

“Uso de *Trichoderma* spp para control del complejo Moniliasis-Escoba de Bruja del cacao en Ecuador”

Karina Solis Hidalgo* & Carmen Suárez-Capello**

Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Tropical Pichilingue, Departamento Nacional de Protección Vegetal.

PO Box 24, Quevedo, Los Ríos Ecuador.

*carinasolis@yahoo.com, **protveg@hotmail.com

Resumen

Especies del género *Trichoderma* (*T. koningiopsis* y *T. stromaticum*) aisladas en el hábitat donde se desarrollan las enfermedades del cacao, se presentan *in vitro* como supresores de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri*) y Escoba de bruja (*Crinipellis perniciosa*). Para evaluar estos agentes a nivel de campo e integrar el componente biológico al manejo integrado del cultivo, se realizaron dos experimentos aplicando conidias de *T. koningiopsis* y *T. stromaticum* (10^8 esp/mL) solos y en mezcla, en comparación con Óxido Cuproso (3.0 g. i.a./árbol) y Azoxystrobina (0.75 mL p.c./árbol). Las aplicaciones se hicieron quincenal y mensualmente para los biocontroladores y mensualmente los fungicidas, durante la época lluviosa. Antes de la intervención se evaluó la micoflora presente en los lotes, sin detectar presencia de *Trichoderma*. En este primer año, no hubo diferencias significativas entre los aislamientos, sin embargo se encontró menor número de mazorcas esporuladas con *M. roreri* y frutos Cherelles en los tratamientos con *T. koningiopsis*. La producción de mazorcas sanas aumento entre 16 y 20% en relación al testigo con todos los tratamientos; *T. koningiopsis* pudo ser recuperado del tronco, mazorcas sanas y frutos tiernos, así como de flores y cojinetes florales hasta cuatro meses después de la última aplicación. En ningún caso se recuperó *T. stromaticum*.

INTRODUCCION

Las principales enfermedades que azotan al Ecuador son Escoba de Bruja y Moniliasis, causadas por *Crinipellis perniciosa* y *Moniliophthora roreri* respectivamente, ocasionan pérdidas del 60% la producción. La diseminación de *C. perniciosa* depende de basidiocarpos formados sobre escobas secas, *M. roreri* es especializado en frutos (Suárez, 1993) se dispersa por el viento, las esporas que crecen abundantemente en la superficie de la mazorca colonizan internamente y los síntomas aparecen luego 60 días de la infección (Suárez, 1971; Ram, 1989).

Su control, empieza bajando la altura del árbol mediante un descope, poda sanitaria anual y remoción semanal de mazorcas enfermas. La protección de frutos con Oxido Cuproso, Clorotalonil, reduce infecciones en un 40% (Suárez, 1993), la Azoxistrobina, ejerce control de *M. roreri* (Durango, 2001). La selección de materiales con resistencia genética es compleja y precisa de tiempo para su disponibilidad al agricultor (Suárez, 1993).

La búsqueda de alternativas, mediante selección y reintroducción de microorganismos antagonicos a *M. roreri* y *C. perniciosa*, constituye una atractiva solución presentando riesgos menores que los derivados por fungicidas (Solís, 1999; Hebbar *et al.*, 1999;

Samuels *et al.*, 2000; Suárez y Solis, 2003), reduciendo la capacidad del patógeno para producir inóculo (Fokkema, 1995).

Existen pocos reportes de control biológico de patógenos en cacao (Hebbbar *et al.*, 1999; Solis, 1999), especies endofíticas se mencionan con gran potencial (Arnold, 1999). Bacterias como *Pseudomona aeruginosa*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus subtilis*, *P. cepacia* han sido evaluadas ampliamente en el control de Moniliasis (Sandoval *et al.*, 1987; Jiménez *et al.*, 1988; Macagnan *et al.*, 2005). Los hongos *Cladobotryum amazonense*, *Hypomyces* spp, *Verticillium lecanii*, *Penicillium* spp, *Clonostachys* spp. (*Gliocladium*), *Trichoderma* spp, *Aspergillus niger*, *Acremonium* spp, *Didymella* spp, *Nectria* spp, *Didymostilbe* spp se han identificado como antagonistas de enfermedades del cacao (Krauss y Soberanis, 2003; Suárez y Solis, 2003; Bateman *et al.*, 2005).

T. stromaticum es usado en Brasil para controlar *C. perniciosa* (Carvalho *et al.*, 2005) evita la formación de basidiocarpos (Samuels *et al.*, 2000) parasita hifas de *C. perniciosa* en el interior de las escobas secas (Costa *et al.*, 2005). En Ecuador, el INIAP ha seleccionado microorganismos antagonistas a *M. roleri* y *C. perniciosa*. De éstos, *T. koningiopsis* (antes llamado *T. koningii*) (Solis, 1999; Suárez y Solis, 2003) y *T. stromaticum* son las especies mas promisorias para el control de enfermedades de la mazorca de cacao.

Con estos antecedentes en este trabajo se evaluó a nivel de campo la eficacia y establecimiento de los agentes de control biológico *T. koningiopsis* y *T. stromaticum* para el control de *M. roleri* y *C. perniciosa*, comparado con el Óxido de Cobre y Azoxistrobina con la finalidad de integrar al componente biológico dentro del manejo integrado del cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies nativas de Ecuador (Colección de hongos antagonistas, Laboratorio de Fitopatología), Departamento Nacional de Protección Vegetal, Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP; probados *in vitro* y seleccionados por su agresividad *T. koningiopsis* (509) y *T. stromaticum* (01), se aplicaron en dos lotes de cacao durante enero hasta mayo del 2005 (Tabla 1).

Un lote de híbridos (IMC 67 x SCA 6 y EET 19 x SILECIA 1) de 40 años de edad, denominado “Nuevo Bambú” (EET-Pichilingue), se encuentra a cinco kilómetros de la vía El Empalme, sus coordenadas geográficas 79°28'06'' de longitud oeste y 01°05'24'' de latitud sur a 85msnm¹. Con una precipitación de 2442.6mm, 25°C, 85.15% de humedad relativa y 889.4 horas luz/año².

El lote comercial “El Chollo” de la empresa exportadora ORECAO S.A., ubicado en La Cadena, Provincia de Los Ríos. Sus coordenadas son 79°25'09'' de longitud oeste y 0°54'11'' de latitud sur a 90 msnm¹. Con una precipitación de 3278 mm, 25°C, 87% de humedad relativa y 949 horas luz/año². Las parcelas se ubicaron en dos lotes de cacao, con clones Tipo Nacional (EET 95, EET 103 y EET 96) y CCN 51 de aproximadamente tres y seis años de edad respectivamente.

¹ Coordenadas geográficas registradas con GPS (Global Positioning System, Localizador Satelital por Coordenadas) 315 MAGELLAN.

² Datos tomados de los años 1998-2004. Estación Meteorológica del INAMHI Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP

Tabla 1. Concentración de suspensiones, frecuencia y número de aplicaciones de los tratamientos en “Nuevo Bambú” y “El Chollo”

Tratamientos	Concentración	Aplicaciones			
		“Nuevo Bambú” *		“El Chollo” **	
		Frecuencia	Nº	Frecuencia	Nº
<i>T. koningiopsis</i>	10 ⁸ esp/mL	Quincenal	9	Mensual	5
<i>T. stromaticum</i>	10 ⁸ esp/mL	Quincenal	9		
<i>T. koningiopsis</i> + <i>T. stromaticum</i>	10 ⁸ esp/mL (1:1)	Quincenal	9		
Oxido cuproso (Cobre Nordox 50)	3.0 gr. i.a/árbol	Mensual	4		
Azoxistrobina (Bankit)	0.45 mL p.c/árbol	Mensual	4		
Testigo	Sin aplicación	---	---		

Se calcula un gasto de (*) 200 mL y (**) 160 mL de agua por árbol

Manejo de los experimentos

En ambos lotes se realizó una poda sanitaria y eliminaron mensualmente los chupones, en “Nuevo Bambú”, se seleccionaron al azar 48 árboles con suficiente producción, se fertilizó y aplicó Glifosato para controlar malezas. El experimento se realizó bajo un Diseño Completamente al Azar con 6 tratamientos y ocho unidades (plantas) de observación. En “El Chollo” se desarrolló bajo Diseño de Bloques Completos al Azar, con seis tratamientos y tres repeticiones. Dos repeticiones se ubicaron en cacao Nacional y una en CCN 51. Parcelas con 64 árboles, 36 (6 x 6) fueron aplicados y 16 (4 x 4) evaluados como parcela útil.

En laboratorio se sub-cultivaron *T. stromaticum* y *T. koningiopsis*, en medio papa-dextrosa-agar (PDA, DIFCO®). Se usaron esporas *T. koningiopsis* producidas en sustrato sólido³ (arroz) y *T. stromaticum* obtenido en medio líquido (melaza, levadura de cerveza). Se suspendieron a concentraciones establecidas y añadió Tween® 20 (0,05% v/v).

Antes de las aplicaciones en “Nuevo Bambú”, se colectaron muestras de mazorcas sanas, enfermas, tronco y Escobas vegetativas en 10 árboles del ensayo. Segmentos de tronco se aislaron directamente en campo (PDA más Cloranfenicol 0.05 %). Las muestras se trasladaron al Laboratorio, se lavaron, desinfectaron (Cloro comercial 5%) e inocularon en PDA.

Las aplicaciones se realizaron con bombas de presión retenida (“Jacto”, boquilla de cono color azul) separadas para cada tratamiento. Durante la cosecha, se colectó y aisló (PDA más Rosa de bengala 0.005%) una mazorca sana por árbol (*Trichoderma* spp y testigo). Los cultivos se incubaron a 25°C durante siete días. En “El Chollo” al inicio del experimento se colectaron y aislaron, muestras del tronco y mazorcas en 20 árboles. Las aplicaciones se realizaron con equipos motorizados de espalda (Jacto® Polijacto PL-50BV).

Quincenalmente se registró la producción de frutos sanos, se removieron y contaron mazorcas Monilia, *Phytophthora*, Cherelles Wilt (frutos marchitos de hasta 10 cm) y Escoba. A mediados y luego de cuatro meses de la última aplicación con *Trichoderma* sp

³ Metodología de producción masiva de Biocontroladores. EET-Pichilingue, INIAP

en “Nuevo Bambú”, se aislaron en campo muestras del tronco y cojinetes florales, se colectaron flores, frutos tiernos y se aislaron en laboratorio.

RESULTADOS

A. Eficacia de *T. koningiopsis* y *T. stromaticum* para el control enfermedades frente al Oxido de Cobre y Azoxistrobina

El muestreo *in vitro* de especies nativas en mazorcas sanas, enfermas, tronco y escoba vegetativas previo a las aplicaciones, indicó ausencia de *T. koningiopsis* y *T. stromaticum*, se aislaron colonias de los géneros *Colletotrichum*, *Diploida*, *Fusarium*, *Cladosporium* y *Nigrospora*. En “Nuevo Bambú”, promedios del total de mazorcas cosechadas indicaron efecto de *Trichoderma* y los fungicidas; *T. koningiopsis* presentó menores niveles de Monilia y frutos Cherelles (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de mazorcas sanas, Monilia, enfermas y Cherelles Wilt. “Nuevo Bambú”, EET-Pichilingue.

Tratamientos	% de Mazorcas			
	Sanas	Monilia	Enfermas	Cherelles
<i>T. koningiopsis</i>	27	14	36	23
<i>T. stromaticum</i>	27	23	24	27
<i>T. koningiopsis</i> + <i>T. stromaticum</i>	24	19	27	29
Azoxistrobina	29	16	31	24
Oxido de cobre	33	18	23	26
Testigo	25	17	26	32

En “El Chollo”, el efecto de *Trichoderma* y fungicidas sobre la producción de mazorcas sanas fue igual. Sin embargo, los frutos infectados fueron similares en comparación con el testigo. Analizando por separado mazorcas infectadas y Cherelles, se encontró diferencia en porcentajes de Monilia, los fungicidas y *T. koningiopsis* presentaron niveles de infección similares entre sí y estadísticamente diferentes al testigo (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de mazorcas producidas en parcelas aplicadas con *T. koningiopsis*, *T. stromaticum* y fungicidas. “El Chollo”, ORECAO.

Tratamientos	% de Mazorcas		% Mazorcas infectadas			
	Sanas	Enfermas	Monilia	Escoba	<i>Phytophthora</i>	Cherelles
<i>T. koningiopsis</i> (T.k)	48,22 a	51,78 b	19,10 b	29,87 a	2,52 a	18,18 c
<i>T. stromaticum</i> (T.s)	50,40 a	49,60 b	19,88 ab	27,22 a	2,22 a	25,78 ab
<i>T. k</i> + <i>T. s</i>	50,02 a	49,99 b	18,61 b	27,42 a	3,91 a	19,16 b
Azoxistrobina	54,62 a	45,38 b	18,43 b	25,22 a	1,56 a	23,71 b
Oxido de cobre	54,47 a	45,54 b	19,37 b	23,04 a	3,13 a	32,31 a
Testigo	34,34 b	65,66 a	28,57 a	33,59 a	3,50 a	20,14 b
% CV	13,14	13,23	23,34	24,47	58,10	14,69

Duncan al 5% (P<0.05), promedios que comparten la misma letra no difieren estadísticamente entre si

T. koningiopsis, solo o combinado, presentó valores menores de Monilia. No se presentaron diferencias en porcentajes de mazorcas Escoba y *Phytophthora*. Sin embargo, Azoxistrobina presentó menor porcentaje de *Phytophthora* y *T. koningiopsis* el menor número de Cherelles Wilt (Tabla 3)

B. Establecimiento de *T. koningiopsis* y *T. stromaticum*.

En muestreos *in vitro* (tronco, frutos tiernos, mazorcas maduras flores y cojinetes florales) se recuperó *T. koningiopsis* (Tabla 4) En el testigo se obtuvieron los géneros *Nigrospora*, *Cladosporium* y *Fusarium*.

Tabla 4. Porcentaje de recuperación de *T. koningiopsis* en árboles aplicados. “Nuevo Bambú”, EET-Pichilingue

Tratamientos	% de <i>T. koningiopsis</i>								
	Frutos		Escobas		Tronco			Cojinetes	Flores
	Sanos	Pepinos	Verdes	Secas	Antes	Durante	Posterior	Posterior	Posterior
<i>T. koningiopsis</i>	100	75	0	63	0	75	38	88	100
<i>T. stromaticum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. k. + T. s.</i>	50	50	0	75	0	63	38	75	50
Testigo	0	0	0	0	0	0	0	0	0

DISCUSION

Antes de las aplicaciones de *T. koningiopsis*, *T. stromaticum* no se encontraron especies nativas en las parcelas, lo que podría deberse al manejo del cultivo que probablemente afecta a las poblaciones nativas microorganismos benéficos, incluyendo *Trichoderma spp* (Kredics *et al.*, 2003).

La reducción de enfermedades en parcelas tratadas con *T. koningiopsis* y *T. stromaticum* fue similar a la obtenida con fungicidas. Esto concuerda con Papavizas (1985). *T. koningiopsis* se estableció en las plantas y controló a *M. royeri* igual que los fungicidas evaluados, esto indica que actuaría bajo las mismas condiciones del patógeno, característica de vital importancia en la selección del antagonista (Dubos, 1987), este efecto podría deberse a que la especie proviene de mazorcas infectadas (Solís, 1999), al respecto, Krauss y Soberanis (2003), indican que el área vegetal donde fue aislado el antagonista determina donde ejercería un mejor control de la enfermedad.

Los biocontroladores no tuvieron efecto significativo sobre *C. pernicioso*. Sin embargo, *T. stromaticum* presentó niveles similares a los fungicidas, esto probablemente se debe a que la presión de inóculo influyó en los resultados (Suárez, 1993). El efecto de *T. stromaticum* es indirecto, inhibiendo la formación de basidiocarpos, se reduce la cantidad de esporas para futuras infecciones (Bastos, 1996).

La disminución de frutos Cherelles Wilt con *T. koningiopsis*, concuerda con el efecto estimulante de *Trichoderma spp* (Chang *et al.*, 1986; Elias *et al.*, 1989). Al parecer, *T. koningiopsis* además de disminuir las infecciones de *M. royeri*, podría reducir la formación Cherelles Wilt.

La presencia de géneros *Colletotrichum*, *Diploida*, *Fusarium*, *Cladosporium* y *Nigrospora* en flores, frutos tiernos y cojinetes florales en los árboles testigo, sugiere que éstos son reprimidos por *T. koningiopsis* y de allí su influencia en mayor cuajamiento y desarrollo de frutos.

CONCLUSIONES

Las aplicaciones de *T. koningiopsis* y *T. stromaticum* mejoraron la sanidad del cultivo disminuyendo la incidencia de enfermedades e incrementaron la producción de mazorcas sanas. Redujeron la Moniliasis de manera similar a los fungicidas evaluados, *T. koningiopsis* fue el organismo mas eficaz para control, se adaptó al agroecosistema del cacao, pudiendo sobrevivir asociado al cultivo durante la época seca. Se recomienda realizar evaluaciones con *T. koningiopsis*, *T. stromaticum* y Azoxystrobina combinados en el manejo integrado de enfermedades con diferentes dosis, métodos, formulaciones y épocas de aplicación de los agentes de control biológico.

AGRADECIMIENTOS

A Drs. Prakash Hebbar (MARS-MASTERFOODS), Keith Holmes (CABI-Bioscience) y Gary Samuels (USDA-ARS) por su colaboración científica y financiera en el desarrollo de esta investigación. A los estudiantes Raquel Guerrero, David Arias, Marlon Días y Raúl Pucha.

BIBLIOGRAFÍA

- ARNOLD, E. 1999. Fungal endophytes of tropical trees: methods and potential for biological control of fungal pathogens of cacao. In Workshop Manual: Research Methodology for the Biological Control of Plant Diseases with special reference to fungal diseases of cacao. CATIE, Costa Rica. Krauss U. and Hebbar P. (eds).
- BASTOS, C. 1996. Potencial de *Trichoderma viride* no controle da vassoura_de_bruca (*Crinipellis perniciosa*) do cacaueiro. Fitopatologia Brasileira 21:509-512.
- BATEMAN, R.; HIDALGO, E.; GARCIA, J.; ARROYO, G.; HOOPER, G. ADONIJAH, V.; KRAUSS, U. 2005. Application of chemical and biological agents for the management of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in Costa Rica cacao (*Theobroma cacao*). Annals of Applied Biology 147:129-138.
- CARVALHO, A. LOGUERCIO, L.; AITKEN, M.; COSTA, T.; POMELLA, A. 2005. Desenvolvimento de bioensaio para seleção de isolados de *Trichoderma stromaticum*, correlacionando esporulação em campo com colonização em laboratorio. In Annais VIII Reuniao de Control Biológico de Fitopatógenos. Ministerio da Agricultura, pecuária e Abastecimiento/CEPLAC (BR). p. 114.
- CHANG, Y.; BAKER, R.; KLEIFELD, O.; CHET, I. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. Plant Disease 70:145-148.
- COSTA, M.; XIMENES, E.; POMELLA, A.; LOGUERCIO, L.; DE MARCO, J.; CARVALHO, L. 2005. Projeto Proteoma de *Trichoderma stromaticum*. identificação, caracterização e análise funcional de proteínas envolvidas no controle biológico do patógeno de cacau *Crinipellis perniciosa*. In Annais VIII Reuniao de Control Biológico de Fitopatógenos. Ministerio da Agricultura, pecuária e Abastecimiento/CEPLAC (BR). p. 129-130.
- DUBOS, B. 1987. Fungal antagonism in aerial agrobiocenoses. In I.Chet (ed.), Innovative Approaches to plant disease control. New York. p. 107-135.

- DURANGO, W. 2001. Evaluación de fungicidas y biocontroladores en el manejo de enfermedades de la mazorca de cacao. Tesis, Ing. Agr. Universidad de Guayaquil, Ecuador. 69p.
- ELIAS, R.; ARCOS, O.; ARBELAEZ, G. 1989. Estudio del antagonismo de algunas especies de *Trichoderma* sobre *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. Agronomía Colombia. 6:25-30.
- FOKKEMA, N. 1995. Strategies for biocontrol of foliar fungal diseases. In M. Manka (Ed), Environmental Biotic Factors in Integrated Plant Disease Control. The Polish Psychopathological Society, Pozman. p. 69-79.
- HEBBAR, P.; KRAUSS, U.; SOBERANIS, W.; LAMBERT, S.; MACHADO, R.; DESSIMONI, C.; AITKEN, M. 1999. Biocontrol of cacao diseases in Latino America status of field trials. In Workshop Manual: Research Methodology for the Biological Control of Plant Diseases with special reference to fungal diseases of cacao. CATIE, Costa Rica. Krauss U. and Hebbar P. (eds).
- JIMENEZ, J.; GALINDO, J.; RAMIREZ, C.; ENRIQUEZ, G. 1988. Evaluación del combate biológico y químico de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao en Costa Rica. In 10ª Conferencia Internacional de Investigación en cacao. p. 453-456.
- KRAUSS, U. y SOBERANIS, W. 2003. Biological control of frosty pod (*Moniliophthora roreri*) and other pod pathogens in Peru. In 13ª Conferencia Internacional de Investigación en cacao. p. 741-748.
- KREDICS, L.; ANTAL, Z.; MANCZINGER, L.; SZEKERES, A.; KEVEI, F.; ERZSEBET, N. 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potencial. Food Technology Biotechnology. 41(1):37-42.
- MACAGMAN, D.; ROMEIRO, R.; POMELLA, A. 2005. Eficiencia de bacterias do tipo actinomicetos e endoprogenicas na inibição da germinação de basidoporos de *Crinipellis pernicioso* em frutos de cacau. In Anais VIII Reuniao de Control Biológico de Fitopatógenos. Ministerio da Agricultura, pecuária e Abastecimento/CEPLAC (BR). p. 97-98.
- PAPAVIZAS, G. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Biology, ecology, and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology. 23:23-24.
- RAM, A. 1989. Biology, Epidemiology and Control of Moniliasis (*Moniliophthora roreri*) of cacao. Thesis PhD. Imperial College of Science and Technology. University of London, England. p 46-153
- SAMUELS, G.; PARDO-SCHUKTHEISS, C.; HEBBAR, P.; LUMSDEN, R.; BASTOS, C.; COSTA, N.; BEZERRA, J. 2000. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. Mycol. Res 104(6):760-764.
- SANDOVAL, G.; AMBRECHT, H.; GRANADA, G. 1987. Posibilidad de control biológico de la Moniliasis del cacao. El Cacaotero Colombiano. 10 (34):39.
- SOLIS, H. Z. K. 1999. Determinación de organismos antagónicos a *Monilia roreri* a partir de mazorcas de cacao dejadas en el suelo. Tesis Ing. Agr. Universidad de Guayaquil, Ecuador. 55p.

- SUÁREZ, C. C. 1971. Estudio del mecanismo de penetración y del proceso de infección de *Monilia royeri* Cif & Par en frutos de cacao (*Theobroma cacao*). Tesis Ing. Agr. Universidad de Guayaquil, Ecuador. 59p
- SUÁREZ, C. 1993. Enfermedades de cacao y su control. In. Suárez, C. ed. Manual del Cultivo de Cacao. 2da. Ed. Quevedo, Ecuador, EET-Pichilingue. Manual Técnico No.25. p. 90-116.
- SUÁREZ, C. C; SOLÍS, H. K. 2003. Hacia el control biológico de las pudriciones de mazorcas en cacao. Póster presentado In 14th Internacional Cocoa Research Conference. Accra, Ghana