

## Artículo científico

### Crecimiento y antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp., en el control de *Monilophthora roreri*, mediante modelos matemáticos

### Growth and *in vitro* antagonism of *Trichoderma* spp., In the control of *Monilophthora roreri*, by means of mathematical models

Johan Reinaldo Párraga Vélez <sup>1\*</sup>, Álvaro Gustavo Cañadas López <sup>2</sup>, Diana Yasbeth Rade Loo <sup>3</sup>, Piero Cristóbal Fajardo Navarrete <sup>3</sup>, Joffre Alberto Andrade Candell <sup>3</sup>, Marcos Zambrano Zambrano <sup>2</sup>, Christian Wehenkel <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Portoviejo, Manabí, Ecuador.

<sup>2</sup> Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí (ULEAM) Extensión Chone, Av. Eloy Alfaro, Chone, Manabí, Ecuador.

<sup>3</sup> Escuela Superior Politécnica de Manabí (ESPM-MFL), Centro de Investigación de las Carreras de la ESPM-MFL (CICEM). Campus Politécnico Calceta, Manabí, Ecuador. <sup>4</sup> Instituto de Silvicultura e Industria de la Madera,

Universidad Juárez del Estado de Durango, Boulevard del Guadiana #501, Ciudad Universitaria, Torre de Investigación, C.P. 34120 Durango, México

\* johan.parraga@iniap.gob.ec

Recibido 05-04-2017 ; Aceptado 22-08-2017

**RESUMEN.-** Los modelos matemáticos permiten la descripción del crecimiento y la curva de antagonismo de Aislados de *Trichoderma* frente a patógenos mediante funciones sigmoidales de tres parámetros. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el crecimiento de aislados nativos de *Trichoderma* spp., *in vitro* y determinar su capacidad antagonista en presencia de *Monilophthora roreri* a través de modelos matemáticos. Esta investigación fue conducida en la Estación Experimental Portoviejo (EEP) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Se colectaron 12 aislados de *Trichoderma* spp., de los cuales se evaluó su crecimiento y antagonismo bajo condiciones *in vitro* frente a *M. roreri*. La función de Hossfeld describe adecuadamente la función de crecimiento. Los aislados de *Trichoderma* spp., A1, A10 y A4 fueron los de mayor crecimiento, y presentaron diferentes parámetros entre cada uno de ellos. Los aislados A1, A6 y A2 fueron los que mostraron mayor antagonismo frente a *M. roreri*. El parámetro  $a$  del modelo Verhulst representa la capacidad de carga del medio de cultivo PDA. En este estudio se estableció una proporción inversamente a menor valores del parámetro  $a$  de la función de Verhulst mayor es el antagonismo frente a *M. roreri*.

**PALABRAS CLAVES:** antagonismo, control biológico, cacao, moniliasis

**ABSTRACT.-** The mathematical models allow to describe the growth and antagonism curve of *Trichoderma* isolates against pathogens through a three parameters sigmoidal functions. The objective of the present research was to evaluate the growth of native *Trichoderma* spp., isolates *in vitro* and to determine their antagonistic by inhibiting *Monilophthora roreri* by mathematical modeling. This research was conducted at the Portoviejo Experimental Station (EEP) of the National Institute of Agricultural Research (INIAP). 12 *Trichoderma* spp., isolates were collected, isolated and their growth and antagonism was tested under *in vitro* conditions against *M. roreri*. The Hossfeld function adequately describes the growth function of *Trichoderma* spp., and isolated A1, A10 and A4 were shown as the highest growth. Each isolates presented different parameters between each of them. Isolates A1, A6 and A2 were exhibited greater antagonism against *M. roreri*. The parameter  $a$  of the Verhulst model represents the PDA culture medium carrying capacity. In this study were established an inversely proportional ratio, the lower values of parameter  $a$  the Verhulst function greater is the antagonism against *M. roreri*.

**KEY WORDS:** antagonist, biological control, cocoa, moniliasis.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo cacao (*Theobroma cacao* L.) es de gran importancia para la economía del Ecuador, debido a las exportaciones y la generación de empleo para los pobladores de los sectores rurales del país (Philips et al. 2007). Ecuador aporta el 50 % de la producción mundial de cacao fino de aroma, único en el mundo y denominado como “Nacional” (Melo y Hollander 2013). En la actualidad, la producción de cacao está condicionada por diversas enfermedades del fruto entre las que destacan hongos del género *Moniliophthora*, que poseen diferentes niveles de virulencia (Loor et al. 2013). Entre ellas, la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) (Cif.) H.C. Evans, Stalpers, Samson y Benny, es una enfermedad fúngica causante de grandes pérdidas económicas en el noroeste de Sudamérica (Ecuador, Colombia, Perú, parte de Venezuela) y algunas regiones de Centroamérica (Panamá, Costa Rica, Nicaragua y Honduras) (Evans 2007). La moniliasis es capaz de provocar pérdidas de producción de hasta un 100 % (Sánchez y Garcés 2012). En la zona de Quevedo, Ecuador se han registrado sintomatologías en un 80 % de moniliasis y un 20 % restante con escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) (Stahel) (Aime y Phillips-Mora 2005).

La presencia de esta enfermedad ha tenido un efecto devastador, causando el abandono de las zonas de producción de cacao durante un período de casi 200 años (Philips et al. 2007), disminuyendo la producción de mazorcas en los Neotrópicos (Evans 2007). Existen dos métodos de mitigación para la moniliasis, el más empleado y efectivo son las labores culturales, seguido de aplicaciones químicas. De ahí que, la frecuencia en que las mazorcas infectadas son retiradas del campo constituye una estrategia esencial para un control efectivo de la moniliasis (Loor et al. 2013). Sin embargo, esta remoción de mazorcas requiere una elevada inversión económica y abundante mano de obra. Además, el control químico se basa en la aplicación de fungicidas cúpricos y metalaxil que dan lugar a la contaminación de suelos y aguas, pérdida de biodiversidad y desarrollo de mecanismos de resistencia que dificultan aún más el manejo de la enfermedad (Correa et al. 2014). Además, el método químico es aún más oneroso por su alto costo económico y solo son capaces de proteger un 20 % de una plantación (Bateman 2005).

El control biológico, empleando agentes microbianos, ha sido reportado como una opción alternativa y eficaz, frente al uso de fungicidas químicos para

el control de enfermedades (Liu et al. 2013). Los métodos de control biológico empleados en una estrategia de manejo integrado de plagas están siendo implementados en varias regiones de Latinoamérica. Así por ejemplo, algunas de las especies de *Trichoderma* se usan dentro de un manejo integrado, por ser este género colonizadores de raíces, estimulando su crecimiento y previniendo enfermedades (Holmes 2004). Muchas especies de *Trichoderma* se han estudiado ampliamente en condiciones de laboratorio y son propuestas como biocontroladores de *M. roreri*, (Suárez y Cabrales 2008). Así mismo, este agente de biocontrol se ha logrado aislar de suelos establecidos con cacao (Torres et al. 2008).

Para optimizar el uso práctico de un agente de control biológico es esencial entender cómo las condiciones físicas afectan la sobrevivencia, crecimiento y reproducción de estos agentes. Los modelos matemáticos han sido aplicados para describir el comportamiento de estos microorganismos bajo diferentes medios y condiciones de crecimiento, como por ejemplo con *Moniliophthora perniciosa* (Párraga et al. 2017). Cross y Kenerley (2004) desarrollaron un modelo para describir el crecimiento de *Trichoderma virens* mediante imágenes digitales. Begoude (2007) modeló el crecimiento de *Trichoderma asperellum* bajo diversas condiciones de temperatura, pH, agua remanente y actualmente la acción antagonista de varios aislados de *Trichoderma* spp, en presencia de *Moniliophthora perniciosa* que han sido modelados mediante la función logística descrita por Párraga et al. (2017).

El crecimiento micelial e incremento de biomasa son parámetros importantes para determinar la eficiencia y eficacia de un agente de control biológico o biorremediación. Consecuentemente, la determinación de modelos matemáticos que describen el crecimiento de un patógeno en presencia de biocontrolador (antagonismo) permitiría una rápida identificación y caracterización de aislados como por ejemplo *Trichoderma* spp., mediante una función sigmoide de tres parámetros que pueden ser empleados en la práctica (Párraga et al. 2017). De tal manera que, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el crecimiento de aislados nativos de *Trichoderma* spp., a nivel in vitro y el establecimiento de la capacidad antagonista de dichos aislados en presencia de *M. roreri* a través de modelos matemáticos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

***Trichoderma* spp.-** Se utilizaron 12 aislados de *Tri-*

*choderma* spp., las características de estos materiales pueden ser consultadas en Párraga et al. (2017), dichos materiales fueron procedentes del jardín clonal de cacao de la Estación Experimental Portoviejo del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuaria (INIAP). El crecimiento fue determinado de acuerdo al protocolo desarrollado por Samuels et al. (2006) y Párraga et al. (2017). Con la finalidad de describir en base a un modelo no lineal del crecimiento acumulado del micelio, fueron empleados tres modelos los cuales fueron: Richards (1959) Ec. (1), Bailey y Clutter (1974) Ec. (2) y Hossfeld Ec. (3) (ver Zeide 1993).

$$G_0 = a(1 - \exp^{-b(t-d)})^{1/d} \quad \text{Ec. 1}$$

$$h \ G_0 = a + b \frac{1}{t} \quad \text{Ec. 2}$$

$$G_0 = \frac{t^2}{a + b + c^2} \quad \text{Ec. 3}$$

Donde =  $G_0$  es el crecimiento en cm del diámetro de los aislados de *Trichoderma* spp,  $t$  el tiempo (horas) y los parámetros de la función  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$ . Las curvas anamórficas fueron desplegadas como guías para observar el máximo crecimiento al tiempo de referencia.

**Moniliophthora roreri.**- El aislado de *M. roreri* empleado en la investigación se obtuvo de mazorcas de cacao con un 30 % de afectación, para evitar contaminación con microorganismos saprofitos. Se cortaron fragmentos de la epidermis del fruto de 5 mm en los límites del área enferma, fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 0.5 % por cinco minutos, luego se lavaron varias veces en agua destilada y sembrados asépticamente en cajas Petri con medio de cultivo (PDA), adicionando antibiótico gentamicina a razón de 80 mg/L. Se incubaron a 22° C en oscuridad durante 9 días (Holmes 2004).

**Antagonismo de *Trichoderma* spp., en presencia de *M. roreri*.**- En la interacción antagónica de *Trichoderma* spp, y *M. roreri* se realizaron cultivos duales, cortando discos de micelio de 5 mm de diámetro de cada uno de los hongos en estudio, situándolos en las cajas Petri con medio PDA uno a cada extremo del otro, incubados a 22 °C durante cinco días, con observaciones cada ocho horas (Evans et al. 2003). La capacidad antagónica de *Trichoderma*

spp., en presencia de *M. roreri* se describió a través de una curva de aumento basado en la “ley de crecimiento de la población”, siguiendo el modelo descrito por Verhulst (Párraga et al. 2017), que radica en:

$$G = \frac{a}{1 + \exp^{b-ct}}$$

Donde:

$G$  = Crecimiento radial acumulado de *M. perniciosa*

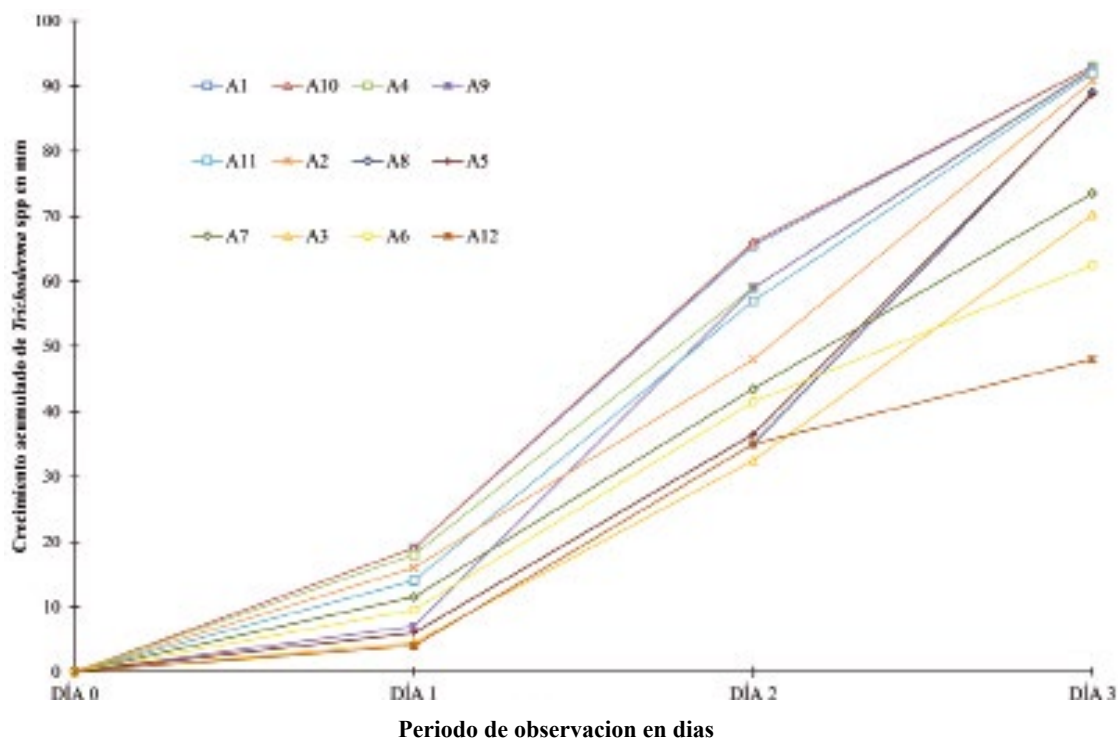
$t$  = Tiempo en días

$a$ ,  $b$ ,  $c$  = Parámetros del modelo

Para encontrar los parámetros  $a$ ,  $b$ ,  $c$ , de la tasa de crecimiento micelial de *M. roreri* se utilizó el Método Full Information Maximum Likelihood Estimation (FIML). Los parámetros fueron estimados empleando el Programa SAS (2013) versión 9.4 (Software analítico, Nueva York, USA). Los modelos de crecimiento de *M. roreri* fueron validados mediante el método de evaluación gráfica, utilizando gráficos Q-Q plots, bajo el supuesto de normalidad de residuos entre los datos observados de crecimiento de *M. roreri* frente a *Trichoderma* spp. Comparados con las cantidades predichas de acuerdo con el modelo propuesto por Verhulst. La diferencia entre valores observados y valores predichos por la función empleada se definen como residuos (Cañadas et al. 2016a) y para validar los modelos propuestos, los residuos en los gráficos no deben presentar ningún tipo de tendencia sino una distribución al azar de los residuos mencionados a lo largo de las observaciones realizadas (Cañadas et al. 2014, 2016b). El segundo criterio de validación fue el coeficiente de regresión no lineal entre el tiempo y el crecimiento acumulado del micelio de *M. roreri*.

## RESULTADOS

**Crecimiento de los aislados de *Trichoderma* spp.**- En la figura 1 se muestra el crecimiento micelial de los 12 aislados de *Trichoderma* spp, con el transcurso del tiempo hasta la colonización completa de la caja Petri con medio de cultivo PDA. Todos los aislados mostraron diferentes patrones de desarrollo y velocidad de crecimiento. Estas curvas fueron modeladas basados en la ecuación de Hossfeld de-



**Figura 1.** Crecimiento in vitro, de 12 aislados de *Trichoderma* spp, en medio de cultivo PDA

bido a que las funciones de Richards (1959), Bailey y Clutter (1974) dieron un bajo ajuste para describir la relación entre el crecimiento y el tiempo de crecimiento de los aislados.

Los parámetros del modelo de Hossfeld adaptado para el crecimiento de cada uno de los aislados son presentados en la tabla 1, con sus respectivos coeficientes de regresión. La velocidad de crecimiento está plasmada en los diferentes parámetros, lo cual

caracteriza a cada uno de las curvas de crecimiento observados para los aislados estudiados y están ordenados de acuerdo con la velocidad de crecimiento, A1, A10 y A4 son los más rápidos, mientras que A12 es el más lento (Tabla 1)

Es necesario resaltar que cada uno de los aislados de *Trichoderma* spp., estudiados en la presente investigación presentaron diferentes valores para los parámetros  $a$ ,  $b$  y  $c$  de la función de Hossfeld.

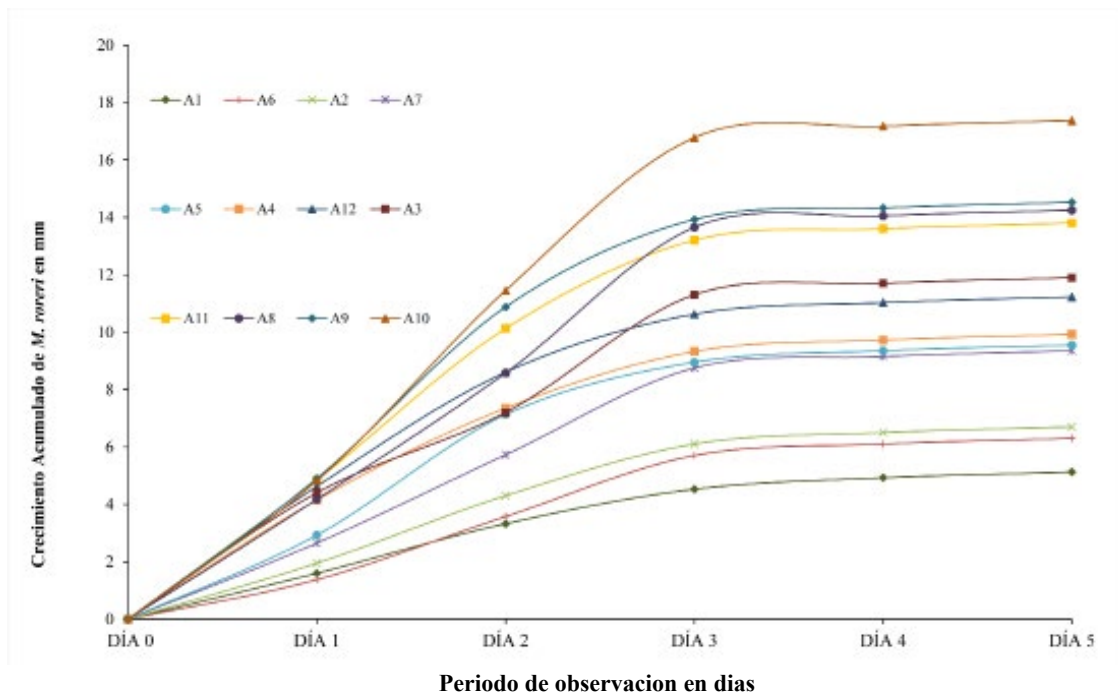
**Tabla 1.** Crecimiento in vitro de 12 aislados de *Trichoderma* spp, en medio de cultivo PDA.

Aislados	Parámetros del Modelo Hossfeld			$r^2$
	$a$	$b$	$c$	
A1	209,201	110,932	71,914	0,96
A10	189,211	138,941	61,912	0,97
A4	179,311	137,221	59,348	0,94
A9	167,322	148,921	59,120	0,97
A11	166,455	149,008	59,001	0,97
A2	158,832	139,908	59,032	0,97
A8	133,228	119,088	56,099	0,97
A5	98,678	119,035	51,910	0,89
A7	98,543	119,023	50,191	0,97
A3	81,233	90,056	48,211	0,96
A6	71,233	80,122	40,082	0,96
A12	69,654	29,923	38,002	0,94

**Antagonismo de *Trichoderma* spp., en presencia de *M. roreri*.**- La habilidad de inhibición de *Trichoderma* spp., frente a *M. roreri* pudo ser modelada mediante una curva de crecimiento micelial. En la figura 2 se representan las curvas de antagonismos para los 12 aislados. Se observa el crecimiento acumulado de *M. roreri* por día, dando como resultados una curva sigmoidea. De tal modo que, los valores más bajos de crecimiento significan mayor capacidad antagonica de *Trichoderma* spp.,

Estas funciones de crecimiento fueron ajustadas de acuerdo con la función de Verhulst bajo condiciones constantes

El resultado de los parámetros de la función y los coeficientes de regresión son resumidos en la tabla 2. Todos los coeficientes de regresión fueron altamente significativos ( $P < 0.0001$ ). El ajuste de los modelos fue mejor en los aislados con mayor capacidad antagonica, especialmente para los aislados



**Figura 2.** Crecimiento acumulado micelial de *M. roreri* en presencia de 12 aislados de *Trichoderma* spp

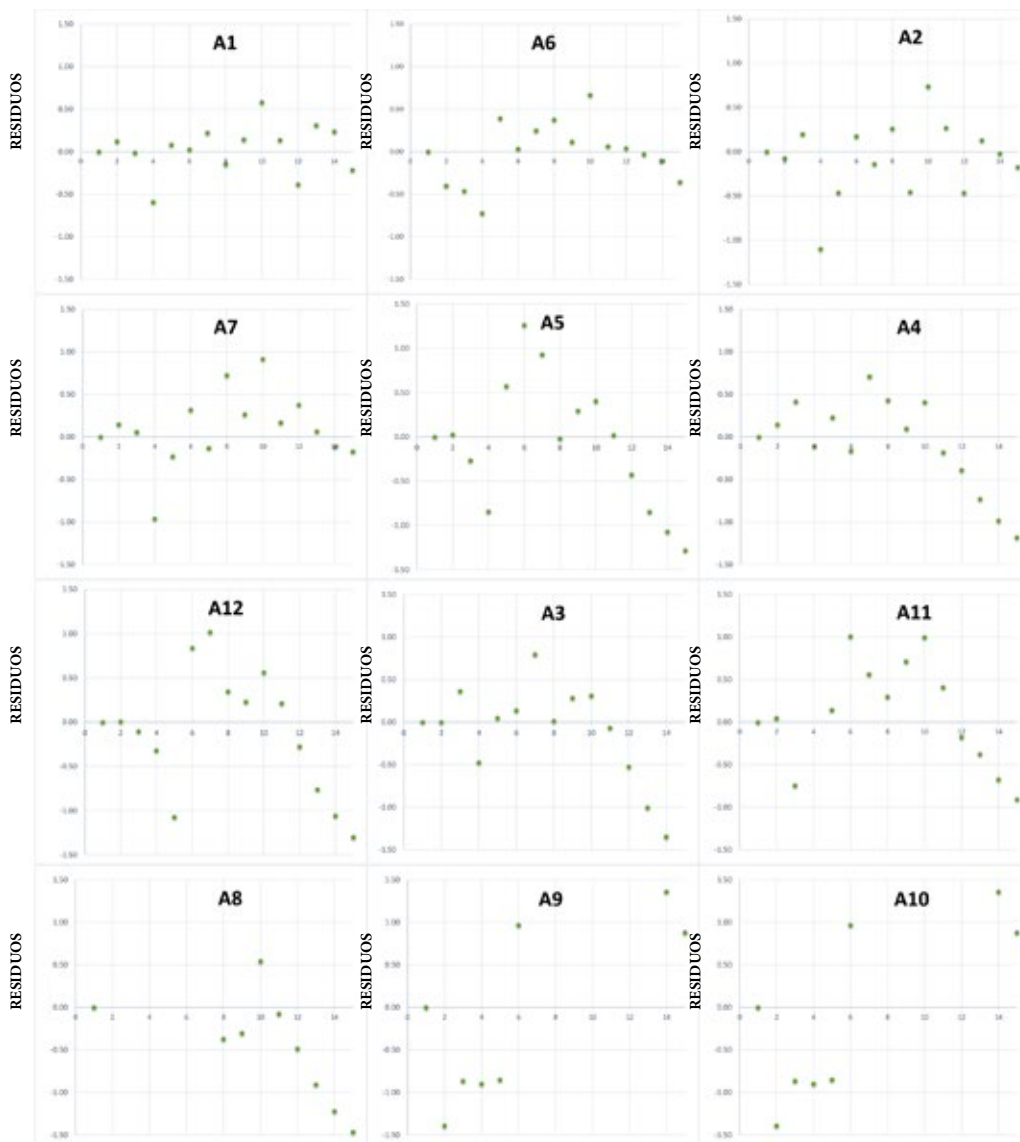
**Tabla 2.** Coeficientes de los modelos desarrollados para 12 aislados de *Trichoderma* spp.

Aislados	Parámetros del Modelo Verhulst			r <sup>2</sup>
	a	b	c	
A1	57,019	10,991	0,629	0,913
A6	75,098	13,993	0,689	0,901
A2	81,288	14,199	0,707	0,900
A7	101,982	15,009	0,900	0,899
A5	119,199	16,211	0,850	0,889
A4	121,409	13,999	0,809	0,887
A12	136,984	13,729	0,794	0,888
A3	138,984	13,527	0,800	0,877
A11	158,990	11,729	0,789	0,864
A8	169,990	11,328	0,788	0,845
A9	179,889	10,329	0,489	0,832
A10	189,713	10,999	0,589	0,804

A1, A6 y A2 (Figura 3). En la tabla 2 se presentan los valores de los parámetros a, b y c de la función de Verhults y coeficiente de regresión

En necesario resaltar que los valores para los aislados A1, A6 y A2 fueron 5,70; 7,5 y 8,13 respectivamente. En la figura 3 se puede observar la validación de los modelos generados en esta in-

vestigación. La dispersión de los valores predichos en confrontación con los valores observados de los modelos de antagonismo de *Trichoderma* spp., (Q-Q plots) no expresaron ninguna tendencia en la dispersión de los residuos. Los ajustes para los aislados A8, A9 y A10 fueron los menos antagónicos y los de mayor dispersión observada se reflejan en el bajo coeficiente de correlación.



**Figura 3.** Distribución de residuos entre los valores observados y predichos del crecimiento de *M. royeri* en presencia de *Trichoderma* spp.

## DISCUSIÓN

**Crecimiento de *Trichoderma* spp.-** Los aislados que mostraron la mayor velocidad de crecimiento fueron A1, A10 y A4. La tasa de crecimiento de un microorganismo permite evaluar la capacidad de estos para explorar espacios tridimensionales de su hábitat y para competir por espacio y nutrientes. Esta estimación puede ser de gran importancia para determinar el antagonismo de *Trichoderma* spp., en presencia del fitopatógeno *M. royeri*. El crecimiento de los hongos se presta para la modelación de su desarrollo, las hifas generalmente se despliegan en una forma predecible bajo un número de condiciones de limitaciones (Cross y Kenerley 2004). El crecimiento geométrico constante hacia los bordes como desarrollo de la colonia de hongos se ha postulado como una propiedad intrínseca propia del crecimiento fúngico (Prosser 1993). El entendimiento del crecimiento de los hongos en un patrón ordenado, predecible y ha sido utilizado con éxito para describir el crecimiento de hongos como fractales (Boddy et al. 1999). Otro componente del modelo de crecimiento de los hongos es el término negativo para el desarrollo de las hifas y ocurrencia de la hifalísis. Este proceso es una característica universal del desarrollo de las colonias de hongos ocurrido sin consideración del tipo o consistencia del sustrato (Cross y Kenerley 2004).

La función de Hossfeld fue la expresión que más se ajustó al crecimiento de *Trichoderma* spp., bajo un medio PDA. Los modelos desarrollados en la presente investigación para 12 aislados de *Trichoderma* spp., pueden ser empleados para predecir la esfera de influencia ejercida por el hongo sobre el tiempo. De estas predicciones, una apropiada dosificación del propágulo necesaria para la exploración de un volumen de suelo puede ser determinado fácilmente. El crecimiento del hongo hasta el borde de la caja Petri (45 mm de radio) fue alcanzado en 5 días bajo una concentración de *Trichoderma* spp. Los factores limitantes para la cobertura micelial en ambientes oligotrópicos han sido postulados (Cross y Kenerley 2004). De ahí que, los propágulos del hongo podrían ser incorporados con una adición de una apropiada sustancia que potencialice el mantenimiento y expansión de las hifas por un largo período.

El crecimiento es parte de la caracterización que se puede hacer de un microorganismo, de ahí que para describir el poder antagónico en presencia de *M. royeri*, la velocidad de crecimiento para cubrir el área de la caja Petri fue una característica de-

seable a la hora de inhibir el crecimiento de este fitopatógeno. La variación de los parámetros  $a$ ,  $b$  y  $c$  de la función de Hossfeld para crecimiento sugiere que se trata de aislados de *Trichoderma* spp., con diferentes patrones de crecimiento que podrían corresponder a diferentes especies del género *Trichoderma*.

**Capacidad antagónica.-** La descripción del antagonismo mediante una función polinómica de tres parámetros a base de la función de Verhulst demostró ser la más adecuada para describir esta interacción entre los aislados de *Trichoderma* spp., y el fitopatógeno *M. royeri*. Estos resultados pueden ser comparados por los encontrados por Párraga et al. (2017) para describir el antagonismo frente a *M. pernicioso*. De acuerdo con Párraga et al. (2017) el parámetro  $a$  del modelo Verhulst que representó la capacidad de carga del medio de cultivo PDA y determinó el desarrollo del patógeno ante la presencia del antagonista *Trichoderma* spp., para *M. pernicioso* observaron una tendencia creciente entre valores del aislado A1 de 8,49 (mayor antagonismo) a 16,99 para el Aislado A5 (menor antagonismo). Para *M. royeri* siguió la misma tendencia inversamente proporcional a menores valores del parámetro  $a$  de la función mayor es el antagonismo. No obstante, el valor de este parámetro de la función de Verhulst se redujo considerablemente, bajando para el aislado A1 de 8,49 para *M. pernicioso* a 5,71 para *M. royeri* en la capacidad de carga del medio de cultivo PDA (Párraga et al. 2017). Esta variación de los parámetros de la función de Verhulst para *M. pernicioso* (Párraga et al. 2017) y *M. royeri* en esta investigación demuestra en primer lugar, la diferencia que existe entre la virulencia de *M. royeri* en comparación a *M. pernicioso* en el campo (Loor et al. 2013) y luego que los parámetros son totalmente diferentes, mostrando la misma tendencia (inversamente proporcional), lo cual permitiría caracterizar a cada uno de los aislados de *Trichoderma*. La identificación molecular de los 12 aislados de *Trichoderma* podría corroborar los resultados obtenidos en esta investigación.

Del mismo modo, el parámetro  $b$  de la función de Verhulst que representa un autoregulator de la población de *M. pernicioso* con el pasar del tiempo, para el Aislado A1 fue de 6,31 (Párraga et al. 2017), y bajó considerablemente la capacidad de autorregulación para A1 a un valor de 1,09 frente a *M. royeri* lo que demuestra numéricamente la agresividad de esta enfermedad. Mientras que, el parámetro  $c$  representa una constante para cada función

desarrollada. Para *M. pernicioso* mostró un valor de 2,99 (Párraga et al, 2017) y bajó a 0,63 para *M. roreri*. Estas diferencias expuestas entre los parámetros  $a$ ,  $b$ ,  $c$  de la función Verhulfts entre *M. roreri* y *M. pernicioso* confirma lo expuesto por Loor et al. (2013) y Correa et al. (2014), que la moniliasis es una enfermedad devastadora y las estrategias de control tradicional han generado resultados colaterales como el fortalecimiento de la resistencia genética de las cepas del hongo en algunas regiones de Ecuador y Colombia.

Es necesario resaltar que, cada uno de los aislados de la presente investigación mostraron diferentes patrones de antagonismo en confrontación a *M. roreri*. Dichos modelos matemáticos podrían ser utilizados en la caracterización de aislados de *Trichoderma* spp. (Párraga et al. 2017). La misma tendencia observada por Párraga et al. (2017) mantiene que, los aislados con mayor poder de control del fitopatógeno se ajustaron mejor en relación con los de menor poder antagónico. De acuerdo con Bortz (2010) y Cañadas et al. (2016a, 2016b), para la validación de modelos estocásticos, es necesario determinar la normalidad de residuos o independencia de los residuos y esto se logra mediante el gráfico de los mismos. Si el gráfico de residuos observados mostrase alguna tendencia, esta puede ser indicio de autocorrelación, de heterocedasticidad o falta de linealidad (Cañadas et al. 2016a). Para las 12 modelos desarrolladas no se mostraron severas transgresiones de los fundamentos estadísticos y tendencia (Figura 3). Es decir, ratifican el supuesto de normalidad de los residuos (Bortz 2010; Cañadas et al. 2014). La determinación de modelos matemáticos que describen el crecimiento de *M. pernicioso* (Párraga et al. 2017) y los modelos desarrollados en esta investigación con *M. roreri* en presencia de *Trichoderma* spp., (antagonismo) permitiría una rápida identificación y caracterización de aislados de *Trichoderma* spp., mediante una función sigmoide de tres parámetros que pueden ser empleados en la práctica.

De acuerdo con Párraga et al. (2017) en su estudio sobre la capacidad antagónica de 12 aislados de *Trichoderma* spp., frente a *M. pernicioso*, el aislado A1 mostró ser el que mayor antagonismo presentó y sus características físicas fueron: intenso aroma a coco, conidios de color verde, estructura plana y rápido crecimiento. Estos resultados son corroborados por los trabajos realizados por Krauss y Soberanis (2001), quienes manifestaron sobre el poder biocontrolador de *Trichoderma* spp., al colonizar la superficie de crecimiento rápidamente y

limitar el crecimiento del fitopatógeno. No obstante, las características de aroma, estructura y velocidad de crecimiento no resultaron estar necesariamente asociadas a la capacidad antifúngica de los diferentes aislados de *Trichoderma* spp., (Párraga et al. 2017). Un atributo adicional fue investigado y verificado en este trabajo donde, el aislado A1 fue el que mayor velocidad de crecimiento mostró en un medio PDA. Estos cuatro atributos (olor, color, estructura y velocidad) del antagonista A1 pudieron ser decisivos al momento de inhibir el crecimiento tanto de *M. pernicioso* y *M. roreri*. Es necesario resaltar que, el fuerte olor a coco es distintivo de la especie viride encontrado en aislados ecuatorianos y peruanos (Chaverri y Samuels 2004).

El aislado A6 fue uno de los más lentos en crecer. De acuerdo con Párraga et al. (2017) observaron que las características de este aislado A6 están relacionadas con colores hialinos, ningún aroma a coco y presentó una estructura aérea. Frente a *M. pernicioso*, este aislado (A6) se ubicó en séptimo lugar en relación con su antagonismo (Párraga et al. 2017). No obstante, frente a *M. roreri* mostró ser el segundo aislado de mayor antagonismo en la presente investigación. El aislado A2 se ubicó en el tercer puesto, seguido del aislado A7 y de A5. Sus características estuvieron asociadas con las descritas para el aislado A6 (Párraga et al. 2017).

## CONCLUSIONES

- El modelo de crecimiento de *Trichoderma* spp., en laboratorio sobre sustrato sólido presentado en este trabajo fue la función de Hossfeld ajustándose apropiadamente para describir el crecimiento y es el primer paso hacia la predicción del comportamiento de este agente de biocontrol bajo condiciones controladas. Así pues, se trata de un avance dirigido a la futura determinación de las condiciones de crecimiento en campo mediante el uso de un modelo matemático.

- Los parámetros  $a$ ,  $b$ ,  $c$ , de la función Verhulfts para describir el antagonismo de *Trichoderma* spp., frente a *M. roreri* difieren ampliamente por los reportados por Párraga et al. (2017) al describir el antagonismo de *Trichoderma* spp., frente a *M. pernicioso*. Esta discrepancia en parámetros permitiría en la práctica la identificación y caracterización de aislados del género *Trichoderma* investigados en la presente investigación.



## AGRADECIMIENTO

Agradecemos a todas las instituciones que intervinieron en el proceso y ejecución de este trabajo de investigación, especialmente al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias “INIAP” en nombre del Director de la EEP-INIAP período 2015-2016 por el financiamiento a través del Proyecto cambio de la Matriz Productiva y prestar todas las facilidades tecnológicas para poder cumplir este objetivo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aime MC, Phillips-Mora W. (2005). The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao chocolate, *Theobroma cacao* form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97(5): 1012-1022.
- Bailey R, Clutter J. (1974). Base-age invariant polymorphic site curves. *Forest Science* 20(2): 155–159.
- Bateman P, Hidalgo E, García J, Arroyo C, Ten Hoopen G, Adonijah V, Krauss U. (2005) Application of chemical and biological agents for the management of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in Costa Rica cocoa (*Theobroma cacao*). *Annals of Applied Biology* 147(2):129-138.
- Begoude B, Lahlali R, Friel D, Tondje P, Jijakli M. (2007). Response surface methodology study of the combined effects of temperature, pH, and aw on the growth rate of *Trichoderma asperellum*. *Journal of Applied Microbiology* 103(4):845-854.
- Boddy L, Wells J, Culshaw C, Donnelly D. (1999). Fractal analysis in studies of mycelium in soil. *Geoderma* 88(3):301–328.
- Bortz J. (2010). *Statistik für Sozialwissenschaftler*. 7 Auflage. Springer-Verlag. Frankfurt-Deutschland. 882 p.
- Cañadas A, Vilčko F, Rade D, Zambrano C, Molina C. (2014). Hacia una descripción de fuste para Laurel (*Cordia alliodora*) en sistemas agroforestales, bosque protector Sumaco. *Avance en Ciencias e Ingeniería* 6(1):24-31.
- Cañadas A, Rade D, Domínguez JM, Murillo I, Molina C. (2016a). Modelación Forestal como Innovación Tecnológica para el Manejo Silvicultural y Aprovechamiento Económico de la Balsa, Región Costa-Ecuador. Ed. Abya Yala, Quito-Ecuador. 173 p.
- Cañadas A, Rade D, Fernández G, Domínguez JM, Murillo I, Molina, C. (2016b): Ecuaciones generales diámetro-altura para *Ochroma pyramidale*, Región Costa-Ecuador. *Bosque Latitud Cero* 6(1):1-14.
- Correa Á, Castro M, Coy J. (2014). Estado de la moniliasis del cacao causado por *Moniliophthora roreri* en Colombia. *Acta Agronómica* 63(4):388-399.
- Cross D, Kenerley C. (2004). Modelling the growth of *Trichoderma virens* with limited sampling of digital images. *Journal of Applied Microbiology* 97(3):486-494.
- Chaverri P, Samuels G. (2004). *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with Green ascospores. *Studies in Mycology* 48:110-116.
- Evans H, Holmes K, Thomas S. (2003). Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Research* 2(2):149-160.
- Evans H. (2007). Cacao diseases – the trilogy revisited. *Phytopathology* 97(12):1640-1643.
- Holmes K, Schroers H, Thomas S, Evans H, Samuels G. (2004). Taxonomy and bio control potential of a new species of *Trichoderma* from Amazon basin of South America. *Mycological Progress* 3(3):199-210.
- Krauss U, Soberanis W. (2001). Bio control of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. *Biological Control* 22(2):149-158.
- Liu J, Sui Y, Wisniewski M, Droby S, Liu Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology* 167(2):153-160.

- Loor G, Fouet O, Lemainque A, Pavék S, Boccara M, Argout X, Amores F, Courtois B, Marie Risterucci A, Lanaud C. (2013). Insight into the Wild Origin, migration and domestication history of the fine flavor national *Theobroma cacao* L. variety from Ecuador. *Plos One*, 8(2): 10-1371. /annotation/2357f0f1-7dc3-4781-afb0-29a8ce56b3f0. doi:10.1371/annotation/2357f0f1-7dc3-4781-afb0-29a8ce56b3f0
- Melo C, Hollander G. (2013). Unsustainable development: Alternative food networks and the Ecuadorian Federation of Cacao Producers, 1995-2010. *Journal of Rural Studies* 32:251-63.
- Párraga J, Cañadas A, Fajardo P, Rade D, Andrade J. (2017). Caracterización in vitro de *Trichoderma* spp. y modelo matemático de su antagonismo en presencia de *Moniliophthora perniciosa*. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* 38(1):25-34.
- Philips M, Aime M, Wilkinson M. (2007). Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology* 56(6):911-22.
- Prosser J. (1993). Growth kinetics of mycelial colonies and aggregates of ascomycetes. *Mycological Research* 97(5):513-528.
- Richards F. (1959). A flexible growth function for empirical use. *Journal of Experimental Botany* 10:290-300.
- Samuels G, Suárez C, Solís K., Holmes S, Ismaiel A, Evans H. (2006). *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisparum*: two new species isolated from cacao in South America. *Mycological Research* 110(4):381-392.
- Sánchez F, Garcés F. (2012). *Moniliophthora roreri* (Cif y Par). En el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria* 3(3):249-258.
- SAS INSTITUTE INC, (2013). SAS/STAT User's guide. Release 10.0 Edn. Cary. NC. USA.
- Suárez L, Cabrales C. (2008). Identificación de las especies de cepas nativas de *Trichoderma* spp., y *Bacillus* spp., y evaluación de su potencial antagonista in vitro frente al hongo fitopatógeno nativo *M. roreri* en el departamento de Norte de Santander. *Revista de la Universidad Francisco de Paula Santander* 13(1):45-56.
- Torres E, Iannacone J, Gómez H. (2008). Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. *Bragantia* 67(1):169-178.
- Verhulst P. (1838). Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. *Correspondences Mathématiques et Physiques* 10:113-121.
- Zeide B. (1993). Analysis of growth equations. *Forest Science* 39(3):594-616