

Evaluación de cepas de *trichoderma* sp. para el control de *phytophthora palmivora* en el cacao.

Evaluation of strains of *Trichoderma* sp. to control *Phytophthora palmivora* in cocoa.

Autores: Ing. José Matías Hernández-Ruí¹, Dr. C. Alberto Fernández-Turro², M Sc. Juana Iris Durand-Cos², Dr. C. Alberto Pérez-Díaz²

Organismo: Instituto Nacional de Sanidad Agropecuaria. Estado Miranda. República Bolivariana de Venezuela¹. Facultad Agroforestal de Montaña. Universidad de Guantánamo, Cuba².

E-mail: jmatiash@hotmail.com, afturro@fam.cug.co.cu, juana@fam.cug.co.cu, aperez@fam.cug.co.cu

Resumen.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas del estado Miranda, y en las comunidades cacaoteras de los municipios Andrés Bello y Acevedo con el objetivo de evaluar la efectividad de control de diferentes cepas de *Trichoderma* sp. sobre *Phytophthora palmivora* a partir de diferentes mezclas de compost. Se determinaron los niveles de presencia de este patógeno, se evaluó la capacidad del compost para el aislamiento de diferentes cepas de *T. sp.* y se determinó la efectividad de control del entomopatógeno sobre *P. palmivora*. Se encontraron diferencias en la presencia de las enfermedades entre las localidades de estudio. Se determinó que en las mezclas de compost con mayor porcentaje de cáscara de cacao el número de colonias de *Trichoderma* sp. Fue superior. Se obtuvo que la cepa 9, 10 y *T. longibrachiatum* (Cepa 17) obtuvieron los mayores índices de efectividad sobre el patógeno.

Palabras clave: *Trichoderma*; *Phytophthora palmivora*; cacao.

Abstract.

The research was conducted at the Laboratory of Plant Pathology of the National Agricultural Research Institute of Miranda state, and cocoa communities of Acevedo and Andrés Bello municipalities, in order to evaluate the effectiveness of different control strains of *Trichoderma* sp. on *Phytophthora palmivora* from different mixtures of compost. Levels were determined in the presence of the pathogen, was assessed the capacity of the compost to the isolation of different strains of *T. sp.* and determined the effectiveness of control on *P. palmivora*. Differences were found in the presence of disease among study sites. It was determined that in mixtures with a higher percentage of compost cocoa shell number of *Trichoderma* sp. was high. Also obtained the strain 9, strain 10 and *T. longibrachiatum* (Strain 17) had the highest levels of effectiveness on the pathogen.

Keywords: *Trichoderma*; *Phytophthora palmivora*; cocoa.

Introducción.

En Venezuela, según Parra *et al.* (2009) las enfermedades causadas por las especies del género *Phytophthora*, son la principal causa de pérdidas de mazorcas, plantas en el campo y plántulas bajo condiciones de vivero, pudiendo provocar pudrición de raíces, muerte de injertos y manchas foliares.

En este sentido, es necesario incorporar prácticas de manejo contra plagas y enfermedades del cacao que posibiliten la disminución de aplicación de productos químicos protectores y fungicidas sistémicos, debido a sus altos costos y los riesgos asociados con la contaminación de las almendras y daños medioambientales (Meinhardt *et al.* 2008).

El antagonista *Trichoderma* spp. ha mostrado una gran capacidad controladora de diversos patógenos en una amplia gama de especies vegetales cultivadas, tanto bajo condiciones de laboratorio como en condiciones de campo.

Sin embargo, las potencialidades de este microorganismo antagonista del suelo específicamente las especies de aislamiento local, no han sido aprovechadas eficientemente como herramienta a incorporar en el manejo agronómico del cultivo en las regiones de estudio. Por lo que el objetivo de este trabajo es evaluar la efectividad de *Trichoderma*. Spp de aislamiento local en el control de *Phytophthora palmivora* en condiciones de laboratorio apoyados en estudios bioecológicos.

Desarrollo.

Materiales y Métodos

La investigación se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas del estado Miranda (INIA Miranda) , ubicado en la localidad de Tapipa, municipio Acevedo del estado bolivariano de Miranda y en las comunidades productoras de cacao de los municipios Andrés Bello (comunidad Los Galpones, asentamiento Manatí- San Cristóbal) y Acevedo (las comunidades: Tapipa y Merecure).

Se realizaron los siguientes estudios:

- Determinación de los niveles de presencia de *Phytophthora palmivora* en el estado Miranda

Para los niveles de presencia de la enfermedad se seleccionaron dos productores por zona con al menos una hectárea (1ha) de superficie sembrada.

Para cada predio se realizaron muestreos sistemáticos utilizando la metodología recomendada por Protección de Plantas (2003), donde se determinaron los niveles de presencia de las enfermedades cáncer de tronco y pudrición parda de las mazorcas, causadas por el patógeno, para ello se evaluaron 20 plantas y 100 frutos por cada productor.

- Aislamiento de cepas de *Trichoderma* sp. de los compost elaborados a partir de diferentes mezclas de fuentes de materia orgánica.

Para el estudio se conformaron siete tratamientos tal como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Conformación de las mezclas de materiales orgánicos utilizados.

Mezclas	Cáscaras de cacao (m ³)	Hojas secas de cacao (m ³)	Estiércol bovino (m ³)	Hojas de Árnica (m ³)	Seudo tallos de musáceas (m ³)	Hojas de <i>G. sepium</i> (m ³)	Urea (m ³)	Cal (m ³)
1	1,12							
2	0,84		0,28					
3	0,56	0,28	0,28					
4	0,56	0,28	0,14	0,14				
5	0,56	0,21	0,07		0,14	0,14		
6	0,84	0,14		0,14			0,14	
7	1,12							0,28

Las siete mezclas fueron colocadas en contenedores de un metro cúbico (1m³) de capacidad construidos con rolas de Urape (*Bauhinia* sp.) y Bambú (*Bambusa vulgaris*). Los componentes de la mezcla se fraccionaron manualmente con la ayuda de machetes hasta obtener trozos de 5-10cm de diámetro aproximadamente.

Se realizaron muestreos semanales donde se extrajeron cinco submuestras de cada compostero para formar una muestra compuesta de 1kg. La evaluación de las muestras se realizó según el Manual de Métodos de Micología de INIA (2006).

Se determinó la riqueza micológica de siete mezclas de diferentes fuentes de materia orgánica, número de colonias en el tiempo y número totales de colonias de *Trichoderma* sp por mezcla.

- Evaluación de la efectividad de control de cepas de *Trichoderma* sp. sobre *Phytophthora palmivora*, aislada de diferentes fuentes de materia orgánica.

El aislamiento de *P. palmivora* fue obtenida a partir de frutos recolectados con síntomas de pudrición parda y procesados según lo establecido en el Manual de Métodos de Micología de INIA (2006) y las siete cepas de aislamientos de *T. sp.* fueron obtenidas de los muestreos de los compost realizados.

Se extrajeron muestras de la zona de avance de la enfermedad en los frutos colectados, posteriormente desinfectadas y sembradas en cinco puntos equidistantes en cápsulas de Petri con agar zanahoria (AZ); las colonias obtenidas se purificaron e incubaron durante 10 días hasta el inicio de la prueba de confrontación, para comprobar la efectividad de las secciones y cepas de *Trichoderma* sp. sobre el control de *P. palmivora*.

Se conformaron siete tratamientos mediante la combinación de las cepas escogidas por cada sección contra la cepa del patógeno.

TRATAMIENTOS			
Tratamientos	Sección (Según Bissett,1991)	Cepas Antagonista	Cepas Patógeno
1	<i>Longibrachiatum</i>	T ₁	<i>P. palmivora</i>
2	<i>Pachybasium</i>	T ₃	<i>P. palmivora</i>
3	<i>Trichoderma</i>	T ₉	<i>P. palmivora</i>

4	<i>Hypocreanum</i>	T ₁₀	<i>P. palmivora</i>
5	<i>Longibrachiatum</i>	T ₁₇	<i>P. palmivora</i>
6	<i>Pachybasium</i>	T ₁₈	<i>P. palmivora</i>
7	<i>Trichoderma</i>	T ₂₅	<i>P. palmivora</i>

Resultados y discusión

Determinación de los niveles de presencia de la enfermedad *Phytophthora palmivora* en el estado Miranda.

Índice de presencia de plantas con cáncer de tronco *P. palmivora* por finca.

La Figura 1 muestra los índices de presencia de cáncer de tronco en cada una de las fincas, donde las fincas 1 y 3 presentaron los mayores índices, existiendo diferencias significativas para 0,05%.

El cáncer de tronco es una de las enfermedades más frecuentes en las plantaciones cacaoteras y está en correspondencia con las condiciones climáticas de cada lugar. Los promedios de humedad relativa para la zona se comporta entre el 78,6 y 89,9% con picos de hasta 92,7% en el mes de diciembre, favoreciendo el desarrollo del hongo, a lo que se asocia una temperatura media de 27,7°C.



*Medias con letras iguales no difieren entre sí para Duncan ($p \leq 0,5$). ESx: 0,1057

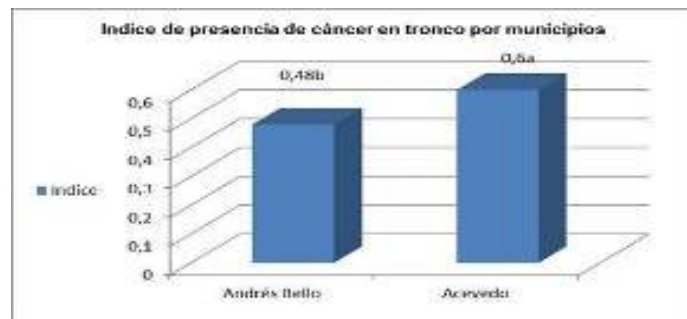
Figura 1. Índice de presencia de plantas con cáncer de tronco producido por *P. palmivora*.

Agrega Moreno (2004) que el cáncer de tronco aunque es una enfermedad de poca ocurrencia en el país; su incidencia pareciera estar asociada a inundaciones de las zonas donde se ha presentado.

Reyes *et al.* (2000), reporta que en Venezuela las zonas más afectadas por este patógeno, se encuentran en Barlovento, donde las pérdidas se ubican alrededor de 20%, debido a las frecuentes lluvias e inundaciones que se suceden, a la carencia de drenajes funcionales, al sombrío excesivo y a un manejo deficiente de las plantaciones.

Índice de presencia de plantas con cáncer de tronco *P. palmivora* por municipio

Para el índice de presencia de plantas con cáncer de tronco por municipios (Figura 2) se observa que el municipio Acevedo presenta los mayores índices de presencia de plantas con cáncer de tronco.



*Medias con letras iguales no difieren entre sí para $p \leq 0,5$. ESx: 0,0798

Figura 2. Índice de presencia de plantas con cáncer de tronco *P. palmivora* por municipio.

A pesar de que ambos municipios son altamente productores de cacao (Andrés Bello: 749,521 Kg. y Acevedo: 3.583,367 kg.), el municipio Acevedo es uno de los que mayor concentración de productores, superficie sembrada y producción más alta del estado de acuerdo con lo reportado por el Censo Agrícola 2007-2008.

Índice de presencia de pudrición parda en frutos por finca.

Como se aprecia en la Figura 3, las fincas con mayor presencia de pudrición parda en los frutos, es la finca 1 y la finca 2; ambas del municipio Andrés Bello, con un índice de 0,28 y 0,21 respectivamente.

Este comportamiento puede ser atribuido a la existencia de una gran variabilidad del hospedero en cuanto a la reacción de resistencia al patógeno, no encontrándose en la actualidad ningún clon reportado como 100% resistente a esta enfermedad. Por otro lado, Reyes *et al.* (2000), Moreno (2004) y Evans (2007), informan que son condiciones predisponentes para el desarrollo de la enfermedad las temperaturas entre 18 a 20°C, un nivel de humedad relativa cercana a la saturación, es decir, por encima de 80%, incidiendo también las lluvias intensas y frecuentes.



*Medias con letras iguales no difieren entre sí para Duncan ($p \leq 0,5$).

Figura 3. Índice de presencia de pudrición parda en frutos por finca. ESx: 0,03738

Índice de presencia de pudrición parda *P. palmivora* en frutos por municipios.

El índice de pudrición parda en frutos por municipio donde se observó que el municipio Andrés Bello presenta el mayor valor con 0,245 de presencia (24,5%) existiendo diferencias significativas con respecto al municipio Acevedo con 0,05 de índice de presencia (Figura 4).

Este resultado se corresponde con lo analizado, donde las fincas con mayor presencia en frutos se localizaron en este municipio. Al respecto, Guest (2007) considera que este patógeno causa pérdidas de mazorcas entre 20 y 30 % por afectaciones de las mazorcas y la muerte de más del 10% de las plantas de cacao por el cáncer de tronco.



Medias con letras iguales no difieren entre sí para Duncan ($p \leq 0,5$). ESx: 0,037

Figura 4. Índice de presencia de pudrición parda *P. palmivora* en frutos por municipios.

Aislamiento de cepas de *Trichoderma sp.* de los compost elaborados a partir de diferentes mezclas de fuentes de materia orgánica.

Número totales de colonias de *trichoderma* por mezcla.

La tabla 3 muestra el número de colonias de *Trichoderma sp.*, donde se observó que en los tratamientos (mezclas) 1, 3, 4, 5, 6 y 7 se alcanzaron los mayores números de colonias de este antagonista, no existiendo diferencias entre ellos. Solo el tratamiento donde se utilizó el estiércol bovino difirió del resto (Tratamiento 2); lo cual puede estar dado por el contenido elevado de celulosa de la cáscara del fruto, que puede ser descompuesta por este hongo celulolítico.

Así mismo, parece ser que el estiércol vacuno durante su proceso de descomposición genera sustancias que afectan negativamente la germinación de las esporas de las diferentes especies de hongos. Esta situación se debe considerar al seleccionar el sustrato que se utiliza en la reproducción masiva de *Trichoderma* (Fernández-Larrea, 2004).

Tabla 3. Número totales de colonias de *Trichoderma* por mezcla.

Tratamientos (mezcla)	Número de colonias (U)
T1 (1,12 m ³ de Cáscara de cacao)	11,398ab
T2 (0,84 m ³ Cáscara cacao + 0,28 m ³ estiércol bovino)	10,095b
T3 (0,56 m ³ de Cáscara cacao + 0,28 m ³ estiércol bovino + 0,28 m ³ hojas cacao secas)	11,749ab

T4 (0,56 m ³ Cáscara cacao + 0,28 m ³ hojas cacao secas + 0,14 m ³ estiércol bovino + 0,14 m ³ hojas Árnica)	12,392a
T5 (0,56 m ³ Cáscara cacao + 0,21 m ³ hojas cacao secas + 0,07m ³ estiércol bovino + 0,14 m ³ pseudotallo musáceas + 0,14 m ³ hojas matarratón)	12,625a
T6 (0,84 m ³ Cáscara cacao + 0,14 m ³ hojas cacao secas + 0,14 m ³ hojas Arnica + 0,14 m ³ urea)	11,64ab
T7 (1,12 m ³ Cáscara de cacao+0,28 m ³ de cal)	12,160a
ESx	0,5988

*Medias con letras iguales no difieren entre sí para Duncan ($p \leq 0,5$).

La composición de géneros de hongos parece ser influenciada por los compuestos químicos del material orgánico usado para preparar el compost. La preparación con sustancias lignocelulósicas, tales como corteza de árboles son colonizados principalmente por *Trichoderma* (Hoitink, 2001).

Evaluación de la efectividad de control de cepas de *Trichoderma sp* sobre *Phytophthora palmivora*, aislada de diferentes mezclas de compost

Diámetro de las colonias según tratamiento (Crecimiento en medio PDA)

Los mayores diámetros de las colonias se obtuvieron con el empleo de la cepa C18 (*Pachybasium*) a los 96 días, seguidas de las cepas C17 (*Longibrachiatum*), C10 (*Hypocreanum*) y C9 (*Trichoderma*) en igual tiempo, existiendo diferencias significativas entre los mismos para un nivel de significación de 0,05%, tal como se muestra en la tabla 4

Lo anterior demuestra, que a las 96 horas las diferentes cepas alcanzaron los mayores valores para el diámetro. En ambos casos se demuestra que el hongo patógeno dejó de crecer, mientras el antagonista continuaba creciendo hasta invadir totalmente la superficie de la colonia del hongo patógeno, lo que puede constituir una manifestación de los procesos de micoparasitismo.

Tabla 4. Diámetro de las colonias según tratamiento (72 y 96 horas).

Tratamientos		Diámetro de las colonias (mm)
Sección/ cepa	Tiempo (Horas)	
Longibrachiatum C1	72	3,125h
Pachybasium C3		3,05ih
Trichoderma C9		3,2375h
Hypocreanum C10		4,1g
Longibrachiatum C17		2,8875i
Pachybasium C18		4,8375f
Trichoderma C25		2,1375j
Longibrachiatum C1	96	6,225d
Pachybasium C3		5,375e
Trichoderma C9		8,0875b
Hypocreanum C10		8,175b
Longibrachiatum C17		8,2125b
Pachybasium C18		8,525a
Trichoderma C25		7,725c
ESx		0,0752476

*Medias con letras iguales no difieren entre sí para Duncan ($p \leq 0,5$).

Por otro lado, la actividad antagonica de *Trichoderma* depende del patógeno a controlar. Aspectos que han sido demostrados por Folgueras Mariluz *et al.* (2008) sobre Antibiosis “*in vitro*” entre el antagonista *Trichoderma* spp y organismos patógenos causantes de pudriciones radicales en yuca, donde se demostró que a partir de las 48 horas de incubación, el aislamiento de *Trichoderma* empleado produjo un porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de los patógenos en estudio superior al 28%, cuya capacidad antagonica se mantuvo en ascenso.

Índice de efectividad media de las cepas de *Trichoderma* y el tiempo sobre *Phytophthora palmivora*.

En el análisis estadístico realizado a estas variables no se encontraron interacciones entre los factores en estudio, por lo que se analizaron los efectos de los mismos por separado.

La tabla 6 muestra el efecto de las diferentes cepas de *Trichoderma* sobre *Phytophthora palmivora*, donde se observó que las cepas C9 (*Trichoderma*), C10 (*Hypocreanum*) y C17 (*Longibrachiatum*) tuvieron un mayor control sobre el fitopatógeno con valores de 1,076; 0,87 y 1,125 respectivamente, no existiendo diferencias entre ellos para un 0,05% de significación.

Por otro lado, las cepas C9 y C10 no difirieron significativamente de la cepa C17.

Tabla 6. Índice de efectividad media de las cepas de *Trichoderma* y el tiempo sobre *Phytophthora*.

Tratamientos	Índice de efectividad media de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Phytophthora palmivora</i>
Selección/Cepa	
<i>Longibrachiatum</i> (Cepa 1)	0,44c
<i>Trichoderma</i> (Cepa 9)	1,07ba
<i>Hypocreanum</i> (Cepa 10)	0,88ba
<i>Longibrachiatum</i> (Cepa 17)	1,13a
<i>Pachybasium</i> (Cepa 18)	0,81b
ESx	0,106
Tiempo	
48 horas	0,69 b
72 horas	0,95 a
96 horas	0,95 a
ESx	0,094

*Medias con letras iguales no difieren entre sí para Duncan ($p \leq 0,5$).

Con respecto al tiempo, los mayores índices se alcanzaron a las 72 y 96 horas con valores de 0,95 para ambos casos, difiriendo estadísticamente con el índice alcanzado a las 48 horas.

Las cinco cepas de antagonistas aislados presentaron diferente nivel de inhibición del *P. palmivora*. En la investigación todos los antagonistas fueron aislados de los compost elaborados. Las cepas de 9,10 y 17 fueron las más efectivas para inhibir el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos.

Es importante mencionar que en la mayoría de los tratamientos el índice de efectividad media de *Trichoderma sp* es alto, lo que significa un mayor número de cepas que pueden ser utilizadas en el control de fitopatógeno.

Conclusiones.

Con respecto a la presencia de la enfermedad en campo se obtuvo que los mayores índices de cáncer de tronco se encontraron en el municipio Acevedo, mientras que para la pudrición parda en frutos los mayores índices se alcanzaron en el municipio Andrés Bello.

1. Estudios de caracterización micológica demostraron que en las mezclas de compost existe una riqueza micológica considerable donde *Trichoderma sp* presentó un mayor número de colonias en las mezclas donde el porcentaje de cáscara de cacao fue superior.
2. Durante la prueba de confrontación se obtuvo que las secciones *Trichoderma* (Cepa 9), *Hypocreanum* (Cepa 10) y *Longibrachiatum* (Cepa 17) obtuvieron los mayores índices de efectividad sobre el patógeno, posibilitando su uso en el futuro manejo de *Phytophthora palmivora*.

Bibliografía.

- Agrícolas., I. N. d. I. (2006). *Manual de métodos de micología*.
- Evans, H. C. (2007). Cacao diseases-The trilogy revisited. *Phytopathology*, 97, 1640-1643.
- Folgueras, M., Herrera, Lidcay, Rodriguez S. y Rojas Xiomara. (2008). Antibiosis "In vitro" entre el antagonista *Trichoderma spp.* Y organismos patógenos causantes de pudriciones radiculares en yuca (*Manihot esculenta Crantz*). *Centro Agrícola*, 35(2), 51-53.
- Guest, D. (2007). Black pod: Diverse pathogens with a global impact on cocoa yield. *Phytopathology* 97, 1650-1653.
- Meinhardt, L. W., J. Rincones, B. A. Bailey, M. C. Aime, G. W. Griffith, D., Zhang. (2008) Pereira. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? *Molecular Plant Pathology*, 577-588.
- M., F., L.O., S. (2004). Taller Latinoamericano: Biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* y otros antagonistas. *FITOSANIDAD*, 10(2), 81.
- Moreno, Z., M. E. (2004). *El cultivo del cacao en Venezuela*.
- Parra, D. P., M., S.; Sosa, D.; Rumbos, R.; Gutiérrez, B.; Moya, A. . (2009). Avances en las investigaciones venezolanas sobre enfermedades del cacao. *Estudios Transdisciplinarios*, 1(2), 56-75.
- Reyes, H. y. C., L. (2000.). El Cacao en Venezuela. Moderna Tecnología para su cultivo. Chocolates el Rey. Disponible en <http://es.scribd.com/doc/23271157/Cacao-REYES>
- Turquino-Manatí., C. N. P. (2003). *Protección de Plantas Manual Técnico para las Actividades Agropecuarias y Forestales en las Montañas*.
- Tierras., M. d. A. y. (2008). VII Censo Agrícola.

Fecha de recibido: 17 abr. 2013
Fecha de aprobado: 19 jun. 2013