriente tiene una función importante sobre la distribución y diseminación de conidias de Colletotrichum sobre la misma planta o de una planta a otra (Agrios, 1995). El agua es el principal agente diseminador de conidias de Colletotrichum y la lluvia es la principal fuente de esa agua. Las conidias con ayuda del mucílago hidrofílico en el que se forman son arrastradas desde las partes vegetativas hasta los órganos florales y frutos (Estrada, 1993).

La precipitación como tal, su función principal es como agente diseminador de las conidias. Pero es el principal condicionante de la humedad ambiental, junto con la temperatura. Si bien la cantidad de lluvia caída es importante, más importante es la intensidad con que llueve; debido a que la permanencia del agua sobre el tejido influye sobre la germinación de la espora, se requieren por lo menos 4 h de humedad permanente sobre la superficie del hospedante para que se desarrolle la enfermedad; además lluvias cortas de 2 mm son suficientes para la dispersión de conidias de Colletotrichum (Madden et al., 1992).

Otro factor importante es la humedad relativa, la cual tiene gran influencia en el proceso infectivo de *C. gloeosporioides*: la humedad relativa alta mayor del 95% es de gran importancia para que ocurra la germinación de las esporas, formación de apresorios y diseminación del hongo, siendo necesario que se tenga una temperatura óptima (Fitzell et al., 1984).

En el laboratorio se ha podido determinar las condiciones requeridas por *C. gloeosporioides* para poder desarrollar la enfermedad; evaluando humedades relativas entre 39 y 100% a una temperatura de 25°C, se ha encontrado que la mayor germinación ocurre a 97 y 100% de humedad relativa, siendo del 50% a las 20 h después de haberlas incubado. Se forman apresorios e hifas infecciosas con un 100% de humedad relativa, iniciándose después de 30 h de incubación.

Valores entre 82 y 86% de humedad relativa, inducen reducción en el porcentaje de germinación. La alta humedad relativa sobre la superficie de los tejidos del hospedante y las temperaturas entre 20-30°C, constituyen un factor importante para la liberación de conidias de *Colletotrichum* (Estrada et al., 1993).

Hay aspectos que proporcionan condiciones climáticas favorables para el desarrollo del hongo, los cuales no influyen sobre la patogenicidad del *Colletotrichum*: pero pueden condicionar a que se presenten condiciones ambientales óptimas para el desarrollo del patógeno, como son características del árbol y aspectos agronómicos del cultivo.

En las características del árbol, en el mango y tomate de árbol se pueden desarrollar copas

voluminosas con excesivo follaje, esto hace que se den condiciones climáticas favorables para el desarrollo de la Antracnosis, porque en ese sitio la humedad ambiental es alta, hay poca penetración de la radiación solar y baja ventilación, se crea un microclima húmedo, favorable para el desarrollo de la enfermedad. En tomate de árbol se deben realizar podas de formación cuando la planta tenga una altura de 50 cm, con el fin de suministrar una mayor iluminación y aireación al cultivo, evitando así el desarrollo de la Antracnosis (Páez, 1995; Saldarriaga *et al.*, 1997).

Existen factores agronómicos que favorecen el desarrollo del patógeno: 1) Distancias de siembre inapropiada, la distancia a utilizar depende de la variedad a plantar, cuando se utilizan distancias cortas, las copas de los árboles se entrecruzan y se crean condiciones de alta humedad ambiental. 2) Frecuencias cortas de fertilización y dosis inadecuada, principalmente de nitrógeno. 3) En el cultivo del mango y tomate de árbol en algunos huertos no se realizan podas, y los árboles desarrollan una copa cerrada, el crecimiento es rápido y hay fuente de inóculo permanente (Páez, 1995; Saldarriaga *et al.*, 1997; Arango, 1993).

5.4 CICLO DE VIDA DE *C. gloeosporioides*

En todos los hospedantes el hongo se reproduce profusamente y forma masas rosadas del tipo *Colletotrichum* en acérvulo, consta de un estroma micelial en forma de cojín, formado inmediatamente por debajo de la cutícula de la planta, la cual se rompe al ejercer cierta presión hacia la parte superior de la masa de conidióforos. Los conidios se mantienen unidos en una masa viscosa que en condiciones secas es dura y firme; en climas cálidos y

húmedos los conidios se liberan en una masa rosada y se diseminan sólo cuando los acérvulos se encuentran húmedos, por la lluvia y son transportados por el viento o al entrar en contacto con los insectos, otros animales, herramientas, etc. Los conidios germinan sólo en presencia de agua; después de haber germinado, producen un órgano apresorio y una clavija de penetración y se introducen directamente en los tejidos de su hospedante. Al principio las hifas crecen con gran rapidez, tanto intercelular, como intracelularmente, pero producen poca o ninguna coloración visible u otros síntomas. En muchos hospedantes, el hongo llega a las semillas y es llevado en ellas o en algunos casos, puede incluso invadir pocas de ellas sin que les produzca daño aparente. Hay una variación considerable con respecto a los tipos de plantas hospedantes a los que cada especie de Colletotrichum puede atacar e incluso puede haber varias razas con un grado de patogenicidad distinto dentro de cada una de las especies del hongo (Bailey y Jeger, 1992).

Las pruebas moleculares como Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis del ADN ribosomal, son consideradas como una base para entender la taxonomía de Colletotrichum (Kaufmann y Weidemann, 1996).

5.5 CONTROL BIOLÓGICO.

Los métodos de control biológico para las enfermedades causadas por Colletotrichum tienen ahora gran importancia, aunque el potencial del control biológico a través del efecto de los antagonistas de la filosfera ha sido estudiado por algún tiempo (Lenne y Parbery, 1976). Es necesario integrar el control biológico con otras técnicas de control, con el fin de obtener un efecto máximo (Bailey y Jeger, 1992).

El control biológico se define como la reducción de un patógeno o de su capacidad para producir la enfermedad logrado por o a través de una o más organismos excluyendo al hombre. El uso de microorganismos como agentes de control ha despertado mucho interés para la fitopatología (Baker y Cook, 1974).

Andrews (1992), afirma que el control biológico es fundamentalmente ecología aplicada, con la meta específica de manejar una comunidad microbial para favorecer al agente de control y desfavorecer al patógeno.

Los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Trichoderma* han sido involucrados en los estudios de control biológico frente a *C. gloeosporioides* (Bailey y Jeger, 1992).

5.6 ANTAGONISMO.

5.6.1 Características generales del género *Bacillus*. Son bacterias que tienen forma de bacilos grandes gram positivos que miden desde 0.3 a 2.3 micras de ancho y 1.2 a 7.0 micras de largo. Son aerobios y facultativamente anaerobios, forman endosporas (una por célula). Son cilíndricos, generalmente flagelados, crecen en cadenas y forman colonias grandes e irregulares en los medios sólidos (agar nutritivo), se encuentran en los suelos y en los vegetales en putrefacción, interviniendo activamente en la descomposición de la materia orgánica (Buchanan, 1974).

5.6.1.1 Clasificación. La bacteria pertenece al reino de los prokaryotae, los cuales son organismos unicelulares que tienen una membrana celular o bien una membrana y una pared celular rodeada de citoplasma; este último tiene pequeños ribosomas (70S) y material

genético (ADN) que no están rodeados por una membrana, es decir, no están organizados en un núcleo.

Bacillus. pertenece al reino Prokaryotae, familia Bacillaceae y género Bacillus (Buchanan, 1974).

Algunas especies de este género tales como Bacillus subtilis, pumilus, licheniformes y cereus. actúan como antagonicos frente a muchos microorganismos fitopatógenos (Agrios, 1995).

Bacillus thuringiensis. tiene como sustancia activa una endotoxina que se forma al concluir el crecimiento de la bacteria. B. thuringiensis. se aplica en Colombia en productos tales como Dipel y Thuricide. La duración del efecto, es relativamente corta y puede prolongarse con la ayuda de la biotecnología. En Estados Unidos va a ser aprobado un producto, en el cual la endotoxina del bacilo está encerrada dentro de bacterias muertas de la especie Pseudomonas fluorescens. Antes de emplear microorganismos modificados genéticamente deben comprobarse cuidadosamente los efectos que puedan tener sobre el medio ambiente (Hansen, 1992).

5.6.2 Características generales del género Pseudomonas. Constituyen uno de los grupos más complejos, son cosmopolitas y su ubicuidad les permite colonizar cualquier sustrato imaginable, son colonizadoras de las raíces de las plantas hasta casi formar una simbiosis, son capaces de poner en forma asimilable el hierro, imprescindible en la función clorofílica vegetal, algunas tienen un marcado carácter antagonista frente a otros microbios

(Fahy y Persley, 1983).

Pseudomonas syringae, responsable de temibles Bacteriosis, comprende un importante grupo de patovares (Dye et al., 1980).

Pseudomonas fluorescens se describe como una bacteria asociada al filoplanio y a la rizosfera, si la bacteria es introducida en la semilla o material de siembra, puede controlar enfermedades patogénicas del suelo y promover el crecimiento al suprimir otros organismos dañinos (Kime et al., 1997).

Pseudomonas es una bacteria que posee células en forma de varilla rectas o ligeramente curvadas cuyo tamaño oscila entre 0.5-1.0 μm de ancho por 1.5-5.0 μm de largo; es Gram negativa y móvil mediante uno o varios flagelos polares; es un organismo aerobio (Schaad, 1988).

Entre los diversos pigmentos producidos por las *Pseudomonas* figuran los pigmentos fluorescentes llamados pioverdinas, cuya existencia se hace más patente cuando las bacterias crecen en medios pobres en hierro como es el King-B; las pioverdinas son de color verde-amarillento, solubles en agua y difusibles en medio de cultivo, poseen fluorescencia bajo luz ultravioleta que varía de blanca a verde-azulada. Se pueden visualizar con una longitud de onda de 400 nm (King et al., 1954). Además algunas especies usadas en el control biológico producen pigmentos como la fluoresceína y la piocianina, los cuales se difunden en el medio de cultivo (Schaad, 1980; Merck, 1985).

La complejidad del género *Pseudomonas* se expresa también, en los síntomas que inducen sobre sus hospedantes, producen quemaduras y manchas en hojas, flores y frutos; pero además, la manifestación de tumores (Tuberculosis del olivo), necrosis vasculares (Podredumbre parda de la patata), podredumbres blandas (Podredumbre agria de las cebollas) o cánceres (Chancro bacteriano de los frutales de hueso), poniendo de relieve la variabilidad que el grupo encierra (Schaad, 1988).

Pseudomonas solanacearum: Es una especie netamente tropical, tiene tendencia a la especialización parasítica, ataca a diferentes plantas y origina marchitamiento vascular que resultan más destructivos por una acción conjunta del calor y de la humedad (Goto, 1997).

En la Tabla 1., se pueden observar las características del grupo de *Pseudomonas* no fluorescentes, donde se encuentra *P. solanacearum*.

En la Tabla 2., se presenta un esquema para la determinación de los patovares de *Pseudomonas fluorescentes*, aparecen indicados los distintos grupos en que pueden dividirse, los caracteres principales, los confirmatorios y un ejemplo de la especie o del patovar representativo. En el grupo V casi todas son saprofitos pertenecientes al complejo "fluorescens/putida" figurando un fitopatógeno del champiñón, *P. tolaasii*, que se diferencia por no producir Levano (Lelliot et al., 1966).

Por otra parte, se han encontrado *Pseudomonas* fluorescentes saprofitas, las cuales se encuentran asociadas con plantas, como puede observarse en la Tabla 3.

Tabla 1. Caracterización de *Pseudomonas* no fluorescentes.

PRUEBA	ESPECIE	<i>P. carophylli</i>	<i>P. avenae</i>	<i>P. corrugata</i>	<i>P. gladioli</i>	<i>P. cepacia</i>	<i>P. solanacearum</i> Riotynes			<i>P. pseudoalcaligenes</i>
							1	2	3-4	
Pigmento difusible	V. castaño	-	-	-	V. amarillo castaño	V. amarillo castaño	V. amarillo castaño			-
Oxidasa	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+
Arginina dihidrolasa	+	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	-
Reducción de nitrato	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a 41°C	+	+	-	V+	V+	ND	ND	ND	ND	+
Crecimiento en: Celobiosa	+	ND	-	+	+	-	-	-	-	-
Trehalosa	V	ND	ND	+	V	+	-	+	+	ND
D-Arabinosa	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
D- Tartrato	-	ND	V	+	-	-	-	-	V	ND
Manitol	+	+	ND	+	+	-	-	+	+	ND
Sorbitol	+	+	ND	+	+	-	-	+	+	ND
L-Rhamnosa	+	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
Levulinato	-	ND	ND	-	+	V	V	V	V	ND
Sucrosa	+	-	ND	+	+	+	+	+	+	-
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Benzoato	-	ND	ND	+	v+	-	-	-	-	ND
n-Propanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
B-Alanina	-	+	-	-	-	-	V	V	V	+
Pigmento no difusible	V.A.M.	-	-	-	V.A.P.	V.A.P.	-	-	-	-
Patata	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de gelatina	+/-V	VI-	+	+	+	V+/-	+	+	+	-
Hidrólisis del almidón	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis en Tween-80	VI-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Producción de ácido a partir de sacarosa	+	-	+	+	+	VI-	+	+	+	-

Fuente: Schaad, 1988

+. Positivo
-: NegativoND: No diferenciado
V: Variabilidad que puede ser (+) o (-)V: Verde
A: AmarilloM: Marrón
P: Púrpura

Tabla 2. Esquema para la determinación de *Pseudomonas fluorescentes*.

GRUPO	Caracteres principales			Caracteres confirmados						Especie o patovar representativo
	Colonias tipo levano	Reacción de oxidasa	Podredumbre de patata	Arginina dihidrolasa	Hipersensibilidad en tabaco	Producción de 2-cetogluconato	Lipasa	Reducción nitratos	Acido a partir de sacarosa	
Ia	+		-	-	+	.	.	.	+	<i>P. syringae</i>
Ib					+				+	<i>P. syringae</i> pv. <i>delphinii</i>
II	-	-	+	-	+	-	-	-	-	<i>P. viridiflava</i>
III		+			+			V		<i>P. cichorii</i> (<i>P. agerici</i>)
IVa	+	+	+	+		+	+	+	+	<i>P. marginalis</i> (<i>P. fluorescens</i>)
IVb	-	+	+	+	~	+	V	V	V	<i>P. fluorescens</i> putida
Va	-	+	-	+	-	+	+	-	-	<i>P. tolaasii</i>
Vb	+	+	~	+	~	+	V	V	V	<i>P. fluorescens</i> putida

Fuente: Lelliot et al., 1966.

+ : Positivo

- : Negativo

V : Variabilidad que puede ser (+) o (-).

Tabla 3. Especies de *Pseudomonas fluorescentes* saprofitas asociadas con plantas.

PRUEBA	ESPECIE	P <i>aeruginosa</i>	P. <i>fluorescens</i>					P. <i>chlororaphis</i>	P. <i>aureofaciens</i>	P. <i>putida</i>	
			Biovar I	Biovar II	Biovar III	Biobar IV	Biovar V			Biovar A	Biovar B
Formación de levano		-	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Licuación de la gelatina		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Crecimiento a 4°C		-	+	+	+	+	V	+	+	V	+
Crecimiento a 41 °C		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilización de:											
L-arabinosa		-	+	+	V	+		d	+	V	+
D-galactosa		-	+	+	V	+	V	V	+	-	V
Trehalosa		-	+	+	V	+	V	+	V	-	-
Sacarosa		-	+	+	V	+	V	+	+	+	+
Butirato		+	-	V	V	+	V	+	V	+	+
Valerato		+	V	V	V	-	V	+	+	+	+
Azalate		+	-	-	V	-	-	-	-	-	-
Glutarato-Hidroximetil		-	V	V	-	-	V	-	-	-	-
Sorbitol		-	+	+	V	+	V	-	-	-	V
M-inositol		-	V	+	V	+	V	+	+	-	-
Adonitol		-	+	-	V	-	V	-	-	-	-
Propileno-glicol		+	-	+	V	-	V	-	-	V	+
Etanol		+	-	+	V	-	V	V	-	V	V
Geraniol		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Testosterona		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Fenilacetato		-	-	-	V	-	V	V	+	V	+
Butilamina		-	-	-	-	-	V	-	V	+	+
Nicotina		-	-	-	-	-	V	-	-	V	+
Trigonelina		-	V	V	V	-	V	-	-	V	+

Fuente: Schaad, 1988.

+ : Positivo

- : Negativo

V : Variabilidad que puede ser (+) o (-).

5.6.2.1 Clasificación. Son bacterias que pertenecen al reino prokaryotae, poseen membranas y paredes celulares bien definidas, pertenecen a la familia *Pseudomonadaceae* y al género *Pseudomonas* (Agris, 1995).

5.6.3 Características generales del género *Trichoderma*. Es un hongo saprofito y exigente en su crecimiento, utilizando fuentes de carbono, nitrógeno (purinas, pirimidinas y aminoácidos), azúcares (monosacáridos, polisacáridos), taninos, aldehídos, ácidos grasos de cadena larga, metanol, etc. Este hongo es fotosensible que germina rápidamente, produce clamidosporas, las cuales juegan un papel importante en el biocontrol y sobreviven en el suelo mejor que las conidias. *Trichoderma* produce algunos metabolitos que son importantes en el biocontrol.

La especie *Trichoderma lignorum* produce gliotoxina, y *Trichoderma harzianum* produce los metabolitos termolábil y termoestable. Además algunas especies producen enzimas como glucanasas, celobiasas y quitinasas, se hallan ampliamente distribuidos en todo el mundo, en suelos, materia orgánica.

Debido a su gran versatilidad metabólica y a su resistencia a muchos inhibidores microbiales sobreviven en diferentes nichos ecológicos (Papavizas, 1985).

Trichoderma crece en los medios de cultivo con un desarrollo difuso que cubre toda la superficie del agar como un césped amarillo o amarillo verdoso, la superficie de la colonia es granular o plumosa. En las características microscópicas sobresalen las hifas hialinas y

septadas, conidióforos generalmente cortos que dan origen a esterigmas romos con puntas. Los conidios son esféricos y mantenidos en racimos compactos mediante una ligera secreción mucilaginosa (Koneman, 1989; Barnett, 1960).

5.6.3.1 Clasificación. *Trichoderma* pertenece al reino Mycetozoa, división Eumycota, subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, orden Hyphales y género *Trichoderma* (Agrios, 1995).

Dentro de las especies más importantes de *Trichoderma* están: *T. koningii*, *J. hamatum*, *T. harzianum*, *T. viride*, *T. lignarum*, *T. virens* y *J. polysporum* (Papavizas, 1985).

5.7 SINERGISMO

Agrios (1995), define el sinergismo como un parasitismo concurrente que sufre un hospedante por los patógenos, en el que los síntomas producidos son más estables que en el caso del conjunto de síntomas que causa cada patógeno por separado.

Goto (1992), afirma sobre el sinergismo, que las bacterias patógenas de las plantas se encuentran en estado puro sólo en la fase inicial de la enfermedad; porque pronto las lesiones son invadidas por varios microorganismos tales como bacterias, levaduras y hongos, la habilidad que tiene el patógeno para sobrevivir en tal mezcla de poblaciones es afectada por el sinergismo con otros microorganismos.

La especie *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* incrementa su viabilidad y longevidad

cuando coexiste en aguas con algas verde-azuladas. Lo mismo sucede con *Agrobacterium tumefaciens* la cual tiene gran viabilidad en el suelo, por el uso del Fe^{3+} , el cual es solubilizado por otras bacterias del suelo (Goto, 1992).

Stakman y Marrar (1968), definen el sinergismo como la facultad que tienen dos clases de organismos para desarrollarse mejor o producir mayores efectos cuando actúan asociados que cuando lo hacen cada uno por separado. Así, el mohó *Mucor ramannianus* produce pirimidina, uno de los componentes de la tiamina, y *Rhodotorula rubra* produce tiazol, otro de los componentes. Juntos pueden formar la tiamina necesaria. En caso de *Diplodia natalensis* y *Colletotrichum gloeosporioides* producen juntos mayor efecto en la corteza de los cítricos que el que puede producir cada uno de ellos por sí solo. Dos mohos *Oosporacitri aurantii* y *Penicillium digitatum*, son capaces de podrir independientemente los frutos de cítricos, pero cuando actúan juntos lo pudren más rápidamente. La mezcla de estos dos hongos pueden, por consiguiente, ser a veces más destructiva que el efecto causado por un solo organismo.

Las algas de los grupos azul-verdosos o verdes y los hongos, en su mayor parte los Ascomycetes crecen juntos en una asociación tan íntima que los caracteres del talo del liquen son propios de esta combinación particular. Las algas pueden elaborar por fotosíntesis alimentos básicos, los hongos absorben aparentemente agua y elementos minerales disueltos que suministran a las algas, a cambio de los azúcares y de otros productos de la fotosíntesis (Stakman y Harrar, 1968).

La presencia de una microflora activa sobre la superficie de las plantas, resulta en un estrés

por nutrientes y se ha propuesto como el inicio de la formación de apresorios en Colletotrichum dematium, C. gloeosporioides y Colletotrichum lindemuthianum (Emmett y Parbery, 1975).

Son varios los ejemplos que se pueden citar con microorganismos como agentes sinergistas. Blakeman y Parbery (1977), describen a Pseudomonas UV3, como una bacteria que incrementa los niveles de germinación de Q. acutatum. Extractos de células libres de Pseudomonas UV3 y sideróforos purificados estimulan la germinación de esporas y formación de apresorios de Q. Musae (Mc Cracken y Swinburne, 1979).

Especies de Pseudomonas compiten con Colletotrichum por el hierro, debido a la producción de sustancias queladoras como los sideróforos encontrados en coladas de bananas, las cuales estimulan la germinación de conidias de Q. musae (Harper y Swinburne, 1979).

Así mismo, Averil et al., (1981), describen agentes queladores como el ácido etilendiamino tetracético (EDTA), el 5-ácido sulfonílico-8 hidroxí-7-iodo quinoline, ácido cítrico y sideróforos bacteriales producidos por Pseudomonas UV3, los cuales estimulan la germinación y formación de apresorios de Q. musae.

Es importante investigar no solamente qué hacen los microorganismos por sí solos, sino también cómo actúan en unión con otros (Stakman y Harrar, 1968).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Localización del experimento

La investigación se inició con el muestreo en una zona productora de tomate de árbol, en el departamento de Caldas, en la finca Tesorito, propiedad del señor Guillermo González, localizada en la vereda de Maltería, municipio de Manizales, ubicada a 2.400 m.s.n.m., con una temperatura promedio de 17°C y una precipitación promedio acumulada anual de 1.874 mm (Cenicafé, 1996).

Además se realizó la investigación en el Laboratorio de Fitopatología de Corpoica, Regional 9, Manizales, proyecto Generación de tecnología e integración de métodos para el manejo de plagas y enfermedades en frutales de clima frío moderado , el cual tiene una temperatura promedio 16.5°C, humedad relativa de 73.3%, altura 2.126 m.s.n.m. y una precipitación promedio acumulada anual de 1874,1 mm (Cenicafé, 1996).

6.2 METODOLOGÍA

6.2.1. Primera etapa. Aislamiento, identificación y selección de microorganismos más promisorios con propiedades antagonistas y sinergistas. Para dar cumplimiento a este objetivo, se tomaron muestras de hojas nuevas, hojas viejas y frutos de tres edades diferentes: Verde mediano, verde grande y maduro de 18 árboles que no han recibido tratamiento químico.

Para su recolección se utilizaron bolsas plásticas debidamente rotuladas y fueron guardadas en neveras de icopor con hielo. A medida que se fueron tomando las muestras se fue llenando un formulario con el fin de llevar buenos registros de las muestras. Parte de estas muestras se guardaron por 10 días en nevera marca Icasa a una temperatura de 4°C, en bolsas debidamente selladas, como material de reserva. Para el aislamiento se tomaron hojas jóvenes y viejas y frutos de tres edades, de diferentes sitios del árbol (parte superior, medio e inferior). Posteriormente en el laboratorio se tomó 1 g de las muestras (hojas o frutos), y se suspendieron en un tubo de ensayo marca Pyrex con 10 ml de agua destilada estéril, el tubo se sometió a agitación en una centrífuga marca Precisión a 2.500 r.p.m. durante 10 minutos; luego se botó el sobrenadante con una pipeta Pasteur estéril, y se dejó el sedimento del cual se tomó 0.5 g para iniciar el proceso de siembra directa en medios de cultivo como: Agar nutritivo (AN), papa dextrosa agar (PDA), papa dextrosa agar + ácido láctico al 0.2% (PDA + ácido), y Sabouraud y se incubaron a una temperatura de 24°C en una incubadora marca Thelco por espacio de 5 días, realizando lecturas sucesivas cada 24 h (Blakeman, 1977).

6.2.1.1. Muestreo, aislamiento, identificación de microorganismos sinergistas a partir de frutos de tomate de árbol con síntomas de Antracnosis. Se tomaron muestras de los 18 árboles que no han tenido tratamiento químico, recolectando 3 frutos por árbol, teniendo en cuenta que los frutos deben tener los síntomas de la Antracnosis con ablandamientos bacteriales, con el fin de buscar organismos sinergistas que puedan estar acompañando al hongo. Las muestras se colocaron en cámaras húmedas, debidamente desinfectadas, en cada caja se colocará una rejilla que sirve para sostener las muestras en el interior; además se colocó una servilleta, algodón y agua destilada estéril para generar humedad; sobre la rejilla se depositaron los frutos y finalmente se procedió a sellar, envolver

en bolsa plástica y rotular el recipiente, dejándolo incubar a 17°C durante 5 días (French, 1980).

Para clasificar e identificar debidamente las bacterias aisladas, fue necesario realizar algunas pruebas de caracterización que se describen a continuación:

Características macroscópicas. Se observó color, forma, superficie y consistencia de cada colonia.

Características microscópicas. Se determinaron algunas pruebas utilizadas en la caracterización; estas pruebas son:

- **Tinción de gram**
- **Prueba del KOH al 3%**
- **Tinción con verde de malaquita para la observación de endosporas**
- **Producción de pigmento fluorescente**
- **Prueba de indol-movilidad-ácido sulfhídrico (SIM)**
- **Prueba de la producción de la enzima catalasa**
- **Prueba de licuefacción de la gelatina**
- **Prueba de la hidrólisis del almidón**
- **Prueba de Agar-triple-azúcar hierro (TSI)**
- **Prueba de la utilización del citrato**
- **Citocromo oxidasa**
- **Prueba de oxidación-fermentación para glucosa (O-F)**

- Producción de pigmento fluorescente (piocianina)
- Producción de pigmento fluorescente (fluoresceína)
- Crecimiento en agar nutritivo a 4°C
- Crecimiento en agar Mac Conkey
- Crecimiento en agar cetrimide (Selectivo para Pseudomonas)
- Producción de levano
- Reducción de nitratos a nitritos
- Hidrólisis de compuestos de Tween
- Crecimiento en agar nutritivo + NaCl al 2%, 4% y 7%
- Producción de ácido a partir de la rhamnosa, arabinosa, dulcitol, sucrosa, glucosa, trealosa, sorbitol, manitol, sacarosa, lactosa, maltosa, galactosa, inositol, adonitol y xylosa
- Crecimiento en agar nutritivo a 45°C
- Crecimiento en caldo glucosado en condiciones anaerobias
- Producción de acetoina en caldo rojo de metilo-Voges Proskaver (RM-VP)
- Crecimiento en agar nutritivo a pH 5.7

Posteriormente las cepas puras se inocularon en tubos con agar infusión cerebro corazón (BHI), y se guardaron a 17°C, esto con el fin de realizar trabajos de experimentación posteriores.

6.2.1.2 Detección y aislamiento de Trichoderma a partir de frutos de tomate de árbol sanos colocados en un suelo cultivado con tomate de árbol. Se colocaron en el suelo 25 tomates de árbol de diferentes edades, y se dejará incubando en un sitio fresco evitando

los rayos del sol; luego se tapó con ramas y se dejaron allí durante 4 días, posteriormente se sacaron los frutos y en el laboratorio se lavaron con agua corriente, con el fin de eliminar la tierra adherida. Se dejaron incubando en un recipiente limpio en una incubadora marca Thelco durante 2 días, a 24°C, al cabo de este tiempo se buscó el desarrollo de un micelio blanco, el cual se sembró en papa dextrosa agar (PDA), con ácido láctico al 0.2% y agar Sabouraud y se incubaron en una incubadora marca Thelco por espacio de 8 días realizando lecturas cada 24 h (Chee y Newhook, 1965; Papavizas, 1985).

- **Características macroscópicas:** Se determinaron las diferencias en coloración, desarrollo y crecimiento aéreo del hongo cada día, durante 8 días.

- **Características microscópicas:** Se colocó una pequeña porción de la colonia sobre un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol y se cubrió con una laminilla para ser observado en microscopio Olympus con un objetivo de 40 X.

6.2.1.3. Aislamiento de Colletotrichum : Para la obtención de cepas de Colletotrichum, se escogieron frutos enfermos en cualquier estado de desarrollo, procedentes de la finca Tesorito. Los frutos escogidos se empacaron en bolsas de plástico nuevas y fueron rotuladas con cinta de enmascarar. Posteriormente se transportaron las muestras en nevera de icopor con hielo hasta el laboratorio.

Una vez identificados los microorganismos con potencialidades de ejercer acción sinergista o antagonista, se procedió a observar su comportamiento mediante las siguientes pruebas:

Antagonismo o sinergismo para crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* (*in vitro*).

Para realizar esta prueba fue necesario preparar una suspensión de la bacteria antagonista, tomando la cepa guardada de agar infusión cerebro corazón (BHI), luego se sembró en agar nutritivo y se incubó a 24°C durante 48 h. En un tubo de ensayo con 5 ml de agua destilada estéril, se inoculó el crecimiento bacteriano, y se mezcló hasta lograr una concentración de 1×10^6 bacterias/ml. Esta suspensión fue preparada inmediatamente antes de usar (Lenne y Parbery, 1976).

Antibiograma. Para evaluar la acción antagónica o sinérgica de las bacterias seleccionadas, fueron realizadas pruebas en cajas de Petri con medio agar Sabouraud, las cuales se inocularon con bloques de *C. gloeosporioides* obtenidos con sacabocado No. 3, colocados en un extremo de las cajas a 4 cm de distancia de la línea sobre la cual se sembró la bacteria. Se sembró igualmente cajas testigo (*C. gloeosporioides*-agua destilada estéril); se incubaron en incubadora marca Thelco a 24°C durante 18 días, realizando lecturas del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* cada 3 días.

Para el caso de *Trichoderma* sp. se sembraron otras cajas con bloques iguales del *C. gloeosporioides* obtenido con sacabocado No. 3, el cual se colocó en un extremo de las cajas a 4 cm de distancia de la línea sobre la cual se sembró el hongo antagonista, luego de 4 días. Posteriormente se incubaron estas cajas a 24°C en incubadora marca Thelco, por espacio de 18 días; realizando lecturas del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* cada 3 días a partir del sexto día (Bravo, 1993).

Para facilitar el manipuleo, evitar contaminaciones y lograr un mejor resultado, cada organismo se evaluó por separado y se comparó solamente con el tratamiento testigo (*Colletotrichum gloeosporioides*) en agua destilada estéril.

Grupo 1: *C. gloeosporioides* vs. Bacteria antagonista y testigo. Grupo 2. *C. gloeosporioides* vs. Hongo antagonista y testigo. Grupo 3. *C. gloeosporioides* vs. Hongo o bacteria sinergista y testigo. Para cada grupo fue necesario preparar como mínimo 10 repeticiones (una caja de Petri por repetición).

Experimento sobre germinación de conidias y formación de apresorios sobre placas de vidrio (*In. Vitro*). Para esta prueba fue necesario utilizar la concentración de bacterias de igual forma como se describió en la metodología anterior. Para la suspensión de *C. gloeosporioides*, se tomó un cultivo de 10 días de edad, procedente de agar Sabouraud a 24°C, cuando el hongo alcanzó esporulación abundante, se tomaron conidias y se mezclaron en 5 ml de agua destilada estéril, filtrándose a través de un embudo de vidrio y gasa estéril con el fin de remover el micelio; posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se centrifugaron en centrífuga marca Precisión a 2.500 rpm durante 3 minutos. Posteriormente se realizó el recuento de conidias en cámara Neubauer marca Blood Mixing y se ajustó a una concentración de 1×10^5 conidias/ml (Lenne y Parbery, 1976).

Para el hongo antagonista fue necesario preparar una suspensión de conidias tomando el cultivo de 8 días de edad con abundante esporulación, el cual se mezclará y agitándolo en 25 ml de agua destilada estéril contenidos en un erlemeyer marca Pyrex, luego se filtró a través de una doble capa de gasa estéril; se realizó el recuento en *cámara* de Neubauer

marca Blood Mixing y se ajustó a una concentración de 1.5×10^6 conidias/ml (Papavizas, 1985).

Los grupos 1 y 3 se prepararon en tubos de ensayo marca Pyrex estéril, para efecto se colocó 1 ml de la suspensión bacteriana y 1 ml de la suspensión de conidias, se homogenizaron, y luego se depositaron 50 μ L de esta dilución con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril, luego se depositó en un portaobjetos y luego se mezclaron bien y se extendieron sobre una placa de vidrio; posteriormente se colocaron en cajas de plástico con tapa de 350 ml de capacidad que contenía un papel de filtro y algodón humedecido con agua destilada estéril con el fin de proporcionarle humedad a la placa; estas placas fueron almacenadas a 18°C durante 24 h en un sitio oscuro realizando lecturas a las 24 h. Se efectuaron 10 repeticiones y el estudio se realizará en 100 conidias escogidas al azar, evaluándose el daño, inhibición y alteración de la germinación de las conidias de *C. gloeosporioides* frente al testigo (Lenne y Parbery, 1976; Bravo, 1993).

Para evaluar el estímulo en germinación y formación de apresorios que ejerzan las bacterias sobre la germinación de *C. gloeosporioides*, se utilizó una concentración bacteriana de 1×10^7 bacterias/ml, esta suspensión se preparó de igual forma que para las pruebas de antagonismo. Para la suspensión de *C. gloeosporioides*, se utilizó un cultivo de 10 días de edad procedente de un agar Sabouraud a 24°C, cuando el hongo tenía la esporulación suficiente se tomaron sus conidias y se mezclaron con 5 ml de agua destilada estéril, se filtró con embudo y gasa estéril, se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se centrifugó en centrífuga marca Precisión a 2.500 rpm durante 3 minutos, luego se realizó el recuento de conidias en cámara de Neubauer marca Blood Mixing, luego se ajustó a una

concentración de 5×10^5 conidias/ml, tomándose 25 uL de la suspensión bacteriana y 25 uL de la suspensión de conidias que se colocaron sobre un portaobjetos. Luego se mezclaron bien y se extendieron sobre la placa, posteriormente se colocaron en cámara húmeda a 18°C durante 24 h y 48 h. Se montaron 10 repeticiones y el recuento se realizó en 100 conidias, evaluándose el porcentaje de germinación y la formación de apresorios. Fue necesario colorear con azul de lactofenol las placas con el fin de visualizar bien las estructuras. Los Testigos se marcaron para comparar el efecto de los sinergistas (Blakeman, 1977).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Primer etapa: Aislamiento, identificación y selección de microorganismos más promisorios con propiedades antagonistas y sinergistas: Se obtuvo en total 36 aislamientos de antagonistas, 20 de los cuales corresponden al género Bacillus y 16 corresponden al género Pseudomonas. Como se observa en la Tabla 4., dichos aislamientos se obtuvieron de hojas nuevas, hojas viejas y frutos de 3 edades diferentes: verde mediano, verde grande y maduro de 18 árboles que no habían recibido tratamiento químico.

Al hacer los estudios de caracterización del género Bacillus y Pseudomonas, los resultados se pueden observar en las Tablas 5 y 6.

7.1.1. Muestreo, aislamiento, identificación de microorganismos sinergistas a partir de frutos de tomate de árbol con síntomas de Antracnosis. Se obtuvieron en total 15 aislamientos de Pseudomonas no fluorescentes, los cuales se tomaron de 18 árboles de tomate de árbol que no habían recibido tratamiento químico, donde se tomaron 3 frutos por árbol y teniendo en cuenta que los frutos deben tener los síntomas de la Antracnosis y ablandamientos bacteriales (Tabla 7).

En la Tabla 8., se pueden observar los resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas obtenidas de la Pseudomona no fluorescente.

Tabla 4. Cepas aisladas de hojas y frutos de Tomate de árbol

Estratificación del árbol	Bacillus	Pseudomonas	
		Fluorescentes	NO Fluorescentes
Superior	7	6	0
Medio	2	3	0
Inferior	11	5	2
Total	20	14	2

7.1.2 Detección y aislamiento de Trichoderma a partir de frutos de tomate de árbol colocados en un suelo cultivado con tomate de árbol. Se obtuvieron 2 aislamientos de Trichoderma, de los 25 tomates de árbol de diferentes edades colocados en el suelo problema (Tabla 9).

Una vez identificados los microorganismos con potencialidades de ejercer acción sinergista o antagonista, se procedió a observar su comportamiento mediante las siguientes pruebas.

. Antibiogramas

Se pudo establecer que en condiciones de laboratorio es factible el control de C. gloeosporioides mediante la utilización de aislamientos de Trichoderma spp., Pseudomonas fluorescente y Bacillus spp., lo que coincide con las investigaciones realizadas con estos aislamientos por (khetmalas et al., 1984; Lenne, 1991).

Tabla 5. Resumen de los resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas obtenidas para la caracterización de *Pseudomonas fluorescente* aislada de hojas y frutos de tomate de árbol.

PRUEBA	RESULTADO
Gram	-
Reconfirmación del gram con KoH al 3%	+
Catalasa	+
Oxidasa	+
Agar Mac Conkey	+
Agar Salmonella - Shigella (SS)	+
Fluorescencia en agar P para <i>Pseudomonas</i>	+
Fluorescencia en agar F para <i>Pseudomonas</i>	-
Crecimiento en agar Cetrimide	+
Crecimiento en Hugh - Leifson (of) glucosa	+ (Metabolismo oxidativo)
Hidrólisis del almidón	•
Indol	-
Movilidad	+
Ácido Sulfhídrico	-
Licuación de la gelatina	+
Formación de Levano	
Reducción de Nitratos a Nitritos	
Hidrólisis del Tween - 80	
Crecimiento en agar nutritivo + Nací al 2%	+
Crecimiento en agar nutritivo + Nací al 4%	+
Utilización del citrato	+
Crecimiento en sales de trifetil tetrazolio (TTC)	+
Agar triple azúcar-hierro (TSI)	k/K (Alcalino/alcalino)
Crecimiento a 42°C	+
Crecimiento a 4°C	-
Crecimiento en agar Hektoen	+
Crecimiento en agar sangre	+
UTILIZACIÓN DE:	
Lactosa	-
Maltosa	
Rhamnosa	
Dulcitol	-
Sucrosa	-
Glucosa	+
Trealosa	-
Manitol	-
Sacarosa	-
Arabinosa	-
Galactosa	-
Inositol	-
Adonitol	-
Sorbitol	-

+: Positivo -:
Negativo

Tabla 6. Resumen de los resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas obtenidas para la caracterización de *Bacillus* aislado de hojas y frutos de tomate de árbol.

PRUEBA	RESULTADO
Gram	+
Presencia de espora	V
Posición de la espora	C-T
Crecimiento a 45°C	V
Crecimiento en agar nutritivo + Nací al 7%	+
Utilización del citrato	+
Hidrólisis del almidón	+
Agar triple azúcar-hierro (TSI)	A/A (acido/acido)
Crecimiento en caldo de glucosa en condiciones anaerobias	V
Indol	-
Movilidad	+
Ácido sulfhídrico	-
Reconfirmación del Gram con KoH al 3%	-
Crecimiento en agar nutritivo con pH: 5.7	+
Test Voges-Proskaver (Vp)	+
Formación de ácido de:	V
Arabinosa	V
Manitol	V
Xylosa	V

+: Positivo

-: Negativo

V: Variabilidad, puede ser (+) o (-)

C: Central

T: Terminal

Tabla 7. Cepas aisladas de frutos de Tomate de árbol enfermos por Antracnosis

Tamaño del fruto	Pseudomonas	
	Fluorescente	NO Fluorescente
	No.	No.
Maduro	0	10
Verde grande	0	4
Verde mediano	0	1

El aislamiento que causó mayor inhibición del crecimiento del patógeno a los 18 días fue el Trichoderma - 2, el cual mostró una alta eficiencia en el control. Los aislamientos de Pseudomonas Fluorescente - 31 y Bacillus - 18 también presentaron un buen control, mientras que el aislamiento de Pseudomonas no fluorescente - 39 (sinergista) no inhibió el crecimiento micelial de C. gloeosporioides (Tabla 10) (Figura 1).

Estos resultados demuestran que el hongo Q. gloeosporioides es controlado de manera efectiva "in vitro" por los tres aislamientos anteriormente citados. Además permiten iniciar trabajos en el laboratorio (in vivo), y en el campo para la comprobación de este control en condiciones naturales.

Experimento sobre germinación de conidias y formación de apresorios sobre placas de vidrio (In vitro). Se presentó una inhibición fuerte de la germinación de conidias de C. gloeosporioides . El porcentaje de germinación de conidias fue de 82% a las 24h y 84% a las 48h en el testigo. En los tratamientos la germinación estuvo entre 49% - 57% a las 24h y 55% - 62% a las 48h. Las cepas de Pseudomonas fluorescente aislamiento - 31, Bacillus aislamiento 18 y Trichoderma aislamiento 2, demostraron su efecto antagonista. De acuerdo a los análisis estadísticos no se presentaron diferencias

Tabla 8. Resumen de los resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas obtenidas para la caracterización de *Pseudomona* no fluorescente aislado de frutos de tomate de árbol.

PRUEBA	RESULTADO
Gram	-
Reconfirmación del gram con KoH al 3%	+
Catalasa	+
Oxidasa	+
Agar Mac Conkey	+
Agar Salmonella - Shigella (SS)	+
Fluorescencia en agar P para <i>Pseudomona</i>	
Fluorescencia en agar F para <i>Pseudomona</i>	-
Crecimiento en agar Cetrimide	+
Crecimiento en Hugh - Leifson (of) glucosa	+
Hidrólisis del almidón	+
Indol	-
Movilidad	+
Ácido Sulfhídrico	-
Licuefacción de la gelatina	-
Formación de Levano	+
Reducción de Nitratos a Nitritos	
Hidrólisis del Tween - 80	+
Crecimiento en agar nutritivo + Nací al 2%	+
Crecimiento en agar nutritivo + Nací al 4%	+
Utilización del citrato	+
Crecimiento en sales de trifetil tetrazolio (TTC)	+
Agar triple azúcar-hierro (TSI)	k/K (Alcalino/alcalino)
Crecimiento a 42°C	+
Crecimiento a 4°C	-
Crecimiento en agar Hektoen	+
Crecimiento en agar sangre	+
UTILIZACIÓN DE:	
Rhamnosa	+
Arabinosa	+
Dulcitol	+
Sucrosa	+
Glucosa	+
Trealosa	+
Sorbitol	+
Manitol	+
Sacarosa	+

+: Positivo

-: Negativo

Tabla 9. Detección y aislamiento de *Trichoderma* a partir de frutos de tomate de árbol colocados en un suelo cultivado con tomate de árbol.

FRUTO	A PDA	A PDA + AC	A SABOREAUD
F1 VG	+	+	+
F2M	-	-	-
F3V6	-	-	-
F4M	-	-	-
F5VG	-	-	-
F6VM	-	-	-
F7VM	-	-	-
F8M	-	-	-
F9VG	-	-	-
F10VM	-	-	-
F11 VG	-	-	-
F12VG	-	-	-
F13M	-	-	-
F14M	-	-	-
F15M	-	-	-
F16VG	-	-	-
F17VG	-	-	-
F18VM	-	-	-
F19VM	-	-	-
F20M	+	+	+
F21 VM	-	-	-
F22M	-	-	-
F23VM	-	-	-
F24VG	-	-	-
F25M	-	-	-

VG: Verde grande

VM: Verde mediano

M: Maduro

Tabla 10. Antibiograma para crecimiento micelial en (mm) de C. gloeosporioides

No.	Tratamiento	DÍAS					
		3	6	9	12	15	18
T1	<u>Trichoderma Vs Colletotrichum</u>	0	6	12	16	17	20
T2	<u>Pseudomonas Fluorescente Vs Colletotrichum</u>	6	11	18	21	23	25
T3	<u>Bacillus Vs Colletotrichum</u>	7	12	15	23	25	27
T4	<u>Pseudomonas no Fluorescente Vs Colletotrichum</u>	6	12	17	21	28	30
T5	<u>Colletotrichum (Testigo)</u>	7	12	15	25	33	40

significativas entre ellas. El aislamiento de Pseudomonas no fluorescente, evaluado en el presente estudio, el aislamiento - 39, estimuló la formación de apresorios maduros y protoapresorios más que los otros aislamientos; el porcentaje de apresorios maduros fue de 24% a las 24h y 31% a las 48h, lo que coincide con las investigaciones realizadas con aislamientos de Pseudomonas sp. por (Blakeman, 1977; Me. Cracken, 1979). Colletotrichum gloeosporioides forma ambos protoapresorios y apresorio maduro en presencia de una cepa sinergista comparado con el testigo sin bacteria sinergista (Tabla 11).

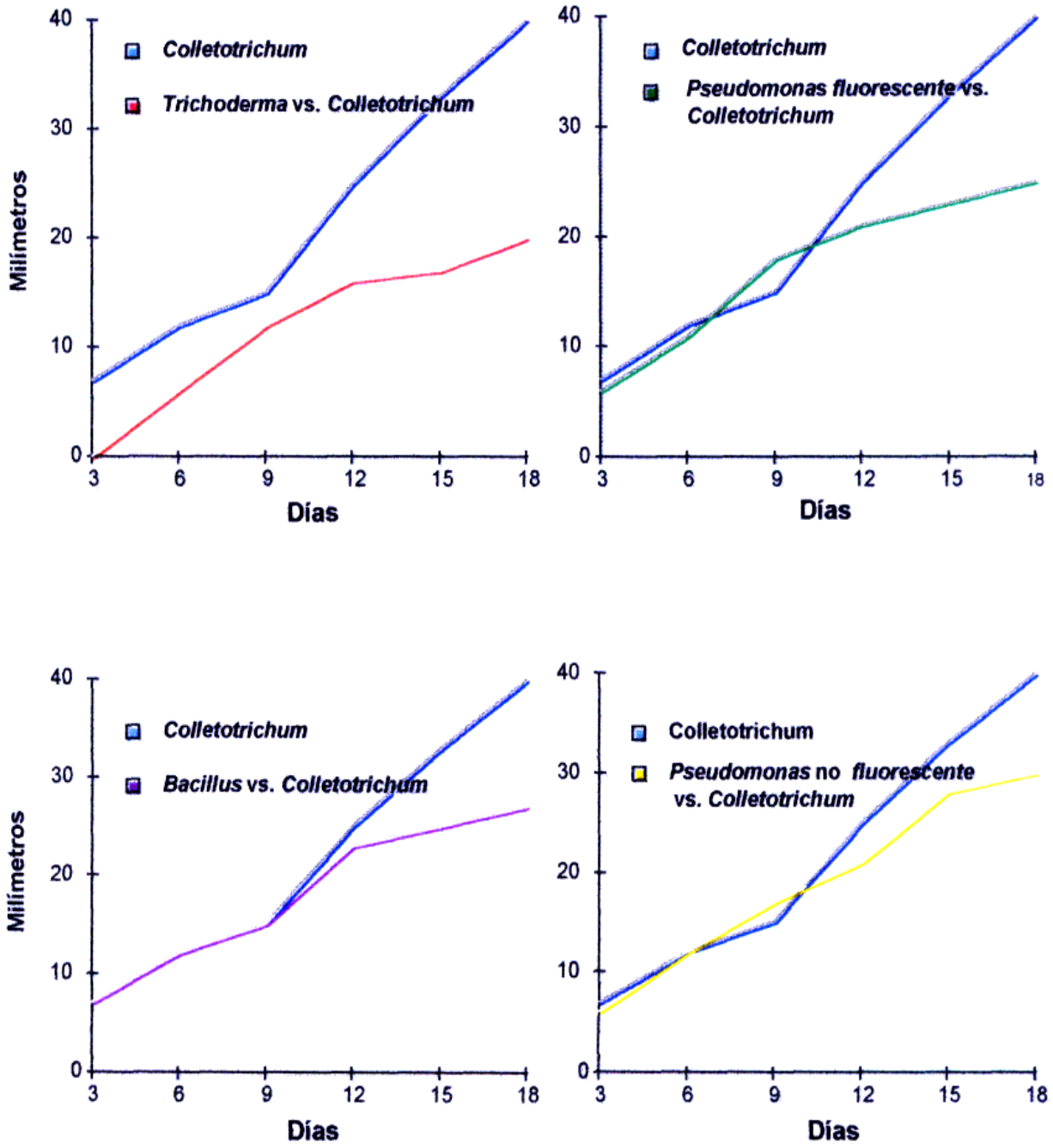


Figura 1. Efecto de algunos microorganismos asociados al crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*

Tabla 11. Comportamiento de algunas cepas promisorias sobre la germinación y formación de apresorios de C. gloeosporioides.

Tratamiento	Tiempo (n)	Germinación %	Protoapresorio %	Apresorio %
Testigo	24	82 a	1	5 b
	48	84 a	2	6 b
<u>Pseudomonas</u> no fluorescentes - 39	24	77 ab	5	24 a
	48	79 ab	7	31 a
<u>Trichoderma</u> - 2	24	57 c	1	3 b
	48	62 c	2	5 b
<u>Bacillus</u> - 18	24	51 cd	1	1 b
	48	56 cd	1	2 b
<u>Pseudomonas</u> fluorescente - 31	24	49 cd	1	2 b
	48	55 cd	1	3 b
CV		11.9		10.9

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De 53 aislamientos se obtuvieron: de Bacillus - 20 cepas, Pseudomonas - 31 cepas y de Trichoderma 2 cepas.

La cepa de Bacillus -18, Pseudomonas fluorescente - 31 y Trichoderma - 2, ejercieron un efecto antagónico sobre la germinación de conidias de C. gloeosporioides.

La cepa de Pseudomonas no fluorescente - 39, favoreció la germinación y estimuló la formación de apresorios de C. gloeosporioides.

Trichoderma - 2, fue el mejor microorganismo que inhibió el crecimiento micelial de C. gloeosporioides.

Es importante la evaluación sinérgica y/o antagonista, con las tres cepas antagonistas y la cepa sinérgica "in vivo" en el laboratorio y en el campo.

Las pruebas de laboratorio son importantes para determinar el modo de acción de los antagonistas y sinérgicos, pero para hacer la selección por eficiencia en el control de la enfermedad o en un mayor desarrollo de la enfermedad es necesario realizar experimentos en el campo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS N., George. Clasificación de hongos fitopatógenos. Fitopatología. 2a. Edición. México: Limusa S.A. de C.V., 1995. p. 280-281.
- ANDREWS, J. H. Biological control in the phyllosphere. Annual Review of Phytopathology. 30:603-635. 1992.
- ARANGO, Jorge, O. Evaluación de diferentes distancias de siembra y su incidencia en la Antracnosis del Tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (CAV.) Sendt.). Universidad Nacional de Colombia, Seccional Medellín. Tesis Facultad de Ciencias Agropecuarias. 1993. p126.
- ARAUZ, L. F. Enfermedades de postcosecha del mango y su combate. Programa de Comunicación Agrícola. Escuela de Fitotecnia, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 1986. p. 20.
- AUSTIN, B.; DICKINSON, C. H.; GOODFELLOW, M. Antagonistic interactions of phylloplane bacteria with *Drechslera dictyoides* (Drechsler) Shoemaker. Canadian Journal of Microbiology 23: 710-715. 1977.
- AVERIL, E., BROWN and SWIMBURNE. Influence of iron and iron chelators on formation of progressive lesions by *Colletotrichum musae* on banana fruits. Transactions of the British Mycological Society. 77 (1): 119-124. 1981.
- BADEL, Jorge y KELEMU, Segenet. Inhibición in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) y otros hongos Fitopatógenos por filtrados de cultivos de *Bacillus subtilis*. Fitopatología Colombiana. Volumen 18: 30-35.1994.
- BAILEY, J.A. y JEGER, M.J. *Colletotrichum* biology, pathology and control. Inglaterra: CBA, 1992. p. 1-10.
- BAKER, K. F.; COOK, R. J. Biological control of plant pathogens. San Francisco. W. H. Freeman y Co. 1974. p. 433.
- BARNETT, H. L. Illustrated genera of imperfect fungi. 2nd. Edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis, 1960. USA. 225 p.
- BLAKEMAN, J.P. and BRODIE, I.D.S. Competition for nutrients between epiphytic microorganisms and germination of spores of plant pathogens on beetroot leaves. Physiological Plant Pathology 10,1977. p. 29-42.
- BLAKEMAN, J.P. and PARBERY, D.G. Stimulation of appressorium formation in *Colletotrichum acutatum* by phylloplane bacteria. Physiological Plant Pathology 11, 1977. p. 313-325.

- BRAVO, O.N. Efecto in vitro de Bacillus sp. sobre el crecimiento, esporulación y germinación de conidias y esporas de nueve hongos. -Fitopatología Colombiana. Volumen 17 No. 2, 1993. p. 62-72.
- BROWN, A.E. and SWIRBURNE, T.R. Influence of iron and iron chelators on formation of progressive lesions by Colletotrichum musae on banana fruits. Transactions of the British Mycological Society. 77 (1). Great Britain. 1981. p. 119-124.
- BUCHANAN, R. E. and GIBBONS, N. E. Endospore forming rods and cocci. Part 15. Eight Edition. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. 1974. p. 529-549.
- BURITICA, P. Impacto de las enfermedades de las plantas en Colombia. En: Ascolfi Informa, Vol. 21 (1): 2-12. 1995.
- CENICAFE. Estación meteorológica. Agronomía, Manizales. Anuario meteorológico cafetero. Centro de Investigaciones del Café Pedro Uribe Mejía. 1996.
- CORPOICA. Estado del arte de los frutales priorizados en la Regional 9. Manizales. 1996. p. 7-26.
- CORPOICA. Informe sobre actividades. Creced altiplano norte. Santa Rosa de Osos (Antioquia). 1997.
- CHEE, K. y NEWHOOK, F. J. Improved methods for use in studies on Phytophthora cinnamoni Rands and other Phytophthora species. N. Z. J. Agric. Res. 8: 89-95. 1965.
- CHET, H. I. Mechanisms of biocontrol of soil-born plant pathogens by rhizobacteria. Plant and Soil (U.S.A.). 129:85-92. 1990.
- DENNIS, C. y WEBSTER, Y. Antagonistic properties of species groups of Trichoderma. III. Hyphal interaction. Transactions of the British Mycological Society. 57 (3): 363-369. 1971.
- DOUVILLE, y And BOLAND, G. J. A note on the antibiotic properties of Bacillus subtilis against Colletotrichum trifolii. Phytoprotection. 73: 31-36. 1992.
- DYE, D.W.; BRADBURY, R.S.; GOTON, M.; HAYWARD, A.C.; LELLIOT, R.A. and SCHROTH, M. N. International standards for naming pathovars of pathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. Rev. Plant Pathol. 59: 153-168. 1980.
- EMMETT, R. and PARBERY, D. G. Appressoria. Annual Review of Phytopathology 13, 147-167. 1975.
- ESTRADA, A. B.; DODD, J. C. y JEDDRIES, P. Effects of environment of the *in-vitro* growth and development of Colletotrichum gloeosporioides isolates from the Philippines. In: Acta Horticulturae 341, 1993, mango. IV. p. 360-369.
- FAHY, P. C. y PERSLEY, G. J. Plant bacterial diseases. A diagnostic guide. Sydney, New York, London: Academic Press, 1983. p. 108-187.

FITZELL, R.D.; PEAK, C. K. and DARNELL, R. E. A model for estimating infection levels of Anthracnose of mango. *Annals of Applied Biology*. 1984. p. 104, 451-458.

FRENCH, Eduardo; TEDDY, R. y HERBERT, T. Métodos de investigación fitopatológica y aislamiento de fitopatógenos. San José (Costa Rica): Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1980. p. 120-162.

GIRARD O., Emile; LOBO A., Mario. El cultivo del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). Manual de asistencia técnica No. 20. Curso sobre frutales. Medellín: Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), 1977.

GIRARD, E. y LOBO, M. El cultivo del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). Manual de asistencia técnica No. 32. Bogotá: Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), 1987. p. 42.

GIRARD, Emile. El tomate de árbol: las pestes más comunes. En: ICA-Infoma, programa de frutales. Medellín; 14 (15): 84-87. 1980.

GOTO, Mazao. *Fundamentals of bacterial plant pathology*. Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press, 1992. p. 282-285.

HANSEN, Wulff. Control fitosanitario moderno pre cosecha y post cosecha, para proteger la calidad de frutas y verduras de exportación. Protrade-Sociedad Alemana de Cooperación Técnica GTZ. 1992. p. 141-151.

HARPER, D. B. and SWIMBURNE, T. R. 2,3-Dihydroxybenzoic acid and related compounds as stimulants of germination of conidia of *Colletotrichum musae* (Berk & Curt.) *Arx. Physiological Plant Pathology* 14, 363-370.1979.

HARTUNG, J.S.; BURTON, C.L. y RAMSDELL. Epidemiological studies of blueberry anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology* 71, 1981. p. 449-453.

KAUFMANN, P. J. And WEIDEMANN, g. J. Isozyme análisis of *Colletotrichum gloeosporioides* from five host genero. *Plant disease*. 80:1289-1293.1996.

KEMPE, J. and SEQUEIRA, L. Biological! control of bacterial wilt of potatoes. Attempts to induce resistance by treating tuber with bacteria. *Plant Disease* 67: 499-503. 1983.

KHETMALAS, M.B.; HASABNIS, S.N.; SARDESHPANDE, J.S. and DIWAKAR, M.P. Soil fungi antagonistic to plant pathogens. *Current Science* 53,1984. p. 862-863.

KIM, D. S.; WELLER, D. M.; COOK, R. J. Population dynamics of *Bacillus* sp. L324-92R12 and *Pseudomonas fluorescens*. 2-79RN10 in the rizosphere of wheat. *Phytopathology* 87: 559-564. 1997.

KONEMAN, Alien y DOWELL, Sommers. Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas color. México: Panamericana S.A., 1989. p. 34-60.

KRANZ, J.; SCHMUTTERER, H. y KOCH, W. Enfermedades, plagas y malezas de los cultivos tropicales. Enfermedades bacterianas. Verlag Paul Parey Berlín y Hamburgo, 1982. p. 125-127.

LEBEN, C. Influence of bacteria isolated from healthy cucumber leaves on two leaf diseases of cucumbers. *Phytopathology* 54. 1964. p. 405-408.

LEBEN, C. And GILBERT, C. Deft. Influence of an Epiphytic bacterium on cucumber Anthracnose, early Blight of Tomato and Northern Leaf Blight of corn. *Phytopathology*. 55: 570-572. 1965.

LELLIOT, R. A.; BILLING, E. and HAYWARD, A. C. A determinative Scheme for fluorescent plant pathogenic bacteria. *Journal of Bacteriology* 29:470-478. 1966.

LEMANCEAU, P.; ALABOUVETTE, C. Suppression of *Fusarium wilts* by fluorescent *Pseudomonas*: Mechanisms and applications. *Biocontrol Science and Technology*. 3: 219-234. 1993.

LENNE, Jillian y PARBERY, D.G. Phyllosphere antagonist and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Transaction of the British Mycological Society*. 66 (2). Great Britain, 1976. p. 334-336.

LENNE, J.M. and BROWN, A.E. Factores influencing the germination of pathogenic and weakly pathogenic isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* on leaf surfaces of *Stylosanthes guianensis*. *Mycological Research* 95,1991. p. 227-232.

LEONG J. Siderophores: Their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology (U.S.A.)* 24:187-209. 1986.

MADDEN, L. V. Rainfall and the dispersal of fungal spores. *Adv. Plant Pathol.* 1992. p. 8, 39-42.

MC CRACKEN, A.R. and SWIMBURNE, T.R. Siderophores produced by saprophytic bacteria as stimulants of germination of conidia of *Colletotrichum musae*. *Physiological Plant Pathology* 15,1979. p. 331-340.

MERCK, E. Manual de medios de cultivos. Merck Franckfurter Strasee. R. F. de Alemania. 1985. p. 1-160.

MERCK, E. Manual de medios de cultivo. Darmstadt (Alemania). Copyright. 1994.

PÁEZ REDONDO, Alberto Rafael. Uso de variedades tolerantes: Alternativa para el manejo de Antracnosis en mango. *Agricultura Tropical*, 1995. Vol. 32 (2).

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Biology, ecology and potential for biocontrol. En: *Annual Review Phytopathology*. Vol 23 (1985). p. 23-54.

PÉREZ, Ligia. Enfermedades de las plantas. Medellín: Lealon, 1993. p. 46-51.

PORRAS, V. N. C. Inducción de resistencia por 4 cepas de *Pseudomonas* spp., en plántulas de café contra la Roya del cafeto *Hemileia vastatrix* Berk y Br. Tesis Bacteriología, Santafé de Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. 147 p. 1996.

RYTTER, Joann L; LUKESIC, F. L; CRAING, R. and MOORMAN, G. W. Control biológico de la Roya del geranio por *Bacillus subtilis*. Fitopatología, volumen 79 No. 3. 1989. p. 367-369.

SALDARRIAGA, Alegría; BERNAL, Jorge y TAMAYO, Pablo. Enfermedades del cultivo del tomate de árbol en Antioquia: Guía de reconocimiento y control. En: Boletín Técnico, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica); C.I. La Selva, Rionegro (Antioquia). 1997. p. 8-10.

SCHAAD, N.W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Department of Plant Pathology. St. Paul (Minnesota): University of Georgia, 1980. p. 1-48.

SCHAAD, N.W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Department of Plant Pathology. St. Paul (Minnesota): University of Georgia, 1988. p. 60-127.

SCHROTH, M. N.; HANCOCK, J. G. Disease suppressive soil and root-colonizing bacteria. Science 216:1.376-1.381. 1982.

SILVANA, A.F.; MEDEIROS y MENEZES, María. Potencial antagónico de algunos hongos a *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal de Antracnosis de *Anacardium occidentale*. Fitopatología Brasileña, Volumen 19, marzo de 1994. p. 84-91.

STACKMAN, Louise y HARRAR, George. Relaciones mutuas entre organismos, ecológicas y simbióticas. Principios de Patología Vegetal. 2a. Edición. Buenos Aires: Eudeba, 1968. p. 79-87.