



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE
MANABÍ MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

CARRERA: INGENIERÍA AGRÍCOLA

**TÉSIS PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÍCOLA**

TEMA:

CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE *Trichoderma spp.*, A NIVEL *in vitro* FRENTE A LOS HONGOS FITOPATÓGENOS *Crinipellis pernicioso* y *Monilophthora roreri*

AUTORES:

PÁRRAGA VÉLEZ JOHAN REINALDO

ZAMBRANO ZAMBRANO JOSÉ FABRICIO

TUTOR:

ING. ÁNGEL M. GUZMÁN CEDEÑO, Mg.As.

CALCETA, ENERO 2012

DERECHOS DE AUTORÍA

Párraga Vélez Johan Reinaldo y Zambrano Zambrano José Fabricio, declaran bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de nuestra autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que se han consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedemos los derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

JOHAN R. PÁRRAGA VÉLEZ

JOSÉ F. ZAMBRANO Z.

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Ángel M. Guzmán Cedeño, certifica haber tutelado la tesis titulada “CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE *Trichoderma spp.*, A NIVEL *in vitro* FRENTE A LOS HONGOS FITOPATÓGENOS *Crinipellis perniciosa* y *Moniliophthora roreri.*”, que ha sido desarrollada por Johan Reinaldo Párraga Vélez y José Fabricio Zambrano Zambrano, previa a la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

ING. ÁNGEL M. GUZMÁN CEDEÑO, Mg.As.

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los Suscritos, miembros del tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** la tesis titulada “CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE *Trichoderma spp.*, A NIVEL *in vitro* FRENTE A LOS HONGOS FITOPATÓGENOS *Crinipellis perniciososa* y *Moniliophthora roreri.*”, que ha sido propuesta, desarrollada y sustentada por Johan Reinaldo Párraga Vélez y José Fabricio Zambrano Zambrano, previa a la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

ING. ENRRIQUE PÁRRAGA M.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

ING. FREDDY MESÍAS GALLO

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

ING. GONZALO CONTANTE TUBAY

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, por darnos la oportunidad de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día.

A Dios por haberme dado salud para culminar una etapa más de mi vida, a mis bisabuelos, a mis padres y a todos mis familiares y amigos por su apoyo incondicional y por haber depositado su confianza en mí.

Al ing. Piero C. Fajardo Navarrete, por la orientación brindada pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de este tiempo, a don Alber Espinoza y al ing. Julio Molina por todo el apoyo brindado durante la ejecución de mi trabajo de tesis, a mi tutor Ing. Ángel M. Guzmán Cedeño, Mg.As por su apoyo en el aporte de la estructuración del proyecto a los distinguidos miembros del tribunal muchas gracias por la contribución brindado para nuestro proyecto.

Johan Reinaldo Párraga Vélez

AGRADECIMIENTO

Agradecer en primer lugar a Dios quien me dio la vida y la ha llenado de bendiciones en todo este tiempo, a él que con su infinito amor me ha dado la sabiduría suficiente para culminar mi carrera universitaria.

Quiero expresar mis más sincero agradecimiento, reconocimiento y cariño a mis padres por todo el esfuerzo que hicieron para darme una profesión y hacer de mí una persona de bien, gracias por los sacrificios y la paciencia que demostraron todos estos años; gracias a ustedes he llegado hacer lo que soy ahora.

Gracias a mis hermanos que han sido mis fieles amigos en los que he podido confiar.

Gracias a todas aquellas personas que de una u otra forma nos ayudaron a crecer como personas y profesionales.

Agradecemos de manera en especial a nuestro Tutor de tesis y a los miembros del tribunal quienes con su conocimiento y apoyos supieron guiarnos al desarrollo de la presente tesis desde el inicio hasta su culminación.

José Fabricio Zambrano Zambrano

DEDICATORIA

A Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, brindándome fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mis bisabuelos

Por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo y por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante.

A mis padres

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi esposa María Muñoz por estar conmigo en las buenas y en las malas y a nuestro hermoso hijo quien es el mejor regalo que Dios nos ha dado y a quien siempre cuidare.

A todos mis familiares quienes de alguna manera influyeron positivamente para lograr este objetivo, a mis maestros y amigos que me apoyaron y marcaron cada etapa de mi camino universitario, y que me ayudaron en asesorías y dudas presentadas en la elaboración de la tesis.

Johan Reinaldo Párraga Vélez

DEDICATORIA

Con mucha sinceridad y sencillez, comparto y dedico este trabajo:

Principalmente a Dios por permitir culminar mi carrera, el cual supo guiarme por el buen camino, por haber permitido llegar hasta el final, dando las fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la fe ni desfallecer en el intento.

A mis padres, José Zambrano y Berly Zambrano, quienes con sacrificio y mucho esfuerzo supieron conducirme por el sendero del bien con sus sabios consejos, por darme la estabilidad emocional, económica, sentimental; para poder llegar hasta este logro, que definitivamente no hubiese podido ser realidad sin ustedes.

A mi Sra. Jahaira Delgado por estar siempre presente, acompañándome en las buenas y malas quien ha sido y es mi motivación, inspiración y felicidad.

Mis hermanos, Oscar, Fernando y Berly quienes de alguna manera influyeron para que cumpla mi meta.

A mis suegros, Yoryinton Delgado y Mercedes Cedeño, porque de manera desinteresada han dado su apoyo en este logro.

Y de manera especial a todos y a cada uno de mis familiares, catedráticos y amigos que colaboraron en forma desinteresada para la realización de éste trabajo.

José Fabricio Zambrano Zambrano,

CONTENIDO GENERAL

DERECHOS DE AUTORÍA	ii
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR	i
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	1
AGRADECIMIENTO	2
DEDICATORIA	4i
CONTENIDO GENERAL	¡Error! Marcador no definido.x
CONTENIDO DE CUADROS	7
CONTENIDO DE GRÁFICOS	7
CONTENIDO DE ANEXOS	8i
RESUMEN	¡Error! Marcador no definido.i
SUMMARY	¡Error! Marcador no definido.i
CAPÍTULO I	1
ANTECEDENTES	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACION DEL PROBLEMA	1
1.1.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	2
1.2. JUSTIFICACIÓN	2
1.3. OBJETIVOS	2
1.3.1. GENERAL	2
1.3.2. ESPECIFICOS	3
1.3.3. HIPÓTESIS, PREMISAS Y/O IDEAS A DEFENDER	3
CAPÍTULO II	4
MARCO TEORICO	4
2.1. IMPORTANCIA DEL BIOCONTROL	4
2.2. ASPECTOS GENERALES DE <i>Trichoderma spp</i>	5
2.2.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	6
2.2.2. MECANISMOS DE ACCIÓN	8
2.2.3. INTERACCIÓN DIRECTA CON EL PATÓGENO	12
2.3. MEDIOS DE CULTIVOS	13
2.4. MÉTODO PARA AISLAMIENTO DE HONGOS PATOGENOS	13
2.5. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE HONGOS	15
2.5.1. CULTIVO EN CUÑAS DE AGAR	¡Error! Marcador no definido.
2.5.2. TÉCNICA DE CAPA DE ACEITE MINERAL	16
2.5.3. CONSERVACIÓN A BAJAS TEMPERATURAS	16
2.5.4. CONSERVACION EN AGUA DESTILADA	16
CAPÍTULO III	17
DESARROLLO METODOLÓGICO	17
3.1. UBICACIÓN DEL ENSAYO	17
3.2. AISLAMIENTO DE CEPAS DEL HONGO <i>Trichoderma spp</i>	17
3.2.1. ÉTAPA DE CAMPO	17
3.2.2. ÉTAPA DE LABORATORIO	17
3.3. AISLAMIENTO DE LOS FITOPATÓGENOS	19
3.3.1. ÉTAPA DE CAMPO	19
3.3.2. ÉTAPA DE LABORATORIO	20

3.4.	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE <i>Trichoderma spp</i>	20
3.4.1.	DELINEAMIENTO EXPERIMENTAL.....	20
3.4.2.	MANEJO DEL EXPERIMENTO.....	21
3.4.3.	VARIABLE RESPUESTA	21
3.5.	CAPACIDAD ANTAGONICA DE <i>Trichoderma</i> vs FITOPATÓGENOS....	22
3.5.1.	DELINEAMIENTO EXPERIMENTAL.....	22
3.5.2.	MANEJO DEL EXPERIMENTO.....	23
3.5.3.	VARIABLES EXPERIMENTALES	24
3.6.	CONSERVACION DE LAS CEPAS AISLADAS	25
CAPÍTULO IV		26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		26
4.1.	AISLAMIENTO DE CEPAS DEL HONGO <i>Trichoderma spp</i>	26
4.2.	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE <i>Trichoderma spp</i>	28
4.3.	CAPACIDAD ANTAGONICA DE <i>Trichoderma</i> vs FITOPATÓGENOS...	30
4.3.1	<i>Trichoderma spp.</i> FRENTE A <i>C. pernicioso</i>	30
4.3.2.	<i>Trichoderma spp</i> FRENTE A <i>M. roleri</i>	32
4.3.3.	<i>Trichoderma</i> FRENTE A <i>C. pernicioso</i> y <i>M. roleri</i> DE ACUERDO A LAS CLASES Y ZONAS DE ANTAGONISMO	35
4.3.3.1.	CLASES DE ANTAGONISMO <i>Trichoderma</i> vs <i>C. pernicioso</i>	35
4.3.3.2.	ZONAS DE ANTAGONISMO <i>Trichoderma</i> vs <i>C. pernicioso</i>	36
4.3.3.3.	CLASES DE ANTAGONISMO <i>Trichodermas</i> vs <i>M. roleri</i>	37
4.3.3.4.	ZONAS DE ANTAGONISMO <i>Trichoderma</i> vs <i>M. roleri</i>	37
4.4.	CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS	38
CAPÍTULO V		40
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		40
BIBLIOGRAFÍA		42
ANEXOS		46

CONTENIDO DE CUADROS

Cuadro N° 4.1.-	Características de las 12 cepas de <i>Trichoderma spp</i>	26
Cuadro N° 4.2.-	Comparación de medias del crecimiento de <i>Trichoderma</i>	29
Cuadro N° 4.3.-	Clases de antagonismo <i>Trichoderma spp</i> vs <i>C. pernicioso</i>	36
Cuadro N° 4.4.-	Zonas de antagonismo <i>Trichoderma spp</i> vs <i>C. pernicioso</i>	36
Cuadro N° 4.5.-	Clases de antagonismo <i>Trichoderma spp</i> vs <i>M. roleri</i>	37
Cuadro N° 4.6.-	Zonas de antagonismo <i>Trichoderma spp</i> vs <i>M. roleri</i>	38

CONTENIDO DE GRÁFICOS

Gráfico N° 4.1.-	Crecimiento de 12 cepas de <i>Trichoderma</i> en los tres días.....	29
Gráfico N° 4.2.-	Crecimiento de <i>Trichoderma</i> vs <i>C. pernicioso</i> primer día	30
Gráfico N° 4.3.-	Crecimiento de <i>Trichoderma</i> vs <i>C. pernicioso</i> segundo día ...	30
Gráfico N° 4.4.-	Crecimiento de <i>Trichoderma</i> vs <i>C. pernicioso</i> tercer día	31
Gráfico N° 4.5.-	Crecimiento de <i>Trichoderma</i> vs <i>C. pernicioso</i> cuarto día	31
Gráfico N° 4.6.-	Crecimiento de <i>Trichoderma</i> vs <i>C. pernicioso</i> quinto día	32

Gráfico N° 4.7.- Crecimiento de <i>Trichoderma</i> vs <i>M. royeri</i> primer día.....	33
Gráfico N° 4.8.- Crecimiento de <i>Trichoderma</i> vs <i>M. royeri</i> segundo día	33
Gráfico N° 4.9.- Crecimiento de <i>Trichoderma</i> vs <i>M. royeri</i> tercer día.....	34
Gráfico N° 4.10.- Crecimiento de <i>Trichoderma</i> vs <i>M. royeri</i> cuarto día.....	34
Gráfico N° 4.11.- Crecimiento de <i>Trichoderma</i> vs <i>M. royeri</i> quinto día	35

CONTENIDO DE ANEXOS

Anexo 1 .- Velocidad de crecimiento de 12 cepas de <i>Trichoderma</i> día uno.....	47
Anexo 2 .- Adeva velocidad de crecimiento de 12 cepas de <i>Trichoderma</i>	47
Anexo 3 .- Velocidad de crecimiento de 12 cepas de <i>Trichoderma</i> día dos	48
Anexo 4 .- Adeva velocidad de crecimiento de 12 cepas de <i>Trichoderma</i>	48
Anexo 5 .-Velocidad de crecimiento de 12 cepas de <i>Trichoderma</i> día tres.....	49
Anexo 6 .- Adeva velocidad de crecimiento de 12 cepas de <i>Trichoderma</i>	49
Anexo 7 .- Aislamiento y selección de las 12 cepas de <i>Trichoderma spp</i>	51
Anexo 8 .- Características de las cepas de <i>Trichoderma spp</i> mas veloces.....	52
Anexo 9 .- Comparacion del fitopatogeno <i>M. royeri</i> con otro ensayo.....	53
Anexo 10 .- Comparacion del fitopatogeno <i>C. pernicioso</i> con otro ensayo	53
Anexo 11 .- Confrontación de las cepas de <i>Trichoderma</i> vs <i>C. pernicioso</i>	54
Anexo 12 .- Confrontación de las cepas de <i>Trichoderma</i> vs <i>M. royeri</i>	55

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el potencial antagónico del hongo *Trichoderma spp.*, frente a los hongos fitopatógenos *Crinipellis perniciososa* y *Moniliophthora roreri*, se aislaron cepas de estos microorganismos de muestras tomadas del jardín clonal de cacao ubicado en el campo politécnico de la ESPAM MFL, donde se aislaron 28 cepas de las cuales basadas en sus características físicas cualitativas como color de esporas olor que emite el medio y presencia de fiálides se escogieron 12 cepas, siendo codificadas C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, para posteriormente determinar la velocidad de crecimiento utilizando una regla estandarizada en mm, mediante el diseño completamente al azar DCA con 4 réplicas y establecer la capacidad antagónica *in vitro* de acuerdo a las clases y zonas de antagonismo, donde se confirmó que las cepas C1, C3, C4, C5, C10, C11 de *Trichoderma spp.*, ejercieron antagonismo sobre *M. roreri.*, y las cepas C4 y C10, sobre *C. perniciososa.*, al quinto día de evaluación.

Palabras Claves: Cepas, antagonismo, *in vitro*, Fitopatógeno, esporulación, fiálides.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao L*) es una de las mejores alternativas económica en Ecuador, debido a que su producción es muy reconocida en el mercado internacional por las características organolépticas que posee; esta condición representa un gran desafío ya que existen enfermedades que causan serios problemas a este cultivar, lo cual se procura controlar empleando fungicidas de síntesis química que provocan desventajas económicas y ecológicas, por los costos y el deterioro al medio ambiente.

Ante ello la utilización de agentes microbiológicos o biocontrol es, en la actualidad, una de las opciones para la protección de los cultivos atacados por patógenos fúngicos del suelo y del ambiente. Microorganismos antagonistas del género *Trichoderma spp.*, están entre los más estudiados, por tratarse de un hongo fácilmente cultivable en diferentes medios, tener crecimiento rápido y producción de antibióticos que atacan una amplia gama de hongos fitopatógenos (Yáñez, 2003).

Stefanova *et al.*, (1999), mencionan que la eficiencia del biocontrol realizado por *Trichoderma* está asociada con la producción de antibióticos no volátiles y con otros mecanismos tales como el micoparasitismo, en el cual posee gran importancia la excreción de quitinasa y proteasas.

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.

La producción de cacao es uno de los principales rubros de explotación en el Ecuador, por sus buenas características organolépticas que posee, tiene excelente acogida en el mercado internacional, sin embargo existen enfermedades que afectan drásticamente dichas características, estas enfermedades son causadas por los hongos (*Crinipellis perniciosa*) y (*Moniliophthora roreri*), el control de estas enfermedades fúngicas ha llevado al uso de productos químicos, los cuales causan problemas al ambiente, los suelos y al hombre.

La escoba de bruja (*C. perniciosa*) es una enfermedad que afecta a todos

los tejidos, en crecimiento, del árbol; lo cual incide directamente en la formación de brotes sanos, por ende puede producir pérdidas en plantaciones hasta en un 80% (Arazazu, 2000).

La monilla (*M. roleri*), afecta directamente a los frutos en cualquier edad de su desarrollo, causando disminución en la producción, deterioro de la calidad del cacao y pérdidas económicas para los productores y el país. Se ha reportado pérdidas en plantaciones hasta en un 90% (Hernández *et al.*, 1991).

A pesar de la existencia y uso de fungicidas de última generación, es evidente el incremento de estos fitopatógenos, la reducción de la productividad y encarecimiento de los costos de producción.

1.2. JUSTIFICACIÓN

El uso de microorganismos es una buena alternativa para el manejo de enfermedades fúngicas; en especial el hongo *Trichoderma spp.*, por que es un hongo benéfico capaz de ejercer control hacia otros hongos que causan daño a las plantas, la utilización del mismo permite estar en armonía con el medio ambiente y nosotros mismos.

El antagonismo, como mecanismo del proceso ecológico de regulación natural de plagas es mas efectivo si lo desarrollan organismos autóctonos porque están adaptados a las condiciones intrínsecas, de allí la importancia de aislar cepas de *Trichoderma spp.*, de las unidades de producción de cacao de la localidad y evaluar su eficiencia a nivel de laboratorio y a futuro validarlas en condiciones de campo.

1.3. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Generar información respecto al antagonismo *in vitro* de *Trichoderma spp.*, frente a *C. pernicioso* y *M. roleri*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Aislar cepas del hongo antagonista *Trichoderma spp.*, y fitopatógenos a partir de muestras de suelo y tejidos vegetal, tomadas en el jardín clonal de cacao de la ESPAM - MFL.
- Determinar la velocidad de crecimiento de cada cepa aislada de *Trichoderma spp.*
- Establecer la capacidad antagónica de las cepas aisladas de *Trichoderma spp.*, frente a *C. pernicioso* y *M. royeri*.

1.4.-HIPÓTESIS.

Las cepas de *Trichoderma spp.* aisladas del jardín clonal de cacao ejercen antagonismo a nivel *in vitro* sobre *C. pernicioso* y *M. royeri*.

CAPÍTULO II. MARCO TEORICO

2.1.- IMPORTANCIA DEL BIOCONTROL.

Según Hall, (1974), el potencial o capacidad de diseminación de un organismo bio-controlador depende de varios factores: la virulencia del microorganismo, susceptibilidad del huésped y transmisión de un individuo a otro o de una población a otra. La mayoría de los patógenos depende para su movilidad de factores físicos (agua, viento) o bióticos (parásitos y depredadores).

Esposito y Da Silva (1998), manifiestan que el género *Trichoderma* es un grupo de hongos ampliamente utilizado debido a sus múltiples usos en la agricultura, es el fungicida biológico más estudiado y empleado; de igual forma es estimulador de crecimiento en plantas y utilizado como agente de bioremediación, ya que degrada algunos grupos de pesticidas de alta persistencia en el ambiente.

En América Latina y el Caribe, son pocos los estudios de diversidad de *Trichoderma spp.* a pesar de la gran potencialidad biotecnológica que posee este género. *Trichoderma* suele encontrarse en madera en descomposición y en casi todo tipo de suelos siendo la rizósfera un sitio ideal para encontrar cepas de *Trichoderma* que interactúen con plantas de *T. cacao* (Druzhinia y Kubicek (2005), Benítez *et al.*, (2004) y Vera, (2005) citados por Marzuly y Domenico (2010).

Biocontrol (2005), manifiesta que las especies de *Trichoderma*, ampliamente difundidas en la comunidad microbiana de los suelos y con marcadas propiedades antagonistas, poseen representantes caracterizados por su alta producción de sustancias gaseosas. Según Dennis y Webster (1971), lo que permite diferenciar las especies de *Trichoderma* es un pronunciado aroma a coco que se desprende del medio de cultivo.

Trichoderma spp., es un hongo comúnmente utilizado como agente de

biocontrol, con el cual se han conseguido buenos resultados frente algunos patógenos del suelo en condiciones experimentales (Baker y Cook 1983).

Krauss (2001) y Soberanis (2002), citado por César *et al.*, (2007), manifiestan que han obtenido experiencias halagadoras, por el eficiente efecto de cepas importadas y nativas de *Trichoderma spp.*, para controlar moniliasis de cacao, así como para control de *C. pernicioso*.

2.2.- ASPECTOS GENERALES DE *Trichoderma spp.*

El *Trichoderma spp.*, es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra naturalmente en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios. Pertenece a la subdivisión *Deuteromycete* que se caracterizan por no poseer o no presentar un estado sexual determinado (Harman, 2001).

Así mismo manifiesta que este hongo se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, y se presenta naturalmente en diferentes rangos de zonas de vida y hábitat, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos especialmente en aquellos que son atacados por otros hongos. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales, son colonizadas rápidamente por estos microorganismos.

Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones medioambientales y sustratos confiere a *Trichoderma spp.*, la posibilidad de ser utilizado en la industria de la biotecnología (Biocontrol, 2005).

Así mismo las especies de *Trichoderma* ampliamente difundidas en la comunidad microbiana de los suelos y con marcadas propiedades antagónicas, poseen representantes caracterizados por su alta producción de sustancias gaseosas, lo que permite diferenciar a estas últimas, es un pronunciado aroma a coco que se desprende del cultivo.

Además, *Trichoderma spp.*, tiene diversas ventajas como agente de control

biológico, pues posee un rápido crecimiento y desarrollo, aparte de esto produce una gran cantidad de enzimas, inducidas con la presencia de hongos fitopatógenos. Puede desarrollarse en una amplia gama de sustratos, lo que facilita su producción masiva para uso en la agricultura. Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y a hábitat donde los hongos causan enfermedad le permiten ser eficiente agente de control, de igual forma puede sobrevivir en medios con contenidos significativos de pesticidas y otros químicos.

En cuanto a los preparados a base de este hongo se pueden presentar tanto en formulación líquida, como en sólida, conteniendo en cualquier caso un mínimo de 1×10^7 UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de peso seco, o por mililitro de producto.

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa, el micelio es ralo en su mayoría, y visto al microscopio es fino, los conidióforos son ramificados, parecen un árbol pequeño, estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies. Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del período vegetativo de las plantas (Rifai, 1969).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* presentan clamidosporas las que toleran condiciones ambientales adversas, son estructuras de sobrevivencia y permiten que el hongo pueda perdurar a través del tiempo (Stefanova, 1999).

2.2.1.- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.

Para Rifai (1969), las características generales para todas las cepas o razas de *Trichoderma spp.*, son las siguientes:

- **Colonia**

Las especies del género *Trichoderma* pueden formar colonias flojas o

compactas, pudiendo presentarse numerosas variaciones entre éstos dos extremos; ocasionalmente se presentan estas dos características sobre una misma colonia. La compactación de las colonias se debe posiblemente o está relacionada con la estructura de los conidióforos.

El color de las colonias se debe a la pigmentación de las fialosporas, así como, a la cantidad de esporas producidas; algunos aislamientos pueden producir cristales o secretar pigmentos que decolora el medio, el pH del medio influye en la coloración de las colonias de *Trichoderma spp.*, puede mostrar una coloración diferente, que varía de amarillo a amarillento o verde claro; además la presencia de elongaciones de las hifas estériles sobre los penachos de los conidióforos de *Trichoderma hamatum*, hacen que las colonias aparezcan blancuzcas o verde grisáceas. Algunas colonias presentan desprendimiento de olores.

- **Micelio.**

El micelio se encuentra constituido por hifas hialinas, septadas de paredes lisas y con abundante ramificación.

- **Clamidóspora.**

Las clamidósporas están presentes en muchas especies, las mismas que pueden ir intercaladas, ocasionalmente terminales o sobre una ramificación lateral de una hifa corta, es globosa o elipsoidal, incolora y de pared lisa.

- **Conidióforo.**

Los conidióforos poseen una estructura compleja, caracterizada por su abundante ramificación, cónicos o piramidales. Sobre las ramificaciones principales de los conidióforos se producen ramificaciones principales laterales cortas, individuales o en grupos de tres, otros se colocan hacia fuera, alejado de las ramificaciones laterales cortas. El ápice de cada rama termina en una fiálide, excepto en *Trichoderma hamatum* y *Trichoderma polysporum*, en las cuales la ramificación principal de los conidióforos comúnmente termina en una prolongación simple, curvada o recta, con

elongaciones de hifas estériles a manera de látigo; por lo general los conidióforos tienen apariencia similar a la forma de las coníferas.

- **Fiálides.**

Son estructuras que se parecen a un frasco, a una pera, por lo general reducida en su base, con una hinchazón en la parte media, luego atenuado bruscamente cerca del ápice en un cono angosto y con cuello subcilíndrico. Las fiálides se disponen en grupos irregulares de hasta cinco alrededor del extremo de las penúltimas células de las ramificaciones o pueden originarse a lo largo de las mismas, en forma individual, alternadamente o en pares opuestos. Generalmente las fiálides terminales son ligeramente más largas que las originales bajo ellas.

- **Esporas.**

Las esporas son fialosporas producidas individualmente o sucesivamente acumuladas en el ápice de las fialides, conformando una cabeza de esporas, cuyo diámetro es inferior a 15 micras, rápidamente pueden estar en cadenas cortas; ovoides, elípticas, cilíndricas o casi oblongas, a veces con apariencia angular, ocasionalmente trucada en su base.

2.2.2.- MECANISMOS DE ACCIÓN.

Harman (2001), reporta varios mecanismos demostrados recientemente, con los cuales *Trichoderma spp.*, actúa como bio-controlador.

- **Micoparasitismo.**

El micoparasitismo es el fenómeno por el cual un hongo coloniza a otro, cubriendo una gran cantidad de eventos en este tipo de interacción.

Las especies de *Trichoderma* durante el proceso de micoparasitismo crecen quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico, que conlleva al debilitamiento casi

total del fitopatógeno (Carsolio *et al.*, 1999).

Chet *et al.*, (1998) Citado por Pérez (2004) manifiestan que el micoparasitismo como mecanismo de acción antagónica en *Trichoderma spp.*, ha sido ampliamente estudiado. No obstante, existen aspectos en el mismo que no están totalmente esclarecidos. Este es un proceso complejo que para su estudio se ha separado en cuatro etapas. El desarrollo de cada etapa depende de los hongos involucrados, de la acción biotrófica o necrotrófica del antagonista y de las condiciones ambientales. Chet y Benhamou (1998), explican detalladamente cada una de estas etapas, para el caso de las especies de *Trichoderma spp.*

- **Reconocimiento.**

Las investigaciones realizadas a lo largo de muchos años con un número considerable de cepas de *Trichoderma* y de especies han demostrado que estas son efectivas sólo contra patógenos específicos. El conocimiento de esta especificidad condujo a la idea de que el reconocimiento molecular entre *Trichoderma* y el hospedante es el evento esencial que precede al proceso antagonista (Chet 1998).

Barondes (1981) citado por Chet y Benhamou (1998). Manifiestan que es un elemento a tener en cuenta para la aplicación de este hongo, y para la búsqueda de nuevos aislamientos más adaptados y eficaces. El reconocimiento se realiza a través de interacciones lectinas-carbohidratos. Las lectinas son proteínas enlazadas a azúcares, las cuales aglutinan células y están involucradas en las interacciones entre los componentes de la superficie de las células y su ambiente extracelular, La producción de lectinas se ha investigado en *R. solani* y *S. rolfsii*. En todos los casos se encontraron evidencias directas, de que las lectinas están involucradas en el micoparasitismo. (Pérez 2004; Chet y Benhamou 1998).

- **Adhesión y enrollamiento**

Cuando el reconocimiento es positivo, las hifas de *Trichoderma* se

adhieren a las del hospedante mediante la formación de estructuras parecidas a ganchos y apresorios, se enrollan alrededor de estas, mediado por procesos enzimáticos (Pérez, 2004).

Según Chet y Elad (1983), citado por Martínez *et al.*, (1994), la adherencia de las hifas de *Trichoderma* ocurre gracias a la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno.

- **Actividad lítica**

En esta etapa ocurre la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas del antagonista (Haram *et al.*, 1996).

Por los puntos de contacto donde se produce la lisis y aparecen los orificios, penetra la hifa del micoparásito en las del hongo hospedante. La actividad enzimática en *Trichoderma* ha sido estudiada extensamente, así como las posibles funciones que desenvuelven en el micoparasitismo.

Las especies de *Trichoderma* tienen un elevado potencial parasítico, con una actividad metabólica muy particular, que les permite parasitar eficientemente las estructuras fúngicas de los hongos (Sandoval y López 2002).

Trichoderma excreta muchos metabolitos dentro de ellos enzimas (celulasas, glucanasas, lipasas, proteasas y quitinasas) que participan en la lisis de la pared celular de las hifas del hospedante, facilitando la inserción de estructuras especializadas y de hifas de *Trichoderma*, que absorben nutrientes del interior del hongo fitopatógeno. Eveleigh *et al.*, (1986), plantearon que el micoparasitismo finalmente termina con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula del hospedante.

El citoplasma restante está principalmente rodeando las hifas invasoras, mostrando síntomas de disgregación, lo que disminuye la actividad

patogénica del mismo. Desde el punto de vista práctico las enzimas se tienen en cuenta como criterio en la selección de aislamientos. Elad, *et al.*, (1983), encontraron que los aislamientos de *Trichoderma* eficaces en el control de patógenos vegetales eran capaces de producir glucanasas, quitinasas y proteasas, por lo que recomienda que los aislamientos de *Trichoderma spp.*, pueden ser seleccionados como agentes de control biológico en base a su capacidad de producir β -1,3-D glucanasa y quitinasa en presencia de glucano y quitina, respectivamente.

- **Antibiosis**

La antibiosis es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos. Algunos autores opinan que la antibiosis no debe ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico (Vero y Mondino 1999).

Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico. Tales sustancias inhibitoras son consideradas “antibióticos” (Hjeljord y Tronsmo 1998). Al inicio se estimó que la actividad inhibitora de aislamientos de *Trichoderma* sobre otros hongos se debía solo a compuestos no volátiles. Dennis y Webster (1971), fueron los pioneros en esta temática, con la realización de los trabajos más completos acerca de la función de los antibióticos producidos por hongos del género *Trichoderma* sobre patógenos de las plantas. Ellos relacionaron la actividad antibiótica de *Trichoderma spp.*, con compuestos no volátiles, entre los que se encontraban uno identificado como trichodermina y otros metabolitos peptídicos. En investigaciones posteriores determinaron que *Trichoderma spp.*, produce dos antibióticos más: gliotoxina y viridina.

Más tarde Oliver y Germain (1998) citado por Martínez *et al.*, (1994), informaron que *T. harzianum* Rifai produce numerosos antibióticos como

son: trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina.

2.2.3.- INTERACCIÓN DIRECTA CON EL PATÓGENO.

- **Parasitismo.**

El término parasitismo se refiere al hecho de que un microorganismo parasite a otro. Puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. El parasitismo consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, Beta-1-3-glucanasas y proteasas. (Melgarejo *et al.* 1989; Ulhoa, 1996).

Los antagonistas contribuyen a la atenuación de los daños que causan las enfermedades en los agroecosistemas donde existan condiciones para su desarrollo y conservación. Para lograr este objetivo los microorganismos beneficiosos presentan diferentes modos de acción que les permitan ejercer su efecto biorregulador. Estos atributos, de conjunto con la capacidad de multiplicarse abundantemente, se encuentran entre los de mayor importancia para su selección como agentes de control biológico (Fernández, 2001).

Desde los primeros estudios en esta temática y hasta el presente, entre las especies más ampliamente estudiadas y aplicadas como control biológico, se encuentran las del género *Trichoderma*, debido a su eficaz control, capacidad reproductiva, plasticidad ecológica, efecto estimulante sobre los cultivos y recientemente se detectó su acción como inductor de resistencia sistémica en la planta a diferentes patógenos (Cervantes, 2007 y Harman, 2004).

- **Predación.**

En el caso de la predación el antagonista se alimenta de materia orgánica entre la cual ocasionalmente se encuentra el patógeno. No ha sido un

mecanismo de acción muy importante en el desarrollo de agentes de biocontrol. Los reportes más conocidos citan la presencia de amebas en suelos supresores de enfermedades las cuales se alimentan de las hifas de hongos patógenos entre otras fuentes de alimento (Campbell, 1989).

2.3.- MEDIOS DE CULTIVOS USADOS EN EL AISLAMIENTO DE HONGOS.

Monzón y Rodríguez (s.f.) manifiesta que los medios de cultivo utilizados habitualmente y que se encuentran en el mercado son:

- Agar extracto de malta (AEM). Se pueden valorar aspectos morfológicos microscópicos y macroscópicos, se consigue una buena esporulación.
- Agar papa dextrosa (PDA). Es un medio útil para valorar el aspecto morfológico y la coloración de la colonia. Su alto contenido de carbohidratos condiciona un mayor crecimiento, en detrimento de la esporulación que suele retrasarse hasta un mes.

Otros medios de cultivo como agar harina de avena (OA), agar clavel (CLA), agar arena, agar nutriente sintético (SNA), medio de komada, etc., se suelen utilizar en laboratorios especializados. La temperatura habitual de incubación de hongos es entre 25 y 28⁰ C.

2.4.- MÉTODO PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS PATOGENOS.

Este método puede ser usado para el aislamiento de cualquier hongo según Herrera y Mayea (1994), lograr el aislamiento del agente causal de una determinada sintomatología o enfermedad, permite, en primer lugar, establecer la causa que originó dichos trastornos, es decir permite llegar a diagnosticar la naturaleza del agente causal. No obstante, es muy común cuando se utilizan técnicas o métodos para el aislamiento del agente causal, que más de un microorganismo sea obtenido, por lo que

irreversiblemente se debe complementar una serie de postulados establecidos por el bacteriólogo alemán Roberto Koch y que son conocidos hoy en día como los postulados de Koch, cuyos pasos son los siguientes:

- El organismo debe estar constantemente asociado con los síntomas observados.
- Debe ser aislado y purificado, y encontrarse libre de otros organismos.
- Al inocularlo sobre una planta hospedante susceptible debe reproducir los mismos síntomas observados.
- El organismo debe ser reaislado de la planta hospedante inoculada y en cultivo puro debe mostrar las mismas características que el cultivo original.

Para el aislamiento de hongos productores de micelio aéreo esporógeno resulta exitoso simplemente transfiriendo directamente el micelio o masas de esporas formadas sobre el tejido de la planta, sobre un medio determinado (PDA). Cuando el crecimiento de micelio o la formación de esporas no es apreciable sobre el tejido de la planta hospedante se emplea la técnica conocida como cámara húmeda, que consiste en tomar porciones o pedazos de dicho tejido, lavarlo débilmente a chorro continuo de agua corriente durante 10 ó 15 minutos para remover de la superficie las esporas de otros hongos saprofíticos y colocarlos luego sobre papel filtro humedecido dentro de placas petri e incubar durante varias horas a temperatura entre 26 y 30 °C. En caso de que determinados microorganismos saprofíticos crezcan a mayor velocidad y cubran la superficie del tejido, enmascarando el verdadero agente causal, debe procederse a la desinfección superficial con hipoclorito de sodio al 1 %, antes de colocar en cámara húmeda los pedazos de tejido enfermo.

Continúan manifestando que para el aislamiento de hongos presentes en el interior de las plantas (haces vasculares, frutos, tubérculos) debe proceder

a la desinfección externa con el producto antes descrito, cortar el tejido con un bisturí o escarpelo estéril y extraer porciones afectadas de la parte interna y colocarlas o sembrarlas en un medio apropiado que favorezca el crecimiento de las estructuras vegetativas o reproductoras. El ajuste del pH en los medios empleados para el aislamiento debe garantizar valores bajos (alrededor de 5,5) que impidan el crecimiento de bacterias.

2.5.- MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE HONGOS.

La gran diversidad genética del reino Fungí ha creado la necesidad de establecer estrategias de conservación a largo plazo, dichas estrategias no se deben restringir a coleccionar y conservar el germoplasma, sino que deben incluir un manejo eficiente del material para documentar, caracterizar y evaluar la variabilidad (Fernández *et al.*, 2005).

Para el establecimiento de una estrategia de conservación de hongos, se debe considerar que: todos los cultivos se mantengan vivos y puros, que cada cepa permanezca estable morfológica y genéticamente. Además, se deben tomar en cuenta los objetivos de la conservación, las metodologías propuestas y los recursos económicos disponibles, por último, es importante considerar que cada cepa debe conservarse al menos por dos métodos de preservación, uno de los cuales debe ser a largo plazo. Las técnicas más usuales de conservación son:

2.5.1.- Cultivo en cuñas de Agar.

Consiste en simular las condiciones naturales para lograr un desarrollo completo del hongo. Esto se logra mediante la preparación de medios de cultivo estériles a base de agar, con la adición de nutrientes como los jugos vegetales y extractos naturales, así como también compuestos sintéticos de composición conocida. El medio se puede depositar ya sea en cajas Petri, en botellas o en tubos de ensayo. Esta metodología, aunque es simple, demanda mucho tiempo para las transferencias de los hongos, además de que requiere mucho material cada cierto período, lo que eleva los costos. Por otro lado, los riesgos de contaminación y pérdida del

material son altos, y las constantes transferencias pueden ocasionar la pérdida de viabilidad de las cepas (Kirsop y Doyle 1991).

2.5.2.- Técnica de capa de aceite mineral.

Consiste en sembrar trozos de cultivos de hongos ya desarrollados, en tubos que contienen agar dispuesto en forma de taco y posteriormente se cubren con una capa de aceite mineral estéril (Panizo *et al.*, 2005).

2.5.3.- Conservación a bajas temperaturas.

Radica en cultivar los hongos en cuñas de agar para almacenarlos luego a temperaturas entre 4°C y 7°C. Presenta por lo tanto los mismos inconvenientes que el cultivo simple en cuñas de agar, además de requerir el equipo de enfriamiento y ser dependiente de la electricidad (Kirsop y Doyle 1991).

2.5.4.- Conservación en agua destilada

Es también conocida como método de Castellani y fue propuesta hace más de 4 décadas. En este medio el crecimiento de los hongos es muy restringido, pero se mantiene la viabilidad y la pureza. Se considera un método barato, simple y eficiente; además evita el ataque de los ácaros (Fernández *et al.*, 2005).

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1.- UBICACIÓN.

El presente trabajo se realizó en el Campus Politécnico de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, localizada en el sitio El Limón, parroquia Calceta, cantón Bolívar, provincia de Manabí, ubicada geográficamente a 00°49'23" de Latitud Sur y 80°11'01" de Longitud Oeste y a una altitud de 15 msnm. ^{1/}

3.2.- AISLAMIENTO DE CEPAS DEL HONGO ANTAGONISTA *Trichoderma spp.*

3.2.1.- Étapa de campo:

- Se graficó el jardín clonal de cacao para la distribución de los sitios a muestrear.
- Se tomaron muestras a 20 cm de profundidad utilizando un muestreador manual.
- Luego se mezclaron las 20 sub muestras, se homogenizaron y se envasaron en fundas plásticas codificadas para su traslado y procesamiento en el laboratorio de Microbiología de la Espam MFL.

3.2.2.- Étapa de laboratorio

Se realizó el aislamiento de las cepas de *Trichoderma spp.*, de acuerdo a sus características más relevantes, realizando el siguiente procedimiento:

a. Procesamiento de la muestra de suelo.

- La muestra se homogenizó, se trituró en mortero y se tamizó con una (malla de 1mm) con el objetivo de eliminar restos vegetales y demás elementos.

- Luego se envasó en un recipiente de cristal estéril para su mejor almacenamiento.

b. Preparación de medios de cultivo

- En un matraz Erlenmeyer se colocó 800 mL de agua destilada y agitando en la plancha magnética agregando 31.2 g de medio de cultivo PDA, hasta homogenizar bien la mezcla.
- Posteriormente se midió el pH el cual se reguló a ± 5.7 , utilizando un peachímetro digital.
- Luego de haber medido el pH, se calentó hasta aflojar grumulos y posteriormente se colocó en el autoclave a 15 PSI, para después llenar las cajas petri con 15 mL de medio PDA.

c. Siembra de la muestra de suelo

- Se pesó 10 g de la muestra obtenida.
- Se realizó una flora total preparando una dilución mezclando los 10 g de suelo en 90 mL de agua destilada estéril obteniendo la solución madre de la muestra.
- De la solución madre se preparó 3 diluciones a diferentes concentraciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} .
- Posteriormente se tomó 1 mL de cada una de las diluciones obtenidas y se vertieron en las cajas petri que contenían el medio de cultivo PDA.
- De cada dilución se realizaron tres siembras, con un total de 9 cajas petri, y se sellaron con parafina.
- Luego de la siembra, las cajas fueron colocadas a temperatura del laboratorio 22° C, acompañadas de un termómetro, y se monitorearon de 1 a 9 días.

d. Identificación de las colonias

- Se tomaron 28 muestras de las colonias puntuales y visibles del total de cajas petri, las mismas que se pasaron individualmente a placas para observar su crecimiento.
- De acuerdo a las características como: forma del micelio, color del micelio, tipo de micelio, esporulación, color que adquiere el medio de cultivo y el olor que emite, se escogieron 12 cepas rotulándose de C1 a C12, además se observó al microscopio lente 40 X, mediante preparaciones fijas, que poseían fiálides que son estructuras morfológicas únicas del género *Trichoderma spp*

e. Purificación de las cepas de *Trichoderma spp*

Una vez identificadas las cepas de *Trichoderma spp.*, se extrajo un disco de cada colonia con un saca bocado de 5 mm de diámetro, para colocarlo individualmente en cajas petri y en cuñas con medio PDA.

3.3.- AISLAMIENTO DE LOS FITOPATÓGENOS (*C. pernicioso* y *M. roreri*).

3.3.1.- Étape de campo:

- Se realizó un recorrido en el jardín clonal de cacao, para recolectar las muestras de los fitopatógenos de plantas infectadas.
- En el caso del fitopatógeno *C. pernicioso.*, se colectaron escobas verdes, se colocaron en fundas plásticas estériles y se llevaron al laboratorio de Microbiología de la ESPAM MFL.
- Para el fitopatógeno *M. roreri.*, se colectaron mazorcas infectadas con un 10% de daño visual, se colocaron en fundas plásticas estériles, y se enviaron al laboratorio de Microbiología de la ESPAM MFL.

3.3.2.- Etapa de laboratorio

Para el aislamiento de los patógenos *C. pernicioso* (escoba de bruja) y *M. roreri* (monilla) se utilizó la siguiente técnica:

- Se procedió a la desinfección externa de las muestras (escobas verdes) con un algodón embebido de hipoclorito de sodio al 1%.
- Luego se cortó con un bisturí o escalpelo estéril, se extrajo porciones y se sembraron en el medio de cultivo PDA.
- En el caso de *M. roreri* se tomaron esporas directamente de las mazorcas infectadas y se colocaron en las cajas petri con PDA.
- La comprobación de la autenticidad de los patógenos se basó en la observación al microscopio y de sus características externas comparadas con el experimento realizado por Santander s.f., y Agrios (1995). Posteriormente las cepas de los fitopatógenos se colocaron en cuñas con PDA y en agua destilada.

3.4.- VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Trichoderma spp.* AISLADAS.

Para la determinación de la velocidad de crecimiento se realizó un bioensayo de las siguientes características.

3.4.1.- DELINEAMIENTO EXPERIMENTAL

➤ DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental utilizado fue el diseño completamente aleatorio (DCA) con 4 réplicas.

➤ FACTOR EN ESTUDIO

- Cepas del hongo antagonista *Trichoderma spp.* (C)

➤ NIVELES

- C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12.

➤ **TRATAMIENTOS**

T1= C1 de *Trichoderma spp*; T2= C2 de *Trichoderma spp*; T3= C3 de *Trichoderma spp*; T4= C4 de *Trichoderma spp*; T5= C5 de *Trichoderma spp*; T6= C6 de *Trichoderma spp*; T7= C7 de *Trichoderma spp*; T8= C8 de *Trichoderma spp*; T9= C9 de *Trichoderma spp*; T10= C10 de *Trichoderma spp*; T11= C11 de *Trichoderma spp*; T12= C12 de *Trichoderma spp*.

➤ **UNIDAD EXPERIMENTAL**

Como unidad experimental se utilizó la caja petri de 93 mm de diámetro con 15 mL de PDA y con la cepa de acuerdo al tratamiento.

➤ **ESQUEMA DE ADEVA**

F.V	G.L
Total	47
Tratamientos	11
Error	36

➤ **ANÁLISIS FUNCIONAL.**

La diferencia estadística entre tratamientos se categorizó mediante la prueba de tukey al 0.05 de probabilidad.

3.4.2.- MANEJO DEL EXPERIMENTO

Se tomaron discos de 5 mm de diámetro de las 12 cepas de *Trichoderma spp.*, con un saca bocados, se colocaron en cajas petri individualmente con 15 mL de medio de cultivo PDA y se rotularon para luego ser colocados en la estufa a 27°C durante tres días.

3.4.3.- VARIABLE RESPUESTA

Crecimiento de las cepas de *Trichoderma spp.*, en milímetro/día.- Con una regla estandarizada en milímetros se midió el diámetro de crecimiento de las colonias cada 24 horas durante 3 días a partir de la siembra.

3.5.- CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE *Trichoderma spp.* VS FITOPATÓGENOS (*C. pernicioso* y *M. roreri*).

Para establecer la capacidad antagónica se realizó un bioensayo de las siguientes características.

3.5.1.- DELINEAMIENTO EXPERIMENTAL

➤ DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental utilizado fue el diseño completamente aleatorio (DCA) con 4 replicas

➤ FACTORES EN ESTUDIO

- Cepas del hongo antagonista *Trichoderma spp.* (C)
- Fitopatógenos *C. pernicioso* (P1) y *M. roreri* (P2)

➤ NIVELES

- C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12
- P1 y P2

➤ TRATAMIENTOS

C1P1= *Trichoderma* Vs *Crinipellis pernicioso*; C1P2= *Trichoderma* Vs *Moniliophthora roreri*; C2P1= *Trichoderma* Vs *Crinipellis pernicioso*; C2P2= *Trichoderma* Vs *Moniliophthora roreri*; C3P1= *Trichoderma* Vs *Crinipellis pernicioso*; C3P2= *Trichoderma* Vs *Moniliophthora roreri*; C4P1= *Trichoderma* Vs *Crinipellis pernicioso*; C4P2= *Trichoderma* Vs *Moniliophthora roreri*; C5P1= *Trichoderma* Vs *Crinipellis pernicioso*; C5P2= *Trichoderma* Vs *Moniliophthora roreri*; C6P1= *Trichoderma* Vs *Crinipellis pernicioso*; C6P2= *Trichoderma* Vs *Moniliophthora roreri*; C7P1= *Trichoderma* Vs *Crinipellis pernicioso*; C7P2= *Trichoderma* Vs *Moniliophthora roreri*; C8P1= *Trichoderma* Vs *Crinipellis pernicioso*; C8P2= *Trichoderma* Vs *Moniliophthora roreri*; C9P1= *Trichoderma* Vs *Crinipellis pernicioso*; C9P2= *Trichoderma* Vs *Moniliophthora roreri*; C10P1= *Trichoderma* Vs *Crinipellis pernicioso*; C10P2= *Trichoderma* Vs

Moniliophthora roreri; C11P1= *Trichoderma* Vs *Crinipellis perniciosa*; C11P2= *Trichoderma* Vs *Moniliophthora roreri*; C12P1= *Trichoderma* Vs *Crinipellis perniciosa*; C12P2= *Trichoderma* Vs *Moniliophthora roreri*.

➤ **UNIDAD EXPERIMENTAL**

Como unidad experimental se utilizó la caja petri de 93 mm de diámetro con 15 mL de PDA y con las cepas de acuerdo al tratamiento.

➤ **ESQUEMA DE ADEVA**

F.V	G.L
Total	95
Tratamientos	23
Error	72

➤ **ANALISIS FUNCIONAL**

Los promedios de los resultados obtenidos en los 5 días de evaluación se presentaron en histogramas de barras.

3.5.2.- MANEJO DEL EXPERIMENTO

- Una vez desarrollados los hongos fitopatógenos se extrajeron discos con un saca bocado estéril de 5 mm de diámetro y se colocaron con el aza de platino previamente esterilizada a un extremo de la caja petri.
- Luego se ubicaron discos de micelio de 5 mm de diámetro de *Trichoderma spp.*, los cuales se enfrentan en posiciones opuestas, a 2 cm del borde de la caja petri, y equidistantes a 5 cm, de tal modo el hongo fitopatógeno quedara en contraposición con el hongo *Trichoderma spp.*, (cultivo dual), desinfectando el aza de platino cada vez que se trabajara con una cepa diferente.

3.5.3.- VARIABLES RESPUESTAS.

Crecimiento de las cepas de *Trichoderma spp.*, vs fitopatógenos en milímetro/día.- Con una regla estandarizada en milímetros se midió el diámetro de crecimiento de las colonias de *Trichoderma spp.*, confrontadas con los patógenos, cada 24 horas durante 3 días a partir de la siembra.

Antagonismo de *Trichoderma spp.* frente a *C. pernicioso* y *M. roreri*.- La prueba antagónica se la realizó de acuerdo a las clases de antagonismo en función a la escala de Bell, Well and Markham (1982), citado por Solís (1999), que consta de cinco clases, al cuarto y quinto día de haber sido confrontadas.

Clase 1. Antagónico cubriendo por completo a *M. roreri*, *C. pernicioso* y a la superficie de medio de cultivo.

Clase 2. Antagónico cubriendo al menos el 75% de la superficie del medio de cultivo.

Clase 3. Antagónico cada uno coloniza el 50% de la superficie del medio de cultivo.

Clase 4. *M. roreri* y *C. pernicioso* colonizan al menos el 75% de la superficie del medio de cultivo y parece resistir la invasión del antagónico.

Clase 5. *M. roreri* y *C. pernicioso* cubriendo completamente la superficie del medio de cultivo.

A su vez la zona de antagonismo se evaluó con la escala propuesta por Punja y Grogan (1983), citado por Solís (1999), que consta de los siguientes zonas.

0. No hay zona de antagonismo
1. Aversión ligera (zona de antagonismo de +/- 1 mm de ancho)
2. Aversión moderada (zona de antagonismo de 2 a 4 mm de ancho)
3. Aversión fuerte (zona de antagonismo de más de 4 mm de ancho)

3.6.- CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS

Una vez culminados los bioensayos anteriores se procedió a pasar las cepas en agua destilada para su conservación, las mismas que pueden ser usadas para futuros trabajos de investigación.

La conservación en agua destilada estéril se realizó según la metodología descrita por Castellani (1967), modificado por Deshmukh (2003), citado por Panizo, *et al* (2005), con la diferencia que 5 mL., de la suspensión de esporas que se obtuvieron directamente del cultivo se centrifugó en tubo Falcón, con capacidad de 15 mL a 12 000 r.p.m. durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se re suspendió el concentrado celular en 5 mL de agua destilada estéril. Las mismas que se almacenaron en refrigeración a 4⁰ C y a temperatura ambiente del laboratorio 22⁰ C.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- AISLAMIENTO DE CEPAS DEL HONGO ANTAGONISTA

Trichoderma spp.

Trichoderma se desarrolla en numerosos ambientes y sustratos, por este motivo el muestreo se lo realizó a 20 cm de profundidad, en la rizósfera del cacao, sitio ideal para encontrar cepas de este género como lo manifiesta Druzhinia y Kubicek (2005), Benítez *et al.*, (2004) y Vera, (2005) citados por Marzuly y Domenico (2010) mencionando que el sitio ideal para encontrar *Trichoderma spp.*, es la rizósfera. Además Mejía *et al.*, (2008) citado por Villamil *et al.*, (2012) registran que los integrantes del género *Trichoderma* son habitantes naturales de los suelos cultivados con cacao.

Se aislaron 12 cepas de *Trichoderma spp.*, de acuerdo a las características específicas de este género, las que se rotularon C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12. Entre las características más relevantes de las 12 cepas encontradas (cuadro 4.1) se observa que adquirieron, en la fase de multiplicación, una esporulación de coloración verde, lo cual corresponde a una característica de *Trichoderma spp.*, coincidiendo con Rifai (1969), quien menciona que las esporas emitidas son de coloración verde. En cuanto a la percepción del olor a coco que emite este género, 6 de las cepas seleccionadas emitieron este aroma, corroborando con lo expuesto por Dennis y Webster, (1971); citado por Biocontrol, (2005), en que una de la características de *Trichoderma spp.*, es el pronunciado aroma a coco que emite el medio. Las cepas que no emitieron el característico olor a coco se las mantuvo dentro del grupo seleccionado porque al realizar las observaciones microscópicas en placas se determinó que tenía las fiálides que son estructuras únicas de género *Trichoderma*, como lo manifiesta Rifai, (1969). (Anexo 8).

Para certificar el aislamiento de los fitopatógenos se compararon las colonias aisladas con las características macroscópicas de *C. pernicioso* y *M. royeri* mostradas por Santander. s.f; y Agrios (1995). (Anexo 9 y 10).

Cuadro 4.1.- Características físicas cualitativas de las 12 cepas de *Trichoderma spp.*, aisladas de un banco clonal de cacao de la ESPAM MFL.

Cepas	Forma micelio	Color del micelio	Tipo de micelio	Color de esporas	Color del medio	Olor	Presencia de Fiálides
C1	Retorcido	Blanco	Plano	verde	Creinoso	Aroma a coco	Si
C2	Retorcido	Blanco	Aéreo plano	verde	Creinoso	Aroma a coco	Si
C3	Retorcido	Blanco	Aéreo plano	verde	Creinoso	Aroma a coco	Si
C4	Retorcido	Blanco	Plano	verde	Creinoso	Aroma a coco	Si
C5	Retorcido	Blanco	Aéreo	verde	Creinoso	Ninguno	Si
C6	Retorcido	Blanco	Aéreo	verde	Creinoso	Ninguno	Si
C7	Retorcido	Blanco	Aéreo	verde	Creinoso	Aroma a coco	Si
C8	Retorcido	Blanco	Aéreo plano	verde	Amarillo	Ninguno	Si
C9	Retorcido	Blanco	Plano	verde	Anaranjado	Ninguno	Si
C10	Retorcido	Blanco	Aéreo plano	verde	Creinoso	Ninguno	Si
C11	Retorcido	Blanco	Aéreo plano	verde	Creinoso	Ninguno	Si
C12	Retorcido	Blanco	Aéreo plano	verde	Creinoso	Aroma a coco	Si

4.2.- VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Trichoderma spp.* AISLADAS.

En el día uno de acuerdo al análisis de varianza se encontró diferencias altamente significativas entre los tratamientos, los cuales presentaron 6 rangos de igualdad estadística, sobresaliendo en la primera categoría las cepas C1 y C10, con 19 mm de crecimiento, y con el menor promedio la cepa C8 con 4 mm, obteniendo un coeficiente de variación de 24.87 % (cuadro 4.2).

En el segundo día de evaluación se encontró diferencias altamente significativas entre los tratamientos, repartidos en cinco categorías estadísticas, ubicándose en primer rango la cepa C9, con 52 mm, compartiendo esta igualdad estadística con las cepas C10, C1, C11, con promedios de 47, 46.5 y 43.5 mm respectivamente, con un coeficiente de variación de 17,35 % (cuadro 4.2).

Finalmente en el tercer día de evaluación se encontró diferencias altamente significativas entre los tratamientos, agrupándose en cuatro categorías estadísticas, ubicándose en primer rango la cepa C8, con 54 mm, compartiendo esta igualdad estadística con las cepas C5, C2, C3 y C11, con promedios de 52.25, 42.75, 37.75 y 35.50 mm respectivamente, con un coeficiente de variación de 23,07 % (cuadro 4.2).

Las cepas C1, C10, C4 y C9 lograron completar el espacio de la caja petri (93 mm) en los tres días coincidiendo con Dennis, y Webster, (1971), quienes manifiestan que un carácter ventajoso de *Trichoderma spp.*, es colonizar el área de crecimiento rápidamente (gráficos 4.1).

Cuadro 4.2.- Crecimiento de las 12 cepas de *Trichoderma spp.*, aisladas de un banco clonal de cacao de la ESPAM MFL.

CRECIMIENTO DE <i>Trichoderma spp.</i> (mm)					
Cepas	DÍA 1 **	Cepas	DÍA 2 **	Cepas	DÍA 3 **
C1 y C10	19,00 a	C9	52,00 a	C8	54,00 a
C4	18,00 a b	C10	47,00 a b	C5	52,25 a b
C2	16,00 a b c	C1	46,50 a b	C2	42,75 a b c
C11	14,00 a b c d	C11	43,50 a b c	C3	37,75 a b c d
C7	11,50 b c d e	C4	41,00 a b c d	C11	35,50 a b c d
C6	9,50 c d e f	C2, C6 y C7	32,00 b c d	C4	33,75 b c d
C12	7,50 d e f	C8	31,00 c d	C9	33,50 b c d
C9	7,00 e f	C5	30,50 c d e	C7	30,25 c d
C5	6,00 e f	C3	28,00 d e	C1	27,50 c d
C3	4,50 f	C12	15,50 e	C10	27,00 c d
C8	4,00 f			C12	25,00 c d
				C6	21,00 d
S\bar{x}	± 1,40	S\bar{x}	± 3,09	S\bar{x}	± 2,02
Tukey	6,96	Tukey	15,4	Tukey	19,97
CV	24,87 %	CV	17,35 %	CV	23,07 %

a, b, c, d, e y f. Letras iguales no defieren estadísticamente según tukey al 5% de probabilidad.

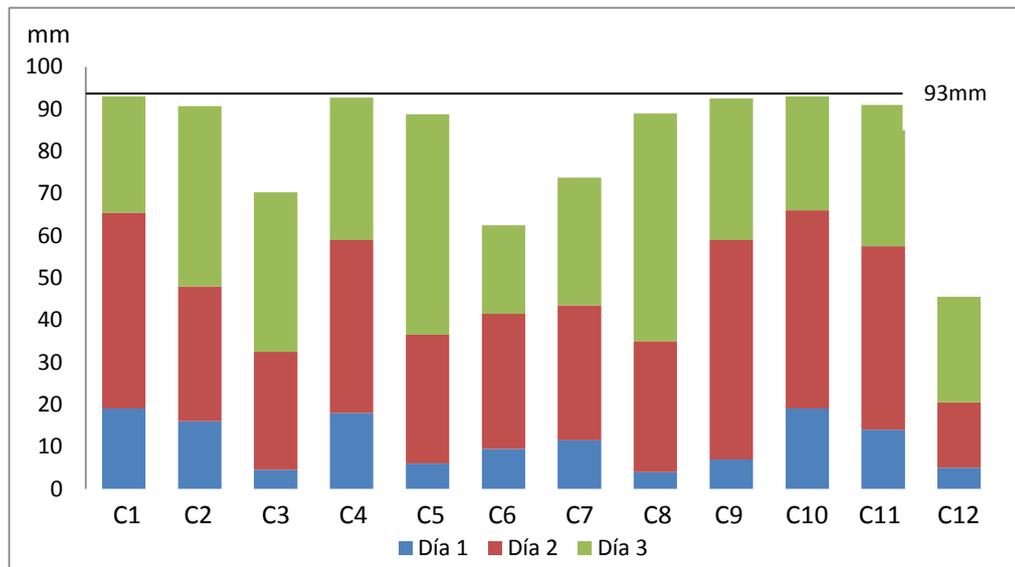


Gráfico 4.1.- Crecimiento de las 12 cepas de *Trichoderma spp.*, durante los tres días de evaluación.

4.3.- CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE *Trichoderma spp.*, VS FITOPATÓGENOS (*C. pernicioso* y *M. royeri*).

4.3.1.- *Trichoderma spp.*, frente a *C. pernicioso*.

a. Crecimiento

En el (gráfico 4.2), se presenta el efecto de la confrontación sobre el crecimiento en (mm/día) de las 12 cepas de *Trichoderma spp.*, con *C. pernicioso* (P1). En el primer día de evaluación sobresalieron las cepas, C10, C8, C4 y C9, logrando los mayores crecimientos entre las demás con promedios de 12.75, 12.5, 12, y 10.75 mm, en su orden; mientras que *C. pernicioso* tuvo un crecimiento promedio de 1 mm.

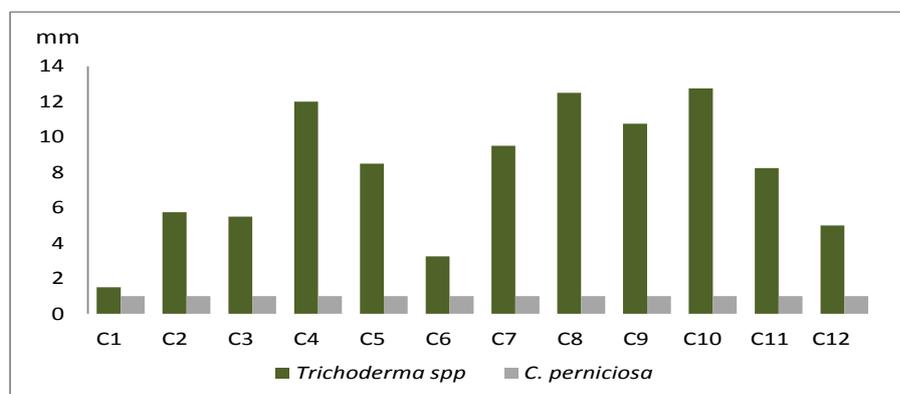


Gráfico 4.2. Crecimiento de *Trichoderma spp.*, frente a *C. pernicioso*, en el primer día.

En el segundo día de evaluación (gráfico 4.3), las cepas C4, C2, C1 y C3 obtuvieron los mayores crecimientos con promedios de 18, 14.25, 13.5 y 12.5 mm, aumentando el crecimiento del fitopatógeno *C. pernicioso* con un crecimiento promedio de 3 mm.

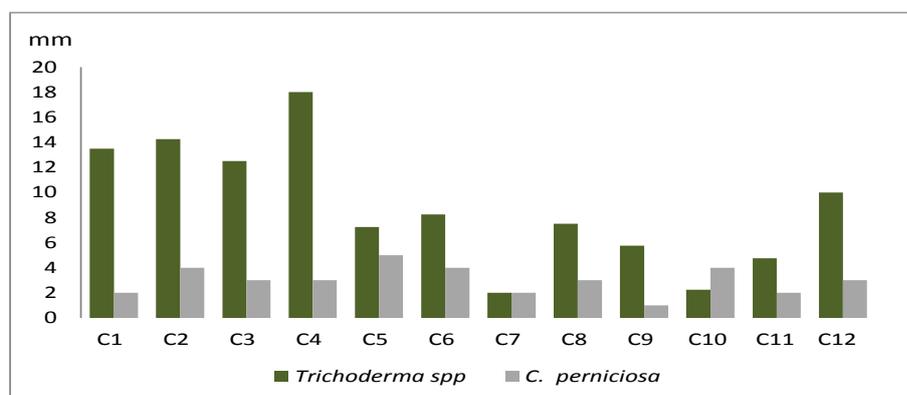


Gráfico 4.3. Crecimiento de *Trichoderma spp.*, frente a *C. pernicioso*, en el segundo día.

En el tercer día de evaluación (gráfico 4.4), las cepas C1, C4 y C3 alcanzaron los mayores crecimientos con promedios de 61.25, 40 y 35 mm, respectivamente, corroborando lo expuesto por Dennis, y Webster, (1971) que un carácter ventajoso de *Trichoderma spp.*, es colonizar el área de crecimiento rápidamente, aumentando el crecimiento del fitopatógeno *C. pernicioso* con un promedio de 6.5 mm siendo el crecimiento del fitopatógeno muy lento en comparación con el antagonístico.

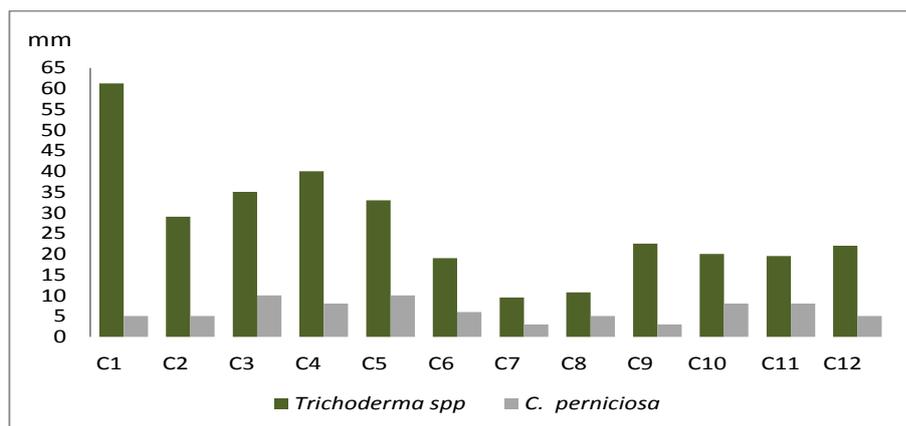


Gráfico 4.4. Crecimiento de *Trichoderma spp.*, frente a *C. pernicioso*, en el tercer día.

b.- Antagonismo

Al cuarto día de evaluación (gráfico 4.5), las cepas C10, C7 y C11, obtuvieron los mayores crecimientos con promedios de 35, 32 y 25 mm respectivamente, disminuyendo considerablemente el crecimiento del fitopatógeno corroborando lo expuesto por Biocontrol, (2005) que *Trichoderma spp.*, produce una gran cantidad de enzimas inducidas por la presencia del fitopatógeno las que reprimen el crecimiento del mismo.

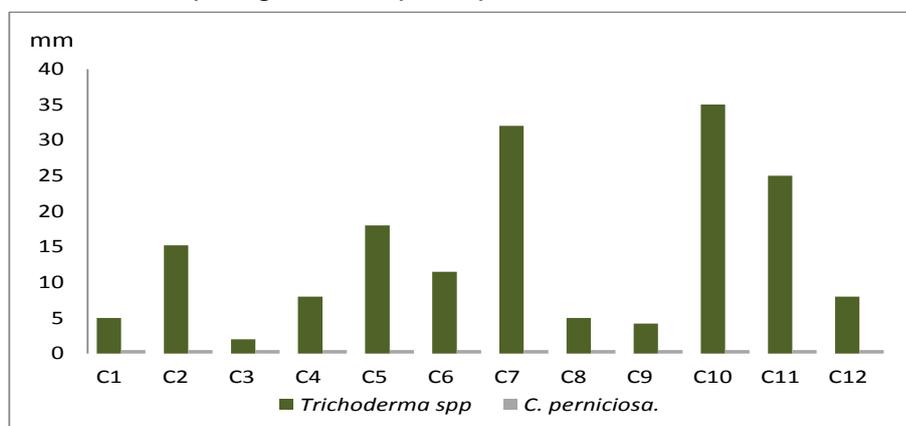


Gráfico 4.5. Crecimiento de *Trichoderma spp.*, frente a *C. pernicioso*, en el cuarto día.

En el quinto día de evaluación (gráfico 4.6), las cepas C10 y C4 alcanzaron el mayor crecimiento con promedios de 20 y 15 mm respectivamente, cubriendo en su totalidad la caja petri, invadiendo al patógeno, esporulando sobre el mismo y eliminando su crecimiento, corroborando lo expuesto por Carsolio *et al*, (1999) que *Trichoderma spp.*, crece hacia el fitopatógeno, degradando su pared celular, debilitándolo totalmente. Las demás cepas también lograron disminuir el crecimiento del fitopatógeno, formando un pequeño halo cerca del área de confrontación, ratificando lo expuesto por Hjeljord. L, (1998) que muchas cepas de *Trichoderma spp.*, pueden reprimir el crecimiento de fitopatógenos sin tener contacto con el mismo (anexo 11).

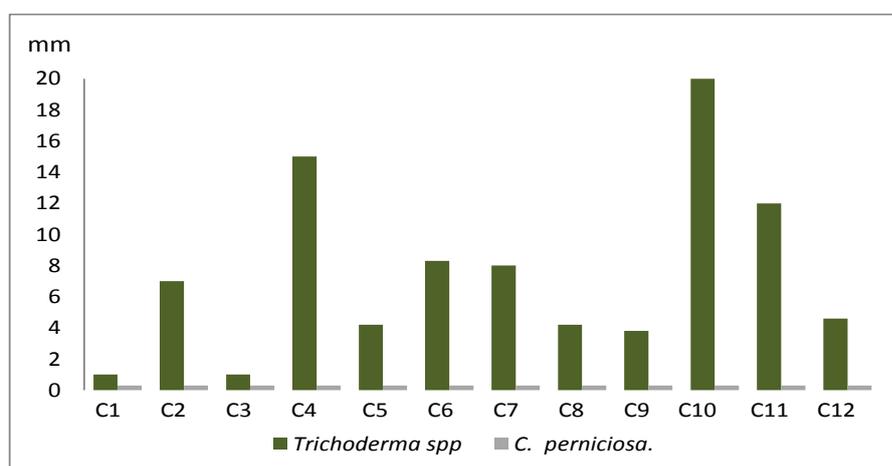


Gráfico 4.6. Crecimiento de *Trichoderma spp.*, frente a *C. pernicioso*, en el quinto día.

4.3.2.- *Trichoderma spp.*, frente a *M. roreri*

a. Crecimiento

En el (gráfico 4.7), se presenta el efecto de la confrontación sobre el crecimiento en (mm/día) de las 12 cepas de *Trichoderma spp.*, confrontadas con *M. roreri*. En el primer día de evaluación sobresalieron las cepas C10 y C4, logrando los mejores crecimientos con 19 mm. Respectivamente. El fitopatógeno *M. roreri* tuvo un crecimiento promedio de 3.53 mm.

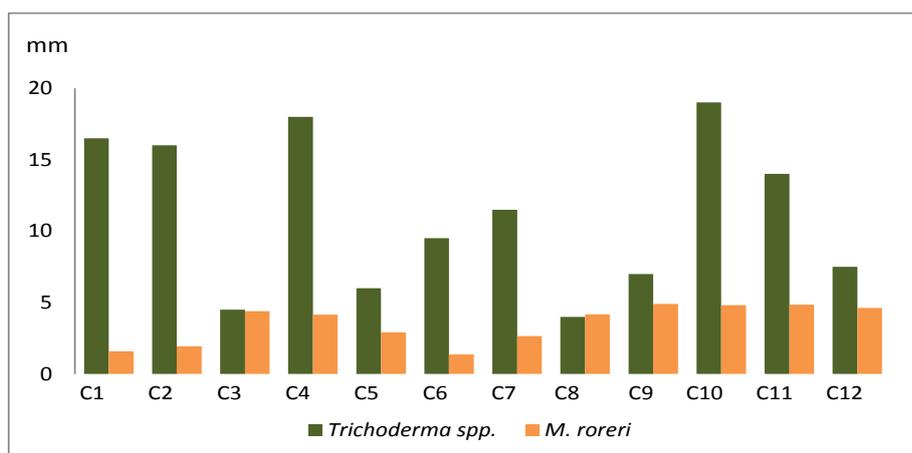


Gráfico 4.7. Crecimiento de *Trichoderma spp.*, frente a *M. royeri*, en el primer día.

En el segundo día de evaluación (gráfico 4.8), la cepa de *Trichoderma* C3, obtuvo el mejor promedio con 32.4 mm seguida de las cepas C1 y C4, que alcanzaron un crecimiento 30 mm; mientras que las cepas de *royeri* crecieron en promedio de 3.81 mm.

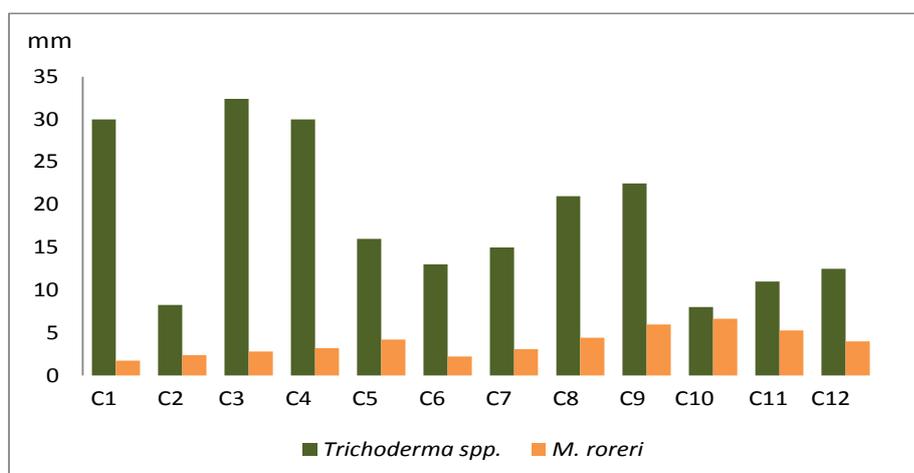


Gráfico 4.8. Crecimiento de *Trichoderma spp.*, frente a *M. royeri*, en el segundo día.

En el tercer día de evaluación (gráfico 4.11), las cepas C11, C5, C10 y C3, lograron los mayores crecimientos con promedios de 45.25, 44, 42 y 40.8 mm, respectivamente corroborando lo expuesto por Dennis, y Webster, (1971), quienes manifiestan que un carácter ventajoso de *Trichoderma spp.*, es colonizar el área de crecimiento rápidamente. Disminuyendo el crecimiento del fitopatógeno *M. royeri* alcanzo un promedio de promedio de 4.33 mm, siendo este muy lento en comparación con el antagonico.

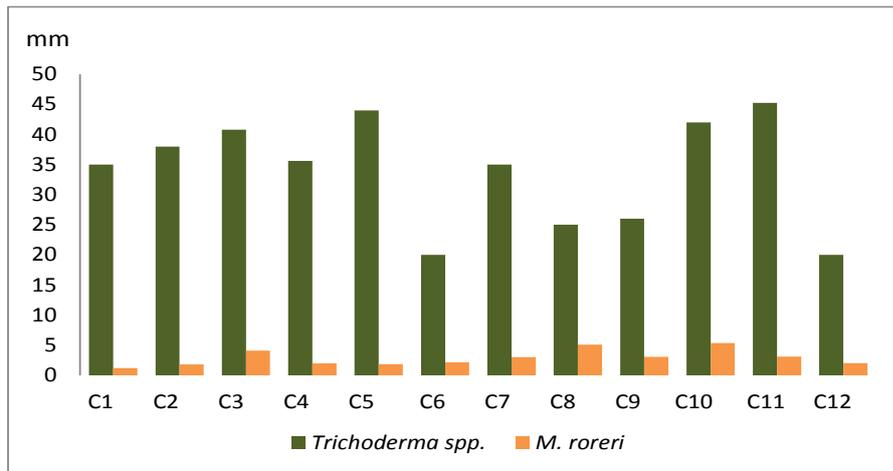


Gráfico 4.9. Crecimiento de *Trichoderma spp.*, frente a *M. royeri*, en el tercer día.

b. Antagonismo

En el cuarto día de evaluación (gráfico 4.10), las cepas de *Trichoderma spp.* C5, C10 y C11 crecieron en promedios 18, 15 y 13.8 mm, respectivamente; por lo cual reprimieron considerablemente el crecimiento del fitopatógeno, corroborando lo expuesto por Biocontrol, (2005) que *Trichoderma spp.*, produce una gran cantidad de enzimas inducidas por la presencia del fitopatógeno, que inhibe el crecimiento del mismo.

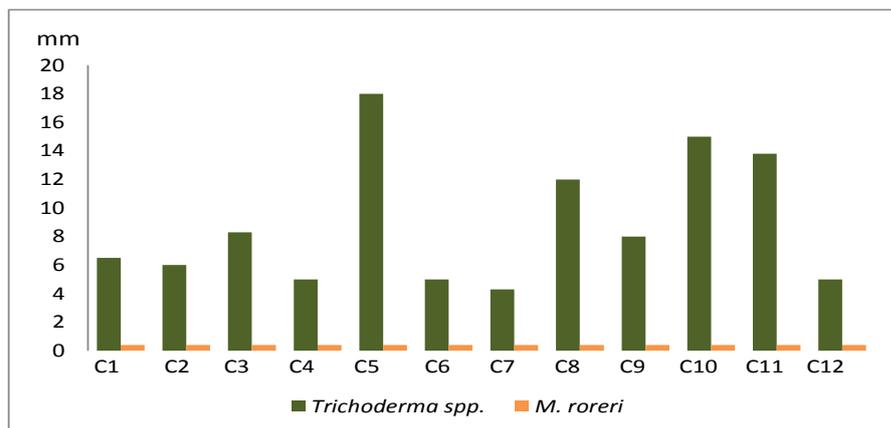


Gráfico 4.10. Crecimiento de *Trichoderma spp.*, frente a *M. royeri* en el cuarto día.

Al quinto día de evaluación (gráfico 4.11), las cepas C8, C5, C3 y C9 obtuvieron el mejor crecimiento con promedios de 10, 9, 7 y 7 respectivamente, mientras que las cepas de *M. royeri* disminuyeron totalmente su crecimiento.

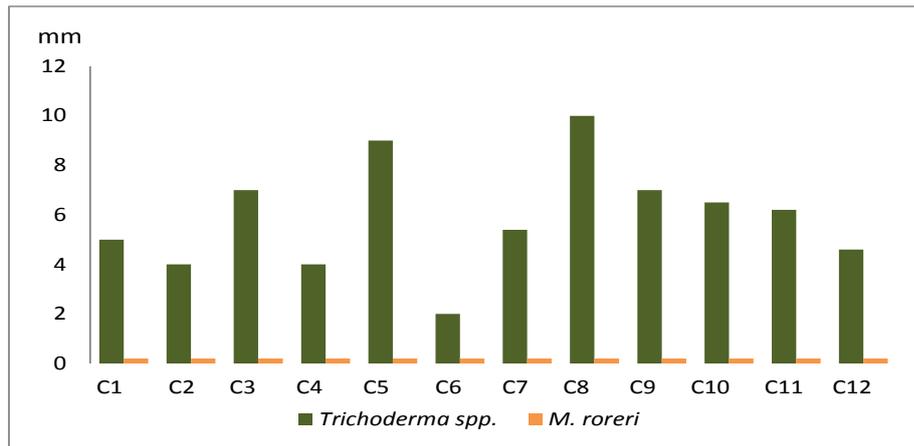


Gráfico 4.11. Crecimiento de *Trichoderma spp.*, frente a *M. royeri* en el quinto día.

Las cepas C1, C3, C4, C5, C10 y C11 cubrieron en su totalidad a la caja petri, invadiendo al fitopatógeno, esporulando sobre el mismo y eliminando totalmente su crecimiento, corroborando lo expuesto por Carsolio *et al*, (1999) que *Trichoderma spp.*, crece hacia el fitopatógeno, degradando su pared celular y debilitándolo totalmente. Las demás cepas también lograron disminuir el crecimiento del fitopatógeno sin haber completado el cubrimiento de la caja. Corroborando lo expuesto por Hjeljord, (1998) que muchas cepas de *Trichoderma spp.*, pueden reprimir el crecimiento de fitopatógenos sin tener contacto con el mismo (anexo 12).

4.3.3.- *Trichoderma spp.*, frente a *C. pernicioso* y *M. royeri* de acuerdo a las clases y zonas de antagonismo.

4.3.3.1.- Clases de antagonismo *Trichoderma spp.*, frente a *C. pernicioso*.

Al confrontar las 12 cepas de *Trichoderma spp.*, con una colonia de *C. pernicioso* se obtuvieron reacciones antagónicas definidas, lo que permitió agruparlas en tres clases de acuerdo a Bell, Well and Markham (1982), citado por Solís (1999), como se indica en el (cuadro 4.3), ubicando en la clase 1 a las cepas C4 y C10, porque cubrió por completo a *C. pernicioso* y a la superficie del medio de cultivo.

Las cepas C1, C2, C5, C7, C11, se ubicaron en la clase 2, puesto que

colonizó el 75% de la superficie, reprimiendo el avance del fitopatógeno. Las cepas C3, C6, C8, C9, C12, se ubicaron en la Clase 3, presentando una situación de antagonismo mutuo con *C. pernicioso*, cada uno colonizó el 50% de la superficie del medio de cultivo, es decir no hubo dominancia. Sin embargo cualquiera de las cepas de *Trichoderma spp.*, es capaz de detener el avance colonizador de *C. pernicioso*, corroborando lo expuesto por Krauss (2001) y Soberanis (2002), citado por César *et al.*, (2007) que existen especies de *Trichoderma spp.*, capaces de controlar *C. pernicioso* (anexo 11).

Cuadro 4.3.- Clases de antagonismo de *Trichoderma spp.*, frente a *C. pernicioso*.

Clase 1	Clase 2	Clase 3
C4	C1	C3
C10	C2	C6
	C5	C8
	C7	C9
	C11	C12

4.3.3.2.- Zonas de antagonismo *Trichoderma spp.*, frente a *C. pernicioso*.

De acuerdo con las zonas propuestas por Punja y Grogan (1983), citado por Solís (1999), las cepas C4 y C10 se ubicaron en la zona 3, existiendo una aversión fuerte, reprimiendo el avance de la colonia establecida de *Crinipellis pernicioso*. Las cepas C1, C2, C5, C7, C11, se ubicaron en la zona 2 con una moderada aversión entre las colonias. Las cepas C3 y C6, C8, C9 y C12, presentaron una ligera aversión agrupándose en la zona 1 (cuadro 4.4).

Cuadro 4.4.- Zonas de antagonismo de *Trichoderma spp.*, frente a *C. pernicioso*.

Zona 0	Zona 1	Zona 2	Zona 3
	C3	C1	C4
	C6	C2	C10
	C8	C5	
	C9	C7	
	C12	C11	

4.3.3.3.- Clases de antagonismo *Trichoderma spp.*, frente a *M. royeri*.

Al confrontar las 12 cepas de *Trichoderma spp.*, con una colonia de *M. royeri*, se obtuvieron reacciones antagónicas definidas, lo que permitió agruparlas en tres clases de acuerdo a Bell, Well and Markham (1982), citado por Solís (1999), como se indica en el cuadro 4.3, ubicando en la clase 1 las cepas C1, C3, C4, C5, C10, C11, cubriendo por completo a *M. royeri* y a la superficie del medio de cultivo. Las cepas C2, C7, C8, C9, se ubicaron en la clase 2, cubriendo el 75% de la superficie y reprimiendo el avance del fitopatógeno. Las cepas C6, C12 se ubicaron en la Clase 3, presentando una situación de antagonismo mutuo con *M. royeri*, ya que ninguno se presentó dominante. Sin embargo cualquiera de las cepas de *Trichoderma spp.*, es capaz de detener el avance colonizador de *M. royeri*, y suprime o reprime la capacidad esporulante del mismo, corroborando lo expuesto por Krauss (2001) y Soberanis (2002), citado por César *et al.*, (2007) que existen especies de *Trichoderma spp* capaces de controlar *M. royeri* (anexo 12).

Cuadro 4.5.- Clases de antagonismo de *Trichoderma spp.*, frente a *M. royeri*.

Clase 1	Clase 2	Clase 3
C1	C2	C6
C3	C7	C12
C4	C8	
C5	C9	
C10		
C11		

3.3.3.4.- Zonas de antagonismo *Trichoderma spp.*, vs *M. royeri*.

De acuerdo con las 6 zonas propuestas por Punja y Grogan (1983), citado por Solís (1999) las cepas C1, C3, C4, C5, C10, C11, se ubicaron en la zona 3, existiendo una aversión fuerte y reprimiendo el avance de la colonia establecida de *M. royeri*. Las cepas C2, C7, C8 y C9, se ubicaron en la zona 2 con una moderada aversión entre las colonias. Las cepas C6

y C12, presentaron una ligera aversión agrupándose en la zona 1 (cuadro 4.6)

Cuadro 4.6.- Zonas de antagonismo de *Trichoderma spp.*, frente a *M. royeri*.

Zona 0	Zona 1	Zona 2	Zona 3
	C6	C2	C1
	C12	C7	C3
		C8	C4
		C9	C5
			C10
			C11

4.4.- CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS

Las doce cepas de *Trichoderma spp.*, fueron conservadas según la metodología descrita por Castellani (1967), citado por Panizo, (2005), las cuales fueron conservadas por ocho meses en refrigeración a 4° C, luego se sembraron para determinar si existía variabilidad en sus características morfológicas: forma de micelio, color del micelio, tipo de micelio, color de esporas, color del medio, olor y presencia de fiálides, no presentaron variabilidad, confirmando que es un excelente método de conservación para *Trichoderma spp.*, corroborando con la investigación “métodos alternativos en la conservación de *Trichoderma harzianum*” realizada por Dayamí y Yohana (2010), cuyo resultado fue: La viabilidad de la cepa A-34 de *Trichoderma harzianum* conservada en agua destilada estéril a los 12 meses de evaluación fue de un 50%, aunque la cepa patrón fue del 95% de esta manera se garantiza la recuperación del cultivo. Las características morfológicas no mostraron variaciones respecto a la cepa patrón utilizado.

HIPÓTESIS.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la investigación, CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE *Trichoderma spp.*, A NIVEL *in vitro* FRENTE A LOS HONGOS FITOPATÓGENOS *C. pernicioso* y *M. royeri*, y la hipótesis planteada: “Las cepas de *Trichoderma spp.* aisladas del jardín clonal de cacao, ejercen antagonismo a nivel *in vitro* sobre *C. pernicioso* y *M.*

roreri.”; no se rechaza porque dos cepas de *Trichoderma spp.*, tuvieron una aversión fuerte de antagonismo cubriendo por completo al fitopatógeno *C. pernicioso* y seis de las cepas obtuvieron una aversión fuerte de antagonismo cubriendo por completo al fitopatógeno *M. roreri*, de acuerdo a las clases de Bell, Well and Markham (1982), y a las Zonas de Punja y Grogan (1983), citado por Solís (1999).

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES.

- ❖ Del muestreo realizado en el área de clones de cacao de la ESPAM MFL a 20 cm de profundidad, se aislaron en el laboratorio 12 cepas de *Trichoderma spp.*, identificadas cualitativamente de acuerdo a sus características físicas.
- ❖ Las cepas C1, C10, C4, y C9 fueron las más veloces en crecer completando el espacio de la caja petri de 93 mm de diámetro en tres días.
- ❖ Las cepas C4 y C10 de *Trichoderma spp.*, se ubicaron en la Clase 1 y Zona 3, porque cubrieron por completo a *C. pernicioso*, y a la superficie del medio de cultivo, existiendo una aversión fuerte de antagonismo *in vitro*.
- ❖ Las cepas C1, C3, C4, C5, C10, C11, de *Trichoderma spp.*, se ubicaron en la Clase 1 y Zona 3, puesto que cubrieron por completo a *M. roreri*, y a la superficie de medio de cultivo, existiendo una aversión fuerte de antagonismo *in vitro*.

RECOMENDACIONES.

- ❖ Para el aislamiento de cepas de *Trichoderma spp.*, realizar muestreos en la rizósfera del cultivo de cacao debido a que allí es donde se encuentra la mayor población de este hongo.
- ❖ Tomar en cuenta como antagónicos a las cepas C1, C10, C4, y C9 debido a que fueron las cepas más veloces en crecer en los tres días de evaluación.
- ❖ Emplear las cepas C4 y C10 de *Trichoderma spp.*, en liberaciones en campo para evaluar su comportamiento antagónico mediante experimentación frente a *C. pernicioso*.

- ❖ Utilizar las cepas C1, C3, C4, C5, C10, C11, de *Trichoderma spp.*, en liberaciones en campo para evaluar su comportamiento antagónico mediante experimentación frente a *M. royeri*.
- ❖ Emplear las mejores cepas estudiadas del hongo antagonista *Trichoderma spp*, frente a otros fitopatógenos del mismo grupo.
- ❖ Identificar hasta especie mediante biología molecular, a las 12 cepas de *Trichoderma spp.* estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Arazazu, F. 2000. Escoba de bruja en Colombia su impacto económico y el manejo. En: Mejia L. A, Aguello O. eds. Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción de cacao. Bucaramanga, Colombia. Corpoica. p. 85-90.
- Agrios, G.N. 1995. Fitopatología. 2a.ed. México, Uthea. 838p. (en Línea). Consultado, 6 de diciembre de 2011. Formato PDF. Disponible en: <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursos/fitopato/practicass/hongos.html>.
- Baker K.F. y Cook R.J. 1983, The nature and practice of biological control of plant pathogens, The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. p. 375.
- Biocontrol. 2005. *Trichoderma*: fungicida biológico, estimulador de crecimiento en plantas y degrada algunos grupos de pesticidas, Bolo san Isidro, Grano de Oro, Km. 5 Vía Palmira-Candelaria. Palmira. Colombia. (en Línea). Consultado, 15 de diciembre de 2011. Formato PDF. Disponible en gerencia@controlbiologico.com.
- Campbell, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press. Cambridge p. 218.
- Carsolio, C. Benhamou N, Haran S, Cortés C, Gutierrez A, Chet I, Herrera-Estrella A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. Appl Environ Microbiol. p 65:929-935.
- Cervantes A. 2007. Microorganismos del suelo beneficiosos para los cultivos. (En línea). Consultado 5 de enero de 2012. Disponible en: http://infoagro.comhortalizasmicroorganismos_beneficiosos_cultivos.html.
- César E. Falconi S, Yanez V. 2007. "Validación de biopesticidas para el control de la moniliasis y manejo sustentable del cacao fino y de aroma en el Ecuador". Publicación científica. Sangolquí Ecuador. p 38.
- Chet I, Benhamou SH. 1998. Mycoparasitism and lectin enzymes. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman GE, Kubice CP. (Eds.). Volumen 2. p.153-152. Taylor & Francis Ltd., London, UK.
- Dayamí y Yohana, (2010). "Métodos alternativos en la conservación de *Trichoderma harzianum*". Vol 14, núm. 4, p. 241-246. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. La Habana Cuba.
- Dennis L, Webster J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. III Hyphal interaction. Trans Br Mycol Soc. p 57:363-369.

- Elad Y, Chet I, Boyle P, Hennies Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* sp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathol.* p 73:78.
- Esposito, E. y DaSilva M. 1998. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*, Critical review in microbiology p. 24, 89-98.
- Eveleigh DE, Demain AL, Solomon N. 1986. *Trichoderma*. Biology of industrial
- Fernandez, C.; Martinez, G.; Perurena, M; Inait, M.; Valdez, I. 2005. La colección de cultivos de hongos del instituto de medicina tropical "Pedro Kourí": funciones y retos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. Vol. 57 (no 3): p 1-7.
- Fernández LO. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas*; p 62:96-100.
- Hall, I. 1974. Dispersión of pathogens, Ed. In F.G. Maxwell y F.A.Harris. *Proceedings of the Summer Institute on Biological Control of Plant Insects and Diseases*. Univ. Press. Jackson. Mississippi. p. 591, 598.
- Haram S, Schickler HL, Chet I. 1996. Molecular mechanisms of lictin enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*. p 142:2321-2331.
- Harman, GE. 2004. Mythos and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Dis*; p 84:377-393.
- _____. 2001. *Trichoderma* sp., Including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. kamatum* and other sp. Deuteromycetes, moniliales (asexual classification system). (En Línea). Consultado, 25 de abril de 2011. Formato PDF. Disponible en: <http://www.birdhybrids.com/t-22.htm>.
- Hernández, T. R. Ríos y E. Arévalo. 1991. *Enfermedades de cacao*. p. 37-44.
- Herrera, L. y Mayea, S. 1994. *Fitopatología General*, Edición Ventura Publisher-Juana Maria Pérez. Editorial Félix Varela. El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba. p. 290, 291.
- Hjeljord L, Tronsmo A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman GE, Kubice CP. (Eds). Volumen 2. p.131-151. Taylor & Francis.
- Kirsop, B. Doyle, A. 1991. Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of laboratory methods. Segunda edición. San Diego, California. Academic Press Inc. p 308.

- Martínez B, Fernández L, Solano T. 1994. Antagonismo de cepas de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos de la caña de azúcar, tomate y tabaco. *Cultivos Tropicales*. p 15(3):54.
- Marzuly R y Domenico P. 2010. Diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de *Theobroma cacao* L. del estado carabobo, venezuela, y su capacidad biocontroladora sobre *Crinipellis pernicioso* (stahel) Singer. VOL. 35 N° 10. p 789-783.
- Melgarejo, P., De Cal, A., et M. Sagasta, E. 1989. Influence of *Penicillium frequentans* and two of its antibiotics on production of stromata by *Monilinia laxa* in culture, *Can. J. Bot.* 67:83-87. *microorganisms.. Biotech Ser. (Ed). Cap.16: p 489-500.*
- Monzón, A. y Rodríguez, L. s/f. Infecciones causadas por el género *Fusarium*, Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda.
- Panizo, M.; Reviakina, V., Montes, W.; Gonzalez, G. 2005. Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Revista Sociedad Venezolana de Microbiología*. Vol. 25 (no 1): p 35-40.
- Pérez N. 2004. Manejo Ecológico de plagas. CEDAR: La Habana. Cuba. 296 pp.
- Phillips, W. 2006. CATIE en el Taller Regional Andino de Aplicación Tecnológica en el cultivo de caca., Quevedo, Ecuador.
- Rifai, M. 1969. A Revision of the genus *Trichoderma*, Commonwealth Mycological Institute. England.
- Sandoval LI, López M. 2002. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* A-34 hacia *Macrophomina phaseoli* y otros patógenos fúngicos del frijol. *Fitosanidad*. 4 (3-4): p 69 - 72.
- Santander, D. Oliva, R. Solís, K. Gramacho, K. Suárez, C. SF. Caracterización de aislados ecuatorianos de *Crinipellis pernicioso* y *Moniliophthora roreri*, mediante marcadores moleculares microsatelitales. CIP. Quito. INIAP-Pichilingue, Quevedo Ecuador.
- Solís Z. 1999. "Determinación de organismos antagónicos a *Monilia roreri* a partir de mazorcas de cacao dejadas en el suelo". Tesis. Ing. Agrónomo. U.F.C.A. Guayaquil. EC. p 28.
- Stefanova M., Leiva A., Larrinaga L., Coronado M., 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma spp* para el control de hongos fitopatógenos del suelo.
- Ulhoa, C. 1996. Enzimas micolíticas produzidas por agente de biocontrol *Trichoderma harzianum*, V sincobiol Simposio de controle biológico.

Anais: conferencias y palestras.Foz de Iguacu-Parana-Brasil. p.234-238.

Vero SM, Mondino P. 1999. Control biológico postcosecha en Uruguay. Horticultura Internacional. 7:1-10.

Villamil J, Blanco J y Viteri S. 2012. Evaluacion in vitro de microorganismos nativos por su antagonismo contra *Moniliophthora roreri* y *Crinipellis perniciosa*, en cacao (*Theobroma cacao*). Universidad Pedagógica y tecnológica de Colombia. Rev.Fac.Nal.agr. Medellín. (En Línea). Consultado, 20 de febrero de 2013. Formato PDF. Disponible en la web: www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v65n1a02.pdf.

Yáñez V. 2003. Agentes de biocontrol. En: Produccion y formulación de biopesticidas a base de *Pseudomonas cepacia*, *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* spp. Para el control biológico de la *moniliasis* en cacao. Boletín técnico N°. 2, EdiEspe. p 7-8.

ANEXOS

**Anexo 1.- VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE
Trichoderma spp. AISLADAS.**

Crecimiento en mm								
Nº	TRATAMIENTOS	DIA 1					Σ	
		REPLICAS						
		I	II	III	IV			
1	C1	20	20	20	16	76	19	
2	C2	16	16	16	16	64	16	
3	C3	2	4	2	10	18	4.5	
4	C4	18	18	18	18	72	18	
5	C5	2	6	10	6	24	6	
6	C6	10	10	8	10	38	9.5	
7	C7	10	10	12	14	46	11.5	
8	C8	2	4	6	4	16	4	
9	C9	6	6	8	8	28	7	
10	C10	18	18	20	20	76	19	
11	C11	4	18	18	16	56	14	
12	C12	12	5	5	8	30	7.5	

**Anexo 2.- ADEVA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS
DE *Trichoderma spp.*, AISLADAS.**

ADEVA

FV	GL	SC	CM	FC	FT 0.5 %
TRATAMIENTOS	11	1426,67	129.70	16.33	0.0001
ERROR	36	286,00	7.94		
TOTAL	47	1712.,67			
C.V.	24.87%				

**Anexo 3.- VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE
Trichoderma spp. AISLADAS.**

Crecimiento en mm							
Nº	TRATAMIENTOS	DIA 2					
		REPLICAS				Σ	x
		I	II	III	IV		
1	C1	44	48	50	44	186	46,5
2	C2	30	32	32	34	128	32
3	C3	8	36	28	40	112	28
4	C4	42	40	42	40	164	41
5	C5	24	34	30	34	122	30,5
6	C6	32	36	30	30	128	32
7	C7	30	30	34	34	128	32
8	C8	28	36	34	26	124	31
9	C9	54	50	52	52	208	52
10	C10	50	46	52	40	188	47
11	C11	46	42	42	44	174	43,5
12	C12	30	5	5	22	62	15,5

**Anexo 4.- ADEVA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS
DE *Trichoderma spp.* AISLADAS.**

ADEVA

FV	GL	SC	CM	FC	FT 0.5%
TRATAMIENTOS	11	4623.67	420.33	10.82	0.0001
ERROR	36	1398.00	38.83		
TOTAL	47	6021.67			
C.V.	17.35%				

**Anexo 5.- VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE
Trichoderma spp. AISLADAS.**

Crecimiento en mm							
Nº	TRATAMIENTOS	DIA 3					
		REPLICAS				Σ	X
		I	II	III	IV		
1	C1	29	25	23	33	110	27,5
2	C2	42	45	41	43	171	42,75
3	C3	40	34	34	43	151	37,75
4	C4	33	34	33	35	135	33,75
5	C5	64	50	50	45	209	52,25
6	C6	8	10	36	30	84	21
7	C7	34	24	47	16	121	30,25
8	C8	59	49	45	63	216	54
9	C9	31	37	33	33	134	33,5
10	C10	25	29	21	33	108	27
11	C11	43	33	33	33	142	35,5
12	C12	30	10	20	40	100	25

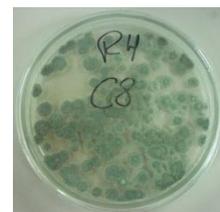
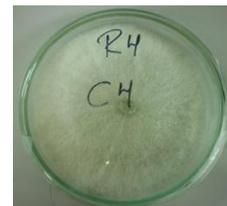
**Anexo 6.- ADEVA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS
DE *Trichoderma spp.* AISLADAS.**

ADEVA

FV	GL	SC	CM	FC	FT 0.5%	FT 0.1%
TRATAMIENTOS	11	4676.2304	425.1118	6.51	3.82	2.63
ERROR	36	2350.7500	65.2986			
TOTAL	47	7026.9804				
C.V.	23.07 %					

FOTOS DEL ENSAYO

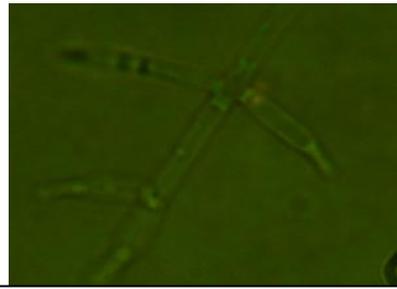
Anexo7.- Aislamiento y selección de las 12 cepas de *Trichoderma* spp.



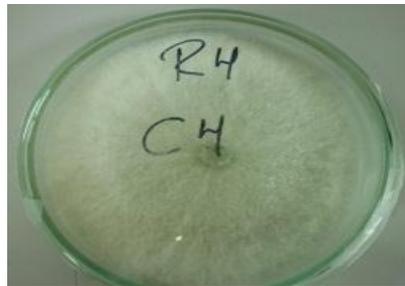
Anexo 8.- Características de las cepas de *Trichoderma spp.* mas veloces.



Cepa 1, a los tres días de crecimiento, coloración de esporas verde y micelio blanco.



Fiálide de la cepa 1 de *Trichoderma spp.*, característica específica de este género



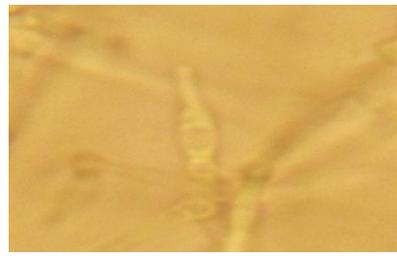
Cepa 4, a los tres días de crecimiento, inicio de esporulación de color verde y micelio blanco.



Fiálide de la cepa 4 de *Trichoderma spp.*, característica específica de este género



Cepa 9, a los tres días de crecimiento, coloración de esporas verde y micelio blanco.



Fiálide de la cepa 9 de *Trichoderma spp.*, característica específica de este género

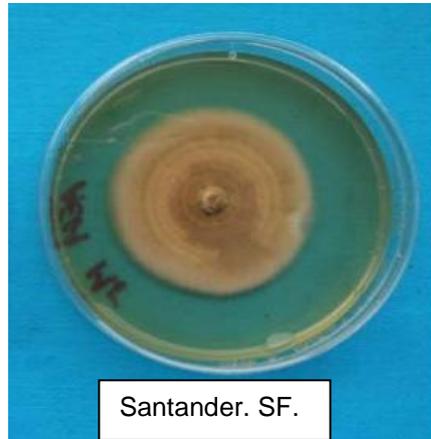


Cepa 10, a los tres días de crecimiento, coloración de esporas verde y micelio blanco.



Fiálide de la cepa 10 de *Trichoderma spp.*, característica específica de este género

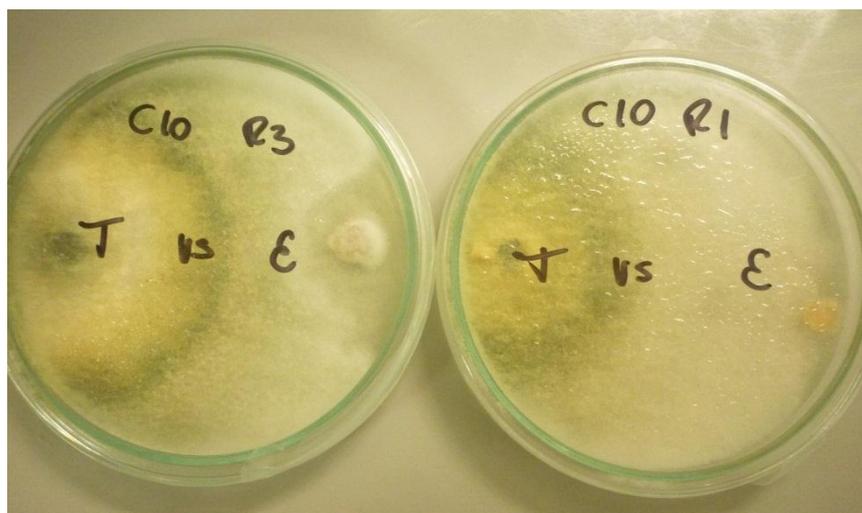
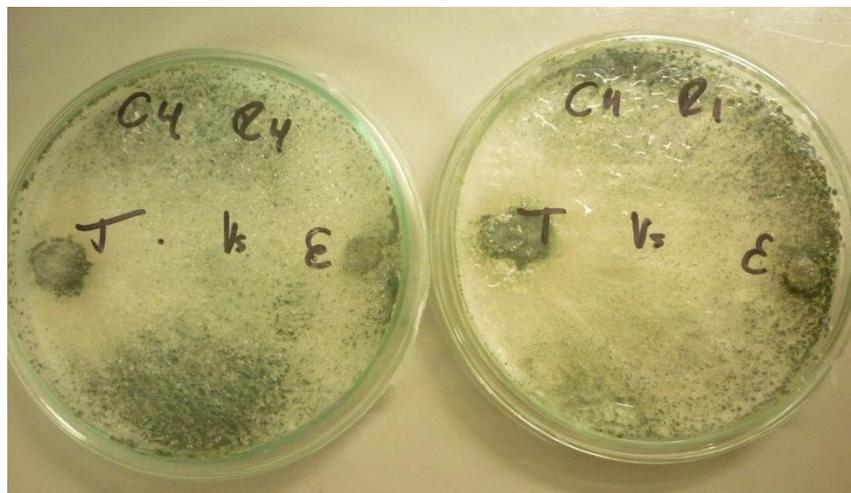
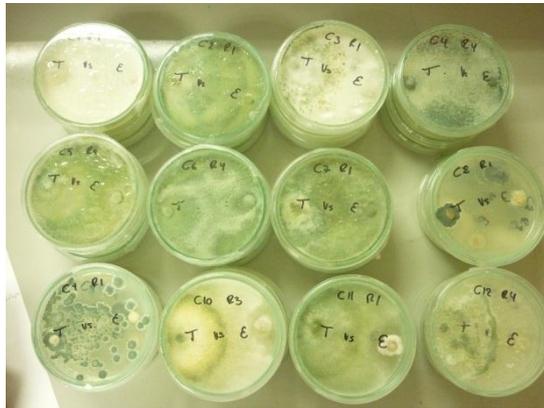
Anexo 9.- Cajas petri con cepa de *Monilophthora roreri*, izquierda fuente, derecha foto del ensayo.



Anexo 10.- Cajas petri con cepas de *Crinipellis pernicioso*, izquierda fuente, y derecha foto del ensayo.



Anexo 11.- Confrontación de las cepas de *Trichoderma* spp., Vs *Crinipellis perniciososa*



Anexo 12.- Confrontación de las cepas de *Trichoderma* spp., Vs *Monilophthora roreri*

