



Universidad de Carabobo
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología
Departamento de Biología
Centro de Biotecnología Aplicada (CBA)



Biocontrol de *Fusarium* sp. por *Trichoderma* spp. en *Theobroma cacao* L en condiciones *in vitro* y vivero.

Trabajo Especial de Grado presentado por la **Br. Yugreisy Del Carmen Polanco** ante la ilustre Universidad de Carabobo como requisito para optar al título de **Licenciada en Biología**

Tutor: Dr. Domenico Pavone

Naguanagua, Junio de 2016



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



ACTA

Mediante la presente se deja constancia que el (la) **Br. Yugreisy Polanco**, Cédula de Identidad N° **22.004.269**, presentó ante el Jurado aprobado por el Consejo de Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (FACYT), de la Universidad de Carabobo, su Trabajo Especial de Grado (T.E.G.), titulado: **"Biocontrol de *Fusarium* spp. por *Theobroma cacao* L. en condiciones *in vitro* y *vivero*"**, en concordancia con los artículos 16, 17, 18 y 19 de las Normas de Interés Estudiantil. El jurado evaluador consideró que, luego de haber aprobado dicho trabajo el (la) bachiller cumple con los méritos académicos necesarios para obtener el Título de Licenciado en Biología.

En Valencia, a los ocho días del mes de junio del año dos mil dieciseis.

Prof. Domenico Pavone
Tutor

Prof. Rafael Fernández
Jurado Principal
Prof. Rafael Rodríguez
Jurado Principal

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, hermanos, tíos y abuela por su apoyo.

A mi tutor Domenico Pavone, que de forma desinteresada me ha brindado su apoyo en la realización de cada parte de esta investigación. Gracias por darme la oportunidad de compartir todo este tiempo y de haber confiado en mí.

Al señor Luis Estrada por su generosa colaboración y valiosa contribución en lo que respecta a toda la información brindada de sus cultivos en Trincheras, Edo. Carabobo, dando de forma desinteresada las semillas de cacao necesarias para llevar a cabo los ensayos.

Al Centro de Biotecnología Aplicada (CBA) de la Universidad de Carabobo, por ser el espacio donde se realizaron los diferentes ensayos.

Al laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo, por facilitar el uso de los equipos para la realización de los ensayos para la identificación molecular.

A la Prof. Sonia Ardito en el laboratorio de Biodiversidad Vegetal de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo, por permitirme realizar las fotografías y mediciones necesarias para la identificación morfológica.

A Wilfredo Yéguez, quién brindó su apoyo incondicional, paciencia y motivación para la realización de este trabajo.

A todo el personal técnico y administrativo de la escuela de Biología por su apoyo cuando fue necesario.

A Sabrina, Aurita y Andrea por su apoyo y compañía en cada momento.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Planteamiento del problema.....	3
1.2 Justificación.....	3
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos.....	4
3. MARCO TEÓRICO	4
3.1 El cultivo de <i>Theobroma cacao</i> L.	4
3.2 Enfermedad de agallas en cacao	5
3.3 Sintomatología	6
3.4 Etiología	8
3.5 <i>Fusarium decemcellulare</i> Brick.	9
3.6 Ciclo de la enfermedad.....	10
3.7 Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de agallas en cacao	10
3.8 Métodos de control.....	11
3.9 <i>Trichoderma</i> spp. como agente biocontrolador.	12
3.9.1 Mecanismos de control de <i>Trichoderma</i> spp.	13
3.9.2 Micoparasitismo.....	14
3.9.3 Antibiosis.....	15
3.9.4 La competencia.....	16
3.9.5 Estimulación del crecimiento vegetal.	17
4. ANTECEDENTES	18
5. MARCO METODOLÓGICO	20
5.1 Material biológico	20
5.2 Procesamiento de muestras para obtener aislamientos de <i>Fusarium</i> sp.	20
5.3 Obtención de cultivos monospóricos de <i>Fusarium</i> sp.	21
5.4 Patogenicidad de <i>Fusarium</i> sp. sobre plántulas de <i>T. cacao</i>	21
5.5 Efecto antagónico <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Fusarium</i> sp.	22
5.6 Evaluación de la actividad antagónica de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Fusarium</i> sp. en plantas de cacao en condiciones de vivero.	23
5.7 Colonización de <i>Trichoderma</i> spp. en suelo.	23
5.8 Efecto de <i>Trichoderma</i> spp. en la germinación de la semilla y desarrollo de plántulas de <i>T. cacao</i>	24
5.9 Análisis estadísticos.	25

6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
6.1	Aislamiento de <i>Fusarium</i> sp.....	25
6.2	Patogenicidad de <i>Fusarium</i> sp en plántulas de <i>T. cacao</i>	27
6.3	Efecto biocontrolador <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Fusarium</i> sp.....	30
6.4	Biocontrol en vivero de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Fusarium</i> sp....	38
6.5	Colonización de <i>Trichoderma</i> spp. en suelo.	41
6.6	Efecto de <i>Trichoderma</i> spp. en la germinación y crecimiento de <i>T. cacao</i>	44
7.	CONCLUSIONES	52
8.	RECOMENDACIONES	53
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
10.	ANEXOS	64

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla I. Crecimiento de <i>F. cf. decemcellulare</i> (Fus) y <i>Trichoderma</i> spp, (TV) (cm ²) en cultivos duales en medio sólido (PDA). Se presenta el promedio y error estándar de cinco réplicas. En la columna 120 h-Fus se muestra la comparación de medias para las áreas de <i>F. cf. decemcellulare</i> en presencia de <i>Trichoderma</i> spp. a los cinco días. Las áreas con letras distintas muestran diferencias significativas entre sí a $p \leq 0,05$ (Kruskal-Wallis/Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)). 30	30
Tabla II. Número de plantas de <i>T. cacao</i> de un mes de crecimiento, inoculadas o no con <i>Trichoderma</i> spp. y <i>F.cf. decemcellulare</i> con agallas en axilas cotiledonarias. 39	39
Tabla III. Efecto de <i>Trichoderma</i> spp. sobre la germinación y el desarrollo de plántulas de <i>T. cacao</i> 45	45

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Tipos de agallas en cacao. (A) Cojín floral, (B) puntos verdes, (C) perilla y (D) cojín floral sano. Fuente: Parra <i>et al.</i> , (2009).....	8
Fig. 2. Estructuras morfológicas de <i>F. cf. decemcellulare</i> . A. Colonia en medio PDA. B. Microconidias. C. Microconidias y conidióforo (400X). D. Macroconidias (400X).....	27
Fig. 3. Patogenicidad en plantas de <i>T. cacao</i> inoculadas con <i>F. cf. decemcellulare</i> a los tres meses de desarrollo. A. Plantas de cacao infectadas. B-C. Vista con detalle de las agallas en axilas cotiledonarias. D. Planta de cacao sin agallas. ...	29
Fig. 4. Cinética de crecimiento de <i>F. cf. decemcellulare</i> medida durante 5 días en presencia o no de <i>Trichoderma</i> spp.***= diferencias significativas con $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis). A partir del día 4 se observó el contacto entre las colonias. La figura fue realizada con base en los datos promedio presentados en la Tabla I. .	32
Fig. 5. Área de crecimiento de <i>F. cf. decemcellulare</i> (cm ²) en presencia de diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> sp. (TV118, TV190, TV200 y TV243) en el día 5 en medio PDA. Las letras distintas muestran diferencias significativas a $p < 0,05$ (Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)). Los valores son promedios de 5 réplicas $\pm$ error estándar.	32
Fig. 6. Crecimiento secuencial de cultivos duales en medio PDA entre <i>Trichoderma</i> spp. y <i>F. cf. decemcellulare</i> . Se presenta la fotografía de una de las cinco réplicas realizadas en el experimento.....	34
Fig. 7. Enrollamiento de las hifas de <i>Trichoderma</i> spp (T) sobre <i>Fusarium</i> sp (F). a. Hifas de <i>Trichoderma</i> sp. b-c. <i>T. virens</i> (TV118) y <i>Fusarium</i> sp. d. <i>T. harzianum</i> (TV200) y <i>Fusarium</i> sp. (400X).....	36
Fig. 8. Áreas de crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. (cm ²) en suelo luego de 6 días. Las letras distintas muestran diferencias significativas a $p \leq 0,05$ (Mann-Whitney). Los valores son promedios de 5 réplicas $\pm$ error estándar.	43
Fig. 9. Crecimiento de diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> sp. (TV118, TV190, TV200 y TV243) durante 6 días en suelo proveniente de Trincheras, Edo. Carabobo. ..	43
Fig. 10. Cinética de germinación de semillas de <i>T. cacao</i> tratadas con y sin <i>Trichoderma</i> spp. (N x tratamiento=20).....	45
Fig. 11. Longitud del hipocotilo (mm) de semillas de <i>T. cacao</i> de siete días de germinadas en diferentes suspensiones de esporas de las cepas de <i>Trichoderma</i> sp. (TV118, TV190, TV200 y TV243). Las letras distintas indican diferencias significativas a $p \leq 0,05$ (Mann-Whitney) entre los tratamientos.....	46

Fig. 12. Biomasa radical y aérea (g) de plántulas de <i>T. cacao</i> de tres meses tratadas con diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> sp. (TV118, TV190, TV200 y TV243). Las letras distintas indican diferencias significativas a $p \leq 0,05$ (Mann-Whitney) entre los tratamientos.	48
Fig. 13. Número de hojas medidas semanalmente de las plántulas de <i>T. cacao</i> L. tratadas con y sin <i>Trichoderma</i> spp.	49
Fig. 14. Longitud del tallo (cm) medido semanalmente de las plántulas de <i>T. cacao</i> L. tratadas con y sin <i>Trichoderma</i> spp.	49
Fig. 15. Diámetro del tallo (mm) medido semanalmente de las plántulas de <i>T. cacao</i> L. tratadas con y sin <i>Trichoderma</i> spp.	50
Fig. 16. Densidad de pelos radicales y presencia de <i>Trichoderma</i> spp. en raíces de <i>T. cacao</i> . A. Raíces con <i>T. harzianum</i> (100X). B. Raíces sin <i>Trichoderma</i> (100X) C. Micelio y/o conidióforo de <i>T. harzianum</i> (400X). PR. Pelo radical. M-C. Micelio y conidióforo de <i>Trichoderma</i> sp.	51

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. Número de hojas de plántulas de <i>T. cacao</i> L inoculadas con <i>Trichoderma</i> spp. (TV118, TV190, TV200 y TV243) medidos semanalmente. Se presenta el promedio de hojas/planta y error estándar. Las letras distintas muestran las diferencias entre tratamientos semanalmente. [Kruskall-Wallis/Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)]	64
ANEXO 2. Número de hojas de plántulas de <i>T. cacao</i> L inoculadas con <i>Trichoderma</i> spp. (TV118, TV190, TV200 y TV243) medidos semanalmente. Se presenta el promedio de la longitud aérea de las plantas (cm) y error estándar. Las letras distintas muestran las diferencias entre tratamientos semanalmente. [Kruskall-Wallis/Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)]	64
ANEXO 3. Número de hojas de plántulas de <i>T. cacao</i> L inoculadas con <i>Trichoderma</i> spp. (TV118, TV190, TV200 y TV243) medidos semanalmente. Se presenta el promedio del diámetro de las plantas (mm) y error estándar. Las letras distintas muestran las diferencias entre tratamientos semanalmente. [Kruskall-Wallis/Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)]	65

RESUMEN

La agalla de puntos verdes en cacao es una enfermedad potencialmente importante en todo el mundo, afectando los cojines florales de las plantaciones siendo el agente causal el hongo fitopatógeno *Fusarium decemcellulare*. El género *Trichoderma* es reconocido por ser antagonistas de fitopatógenos y además, promotores del crecimiento en plantas. En este trabajo se evaluó la capacidad biocontroladora de *Trichoderma* spp sobre *Fusarium* sp *in vitro* y en vivero, así como también, el efecto de *Trichoderma* spp sobre la germinación y desarrollo de plántulas de *T. cacao*. A partir de muestras de agallas de cojines florales de cacao, se aisló e identificó morfológicamente el posible patógeno y se completaron los postulados de Koch para confirmar el agente causal de la enfermedad. Se realizaron enfrentamientos en cultivos duales en medio sólido del patógeno con *Trichoderma virens*, *T. asperellum*, *T. harzianum* y *T. koningiopsis* (TV118, TV190, TV200 y TV243, respectivamente). Para estudiar el efecto biocontrolador en vivero, se sembraron semillas de *T. cacao* previamente inoculadas con el patógeno y *Trichoderma* spp. Así mismo, se evaluó la capacidad colonizadora de *Trichoderma* sp. en suelo estéril y el efecto bioestimulante sobre el crecimiento de *T. cacao*. Se obtuvo un aislado con estructuras características de *F. decemcellulare*, observándose al reinocarlo en plántulas de cacao, la formación de agallas en axilas cotiledonarias de las plántulas. Las cepas de *Trichoderma* spp tuvieron un efecto competitivo y colonizador sobre *Fusarium* sp., observándose micoparasitismo con las cepas TV118 y TV200, pudiendo ser agentes promisorios para el biocontrol de *Fusarium* sp. Las plántulas con los tratamientos Fus-TV190 y Fus-TV200 mostraron entre el 52,63 y 45,45% de plantas afectadas y con Fus-TV118 el número de agallas fue menor encontrándose el 26,3 %. Las cepas TV200 y TV243 mostraron abundante esporulación en las placas con suelo estéril. Se obtuvo un incremento en la longitud del hipocotilo pero no en la germinación de las semillas. Por su parte, *Trichoderma* spp no ejerció una respuesta significativa en las variables de crecimiento y desarrollo de *T. cacao*, como lo son biomasa radical, aérea, diámetro del tallo, número de hojas, longitud de la raíz y de la parte aérea. Los resultados sugieren la posibilidad de incorporar algunas de estas cepas de *Trichoderma* spp en Programas de Manejo Integrado del cultivo de cacao.

Palabras clave: agalla, bioestimulante del crecimiento, micoparasitismo, control biológico.

1. INTRODUCCIÓN

El cacao, *Theobroma cacao* L., es un rubro agrícola muy importante en Venezuela, tanto por su calidad como por ser una fuente de empleo en las regiones donde se cultiva, siendo cultivado en diferentes regiones del país, como lo es la región sur-occidental, constituida por los estados Zulia, Mérida, Táchira, Apure y Barinas; la región centro-norte-costera, que comprende los estados Miranda, Aragua, Carabobo, Guárico y Yaracuy, y la región nor-oriental, a la cual pertenecen los estados Sucre, Monagas y Delta Amacuro (Sosa *et al.*, 2007).

Las enfermedades del cacao han constituido una de las principales limitantes de su cultivo en todo el mundo, cuantificándose pérdidas en toneladas métricas (Anon, 2008; Ploetz, 2007). Un buen ejemplo es el de los efectos devastadores de la enfermedad fúngica invasiva “escoba de bruja” que redujo la producción en Brasil en un 75% (de 400.000 a 100.000 ton) en tan sólo 10 años (Ploetz, 2007).

Las enfermedades que afectan a este cultivo son diversas, y su importancia varía entre las regiones productoras según la intensidad con que éstas se presentan. Así, se pueden encontrar enfermedades que terminan siendo más perjudiciales a largo plazo como es el caso de las agallas, causadas en algunos casos por *Fusarium* sp. Este es un género de hongos saprófitos y patógenos en animales y plantas, causante de pérdidas para la agricultura. Las especies de este género se encuentran en muchos tipos de hábitat y son capaces de prosperar bajo condiciones variadas de temperatura, nutrientes, tipos de sustratos, pH, por lo tanto, su control puede ser problemático (Quezada, 2008).

Para comprobar el agente causal de la enfermedad de agallas, se deben realizar los postulados de Koch, el cual es un método usado para establecer la etiología de una enfermedad infecciosa determinada (Timothy e Inglis, 2007). Para confirmar la hipótesis de que el patógeno es la causa de la enfermedad, este debe encontrarse

asociado con la enfermedad en todas las plantas enfermas que se "examinen", debe aislarse y desarrollarse en un cultivo puro en medios nutritivos. El patógeno que se desarrolle en un cultivo puro debe ser inoculado en plantas sanas de la misma variedad o especie en que apareció la enfermedad y debe producir la misma enfermedad en las plantas inoculadas (Agrios, 1991).

La práctica tradicional más común para la disminución y eliminación de los efectos perjudiciales, ocasionados por los agentes fitopatógenos se basa en el empleo de plaguicidas, práctica denominada control químico. Debido al enorme deterioro ambiental que supone la utilización indiscriminada de compuestos químicos, ha generado un gran interés la búsqueda de sistemas ambientalmente sostenibles para el control de plagas y enfermedades. Una estrategia promisorio es la utilización de microorganismos antagonistas de los agentes infecciosos y que desplazan a estos de una manera natural, denominada control biológico (Rudy *et al.*, 2011). Esta técnica forma parte de lo que se conoce como Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades (MIPE), el cual se define como la utilización de distintas técnicas de control, tomando en cuenta factores de tipo económico, ecológico y social que conlleven a la reducción de las poblaciones de organismos plaga y fitopatógenos por debajo de niveles que no causen daño económico (Clavijo, 1993).

Las agallas en cacao tienen la propiedad de extenderse por las plantaciones hasta disminuir la producción de mazorcas. Si bien las agallas no destruyen el árbol, con el tiempo hacen improductivas a las plantas y pueden constituir focos de contaminación, afectando a plantaciones sanas y como consecuencia, se puede generar una declinación de la producción en muchas regiones cacaoteras (Parra *et al.*, 2009). En trabajos realizados previamente en nuestro Laboratorio en plantaciones de cacao de Trincheras, Edo. Carabobo, la incidencia de esta enfermedad fue de hasta 69%, presentándose plantas con agallas de forma severa en tronco y ramas, lo que corresponden a focos de incidencia, donde el 30,9% de las plantaciones se encontraron sanas.

1.1 Planteamiento del problema

Las grandes pérdidas que ocasionan agallas en plantaciones de cacao afectan económicamente a los productores, en un rubro de tanto potencial de desarrollo para la economía del País. Adicionalmente no es recomendable el uso de agroquímicos para el control de enfermedades en las plantaciones de cacao. De esta forma se requieren de medidas de control efectivas y de bajo impacto sobre el ambiente.

1.2 Justificación

Se conoce que la habilidad de *Trichoderma* spp. para reducir los daños en enfermedades causadas por hongos fitopatógenos está ligada a su fuerte capacidad competitiva, así como a la antibiosis, por la producción de enzimas líticas y metabolitos secundarios y de igual manera al micoparasitismo. Muchas especies de este género son agentes de control biológico con potencial contra un sin número de enfermedades (Michel, 2001). De este hongo biocontrolador se ha reconocido que promueve mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos en algunas plantas, y que es capaz de modificar la rizósfera, colonizar el sistema radical y solubilizar nutrientes (Howell, 2003; Benítez *et al.*, 2004). Muchas de las especies endófitas de *Trichoderma* aisladas de ambientes de cacao se están estudiando por su potencial para proteger al cacao contra enfermedades (Rudy *et al.*, 2011). Por ello, el descubrimiento de cepas de *Trichoderma* spp. con estas características permitiría incluirlas en los Programas de Manejo Integrado del cultivo, con todos los beneficios que este tipo de técnicas amigables con el ambiente posee.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Estudiar la capacidad biocontroladora de *Trichoderma* spp sobre *Fusarium* sp. en *Theobroma cacao* L.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la actividad antagónica *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium* sp.
- Comparar el efecto de biocontrol de cepas de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium* sp. en condiciones de vivero.
- Evaluar el efecto de *Trichoderma* spp. sobre la germinación y desarrollo de plántulas de *T. cacao*.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 El cultivo de *Theobroma cacao* L.

El cacao pertenece a la Clase Dicotiledóneas, Orden Malvales, Familia Sterculiaceae, género *Theobroma*, especie *T. cacao* (Camacho, 1982; Quintero & Díaz, 2004; Rondón & Campos, 2005). Es un árbol de tamaño mediano (5-8 m), aunque puede alcanzar alturas de hasta 20 m, cuando crece libremente bajo sombra intensa (Maridueña, 2011).

La especie *T. cacao* es originaria de la cuenca alta del Amazonas específicamente entre los países: Colombia, Ecuador, Perú y Brasil. Luego se dispersaron en dos corrientes en función del tipo de cacao, los tipos criollos se orientaron hacia el Norte y los amazónicos hacia el Sur, que posteriormente se cruzaron y dieron origen a los cacaos trinitarios (Portillo *et al.*, 2006).

T. cacao es una planta que necesita un adecuado suministro de agua para efectuar sus procesos metabólicos. La precipitación y la temperatura son factores de mucha importancia debido a su relación con el desarrollo, floración y fructificación del cultivo de cacao controlando la actividad de las raíces y de los brotes de la planta.

La temperatura para el cultivo de cacao debe estar entre los valores siguientes: mínima de 23 °C, máxima de 32 °C, óptima de 25 °C (Maridueña, 2011).

El cacao es uno de los principales productos de importancia económica para el mundo. La producción de cacao en Venezuela ha estado vinculada a las enfermedades, incluso desde sus inicios como cultivo económico en el Siglo XVII (Reyes y Capriles, 2000). En Venezuela las plantaciones son viejas, en Barlovento (Estado Miranda) se asume que entre el 33% y el 38% de las fincas tienen plantaciones entre 21 y 60 años de edad, y cerca del 11% puede llegar a tener entre 61 y 80 años de edad (Liendo y Marín, 2006).

3.2 Enfermedad de agallas en cacao

El cacao como cualquier vegetal, es susceptible a la acción de microorganismos que alteran su desarrollo, disminuyendo así la productividad (Maridueña, 2011). Las enfermedades de cacao han constituido una de las principales limitantes del cultivo en todo el mundo. Así, la fitosanidad de una plantación depende de muchos factores: ubicación, tipo de cacao, patógenos presentes en el área, especies usadas como sombra y densidad de siembra, capacidad productiva de los clones e híbridos, manejo agronómico y receptividad de los productores al asesoramiento externo (Reyes y Capriles, 2000). Purdy *et al.*, (1998), han listado varias docenas de enfermedades de cacao, la mayoría de las cuales son causadas por hongos.

El complejo de agallas es una enfermedad potencialmente importante en todo el mundo (Ploetz, 2007), siendo las más comunes y estudiadas la de “puntos verdes” y la de cojín floral. Se presentan en todas las regiones del país y se considera una enfermedad menor, ya que su efecto es “silente” y no afecta directamente a los frutos o las almendras.

El daño es más frecuente en plantas medianamente jóvenes (10-12 años) de edad que en las viejas (50-60 años). Un hecho sorprendente reportado es que la enfermedad es mucho más grave y difundida en plantaciones de 2 a 3 años de edad obtenidas por estacas; donde es frecuente encontrar ramas con la totalidad de los cojines florales hipertrofiados (Malaguti, 1958).

3.3 Sintomatología

La manifestación más notoria del fenómeno es una hiperplasia o hinchazón en forma de agalla, localizada generalmente en el cojín floral (Malaguti, 1958). A veces, de una agalla emergen flores normales, las cuales pueden formar mazorcas; otras veces flores ligeramente deformadas. A partir de la agalla emergen brotes que pueden alcanzar tamaños de 5 a 20 cm de largo. De estos, por lo general se forman pequeñas ramas laterales que pueden tener hojas o flores. Ocasionalmente, de estas flores se forman mazorcas.

Las plántulas son más susceptibles y desarrollan síntomas dentro de las 2 semanas de la inoculación. El desarrollo de los síntomas en los cojines florales y tallos es más variable a menudo teniendo un máximo de 5 meses (Ploetz, 2007).

Se han descrito hasta cinco tipos de síntomas asociados a las agallas, describiéndose de perilla, florales, abanico, lobulares y de puntos verdes (**Fig. 1**).

- **Agalla de puntos verdes:** el síntoma comienza con la aparición de formas similares a brotes que aumentan rápidamente en número, adquiriendo un color verde brillante que poco a poco se va haciendo oscuro hasta terminar como pardo oscuro. En general, son de forma globosa, duras y se pueden separar fácilmente del tronco al que están unidas. A medida que envejece la agalla puede morir toda o por partes, entonces los puntos verdes de la parte muerta desaparecen y la agalla forma un color

negro carbonoso, y puede ser separada fácilmente. Esta agalla aparece generalmente en cojines florales, muy rara vez se observan en otras regiones de la planta (Brenes, 1981).

- **Agalla floral:** son de forma globosa y la característica más sobresaliente de estas agallas es la enorme cantidad de flores que van saliendo de cada punto y que en general van cayendo. Si el ataque es severo, se pueden ver todos los cojines florales afectados, incluyendo las ramas más o menos delgadas. Algunas veces una flor puede ser polinizada normalmente, pero si se hacen polinizaciones manuales se pueden conseguir mazorcas normales (Brenes, 1981).

- **Buba de perilla:** son en general pequeñas, aunque se han descrito agallas muy grandes. Son duras redondeadas, de superficie más bien lisa, en general nacen junto al cojín, pero no presentan flores. En general, están en troncos viejos y rara vez se localizan en ramas jóvenes. Su ataque no es muy severo en una plantación pero se pueden encontrar arboles con varias agallas (Brenes, 1981).

- **Agalla lobular:** se presentan en ramas o troncos, tiene una apariencia entre agallas de puntos verdes y una agalla floral pero de coloración marrón claro. Tiene una estructura en forma de crestas o lóbulos pegados unos con otros, adquiriendo una estructura redondeada (Brenes, 1981).

- **Agalla de abanico:** este tipo de agalla también se encuentra en cojines florales como estructuras alargadas de internudos cortos que crecen muy rápidamente y en ocasiones a lo largo de las “ramas del abanico” nacen algunas flores. Los crecimientos alargados en conjunto, dan la apariencia de un abanico que al secarse dan una estructura dura pero quebradiza (Brenes, 1981).



Fig. 1. Tipos de agallas en cacao. (A) Cojín floral, (B) puntos verdes, (C) perilla y (D) cojín floral sano. Fuente: Parra *et al.*, (2009).

3.4 Etiología

La agalla puede ser considerada como una enfermedad de etiología compleja. Se ha reportado que *Fusarium decemcellulare* Brick es el agente causal de las agallas de puntos verdes en cacao, produciéndose plantaciones con agallas en axilas cotiledonarias. Esta especie ha sido aislada de agallas de puntos verdes en Costa Rica y Venezuela (Hansen y Reyes, 1963).

Fusarium roseum se ha aislado en Nicaragua, considerado como otro agente capaz de inducir la misma enfermedad. Los síntomas inducidos por *F. roseum* y *F. decemcellulare* son idénticos a los que aparecen después de la inoculación con los aislamientos provenientes de América y Ghana (África) de *F. decemcellulare*, donde no se encontraron diferencias marcadas entre las enfermedades de agallas de puntos verdes en cojín floral en Nicaragua, Costa Rica y Venezuela (Hansen, 1963).

La agalla de cojines ha sido considerada una enfermedad menor en varios países como Brasil (Guimarães, 2013) y Cuba (Pérez *et al.*, 2012). Sin embargo, ha sido reportada epidémica en Nicaragua y Costa Rica con un 50-70% de incidencia de árboles infectados (Kevorkian, 1951). En Venezuela, se han encontrado plantaciones con el complejo de agallas (de puntos verdes, de cojín floral, lobulares, de abanico y

de perilla) causando daños en fincas del 15,5 % en la Región Nor-Oriental, 23,9% en la Región Centro-Norte-Costera y del 3,6 % en la Región Sur-Occidental (Parra *et al.*, 2009).

3.5 *Fusarium decemcellulare* Brick.

F. decemcellulare Brick 1908 (teleomorfo *Albonectria rigidiuscula* sinónimo: *Calonectria rigidiuscula* (Berk & Broome.) Sacc (Booth, 1971), pertenece a la División: Ascomycota, Clase: Sordariomycetes, Orden: Hypocreales y a la Familia: Nectriaceae. Este hongo normalmente, se encuentra en las zonas tropicales y subtropicales donde se asocia con el cancro de rama y muerte regresiva de una serie de árboles de frutas tropicales, como el aguacate, cacao, guaraná y el mango (Leslie y Summerell, 2006). En *T. cacao*, causa enfermedades importantes como las agallas en cojines, así como también, agalla en el tallo del níspero (*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl).

Este hongo es reconocido como endófito y patógeno de plantas dicotiledóneas, asociado como hospedador de las familias Anacardiaceae, Annonaceae, Apocynaceae, Bignoniaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Meliaceae, Moraceae, Myrtaceae, Poaceae, Sterculiaceae, Tiliaceae, Ulmaceae (Brunt y Warton, 1962; Booth, 1971; Guimarães, 2013).

El micelio aéreo del hongo es algodonoso con pigmentación rosa, donde son producidos en monofialides microconidios hialinos, que pueden ser formados en cadena o en “falsas cabezas”, con forma ovoide, midiendo 10-15 x 3-5 µm. Las macroconidias son formadas en esporodoquios de color amarillo, son curvos, cilíndricos y fusoides con una pared gruesa exterior, excepto para la célula basal en forma de pie. Cuando son maduros presentan de 7 a 10 septos que miden 55-130 x 6-10 µm. La especie no forma clamidosporas (Booth, 1971). El hongo bajo la forma perfecta homotética que se producen a partir de cultivos de peritecios monospóricos,

no inducen la formación de agallas, solo las formas heterotálicas son patogénicas (Pérez *et al.*, 2012; González, 2007).

3.6 Ciclo de la enfermedad

F. decemcellulare se disemina a través de macroconidios producidos en pequeños esporodoquios en tallos y ramas muertas, los microconidios desarrollados a partir de los micelios crecen en los tejidos recientemente infectados y las ascosporas producidas en tallos caídos y ramas muertas en el suelo en descomposición, teniendo además una fase saprófita en el suelo (Pérez *et al.*, 2012). Los peritecios se producen en pequeños grupos de estromas en ramas muertas que tienen mucho tiempo, y emergen a través de la producción de ascosporas en la corteza durante la temporada de lluvia, éstas se difunden por el viento o cuando la lluvia caída salpica a otras heridas o tejidos expuestos. El hongo puede sobrevivir como micelio vegetativo en la corteza, en los bordes de las lesiones del hospedador como esporas, como cuerpos de fructificación y como saprófito de la corteza (Pérez *et al.*, 2012).

3.7 Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de agallas en cacao

Se ha mencionado que las agallas de puntos verdes están presentes durante todo el año en las áreas afectadas. Como fuente de inóculo hay poca evidencia de una esporulación conidial de *Fusarium* relacionada con las agallas, sin embargo, se encuentran abundantes peritecios sobre mazorcas de cacao en descomposición sobre el suelo (González, 2007).

El progreso de la enfermedad en condiciones de sequía es lento, y progresa rápidamente bajo condiciones de alta humedad y alta luminosidad. Rangos de temperatura mínima de 10°C, máximas de 31°C y una óptima de 29°C son condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad (González, 2007). La ubicación del patógeno y el constante potencial del inóculo en el suelo a pesar de un

largo período de sequía, sugiere una buena adaptación de fase saprófita. Las clamidosporas no son producidas, sugiriendo que la probable estructura de resistencia o latencia sea el mismo micelio o los peritecios (González, 2007).

La infección y diseminación del patógeno *F. decemcellulare* puede ser facilitada por diferentes agentes patogénicos, como los insectos plaga (Litz, 2009). En África occidental los insectos *Distantiella theobromae*, *Sahlbergella singularis* y *Helopeltis* spp. (Heteroptera: Miridae) facilitan la infección y son factores importantes en el ciclo de la enfermedad de agallas (Ploetz, 2007). *Fusarium* también interactúa con patógenos que causan otros daños, como lo son *Diplodia theobromae* y *Phytophthora palmivora* (Ploetz, 2006).

3.8 Métodos de control

Son pocos los estudios que se han realizado sobre el control de la enfermedad de agallas en cacao. Delgado (1991), señala que dentro de los métodos culturales se debe realizar un mejor manejo de las plantaciones con adecuadas densidades de siembra; igualmente recomienda eliminar las plantas afectadas, cortar y quemar las agallas sin dañar los cojines florales. También se recomienda proteger los cortes con pasta cicatrizante y sembrar sólo material sano.

Otra forma recomendada para el control de la enfermedad es mediante el uso de variedades resistentes con fumigaciones dirigidas. Se han realizado estudios para combatir las agallas de puntos verdes con la aplicación de ocho fungicidas, donde las aplicaciones a base de Benlate + Daconil y la pasta Bordelesa fueron las que proporcionaron el control más efectivo de las agallas de puntos verdes (Delgado, 1991). Estudios similares acerca del control de *F. decemcellulare* fueron realizados por Rojas y Rondón (1995) en Mango (*Mangifera indica* L) para estudiar la acción que tienen ciertos fungicidas sobre el crecimiento y la esporulación de este

fitopatígeno. Para ello, utilizaron Benlate al 50% (Benomil), Actidione al 4,2% (Cicloheximida), Cobox al 84% (Oxicloruro de Cobre) y Vitavax 200 (Carboxin - Thiram); encontrándose que el Benomil produjo mayor inhibición del crecimiento de *F. decemcellulare* seguido de la Cicloheximida, Carboxin-Thiram y Oxicloruro de Cobre.

3.9 *Trichoderma* spp. como agente biocontrolador.

El género *Trichoderma* es un hongo cosmopolita, habitante natural del suelo y algunas de sus especies tienen la habilidad de producir enzimas que atacan o inhiben a hongos fitopatógenos, haciéndolo un excelente agente de biocontrol (Michel *et al.*, 2008). El género anamórfico *Trichoderma* Persoon 1794, pertenece a la Familia: Hypocreaceae, Orden: Hypocreales, Subclase: Sordariomycetidae, Clase: Ascomycetes, Phylum: Ascomycota, Reino: Fungi (CABI Bioscience, 2004). Son hongos saprófitos del suelo y la madera, de crecimiento muy rápido. Se presentan naturalmente en diferentes ambientes, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición.

El potencial de este hongo radica en el amplio espectro como antagonista para controlar fitopatógenos que afectan cultivos de interés comercial como maíz, cebolla, tomate, frijol, trigo, etc. (Michel *et al.*, 2008). La capacidad de producir diversos metabolitos y de adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos, le confiere a *Trichoderma* la posibilidad de ser utilizado en la industria biotecnológica.

El género *Trichoderma* en su estado vegetativo presenta micelio con septos simples. Las especies son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucano. Se reproducen asexualmente por conidios. Presentan conidióforos hialinos ramificados, fiálides simples o en grupos, conidios de 2,4-3,2 x 2,2-2,8 µm, generalmente ovalados, unicelulares, coloreados (usualmente verdes) de rápido desarrollo en medios sintéticos. Tiene la capacidad de producir clamidosporas en

sustratos naturales que son unicelulares pero pueden unirse entre dos o más. Estas estructuras son de vital importancia para la sobrevivencia del género en el suelo bajo condiciones adversas (Martínez *et al.*, 2013).

3.9.1 Mecanismos de control de *Trichoderma* spp.

El control de fitopatógenos por parte de *Trichoderma* resulta de la competencia por nutrientes y espacio o como resultado de la habilidad de *Trichoderma* para producir metabolitos que: impidan la germinación de las esporas del patógeno (fungistasis), que eliminen sus células (antibiosis) o modifiquen la rizósfera (variando el pH, etc.) de tal forma que el patógeno no pueda crecer. El control también puede resultar de la interacción directa de tipo micoparasítica entre *Trichoderma* y el patógeno, la cual involucra el contacto físico, la síntesis de enzimas hidrolíticas, compuestos tóxicos y/o antibióticos que actúan sinérgicamente con las enzimas. *Trichoderma* también puede tener efectos positivos sobre el crecimiento de las plantas, incrementando la solubilización de algunos micronutrientes e incluso estimulando sus mecanismos de defensa (Harman, 2000; Benítez *et al.*, 2004). Asimismo, Harman (2000) y Vinale *et al.*, (2008) han informado sobre nuevos mecanismos con los cuales *Trichoderma* ejerce su acción como antagonista y colonizador de las raíces, como son: aceleración del desarrollo del sistema radicular, solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos, estimulación del crecimiento vegetal e inducción de resistencia a patógenos. Estos actúan indirectamente sobre los patógenos ya que su acción es impulsar mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos en la planta. El estudio de estos modos de acción en condiciones de campo es complejo, pues *Trichoderma* es un hongo cuyo hábitat es el suelo y la mayoría de estos procesos se efectúan en la rizósfera.

3.9.2 Micoparasitismo

El micoparasitismo es definido como la interacción antagónica directa entre dos hongos, donde ocurre el parasitismo de un hongo hospedero por otro hongo denominado micoparásito; a través de la acción de enzimas hidrolíticas (quitinasas, celulasas, β -1,3-glucanasas y proteasas) que facilitan la degradación de la pared celular del hospedero (Hoyos *et al.*, 2008; Infante *et al.*, 2009).

El parasitismo parece consistir en varios eventos consecutivos que inician con una atracción y un crecimiento directo de *Trichoderma* spp. hacia el hospedero probablemente por quimiotropismo positivo. Subsecuentemente cuando el contacto se efectúa, en algunos casos se pueden formar estructuras parecidas a ganchos, presumiblemente accesorios, que probablemente permiten la penetración de la hifa en la célula (Michel, 2001).

Las enzimas desempeñan una función esencial en el micoparasitismo, ya que la penetración de la hifa de *Trichoderma* en su hospedante está regida por la maquinaria enzimática de este antagonista y depende más del aislamiento y del hospedante que de la propia especie del bioregulador. Entre las enzimas involucradas en estos procesos se encuentran las quitinolíticas, las β -glucanasas o celulasas, las polisacárido liasas, las proteasas y las lipasas, aunque las dos primeras (quitinansas y glucanasas) se consideran las más importantes en el proceso de control (Harman *et al.*, 1993; Cohen y Chet., 1998), pudiendo incluso actuar de forma sinérgica (Lorito *et al.*, 1993). Del mismo modo, se ha determinado que algunas de estas enzimas que degradan la pared celular (quitinasas especialmente) inhiben la germinación de esporas de hongos que contienen quitina en su pared celular y más aún, mientras mayor sea el contenido de quitina en la pared celular, mayor el grado de inhibición (Lorito *et al.*, 1993). De esta forma, *Trichoderma* spp. utiliza el contenido celular como alimento y ejerce así su función de control (Cohen y Chet., 1998). Diferentes interacciones hifales están involucradas en el micoparasitismo, tales como:

enrollamiento, penetración, vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis (Martínez *et al.*, 2013).

3.9.3 Antibiosis

Los metabolitos con actividad antifúngica secretados por *Trichoderma* constituyen un grupo de compuestos volátiles y no volátiles muy diverso en cuanto a estructura y función. Muchas cepas de *Trichoderma* producen estos metabolitos secundarios, algunos de los cuales inhiben otros microorganismos con los que no se establece contacto físico y estas sustancias inhibitorias fueron consideradas «antibióticos» (Martínez *et al.*, 2013).

Se han identificado compuestos del tipo de las alquilpironas (6- α -pentil-pirona), isonitrilos (isonitrina), poliquétidos (harzianolida), peptabioles (trichodermina, atroviridina, alameticina, suzucacilina y trichozianina), dicetopiperacinas (gliovirina y gliotoxina), sesquiterpenos (ácido heptelídico) y esteroides (viridina) (Martínez *et al.*, 2013). Muchas de estas sustancias ejercen un mejor efecto de control cuando actúan sinérgicamente con las enzimas degradadoras de la pared celular; incluso se ha demostrado la necesidad de la actuación de estas enzimas previo a la acción de antibióticos sobre el patógeno para ejercer un control eficiente (Benítez *et al.*, 2004).

La capacidad de una misma cepa de *Trichoderma* de secretar varios compuestos antifúngicos simultáneamente, limita el riesgo de aparición de microorganismos resistentes a estos metabolitos, aspecto relevante desde el punto de vista práctico. Estos resultados ejemplifican la importancia de la antibiosis como parte de la actividad antagonista de este hongo (Martínez *et al.*, 2013).

3.9.4 La competencia

Un factor esencial para que exista competencia, es la escasez o limitación de un requerimiento (espacio y/o nutrientes). La presencia de *Trichoderma* en suelos agrícolas y naturales en todo el mundo es una evidencia de su plasticidad ecológica y de su capacidad para competir por espacio y recursos nutricionales (Martínez *et al.*, 2013).

La competencia por nutrientes de *Trichoderma*, es principalmente por carbono, nitrato e hierro. *Trichoderma* posee una gran capacidad de movilizar y tomar nutrientes del suelo en comparación con otros organismos. De forma general, entre las cualidades que favorecen la competencia de este antagonista, se encuentra la alta velocidad de crecimiento que poseen gran parte de sus aislamientos y la secreción de metabolitos de diferente naturaleza que frenan o eliminan a los competidores en el microambiente. Este modo de acción influye en «bloquear el paso» al patógeno y resulta importante para la diseminación del antagonista (Martínez *et al.*, 2013).

La competencia evaluada bajo condiciones *in vitro* (cultivo dual), se ejerce principalmente por espacio. En ella intervienen la velocidad de crecimiento de las cepas del antagonista y factores externos como tipo de sustrato, pH y temperatura, entre otros (Martínez *et al.*, 2013).

Bajo condiciones *in vivo*, la competencia de *Trichoderma* en la rizósfera se relaciona con la capacidad de colonización de la raíz y el espacio adyacente. En ella influyen de forma importante factores como tipo de suelo, pH, temperatura y humedad (Hjeljord & Tronsmo, 1998). No obstante, la competencia en suelos o sustratos ricos en nutrientes por los que pudiera competir el patógeno no es eficaz. Debido a esto, en aquellos suelos ricos en materia orgánica o con fertilización completa, este mecanismo tiene menos valor práctico (Martínez *et al.*, 2013).

3.9.5 Estimulación del crecimiento vegetal.

La desactivación de los factores de patogenicidad de *Trichoderma* contra hongos fitopatógenos constituye un mecanismo de antagonismo indirecto poco estudiado. 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 (Martínez, *et al.*, 2013).

Según Harman *et al.* (2004), durante muchos años se supo de la habilidad de estos hongos para estimular el crecimiento de las plantas, en especial el sistema radicular. Sin embargo, aún no se conocen con certeza los mecanismos involucrados. Con relación a ese efecto existen opiniones divergentes. Smith *et al.* (1990) señalaron que estos incrementos pudieran atribuirse a la eliminación de patógenos menores que se encuentran en la rizósfera, mientras que Windham *et al.*, (1986) afirmó que *Trichoderma* era capaz de producir un factor regulador del crecimiento sobre plantas de diferentes cultivos. Recientemente, se encontró que una cepa de *Trichoderma* contribuye al crecimiento de las raíces de maíz y algunos pastos, haciendo que estos cultivos sean más resistentes a la sequía (Martínez *et al.*, 2013). Este mismo autor observó que aislamientos seleccionados de *Trichoderma* estimularon la germinación y la altura de plantas de frijol con una ganancia en peso de 60% aproximadamente. Por su parte Mathivanan *et al.* (2005) obtuvieron incremento significativo del crecimiento y floración en plantas de arroz con aplicaciones de *T. viride*. Otros autores relacionaron este fenómeno con la influencia de *Trichoderma* sobre la nutrición mineral de las plantas superiores. Nicholas (1965) indicó que *T. viride* suprimía la absorción de iones orgánicos e incrementaba la de glucosa a través de las raíces.

4. ANTECEDENTES

Fusarium decemcellulare se ha reportado como patógeno en *T. cacao* ocasionando las agallas de puntos verdes (Hansen 1963; Hansen & Reyes, 1963; Ploetz, 2006; Pérez *et al.*, 2012). Estos autores han obtenido aislados de *F. decemcellulare* de agallas de plantas adultas de cacao y fueron sembrados en medios de cultivo con PDA (papa-dextrosa-agar).

Hansen y Reyes (1963); Delgado (1991) y Guimarães (2013) inocularon semillas de cacao colocando sobre la herida una gota o una suspensión de 10^6 conidios/mL de *F. decemcellulare*. Las semillas inoculadas germinaron y al mostrar un crecimiento activo, se observó la formación de agallas de puntos verdes en las axilas de los cotiledones y en los tallos de las plántulas de cacao. Se pudo denotar que las agallas primarias y secundarias en plantas jóvenes pueden reproducirse por medio de la inoculación de las semillas con aislamientos de *F. decemcellulare* pudiendo reaislarse el mismo hongo de esas agallas. De esta manera, parte de las infecciones naturales de agallas de puntos verdes son causadas directa o indirectamente por *F. decemcellulare*, estado imperfecto de *Calonectria rigidiuscula* (Hansen y Reyes, 1963).

Como alternativa para el control biológico de enfermedades en cacao se ha usado *Trichoderma* spp. ya que tiene la capacidad de parasitar un gran número de hongos que incluyen patógenos entre los cuales se encuentra el género *Fusarium* sp. El género *Trichoderma* tan complejo en su identificación morfológica, ha mostrado gran diversidad en detritos en suelos de cacao. En la búsqueda de potenciales agentes de control biológico se han identificado mediante la secuenciación de los espaciadores ITS1 e ITS2 y el gen 5,8s, siete especies en 18 aislados: *T. harzianum* (=Hypocrea *lixii*), *T. asperellum*, *T. brevicompactum*, *T. koningiopsis* (=H. *koninigiopsis teleom*), *T. virens* (=Gliocladium *virens teleom*), *T. reesei* (=Hypocrea *jecorina teleom*) y *H. virens* (Sarmiento *et al.*, 2009).

Así mismo, Rivas y Pavone (2010) en plantaciones de *T. cacao* en el Estado Carabobo reportaron las especies *T. harzianum*, *T. virens*, *T. brevicompactum*, *T. theobromicola*, *T. koningiopsis*, *T. ovalisporum* y *T. pleurotum*, siendo la especie más abundante *T. harzianum*. Esta especie es muy utilizada en programas de control de hongos fitopatógenos (Harman, 2000; Benítez *et al.*, 2004) y se ha reportado que presenta una mayor capacidad de colonizar ambientes edáficos y el sistema radical de algunas especies vegetales induciendo resistencia a patógenos (Yedidia *et al.*, 2003).

Por su parte, *T. virens* ha sido reportado como un hongo benéfico capaz de promover el crecimiento en algunas especies vegetales (Contreras *et al.*, 2009). *T. koningiopsis* y *T. ovalisporum* pertenecen al complejo de especies *T. koningii*, reportándose como endofíticos en troncos de *T. cacao* y como potenciales agentes de biocontrol (Samuels *et al.*, 2006).

Se han realizado ensayos con la técnica de cultivo dual en placas de Petri en medio PDA con hongos biocontroladores del género *Trichoderma*. Esta técnica permite evaluar el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del patógeno y el área de la zona de inhibición (Fernández & Suárez, 2009; Rivas y Pavone, 2010; Adebola y Amadi, 2012; Pavone, 2012). *T. harzianum* ha sido evaluado sobre *F. oxysporum* empleándose la prueba *in vitro* de cultivo dual. Se evaluó la competencia por nutrientes y espacio así como también, micoparasitismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial por 10 días a 28 °C. En este estudio todos los aislamientos de *T. harzianum* superaron el crecimiento de *F. oxysporum* con radios de 7,42 cm. Mientras que el patógeno mostró un radio de 1,99 cm (Fernández y Suárez 2009).

T. harzianum ha sido probado para evaluar su efecto sobre la emergencia y el vigor de plantas a través de tratamientos de inoculación a las semillas o al suelo. El tratamiento reduce las contaminaciones externas por diversas especies de hongos en

cucurbitáceas, col, cebolla, ajo, rábano, remolacha, zanahoria, habichuela, tomate y pimiento, entre otros; incrementa además el porcentaje de germinación y estimula el crecimiento. En pruebas de protección de las semillas contra las infecciones postemergentes se registraron coberturas elevadas por el antagonista que reducen a menos de 50% las infecciones por *F. solani*. *Trichoderma* sp. se ha empleado en cultivo de pimiento, lográndose controlar el complejo *Fusarium* spp - *Phytophthora capsici* y reducir a 5% el número de áreas con más de 50% de plantas enfermas (Nalimova, 2007).

5. MARCO METODOLÓGICO

5.1 Material biológico

Se utilizaron cepas de *Trichoderma* spp. de la colección micológica del Centro de Biotecnología Aplicada (CBA) de la Universidad de Carabobo específicamente las cepas TV118 (*T. virens*) aislada del Estado Barinas, TV190 (*T. asperellum*) y TV200 (*T. harzianum*) aisladas del Estado Monagas y TV243 (*T. koningiopsis*) aislada del Estado Aragua. Las cepas se conservaron en placas de Petri con medio PDA (agar-papa-dextrosa) a 25 °C. Para los ensayos de vivero se utilizaron semillas de *T. cacao*, de la variedad forastero, provenientes de plantaciones de Trincheras, Municipio Naguanagua, Edo. Carabobo. Estas se extrajeron de mazorcas tomadas de diferentes plantaciones y luego fueron mezcladas.

5.2 Procesamiento de muestras para obtener aislamientos de *Fusarium* sp.

Para los aislamientos del patógeno se utilizó la metodología descrita por Delgado (1991). Muestras de agallas provenientes de plantaciones de cacao en Trincheras Edo. Carabobo fueron cortadas en trozos pequeños y desinfectadas con cloro al 5 % durante 1 minuto. Los trozos se lavaron tres veces en agua destilada

estéril y se secaron con servilletas estériles. Con una pinza esterilizada con etanol se colocaron los pequeños trozos en cámaras húmedas y otros se colocaron directamente en cajas Petri con medio PDA y Cefradroxilo (1 mg/mL). Posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente por 48 h. Los aislados fúngicos obtenidos de cámaras húmedas y en medio PDA fueron trasladados a medio PDA sin antibiótico para determinar la morfología de las colonias y realizar observaciones al microscopio.

5.3 Obtención de cultivos monospóricos de *Fusarium* sp.

Se utilizaron los aislamientos provenientes de placas con medio PDA. Con un asa de platino flameada se tomó parte de micelio y se colocó en frascos con 10 ml de agua destilada estéril para obtener una suspensión de conidios. La suspensión se esparció sobre la superficie de placas de agar-agua y fue descartada inmediatamente inclinando la placa. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente por 24 h para inducir la germinación de los conidios. Después de la incubación se observaron en un microscopio estereoscopio los conidios germinados, los cuales se transfirieron en una placa con medio PDA cortando parte del medio conteniendo el conidio germinado. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por una semana.

5.4. Identificación de los aislados de *Fusarium* sp.

Para la identificación morfológica preliminar del patógeno se realizaron montajes de los cultivos monospóricos en láminas portaobjetos para la observación al microscopio de estructuras características de los aislados (micelio, forma de las conidias, presencia de esporodoquio, fialides, etc) de acuerdo a Leslie y Summerell (2006).

5.4 Patogenicidad de *Fusarium* sp. sobre plántulas de *T. cacao*

Para determinar la patogenicidad del aislado de *Fusarium* sp. se deben completar los postulados de Koch. Se inocularon 20 semillas sumergiéndolas por 12 a 24 horas

en una suspensión de esporas realizada a partir de cultivos en placas con PDA resuspendidos en agua destilada estéril, ajustando a una concentración de 10^6 esporas/mL con ayuda de una cámara de Neubauer. Previamente, a las semillas se les removió la envoltura mucilaginosa mezclándolas con aserrín (no estéril). Como control se sumergieron un lote de semillas (20) en agua destilada estéril. Las semillas una vez inoculadas se sembraron en bolsas negras de polietileno de 1 Kg con tierra abonada de viveros locales y se colocaron en un invernadero proyectando aproximadamente 60% de sombra durante tres meses. Finalmente, se observaron los síntomas presenciando protuberancias de puntos verdes (agallas) en axilas cotiledonarias. En las plántulas que presentaron síntomas de agallas, el agente fitopatógeno fue reaislado y se volvió a identificar.

5.5 Efecto antagónico *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium* sp.

Se realizaron cultivos duales entre aislados de *Trichoderma* sp. y *Fusarium* sp. Para ello, en placas con PDA se procedió a colocar un disco de agar con micelio del patógeno (*Fusarium* sp.) en un extremo de la misma a 1 cm del borde y un disco de agar con micelio esporulado del antagonista (*Trichoderma* spp) por separado en el lado opuesto a 5 cm aproximadamente entre ellos (Howell, 2003). Como control se sembraron placas sólo con el patógeno. El ensayo fue realizado por quintuplicado. Los cultivos fueron incubados a 25 °C durante 7 días y se realizaron mediciones cada 24 h de las áreas de cada colonia. Para ello, se realizaron registros fotográficos de cada placa diariamente con una hoja de papel milimetrado como fondo para determinar las áreas de las colonias de cada hongo con el Programa *ImageTool for windows* v 3.0 (Donald *et al.*, 2001). Se tomaron muestras de micelio en la zona de confluencia de las colonias y en la periferia de las cepas cultivadas solas. Luego, se realizaron los respectivos montajes para su observación al microscopio óptico y así poder verificar enrollamientos característicos de procesos micoparasíticos (Pavone, 2012).

5.6 Evaluación de la actividad antagónica de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* sp. en plantas de cacao en condiciones de vivero.

Para la ejecución de este ensayo, se sembraron semillas de cacao previamente germinadas en bolsas de vivero con tierra abonada. Las semillas fueron inoculadas con el patógeno y *Trichoderma* spp. como se describe en 5.4. Posteriormente, se sumergieron en mezclas de suspensiones de esporas de *Fusarium* sp. y *Trichoderma* spp. (10^6 esporas /mL c/u) hasta su germinación. Las mezclas del patógeno se realizaron con cada una de las cepas de *Trichoderma* spp. por separado. Debido al escaso rendimiento en la prueba *in vitro* y al número limitado de semillas, la cepa TV243 fue excluida del ensayo, trabajando únicamente con las cepas TV118, TV190 y TV200. Para el ensayo se utilizaron 30 semillas por cada tratamiento (*Fusarium* solo, *Trichoderma* spp mezclados con el patógeno, *Trichoderma* spp. solo y un control). Para el control, las semillas se sumergieron en agua destilada. Finalmente, se evaluó el efecto controlador determinando el número de plantas con agallas de puntos verdes en axilas cotiledonarias en cada tratamiento.

5.7 Colonización de *Trichoderma* spp. en suelo.

Se utilizaron muestras de suelo provenientes de plantaciones de cacao de Trincheras, Edo. Carabobo. En placas de Petri de vidrio fueron colocados 25 g de suelo compactado y se procedió a esterilizar en autoclave para posteriormente hidratarlas con 5 mL de agua destilada estéril. Luego se procedió a colocar en el centro de la placa con suelo, un disco con micelio esporulado de cada cepa de *Trichoderma* spp. por separado, desarrollados en medio PDA durante una semana. El ensayo se realizó por quintuplicado. Posteriormente, las placas fueron incubadas a 25 °C y con luz artificial continua durante 6 días. Por último se determinó el área de cada colonia tal como se describe en 5.5.

5.8 Efecto de *Trichoderma* spp. en la germinación de la semilla y desarrollo de plántulas de *T. cacao*.

Para evaluar el efecto de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento y desarrollo de *T. cacao*, se sumergió un lote de semillas en suspensiones de las cepas de *Trichoderma* spp. (TV118, TV190, TV200 y TV243) por separado hasta su germinación conteniendo 10^6 esporas/mL provenientes de cultivos esporulados en medio PDA. Para los controles sin hongo, se sumergieron semillas en agua destilada estéril hasta su germinación. Cada tratamiento constó de 20 semillas. Durante dos semanas, se determinó la cinética de germinación (contabilizando el número de semillas germinadas por día) y la longitud del hipocotilo. Una vez germinadas las semillas fueron transferidas a bolsas de vivero con tierra abonada. Semanalmente, se registró la longitud aérea (cm) desde la corona radical hasta la yema apical en el vástago principal de la planta y se cuantificó el número de hojas totales por planta (adaptado de Aguirre *et al.*, 2007). También se determinó en las plántulas de dos meses, la longitud de la raíz y la biomasa seca aérea y radical. Para determinar la biomasa seca, las raíces fueron lavadas en agua corriente y separada de la parte aérea, colocándose en estufa a 60 °C por 3 días. Finalmente, se determinó la masa seca en una balanza analítica. También se realizaron montajes radiculares de las plántulas para observar la colonización o no de las raíces por parte de *Trichoderma* spp., colocando las raicillas en solución fijadora de Carnoy (etanol: ácido acético 3:1) durante 24 h a 4 °C lavándolas luego con agua destilada y tiñendo con eosina ácida al 5% durante 1 minuto (Núñez, 2012). Se realizó un último lavado con agua destilada y las raíces se montaron sobre una lámina portaobjeto con glicerina al 40%, se sellaron con esmalte de uñas transparente y se observaron bajo un microscopio óptico con un aumento total de 400X (Núñez, 2012).

5.9 Análisis estadísticos.

Para analizar los resultados en este estudio, se realizó estadística descriptiva, graficando el promedio y error estándar con el programa *Sigma Plot*, v 11.0 (Systat Software, San José, California, USA, www.systatsoftware.com). De no cumplirse los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, los datos fueron analizados con estadística no paramétrica mediante el análisis de varianza por rangos de Kruskal-Wallis, con el fin de verificar diferencias significativas entre tratamientos con el programa *Past*, v 2.17 (Paleontological statistic, http://paleo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm). A su vez, las medias de cada tratamiento se compararon mediante la prueba de Mann-Whitney ($P \leq 0,05$). Este mismo análisis fue aplicado para comparar las áreas de crecimiento en el ensayo de cultivo dual en medio sólido.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento de *Fusarium* sp.

El primer paso para la determinación del agente causal de una enfermedad en plantas, es el aislamiento e identificación de los microorganismos relacionados con esa sintomatología, para posteriormente determinar cuál de éstos, es el verdadero agente causal de la enfermedad a través de los postulados de Koch. A partir de agallas de cojines florales en cacao, se obtuvo un aislado de *Fusarium* sp. en medio PDA. De acuerdo a la caracterización morfológica éste presentó una coloración rosa y con el paso de los días la coloración se tornó a púrpura con pigmentos rojos producidos en el agar (**Fig. 2A**). En el micelio aéreo se observaron los conidióforos y conidias (microconidias) de forma oval midiendo $5-12,5\mu\text{m} \times 2,5\mu\text{m}$ con y sin septos (**Fig. 2B-C**). Asimismo, se observaron las macroconidias a partir de gotas de exudados de color amarillo en el cultivo midiendo $50-82,5\mu\text{m} \times 2,5-7,5\mu\text{m}$, septadas entre 5 y 8

septos (mayormente 7 septos) con la célula apical redondeada y la célula basal en forma de pie (**Fig. 2D**).

De acuerdo a Booth (1971); Leslie y Summerell, (2006); Pérez *et al.* (2012) el cultivo de *F. decemcellulare* (agente causal de las agallas de puntos verdes del cojín floral en cacao) en medio PDA inicialmente es de color blanco a crema y después de tres a cinco días se produce una pigmentación rosa en y sobre la superficie del agar que con la edad se vuelve más oscura, como se observó en el aislado obtenido en este estudio.

Se ha reportado que *F. decemcellulare* presenta microconidios de cadena larga y las células conidiógenas son únicamente monofiálides (Leslie y Summerell, 2006). Un carácter importante para la identificación de *F. decemcellulare*, es el número de septos de los macroconidios donde esta especie puede presentar de 5 a 9 septos pero usualmente se observan de 7 a 9 (Leslie y Summerell, 2006) por lo que es raramente confundida con otras especies del mismo género. En el aislado obtenido en nuestro trabajo no se observaron 9 septos, la mayoría presentaron de 6 a 8 septos. Pérez *et al.* (2012) reportaron macroconidias de 27-77µm x 3-5µm y microconidias de 6-16µm x 3-5µm. Booth (1971) reporta macroconidias de 55-130µm x 6-10µm y microconidias de 10-15µm x 3-4 µm.

F. decemcellulare ha sido aislado de agallas de puntos verdes en cacao reportándose en Venezuela y Costa Rica (Hansen y Reyes, 1963) así como también en Cuba (Pérez *et al.*, 2012) como causante de la enfermedad. Este hongo también ha sido aislado del mango (*Mangifera indica* L.) en el Oriente de Venezuela, encontrándose en muestras de entrenudos, yemas y hojas, siendo reconocido como agente causal de agallas o escoba de bruja en mango (Morales y Rodríguez, 2009; Castellano y Guanipa, 2004; Litz, 2009).

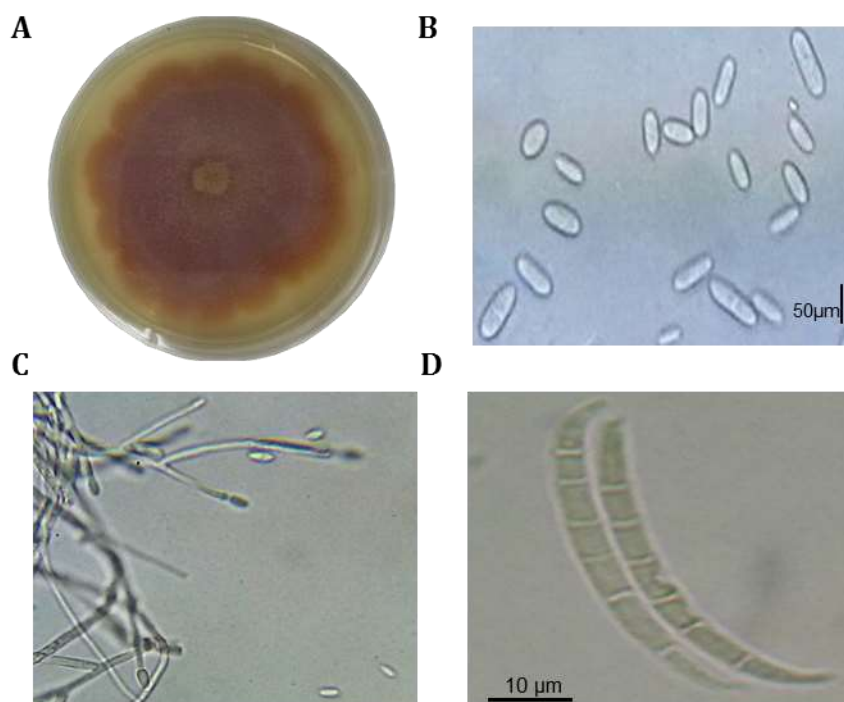


Fig. 2. Estructuras morfológicas de *F. cf. decemcellulare*. **A.** Colonia en medio PDA. **B.** Microconidias. **C.** Microconidias y conidióforo (400X). **D.** Macroconidias (400X).

Con base en los datos obtenidos de las características morfológicas del aislado de *Fusarium* sp. encontrado en este trabajo, se presume que el mismo puede identificarse como *F. cf. decemcellulare*. Se recomienda realizar una prueba de patogenicidad sobre plantas de *T. cacao*, para determinar si es el agente causal de las agallas colectadas en este trabajo. Además de la corroboración de la identidad del mismo a través de metodologías moleculares, amplificando y secuenciando los espaciadores transcritos internos del ADN ribosomal (ITS1 e ITS2).

6.2 Patogenicidad de *Fusarium* sp en plántulas de *T. cacao*.

Para asegurar que el aislado obtenido es el agente causal de la enfermedad, se realizó la inoculación en semillas de *T. cacao* con el aislado *F. cf. decemcellulare*. En plántulas de un mes de inoculadas se observó la formación de un crecimiento anormal de las yemas de axilas cotiledonarias. Luego de tres meses el crecimiento de

las agallas fue más avanzado, reportándose cinco plantas con la misma sintomatología (**Fig. 3**). Esto fue observado únicamente en las plántulas inoculadas con el aislado de *F. decemcellulare*, ya que en las plántulas inoculadas con agua no se observó esta sintomatología.

Una vez reaislado el patógeno de la agalla de las plántulas se obtuvieron las estructuras típicas del hongo como lo es el color de la colonia, micelio, conidióforo y conidias (detalladas anteriormente).

De acuerdo a la morfología del aislado obtenido a partir de las agallas de puntos verdes y los síntomas observados en las plantas inoculadas, los mismos coinciden con la descripción de la enfermedad de agallas en cacao causada por *F. decemcellulare*, siendo posible la reproducción a partir de inoculaciones en semillas, observándose las agallas en axilas cotiledonarias de plántulas jóvenes (Hansen y Reyes, 1963; Hansen, 1963; Booth, 1971; Pérez *et al.*, 2012; Guimarães, 2013). Algunos autores usan el nombre del teleomorfo *C. rigidiuscula* (anamorfo: *F. decemcellure*) (Brunt y Warton, 1962; Pérez *et al.*, 2012).

Hansen (1963) inoculó semillas de cacao tipo Trinitario con un aislado de *F. decemcellulare* donde luego de 28 días las plantas infectadas desarrollaron una hinchazón anormal de las yemas cotiledonares y a los 37 días se observó claramente la agalla afectando al 84% de las plantas inoculadas.

Delgado (1991) menciona que los primeros síntomas de la enfermedad consisten en la aparición de una o más protuberancias sobre las cuales se forman unos puntos verdes semejantes a yemas, cuyo número aumenta a medida que crece la agalla, pudiendo alcanzar un diámetro de uno o más centímetros. Este autor reportó la manifestación de los síntomas a los 21 días después de sembradas e inoculadas las semillas de cacao, siendo las plántulas más susceptibles pudiendo desarrollar síntomas luego de dos semanas (Ploetz, 2007).

F. decemcellulare se encuentra en diversos árboles en las zonas tropicales. Esta especie es débilmente agresiva y requiere de heridas para infectar el cacao, las cuales pueden ser ocasionadas por *Diplodia theobromae* y *Phytophthora palmivora*. Se ha

mencionado que *Distantiella theobromae* y *Sahlbergella singularis* facilitan la infección y son factores importantes en el ciclo de la enfermedad de agallas de cojín (Ploetz, 2006).

Si bien el manejo de las enfermedades en cacao ocasionada por patógenos (*Albonectria rigidiuscula*, *Diplodia theobromae* y *Phytophthora. palmivora*) o insectos (míridos) incluye la extracción y la quema de árboles sintomáticos (Ploetz, 2007) en este estudio se busca una medida de biocontrol que pueda prevenir el desarrollo de la enfermedad de agallas en cojines florales pudiendo actuar sobre el agente causal.



Fig. 3. Patogenicidad en plantas de *T. cacao* inoculadas con *F. cf. decemcellulare* a los tres meses de desarrollo. **A.** Plantas de cacao infectadas. **B-C.** Vista con detalle de las agallas en axilas cotiledonarias. **D.** Planta de cacao sin agallas.

6.3 Efecto biocontrolador *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium* sp.

Una vez evaluado el aislado obtenido de *F. cf. decemcellulare* en vivero, se procedió a determinar la capacidad de varias cepas del hongo *Trichoderma* spp. sobre el control del mismo *in vitro*. Para poder comprobar esta capacidad existen varias metodologías, que cada una, aportan evidencias sobre ese parámetro. El primer ensayo realizado en este sentido, se basó en observar la cinética de crecimiento del patógeno en presencia de *Trichoderma* spp. Este experimento fue realizado en placas con medio PDA (cultivo dual). Los resultados del crecimiento del patógeno se muestran en la **Tabla I**.

Tabla I. Crecimiento de *F. cf. decemcellulare* (Fus) y *Trichoderma* spp, (TV) (cm²) en cultivos duales en medio sólido (PDA). Se presenta el promedio y error estándar de cinco réplicas. En la columna 120 h-Fus se muestra la comparación de medias para las áreas de *F. cf. decemcellulare* en presencia de *Trichoderma* spp. a los cinco días. Las áreas con letras distintas muestran diferencias significativas entre sí a $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis/Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)).

Cepa	Área de la colonia (cm ²)							
	48 h		72 h		96 h		120 h	
	TV	Fus	TV	Fus	TV	Fus	TV	Fus
<i>Fusarium</i> sp.	-	0,95 ±0,33 ^a	-	2,7 ±0,56a	-	4,43 ±0,55ab	-	5,63 ±1,07c
TV118	5,95 ±0,2	0,67 ±0,12a	17,3 ±0,43	1,62 ±0,25a	38,17 ±1,4	2,7 ±0,29abc	55,02 ±2,87	3,42 ±0,55ab
TV190	8,13 ±0,48	0,56 ±0,41a	25,75 ±1,27	1,5 ±0,11a	48,26 ±0,59	3,09 ±0,2ab	57,35 ±3,62	3,43 ±0,34ab
TV200	10,0 ±0,43	0,51 ±0,03a	30,13 ±0,31	1,66 ±0,07a	53,52 ±0,49	2,34 ±0,14ac	57,94 ±1,7	2,5 ±0,59b
TV243	11,53 ±0,68	0,54 ±0,84a	32,83 ±1,6	1,69 ±0,13a	54,07 ±0,7	2,76 ±0,17abc	58,35 ±3,44	2,9 ±0,37ab

En la **Fig. 4** se observa la cinética de crecimiento de *Fusarium* sp. en presencia de diferentes cepas del hongo biocontrolador *Trichoderma* sp. en placas de PDA. Se observa que el crecimiento del fitopatógeno fue disminuido en presencia de *Trichoderma* spp., encontrándose diferencias significativas a partir del día 4 ($p < 0,05$)

presentando las cepas de *Trichoderma* sp. mayores áreas como se reporta en la **Tabla I**. En presencia de las cepas TV200 y TV243 comenzó a crecer más lento en contraste con las cepas TV118 y TV190 (**Fig. 4 y 5**) notándose que el biocontrolador mantuvo un crecimiento más rápido. Durante la interacción, las cepas de *Trichoderma* spp. no inhibieron el crecimiento de *F. cf. decemcellulare* pero si lo disminuyó.

El área de crecimiento de *Fusarium* sp. solo (control) fue mayor, alcanzando en el día 5 un área promedio de $5,63 \pm 1,07 \text{ cm}^2$ en contraste con las áreas de *Fusarium* sp. en presencia de las cepas TV118, TV190, TV200 y TV243 diferenciándose todos los tratamientos del control el día 5 ($p < 0,05$) como se muestra en la **Fig. 5**. Resultados similares han sido reportados por Michel (2001). Este autor encontró que cepas de *T. harzianum*, *T. virens*, *T. koningii* y *T. longibrachiatum* presentaron mayores tasas de crecimiento en contraste con los fitopatógenos *F. subglutinans* y *F. oxysporum*. El mismo resultado ha sido reportado por Guédez *et al.* (2012) utilizando a *T. harzianum*. Esto sugiere que existe represión del crecimiento por parte de *Trichoderma* spp. sobre *F. cf. decemcellulare* como lo mencionan Fernández y Suárez, (2009) donde el crecimiento del patógeno *F. oxysporum* mostró una diferencia significativa comparado con el testigo, influyendo *T. harzianum* sobre su crecimiento. Cabe acotar que en diferentes estudios de cultivos duales en medio sólido, los autores se basan en el radio de la colonia y no en el área como en este estudio. Esto puede conllevar a errores en la medición, ya que es probable que las colonias del hongo no crezcan como una circunferencia perfecta, por lo que la forma más exacta de medir estos parámetros es a través de la determinación del área real de la colonia (Pavone, 2012).

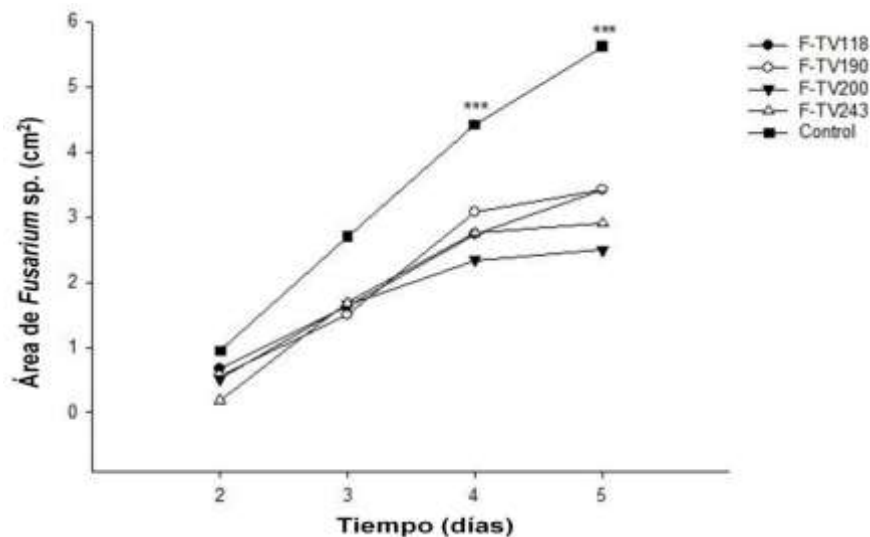


Fig. 4. Cinética de crecimiento de *F. cf. decemcellulare* medida durante 5 días en presencia o no de *Trichoderma* spp.***= diferencias significativas con $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis). A partir del día 4 se observó el contacto entre las colonias. La figura fue realizada con base en los datos promedio presentados en la **Tabla I**.

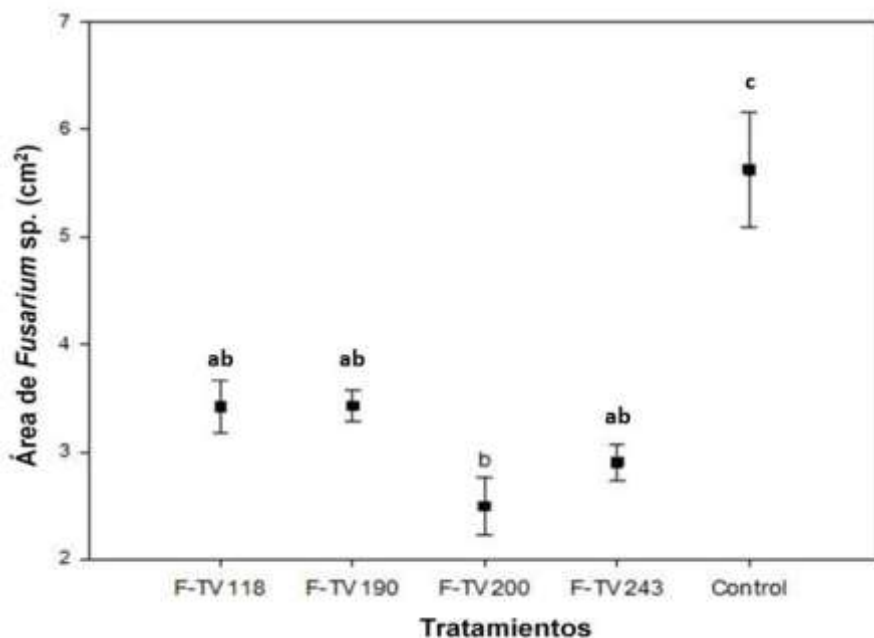


Fig. 5. Área de crecimiento de *F. cf. decemcellulare* (cm²) en presencia de diferentes cepas de *Trichoderma* sp. (TV118, TV190, TV200 y TV243) en el día 5 en medio PDA. Las letras distintas muestran diferencias significativas a $p < 0,05$ (Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)). Los valores son promedios de 5 réplicas $\pm$ error estándar.

Martínez *et al.* (2013) mencionan que un factor esencial para que exista competencia es la escasez o limitación de un requerimiento (espacio y/o nutrientes). Esto se evidenció durante la interacción entre ambos hongos donde el biocontrolador ocupó el área del fitopatógeno, superponiéndose sobre éste completamente en el día 6 (**Fig. 6**).

La competencia evaluada bajo condiciones *in vitro* (cultivo dual) es ejercida principalmente por espacio y en ella intervienen la velocidad de crecimiento de las cepas del antagonista y factores externos como tipo de sustrato, pH y temperatura, entre otros (Martínez *et al.*, 2013). En este estudio, todas las cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas presentaron un crecimiento más rápido, dónde las cepas TV200 y TV243 lograron contacto con el patógeno en el cuarto día, mientras que las cepas TV118 y TV190 lo hicieron en el quinto día. Sin embargo, se han reportado contactos más rápidos de cepas de *T. harzianum* sobre *Fusarium* sp. a partir del tercer día y de *T. virens* en el cuarto día (Michel, 2001).

La velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, debido a la riqueza de enzimas que posee, son caracteres ventajosos en la disputa por colonizar el área; ésta es una manera de ejercer biocontrol, al reducir o detener completamente el desarrollo del micelio (Guédez *et al.*, 2012; Infante *et al.*, 2009).

La evaluación de la capacidad de esporulación puede ser un buen indicativo ya que permite evaluar si las cepas de *Trichoderma* estudiadas ejercen un efecto sobre la esporulación del patógeno. Esto no fue cuantificado en este estudio, sin embargo, se observaron microconidias al momento de tomar parte del micelio y ser observado al microscopio.

Michel (2001) reportó abundante esporulación para *F. subglutinans* y *F. oxysporum* en presencia de diferentes cepas de *Trichoderma* sp. Este autor reportó un efecto antibiótico de quitinasas y glucanasas por parte de *Trichoderma* sp. sobre *F. subglutinans* y *F. oxysporum* encontrando una reducción en el número de conidios,

donde el mayor efecto lo tuvieron las especies *T. harzianum*, *T. koningii* y *T. longibrachiatum*. Estas enzimas degradan la pared celular de hongos fitopatógenos, inhibiendo el crecimiento del micelio y potencial reproductivo por lo que pueden ser prospectos para utilizar en el control biológico (Lorito *et al.*, 1994).

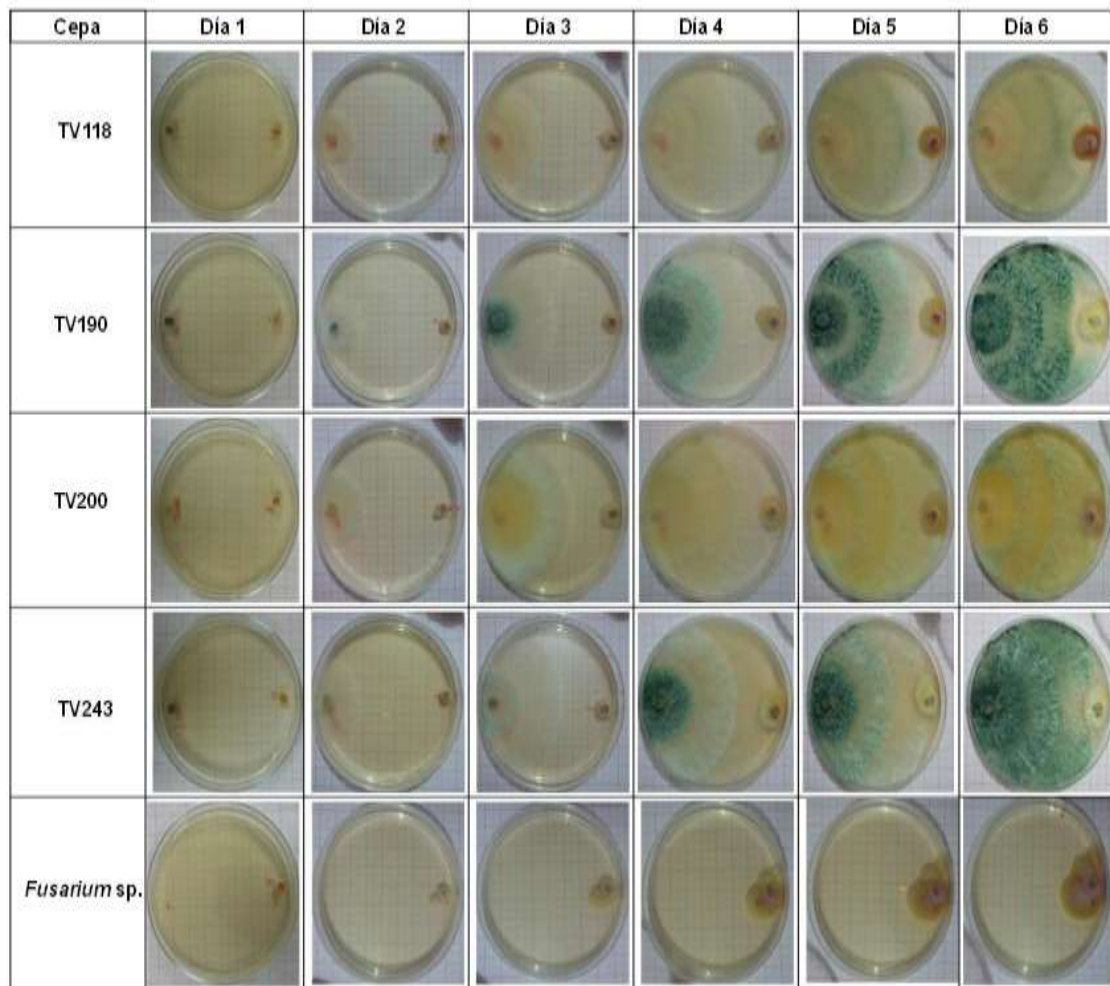


Fig. 6. Crecimiento secuencial de cultivos duales en medio PDA entre *Trichoderma* spp. y *F. cf. decemcellulare*. Se presenta la fotografía de una de las cinco réplicas realizadas en el experimento.

En este estudio se observó abundante esporulación de *Trichoderma* sp. donde las cepas TV190, TV200 y TV243 llegaron a crecer sobre el patógeno. Michel (2001) encontró el micelio esporulado hasta la zona de intersección, alcanzando esporular toda la superficie de la placa, aun sobre el crecimiento de *F. oxysporum*. Esto pone de manifiesto la agresividad del hongo antagónico, donde *T. harzianum*, *T. koningii* y *Trichoderma* sp. mostraron mayor agresividad. El crecimiento de *F. oxysporum* al estar en contacto con las cepas de *Trichoderma* spp, específicamente con las cepas de las especies *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*, disminuyó.

El micoparasitismo es otro de los mecanismos de acción del hongo biocontrolador *Trichoderma* sobre los fitopatógenos y su habilidad para parasitar se ha demostrado convincentemente. En este estudio se observaron enrollamientos micoparasíticos únicamente con las cepas TV118 (*T. virens*) y TV200 (*T. harzianum*) sobre *Fusarium* sp. luego de 5 días (**Fig.7a-d**). Antes del contacto con el patógeno se observó la forma en espiral del micelio de *Trichoderma* sp. (**Fig.7a**) luego, se observó el enrollamiento de éste sobre las hifas de *F. cf. decemcellulare*. (**Fig.7b-c-d**). Durante la observación no se encontró penetración en hifas de *F. cf. decemcellulare*, observándose conidios de *Fusarium* sp. y *Trichoderma* spp.

Michel (2001) reportó enrollamientos de cepas de *T. harzianum* sobre *F. oxysporum* y de *T. virens* sobre *F. subglutinans*. Sobre *F. oxysporum* se ha reportado penetración de las hifas por *T. harzianum*. El mismo autor encontró abundante esporulación de *Trichoderma* sp. las cuales se encontraron entremezcladas con las hifas. Otros autores han reportado únicamente la acción competitiva de *Trichoderma* inhibiendo el crecimiento del patógeno, donde no se llega a observar el efecto micoparasítico. Esto se ha encontrado con aislados de *T. harzianum* sobre *F. oxysporum* y *F. solani* (Fernández y Suárez, 2009; Kim y Knudsen, 2013). Pavone (2012) menciona que el hecho de que *Trichoderma* spp. haya colonizado toda la placa no es un indicio de micoparasitismo, lo cual fue observado con las cepas TV190 y TV243.

Se conoce que *Trichoderma* spp. después de reconocer a su hospedero lo ataca, crece en espiral y produce un apresorio el cual lo auxilia en la penetración de la pared celular y de la nutrición del huésped (Michel, 2001). Carsolio *et al.* (1999) menciona que 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. Diversos autores han informado para *Trichoderma* diferentes tipos de interacción hifal como parasitismo, considerándolos una potencialidad para su uso como biorreguladores de hongos del suelo (Infante *et al.*, 2009).

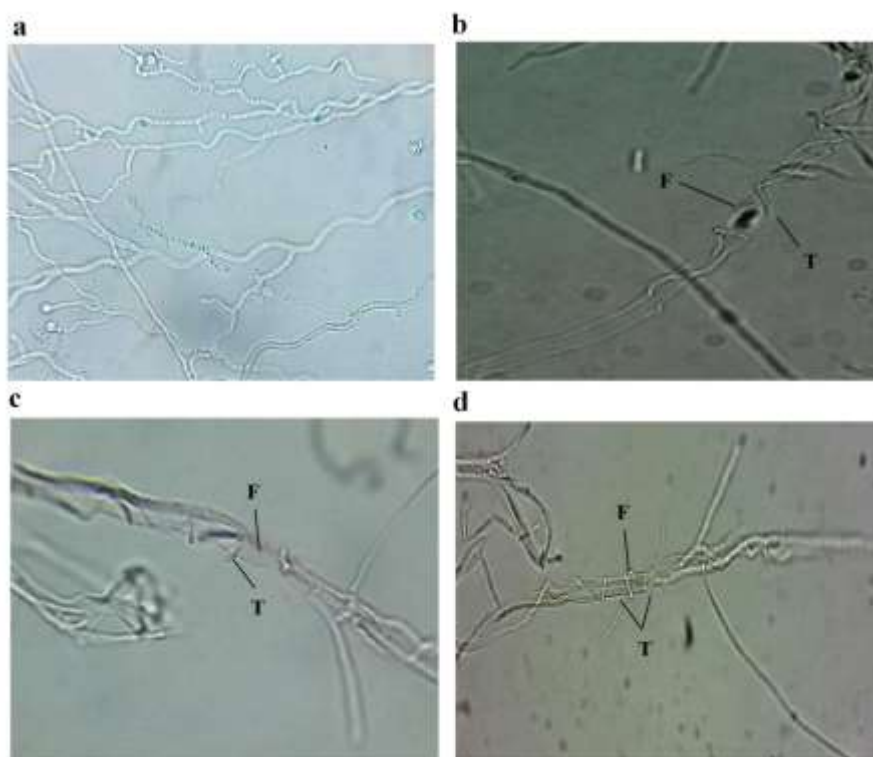


Fig. 7. Enrollamiento de las hifas de *Trichoderma* spp (T) sobre *Fusarium* sp (F). **a.** Hifas de *Trichoderma* sp. **b-c.** *T. virens* (TV118) y *Fusarium* sp. **d.** *T. harzianum* (TV200) y *Fusarium* sp. (400X)

El reconocimiento se realiza a través de interacciones lectinas-carbohidratos. Las lectinas son proteínas enlazadas a azúcares o glicoproteínas, las cuales aglutinan

células y están involucradas en las interacciones entre los componentes de la superficie de las células y su ambiente extracelular (Chet *et al.* 1998).

La producción de enzimas relacionadas con el parasitismo, son tomadas en cuenta como criterio en la selección de aislamientos para biocontrol (Infante *et al.*, 2009). Se ha encontrado que los aislamientos de *Trichoderma* eficaces en el control de patógenos vegetales, son capaces de producir glucanasas, quitinasas y proteasas.

De acuerdo a los estudios realizados con *Trichoderma* sp. se ha llegado a la conclusión de que la producción del factor inhibidor del biocontrolador depende más del aislamiento que de la propia especie (Infante *et al.*, 2009; Michel, 2001); lo que incrementa la búsqueda constante de nuevos aislamientos de este antagonista (Infante *et al.*, 2009).

Existen pocas investigaciones que reporten el potencial de *Trichoderma* como agente de control biológico de especies de *Fusarium*. Se ha reportado que *T. harzianum* es efectivo contra *F. oxysporum* y *F. solani* en *Lycopersicum esculentum* M. y *Passiflora edulis* Sims. (Fernández y Suárez, 2009; Guédez *et al.*, 2012) y *T. viride* inhibe el desarrollo de *F. moniliforme*. Asimismo, *T. koningiopsis* ha mostrado una alta eficacia en el control de *F. oxysporum*, siendo capaz de retrasar la colonización de los haces vasculares en comparación con las plantas que solo estaban infectadas con el patógeno (Jaimes *et al.*, 2009).

A pesar de que la técnica en cultivos duales en medios agarizados no brinda mucha información sobre lo que ocurre en campo, estos resultados son de mucha importancia ya que indican que las cepas de *Trichoderma* sp. *in vitro* por su actividad micoparasítica y colonizadora sobre *Fusarium* sp. son agentes promisorios para el biocontrol de la enfermedad. Pavone (2012) menciona que el entendimiento de cómo los biocontroladores ejercen su efecto protector es un prerrequisito para su aplicación práctica efectiva, lo cual permite una selección adecuada, producción, formulación, uso y registro.

Las cambiantes condiciones ambientales son un factor importante en el biocontrol de enfermedades, ya que influyen en la acción de los diferentes mecanismos que

resultan en un efecto protector muy complejo, debido a las interacciones entre plantas, microorganismos, patógenos y el agente de biocontrol (Massart y Jijakli, 2007). Es por ello, que se debe comprobar la eficacia del biocontrolador en ensayos de vivero y campo, lo que permite identificar cual es la mejor cepa biocontroladora (Pavone, 2012).

6.4 Biocontrol en vivero de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium* sp.

Como se mencionó en la sección anterior, los ensayos *in vitro*, si bien son importantes para preseleccionar cepas con posible potencial biocontrolador, no predicen por si solas la actuación en campo de la cepa. En este sentido, se realizaron ensayos de vivero para verificar la capacidad de controlar a *F. cf. decemcellulare* por parte de *Trichoderma* spp. En la **Tabla II** se muestra el número de plantas tratadas con *Trichoderma* spp. y *F. cf. decemcellulare*. Se observa que las plántulas tratadas con los tratamientos Fus-TV190 (*Fusarium-T. asperellum*) y Fus-TV200 (*Fusarium-T. harzianum*) mostraron entre el 52,63 y 45,45% de plantas afectadas con agallas y el control con *F. cf. decemcellulare* mostró el 52,17%. En el tratamiento Fus-TV118 (*Fusarium-T. virens*) se presentó un número menor de agallas en axilas cotiledonarias, afectando al 26,3% de las plantas. También fueron observadas agallas en yemas axilares (agallas secundarias) en algunas plantas. La presencia de las agallas secundarias se ha reportado en plantas jóvenes (Hansen y Reyes, 1963).

En *T. cacao* se han realizado estudios donde cepas de *Trichoderma* han colonizado tejidos de la parte aérea, raíces, tallos y hojas. Lo cual es una capacidad de colonizar las partes de la planta, que es de interés clave en el control de enfermedades de cacao (Bailey *et al.*, 2008). Este puede ser el primer paso para el desarrollo de una estrategia de control biológico para las enfermedades de cacao. Un estudio más a fondo puede ser considerado para el biocontrol de la enfermedad de agallas ya que el organismo causante tiende a hospedar los tejidos aéreos afectando los cojines florales

de las plantas adultas o encontrarse los peritecios sobre mazorcas en descomposición sobre el suelo (González, 2007).

Tabla II. Número de plantas de *T. cacao* de un mes de crecimiento, inoculadas o no con *Trichoderma* spp. y *F.cf. decemcellulare* con agallas en axilas cotiledonarias.

Tratamientos	Nro. de plantas con agallas	Nro. total de plantas inoculadas *
Control (<i>Fusarium</i> sp.)	12	23
Fus-TV118	5	19
Fus-TV190	10	19
Fus-TV200	10	22

* se reportan únicamente las plantas que no sufrieron mal del tallo.

En cacao no se ha reportado el control de la enfermedad de agallas con organismos biocontroladores. Los estudios han estado enfocados en el crecimiento y la esporulación del patógeno *F. decemcellulare* en mango (*Mangifera indica* L) con compuestos químicos (Delgado, 1991; Rojas y Rondón, 1995). Se han probado mezclas de micoparásitos para controlar hongos fitopatógenos en cacao como lo son *Moniliophthora roreri*, *P. palmivora* y *Crinipellis perniciosus* causantes de la moniliasis, escoba de bruja y pudrición negra de la mazorca, respectivamente (Krauss y Soberanis, 2001).

En este trabajo se logró reproducir las agallas en plántulas jóvenes con el fin de evaluar si *Trichoderma* sp. tiene un efecto biocontrolador sobre el patógeno. Si bien la metodología utilizada en los ensayos de vivero no representa de forma exacta lo que ocurre en campo, es una forma de aproximarnos a esta condición.

La cepa TV200 no fue muy efectiva sobre el control del patógeno y en la reducción de la incidencia de las agallas en las plántulas, lo cual no fue similar a los resultados obtenidos *in vitro*, donde esta cepa llegó a colonizar y a tener un efecto micoparasitico sobre *F. cf. decemcellulare* en cultivo dual en medio sólido. Sin

embargo, con el tratamiento con Fus-TV118 se observó una reducción en el número de plantas afectadas.

Diferentes especies de *Trichoderma* han sido extensamente estudiadas por su potencial en el biocontrol. *T. harzianum* ha sido aplicado en el tratamiento de semillas o suelo y también ha sido usado en aplicaciones foliares para el control de enfermedades de manzana, uva y otros cultivos de frutas (Bailey *et al.*, 2008).

La especie *T. virens* se ha empleado como biocontrolador de fitopatógenos para diferentes variedades de cultivos a escala mundial. Su mecanismo de biocontrol es el micoparasitismo, produciendo compuestos antifúngicos (Wiest *et al.*, 2002).

Los aislados *T. hamatum* y *T. asperellum* han sido también otras especies de *Trichoderma* que han demostrado ser efectivas en la inducción de resistencia a enfermedades en muchas especies (Howel, 2003; Yedidia *et al.*, 2003). Se ha demostrado que la competencia por nutrientes de *Trichoderma* es el mecanismo más usado por *T. harzianum* para el biocontrol de *F. oxysporum* (Vinale *et al.*, 2008).

Bailey *et al.* (2008) señala que los aislados *T. harzianum* y *T. asperellum* fueron los más consistentes colonizadores por los métodos de inoculación antes de la siembra y en el suelo. García *et al.* (2012) aplicaron *T. asperellum* sobre microtubérculos-semillas de papa, reportando bajas incidencias de rhizoctoniasis que estuvieron en 2,23 y 3,9% con baja severidad de daño y una reducción de la enfermedad de 83 y 80% respectivamente, con relación a las plantas testigos que presentaron 20% de incidencia y mayor severidad de daño.

Anees *et al.* (2010) evaluaron cepas de *Trichoderma* spp. contra *R. solani* *in vivo* e *in vitro*. Estos autores no encontraron una correlación positiva entre la producción de sustancias inhibidoras solubles en agua o enrollamiento de hifas de *R. solani*, con la reducción de la enfermedad *in vivo*. Bailey *et al.* (2008) menciona que la capacidad de colonizar las plántulas de cacao no está vinculada críticamente a cualquier capacidad de antibiosis o micoparasitismo. Esto nos lleva a decir que no es posible extrapolar la actividad antagónica en condiciones de invernadero basándose en experimentos *in vitro*, ya que no se garantiza un efecto biocontrolador *in vivo*.

Adebola y Amadi, (2012) indican que el lapso de tiempo entre la inoculación del antagonista y el patógeno contribuye al éxito del antagonista contra el patógeno. Esto permite un adecuado incremento de la concentración de células y la posterior colonización por el antagonista antes de la llegada del patógeno.

La selección de aislados de *Trichoderma* con buena capacidad para colonizar internamente a la planta (hongos endofíticos) además de otros atributos como micoparasitismo, antibiosis y/o resistencia inducida podría mejorar en gran medida las posibilidades del desarrollo de estrategias de control biológico funcionales para las enfermedades del cacao (Bailey *et al.*, 2008).

Los ensayos *in vitro* y en vivero permitieron observar la interacción entre el biocontrolador y el fitopatógeno bajo condiciones controladas. Sin embargo, los ensayos en campo son los que definen la eficacia del biocontrolador sobre el fitopatógeno; en los cuales se enfrentan las condiciones definitivas y reales que marcará el grado de control (Pavone, 2012).

6.5 Colonización de *Trichoderma* spp. en suelo.

Otro parámetro importante para evaluar la actuación de *Trichoderma* spp. en campo, es su capacidad de colonizar el suelo donde será aplicado, ya que esto permite predecir si condiciones como cantidad y disponibilidad de nutrientes, pH y presencia de agroquímicos, pudieran afectar su capacidad de colonizar ese suelo y por consiguiente su capacidad de biocontrol. Evaluando la capacidad colonizadora de *Trichoderma* sp. en el suelo proveniente de las plantaciones de cacao de Trincheras, Edo. Carabobo, se observó que las cepas TV200 y TV243 fueron las que colonizaron en mayor grado las placas. La colonia de la cepa TV190 presentó una área menor ($28,086\text{cm}^2 \pm 7,54$) mientras que la cepa TV243 presentó un área mayor ($48,742\text{cm}^2 \pm 4,91$) mostrando diferencias estadísticas ($p < 0,05$). Entre las cepas TV118, TV200 y TV243 no se encontraron diferencias significativas (**Fig. 8**).

Infante (2009) menciona que la competencia por sustrato o espacio depende de si el mismo está libre de patógenos (sustrato estéril) o si hay una microbiota natural. En el primer caso, la velocidad de crecimiento del antagonista no determina la colonización efectiva de los nichos, sino la aplicación uniforme del mismo en todo el sustrato. Sin embargo, en el segundo caso la velocidad de crecimiento conjuntamente con otros de los mecanismos de acción del antagonista es determinante en el biocontrol del patógeno y colonización del sustrato. En este ensayo, el suelo fue previamente esterilizado por lo que no se evaluó la colonización de las diferentes cepas de *Trichoderma* sp. con las condiciones naturales del suelo, sino más bien demostrar si el biocontrolador tenía la capacidad de colonizar el suelo, en ausencia de otros organismos. Esto se llegó a demostrar, donde todas las cepas estudiadas crecieron en este sustrato llegando a colonizar toda la placa. Las cepas TV200 y TV243 fueron las que tuvieron mayor capacidad de esporulación en comparación con las cepas TV118 y TV190 (**Fig. 9**). Por su parte, Rivas (2009) evaluó la capacidad colonizadora de *Trichoderma* spp. en suelo estéril y no estéril proveniente de plantaciones de cacao, donde ninguno de los aislados fue capaz de crecer a expensas de los nutrientes del suelo, colonizando únicamente el suelo estéril, probablemente debido a la interacción y competencia con los microorganismos presentes en el suelo. Por lo que no se logró desarrollar una de las características más reconocida por este género, siendo ésta la competencia por espacio y nutrientes.

Samuels (1996) refiere que la presencia de forma natural de *Trichoderma* en diferentes suelos (agrícolas, forestales, en barbechos), se considera una evidencia de la plasticidad ecológica de este hongo y de su habilidad como excelente competidor por espacio y recursos nutricionales, aunque la competencia depende de la especie. El hongo *Trichoderma* está biológicamente adaptado para una colonización agresiva de los sustratos y en condiciones adversas para sobrevivir, fundamentalmente, en forma de clamidosporas (Infante, 2009).

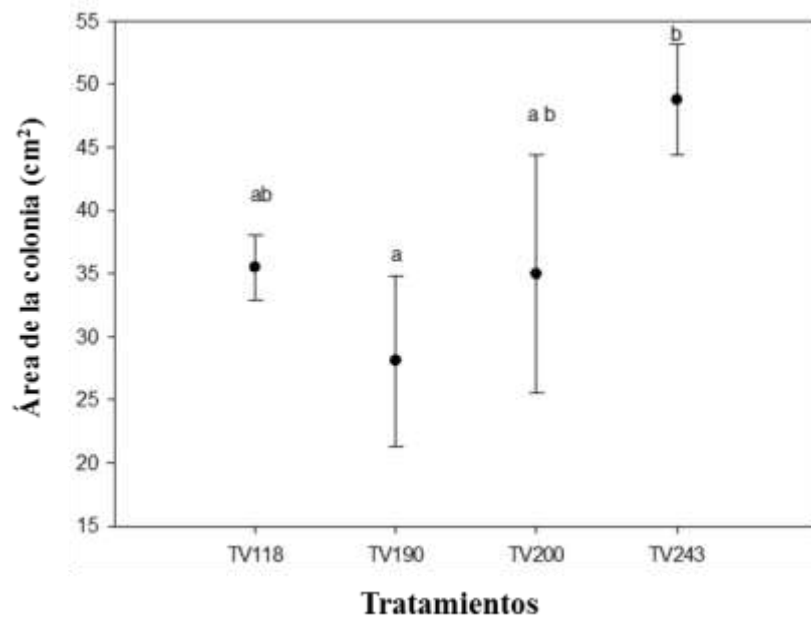


Fig. 8. Áreas de crecimiento de *Trichoderma* spp. (cm²) en suelo luego de 6 días. Las letras distintas muestran diferencias significativas a $p \leq 0,05$ (Mann-Whitney). Los valores son promedios de 5 réplicas $\pm$ error estándar.

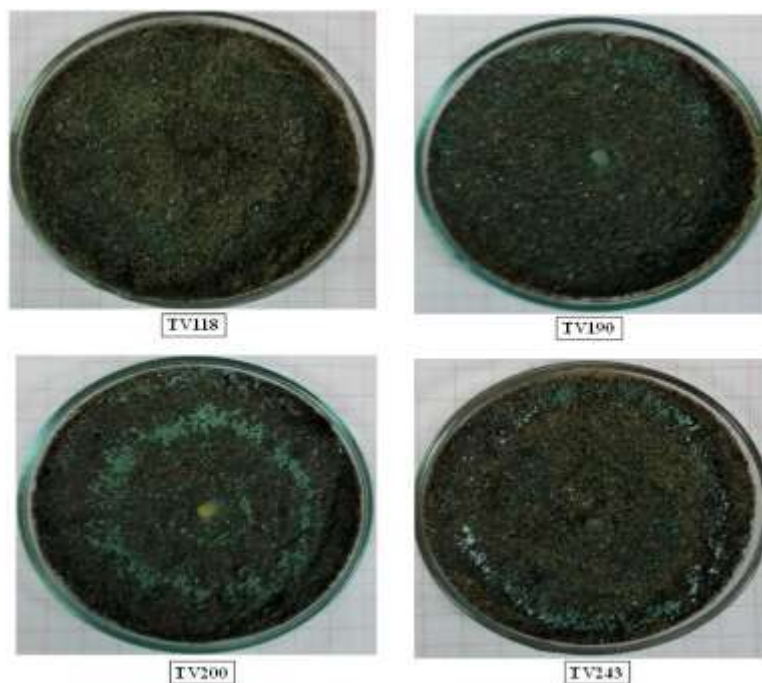


Fig. 9. Crecimiento de diferentes cepas de *Trichoderma* sp. (TV118, TV190, TV200 y TV243) durante 6 días en suelo proveniente de Trincheras, Edo. Carabobo.

6.6 Efecto de *Trichoderma* spp. en la germinación y crecimiento de *T. cacao*.

Durante el desarrollo inicial, la mayoría de las especies vegetales son más frágiles y susceptibles, por lo que cualquier esfuerzo por incrementar su desarrollo se podría traducir en un mayor número de plantas más vigorosas y por ende, obtener una mayor producción en aquellas de interés agrícola (Counce *et al.*, 2000). En la **Fig. 00** se muestra el porcentaje de germinación de las semillas de *T. cacao* durante 8 días tratadas con *T. virens* (TV118), *T. asperellum* (TV190), *T. harzianum* (TV200) y *T. koningiopsis* (TV243) o sin *Trichoderma* (control). Estos resultados muestran que las semillas tratadas con *Trichoderma* no presentaron un aumento significativo en la germinación con respecto a las semillas no tratadas, no encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos (**Tabla III**). Sin embargo, diferentes autores reportaron que al analizar el comportamiento de germinación, obtuvieron mayores porcentajes en los tratamientos con *Trichoderma*, mostrando diferencias significativas en relación con los testigos (Santana *et al.*, 2003; Camargo y Ávila, 2013).

Por otra parte, en la **Fig. 11** se muestra la longitud del hipocotilo de las semillas de cacao tratadas con *Trichoderma* spp. Se observa que la longitud del hipocotilo de las semillas inoculadas con la cepa TV200 estadísticamente no mostró diferencia con respecto al control ($p > 0,05$). Por su parte, la longitud del hipocotilo para los tratamientos con las cepas TV118, TV190 y TV243 fue de $4,16\text{mm} \pm 0,30$; $3,8\text{mm} \pm 0,27$ y $3,82\text{mm} \pm 0,30$ respectivamente, mostrando diferencias estadísticas en relación al control ($p < 0,05$) con una longitud de $2,95\text{mm} \pm 0,18$ respectivamente.

La razón por la cual la longitud del hipocotilo de las semillas en los diferentes tratamientos hayan presentado diferencia respecto al control puede deberse a la capacidad de *Trichoderma* spp. en la promoción del crecimiento radical, que se da a través de la producción de metabolitos estimulantes del crecimiento y/o colonización de la raíz por vía endofítica (Núñez, 2012). *T. virens* ha sido reportado como un hongo benéfico capaz de promover el crecimiento en algunas especies vegetales

(Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). En este estudio a pesar de que no se observaron diferencias con respecto a la germinación, la longitud del hipocotilo pudo verse influenciada por la acción de *Trichoderma* spp.

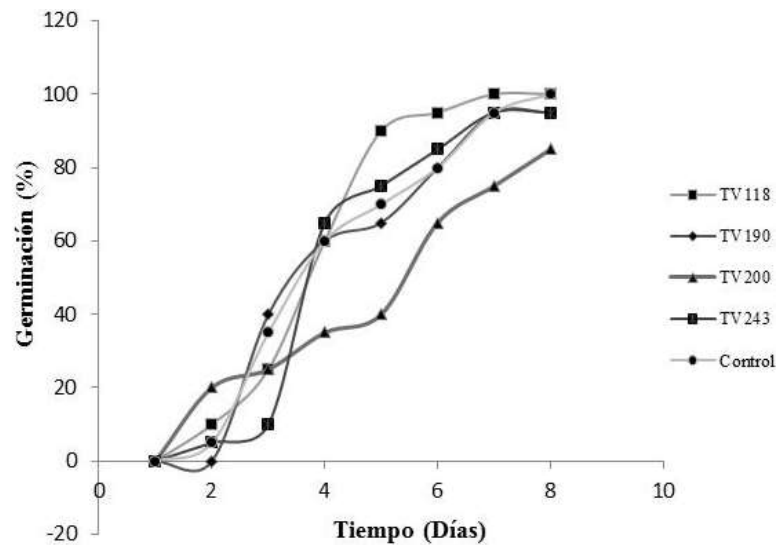


Fig. 10. Cinética de germinación de semillas de *T. cacao* tratadas con y sin *Trichoderma* spp. (N x tratamiento=20).

Tabla III. Efecto de *Trichoderma* spp. sobre la germinación y el desarrollo de plántulas de *T. cacao*.

	Control	TV118	TV190	TV200	TV243
Germinación a los 8 días (%)	100 ± 2,56(a)	100 ± 2,90(a)	95 ± 2,53(a)	85 ± 1,93 (a)	95 ± 2,93 (a)
Longitud del hipocotilo a los 8 días (cm)	2,947 ± 0,174 (b)	4 ± 0,316 (a)	3,8 ± 0,268 (a)	3,526 ± 0,283 (ab)	3,823 ± 0,277 (a)
Longitud de la raíz a los 2 meses (cm)	6,425 ± 0,32 (a)	6,91 ± 0,52 (a)	6,923 ± 0,53 (a)	7,51 ± 0,95 (a)	8,27 ± 0,85 (a)
Biomasa aérea a los 2 meses (g)	0,809 ± 0,076 (a)	0,733 ± 0,060 (a)	0,804 ± 0,100 (a)	0,771 ± 0,103 (a)	0,651 ± 0,125 (a)
Biomasa radical a los 2 meses (g)	0,101 ± 0,019 (a)	0,16 ± 0,25 (a)	0,175 ± 0,020 (ab)	0,148 ± 0,012 (b)	0,1 ± 0,026 (ab)

Nalimova (2007) menciona que el método de inoculación de *Trichoderma* por medio de semillas ofrece una cobertura protectora cuyo efecto se muestra cuando se

siembran en el sustrato correspondiente. El tratamiento reduce las contaminaciones externas por diversas especies de hongos incrementando además el porcentaje de germinación y estimulando el crecimiento.

Altamore *et al.* (1999) indicaron que la promoción del desarrollo se debe a que *Trichoderma* tiene la capacidad de solubilizar manganeso, sin importar el pH del medio, ni la disponibilidad del mismo, es decir, que lo solubiliza constantemente y como este microelemento es requerido para funciones fisiológicas de las plantas, como fotosíntesis, metabolismo del nitrógeno, síntesis de los compuestos aromáticos y además, para precursores de aminoácidos y hormonas, de fenoles y de lignina, se asegura en parte el crecimiento y la resistencia a enfermedades en las plantas. Otro mecanismo que promueven el crecimiento y desarrollo de los cultivos por *Trichoderma* spp. es la síntesis de metabolitos que estimulan los procesos de desarrollo vegetal, tales como auxinas, giberelinas y citoquininas (Abdul *et al.*, 2007).

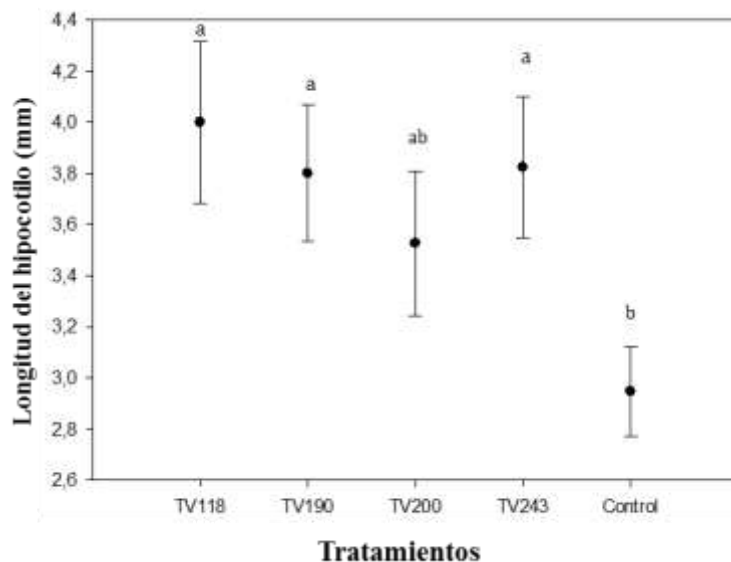


Fig. 11. Longitud del hipocotilo (mm) de semillas de *T. cacao* de siete días de germinadas en diferentes suspensiones de esporas de las cepas de *Trichoderma* sp. (TV118, TV190, TV200 y TV243). Las letras distintas indican diferencias significativas a $p \leq 0,05$ (Mann-Whitney) entre los tratamientos.

En la **Fig. 12** se muestra la biomasa radical y aérea de las plántulas de cacao tratadas con *Trichoderma* spp. En relación a la biomasa radical, los tratamientos con las cepas TV118, TV190 y TV243 no resultaron estadísticamente diferentes del control, lo contrario pasó con la cepa TV200 la cual presentó menor biomasa ($0,1g \pm 0,012$). En relación a la biomasa aérea y longitud radical no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos (**Tabla III**). Esto mismo fue observado en el número de hojas, diámetro del tallo y longitud aérea, dónde las plántulas tratadas con *Trichoderma* spp. no presentaron estadísticamente diferencias respecto al grupo control ($p > 0,05$) (**Fig. 13, 14 y 15**).

Estos resultados son opuestos a lo comúnmente encontrado en la bibliografía en relación a la promoción del crecimiento radical (Howell *et al.*, 1999). Este fenómeno ha sido observado por varios investigadores que trataron plantas con *T. harzianum* resultando en grandes aumentos de la longitud de la raíz, así como aumentos significativos en el peso seco, longitud del brote, y el área de la hoja, en contraste al control (Howel, 2003); por lo que se han obtenido plantas con sistemas radicales más ramificados, y también plantas con raíces más fuertes y robustas, lo cual puede incrementar la productividad del cultivo debido a que proporciona al sistema radical un mayor alcance y absorción de nutrientes y agua (Harman, 2004). Esto se lleva a cabo por la acción solubilizadora de nutrientes y minerales en el suelo, aumentando el crecimiento de las plantas, lo cual se da mediante la disminución de la actividad de organismos perjudiciales de la microflora de la raíz, siendo un efecto indirecto que brinda protección a las mismas, tanto en la parte radical como aérea, contra la infección por patógenos (Abdul *et al.*, 2007).

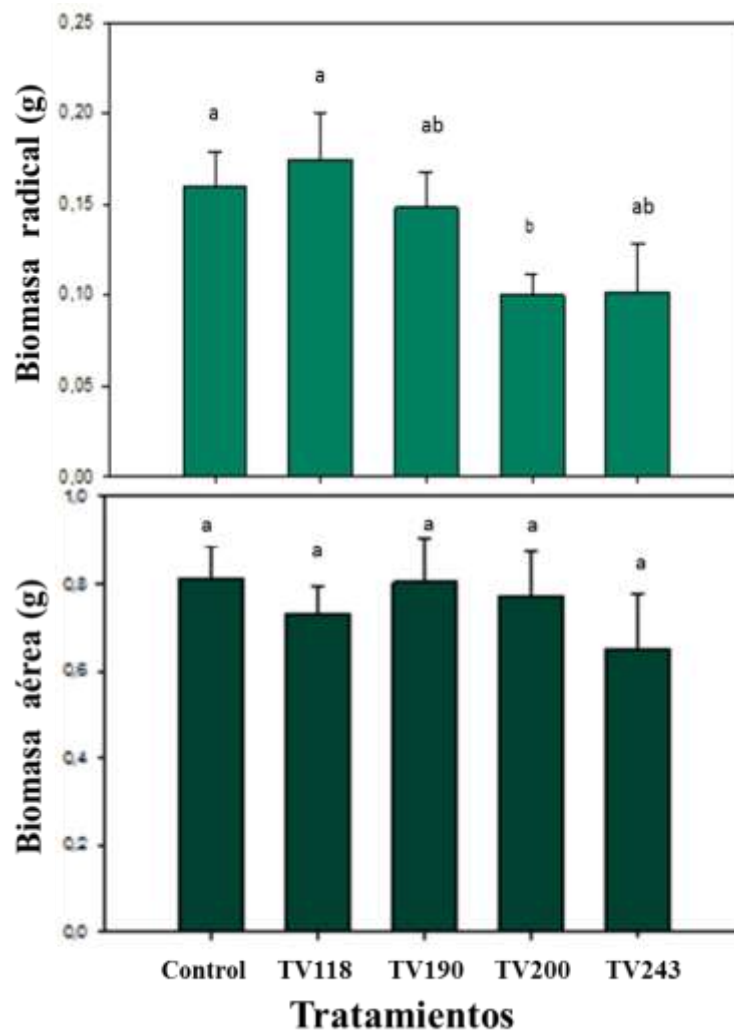


Fig. 12. Biomasa radical y aérea (g) de plántulas de *T. cacao* de tres meses tratadas con diferentes cepas de *Trichoderma* sp. (TV118, TV190, TV200 y TV243). Las letras distintas indican diferencias significativas a $p \leq 0,05$ (Mann-Whitney) entre los tratamientos.

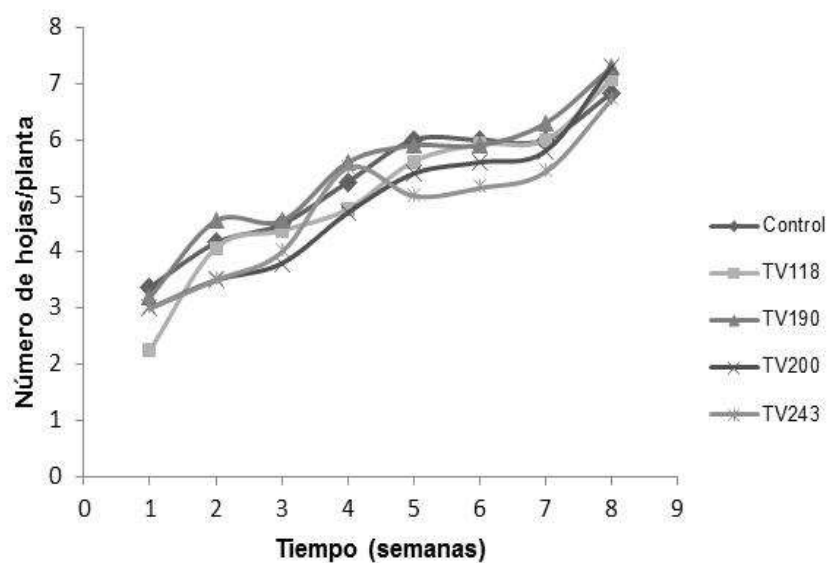


Fig. 13. Número de hojas medidas semanalmente de las plántulas de *T. cacao* L. tratadas con y sin *Trichoderma* spp.

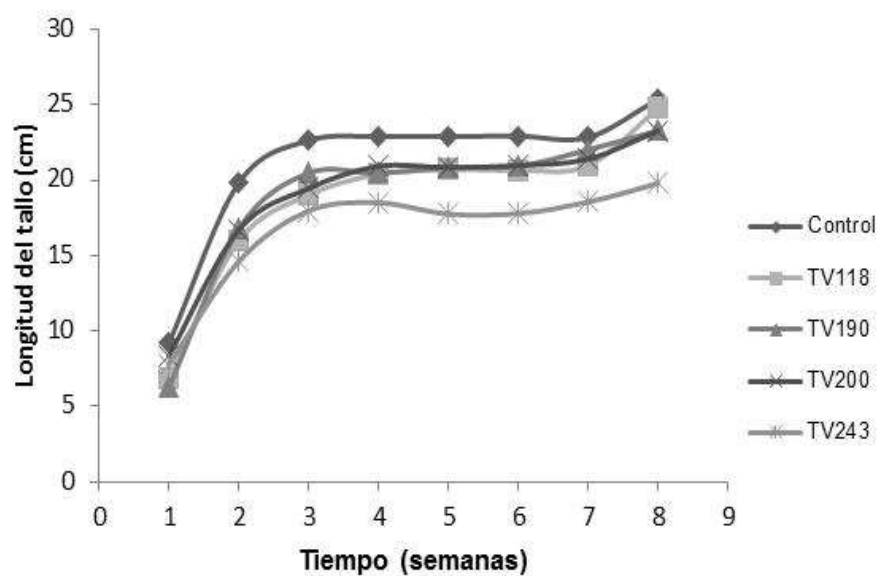


Fig. 14. Longitud del tallo (cm) medido semanalmente de las plántulas de *T. cacao* L. tratadas con y sin *Trichoderma* spp.

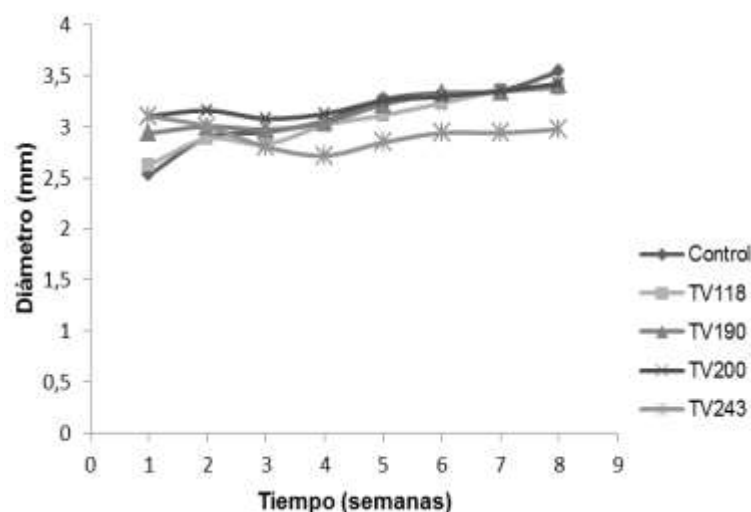


Fig. 15. Diámetro del tallo (mm) medido semanalmente de las plántulas de *T. cacao* L. tratadas con y sin *Trichoderma* spp.

García *et al.* (2012) estudiaron el efecto de *Trichoderma* sobre el desarrollo de *Solanum tuberosum* L., encontrando diferencias significativas de las plántulas tratadas con *Trichoderma* spp. con respecto al grupo control en relación al diámetro. Estos autores también reportaron que en los tratamientos con este hongo, el peso seco de las raíces y de la parte aérea fueron superiores a diferencia del grupo control. Para la variable número de hojas/planta, observaron que las plantas tratadas con cepas de *T. asperellum* a los 60 días desarrollaron más hojas que los testigos, encontrando también diferencias significativas en la altura de las plántulas con respecto al control. Esto demuestra que *Trichoderma* tiene un efecto como regulador del crecimiento de ciertos cultivos, sin embargo, en este estudio no se encontraron diferencias significativas para el caso de *T. cacao*. Se requieren más estudios del efecto de *Trichoderma* sobre el crecimiento del cacao. Se han realizado estudios acerca de la colonización de *Trichoderma* en semillas de cacao y se ha demostrado que este hongo puede colonizar las raíces de esta planta (Bailey, 2008).

Otro parámetro evaluado fue la colonización de las raíces de *T. cacao* por *Trichoderma* spp. Se observó la presencia de *Trichoderma* sp. en las raíces, siendo

muy poca colonización de éste en las plántulas inoculadas. En las raíces de las plántulas tratadas con TV200 (*T. harzianum*) se observaron las hifas y el conidióforo (Fig. 16). Así mismo, a pesar de no haberse determinado, se observó cualitativamente en las raíces un incremento en el número y longitud aparente de los pelos radicales. Se recomienda profundizar más en este tipo de efecto en futuros trabajos. Núñez (2012) reportó la presencia de micelio y conidióforos de *T. harzianum* y *T. asperellum* en raíces de arroz (*Oryza sativa* L) y también encontró mayor número de pelos radicales. En maíz (*Zea mays*) y en *Arabidopsis* sp. se han inoculado previamente con cepas de *T. virens*, *T. atroviride* y *T. harzianum* (Harman *et al.*, 2004; Contreras *et al.*, 2009). Esto puede ser promovido por la producción de sustancias indólicas similares a las auxinas por parte de *Trichoderma* spp. como lo son el ácido indol-3acético, el indol-3-acetaldehído y el indol-3-etanol las cuales podrían ejercer una función promotora del incremento del desarrollo de los pelos radicales y de la longitud radical (Contreras *et al.*, 2009).

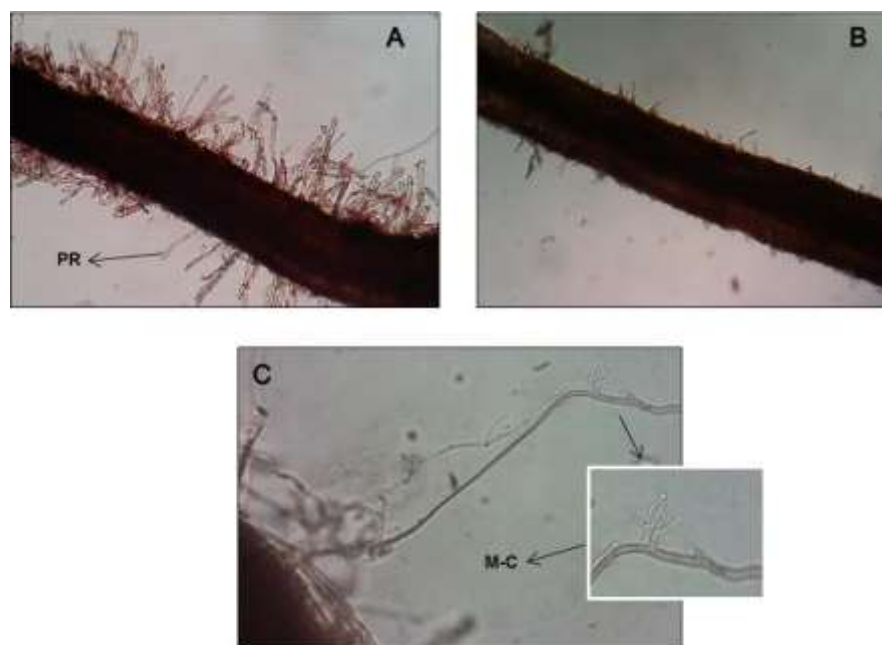


Fig. 16. Densidad de pelos radicales y presencia de *Trichoderma* spp. en raíces de *T. cacao*. **A.** Raíces con *T. harzianum* (100X). **B.** Raíces sin *Trichoderma* (100X) **C.** Micelio y/o conidióforo de *T. harzianum* (400X). **PR.** Pelo radical. **M-C.** Micelio y conidióforo de *Trichoderma* sp.

7. CONCLUSIONES

- Se aisló e identificó morfológicamente una cepa de *Fusarium* sp. a partir de agallas, la cual fue capaz de reproducir los síntomas de agallas en axilas cotiledonarias en plántulas de *T. cacao* de un mes de crecimiento. Por lo tanto se podría decir que morfológicamente se sugiere la presencia de *F. cf. decemcellulare*.
- *Trichoderma* spp. colonizó completamente al aislado de *F. decemcellulare* en el cultivo dual, lo que sugiere una represión del crecimiento por parte del biocontrolador, donde las cepas TV200 y TV243 colonizaron a *Fusarium* sp en menor tiempo, disminuyendo el crecimiento del patógeno.
- Se encontró que las cepas TV118 y TV200 tuvieron un efecto micoparasitico sobre *F. decemcellulare* observándose enrollamiento de las hifas del antagonista sobre el fitopatógeno, siendo posibles candidatos para el biocontrol del patógeno.
- La cepa TV118 mostró una reducción en el número de agallas en las plántulas de cacao, por lo que este aislado puede ser considerado como un candidato para el biocontrol de la enfermedad.
- Las cepas de *Trichoderma* sp. fueron capaces de colonizar el suelo estéril proveniente de Trincheras, siendo las cepas TV200 y TV243 las que tuvieron mayor capacidad de colonización.
- Las cepas de *Trichoderma* sp. no ejercieron respuesta significativa en la germinación, ni en las variables de crecimiento y desarrollo de *T. cacao*, como lo son biomasa radical, aérea, diámetro, número de hojas, longitud de la raíz y de la parte aérea. Con las cepas TV118, TV190 y TV243 se obtuvo mayor longitud del hipocotilo.

8. RECOMENDACIONES

- Se recomienda hacer la identificación molecular del aislado de *Fusarium* sp. obtenido para comprobar a nivel molecular si es la especie *Fusarium decemcellulare*.
- En el cultivo dual en medio sólido se recomienda estimar la concentración de esporas del fitopatógeno en presencia o no de *Trichoderma* sp. para evaluar si el biocontrolador influye sobre el potencial reproductivo de *Fusarium* sp.
- Se recomienda la aplicación del biocontrolador antes del patógeno con el fin de evaluar si existe mayor protección en las semillas en vivero.
- Se debe evaluar la interacción de *Trichoderma* sp. en el suelo no estéril en presencia del fitopatógeno *Fusarium* sp.
- Para evaluar el desarrollo y crecimiento se recomienda inoculaciones a la semilla y reinoculaciones periódicas a nivel del suelo.
- Se recomienda realizar inoculaciones de las cepas evaluadas en campos con plantas infectas con la agalla del cojín floral, para evaluar el efecto de los biocontroladores en estas condiciones; además de exponer plantas inoculadas con *Trichoderma* spp desde su germinación a ambientes en cultivos de cacao con presencia de agallas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agrios, G. 1991. Fitopatología. Trad. Manuel Guzmán Ortiz. 2da. Edición. Editorial Limusa S.A. México. Pp35-36.
2. Abdul, O., A. Moustafa & M. Metwally. 2007. Enhancement of plant growth through implementation of different *Trichoderma* species. Proceeding of the 2nd International conference of Zagaig Universty. Pp 43-59.
3. Aguirre, J., A. Mendoza., J. Cadena & C. Avendaño. 2007. Efecto de la biofertilización en vivero del cacao (*Theobroma cacao* L) con *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg Et Döbereiner y *Glomus intraradices* Schenk Et Smith. Interciencia. 32(8): 541-546.
4. Adebola, M. & J. Amadi. 2012. Studies on *Penicillium digitatum*, *Botryodiplodia theobromae*, *Alternaria tenuis* and *Trichoderma harzianum* for Bicontrol of *Phytophthora palmivora* Cocoa Black Pod Disease Pathogen. Am-Euras. J. Agron., 5(2): 30-34.
5. Altomare C., W. Norvell, T. Björkman & G. Harman. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrintes by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22- App. & Environ. Microbiol. 65(7): 2926-2933.
6. Anees M., A. Tronsmo., V. Hermann., L. Hjeljord., C. Heraud., & C. Steinberg. 2010. Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. Fungal Biology 114(9): 691-700.
7. Anon. 2008. The World's Worst Cocoa Problems. DropData. En http://www.dropdata.org/cocoa/cocoa_prob.htm#severity. [11/11/2015]
8. Bailey, B., H. Bae, M. Strem, J. Crozier, S. Thomas, G. Samuels, B. Vinyard. & K. Holmes. 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. Biological Control 46(1), 24–35.

9. Benítez, T., A. Rincón., M. Limón. & A. Codón. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7(4): 249-260.
10. Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological. Institute, Kew, Surrey, United Kingdom. England. Pp 75-77.
11. Brenes, O. 1981. Revisión de literatura sobre la buba del cacao (*Theobroma cacao* L). Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza. Turrialba, Costa Rica. Pp 6-8.
12. Brunt, A. & A. Wharton. 1962. Galls the cacao a correction. Commonwealth Phytopathological News. 7(3): 44-45.
13. CABI Biosciences Databases. 2004. [En línea]. En <http://www.indexfungorum.org/Names/fundic.asp>. [08/03/15].
14. Camacho, R. 1982. Manual del cacaotero. Segunda edición. Pp 9-19.
15. Camargo, D. & E. Ávila. 2013. Efectos del *Trichoderma* sobre el crecimiento y desarrollo de la arveja (*Pisum sativum* L). Ciencia y Agricultura, 11 (1): 91-100.
16. Carsolio, C., N. Benhamou., S. Haran, C. Cortés., A. Gutiérrez, I. Chet., E & Herrera A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. Appl Environ Microbiol. 65(3):929-935.
17. Castellano, G. y N. Guanipa. 2004. Comportamiento de diez cultivares de mango (*Mangifera indica* L.) a la inoculación con *Fusarium decemcellulare* Brix. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 21(4): 200-206.
18. Chet. I. & S. Benhamou. 1998. Mycoparasitism and lectin enzymes. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman GE, Kubice CP. (Eds.). Taylor & Francis Ltd., London, UK. 2: 153-152.
19. Clavijo, S. 1993. Fundamentos en Manejo de Plagas. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH). Caracas, Venezuela. Pp 205.

20. Cohen, R. & I. Chet. 1998. The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology*. 9(3): 270-277.
21. Contreras, H., L. Macias, C. Cortés. & J. López. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149(3): 1579-1592.
22. Counce, P., T. Keisling & A. Mitchell. 2000. A uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. *Crop Sci.* 40 (2): 436.
23. Delgado, A. 1991. Eficacia de fungicidas en el control de agallas de puntos verdes inducidas artificialmente en plántulas de cacao. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 8(1): 29-47.
24. Donald W., D. Brent., M. Doss & D. Greer. ImageTool. The University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas. En <http://compdent.uthscsa.edu/dig/>. [26/05/16].
25. Fernández, R. & C. Suárez. 2009. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio zona Bananera Colombiana. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 62(1): 4743-4748.
26. García, R., Arcia, M., Pérez, R. Riera. 2012. Efecto de *Trichoderma* sobre el desarrollo de papa y el biocontrol de *Rhizoctonia* bajo tres tiempos de inicio de aplicación. *Agronomía Trop.* 62(1- 4): 77-95.
27. González, J. 2007. Identificación de hongos fitopatógenos que afectan el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la finca Bulbuxya, San Miguel Panan Suchitepéquez. Tesis. Facultad de Agronomía. Instituto de investigaciones agronómicas. Guatemala. Pp 22-53.
28. Guédez, C., L. Cañizalez., C. Castillo & R. Olivar. 2012. Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Rev. Soc. Ven. Microb.* 32(1):44-49.

29. Hansen, A. 1963. The role of *Fusarium decemcellulare* and *Fusarium roseum* in the green point cushion gall complex of cacao. *Turrialba*, 13(2): 80-87.
30. Hansen, A & L. Reyes. 1963. Agalla de puntos verdes en el cacao de Venezuela y Costa Rica. *Turrialba*, 13(2): 128-130.
31. Harman, G., C. Hayes., M. Lorito., R. Broadway., A. Di Pietro., C. Peterbauer. & A. Trosnmo. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83(3): 313-318.
32. Harman, G. 2000. Myths and dogmas of Biocontrol, Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84(4): 377-393.
33. Harman, G, C. Howell, A. Viterbo, I. Chet. & M. Lorito. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology*. 2(1):43-56.
34. Hjeljord, L. & A. Tronsmo. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: Harman, G.; Kubicek, C. (Eds.) *Trichoderma & Gliocladium*. Volumen 2. Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor & Francis. London, UK. Pp 131-151.
35. Howell, C., L. Hanson, R. Stipanovic & L. Puckhaber. 1999. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rizhoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*. 90(3):248-252
36. Howell, C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases. The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87(1): 4-10.
37. Hoyos L., G. Duque & S. Orduz. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. *Rev. Col. Cienc. Hort.* 2(1): 76-86.

38. Infante, D., B. Martínez., N. González & Y. Reyes, 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.* 24(1):14-21.
39. Jaimes, Y., C. Moreno., A. & A. Cortes. 2009. Inducción de resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum* en tomate por *Trichoderma koningiopsis* TH003. *Acta Biológica Colombiana* 14(3): 2-9.
40. Kevorkian, A. 1951. The Cushion Gall Disease of Cacao. *Phytopathology*. USA. 41(6): 562-563.
41. Kim, T. & G. Knudsen. 2013. Relationship between the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* and the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f.sp. pisi. *Applied Soil Ecology*, 68: 57– 60.
42. Krauss, U. & W. Soberanis. 2001. Biocontrol of cocoa pod diseases with micoparasites mixtures. *Biological Control* 22(2): 149-158
43. Leslie, J. & Summerell, B. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. 1ra. Edición. Blackwell Publishing. USA. Pp 160.
44. Liendo, R. & C. Marín. 2006. Prácticas poscosecha y de almacenamiento del cacao (*Theobroma cacao*) en el estado Miranda Venezuela. *Rev. Fac. Agron.* 23(3): 349-363.
45. Litz, R. 2009. The Mango: botany, production and uses. 2da. Edición. CAB International. USA. 257-259 pp.
46. Lorito, M., G. Harman., C. Hayes., R. Broadway., A. Tronsmo., S. Woo. & A. Di Pietro. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83(3): 302–318.
47. Lorito, M., C. Hayes., A. Di Pietro., S. Woo & G. Harman. 1994. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3-b-glucosidase and an N-acetyl-b-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 84(4): 398-405.

48. Malaguti, G. 1958. Primeras observaciones sobre la “buba” o “agallas” del cacao en Venezuela. *Notas. Agron. Trop.* 8(3): 115-120.
49. Maridueña, M. 2011. Estudio de la micobiota patogénica de “cacao criollo” (*Theobroma cacao*) en cinco provincias de la costa ecuatoriana y evaluación de la efectividad *in vitro* de los bioles locales para su control. Tesis para la obtención de título de Master en Biotecnología agrícola con mención en agricultura orgánica. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. Ecuador. Pp 7-12.
50. Martínez, B., D. Infante. & Y. Reyes. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Prot. Veg.* 28 (1): 1-11.
51. Massart, S., & H. Jijakli. 2007. Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agents: A review. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2): 229–241.
52. Mathivanan, N, Prabavath & V, Vijayanandraj. 2005. Application of Talc Formulations of *Pseudomonas fluorescens* Migula and *Trichoderma viride* Pers. Ex S.F. Gray Decrease the Sheath Blight Disease and Enhance the Plant Growth and Yield in Rice. *J. Phytopathology*. 153:697-701.
53. Michel, A., M. Otero., R. Martínez., N. Rodríguez., R. Ariza. & A. Barrios. 2008. Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(2): 185-191.
54. Michel, A. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp Euscomycetes (Hypocreales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes: Hyphales). Tesis Doctoral. Universidad de Colima. Colima, México. Pp 36-135.
55. Morales, V. & M. Rodríguez. 2009. Micobiota endofítica asociada al cultivo del mango ‘Haden’ (*Mangifera indica* L.) en el oriente de Venezuela. *Revista UDO Agrícola*. 9(2): 393-402.
56. Nalimova, M. 2007. Introducción y eficacia técnica del biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* spp en Cuba. *Fitosanidad*. 11(3):75-79.

57. Nicholas, D. 1965. Influence of the rhizosphere on the mineral nutrition of the plant. *In Ecology of Soil - Borne Plant Pathogens*. R. W. Baker and W. C. Snyder Eds. University of California press, Berkeley, Los Ángeles. Pp 210-217.
58. Núñez, L. 2012. Efecto de *Trichoderma* spp. en el desarrollo de *Oryza sativa* L. en condiciones de vivero y el biocontrol *in vitro* de *Pyricularia grisea* Sacc. Tesis. Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela. Pp 45-46.
59. Parra, D., S. Pérez., D. Sosa., R. Rumbos., B. Gutiérrez & A. Moya. 2009. Avances en las investigaciones venezolanas sobre enfermedades del cacao. *RET.1* (2): 56-75.
60. Pavone, D. 2012. Biocontrol de *Rhizoctonia solani* Kühn por *Trichoderma* spp. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Postgrado en Biología Celular. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. Pp 71-103.
61. Pérez, V., E. Martínez. & T. Cantillo. 2012. First report in Cuba of green point gall of cocoa cushion caused by *Albonectria rigidiuscula* (*Fusarium decemcellulare*). *Fitosanidad* 16(1): 19-25.
62. Ploetz, R. 2006. *Fusarium*-Induced Diseases of Tropical, Perennial Crops. *Phytopathology*. 96(6): 648-652.
63. Ploetz, R. 2007. Cacao Diseases: Important Threats to Chocolate Production Worldwide. *Phytopathology*. 97(12): 1634-1639.
64. Portillo, E., L. Graziani & E. Cros. 2006. Efecto de algunos factores post-cosecha sobre la calidad sensorial del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 23(1): 49-57.
65. Purdy, L., R. Schmidt & K. Gramacho. 1998. Diseases of cacao (*Theobroma cacao* L.). APSnet. En: <http://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/Cacao.aspx>. [21/02/2016]

66. Quezada, M. 2008. Caracterización morfológica de aislamientos de *Fusarium* sp. obtenidos de árboles de mango con malformación en el estado de Colima. Tesis para optar título profesional en Biología. Facultad de Biología. Michoacana, México. Pp 10-11.
67. Quintero, M. & Díaz, K. 2004. Mercado mundial de cacao. Agroalimentaria. 9(18): 47-59.
68. Reyes, H. & L. Capriles. 2000. El Cacao en Venezuela. Moderna Tecnología para su cultivo. Caracas, Venezuela: Chocolates el Rey. Pp 74-140.
69. Rivas, M. 2009. Diversidad del género *Trichoderma* (Ascomycetes) en plantaciones de *Theobroma cacao* L. del estado Carabobo. Tesis. Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela. Pp 94-95.
70. Rivas, M. & D. Pavone. 2010. Diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de *Theobroma cacao* L. del estado Carabobo, Venezuela, y su capacidad biocontroladora sobre *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer. 35 (10): 777-783.
71. Rojas, T. & A. Rondón. 1995. Control químico *in vitro* de *Fusarium decemcellulare* Brick aislado de mango. *Agro. Trop.* 45(3) 417-428.
72. Rondón, J. & Campos, L. 2005. Revisión taxonómica del género *Theobroma* (Sterculacea) en Venezuela. *Acta Botánica Venezuelana.* 28(1): 113-134.
73. Rudy, N., H. Smeltkop., J. Almanza. & M. Loza. 2011. Evaluación de la capacidad biocontroladora de cepas nativas de *Trichoderma* spp sobre *Rhizoctonia* sp y *Fusarium* sp en café (*Coffea arabica*) en condiciones experimentales. *J Selva Andina Res. Soc.* 1 (1): 43-52.
74. Samuels, G. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. *Mycol Res.* 100(8): 923- 935.
75. Samuels, G., S. Dodd., B. Lu., O. Petrini., H. Schroers. & I. Druzhinina. 2006. The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies Mycol.* 56: 67-133.

76. Santana, R., C. Rodríguez., C. Pérez., Y. Delgado & M. Cupull. 2003. Efecto de *Trichoderma viride* como estimulante de la germinación, en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn. Centro Agrícola, año 30. (1): 21-25.
77. Sarmiento, J., D. Domínguez., R. Rumbos., D. Parra., B. Gutiérrez., S. Pérez., & D. Sosa. 2009. Identificación de especies de *Trichoderma* aisladas de detritos y suelo de cacao. XXI Congreso Venezolano de Fitopatología, Isla de Margarita, Nueva Esparta, Venezuela.
78. Smith, V., W. Wilcox. & G. Harman. 1990. Potential for biological control of *Phytophthora* and Crown Rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology*. 80(9): 880-885.
79. Sosa, D., R. Rumbos., D. Parra., L. Monsalve., S. Pérez., B. Gutiérrez., A. Moya., H. Urbina., M. Mijares., T. Fariñas., & D. Infante. 2007. Primer avance exploratorio de hongos y cromistas asociados al cultivo del cacao en algunas zonas productoras de Venezuela. XX Congreso Venezolano de Fitopatología. San Felipe, Edo. Yaracuy. Venezuela.
80. Timothy J. & Inglis. J. (2007). Principia aetiologica: taking causality beyond Koch's postulates. *Journ. Med. Microb.* 56:1419–1422.
81. Vinale, F., K. Sivasithamparam., E. Ghisalberti., R. Marra., S. Woo. & M. Lorito . 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40(1): 1-10.
82. Wiest, A., D. Grzegorski., B. Xu., C. Goulard., S. Rebuffat., D. Ebbola., B. Bodo. & C. Kenerley. 2002. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. En <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11909873>. [27/01/2016]
83. Windham, M., Y. Elad. & R. Baker. 1986. A mechanism for increased plant grow induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 76(5):518-521.
84. Yedidia, I., M. Shores., Z. Kerem, N., Benhamou., Y. Kapulnik. & I. Chet. (2003). Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas*

syringae pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Appl. Env. Microbiol.* 69(12): 7343-7353.

10. ANEXOS

ANEXO 1. Número de hojas de plántulas de *T. cacao* L inoculadas con *Trichoderma* spp. (TV118, TV190, TV200 y TV243) medidos semanalmente. Se presenta el promedio de hojas/planta y error estándar. Las letras distintas muestran las diferencias entre tratamientos semanalmente. [Kruskall-Wallis/Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)]

Tiempo (Semanas)	Sin <i>Trichoderma</i> (control)	TV118	TV190	TV200	TV243
1	3,375 ± 0,264ab	2,25 ± 0,167b	3,2 ± 0,129a	3 ± 0,3196ab	3 ± 0ab
2	4,167 ± 0,112ab	4,076 ± 0,313ab	4,556 ± 0,21b	3,5 ± 0,312a	3,5 ± 0,289ab
3	4,5 ± 0,261a	4,385 ± 0,336a	4,556 ± 0,21a	3,8 ± 0,298a	4 ± 0a
4	5,25 ± 0,329a	4,769 ± 0,284a	5,6 ± 0,202a	4,7 ± 0,472a	5,5 ± 0,1667a
5	6 ± 0,492a	5,615 ± 0,313a	5,9 ± 0,253a	5,4 ± 0,243a	5 ± 0,259a
6	6 ± 0,492a	5,923 ± 0,535a	5,9 ± 0,567a	5,6 ± 0,54a	5,143 ± 0,577a
7	6 ± 0,492a	6 ± 0,174a	6,3 ± 0,238a	5,8 ± 0,183a	5,428 ± 0,227a
8	6,833 ± 0,458a	7,077 ± 0,313a	7,3 ± 0,274a	7,3 ± 0,195a	6,714 ± 0,218a

ANEXO 2. Número de hojas de plántulas de *T. cacao* L inoculadas con *Trichoderma* spp. (TV118, TV190, TV200 y TV243) medidos semanalmente. Se presenta el promedio de la longitud aérea de las plantas (cm) y error estándar. Las letras distintas muestran las diferencias entre tratamientos semanalmente. [Kruskall-Wallis/Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)].

Tiempo (Semanas)	Sin <i>Trichoderma</i> (control)	TV118	TV190	TV200	TV243
1	9,17 ± 1,282a	6,827 ± 0,832a	6,222 ± 0,959a	8,33 ± 1,175a	7,75 ± 0,640a
2	19,8 ± 1,580a	15,954 ± 1,488a	16,75 ± 1,723a	16,69 ± 1,790a	14,6 ± 1,998a
3	22,625 ± 1,115a	19,015 ± 0,732b	20,467 ± 1,333ab	19,45 ± 1,102ab	17,96 ± 2,206b
4	22,892 ± 0,747a	20,392 ± 0,589b	20,47 ± 0,934ab	20,92 ± 0,824ab	18,5 ± 2,319b
5	22,892 ± 0,957a	20,7 ± 0,585a	20,82 ± 0,958a	20,84 ± 0,891a	17,757 ± 2,029a
6	22,925 ± 0,904a	20,654 ± 0,464a	20,93 ± 0,946a	20,97 ± 0,9a	17,786 ± 1,55a
7	22,833 ± 0,815a	20,962 ± 0,473a	22,01 ± 1,073a	21,4 ± 0,915a	18,543 ± 1,373b
8	25,367 ± 1,296a	24,753 ± 0,837a	23,28 ± 1,320a	23,27 ± 1,013a	19,786 ± 1,527b

ANEXO 3. Número de hojas de plántulas de *T. cacao* L inoculadas con *Trichoderma* spp. (TV118, TV190, TV200 y TV243) medidos semanalmente. Se presenta el promedio del diámetro de las plantas (mm) y error estándar. Las letras distintas muestran las diferencias entre tratamientos semanalmente. [Kruskall-Wallis/Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)].

Tiempo (Semanas)	Sin <i>Trichoderma</i> (control)	TV118	TV190	TV200	TV243
1	2,525 ± 0,139a	2,6223 ± 0,112a	2,933 ± 0,068a	3,1 ± 0,1a	3,1 ± 0,108a
2	2,892 ± 0,125a	2,881 ± 0,096a	3 ± 0,116a	3,155 ± 0,100a	3 ± 0,091a
3	2,945 ± 0,999a	2,827 ± 0,115a	2,97 ± 0,113a	3,075 ± 0,096a	2,8 ± 0,185a
4	3,053 ± 0,084a	3,011 ± 0,068a	3,035 ± 0,125a	3,122 ± 0,091a	2,714 ± 0,252a
5	3,262 ± 0,069a	3,108 ± 0,088a	3,215±0,103a	3,25 ± 0,076a	2,843 ± 0,227a
6	3,327 ± 0,083a	3,227 ± 0,092a	3,32 ± 0,104a	3,291 ± 0,069a	2,936 ± 0,229a
7	3,348 ± 0,066a	3,342 ± 0,090a	3,338 ± 0,104a	3,346 ± 0,070a	2,936 ± 0,227a
8	3,537 ± 0,108a	3,369 ± 0,095a	3,405 ± 0,107a	3,416 ± 0,062a	2,971 ± 0,216a