

# Aplicación de Antagonistas Microbianos para el Control Biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. Bajo Condiciones de Campo

Application of Microbial Antagonists for the Biological Control of *Moniliophthora roreri* Cif & Par in *Theobroma cacao* L. Under Field Conditions

Jorge Enrique Villamil Carvajal<sup>1</sup>; Silvio Edgar Viteri Rosero<sup>2</sup> y William Luciano Villegas Orozco<sup>3</sup>

**Resumen.** En Colombia, las pérdidas ocasionadas por *Moniliophthora roreri* Cif & Par en el cultivo de cacao continúan siendo considerables. El objetivo del presente estudio fue investigar la actividad antagonista de dos aislamientos autóctonos de *Trichoderma* sp. y uno de *Bacillus* sp. ante *M. roreri*, en condiciones de campo. Los tratamientos fueron: T1, hongo H5; T2, hongo H20; T3, bacteria B3 y T4, testigo. Se evaluó incidencia y severidad externa e interna en los frutos. Los resultados de severidad externa e interna mostraron que respecto al control la disminución del daño en los frutos fue del 19,5 y 11,2% en el T1, del 28 y 19,5% en el T2 y del 13,5 y 8,5% en el T3, respectivamente con diferencias estadísticas a favor del T2. Se concluye que entre los tres antagonistas evaluados, el hongo H20 (*Trichoderma* sp.) tiene el mayor potencial para el control de la moniliasis del cacao en condiciones de campo.

**Palabras clave:** Moniliasis, *Trichoderma*, *Bacillus*, bioantagonistas.

**Abstract.** In Colombia, the economic losses caused by *Moniliophthora roreri* Cif & Par in the cocoa cultivation continue being considerable. The objective of this study was to investigate the antagonistic activity of two indigenous isolates of *Trichoderma* sp and one of *Bacillus* sp. over *M. roreri* under field conditions. The treatments were: T1, fungus H5; T2, fungus H20; T3, bacteria B3; T4, control. The variables evaluated on the cocoa fruits were incidence and external and internal severity. The results of the external and internal severity showed that with respect to the control the damage reduction on the cocoa fruits was 19,5 and 11,2% in T1, 28 and 19,5% in T2, and 13,5 and 8,5% in T3, respectively with statistical differences in favor of T2. It is concluded that among the three evaluated antagonists, the fungus H20 (*Trichoderma* sp.) has the greatest potential for the biocontrol of frosty pod rot in the cocoa cultivation under field conditions.

**Key words:** Frosty pod rot, *Trichoderma*, *Bacillus*, bioantagonists.

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; Suárez y Alba, 2013). Los hongos antagonistas del género *Trichoderma* tienen la capacidad de actuar contra una amplia variedad de patógenos del suelo (*Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. y *Sclerotinia* sp.) y del follaje (*Botrytis* spp. y *Peronospora* sp.) (Hoyos *et al.*, 2008; Reyes *et al.*, 2008; Tchameni *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2010; Acebo *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2013).

Con relación a *M. roreri* y *M. pernicioso*, especies de los géneros *Trichoderma* y *Gliocladium* han sido ampliamente calificadas como agentes eficaces en el control biológico de las enfermedades causadas por estos patógenos, tanto en condiciones *in vitro* como *in situ*, en diferentes áreas

geográficas (Hebbar, 2007; Bailey *et al.*, 2008; Suárez y Cabrales, 2008; Krauss *et al.*, 2010; Medeiros *et al.*, 2010; Villamil, 2011; Villamil *et al.*, 2012; Hernandez *et al.*, 2014). Resultados similares han sido obtenidos utilizando bacterias del género *Bacillus* con actividad antagonista eficaz ante *M. roreri* (Benito *et al.*, 2007; Jaimes *et al.*, 2008; Melnick *et al.*, 2008; Melnick *et al.*, 2011; Suárez y Alba 2013). Entre los mecanismos de acción utilizados por *Trichoderma* spp. se destacan la competencia por el espacio y los nutrientes, el micoparasitismo, la producción de compuestos inhibidores, la inactivación de enzimas del agente patógeno y la inducción de resistencia en la planta (Martínez *et al.*, 2008; Shores *et al.*, 2010; Tchameni, 2011; Hernández *et al.*, 2014). La multiplicidad de estos mecanismos en un aislamiento es una característica importante para su selección como agente de control biológico (Hoyos *et al.*, 2008).

La competencia se relaciona con el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo

<sup>1</sup> Ingeniero Agrónomo. Joven Investigador, Colciencias-UPTC. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia Facultad de Ciencias Agropecuarias - Programa de Ingeniería Agronómica. Avenida Central del Norte. Tunja, Colombia. <cavitosa@yahoo.com>

<sup>2</sup> Profesor Titular. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia - Facultad de Ciencias Agropecuarias - Programa de Ingeniería Agronómica. Avenida Central del Norte. Tunja, Colombia. <silvio.viteri@uptc.edu.co>

<sup>3</sup> Ingeniero Agrónomo. Investigador Corporación Centro de Innovación del Trópico Alto Sostenible-CEI3TAS. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Avenida Central del Norte. Tunja, Colombia. <willvillegas@gmail.com>



requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de ellos, reduzca la cantidad necesaria para los demás (Martínez *et al.*, 2008). *Trichoderma* spp. puede parasitar las hifas del patógeno a través de enrollamientos, ganchos y cuerpos de tipo apresorios, que penetran la pared celular por la acción hidrolítica de las enzimas quitinasas, glucanasas y celulasas (Bernal *et al.*, 2007; Vinale *et al.*, 2008). El efecto de antibiosis se debe a la producción de metabolitos secundarios, los cuales pueden ser volátiles o difusibles, pero que en cualquiera de los casos, sin entrar en contacto físico con el patógeno pueden inhibir o restringir su crecimiento (Rodríguez *et al.*, 2010). Algunas cepas de *Trichoderma* producen trichodermina, dermadina, suzukacilina, viridina, alameticina, richotoxina, metabolitos que son responsables del mecanismo antagónico (Vinale *et al.*, 2006). La desactivación de los factores de patogenicidad de *Trichoderma* contra hongos fitopatógenos constituye un mecanismo de antagonismo indirecto poco estudiado (Martínez *et al.*, 2013). Es posible que el potencial enzimático de *Trichoderma* para detener el proceso infeccioso de los patógenos sea mucho mayor, pues este controlador biológico secreta más de 70 metabolitos, entre ellos: sustancias estimuladoras del crecimiento y desarrollo de las plantas (Howell, 2003).

Las cepas de *Trichoderma* pueden activar un mecanismo nativo de defensa en las plantas contra diferentes plagas, conocido como Resistencia Sistémica Inducida (SIR- Systemic Induced Resistance) (Shoresh *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2013). Diversas clases de compuestos pueden ser liberados por *Trichoderma* en la zona de la rizosfera y estar relacionados con la IRS en las plantas (Shoresh *et al.*, 2010). Aún no se esclarecen y amplían los conocimientos acerca de *Trichoderma* como inductor de resistencia, pero es indiscutible su función en la defensa de las plantas (Martínez *et al.*, 2013).

Los principales mecanismos involucrados en el control biológico de fitopatógenos con el uso de bacterias antagonistas como *Bacillus* sp., son la competencia por nutrientes, minerales y espacio; la síntesis de metabolitos, tales como sideróforos, antibióticos, toxinas y biosurfactantes, y la inducción de resistencia sistémica en la planta (Melnick *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2011; Acebo *et al.*, 2012). Estos mecanismos son potenciados por alta motilidad del microorganismo y su capacidad de formar biopelículas (Acebo *et al.*, 2012).

Así, el objetivo de este estudio se enfoca a determinar la actividad antagónica de dos aislamientos autóctonos de *Trichoderma* sp. y uno de *Bacillus* sp. ante *Monilophthora*

*roreri* Cif & Par, para el diseño de estrategias que permitan el manejo integrado de la moniliasis en el cultivo de cacao.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Área de estudio.** El estudio se realizó en la finca "Corozales", vereda Resguardo del municipio de Coper, occidente de Boyacá (Colombia), coordenadas 05° 28' 45,6" N, 74° 02' 23,1 O a una altura de 825 msnm, temperatura promedio de 22 a 32 °C, precipitación pluvial acumulada de 1.557 mm y humedad relativa de 84,12%.

**Definición de los tratamientos.** Se evaluaron los aislamientos autóctonos *Trichoderma* sp. H5 y H20, y *Bacillus* sp. B3. Se establecieron los siguientes tratamientos: T1, *Trichoderma* sp. H5; T2, *Trichoderma* sp. H20; T3, *Bacillus* sp. B3 y T4, testigo. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA), con cuatro tratamientos, cuatro repeticiones, cuatro frutos por repetición.

**Obtención de inoculantes microbianos.** Los biocultivos fueron suministrados por el cepario del Laboratorio de Control Biológico del Grupo Manejo Biológico de Cultivos (GMBC) del Programa de Ingeniería Agronómica, de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Los antagonistas microbianos autóctonos se obtuvieron previamente de suelo rizosférico y de frutos de cacao de arboles procedentes de semilla, de diversos cruzamientos interclonales mayores a 40 años de las fincas Diamante y Resguardo del municipio de Coper (Boyacá). Como criterio de selección se tuvo en cuenta su potencial para reducir el crecimiento y esporulación de *M. roreri* en condiciones *in vitro* (Villamil *et al.*, 2012). El aislamiento de *M. roreri*, se obtuvo a partir de frutos completamente esporulados, coleccionadas en la finca Corozales, de los cuales, se tomó el micelio del hongo y se realizó siembra directa en cajas Petri en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).

La multiplicación de los antagonistas y el patógeno se hizo en cajas de Petri en medio PDA (hongos) y Agar Nutriente (AN) (bacterias). Los hongos fueron sembrados a los 62 días de la polinización de los híbridos e incubados a 25 °C, durante 8 días, y la bacteria a los 66 días de la polinización e incubada a 28 °C, durante 4 días (Agrios, 2005). El patógeno se sembró a los 45 días de la fecundación de los frutos y se incubó a 25 °C, durante 25 días.

**Obtención e inoculación de frutos sanos.** Los frutos sanos de cacao, se cosecharon de 16 árboles mayores de 25 años en competencia perfecta en un lote de arboles procedentes de semilla, de diversos cruzamientos interclonales, con similares características en cuanto a color y forma de frutos, que presentaban susceptibilidad a la moniliasis. Manualmente se fecundaron ocho flores del tercio medio superior por cada árbol con polen procedente del material varietal IMC 67.

A los 70 días de la polinización se seleccionaron cuatro árboles procedentes de cruzamiento interclonal para cada tratamiento. Para el conteo de conidios se preparó una suspensión de cada uno de los antagonistas en solución salina (NaCl 0,85%) en un patrón de 9 mL, utilizando 1 g de PDA colonizado por el biocontrolador y una alícuota de 400  $\mu$ L de Tween 80, para la dispersión de las conidios. De esta suspensión se hicieron diluciones seriadas de  $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$  y  $1 \times 10^{-3}$ , tomando de esta última una alícuota de 500  $\mu$ L para hacer los conteos en cámara Neubauer (Agrios, 2005). La densidad de la suspensión de cada hongo fue ajustada a  $2,6 \times 10^7$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ . Para la bacteria se siguió el mismo procedimiento utilizado para los hongos, con el adicional de diluciones seriadas de  $1 \times 10^{-1}$  hasta  $1 \times 10^{-5}$ , tomando de esta última una alícuota de 500  $\mu$ L para hacer los conteos en cámara Petroff Hausser (Agrios, 2005). La densidad de la bacteria fue  $3,2 \times 10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ . De cada árbol procedente de cruzamiento interclonal se inocularon 4 frutos con 2,2 mL de suspensión del antagonista respectivo mediante aspersión con atomizador manual en un área de 3  $\text{cm}^2$ , sobre los canales de la parte media del fruto. Después de la inoculación cada fruto se protegió con una bolsa plástica de color azul, abierta en su parte inferior, con el fin de evitar el lavado por lluvia y concentración de mayor humedad alrededor del fruto. Cinco días posteriores a la inoculación con los antagonistas, se preparó una suspensión de esporas del patógeno siguiendo la metodología anteriormente descrita para hongos autóctonos, con una concentración de  $2,6 \times 10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  y se inocularon los frutos utilizando 2 mL de inóculo por fruto mediante aspersión con atomizador sobre la misma área donde fue inoculado el antagonista. Simultáneamente, los frutos de los 4 árboles procedentes de cruzamiento interclonal asignados al testigo fueron inoculados con 2,2 mL de la suspensión del patógeno. Esta inoculación también se realizó mediante aspersión con atomizador manual en una área de 3  $\text{cm}^2$ , sobre los canales de la parte media del fruto (Jaimes y Aranzazu, 2010).

**Variables evaluadas.** Se llevó un registro semanal de la incidencia y severidad externa de la enfermedad, a partir

de la aparición de los primeros síntomas, durante un período de 6 semanas. La severidad interna se determinó cuando los frutos alcanzaron madurez de cosecha, 48 días posteriores a la inoculación. La incidencia de la enfermedad en cada semana se calculó en porcentaje mediante la fórmula de Arguello (2000), contando el número de frutos con el síntoma de la enfermedad. La severidad externa se evaluó, primero con base en el porcentaje de tejido afectado en el fruto, utilizando la escala dada en grados y porcentaje de daño (Grado 1= 0 fruto sano; Grado 2= 1-25 protuberancia; Grado 3= 26-50 inicio de mancha; Grado 4= 51-75 mancha; Grado 5= 76-100 esporulación) y luego mediante la sumatoria de los grados de daño en porcentaje sobre el número total de datos por el mayor dato del porcentaje de severidad (Cárdenas y Giraldo, 1986). Para comparar el efecto de los tratamientos sobre la severidad externa se calculó el área abajo la curva del progreso de la enfermedad (AACPE), mediante la aplicación de la fórmula planteada por Shaner y Finney (1977). Para introducir los datos, se tuvo en cuenta el % de daño externo y el número del día en el cual se hizo la evaluación después de la aplicación de los tratamientos (Pérez y Forbes, 2008). Cuando los frutos alcanzaron madurez de cosecha se abrieron longitudinalmente para determinar la severidad interna, la que se expresó en términos de porcentaje de daño, empleando la escala en grados y porcentaje de daño: (Grado 0 = 0% de daño, Grado 1= 1-20%, Grado 2= 21-40%; Grado 3= 41-60%, Grado 4= 61-80%; Grado 5= 81-100% de daño) (Jaimes y Aranzazu, 2010).

**Análisis biométricos.** Se analizaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza para los datos obtenidos en cada variable mediante la prueba de Shapiro-wilk y Bartlett, se corrió el análisis de varianza ANOVA y se aplicaron las pruebas de comparación múltiple de Tukey (Gómez y Gómez, 1984), utilizando el paquete estadístico R versión 3.0.2 copyright©.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Incidencia de moniliasis en los frutos tratados.**

Los primeros síntomas (gibas) de la enfermedad se observaron 40 días posteriores a la inoculación del patógeno. De acuerdo con Suárez (1972), en frutos inoculados a los 70 días de desarrollo el periodo de incubación desde la penetración hasta la aparición de los primeros síntomas generalmente es de 40-60 días. Una de las características de este fitopatógeno es el prolongado periodo de incubación (Evans, 2007; Phillips *et al.*, 2007).



Los resultados de los tratamientos sobre la incidencia de moniliasis en los frutos de cacao mostraron menores porcentajes en los tratamientos con los antagonistas, durante las dos primeras semanas, después de la aparición de los síntomas, sin diferencia estadística frente al control. Aunque las diferencias no alcanzaron los niveles de significación se destaca que la menor incidencia ocurrió en los frutos inoculados con el hongo antagonista H20 (T2), aislamiento que en condiciones *in vitro* inhibió por completo el crecimiento y esporulación de *M. roseri* (Villamil *et al.*, 2012). A partir de la tercera semana la incidencia de moniliasis fue del 100% en todos los tratamientos, independientemente de la presencia de antagonista.

**Severidad externa.** El menor porcentaje de severidad externa se encontró en los frutos inoculados con el antagonista H20 (T2). Las diferencias en cuanto a la severidad externa entre el tratamiento T2 y el testigo (T4) fueron significativas durante las seis semanas del estudio y frente a los otros dos antagonistas, a partir de la semana 3. Entre los tratamientos T1 (hongo H5) y T3 (bacteria B3) no se presentaron diferencias significativas en el tiempo del estudio, pero los dos también se diferenciaron del testigo (T4), a partir de la semana 4 (Tabla 1). Específicamente, según los datos registrados en la semana 6, al comparar el porcentaje en la disminución del daño externo en los tratamientos con aislamientos antagonistas respecto al control (5,5%), se deduce que el efecto del biocontrol en el T1 fue del 19,5%, en el T2 del 28% y en el T3 del 13,5%. La severidad del daño externo ocasionado por el patógeno en presencia y ausencia de bioantagonistas se puede apreciar en la Figura 1. En general, el incremento de la severidad de la moniliasis en todos los tratamientos podría estar relacionada con el aumento progresivo de

la precipitación pluvial y la temperatura ocasionada por las bolsas plásticas empleadas en las pruebas durante el desarrollo del experimento (Tabla 1), lo que generó en el ambiente condiciones de humedad relativa favorables, para el crecimiento y esporulación del patógeno. Esta observación concuerda con Phillips y Wilkinson (2007) y Phillips *et al.* (2007) quienes afirmaron que el conidio necesita de la presencia de agua para germinar, por lo que la moniliasis se incrementa en los meses de lluvia; en general, el hongo prospera con precipitación anual de 780 a 5.500 mm, temperatura promedio anual de 18,6 a 28 °C y 85% de humedad relativa, condiciones que se corresponden con las óptimas de crecimiento del patógeno.

Los frutos inoculados con *Trichoderma* sp. H5 y *Bacillus* sp. B3 presentaron el síntoma de mancha de color chocolate, que se hizo mayor en el tejido a medida que aumentó la precipitación, pero no evidenciaron esporulación del patógeno (Figura 1, A y C). Estos resultados están de acuerdo con Infante *et al.* (2009) y Martínez *et al.* (2013) quienes registraron que *Trichoderma* sp. tiene una alta capacidad de competencia por el sustrato.

Respecto a *Bacillus* sp., Jaimes *et al.* (2008) y Suárez y Alba (2013) corroboraron que especies de este género pueden inhibir a *M. roseri* *in vitro*, mediante la liberación de metabolitos secundarios. Específicamente cepas de *B. cereus* y *B. subtilis* han sido utilizadas para el control biológico de *Phytophthora* spp. tanto *in vitro* como en suelos infestados con el patógeno (Melnick *et al.*, 2008; Melnick *et al.*, 2011; Acebo *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2014).

En contraste a los tratamientos T1 y T3, los frutos inoculados con el hongo antagonista H20 (T2), mostraron una disminución considerable en la esporulación del patógeno (Figura 1B). Estos resultados se corroboran



**Figura 1.** Escala en porcentaje de daño, con la cual se determinó la severidad externa de moniliasis en frutos de cacao en condiciones de campo. A. *Trichoderma* sp., H5; B. *Trichoderma* sp., H20; C. *Bacillus* sp., B3; D. Testigo.

con lo expuesto por Torres (2010), quien afirma que un antagonista que inhiba crecimiento micelial, puede reducir la capacidad de *M. roleri* para infectar el tejido de la planta y causar la enfermedad. Al respecto, Sánchez (2005) informó que *Trichoderma* sp., presenta alta actividad competitiva frente a *M. roleri*, lo que tiene importancia especialmente en la fase saprofita ya que impide su desarrollo en el mismo sustrato. El hongo *Trichoderma* sp. produce enzimas como viridin, trichodermin, exo y endogluconasas, celobiasas, quitinazas y el compuesto 6-pentyl- $\alpha$ -pirona (6PAP), que presenta actividad antifúngica (Martínez *et al.*, 2013). Por su parte, Mejía *et al.*, (2008) y Lopes *et al.* (2009) encontraron que *Trichoderma* sp. mostró ser parásito de hifas de *Moniliophthora* spp. y *Phytophthora* spp., reportándose como posible agente de control de estos fitopatógenos del cacao. Betalleluz (2003) mencionó

que *Trichoderma* sp. ejerció antagonismo mediante el micoparasitismo y antibiosis contra *P. infestans*. (Ezziyyani, 2004; Vera *et al.*, 2005; Quiroz y Ferrera, 2008; Reyes, 2008 y Torres *et al.*, 2008) evidenciaron el alto potencial antagonístico de *Trichoderma* spp., como micoparásito, al penetrar y causar lisis del micelio de *Sclerotium cepivorum* y *Rhizotocnia solani* en ajo, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora* spp., *Rosellinia* sp., *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae* y *Cladosporium fulvum* en diferentes cultivos.

La tendencia en la severidad externa del patógeno a través del tiempo mostró que el menor porcentaje de expresión de severidad externa de *M. roleri* durante las seis semanas del experimento fue el H20, etapa en la que los porcentajes de severidad fueron significativamente los más bajos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Efecto de los antagonistas *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp sobre la severidad externa de moniliasis en frutos de cacao, bajo condiciones de campo. Municipio de Coper, Boyacá, Colombia.

Tratamientos	Severidad Externa (%) / Semanas											
	1	DS	2	DS	3	DS	4	DS	5	DS	6	DS
T1. <i>Trichoderma</i> sp. H5	22,8 ab	±1,5	29,8 c	±1,3	50,4 a	±1,3	60,5 b	±2,1	68,0 b	±0,8	75,0 b	±0,8
T2. <i>Trichoderma</i> sp. H20	22,0 b	±1,6	27,5 d	±0,6	40,3 b	±0,6	48,8 c	±1,3	54,5 c	±1,7	66,5 c	±2,6
T3. <i>Bacillus</i> sp. B3	24,3 ab	±1,0	32,5 b	±1,7	50,0 a	±1,7	62,0 b	±1,6	73,3 b	±2,8	81,0 b	±5,7
T4. Testigo (sin antagonista)	24,8 a	±0,5	35,3 a	±1,0	54,3 a	±1,0	70,3 a	±2,4	85,0 a	±5,0	94,5 a	±3,1

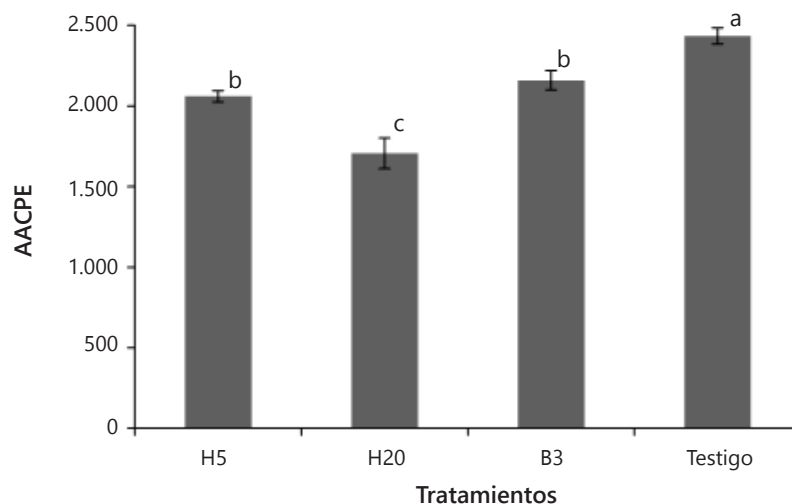
Letras no comunes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey (P<0,05). DS = representa la desviación estándar.

**Área abajo la curva del progreso de la enfermedad (AACPE).** Los valores del AACPE para cada tratamiento fueron: T1 (H5) 2060, T2 (H20) 1707, T3 (B3) 2161 y T4 (testigo) 2435. Los datos más altos corresponden a los tratamientos con menor efecto de biocontrol sobre la moniliasis. La Figura 2 muestra que el hongo H20 tuvo el mejor efecto antagonístico contra *M. roleri* seguido de los otros dos antagonistas H5 y B3.

**Severidad interna.** Los frutos que alcanzaron madurez de consumo presentaron disminución en el número de semillas y anomalías en su desarrollo (Figura 3), similar a lo observado por Evans (2007) en frutos infectados por *M. roleri* menores a 2 meses. Estos resultados ratifican que entre los antagonistas evaluados en este estudio, el aislamiento autóctono H20 es el hongo con el mayor potencial de control biológico de

este patógeno. Al igual que en el caso de la severidad externa, en este tratamiento se presentó el menor porcentaje de daño interno en los frutos (77,5%) con diferencias significativas respecto al hongo H5 (85,2%), la bacteria B3 (88%) y al testigo (96,5%). Los tratamientos T1 (H5) y T3 (B3) no presentaron diferencias estadísticas entre sí, pero sí con el testigo.

Al confrontar la disminución en el porcentaje de daño interno en los tratamientos con los antagonistas respecto al testigo (3,5%), se infiere que el efecto de biocontrol en el T1 (H5) fue de 11,2%, en el T2 (H20) 19,5% y en el T3 (B3) 8,5%. La Figura 4 ilustra la severidad del daño interno ocasionado por el patógeno en los diferentes tratamientos. Como consecuencia de los más bajos porcentajes de daño externo (Tabla 1) e interno (Figura 3) la mayor disminución de daño en

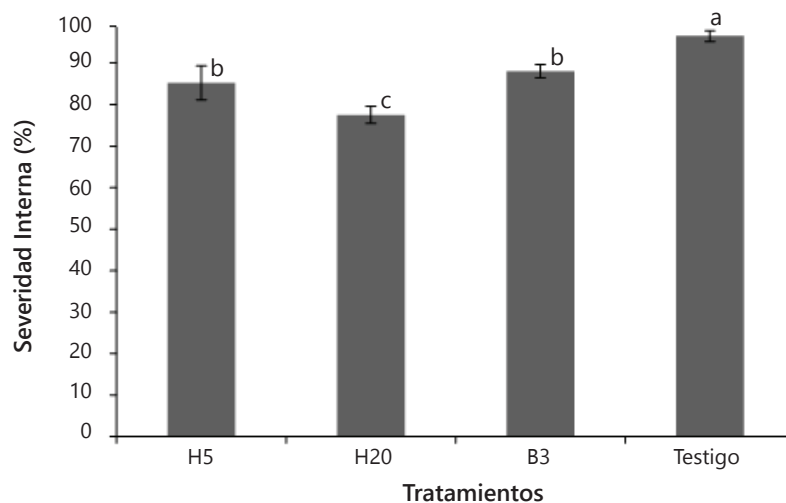


**Figura 2.** Área abajo la curva del progreso de la enfermedad (AACPE), para los bioantagonistas *Trichoderma* sp., *Bacillus* sp. y el testigo. Letras no comunes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

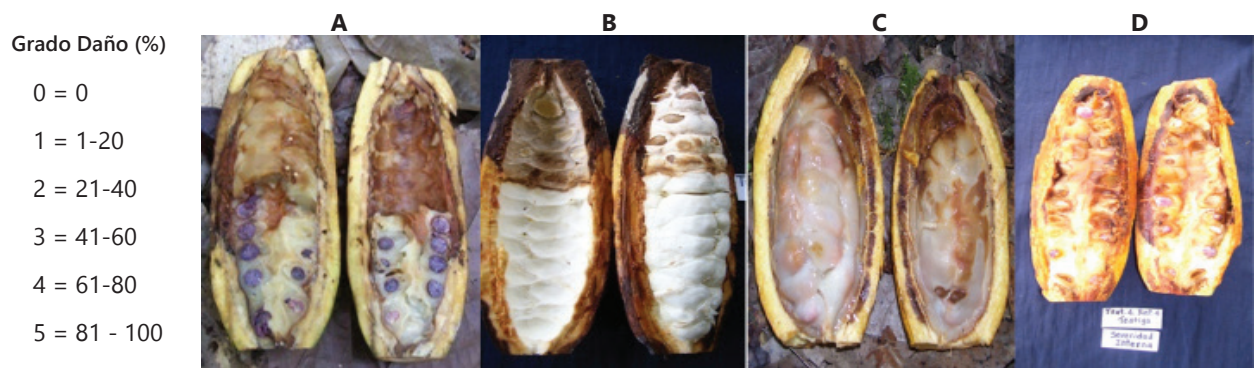
los frutos de cacao se registró en el tratamiento T2, lo que demuestra que el aislamiento de *Trichoderma* sp. H20 tiene capacidad antagonista sobre *M. roleri* en condiciones de campo. Resultados similares fueron reportados por Benito *et al.* (2007); Bailey *et al.* (2008) y Osorio (2010), quienes al evaluar cepas de *T. viride*, *T. Harzianum* y *T. hamatum*, encontraron antagonismo sobre *M. roleri* *in vitro* e *in situ*. Al respecto, Krauss *et al.* (2010) mencionan que los bioensayos realizados con *Trichoderma* sp. han sido efectivos y que por

su naturaleza, el control biológico no elimina, sino que reduce las poblaciones del patógeno y, como consecuencia, reduce la incidencia de la enfermedad.

No obstante; a pesar de las potencialidades de estos antagonistas autóctonos, se debe profundizar en el estudio, usando un mayor número de repeticiones por tratamiento y haciendo aspersiones masivas sobre el dosel de *T. cacao*, para mejorar su efectividad cuando sean aplicados como inoculantes microbianos.



**Figura 3.** Efecto de los antagonistas microbianos *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp., sobre la severidad interna de la moniliasis en frutos de cacao en condiciones de campo. Letras no comunes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 4.** Efecto de los antagonistas microbianos sobre la expresión de la severidad interna de moniliasis en frutos de cacao, en condiciones de campo. **A.** *Trichoderma* sp., H5; **B.** *Trichoderma* sp., H20; **C.** *Bacillus* sp., B3; **D.** Testigo.

Lo anterior sugiere que para un mejor aprovechamiento del potencial de control biológico de *M. royeri* en cacao demostrado en este estudio, especialmente por el hongo H20 (*Trichoderma* sp.), la aplicación de estos antagonistas microbianos debe integrarse con prácticas de prevención de diseminación de la enfermedad como el uso de cortinas rompevientos, desinfección de herramientas, traslado de material vegetal y el transporte de animales o el mismo hombre entre lotes de cacao (Jaimes y Aranzazu, 2010). Las medidas de control para el manejo integrado de plagas y enfermedades en el cultivo involucran la siembra de materiales genéticos de alta productividad con tolerancia o resistencia parcial a la enfermedad, podas semestrales, regulación del sombrero permanente, manejo trimestral de arvenses, nutrición balanceada con base en análisis de suelos y foliar, sistemas adecuados de drenaje, remoción semanal de frutos enfermos (Rodríguez *et al.*, 2005; Jaimes y Aranzazu, 2010) y la aplicación de la mezcla de fungicidas protectantes (a base de cobre) y sistémicos (i.a. Azoxistrobin) en cultivos altamente productivos (Argüello, 2000; Ayala, 2008; Isai, 2012).

### CONCLUSIONES

Los aislados autóctonos *Trichoderma* sp. H5 y H20 y *Bacillus* sp. B3 son potencialmente eficientes en el control biológico de *Moniliophthora royeri* Cif & Par en *T. cacao* en condiciones de campo, lo que indica que si existen alternativas biológicas para el control de este patógeno.

*Trichoderma* sp. H20 demuestra tener la mayor capacidad antagonista contra *M. royeri* al inducir en condiciones de campo los menores porcentajes de severidad externa e

interna, la menor área abajo la curva del progreso de la enfermedad y en consecuencia la mayor disminución de daño en los frutos de cacao, por lo que se destaca como un agente con el mayor potencial para el control de dicho patógeno.

Las potencialidades demostradas por estos antagonistas sugieren la necesidad de continuar las evaluaciones a gran escala, en condiciones de campo, utilizando aplicaciones masivas sobre el cultivo, mayor número de repeticiones y esclareciendo los mecanismos a través de los cuales ejercen su acción, para mejorar su efectividad cuando sean aplicados como inoculantes microbianos.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al equipo de trabajo del Laboratorio de Control Biológico Grupo Manejo Biológico de Cultivos-GMBC, del Programa de Ingeniería Agronómica de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, sede Tunja, por el apoyo incondicional durante todo el proceso de la investigación y especialmente a los profesores Jorge Velandia, Jorge Orlando Blanco y Donald Riascos por sus valiosos aportes y orientación en la metodología.

### BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G.N. 2005. Fitopatología. Quinta edición. Limusa, México. D.F. México. 819 p.

Argüello, O. 2000. Manejo integrado de la monilia en cacao (*Theobroma cacao* L.). pp. 74-84. En: Mejía, L., O. Argüello (ed.). Tecnología para el mejoramiento del



sistema de producción de cacao. CORPOICA. Impresores Colombianos, Bucaramanga. 144 p.

Ayala, F. 2008. Manejo integrado de moniliasis (*Moniliophthora roreri*) en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante uso de fungicidas, combinado con labores culturales. Guayaquil. Tesis Ingeniero Agropecuario. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador 115 p.

Acebo, Y., A. Hernández, M. Heydrich, M. El Jaziri and A.N. Hernández. 2012. Management of black pod rot in cacao (*Theobroma cacao* L.): a review. *Fruits* 67(1): 41-48.

Bernal, A., C. Andreu, M. Moya, M. González y O. Fernández. 2007. Utilización de *Trichoderma* spp. como alternativa ecológica para control de *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder & Hans. *Fitosanidad* 83: 26-29.

Bailey, B.A., H. Bae, M.D. Strem, J. Crozier, S.E. Thomas, G.J. Samuels, B.T. Vinyard and K.A. Holmes. 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control* 46(1): 24-35.

Betalalleluz, V. 2003. Control en tomate de *Phytophthora infestans* con los hongos antagonistas *Trichoderma harzianum*, *T. lignorum*, *T. viride* y *Gliocladium virens* bajo condiciones controladas. Ayacucho. Tesis Licenciatura en Biología. Facultad de Biología Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú. 76 p.

Benito, J., E. Arévalo y L. García. 2007. Manejo integrado del cacao para el control de enfermedades con énfasis en monilia. 39 p. En: Memorias Foro Binacional ICT-INIA. Situación actual y perspectivas de investigación en cacao (*Theobroma cacao* L.) en el Perú. APP Cacao Proyecto INIA/ICT. Perú-Ecuador.

Cárdenas, C y J. Giraldo. 1986. Evaluación de la respuesta de algunos cultivares del cacao (*Theobroma cacao* L.) a *Moniliophthora roreri* mediante dos métodos de inoculación en frutos y en semilla en estado radicular. Trabajo de grado Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad de Caldas. Manizales, Colombia. 107 p.

Federación Nacional de Cacaoteros. FEDECACAO. 2014. Colombia: estadísticas de la producción nacional registrada de cacao en grano. En: <http://www.fedecacao.com.co>; consulta: agosto 2014.

Evans, H. 2007. Cacao diseases: The trilogy revisited. *Phytopathology* 97(12): 1640-1643.

Ezziyyani, M. 2004. Biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento, con combinación de bioantagonistas. Tesis Doctoral en Biología Vegetal. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Murcia, España. 107 p.

Gómez, K.A. and A.A. Gómez. 1984. Statistical procedures for agricultural research. Second edition. John Wiley and Sons, New York. 680 p.

Howell, C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Diseases* 87(1): 4-10.

Hoyos, L., P. Chaparro, M. Abramsky, I. Chet y S. Orduz. 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp., contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. *Agronomía Colombiana* 26(3): 451-458.

Hebbar, P. 2007. Cacao diseases: A global perspective from an industry point view. *Phytopathology* 97(12): 1658-1663.

Hernández, A., Y. Ruíz, Y. Acebo, Y. Miguélez y M. Heydrich. 2014. Antagonistas microbianos para el manejo de la pudrición negra del fruto en *Theobroma cacao* L. Estado actual y perspectivas de uso en Cuba. *Protección Vegetal* 29(1): 11-19.

Isai, Q.D. 2012. Evaluación de fungicidas sistémicos y de contacto en el control de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis Magister en Ciencias. Posgrado Producción Agroalimentaria en el Trópico. Colegio de Postgraduados. 86 p.

Infante, D., B. Martínez, N. González y Y. Reyes. 2009. Mecanismos de acción *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Protección Vegetal* 24(1): 14-21.

Jaimes, Y. y F. Aranzazu. 2010. Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*). CORPOICA, Produmedios, Bogotá. 90 p.

Jaimes, A., R. Coronado y Y. Jaimes. 2008. Evaluación *in vitro* e *in vivo* de cinco cepas de *Bacillus* sp. como agentes de biocontrol de *Moniliophthora roreri*. pp. 26-27. En: Memorias Seminario Internacional de Cacao: Avances



- de Investigación. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Instituto Colombiano Agropecuario. Federación Nacional de Cacaoteros. Bucaramanga, Colombia.
- Krauss, U., E. Hidalgo, R. Bateman, V. Adonijah, C. Arroyo, J. García, J. Crozier, N.A. Brown, G. M. ten Hoopen and K. Holmes. 2010. Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical agents against frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in cocoa (*Theobroma cacao*). *Biological Control* 54(3): 230-240.
- Lopes, L.L., A. Carvalho, G. Rocha, J.T. De Souza and A.W. Villela. 2009. Selection of *Trichoderma stromaticum* isolates for efficient biological control of witches broom disease in cacao. *Biological Control* 51(1): 130-139.
- Medeiros, F.H., A.W. Pomella, J.T. de Souza, G.R. Niella, R. Valle, R.P. Bateman, D. Fravel, B. Vinyard and P.K. Hebbar. 2010. A novel, integrated method for management of witches broom disease in cacao in Bahia, Brazil. *Crop Protection* 29(7): 704-711.
- Melnick, R.L., C. Suárez, B.A. Bailey and P.A. Backman. 2011. Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. *Biological Control* (57)3: 236-245.
- Martínez, B., D. Infante y Y. Reyes. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Protección Vegetal* 28(1): 1-11.
- Mejía, L.C., E.I. Rojas, Z. Maynard, S. Van Bael, A.E. Arnold, P. Hebbar, G.J. Samuels, N. Robbins and E.A. Herre. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* L. pathogens. *Biological Control* 46(1): 4-14.
- Melnick, R., N. Zidack, B. Bailey, S. Maximova, M. Guiltinan and P. Backman. 2008. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Biological Control* 46(1): 46-56.
- Martínez, B., Y. Reyes, D. Infante, E. González, H. Baños y A. Cruz. 2008. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Protección Vegetal* 23(2): 118-125.
- Osorio, R. 2010. Estudio del efecto de *Trichoderma harzianum* en el control de *Moniliophthora roreri* en plantas de *Theobroma cacao* en la provincia de Esmeraldas. Quito. Tesis ingeniero Agro industrial. Escuela Politécnica Nacional. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustrial. 125 p.
- Pérez, W. y G. Forbes. 2008. Manual Técnico. El Tizón Tardío de la papa. Centro Internacional de la Papa (CIP). Comercial Grafica Sucre, Lima, Perú. 12 p.
- Phillips, W., M. Aimes and M. Wilkinson. 2007. Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology* 56(6): 911-922.
- Phillips, W and M. Wilkinson. 2007. Frosty pod of cacao: A disease with limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology* 97(12): 1644-1647.
- Quiroz, V. y C. Ferrera. 2008. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. *Revista Mexicana de Micología* 26: 27-34.
- Reyes, Y., B. Martínez y D. Infante. 2008. Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. *Protección Vegetal* 23(2): 112-117.
- Rodríguez, E., J. Mujica y G. Cubillos. 2005. Manejo integrado de la moniliasis en el cultivo del cacao. Corpoica, Bucaramanga. 25 p.
- Rodríguez, J.E., J. Velandia y S.E. Viteri. 2010. Evaluación de microorganismos aislados de gallinaza por su potencial para el biocontrol de fusarium (*F. oxysporum*) en plántulas de uchuva (*Physalis peruviana*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 63(2): 5499-5509.
- Suárez, C. 1972. Mecanismo de penetración y proceso de infección de *Moniliophthora roreri* en frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.). pp. 506-510. En: Memorias IV Conferencia Internacional de Investigaciones en Cacao. Trinidad y Tobago.
- Suárez, L y C. Cabrales. 2008. Identificación de las especies de cepas nativas de *Trichoderma* sp., y *Bacillus* sp., y evaluación de su potencial antagonista *in vitro* frente al hongo fitopatógeno nativo *M. roreri* en el departamento de Norte de Santander. *Revista de la Universidad Francisco de Paula Santander* 13(1): 45-56.
- Sánchez, M. 2005. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre *Moniliophthora*

- roreri* Cif & Par en cacao. Ucayali. Tesis de Agronomía. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Ucayali. Pucallpa, Perú. 55 p.
- Shoresh, M., G. Harman and F. Mastouri. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Phytopathology* 48: 21-43.
- Shaner, G. and R.E. Finney. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67: 1051-1056.
- Suárez, L. y R. Alba. 2013. Aislamiento de microorganismos para el control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Acta Agronómica* 62(4): 370-378.
- Singh, J.S., V.C. Pandey and D.P. Singh. 2011. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 140(3-4): 339-353.
- Torres, E., J. Iannaccone y H. Gómez. 2008. Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. *Bragantia* 67(1): 169-178.
- Torres, M. 2010. Progreso temporal y manejo integrado de la moniliasis [*Moniliophthora roreri* (Cif y Par.) Evans *et al.*] del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Tabasco, México. Tesis doctorado en Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Texcoco, México. 99 p.
- Tchameni, S.N., M.E. Ngonkeu, B.A. Begoude, L. Wakam, R. Fokom, A.D. Owona, J.B. Mbarga, T. Tchana, P.R. Tondje, F.X. Etoa and J. Kuate. 2011. Effect of *Trichoderma asperellum* and arbuscular mycorrhizal fungi on cacao growth and resistance against black pod disease. *Crop Protection* 30(10): 1321-1327.
- Villamil, J. 2011. Evaluación de hongos y bacterias en la capacidad antagonista a monilia (*Moniliophthora roreri*) en cacao (*Theobroma cacao* L.) *in vitro* y en campo. Trabajo de grado Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja. 78 p.
- Vera, R., B. Moreno, R. Acevedo y E. Trujillo. 2005. Caracterización de aislamientos de *Trichoderma* spp., por tipo de antagonismo y electroforesis de isoenzimas. *Revista Fitopatología Venezolana* 18(1): 1-7.
- Villamil, J., J. Blanco y S. Viteri. 2012. Evaluación *in vitro* de microorganismos nativos por su antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 65(1): 6305-6315.
- Vinale, F., K. Sivasithamparam, E. Ghisalberti, R. Marra, L. Woo and M. Lorito. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40(1): 1-10.
- Vinale, F., R. Marra, F. Scala, L. Ghisalberti, M. Lorito and K. Sivasithamparam. 2006. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology* 43(2): 143-148.