

Evaluación *in vitro* de micoparásitos con potencial de control sobre la enfermedad Roya del caféto (*Hemileia vastatrix*) en la provincia San Juan, República Dominicana

Máximo Halpay¹, Lucia Silverio¹, Ana Mateo¹, Ángel Pimentel¹ y Juan Cueto¹

Investigadores del ¹Centro de Tecnologías Agrícolas (Centa) y del ³Centro Surdel Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (Idiaf). Autor para correspondencia ²Correo electrónico mhalpay@idiaf.gov.do

RESUMEN

En respuesta a la crisis cafetalera debida a la enfermedad Roya del caféto, en la República Dominicana se implementan acciones a corto plazo; sin embargo, las principales estrategias para su manejo se enfocan especialmente hacia el control químico y el uso de variedades resistentes. El control biológico representa una alternativa, con el uso de microorganismos que provengan del mismo ambiente de acción del fitopatógeno. Dentro de las estrategias de control biológico de los fitopatógenos, una de las opciones es el uso de micoparásitos, hongos que tienen la capacidad de sobrevivir a expensas de otros hongos afectando las estructuras reproductivas del patógeno, lo cual limita su desarrollo y diseminación. Diferentes micoparásitos han sido reportados como controladores de la Roya del caféto, entre ellos, *Trichoderma* sp. y *Lecanicillium lecanii*. Se conoce que estos hongos pueden ser parásitos de *Hemileia vastatrix*. Sin embargo, en la República Dominicana falta información sobre estos parásitos u otros organismos de control biológico presentes de forma natural en los ecosistemas cafeteros. Aislados de *Lecanicillium* y *Trichoderma* obtenidos de fincas en Arroyo Cano, provincia San Juan en el oeste de la República Dominicana, fueron evaluados en condiciones de laboratorio para observar su antagonismo en condiciones de laboratorio *in vitro*. Se realizó este estudio *in vitro* para conocer la evidencia de parasitismo. La interacción huésped-micoparásitos realizada resultó en una reducción significativa del desarrollo del hongo *Hemileia* y un aumento en la germinación de los conidios de los parásitos, demostrando parasitismo *in vivo*. El efecto de estos hongos aislados de plantaciones de café en la provincia San Juan es promisorio para el control biológico de la Roya del caféto y mejorar la salud de los cafetales, reducir la dependencia en fungicidas y formar parte de un control integrado.

Palabras clave: *Lecanicillium*, *Trichoderma*, roya, café, *in vitro*

ABSTRACT

In response to the coffee crisis due to the coffee rust disease, short-term actions are implemented in the Dominican Republic; However, the main strategies for its management are especially focused on chemical control and the use of resistant varieties. Biological control represents an alternative, with the use of microorganisms that come from the same environment of action of the phytopathogen. Within the biological control strategies of phytopathogens, one of the options is the use of mycoparasites, fungi that have the ability to survive at the expense of other fungi, affecting the reproductive structures of the pathogen, which limits their development and spread. Different mycoparasites have been reported as controllers of coffee rust, among them, *Trichoderma* sp. and *Lecanicillium lecanii*. These fungi are known to be parasites of *Hemileia vastatrix*. However, in the Dominican Republic there is a lack of information on these parasites or other biological control organisms naturally present in coffee ecosystems. *Lecanicillium* and *Trichoderma* isolates obtained from farms

in Arroyo Cano, San Juan province in the west of the Dominican Republic, were evaluated under laboratory conditions to observe their antagonism under *in vitro* laboratory conditions. This *in vitro* study was conducted to find out the evidence of parasitism. The host-mycoparasite interaction resulted in a significant reduction in the development of the *Hemileia* fungus and an increase in the germination of the parasites' conidia, demonstrating parasitism *in vivo*. The effect of these fungi isolated from coffee plantations in San Juan province is promising for the biological control of coffee rust and improving the health of coffee plantations, reducing dependence on fungicides and being part of an integrated control.

Keywords: Lecanicillium, Trichoderma, rust, coffee, in vitro

INTRODUCCIÓN

La Roya del cafeto causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, Berk es un patógeno biotrófico que afecta hojas de café y se considera la enfermedad más importante en el cultivo a nivel mundial. Este hongo causa defoliación y reduce el rendimiento de los cafetos, Avelino *et al.* 2015. La severidad de las epidemias recientes, a partir del año 2010, en la República Dominicana ha ocasionado pérdidas cuantiosas debida a la reducción en la producción y productividad del cultivo.

En respuesta a la crisis cafetalera debida a la Roya de cafeto, se implementan acciones a corto plazo; sin embargo, las principales estrategias para su manejo se enfocan especialmente hacia el manejo y control químico y el uso de variedades resistentes, Codocafe (2013). Una alternativa viable pero poco estudiada, para enfrentar el problema de la Roya del cafeto, es el manejo y control de esta enfermedad con agentes biológicos. Para lograrlo de forma eficiente, es necesario conocer e identificar primero los organismos autóctonos de las zonas de producción, que tienen el potencial de actuar como controladores, Zambolim *et al.* (1997), Avelino *et al.* (2015) y Escamilla (2016).

El género *Lecanicillium* ha sido ampliamente estudiado, documentándose como agente de control biológico en hongos uredinales, Alavo (2015). Mahfund *et al.* (2006) encontró que los efectos de dos especies de este género pueden actuar desde la decoloración de uredosporas y formación de micelio blanco sobre ellas o necrosamiento, dependiendo el tiempo de aplicación. Esto sugiere que el porcentaje de parasitismo de *Lecanicillium* sp., varía entre especies y aislamientos, Arriola *et al.* (1998).

En general, las especies de *Trichoderma* producen enzimas extracelulares, sustancias antibióticas de naturaleza volátil y no volátil y compuestos antifúngicos, pero también compiten por el espacio y nutrientes frente a otros fitopatógenos, además, promueven el crecimiento de las plantas e inducen la resistencia sistémica en éstas, Hermosa *et al.* (2000).

Sin embargo, los hongos del género *Trichoderma* han sido los microorganismos más utilizados para el control de enfermedades en plantas producidas por hongos durante más de 70 años, pero solo hasta hace poco tiempo estas cepas han comenzado a adquirir un valor comercial importante, debido a los resultados obtenidos durante su aplicación y a la aparición de nuevas tecnologías para la producción masiva y el desarrollo de productos a base de este hongo, Clavijo (1998).

El objetivo de este estudio es evaluar el nivel de inhibición de *Trichoderma* spp y *Verticillium lecanii* frente a la enfermedad Roya del cafeto en condiciones controladas de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTREO DE MATERIAL VEGETATIVO.

Sitios de colecta. Se realizó en doce localidades de la zona de Arroyo Cano en la provincia de San Juan en el suroeste de la República Dominicana, con una altitud de 875 msnm y temperatura media anual de 22 °C y 1300 mm de precipitación anual, se realizaron muestreos en plantaciones de café de la variedad 'Typica' para obtener micoparásitos y determinar su posible acción antagónica contra el agente causal de la enfermedad Roya del cafeto. Se muestrearon 29 parcelas, Tabla 1, en cada una se realizó un muestreo dirigidos a plantas con síntomas de la enfermedad y con signos de posibles micoparásitos en las pústulas. Hojas de café con síntomas y signos de Roya, Figura 1, se colectaron en campo y se conservaron en bolsas de plástico para su análisis en laboratorio. Bajo microscopio estereoscópico se analizaron las pústulas para seleccionar sólo aquellas que presentaron microorganismos micoparásitos. Los tratamientos fueron establecidos bajo un diseño completamente al azar.



Figura 1. Hojas con incidencia alta y moderada de parasitismo

Tabla 1. Relación de muestras de hojas colectadas en fincas de productores

Lugar de Muestreo	No. Muestras
Los Montacitos	11
Gajo de la cruz	3
Gajo Queiebrá Polito	1
Los Jengibres	3
La Lomita Sabaneta	2
Gajo la Peña	1
Los Pino	1
El Maguito	2
Cañada del gramar	2
Los aposentos	1
La Florida	1
Gajo Mulato	1
Total de muestras	29

Para establecer el posible efecto antagonista de los hongos, se realizaron ensayos *in vitro* con el fin de determinar su capacidad supresora, sobre la germinación de las uredosporas de *Hemileia vastatrix* Berk.

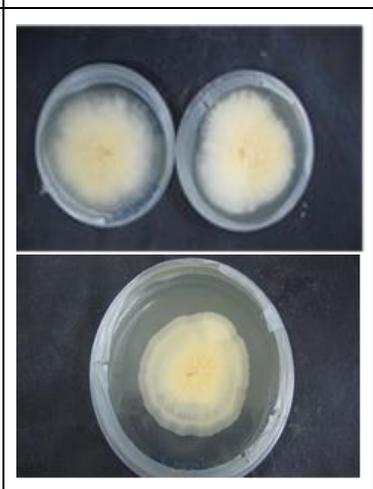
Los ensayos se realizaron en placas petri en agar-agar. Se colocaron secciones de hojas infectadas sobre el agar. Luego, en un espacio libre de la placa se depositó una asada del hongo en prueba obtenida de un cultivo puro del mismo. Las cajas cerradas se colocaron en incubadora a 30 grados Celsius. Se observó el crecimiento del hongo en prueba en funciones del tiempo cuando cubría las hojas infectadas y se registró la confrontación en el estereoscopio.

RESULTADOS

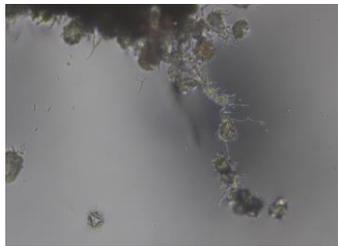
Etapa inicial

Secciones de hoja

Colonias de *Lecanicillium*

Micoparasito	Confrontación en agar agar a	Confrontación a los 10 días
--------------	------------------------------	-----------------------------

	los 10 días	
<i>Trichoderma</i>		
<i>Lecanicillium lecanii</i>		
Uredosporas de <i>Hemileia</i> y micelio y conidias de <i>Lecanicillium</i> vistas al microscopio		

DISCUSIÓN

Los aislados de los géneros *Trichoderma* y *Lecanicillium* ensayados dentro del periodo del estudio mostraron una invasión de las pústulas al ser observadas al estereoscopio, donde se observó el crecimiento sobre las esporas de roya lo que indica que son antagónicos por la invasión de estos parásitos en las hojas afectadas por roya.

En la actualidad, la búsqueda de aislados promisorios potenciales para el control de organismos como la roya del café es una de las tareas importantes que realizan los productores en todo el mundo, razón por la cual se han puesto en marcha programas y proyectos de control biológico para satisfacer las demandas crecientes de las regiones del sector agrario.

La selección de aislamientos promisorios como agente de control biológico frente a plagas es de suma importancia para el desarrollo de programas de manejo integrado de cultivos (MIC), así como en sistemas de manejo agroecológico de cultivos (MAC), porque se ahorra tiempo y se lleva al sistema de producción la cepa con mejores atributos para interactuar en la lucha biológica con su hospedante.

CONCLUSIONES

En el estudio se obtuvieron los géneros *Lecanicillium lecanii* y *Trichoderma* spp, los cuales fueron aislados de pústulas de roya de café (*Hemileia vastatrix*) en Arroyo Cano, provincia San Juan, República Dominicana, indicando que son hiperparásitos presentes en las plantaciones de café de esta región del país. Los dos micoparásitos ejercieron antagonismo al inhibir la germinación de *H. vastatrix* en las pruebas *in vitro*.

Trichoderma fue más eficiente ya que tuvo un mayor desarrollo de micelio, mejor esporulación, porcentaje de parasitismo y colonización de las uredosporas del patógeno. Ambos micoparásitos resultaron exitosos en el control del fitopatógeno, por lo que son candidatos importantes para utilizar como herramienta de control biológico de la roya del café.

LITERATURA CITADA

- Arriola, M.; Chet, I.; Rölz C. 1998. Hongos que atacan la roya del café: Un breve comentario. Universidad Del Valle de Guatemala 8:2-6. (En Línea). Revisado el 4 de agosto 2020. Disponible en: <http://uvg.edu.gt/publicaciones/revista/volumenes/revista8.pdf>
- Avelino, J.; Zelaya, H.; Merlo, A.; Pineda, A.; Ordoñez, M.; Savary, S. 2006. The intensity of a coffee rust epidemic is dependent on production situations. *Ecological Modelling* 197 (3-4): 431-447.
- Avelino, J.; Rivas, G. 2013. La roya anaranjada del cafeto. En J. Avelino, A. Muller Raoul, A. Eskes, Santacreo Rodnev, & F. Holguin, La roya anaranjada del cafeto: mito y realidad. San José, Costa Rica: CIRAD-CP-CAFE, IRD, France-MAE, IICA-PROMECAFE, PROMECAFE, ICAFE-San José, CR.
- Avelino, J.; Pablo, I.; Laderach, P.; Hruska, A. 2015. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008-2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security* 7(2): 303-321.
- Alavo, B. 2015. The insect pathogenic fungus *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas and its use for pests control: A review. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* 3:337-345.
- Barquero, M. 2013. Recomendaciones para el combate de la roya del cafeto. San José: Instituto del café de Costa Rica (ICAPE). San José, CR.
- Belayneh, T.; Kubicek, C.; Druzhin A. 2010. The Rhizosphere of *Coffea Arabica* in Its Native Highland Forests of Ethiopia Provides a Niche for a Distinguished Diversity of *Trichoderma*. (En Línea). Revisado el 4 de agosto 2020. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1424-2818/2/4/527/pdf>
- Codocafe (Consejo Dominicano del Café, DO) 2012. Serie histórica de la producción, exportación y divisas del café dominicano años cafeteros del 1939-1940 al 2009-2010. Santo Domingo. DO.
- Codocafe (Consejo Dominicano del Café, DO). 2006. Diagnóstico de la Caficultura Dominicana. Santo Domingo, DO.
- Eskes A.; Mendes, M.; Robbs, C. 1991. Laboratory and field studies on parasitism of *Hemileia vastatrix* with *Verticillium lecanii* and *V. leptobactrum*. *Café-Cacao-Thé*, 35:275-282.
- González, E.; Surís, M. 2007. Selección *in vitro* de aislamientos promisorios de *Lecanicillium lecanii* (Zare y Gams) para la lucha biológica de *Hemileia vastatrix* (Berk. Et Br.). *Protección Vegetal* 22(2): 128-130.

Gómez, I.; Pérez-Portilla, E.; Escamilla-Prado, E.; Martínez-Bolaños, M.; Luz, G.; Carrión-Villarnovo, L.; Hernández-Leal, T. Selección in vitro de micoparásitos con potencial de control biológico sobre Roya del café (*Hemileia vastatrix*). *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 172-183. (En Línea). Revisado el 4 de agosto 2020. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v36n1/2007-8080-rmfi-36-01-172.pdf>

Jackson, D.; Skillman, J.; Vandermeer, J. 2012. Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. *Biological control* (61): 89-97.

Jackson, D.; Zemenick, K.; Huerta, G. 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*). *Tropical and Subtropical Agroecosystems* (15): 389-401.

Mahfund, M.; Mior, A.; Meon, S.; Kadir, J. 2006. In Vitro and in Vivo Tests for Parasitism of *Verticillium psalliotae* Treschow on *Hemileia vastatrix* Berk and Br. *Malaysian Journal of Microbiology*. 2:46-50. (En Línea). Revisado el 4 de agosto 2020. Disponible en: <http://www.myjurnal.my/public/article-view.php?id=10291>

Nina, R.; Smeltekop, H.; Almanza, J.; Loza-Murguía, M. 2011. Evaluación de la capacidad biocontroladora de cepas nativas de *Trichoderma* spp sobre *Rhizoctonia* sp y *Fusarium* sp en café (*Coffea arabica*) en condiciones experimentales. *J Selva Andina Res Soc.* 1(1):43-52. (En Línea). Revisado el 4 de agosto 2020. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Loza_Manuel/publication/277261617_Evaluacion_de_la_capacidad_biocontroladora_de_cepas_nativas_de_Trichoderma_spp_sobre_Rhizoctonia_sp_y_Fusarium_sp_en_cafe_Coffea_arabica_en_condiciones_experimentales/links/55ad674908aee079921e2528/Evaluacion-de-la-capacidad-biocontroladora-de-cepas-nativas-de-Trichoderma-spp-sobre-Rhizoctonia-sp-y-Fusarium-sp-en-cafe-Coffea-arabica-en-condiciones-experimentales.pdf

Vandermeer, J.; Perfecto, I.; Liere, H. 2009. Evidence for hyperparasitism of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) by the entomogenous fungus, *Lecanicillium lecanii*, through a complex ecological web. *Plant Pathology* (58): 636-641.

Zambolim, L.; Vale, F.; Pereira, A.; Chaves G. 1997. Café (*Coffea arabica* L.), Controle de Doenças. In: Vale FXR, Zambolim L. (eds.). *Controle de Doenças de Plantas: Grandes Culturas*, vol. 1. Suprema Gráfica e Editora, Visconde do Rio Branco, BR.

Zare, R.; Gams, W. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia* 73: 1-50.

