

Identificación de especies de cepas nativas de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. y evaluación de su potencial antagonista in vitro frente al hongo fitopatógeno nativo *Moniliophthora roreri* en el departamento de Norte de Santander

Liliana Yanet Suárez¹ | Claudia Patricia Cabrales²

Recibido:
3 de abril de 2008

Aceptado:
12 de junio de 2008

Resumen

La moniliasis causada por el hongo *Moniliophthora roreri* es la enfermedad más grave que ataca el cacao, que se presenta en casi todas las zonas del país ocasionando graves pérdidas al agricultor. Se realizó la identificación de la especie de seis cepas del hongo *Trichoderma* sp. Procedentes de los municipios de: El Zulia, El Tarra, Bucarasica, Cúcuta y el corregimiento de Agua Clara y una cepa bacteriana de *Bacillus* sp. Aislada en el municipio de Bucarasica, las cuales fueron evaluadas para determinar su potencial antagonico frente a siete cepas nativas del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* aisladas en los municipios: El Zulia, Tibú, Teorama, Sardinata y Bucarasica. Las pruebas de antagonismo que se desarrollaron fueron: plato dual, metabolitos difusibles y plato precolonizado. En todas las pruebas, se empleó un diseño experimental completamente al azar y tres repeticiones por tratamiento. Se pudo establecer que durante los 8 días de evaluación, se ejerció un efecto antagonico e hiperparasitico significativo de ($\alpha=0.05$) por parte de las cepas de *Trichoderma* sp. frente las cepas de *M. roreri*, sólo tres de las seis cepas de *Trichoderma* sp., mostraron un alto efecto antagonico frente a *M. roreri*, tanto en forma micelial como metabólica; la cepa bacteriana *Bacillus* sp., no arrojó resultados positivos en el enfrentamiento. Las cepas del hongo antagonico fueron identificadas como *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma longibrachiatum*, la cepa bacteriana fue identificada como *Bacillus brevis*.

Palabras Claves: *Moniliophthora roreri*, *Trichoderma* sp., *Bacillus* sp., control biológico.

¹Lic. Biología-Química, MSc. en Biología énfasis Genética. Candidata a Doctor en Biotecnología. Departamento de Medio Ambiente, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Francisco de Paula Santander. Profesora de tiempo completo. Coordinadora del Laboratorio de Genética y Biología Molecular. Universidad Francisco de Paula Santander. lysuarez@bari.ufps.edu.co

²Ingeniera de Producción Biotecnológica. Departamento de Medio Ambiente, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Francisco de Paula Santander. claudiapatricia.cabrales@gmail.com

Abstract

The Molinasis is caused fungus *Moniliophthora roreri*. Which is the most serious disease which attacks cocoa, and appears in almost anywhere across the country, causing significant losses to farmers. The recognition of the six kind of fungus *Trichoderma sp.* Obtained from: El Zulia, El Tarra, Bucarasica, Cúcuta and Agua Clara has been realized, along with the bacterial strain *Bacillus sp.* Isolation of Bucarasica, which were evaluated, in order to determinate their antagonistic potential in front of seven strains of *Moniliophthora roreri* fungus from El Zulia, Tibú, Teorama, Sardinata and Bucarasica. Tests have been realized: dual plate, diffusible metabolito and pre seeded (colonized). An experimental design, completely randomly, has been used in all the tests. Each test has been repeated three times. During eight days of observation, were detected antagonistic (hostile) and hyperparasitic reaction ($\alpha=0.05$) by *Trichoderma sp.* In front of *M. roreri*, and only three of six strains of *Trichoderma sp.* have presented strong antagonistic reaction in front of *M. roreri*, not only micelial, but the metabolic; *Bacillus sp.* has not presented any positive result during the tests. The antagonistic fungus strains have been identified as *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma longibrachiatum*. the bacterial strain has been identified as *Bacillus brevis*.

Keywords: *Moniliophthora roreri*, *Trichoderma sp.*, *Bacillus sp.*, biocontrol.

Introducción

La producción de cacao en Colombia tiene una connotación muy importante, tanto socioeconómica como ambiental, además de su enorme potencialidad en cerca de 280.000 hectáreas aptas. Colombia dispone actualmente de 86.000 hectáreas cultivadas, con una producción de 39.000 toneladas anuales y un valor de \$ 84.240.000.000, actividad de la cual dependen 25.000 familias y genera 7.9 millones de jornales en forma directa e indirecta AGROCADENAS (2005).

Las plantaciones de cacao son afectadas por las enfermedades, entre estas la más limitante es monilia (*Moniliophthora roreri*), presente en

la totalidad de las regiones productoras, según las estimaciones realizadas por los técnicos y entidades, por la sola enfermedad se pierden anualmente alrededor de 18.000 toneladas 30% del potencial productivo que a precios de hoy valdrían \$ 68.400 millones, pérdidas aun mayores y cercanas al 60% son estimadas cuando se presenta el ataque de la enfermedad de manera conjunta con la escoba de bruja (*Crinipellis perniciososa*) AGROCADENAS (2005).

En condiciones naturales, el fruto es el único órgano del cacao infectado por *Moniliophthora roreri*. Los síntomas de la enfermedad varían con la edad del fruto, y la velocidad de desarrollo de la moniliasis depende en parte de las condiciones ambientales. El síntoma característico de

la enfermedad es una mancha color marrón oscuro con borde irregular, denominado “mancha chocolate”. La infección en frutos recién formados, menores de 20 días, produce marchitez. En frutos menores de dos meses, causa deformaciones en forma de jiba. Las mazorcas infectadas después de los 3 meses de edad pueden no mostrar síntomas externos. En otros casos se observan puntos necróticos marrón oscuros, o manchas oscuras limitada. El hongo puede cubrir totalmente el fruto con una felpa blanca. SENASA (2006).

El control de la moniliasis se basa en un sistema de manejo integrado de plagas, que permite reducir los daños significativamente a través de la integración de la siembra de materiales genéticos de alta productividad, implementación permanente de prácticas de saneamiento y culturales. Como el control genético ARGUELLO (1990), control químico AMPUERO (1961); BARROS (1980); ANTEPARA (1965); ICA (1977) y control biológico (KRAUSS and SOBERANIS, 2001).

El control biológico ha despertado gran interés en detener los patógenos de plantas y es una respuesta al creciente uso de pesticidas químicos. Existe un grupo importante de hongos, bacterias, levaduras y actinomicetos que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos, acción que puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales.

El género *Trichoderma* es un grupo de hongos ampliamente utilizado por el efecto antagónico contra un amplio rango de hongos fitopatógenos, por su gran capacidad parasítica que presenta frente a otros microorganismos causantes de enfermedades en plantas, entre las enfermedades del suelo que controla *Trichoderma sp.* se pueden mencionar: *Phytium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium* y *Sclerotinia*. Algunas

enfermedades del follaje que controla: *Botrytis*, el Mildeu polvoroso, entre otras. También actúa mediante la producción de antibióticos que le permite inhibir el desarrollo de otros hongos o bacterias que compiten por nutrientes y espacio, como ocurre sobre flores y frutos con *Botrytis* y *Monilia* AGROTENDENCIA (2006).

El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial antagónico in vitro frente al hongo patógeno nativo *Moniliophthora roreri* en el departamento de Norte de Santander. En condiciones in vitro, se pueden realizar pruebas antagónicas para investigar posibles microorganismos como controladores biológicos de enfermedades en el cultivo del cacao. En este estudio se evaluaron seis cepas nativas del hongo antagónico del género *Trichoderma sp.* y una cepa bacteriana de *Bacillus sp.*, para determinar su capacidad antagónica frente a siete cepas del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri*. El principal agente ensayado es *Trichoderma* del que se han obtenido resultados positivos de inhibición de crecimiento en placa de *M. roreri* EVANS (1981); (KRAUSS and HEBBAR, 1998); SUÁREZ (2006). La Federación Nacional de Cacaoteros ha realizado una gran investigación sobre las posibles luchas biológicas contra *M. roreri* con productos biológicos comerciales como *Trichoderma spp*, en el cual han determinado un control significativo de la enfermedad por parte del hongo antagónico *Trichoderma spp*. RAMÍREZ (2004).

Materiales y métodos

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Universidad Francisco de Paula Santander, siguiendo un arreglo factorial completamente al azar de seis por siete (seis cepas de *Trichoderma sp.* y siete cepas de *Moniliophthora*

roreri) con tres repeticiones por tratamiento. Dichas cepas fueron aisladas en un proyecto anterior denominado: Aislamiento e identificación del hongo *Moniliophthora roreri* a partir de cultivos de cacao ubicados en los municipios de Santiago, Sardinata, Tibú y Puerto Santander.

Las cepas de *M. roreri* fueron purificadas y conservadas en PDA, las cepas de *M. roreri* 7-17-18-48 se aislaron durante el segundo semestre del año 2005 y las cepas A1-A2-A5 en el segundo semestre del 2006. Las cepas de *Trichoderma sp.* T1-T2-T3-T4-T5-T6 fueron aisladas en el segundo semestre del 2005 y conservadas en PDA. La cepa de *Bacillus sp.* utilizada fue aislada en el segundo semestre del 2005, en el proyecto anterior.

Identificación de especie de cepas nativas de *Trichoderma sp.*

Las cepas de *Trichoderma sp.* fueron aisladas a partir de suelos en cultivos de cacao en los municipios: El Zulia, El Tarra, Bucarasica y el corregimiento de Agua Clara en Norte de Santander. Una vez reactivadas y purificadas, las cepas fueron identificadas molecularmente por ITS.

Las pruebas de antagonismo seleccionadas informan sobre la capacidad de los microorganismos antagónicos cepas de *Trichoderma sp.* y *Bacillus sp.*, para afectar el desarrollo de *Moniliophthora roreri* a partir de la posible producción de metabolitos. Las metodologías utilizadas para la evaluación de los microorganismos generan efectos sobre las estructuras de reproducción del hongo fitopatógeno, por esta razón las que se ajustan a este fin son: plato dual, metabolitos difusibles y plato precolonizado CORPOICA (2006).

Técnica del plato dual

En cajas petri fueron marcados 2 puntos distantes a 4 cm, con medio de cultivo PDA; se tomó una porción de la colonia esporulada del fitopatógeno y se colocó en uno de los puntos, se dejó crecer la colonia aproximadamente 4 cm, después de la misma forma se inoculó el antagonista en el lado opuesto. Las cajas se incubaron a 28°C durante 8 días. Se utilizaron pruebas cuantitativa y cualitativa. En la prueba cuantitativa se empleó la evaluación del potencial inhibitorio micelial. Se calcularon los valores para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM) según la fórmula:

$$PICM = \frac{Mb - Ma}{Mb} * 100$$

Donde Ma: Micelio del fitopatógeno inhibido; Mb: Micelio del fitopatógeno con crecimiento libre.

En la prueba cualitativa se compararon las cepas teniendo en cuenta la capacidad antagónica, de acuerdo con la escala de notas (tabla 1) BELL y colaboradores (1982) citado por PEREZ (2004).

Tabla 1. Descripción de la clave BELL y colaboradores (1982) citado por PEREZ (2004).

| NIVEL DE ANTAGONISMO | CUALIFICACIÓN |
|----------------------|--|
| 1 | El antagonista crece totalmente sobre el fitopatógeno. |
| 2 | El antagonista crece sobre las 2/3 partes de la caja de cultivo, inhibiendo el crecimiento y desarrollo del fitopatógeno. |
| 3 | El antagonista y el fitopatógeno ocupan espacios iguales en la caja de cultivo, observándose que no hay competencia entre ellos. |
| 4 | El fitopatógeno crece sobre las 2/3 partes de la caja de cultivo, inhibiendo el crecimiento y desarrollo del antagonista. |
| 5 | El fitopatógeno crece totalmente sobre el antagonista. |

Metabolitos difusibles.

Se realizaron filtrados de las cepas de *Trichoderma sp.* y se inoculó una suspensión de esporas de *M. roreri* en agua destilada estéril y agua destilada estéril con sucrosa, se incubó durante 24 horas a una temperatura de 28°C, se observó al microscopio. El efecto de los filtrados sobre fitopatógeno se midió a las 24 horas de iniciada la incubación, y se indicó el porcentaje de esporas germinadas.

Placa precolonizada.

Se realizó inoculación de cultivos puros de *M. roreri* en cajas de petri incubados a 28°C hasta obtener un cubrimiento total de la superficie del medio PDA. Para obtener el inóculo de los antagonistas se utilizaron cultivos de ocho días de edad. Se tomaron franjas de medio con el antagonista y se colocaron sobre la superficie de la colonia del fitopatógeno. Posteriormente se incubó a 28°C a durante ocho días. La evaluación se realizó al observar el micoparasitismo entre el antagonista y el fitopatógeno, teniendo en cuenta el crecimiento del antagonista.

Estas técnicas fueron empleadas tanto para *Trichoderma sp.* como *Bacillus sp.* la prueba de *Bacillus sp.* se evaluó en el medio PDA, para proporcionarle al fitopatógeno unas condiciones donde se pudiera desarrollar y simular un ambiente natural.

Los datos se procesaron estadísticamente utilizando la prueba F ($\alpha = 0.05$), estimado mediante análisis de varianza, para un diseño completamente al azar y tres repeticiones por tratamiento con un arreglo factorial de seis por siete, complementado con prueba Tukey de comparación de medias.

Resultados y discusión

En el estudio se realizó una selección de las mejores cepas entre las seis del hongo antagonístico *Trichoderma sp.* de acuerdo a su alto potencial de inhibición micelial frente a *M. roreri* (foto 1). Durante las pruebas de antagonismo se destacaron las cepas denominadas: T1, T3 y T5, luego identificadas molecularmente como *Trichoderma asperellum* (T1 y T5) y como *Trichoderma longibrachiatum* (T3) (figura 1).

La identificación molecular del aislamiento T1 se realizó con base en el alineamiento de la secuencia de los espaciadores internos de transcripción ITS1 e ITS2. Análisis Blast n mostró una homología del 99% con *Trichoderma asperellum*.

La identificación del aislamiento T3 se realizó con base en el alineamiento de la secuencia de los espaciadores internos de transcripción ITS1 e ITS2. El análisis Blast n mostró una homología del 98% con *Trichoderma longibrachiatum*.

La identificación del aislamiento T5 se realizó con base en el alineamiento de la secuencia de los espaciadores internos de transcripción ITS. El análisis Blast n mostró una homología del 98% con *Trichoderma asperellum*.

Los resultados son beneficiosos en cuanto a la capacidad antagónica que presentaron frente a *M. roreri* por ser especie de gran interés para el control biológico de enfermedades en plantas. Se ha demostrado que *T. asperellum* a través de la expresión de un gen (agn13.2) y secreción de enzimas (α -1,3-glucanasa) presenta capacidad antagónica (SANZ, et al., 2004).

En diferentes estudios se ha observado en *T. longibrachiatum* una gran capacidad de colonización micelial como agente biocontrolador sobre el fitopatógeno. Como también la capacidad de inhibir mediante el mecanismo de antibiosis GONZÁLEZ, (2004).

Según los resultados obtenidos en el estudio de enfrentamiento las seis cepas de *Trichoderma sp.* y las siete cepas de *M. roreri*, las mejores cepas de *Trichoderma sp.* fueron T1-T3 y T5, debido a que ellos produjeron un 100% de antagonismo al sexto de día de evaluación de los ocho días que duro la prueba (figura 1).

Los resultados observados en la prueba de antagonismo con *Bacillus sp.* no fueron iguales a los obtenidos con *Trichoderma sp.*

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza (ANAVA), se pudo establecer que durante el estudio, se presentaron diferencias estadísticas significativas ($\alpha=0.05$) entre las cepas de *Trichoderma sp.*, no se presentaron diferencias significativas entre las cepas de *M. roreri*, se observó interacción entre estas dos especies (hongo fitopatógeno y antagonista) (tabla 2).

Tabla 2. Cuadrados medios del ANAVA para el grado de antagonismo durante los días de evaluación de la prueba.

| F.V | G.L | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 |
|----------------------------|-----|---------------------|------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|
| <i>Trichoderma sp.</i> (T) | 5 | 48.644 [†] | 489.7413 [*] | 658.7199 [*] | 259.684 [†] | 159.8245 [‡] |
| <i>M. roreri</i> (M) | 6 | 26.7687 | 634.7879 ^{**} | 426.5481 ^{**} | 102.9941 | 1399104 ^{**} |
| T*M | 30 | 16.5213 | 168.3720 | 147.8956 | 102.9013 | 78.2080 ^{**} |
| Error | 84 | 20.6863 | 152.6745 | 138.0673 | 71.9874 | 28.65445 |
| C.V.(%) | | 11.0 | 20.4 | 15.1 | 9.8 | 6.1 |

Datos transformados mediante arcoseno

* Diferencias significativas ($\alpha=0.05$).

** Diferencias significativas ($\alpha=0.01$)

Foto 1. Antagonismo de *Trichoderma sp.* frente a *Moniliophthora roreri*. La flecha indica la colonia de *M. roreri* totalmente cubierta por el hongo antagonista *Trichoderma sp.* en PDA.



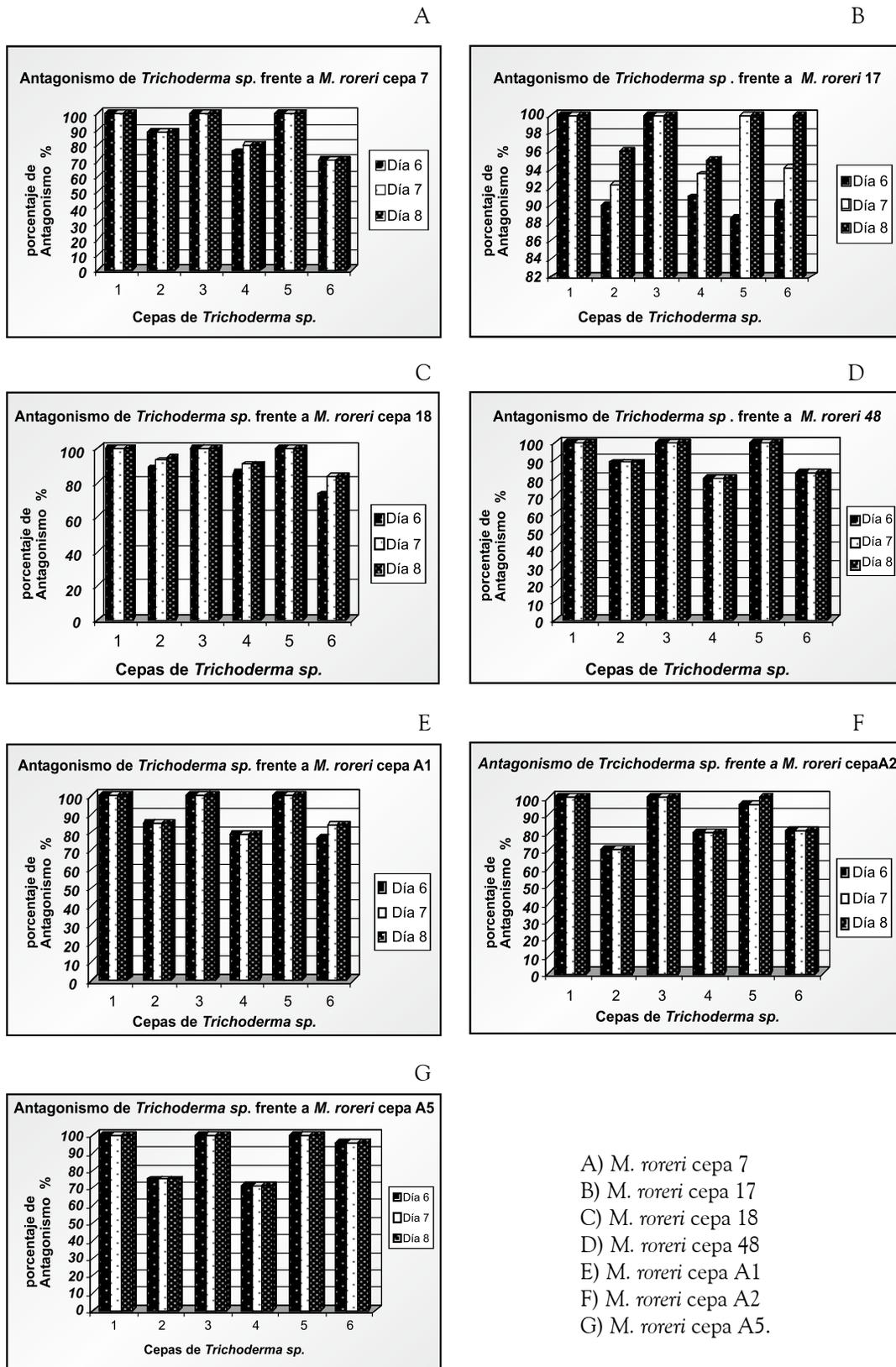
Fuente, Claudia Cabrales

La capacidad antagónica de los aislamientos estudiados aumentó hasta el sexto día se demuestra que el hongo fitopatógeno había dejado de crecer mientras que el hongo antagonista continuaba creciendo hasta invadir totalmente la superficie de la colonia del hongo fitopatógeno, lo cual es la manifestación microscópica de los procesos de micoparasitismo.

Resultados similares comparten WELLS, (1986); CHET, (1987), citado por BERNAL, y colaboradores (2007), los cuales encontraron que la mayoría de las especies de este antagonista tienen un buen micoparasitismo capaz de detectar su hospedante a distancia y posteriormente comienza su ramificación de forma atípica hacia el hongo fitopatógeno y secreta sustancias (enzimas hidrolíticas, metabólicos antifúngicos), quien además debe iniciar su competencia por espacio y nutrientes.

Identificación de especie de cepas nativas de *Trichoderma sp.* y *Bacillus sp.* y evaluación de su potencial antagonista in vitro frente al hongo fitopatógeno nativo *Moniliophthora roreri* en el departamento de Norte de Santander.

Figura 1. Antagonismo de *Trichoderma sp.* frente a *Moniliophthora roreri*.



- A) *M. roreri* cepa 7
- B) *M. roreri* cepa 17
- C) *M. roreri* cepa 18
- D) *M. roreri* cepa 48
- E) *M. roreri* cepa A1
- F) *M. roreri* cepa A2
- G) *M. roreri* cepa A5.

Las cepas de *Trichoderma sp.* evidenciaron fuerte competencia por los nutrientes, y muestran mayor capacidad de colonización del sustrato que el hongo fitopatógeno, por su gran velocidad de crecimiento. Es importante que los ensayos realizados en el laboratorio se lleven a campo para poder comprobar el comportamiento de las cepas antagonicas ante otros microorganismos y observar su velocidad de crecimiento.

MONT (2002) menciona que *Trichoderma sp.* tiene una alta capacidad de competencia por el sustrato, como consecuencia, el organismo afectado tiende a entrar en un estado de latencia que puede ser por deficiencia de nutrientes o la presencia de cierto nivel de sustancias inhibitorias, lo cual impide que *M. roreri* llegue a esporular.

En la prueba cuantitativa se pudo comprobar el grado o nivel de antagonismo que poseen los aislamientos del hongo *Trichoderma sp.* Según la escala de nivel de antagonismo descrita por BELL y colaboradores (1982) citado por PEREZ (2004) (tabla 3).

Las cepas T1, T3 y T5 de *Trichoderma sp.* presentaron nivel 1, el hongo antagonista fue capaz de crecer sobre el fitopatógeno; las cepas T2, T4 y T6, presentaron nivel 2, el antagonista crece sobre las 2/3 partes de la caja de cultivo, inhibiendo el crecimiento y desarrollo del fitopatógeno.

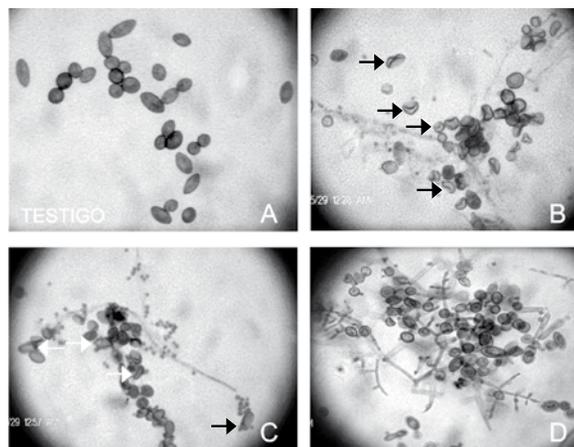
Tabla 3. Nivel de antagonismo entre *Trichoderma sp.* Vs. *M. roreri*.

| GÉNERO | AISLAMIENTO | NIVEL DE ANTAGONISMO <i>Trichoderma sp.</i> frente a <i>M. roreri</i> | | | | |
|------------------------|-------------|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <i>Trichoderma sp.</i> | T1 | x | | | | |
| | T2 | | x | | | |
| | T3 | x | | | | |
| | T4 | | x | | | |
| | T5 | x | | | | |
| | T6 | | x | | | |

Micoparasitismo al microscopio.

Se realizaron montajes al microscopio para observar el micoparasitismo entre el hongo antagonico y el fitopatógeno. Se observa como se encuentran estructuras de *Trichoderma sp.* (hifas y esporas), junto con esporas de *M. roreri*, la mayoría de ellas deformes indicadas con flechas y comparadas con esporas testigos, (foto 2) se indica que *Trichoderma sp.* actúa sobre las esporas del fitopatógeno deformándolas hasta causarle la muerte, y además las esporas de *M. roreri* que aparentemente se observan en buen estado son esporas que no presentaron la capacidad de volver a reproducirse. Luego se sembraron estas esporas en PDA, y no creció el fitopatógeno.

Foto 2. Micoparásitismo de *Trichoderma sp.* y *M. roreri* al microscopio. A) Esporas testigos de *M. roreri*. B) y C) Esporas de *M. roreri* deformes (indicadas con flechas) por acción del micoparasitismo causado por *Trichoderma sp.* D) Interacción entre las estructuras de *Trichoderma sp.* (hifas y esporas) con las esporas de *M. roreri*.



Fuente, Claudia Cabrales

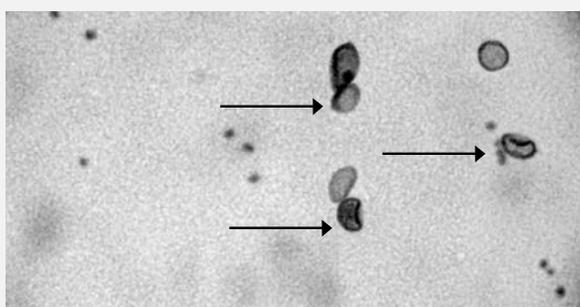
La prueba de metabolitos difusibles se realizó con una suspensión de *M. roreri* colocada en contacto directo con filtrados de los antagonistas y se determinó el perfil de germinación de esporas de *M. roreri*, indicando con esta prueba la producción de enzimas

(hidrolíticas, metabólicas, y antifúngicas) del hongo antagonista que no permitió la germinación de las esporas de *M. roreri*. En un tiempo de 24 horas arrojó resultados positivos, no se presentaron esporas germinadas del fitopatógeno. En las esporas de *M. roreri* contenidas en los filtrados de los hongos antagonistas, se observó deformación de las esporas de *M. roreri* y a su alrededor algunas esporas del hongo antagonista (esporas más pequeñas) (foto 3), y se demuestra en los filtrados la presencia de sustancias inhibitorias para microorganismos fitopatógenos.

El hongo fitopatógeno no manifestó germinación de esporas durante las 24 horas de evaluación y además el hongo mostró muy baja germinación de esporas a las 24 horas de incubación, siendo su máximo porcentaje de germinación de un 2.66 %.

Estos resultados sugieren una baja viabilidad de las esporas que se producen artificialmente, mientras que en campo podría existir algún factor de tipo ambiental que ayuda a que la germinación de esporas sea elevada. Estos resultados confirman las observaciones realizadas por PHILLIPS (2003), quien encontró un porcentaje máximo de germinación del 6% a las 24 horas de evaluación en condiciones similares de incubación.

Foto 3. Esporas de *M. roreri* en filtrados de hongos antagonistas.



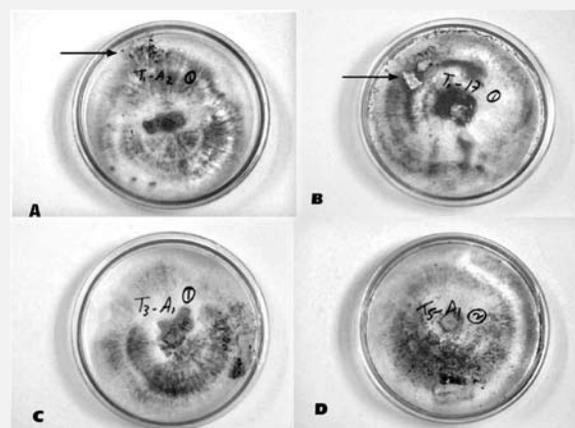
Fuente, Claudia Cabrales

Otros estudios serán necesarios para

conocer mejor este aspecto de la biología del patógeno, y determinar si existen mecanismos intrínsecos en la espora de *M. roreri* que regulan la iniciación de procesos de germinación.

En la prueba de placa precolonizada los resultados obtenidos fueron negativos, no se observó crecimiento del hongo antagonista sobre el fitopatógeno indicando así que *Trichoderma sp.* no presenta la capacidad de reproducirse sobre el fitopatógeno sino que necesita un medio de cultivo donde se pueda desarrollar antes de causar agresión al fitopatógeno. El estudio se llevó a cabo con las siete cepas de *Moniliophthora roreri* enfrentadas con las tres cepas de *Trichoderma sp.* seleccionadas.

Foto 4. Prueba placa precolonizada *M. roreri* Vs. *Trichoderma sp.* A), B), C) y D) colonias de *M. roreri* colonizando el medio de cultivo y sobre ellas trozos de medio de cultivo con los aislamientos de *Trichoderma sp.* (indicados con flechas) que no se desarrollaron sobre la colonia del fitopatógeno.



Fuente, Claudia Cabrales

Antagonismo de *Bacillus sp.* frente a *Moniliophthora roreri*.

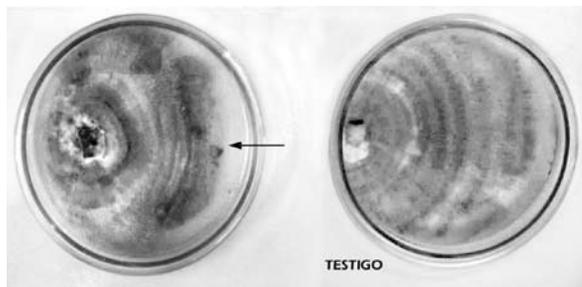
La identificación de especie de la cepa del género *Bacillus sp.* se realizó, mediante un sistema de diagnóstico BBL CRYSTAL Gram Positivo / GP (Becton Dickinson) también se tuvo en cuenta características macroscópicas

y microscópicas de su crecimiento. La realización de esta prueba contribuye a la caracterización bioquímica de la cepa aislada, y permitió identificar el aislamiento como *Bacillus brevis*.

En el estudio de antagonismo entre *Moniliophthora roreri* frente a *Bacillus brevis*, se obtuvo resultados negativos en la prueba de plato dual durante los 8 días de evaluación, se puede observar la capacidad antagónica de la cepa bacteriana de *Bacillus brevis*, comparada contra un testigo de *M. roreri*; determinó que las cepas del fitopatógeno crecieron normalmente como lo hizo la cepa testigo de *M. roreri* y la cepa bacteriana no presentó un buen crecimiento ni inhibición sobre el hongo fitopatógeno (foto 5).

Bacillus brevis es una bacteria que no es útil para el control biológico de hongos fitopatógenos aunque si produce el antibiótico conocido como gramicidina S, utilizado en el tratamiento de numerosas enfermedades infecciosas en el hombre; también secretan una toxina molusquicida aprovechada en el control de moluscos y se ha descrito que algunos hongos matan los huevos de moluscos. VITAE (2007).

Foto 5. Antagonismo *Bacillus sp.* frente a *Moniliophthora roreri*, 8 días de incubación (*Bacillus brevis* indicado con la flecha). En PDA.



Fuente, Claudia Cabrales

Los ensayos In Vitro aunque no reflejan lo que puede suceder en realidad en

campo, determinan el potencial de los microorganismos para el control biológico y mide la susceptibilidad del patógeno frente a los antagonistas.

La segunda fase de este trabajo esta orientada a realizar nuevos aislamientos de *Trichoderma* nativo y diversos microorganismos antagonistas como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas cepacea*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Gliocladium sp.*, *Paecilomyces sp.* CORPOICA (2006) con potencial antagónico para monilia y otros fitopatógenos que están afectando los cultivos de cacao en nuestra región.

una tercera fase de la Investigación comprende el llevar a campo estos antagonistas y observar su comportamiento en los cultivos afectados por *M. roreri*. Y aplicar esta nueva alternativa para un manejo integrado de la enfermedad.

Conclusiones

Se identificaron molecularmente por ITS, dos cepas de *Trichoderma sp.* como dos especies: *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma longibrachiatum* y se demostró con las diferentes pruebas de antagonismo utilizadas en este estudio que son microorganismos efectivos para el control biológico de moniliasis.

Los resultados demuestran la particular habilidad parasítica, producción de enzimas y competencia por espacio y nutrientes de los diferentes aislamientos de *Trichoderma sp.* frente a un mismo fitopatógeno, se mostró su gran potencial antagónico sobre el crecimiento micelial, al compartir un sustrato común con las cepas del hongo fitopatógeno *M. roreri*.

Trichoderma sp. no presentó la capacidad de desarrollarse sobre *M. roreri* según la prueba de placa precolonizada, y se indica que

posiblemente el antagonista necesita de un medio para poder empezar su crecimiento y luego si atacar al hongo fitopatógeno.

Los ensayos realizados directamente con las estructuras de reproducción del fitopatógeno. Se pueden extrapolar estas pruebas a la realidad en campo permitiendo a largo plazo un control más efectivo de la enfermedad.

En las pruebas de antagonismo entre el fitopatógeno *M. roreri* y la cepa bacteriana del género *Bacillus brevis*, los resultados fueron negativos debido a que es una bacteria no apta para el control biológico de enfermedades en plantas. Y es conveniente realizar nuevos aislamientos de *Bacillus sp.* para observar si funcionan como controladores de enfermedades en plantas y otros organismos.

Bibliografía

AGROCADENAS. OBSERVATORIO TERRITORIOS RURALES-SINTESIS DE EXPERIENCIAS LOCALES. Evaluación de la respuesta a moniliasis de algunos clones universales y regionales de cacao. Arauca, Santander – Colombia, 2005.

AGROTENDENCIA REVISTA. El uso del *Trichoderma sp.* en los cultivos. Caracas, Venezuela, 2006.

AMPUERO, E. Control de la moniliasis del cacao. Ecuador, Servicios Cooperativo interamericano de Agricultura. Sanidad Vegetal, N° 9, p. 8. 1961.

ANTEPARA, H. El Brestan 60 y Dithane M-22 comparados con el Caocobre Sandoz en el combate de la monilia de cacao. Guayaquil, Tesis. P.40. 1965.

ARGUELLO, O. Seminario Nacional de Actualización en Cacao con énfasis en la rehabilitación de plantaciones. Ministerio de Agricultura, Instituto Colombiano Agropecuario. Sugerencias de Transferencia y de Investigación, ICA, Manizales, Noviembre 27-29 de 1990.

BARROS, O. El control de la moniliasis en cacaoteras del Dique. El cacaotero colombiano. No. 15. p.31-44. Diciembre de 1980.

BERNAL, A; ANDREU, C; MOYA, M; GONZÁLEZ, M; Y FERNÁNDEZ, O. Utilización de *Trichoderma spp.* como alternativa ecológica para el control de *Fusarium oxysporum schlecht f.sp cubense (e.f.smith) snyd.& hans.* 2007.

CORPORACION COLOMBIANA DE INVESTIGACION AGROPECUARIA. CORPOICA, Centro de Investigación – TIBAITATA. Capacitación sobre el uso de metodologías y protocolos para realizar investigaciones con microorganismos patógenos y potenciales antagonistas en el cultivo de cacao. Laboratorio de Fitopatología, CORPOICA. C.I- TIBAITATA. 10 de Octubre – 17 de Noviembre de 2006.

EVANS, H. Pod rot of cacao causes by *Moniliophthora roreri*. Phytopathological Papers N° 24. CMI. Kew. Surrey, England. 1981.

GONZÁLEZ, G. Evaluación In Vitro del efecto inhibitorio de *Trichoderma longibrachiatum* sobre *Phytophthora capsici* agente causal de la marchitez del pimentón (*Capsicum annum*). Talca – Chile. 2004.

INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). Informe anual de progreso, programa nacional de cacao. Palmira, p.60. 1977.

KRAUSS, U. and SOBERANIS, W. Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. *Biological control*, 22. p.149-159. 2001.

KRAUSS, U. and HEBBAR, P. Avances científicos en el control de la moniliasis y la escoba de bruja. *Foro Internacional: Cacao del Perú para el mundo*, Lima. 1998. p 28-29.

MONT, R. Manejo Integrado de enfermedades de las plantas. SENASA. LIMA-PERU. p 50-56. 2002.

PEREZ, N. Manejo Ecológico de Plagas. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural. La Habana, Cuba: Unidad de Producciones Gráficas del MINREX, 2004.

PHILLIPS, M. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomy affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif) Evans et al. as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. Mayo, 2003.

RAMÍREZ, C. Federación Nacional de Cacaoteros. FEDECACAO, 2004.

SANZ L; MONTERO M; REDONDO J; LLOBELL A; MONTE E. Expression of an α -1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*, Noviembre, 2004.

SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGRARIA. La moniliasis del cacao. SENASA. Ministerio de Agricultura. Perú, 2006.

SUAREZ, L. Aislamiento e identificación de *Moniliophthora roreri* causante de la moniliasis en municipios del nororiente colombiano. *Respuestas*. Universidad Francisco de Paula Santander. Colombia Año 11 N° 1. Julio, 2006.

VITAE. El control biológico de los moluscos intermediarios de los esquistosomas: el ejemplo de la región del caribe. ACADEMIA BIOMEDICA DIGITAL, Octubre, 2007.