

**Identificación de Colletotrichum y Xylaria aislados de hojas de cacao en Cuba.  
Identification of Colletotrichum and Xylaria isolated from cocoa leaves in Cuba.**

**Autores:** Lic. Noryaysi Abreu-Romero<sup>1</sup>, Yurelkys Fernández-Maura<sup>2</sup> MSc. Amauri Díaz-Rodríguez<sup>1</sup>, MSc. Irladis Urgellés-Cardoza<sup>1</sup>, Lic. Arleis Abreu-Romero<sup>1</sup>.

**Organismo:** <sup>1</sup>Centro de Desarrollo de la Montaña. Limonar de Monte Ruz, El Salvador, Guantánamo, <sup>2</sup>Universidad de Guantánamo. Avenida Che Guevara km 1.5 Carretera Jamaica, Guantánamo, Cuba.

**E-mail:** noryaisi@cdm.gtmo.inf.cu

**Resumen.**

Las plantaciones de cacao en Cuba son afectadas por la podredumbre oscura de la mazorca, enfermedad causada por varias especies de *Phytophthora*. Actualmente los hongos endófitos aparecen como una alternativa importante para el control de esta enfermedad. Este estudio se realizó con el objetivo de identificar cepas de hongos endófitos pertenecientes al género *Xylaria* y *Colletotrichum* presentes en plantas de cacao que pudiesen ser utilizados en el manejo integrado de esta enfermedad. Los hongos endófitos fueron aislados de hojas aparentemente sanas de *Theobroma cacao* durante colectas en Baracoa. Para los aislamientos se utilizó el método de triple esterilización. Fueron seleccionados los aislados para la identificación taxonómica por los caracteres morfológicos y se encontraron como especies más comunes *Colletotrichum gloesporioides* seguida por *Xylaria* spp. Se requieren futuros estudios para seleccionar entre estas cepas las que poseen potencialidades como agentes de control biológico de *Phytophthora palmivora*, agente causal de la podredumbre oscura en Cuba.

**Palabras claves:** hongos endófitos, *Theobroma cacao*, *Phytophthora*

**Abstract.**

Cocoa plantations in Cuba are affected by the dark rot of the cob, a disease caused by several *Phytophthora* species. Currently, endophytes fungi appear as an important alternative for the control of this disease. This study was carried out with the objective of identifying strains of endophytes fungi belonging to the *Xylaria* and *Colletotrichum* gender present in cocoa plants that could be used in the integrated management of this disease. The endophytes fungi were isolated from apparently healthy leaves of *Theobroma cacao* during collections in Baracoa. The triple sterilization method was used for the insulation. Isolates were selected for taxonomic identification by morphological characters and found as more common species *Colletotrichum gloesporioides* followed by *Xylaria* spp. Future studies are required to select among these strains those that possess potentials as biological control agents of *Phytophthora Palmivora*, a causative agent of dark rot in Cuba.

**Keywords:** Endophyte fungus, *Theobroma cacao*, *Phytophthora*

## Introducción

Los endófitos bacterianos y fúngicos tienen varios mecanismos de acción que incluyen la competencia directa por el espacio y los nutrientes, la antibiosis, el micoparasitismo, la resistencia sistémica inducida y la promoción del crecimiento, funciones que forman parte de las estrategias para una gestión eficaz y sostenible de la pod pod helada (Vera et al., 2018). Estudios recientes brindan evidencias de que los hongos endófitos juegan un rol importante en las interacciones planta-patógeno.

Se han estudiado diversos mecanismos mediante los cuales los endófitos pueden neutralizar el desarrollo del patógeno, entre ellos la producción de antibióticos que inhiben el crecimiento del patógeno (Herre et al. 2007), inducen mecanismos de defensa que pueden reducir el impacto del ataque de patógenos (Mejía et al., 2014), competencia por espacio y recursos y actúan como micoparásitos (Wang et al. 2013; West et al. 1988). Estudios realizados para evaluar el potencial biocontrolador de hongos endófitos frente a la Podredumbre oscura en T. cacao mostraron un decrecimiento en la severidad de la enfermedad (Hanada et al., 2009).

La mayoría de los estudios conciernen a América del Sur y América Central y fueron realizados para buscar el efecto bio-controlador de los hongos endófitos frente a la Podredumbre parda de la mazorca (*Phytophthora* sp) y la Escoba de bruja (Amin et al., 2014), teniendo todos como resultado la selección de cepas de *Trichoderma* (Mbarga et al., 2014; Sriwati et al., 2015). Esta selección incluye *Trichoderma asperellum* para el control de la Podredumbre parda causada por *P. megakarya* en África. (Mbarga et al., 2014).

La búsqueda de microorganismos antagonistas para el control biológico de patógenos en cultivos de importancia económica ha despertado especial interés debido a sus potencialidades y a la gravedad de los impactos ecológicos causados por la constante y creciente aplicación de agroquímicos en los agroecosistemas (Acebo et al., 2012). Es momento de profundizar en la investigación sobre la biología y ecología de estos organismos antagonistas y, en segundo lugar, encontrar mecanismos para mejorar la difusión y adopción de esta tecnología (Salazar et al., 2014).

En Cuba se desarrolla un programa de rehabilitación del sector productivo cacaotero liderado por el Ministerio de la Agricultura. Este programa tiene como objetivo fortalecer la cadena de producción del cacao para obtener la certificación de la Denominación de origen. Las acciones que forman parte de este programa y que contribuyen al desarrollo sostenible del cacao, requieren de un control racional e integrado de los patógenos que afectan la productividad teniendo en cuenta nuestro contexto económico y medioambiental.

Las plantaciones de cacao en Cuba ubicadas en la región oriental son afectadas por la Podredumbre oscura de la mazorca, enfermedad causada por varias especies de *Phytophthora*. Actualmente son empleadas diferentes formas de protección a este cultivo que reducen el impacto de esta enfermedad, tales como las técnicas culturales (poda de los árboles, eliminación de las mazorcas enfermas, manejo de la sombra) y el uso de pesticidas.

En este contexto, los métodos de control biológico emergen como una alternativa importante, menos agresiva al agroecosistema cacaotero y especialmente frente a nuestras limitaciones económicas. En esta clase de manejo integrado ha de tener también cabida el control biológico. Particularmente, el uso de hongos endófitos, (Martínez, et al., 2016) tiene un futuro prometedor tanto por los resultados que proporciona (Bailey and Gilligan, 1997) como por la inocuidad en el ecosistema en que se emplee.

En los efectos directos los endófitos suprimen directamente al patógeno mediante la producción de antibióticos (Richardson et al., 2014) o la secreción de enzimas líticas (Vinale et al., 2008). Por otro lado, los efectos indirectos que los endófitos provocan en las plantas ayudando a reducir el daño del patógeno pueden ser, por ejemplo, la inducción de la resistencia a la planta, la estimulación de producción de metabolitos y el incremento del crecimiento y de la actividad fisiológica. Por último, ejemplos de los efectos ecológicos son la ocupación de un nicho ecológico, el hiperparasitismo y la depredación (Gao et al., 2010).

### **Materiales y métodos.**

El experimento se realizó en áreas pertenecientes a la Estación de Investigaciones de Cacao Baracoa y de la Empresa Agroforestal de cacao, de la Provincia de Guantánamo.

#### **Colecta**

Las hojas de cacao fueron obtenidas de 6 plantaciones de *T. cacao* en Baracoa, Cuba. Se seleccionaron hojas aparentemente sanas, sin daños visibles por herbívoros o patógenos (Arnold et al., 2003). Fueron mantenidas a 4°C y transportadas al Laboratorio de Microbiología del Centro para el Desarrollo de la Montaña en Guantánamo, Cuba.

#### **Aislamiento de hongos endófitos.**

##### **Método de Triple esterilización**

Las hojas colectadas de diversas plantaciones cacaoteras fueron lavadas, secadas y cortadas en piezas de 2 cm<sup>2</sup>. Las piezas de las hojas fueron esterilizadas utilizando los siguientes agentes: 95% etanol durante 30 s, 3% hipoclorito de sodio durante 10 min. y 75% etanol durante 2 min. Luego fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril y secadas con papel estéril (Ishak et al. 2004). Las hojas tratadas fueron cortadas en discos de Ø 5 mm usando un bisturí estéril. Fueron colocados 5 discos de cada hoja de cacao en una placa Petri con 2% de agar extracto de malta (MEA). Las placas fueron selladas inmediatamente con parafilm e incubadas a una temperatura de 25-30°C, bajo un ciclo 12h12h luz/oscuridad para inducir la producción de esporas, durante un período de 3 a 15 días, con tubos luz fluorescente (40W) ubicados a una distancia de 60cm sobre las placas. La incubación se detuvo ante el crecimiento de la hifa mayor de 5 mm de longitud; en ninguno de los casos excedió las dos semanas. Un fragmento de la hifa de 5 mm de longitud fue cortado y transferido a nuevas placas Petri conteniendo medio PDA. Estas muestras fueron incubadas a 30°C.

#### **Identificación taxonómica.**

Se observaron varios caracteres morfológicos de las cepas (micelio, esporangio, esporas) con un microscopio Olympus BX50. Se tomaron fotografías de las estructuras fúngicas. El crecimiento del micelio se observó en placa Petri para cada individuo.

### **Resultados y discusión.**

#### **Aislamiento y caracterización de hongos endófitos**

Un total de 300 hongos endófitos cultivables fueron aislados de hojas sanas de cacao durante el estudio. Luego de la caracterización morfológica se escogieron aquellos cuyas características morfológicas coincidieron con los géneros de interés: *Colletotrichum gloesporioides* (Figuras 2 y 3) y *Xylaria sp.*

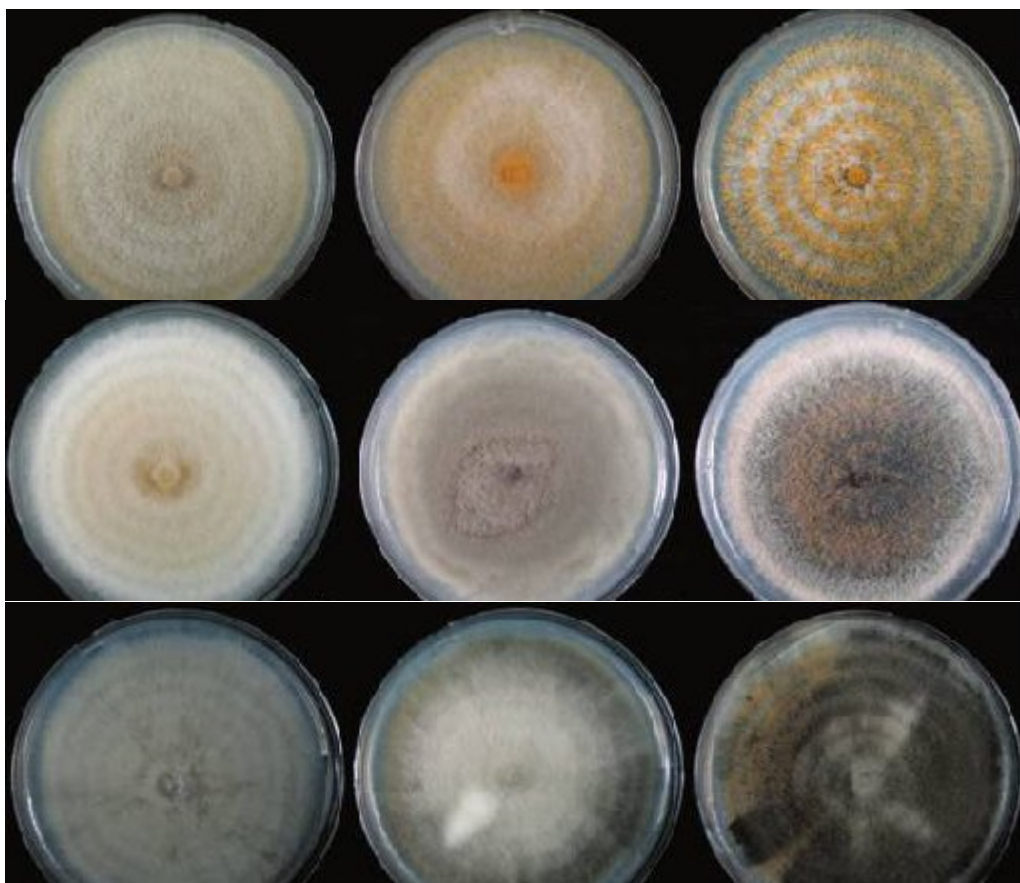


Figura 1. Colonias de *Colletotrichum gloeosporoides* creciendo en PDA a 30°C.



Figura 2. Conidias de *Colletotrichum* spp. Observadas en el análisis microscópico. Aumento 40X

Existe una gran diversidad de microorganismos endofíticos en las plantas tropicales (Strobel, 2003), incluyendo cacao (Crozier et al., 2006). La causa de la existencia de esta alta diversidad de endófitos podría ser las características del sistema agroforestal existente en las plantaciones, donde se encuentra una variedad de especies de plantas asociadas al cacao, tales como cítricos, cocoteros, plátano y forestales (Redman et al. 2001; Flores 2017 ). Diferentes autores como Rubini et al. (2005), Hanada et al. (2010) y Gupta et al. (2014) han logrado identificar microorganismos endófitos con múltiples capacidades hacia la planta y contra los distintos patógenos que afectan al cacao.

La presencia de *Colletotrichum* y *Xylaria* como géneros predominantes es consistente con previos estudios que reportan a *Colletotrichum*, *Fusarium* y *Xylaria* como los tres géneros más frecuentes encontrados en colectas de endófitos en cacao en América del Sur y Centroamérica

(Strobel & Daisy, 2003). Estos reportes muestran a *Colletotrichum tropicale* como la especie dominante aislada de hojas sanas de cacao; las especies de *Xylaria* son los endófitos más comunes aislados en las regiones tropicales (Rodríguez et al., 2009).

La comunidad de hongos endófitos del cacao está siendo estudiada para fines de control biológico de patógenos de plantas y la producción de compuestos con propiedades farmacológicas. Las especies de *Trichoderma* están entre las mejor conocidas y más prometedoras como agentes de control biológico. Muchas especies de *Trichoderma*, como *T. stromaticum*, *T. koningiopsis*, *T. theobromicola*, *T. paucisporum*, *T. evansii* y *T. asperellum*, (Samuels et al., 2006) fueron encontradas como endófitos en cacao. Varias de estas especies muestran actividad antagónica frente a patógenos del cacao. El endófito *Trichoderma ovalisporum* fue utilizado en el control de la enfermedad frosty pod rot en cacao, causada por *Moniliophthora roreri* (Crozier et al., 2015).

Otras especies como *Trichoderma martiale* controla el avance de la podredumbre oscura de la mazorca (Hanada et al., 2009). Para el caso del endófito *C. globosum*, el principal mecanismo de acción es la micostática, mejor conocido como efecto fungistático, que consiste en inhibir hongos endófitos para su uso en el biocontrol de enfermedades forestales, el crecimiento de otros hongos, pero sin provocar la muerte del antagonista (Rolando et al., 2013). Las dos especies de *Trichoderma* son los hongos endófitos que tiene mejor efecto sobre *F. circinatum*, *G. abietina* (Romeralo et al., 2015).

Por lo tanto, resulta pertinente realizar estudios previos que permitan conocer e identificar agentes de control biológico. En este sentido, la propuesta es dar organizadamente el primer paso para el aislamiento, identificación, multiplicación y el enfrentamiento in vitro de los patógenos con antagonistas. De esta manera, se espera colocar las bases para futuras investigaciones en campo que conduzcan a la obtención de formulaciones que puedan ser elaboradas y adoptadas por el productor y que, tal como recomiendan Villamil et al., (2015), esta tecnología pueda ser utilizada en combinación con otros métodos de control dentro de un programa de manejo integrado de plagas.

### **Conclusiones.**

Fueron aislados 300 hongos endófitos cultivables de hojas sanas de cacao.

Fueron encontrados como los géneros más predominantes el *Colletotrichum* y *Xylaria* en las colectas de endófitos en el cacao.

### **Recomendaciones.**

Se recomienda realizar futuras investigaciones para identificar, entre las cepas aisladas de *Colletotrichum* y *Xylaria*, aquellas que posean un mayor potencial como agentes de control biológico de *P. palmivora* en el contexto socioeconómico de Cuba.

### **Referencias Bibliográficas.**

- Acebo, Y., Hernández, A., Heydrich, M., El Jaziri, M., Hernández, A. N. (2012). Gestión de la pudrición de la vaina de cacao en negro (*Theobroma cacao* L.). Rev. Fruits 67(1):41-48.
- Arnold, A. E., Herre, E. A. (2003). Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungi endophytes: ecological pattern and process in the *Theobroma cacao* L. (Malvaceae). Mycology 95: 388– 398.

- Amin, S. M., Junaid, M. (2014). Isolation and identification of endophytic fungi from cocoa plant resistance VSD M. 05 and cocoa plant. Susceptible VSD M. 01 in South Sulawesi, Indonesia.
- Bailey, D. J., Gilligan, C. A. (1997). Biological control of pathozone behaviour and disease dynamics of *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma viride*. *New Phytologist* 136: 359–367.
- Bailey, D. J., Gilligan, C. A. (1997). Biological control of pathozone behaviour and disease dynamics of *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma viride*. *New Phytologist* 136: 359–367.
- Gao, F. K., Dai, C. C., Liu, X. Z. (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research* 4: 1346–1351.
- Gupta, A., Goal, M., Thomas, V. G., Manikandan, V., Gajewski, J. G., Thomas, S., et al., (2014). Whole Genome Sequencing and Analysis of Plant Growth Promoting Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Plantation Crops Coconut, Cocoa and Arecanut. *PLoS ONE* 9 (8): e104259.
- Crozier, J., Thomas, S. E., Aime, M. C., Evans, H. C., Holmes, K. A. (2006). Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies isolated from stems and pods of *Theobroma cacao*. *Plant Pathology* 55: 783-791.
- Hanada, R. E., Pomella, A. W. V., Soberanis, W., Loguercio, L. L., Pereira, J. O. (2009). Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. *Biological Control* 50: 143-149.
- Hanada, R. E., Pomella, A. W. V., Costa, H., Bezerra, S., Loguercio, J. L., Pereira, J. O. (2010). Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuacu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Fungal biología* 114: 901-910.
- Herre, E. A., Mejia, L. C., Kilo, D. A., Rojas, E., Maynard, Z., Butler, A. (2007). Ecological Implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology* 88, 550-558.
- Ishak, Z., Anika, F. B., Furtek, D. B., MohdJaaffar, A. K. (2004). Antifungal activity of endophytic fungi isolated from the cocoa tree against *Phytophthora palmivora* and *Oncobasidium teobromae*. MSMBB Scientific Meeting 19-21, July 2004, Century Mahkota, Melaka, Malaysia.
- Martínez, P. (2015). Environmentally friendly methods for the Integrated Management of Pine Pitch Canker (PPC) disease. University of Valladolid – INIA
- Martínez, P., Fernández, R. A., Sanz, A. V., Pando, V., Diez, J. J., et al., (2016). Two fungal endophytes reduce the severity of pitch canker disease in *Pinus radiata* seedlings. *Biological Control* 94: 1–10.
- Mejía, L. C., Herre, E. A., Sparks, P., Winter, K., García, M. N., Van Bael, S. A. et al., (2014). Pervasive effects of a dominant foliar endophytic fungus on host genetic and phenotypic expression in a tropical tree. *Frontiers in Microbiology* 5, 1-16.

- Mbarga, J., Begoude, B., Ambang, Z., Meboma, M., Kuate, J., Schiffers, B., et al., (2014). A new oil-based formulation of *Trichoderma asperellum* for the biological control of cacao black pod disease caused by *Phytophthora megakarya*. *Biol Control* 77: 15-22.
- Redman, R. S., Dunigan, D. D., Rodríguez, R. J. (2001). Fungal Symbiosis from mutualism to Parasitism: Who Controls the Outcome, Host Or Invader? *New Phytologist* 151: 705-716.
- Richardson, S. N., Walker, A. K., Nsiama, T. K., Mcfarlane, J., Sumarah, M. W., A., Ibrahim, J., et al., (2014). Griseofulvin-producing Xylaria endophytes of *Pinus strobus* and *Vaccinium angustifolium*: Evidence for a conifer-understory species endophyte ecology. *Fungal Ecology* 11: 107–113.
- Sriwati, R., Melnick, R. L., Muarif, R., Strem, M. D., Samuels, G. J., Bailey, B. A. (2015). *Trichoderma* from Aceh Sumatra reduce *Phytophthora* lesions on pods and cacao seedlings. *Biological Control* 89: 33-41.
- Strobel, G. A. (2003). Microbial gifts from the rainforest. *Canadian Journal of Phytopathology* 24: 14-20
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1–10.
- West, C. P., Izeckor, E., Oosterhuis, D. M., Robbins, R. T. (1988). The effect of *Acremonium coenophialum* on the growth and nematode infestation of tall fescue. *Plant Soil* 112, 3-6.
- Villamil, J., Viteri, S., Villegas, W. (2015). Aplicación de Antagonistas Microbianos para el Control Biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par., en *Theobroma cacao* L. bajo condiciones de Campo. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín, CO.* 68(1):7441-7450.
- Rolando, Á., R., Carrión, R., Nina, H., Almanza, J., Loza, M., Michel, A. C., et al. (2013). Eficiencia biológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en el control de *Sclerotium rolfsii* Sacc., en cacahuate. *Avances de Investigación Agropecuaria* 28: 89–107.
- Aleandri, M. P., Chilosi, G., Bruni, N. A., Tomassini, A. M., Vettrano, A. (2015). Use of nursery potting mixes amended with local *Trichoderma* strains with multiple complementary mechanisms to control soil-borne diseases. *Crop Protection* 67: 269–278. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.10.023>.
- Romeralo, C., Botella, L., Santamaría, O., Diez, J. J. (2013). Control biológico de *Gremmeniella abietina* en plántulas de *Pinus halepensis* en invernadero mediante el uso de hongos endófitos. *Congreso Forestal Español* 6CFE01-383: 1–11.
- Rubini, M. R., Silva-Ribeiro, R. T., Pomella, A. W. V., Maki, C. S., Araújo, W. L., Santos, D. R. D., et al., (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences* 1: 24-33.
- Rodríguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E., Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182: 314 -330.
- Salazar, W., Torres, E., Caballero, A. (2014). Control Biológico de Enfermedades de Plantas en Nicaragua. In Bettiol, W., Rivera, M., Mondino, P., Montealegre, J., Colmenárez, Y. (Eds). *Control Biológico de Enfermedades de Plantas en America Latina y el Caribe*. León, NI. p. 287-295.

- Samuels, G. J., Dodd, S. L., Petrini, O., Schroers, H. J., Druzhinina, I. S. (2006). The *Trichoderma koningii* aggregate species *Studies in Mycology* 56: 67–133.
- Flores, J. A. (2017). Antagonismo in vitro de hongos endófitos para su uso en el biocontrol de enfermedades forestales. *Revista Científica de FAREM-Estelí. Medio ambiente, tecnología y desarrollo humano.* 6(23): 58-71.
- Vera, M. A., Bernal, A., Leiva, M., Vera, A. E. A, Vera, D., Peñaherrera, S., Solís, K., Terrero, P., Jiménez, V. E. (2018). Microorganismos endófitos asociados a *Theobroma cacao* como agentes de control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Centro Agrícola*, 45(3), 81-87. Recuperado en 18 de octubre de 2018, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-57852018000300081&lng=es&tlng=](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852018000300081&lng=es&tlng=).
- Wang, Kai., Pei-sheng, Yan., Li-xin Cao, Qing-long Ding, Chi Shao and Teng-feiZhao. (2013). Potential of Chitinolytic *Serratia marcescens* Strain JPP1 for Biological Control of *Aspergillus parasiticus* and Aflatoxin. Hindawi Publishing Corporation. 7.

***Fecha de recibido: 28 jun. 2018***  
***Fecha de aprobado: 31 jul. 2018***