

## Artículo científico

### Caracterización *in vitro* de *Trichoderma* spp., y modelo matemático de su antagonismo en presencia de *Moniliophthora perniciosa*

Johan Párraga Vélez<sup>1\*</sup>, Álvaro Cañadas López<sup>2</sup>, Piero Fajardo Navarrete<sup>3</sup>, Diana Rade Loo<sup>3</sup> y Joffre Andrade Candell<sup>3</sup>

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

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

<sup>3</sup> Escuela Superior Politécnica de Manabí (ESPAM-MFL), CICEM, Manabí, Ecuador.

\*johan.parraga@iniap.gob.ec

DOI:

Recibido 12-10-2016; Aceptado 15-03-2017

**RESUMEN.-** 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. *Trichoderma* ha sido descrito como un agente de control biológico eficaz. El objetivo de la presente investigación fue realizar la caracterización morfológica, determinación del crecimiento y el establecimiento de la capacidad antagonista de aislados nativos de *Trichoderma* spp., a nivel *in vitro* frente al fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa* (ex *Crinipellis perniciosa*) a través de modelos matemáticos. Esta investigación fue conducida en la Estación Experimental Portoviejo (EEP) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Consecuentemente, se identificaron 12 aislados de *Trichoderma* spp., en función de sus características morfológicas. El aislado A1 que, mostró un fuerte aroma a coco, una alta tasa de crecimiento inicial en cultivo puro y una morfología plana, resultó ser el más efectivo a la hora de inhibir el desarrollo de *M. perniciosa*. La determinación de modelos matemáticos que describen el crecimiento micelial de *M. perniciosa* ante la presencia antagonista de los aislados de *Trichoderma* spp., permitiría una rápida identificación, caracterización de aislados de *Trichoderma* spp., y su aplicación práctica.

**PALABRAS CLAVES:** Antagonismo, cacao, fitopatógeno, función sigmoide, modelos matemáticos.

**ABSTRACT.-** To optimization of practical use of the biological control agent is fundamental the understanding of how they were affected by the physics conditions, the survivor capacities, growths and reproduction systems. *Trichoderma* has been described as an efficient biological control agent. The aim of this research have been the *in vitro* characterization, determination of the growth of native strains of *Trichoderma* spp., from Ecuador and the establishment of the antagonistic capacity of this isolates against *M. perniciosa* through the application of mathematical models. The research experiment was carried out in the Portoviejo Research Station (EEP) of Agricultural and Cattle National Research Institute (INIAP). Consequently, 12 isolates of *Trichoderma* spp., were identified based on characteristics of aroma, color and morphology. The isolated A1, which showed a strong smell of coconut, presented initial high growth ranges in pure culture and a flat morphology; was the most effective in the inhibition of *M. perniciosa* development. The mathematical models determination describing the mycelial growth of *M. perniciosa* to the presence of antagonistic isolates of *Trichoderma* spp., could allow a rapid characterization of *Trichoderma* spp., isolates in the praxis.

**KEYWORDS:** Antagonist, cocoa, mathematical modelling, plant pathogen, sigmoid function.

## INTRODUCCIÓN

En el Ecuador la diversificación económica es baja y la producción primaria de la materia prima aún representa el 90% de las exportaciones del país, mayormente compuestas por petróleo, bananas, camarones, flores y cacao (Larrea y Warnars 2009). Dentro de estos productos, el árbol de cacao ecuatoriano de la variedad “Sabor Arriba”, el cual es comercializado como cacao de arriba fino de aroma es el mayor recurso para la elaboración de chocolate de excelente calidad. De ahí que, la producción de este tipo de cacao fino de aroma es escasa, debido a que la producción mundial abarca un 5% y en la actualidad Ecuador abastece cerca de la mitad de la producción de cacao fino de aroma a nivel mundial (Melo y Hollander 2013). No obstante, la vulnerabilidad económica del país puede ser reflejada en la producción de este cultivo; por ejemplo, cuando en 1930 la exportación colapsó debido a enfermedades inherentes al cultivo de cacao. Como estrategia para disminuir el ataque de dos hongos patógenos desconocidos para esa época *Moniliophthora perniciosa* (escoba de bruja) y *Moniliophthora roreri* (moniliasis), las plantaciones de cacao fueron diseminadas por todo el país (Philips-Mora et al. 2007). Este hecho desembocó en los actuales sistemas de producción de cacao existentes en el Ecuador.

El primero, caracterizado por pequeños productores de subsistencia, sin accesos a recursos para volverlos más rentables al cultivo del cacao, bajo cubierta forestal, los cuales están cediendo espacio a otros cultivos (Loor et al. 2013). Segundo, plantaciones con variedades de cacao traídas del exterior resistentes a enfermedades, las cuales fueron introducidas con la finalidad de revitalizar a la industria. Debido a que estos materiales no poseían el sabor nacional fino de aroma, una hibridación natural dio paso a una progresiva erosión de los genotipos originales (Argout et al. 2008). Tercero, como al inicio de los años 30, los técnicos fueron alentados para realizar cambios radicales en el manejo del cultivo del cacao como monocultivo con la finalidad de combatir las enfermedades, bandonando la práctica de crecimiento bajo un dosel forestal (Ruf 2011).

El manejo cultural de enfermedades es actualmente el método de control más eficaz empleado por los pequeños productores. La frecuencia de retirada del campo de la “escoba de bruja” constituye una estrategia esencial para un control efectivo de esta en-

fermedad (Hernández et al. 2014). Sin embargo, los métodos de control no químicos requieren una elevada inversión y abundante mano de obra. El control químico es únicamente efectivo, cuando el precio del cacao y la incidencia de la enfermedad son altas (Franzen y Borgerhoof 2007). En este sentido, las especies de *Trichoderma* spp., son típicamente considerados como organismos asociados con las raíces de las plantas y comúnmente son considerados por su potencial para el control de enfermedades de las plantas, lo cual está cercanamente asociado con muchos aspectos típicamente endofíticos. No obstante, un número muy pequeño de aislados del género *Trichoderma* han sido estudiados en algunos detalles relacionados con su capacidad de biocontrol en las plantas de cacao (Samuels et al. 2006, De la Cruz et al. 2015). Los métodos de control biológico pueden ser empleados en una estrategia de manejo integrado de plagas y están siendo implementados en varias regiones de Latinoamérica. Diferentes hongos epífitos y endófitos han sido evaluados por su eficacia como agentes de control de diferentes enfermedades (Verma et al. 2007). Así, algunas especies del género *Trichoderma* son capaces de colonizar las raíces de las plantas e inducir su crecimiento y resistencia a enfermedades (Bailey et al. 2008). Varias especies del género han sido evaluadas *in vitro* como biocontroladores de *M. perniciosa*, de manera que, varias de ellas han sido propuestas como potenciales agentes de biocontrol. Otra ventaja del uso de estos hongos es que se trata de microorganismos naturalmente presentes en los suelos cultivados con cacao. Entre ellos, *Trichoderma stromaticum* ha sido descrito como un agente de control biológico eficaz que, es capaz de colonizar los tejidos meristemáticos de las plantas y controlar la infección en diferentes cultivos (Hannada 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 los mismos (Samuels et al. 2006). Los modelos matemáticos han sido aplicados para describir el comportamiento de microorganismos en diferentes medios. De acuerdo con Begoude et al. (2007) el método empleado fue un modelo polinómico de segundo orden y los coeficientes fueron calculados mediante un análisis de regresión múltiple, en el cual la variable independiente corresponde al grado de crecimiento radial de *Trichoderma* spp., influenciado por la disponibilidad de agua, temperatura y pH. Resaltando que, aún no han sido descri-

tos modelos matemáticos de proliferación para *Trichoderma* spp., en la literatura científica. De ahí que, la presente investigación tiene como objetivo caracterizar morfológicamente a los aislados nativos del género *Trichoderma* spp., a nivel *in vitro* y determinar el rango de crecimiento, para posteriormente a través de modelos matemáticos, establecer la capacidad antagonista de dichos aislados frente a *M. pernicioso*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Caracterización de *Trichoderma* spp.** - Los 12 aislados de *Trichoderma* spp., utilizados en el presente experimento se obtuvieron a partir de muestras de suelo tomadas a 20cm de profundidad en el jardín de clones de cacao de la Estación Experimental Portoviejo (EEP) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Se realizaron diluciones seriales, sembrando de la dilución  $10^{-3}$  en cajas Petri con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) 22°C, en oscuridad durante nueve días (Holmes et al. 2004). Posteriormente, los aislados se reconocieron por su rápido crecimiento y posterior identificación de sus características morfológicas, observadas mediante microscopio óptico (Boeco-modelo: BM-180), lente 40x, clasificándolos según presencia de un aroma a coco o no, coloración de los conidios, forma del micelio, aéreo o aplanado y presencia de fiálides (Samuels et al. 2006), luego se guardaron en refrigeración a 4°C en tubos con PDA para su debida conservación y respaldo (Nirenberg 1976). Para la caracterización de los aislados se empleó el método de análisis de correspondencias, su ventaja radica en la generación de tablas de doble entrada, basados en pruebas de Ji-cuadrada asociado a componentes ortogonales y fue calculado mediante el software SPSS Statistics 21 (Software analítico, Nueva York, USA).

**Crecimiento de *Trichoderma* spp.** - El radio de la colonia de los cultivos puros se evaluó cada 24 horas durante los tres días siguientes a la siembra. Para detectar las diferencias de crecimiento de los 12 aislados se aplicó un Diseño de Bloques al Azar (DCA) con cuatro repeticiones, utilizando como unidad experimental la caja Petri. La variable evaluada fue mm de micelio/día. Se realizaron las pruebas de homocedasticidad y normalidad de los datos observados. La diferencia estadística entre crecimientos se categorizó mediante la prueba de Tukey al 5% de probabilidad, todos estos análisis fueron obtenidos median-

te el software SPSS Statistics 21 (Software analítico, Nueva York, USA).

**Aislamiento de *Moniliophthora pernicioso*.** - El fitopatógeno *M. pernicioso* empleado en el experimento se obtuvo de escobas vegetativas verdes, procedentes del jardín de clones de cacao de la EEP-INIAP. Se cortaron fragmentos de cinco milímetros de diámetro de los síntomas. Estos fueron desinfectados superficialmente con hipoclorito de sodio al 0.50%, por cinco minutos, luego fueron lavados varias veces en agua destilada estéril, secados con papel de filtro estéril y sembrados asépticamente en cajas Petri, con medio de cultivo PDA (Nirenberg 1976). Se incubaron a 22°C en oscuridad durante nueve días (Holmes et al. 2004). Los aislados se conservaron a 4°C en tubos con PDA.

**Interacción *Trichoderma* spp. versus *M. pernicioso*.** - Para evaluar la interacción antagonista entre los aislados de *Trichoderma* spp., y *M. pernicioso* se realizaron cultivos duales. Se tomaron discos de micelio de 5mm de diámetro de cada uno de los hongos situándolos en lados opuestos de las cajas Petri a 2cm del borde (Evans et al. 2003). El medio de cultivo utilizado fue PDA (Nirenberg 1976) y se mantuvo a 22°C en oscuridad durante cinco días con observaciones cada ocho horas (Evans et al. 2003). El efecto inhibitorio de *Trichoderma* spp., frente a *M. pernicioso* fue descrito a través de una curva de incremento basado en la "ley de crecimiento de la población", siguiendo el modelo desarrollado por Verhulst (1838), que consiste en:

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

Donde:

G = Crecimiento radial acumulado de *M. pernicioso*

t = Tiempo en días

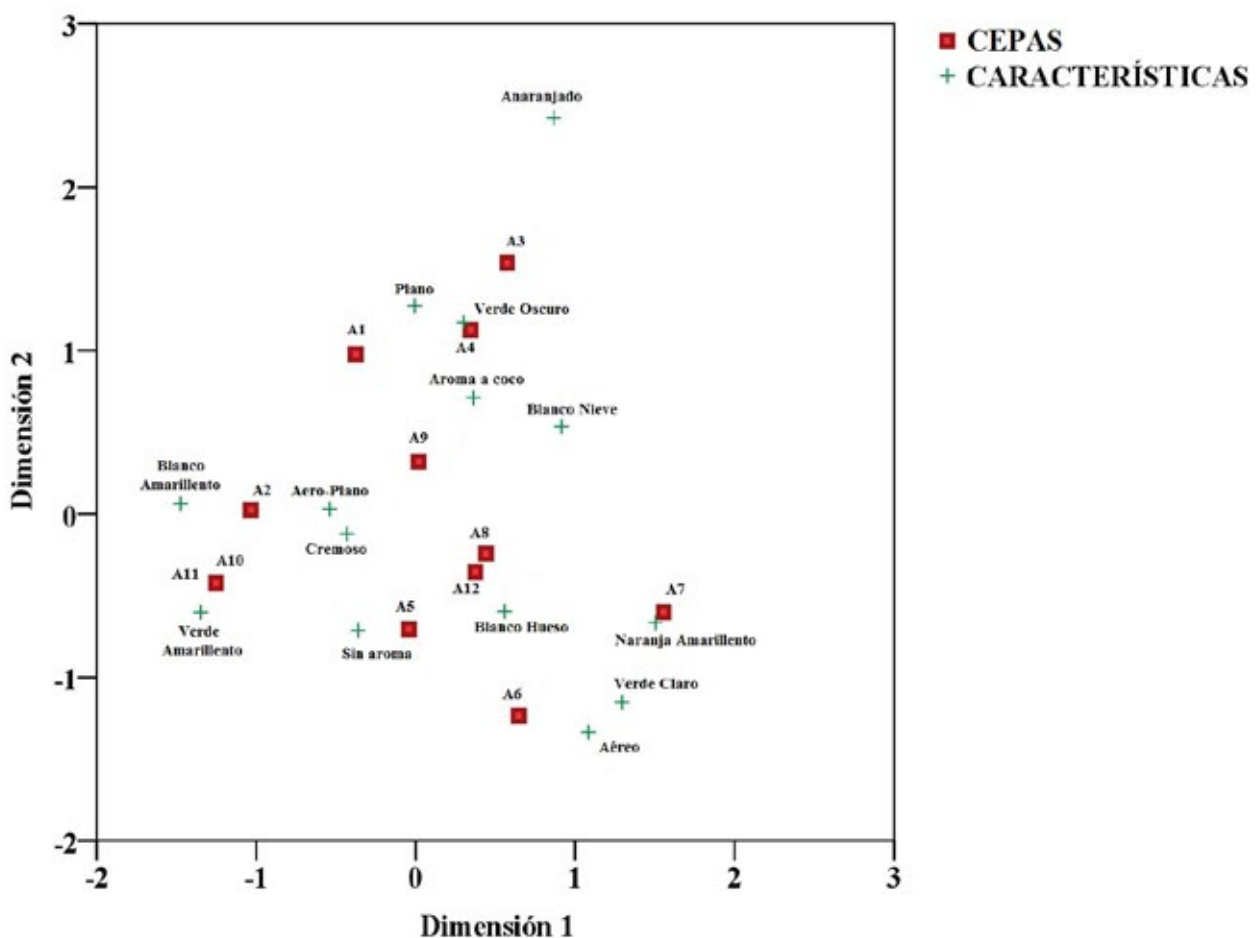
a, b, c = Parámetros del modelo

Para la parametarización de la tasa de crecimiento micelial de *M. pernicioso* se utilizó el Método Full Information Maximum Likelihood Estimation (FIML). Los parámetros fueron estimados empleando el Programa SAS (2013) versión 9.4 (Software analítico, Nue-

va York, USA). Los modelos de crecimiento de *M. pernicioso* 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. pernicioso* en presencia de *Trichoderma* spp., comparados con las cantidades predichas de acuerdo con el modelo propuesto por Verhulst (1838). La diferencia entre valores observados y valores predichos por la función empleada se definen como residuos (Cañadas et al. 2016) 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, Cañadas et al. 2016). El segundo criterio de validación fue el coeficiente de regresión no lineal entre el tiempo y el crecimiento acumulado del micelio de *M. pernicioso*.

## RESULTADOS

**Determinación de las características morfológicas de 12 aislados de *Trichoderma* spp.**- Con la finalidad de caracterizar los aislados de *Trichoderma* spp., respecto a sus peculiaridades morfológicas como color, aroma y morfología, se realizó un mapa asimétrico del análisis de correspondencias (Figura 1). En el mapa se puede observar una larga proporción de la inercia (84.26%) desplazada en las dos primeras dimensiones. La primera dimensión (derecha a izquierda Figura 1) aportó el 44.04% a la inercia. Los aislados A1, A2, A5, A9, A10, A11 se distribuyeron en la parte izquierda (Figura 1). Contraponiéndose en la parte derecha a los aislados A3, A4, A6, A7, A8 y A12. La segunda dimensión acumuló un 40.22% de la inercia (arriba hacia abajo Figura 1) En la parte de arriba se encontraron a los aislados A1, A3, A4 y A9 asociados con el color verde, aroma a coco y estructura plana. Los aisla-



**Figura 1.** Mapa asimétrico del análisis de correspondencias en el que se muestran las características de aroma, color y estructura de los 12 aislados de *Trichoderma* spp.

dos A2, A10, A11, A5, A12, A8, A6 y A7 estuvieron relacionados con colores claros (hialino), ningún aroma y estructura aéreo-plano en la parte baja del mapa asimétrico

#### Desarrollo de los aislados de *Trichoderma* spp.

.- Del análisis de varianza se desprende que, en el primer día se hallaron diferentes tasas de crecimientos entre los aislados, observándose seis rangos de crecimiento ( $p < 0.05$ ). Los aislados A10 y A1 con un promedio de 19.5 y 19.0mm, presentan las tasas de mayor incremento en micelio (Tabla 1). Para el segundo día de evaluación del desarrollo, la prueba de comparación múltiple de Tukey arrojó 4 grupos, destacando el aislado A9, con 52.0mm en el primer lugar (2.17mm/h), seguido de los aislados A10 con 47.0 mm (1.96mm/h) y A1 con 46.5mm (1.94mm/h) en el primer rango (Tabla 1). Para el tercer día, se observaron dos categorías en relación con el crecimiento micelial. En el primero ( $p < 0.05$ ) destacaron el aislado A8 con 54.0mm (2.25mm/h) y el aislado A5 con 52.25mm (2.18mm/h)

#### Interacción *Trichoderma* spp. Versus *M. pernicioso*.

.- La capacidad de inhibición *in vitro* de *Trichoderma* spp., en presencia de *M. pernicioso* fue descrita a través de una curva de crecimiento micelial, la cual están representadas en la Figura 2 para los 12 aislados. Es necesario resaltar que, dicha curva es la suma acumulada del crecimiento de *M. pernicioso* por día frente a la capacidad de inhibición de

*Trichoderma* spp y la forma son descritas a base de los parámetros de la función de Verhulst. De ahí que, los valores más bajos de crecimiento significan mayor capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. Estas funciones de crecimiento fueron ajustadas de acuerdo con la función de Verhulst bajo condiciones constantes. Los aislados A1, A8, A9 y A12 fueron los que mostraron mayor antagonismo en presencia de *M. pernicioso*. Mientras que los aislados A10, A3 y A5 fueron los que menos resistencia presentaron en presencia del patógeno. Se resalta que, a cada aislado le corresponde una función pero con diferentes parámetros (a, b, c) y los coeficientes de regresión de la función de crecimiento son resumidos en la Tabla 2. Todos los coeficientes de regresión fueron altamente significativos ( $p < 0.01$ ) En la Figura 3 se puede observar la validación de los modelos generados en esta investigación. La dispersión de los valores predichos en confrontación con los valores observados de los modelos de antagonismo de *Trichoderma* spp. (Q-Q plots) estableciéndose que los residuos tienden a localizarse en una banda alrededor del eje X cero, sin mostrar ninguna tendencia, lo cual corrobora la distribución normal de los residuos que no mostraron ninguna tendencia en la dispersión de los residuos

## DISCUSIÓN

**Descripción de 12 aislados de *Trichoderma* spp.**.- Los aislados A1, A3, A4 y A9 estuvieron asociados a un aroma fuer-

**Tabla 1.** Crecimiento *in vitro* de 12 aislados de *Trichoderma* spp., en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa, evaluado a las 24, 48 y 72 horas.

Aislados	24 horas	TASA mm/h	Aislados	48 horas	TASA mm/h	Aislados	72 horas	TASA mm/h
A10	19.50 <sup>a</sup>	0.81	A9	52.00 <sup>a</sup>	2.17	A8	54.00 <sup>a</sup>	2.25
A1	19.00 <sup>b</sup>	0.79	A10	47.00 <sup>a</sup>	1.96	A5	52.25 <sup>a</sup>	2.18
A4	18.00 <sup>b</sup>	0.75	A1	46.50 <sup>a</sup>	1.94	A2	42.75 <sup>b</sup>	1.78
A2	16.00 <sup>c</sup>	0.67	A11	43.50 <sup>b</sup>	1.81	A3	37.75 <sup>b</sup>	1.57
A11	14.00 <sup>d</sup>	0.58	A4	41.00 <sup>b</sup>	1.71	A11	35.50 <sup>b</sup>	1.48
A7	11.50 <sup>e</sup>	0.48	A2	32.00 <sup>c</sup>	1.33	A4	33.75 <sup>b</sup>	1.41
A6	9.50 <sup>f</sup>	0.40	A6	32.00 <sup>c</sup>	1.33	A9	33.50 <sup>b</sup>	1.40
A12	7.50 <sup>f</sup>	0.31	A7	32.00 <sup>c</sup>	1.33	A7	30.25 <sup>b</sup>	1.26
A9	7.00 <sup>f</sup>	0.29	A8	31.00 <sup>c</sup>	1.29	A1	27.50 <sup>b</sup>	1.15
A5	6.00 <sup>f</sup>	0.25	A5	30.50 <sup>c</sup>	1.27	A10	27.00 <sup>b</sup>	1.13
A3	4.50 <sup>f</sup>	0.19	A3	28.00 <sup>d</sup>	1.17	A12	25.00 <sup>b</sup>	1.04
A8	4.00 <sup>f</sup>	0.17	A12	15.50 <sup>d</sup>	0.65	A6	21.00 <sup>b</sup>	0.88
Promedio	11.49			35.92			34.85	

a, b, c, d, e, f: Valores de las medias que difieren estadísticamente según la prueba de Tukey 5%.

te a coco. De acuerdo con Samuels et al. (2006) esta es una característica común en muchas especies de *Trichoderma* spp. El aroma intenso a coco es una característica de los aislados peruanos y ecuatorianos, y una particularidad distintiva de muchos miembros de *Trichoderma*. Todos estos aislados pueden ser capaces de producir ácidos nonanoicos. De acuerdo con Rocha-Valdez et al. (2005) los ácidos nonanoicos presentan una cadena corta de ácidos grasos y son conocidos por inhibir la germinación y el crecimiento de las esporas de hongos fitopatógenos. El intenso aroma a coco se asocia a la presencia de

tran dispersas y minúsculas esporas < 1mm de diámetro, formadas alrededor del margen de la colonia y los conidióforos aparecen por separado a partir de hifas aéreas. Los conidios permanecen hialinos por un buen tiempo antes de tornarse verdes. De acuerdo con Samuels et al. (2006) las conidias presentaron forma compacta con micelio aplanado. Los aislados A6, A7, A8 y A12 mostraron un color blanco-amarillento, verde-amarillo y cremoso con falta de micelio aéreo. A diferencia de los anteriores, los aislados A2, A5, A10 y A11, los colores van de blanco a marfil, con escaso micelio aéreo, sin un aroma distintivo (Samuels et al. 2006).

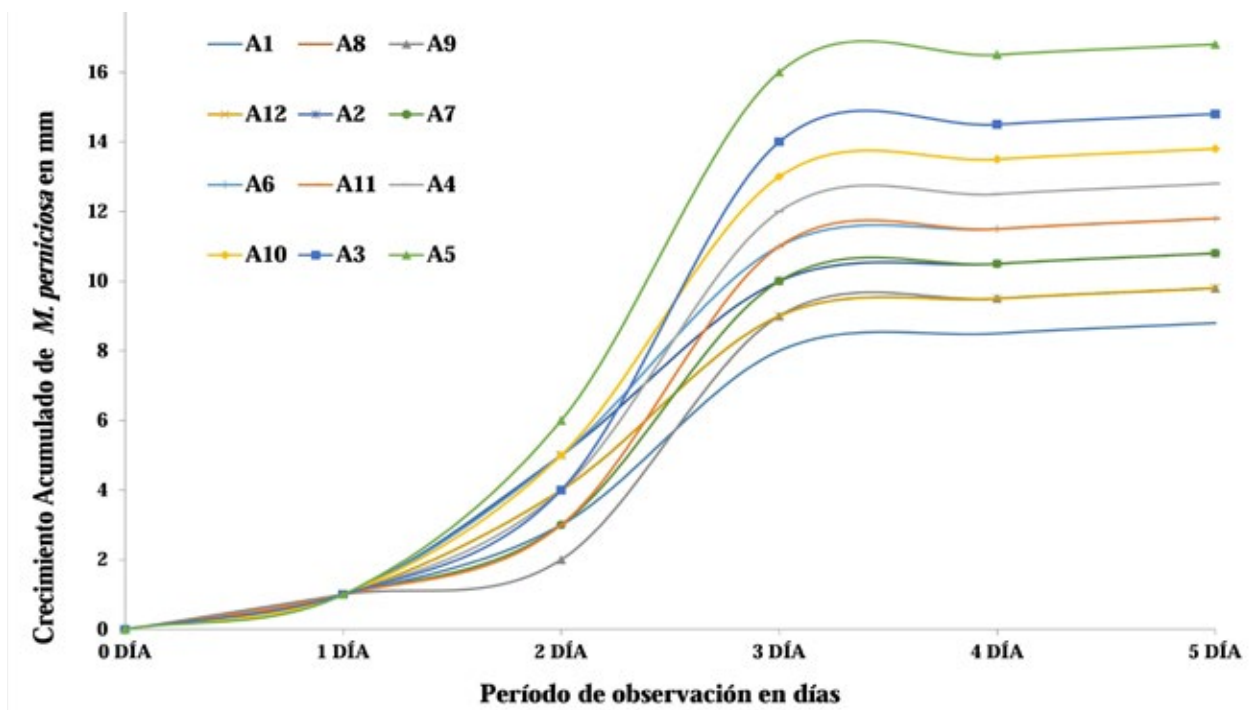


Figura 2. Crecimiento acumulado micelial de *M. pernicioso* en confrontación con *Trichoderma* spp.

6-penta-alfa-pirona (6PAP), la cual ha sido reportada en *T. harzianum*. Igualmente estos aislados estuvieron relacionados con las descripciones reportadas por Samuels et al. (2006) quienes caracterizaron a los aislados de *Trichoderma* spp., por una copiosa producción de conidios verde oscura, las cuales se presentaron en forma compacta (Samuels et al. 2006).

Los aislados A6, A7, A8 y A12, coinciden con las características de *Trichoderma* spp., descritas por Samuels et al. (2006) en correspondencia a su poca relevancia en producción de conidios, se encuen-

#### Crecimiento micelial de *Trichoderma* spp.-

De acuerdo con Samuels (2006) las condiciones ideales de desarrollo de las colonias de *Trichoderma* spp., en medios de PDA, son temperaturas de 25 °C, bajo oscuridad absoluta, logrando de esta manera que después de 90 horas se alcancen incrementos de entre 50 a 65mm. Estos datos difieren con los aislados A1, que alcanzaron un crecimiento de 93mm en 72 horas. Datos que pueden ser contrastados con los de Guigón-López y González-González (2004), quienes describieron en México, el aumento de varios aislados con un tiempo de observación de crecimiento de 190 horas.

Estos autores observaron que, del sitio denominado Camargo (TC 74), el aislado de plantas de chile jalapeño mostró una progresión radial de 90mm y una tasa de crecimiento de 0.48mm/h, seguido del sitio Bachíniva con la cepa aislada de plantas de menta con un 90mm y una tasa de crecimiento de 0.47mm/h, y la cepa TS01 del sitio Saláices aislada de la raíz de durazno con 90mm y una tasa de crecimiento del 0.47mm/h. En cuarto lugar se ubicó el sitio Valle de Allende con aislados de nogal con más de 15 años de edad (TvVA) los que presentaron un desarrollo de 82.2mm y una tasa de crecimiento de 0.43mm/h, y finalmente TbVA con 72.0mm y 0.38mm/h de tasa de crecimiento.

**Capacidad antagónica.**- Pocos datos están disponibles en la literatura sobre el modelaje del crecimiento de *Trichoderma* spp., bajo diversas condiciones (Begoude et al. 2007). La inhibición del crecimiento de *M. pernicioso* (antagonismo) mediante una función de tres parámetros a base de la expresión de Verhulst (1838) demostró ser la más adecuada para describir esta interacción entre los aislados de *Trichoderma* spp. y el fitopatógeno *M. pernicioso*. Es importante señalar que en la Tabla 2, el parámetro *a* del modelo de Verhulst representa la capacidad de carga del medio de cultivo PDA e influye decisivamente en el desarrollo de la población del patógeno por efecto de la presencia del antagonista (*Trichoderma* spp). De ahí que el parámetro *a* va para la accesión A1 de 8.49 (mayor antagonismo) a A5 un valor de 16.99 (menor antagonismo). Por el contrario, el parámetro *b* representa la autorregulación según el tamaño de la población de *M. pernicioso* en cada instan-

te del tiempo de investigación. Los valores de antagonismo de los aislados fluctuaron de entre 6.40 (A1) a 5.30 (A5), ya que el parámetro *c* es una constante para cada función desarrollada. Estos resultados son corroborados por los trabajos realizados por Rivas y Pavone (2010), quienes manifestaron el poder biocontrolador de *Trichoderma* spp., al colonizar una superficie rápidamente y limitar el desarrollo del fitopatógeno.

Cada uno de los aislados mostraron diferentes patrones de antagonismo en presencia de *M. pernicioso*, lo cual queda documentado en los diferentes parámetros (*a*, *b* y *c*) de las curvas de crecimiento en las 12 funciones desarrolladas (Tabla 2). Dichos modelos matemáticos podrían ser utilizados para la identificación y la caracterización de aislados de *Trichoderma* spp., en la práctica. Así, las predicciones de estos modelos se correlacionaron altamente con los resultados del experimento. De acuerdo con Bortz (2010), Cañadas et al. (2014) y Cañadas et al. (2016) 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. Para los 12 modelos desarrollados no se mostraron severas transgresiones de los fundamentos estadísticos y tendencia (Figura 3). Es decir, ratifican el supuesto de normalidad de residuos (Bortz 2010, Cañadas et al. 2014).

Además, los modelos matemáticos han sido desarrollados para determinar el comportamiento de *Trichoderma asperleum* bajo

**Tabla 2.** Parámetros y coeficiente de determinación de los modelos de crecimiento *M. pernicioso* en confrontación con *Trichoderma* spp.

Aislados	Parámetros del Modelo Verhulst			r <sup>2</sup>
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	
A1	8.489	6.399	2.998	0.942
A8	9.779	6.199	3.008	0.921
A9	9.991	7.197	3.009	0.910
A12	10.099	6.399	2.998	0.899
A2	11.019	6.199	2.999	0.871
A7	11.021	6.199	2.698	0.869
A6	11.719	5.999	2.898	0.861
A11	11.990	5.799	2.498	0.860
A4	12.899	5.659	2.509	0.856
A10	13.899	5.509	2.503	0.855
A3	14.689	5.399	2.478	0.843
A5	16.992	5.299	2.378	0.817

diversas condiciones ambientales, describiendo la función matemática del grado de crecimiento radial micelial (mm día<sup>-1</sup>) a través de una función sigmoideal (Begoude et al. 2007). Un enfoque similar ha sido utilizado en la determinación del proceso de deterioro de alimentos causado por la actividad de patógenos como *Rhizopus oligosporus* Saito cepa NRRL2719 y otros patógenos de poscosecha en frutos como *Penicillium expansum* (Lahlali et al. 2005).

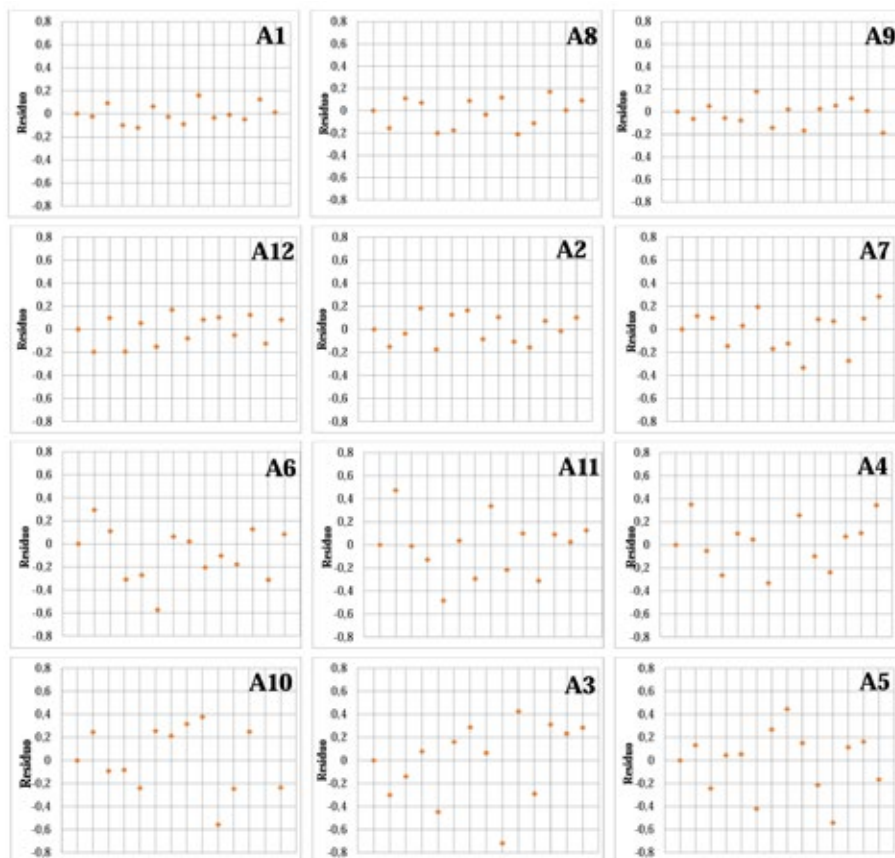
## CONCLUSIONES

- El aislado A1 de *Trichoderma* spp. que mostró un fuerte aroma a coco, color verde, estructura plana y un alto rango de crecimiento inicial, fue la cepa más exitosa en la inhibición del crecimiento de *M. pernicioso*.

- La determinación de modelos matemáticos que describen el crecimiento de *M. pernicioso* en presencia de *Trichoderma* spp. (antagonismo) permitiría una rápida identificación y caracterización de aislados de *Trichoderma* spp., mediante una función sigmoideal de tres parámetros que pueden ser empleados en la práctica.

## AGRADECIMIENTOS

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.



**Figura 3.** Distribución de residuos entre los valores observados y predichos del crecimiento de *M. pernicioso* en confrontación con aislados de *Trichoderma* spp



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Argout X, Fouet O, Wincker P, Gramacho K, Lagvre T, et al. 2008. Towards the understanding of the cocoa transcriptome: Production and analysis of an exhaustive dataset of ESTs of *Theobroma cacao* L. generated from various tissues and under various conditions. *BMC Genomics* 9:512–31.
- Bailey B, Bae H, Stem M, Crozier J, Thomas S, Samuels G, et al. 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control* 46:24–35.
- 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):845–54.
- Bortz, J. 2010. *Statistik für Sozialwissenschaftler*. 7 Auflage. Springer-Verlag. Frankfurt-Deutschland. 882 p.
- Cañadas A, Rade D, Domínguez JM, Murillo I, Molina C. 2016. 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, Vilčko F, Rade D, Zambrano C, Molina C. 2014. Hacia una descripción de fuste para Laurel (*Cordia alliodora*) en sistemas agroforestales, bosque protector Sumaco. *Avances en Ciencias e Ingenierías* 6(1):24–31.
- De la Cruz M, Ortiz C, Bautista C, Ramírez J, Ávalos N, Cappello S, et al. 2015. Diversidad de *Trichoderma* spp., en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 86:947–61.
- 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 bio control agents of cocoa diseases. *Mycological Progress* 2(2):149–160.
- Franzen M, Borgerhoof M. 2007. Ecological, economic and social perspectives on cocoa production worldwide. *Biodiversity Conservation* 16:3835–3849.
- Guigón-López C, González-González P. 2004. Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capiscum annum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 22(1):1–9.
- Hanada R, de Jorge Souza T, Pomella A, Hebbar K, Pereira J, Ismaiel A, et al. 2008. *Trichoderma martiale* sp.nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. *Mycological Research* 112:1335–43.
- Hernández A, Ruíz Y, Acebo Y, Miguélez Y, Heydrich M. 2014. Antagonistas microbianos para el manejo de la pudrición negra del fruto en *Theobroma cacao* L. Estado actual y perspectivas de uso en Cuba. *Revista de Protección Vegetal* 29(1):11–19.
- Holmes K, Schroers H, Thomas S, Evans H and Samuels G. 2004. Taxonomy and bio control potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America. *Mycological Progress* 3(3):199–210.
- Lahlali R, Serrhini M, Jijakli M. 2005. Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*. *International Journal of Food Microbiology* 103(3):315–322.
- Larrea C, Warnars L. 2009. Ecuador's Yasuni-ITT Initiative: Avoiding emissions by keeping petroleum underground. *Energy for Sustainable Development* 13:219–223.
- Loor G, Fouet O, Lemainque A, Pavék S, Boccarra M, Argout X, et al. 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/annota-

- tion/2357f0f1-7dc3-4781-afb0-29a8ce-56b3f0.
- Melo C, Hollander G. 2013. Unsustainable development: Alternative food networks and the Ecuadorian Federation of Cacao Producers, 1995-2010. *Journal of Rural Studies* 32:251–263.
- Nirenberg H. 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der Fusarium-Sektion Liseola. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land-u. Forstwirtschaft. Berlin-Dahle* 169:1–117.
- Philips-Mora W, Aime M, Wilkinson M. 2007. Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Monilophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology* 56:911–22.
- Rivas M, Pavone D. 2010. Diversidad de *Trichoderma* spp., en plantas de *Theobroma cacao* L. del Estado Carabobo, Venezuela, y su capacidad de biocontroladora sobre *Crinipellis pernicioso* (STAHEL) SINGER. *Interciencia* 35(10): 777–783.
- Rocha-Valdez J, Hassan M, Corkidi G, Flores C, Galindo E, Serrano-Carreón L. 2005. 6-pentyl  $\alpha$  pyrone production by *Trichoderma harzianum*: The influence of energy dissipation rate and its implications on fungal physiology. *Biotechnology and Bioengineering* 91(1):54–61.
- Ruf F. 2011. The myth of complex cocoa agro forests: the case of Ghana. *Human Ecology* 39:373–388.
- Samuels GJ, Suarez, C, Solís K, Holmes K, Thomas S, Ismaiel A, et al. 2006. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America. *Mycological Research* 110(4):381–392.
- Samuels GJ. 2006. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* 96:196–206.
- Verhulst P. 1838. Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. *Correspondences Mathematiques et Physiques* 10:113–121.
- Verma M, Brar S, Tyagi RD, Surampalli R, Valéro JR. 2007. Antagonist fungi, *Trichoderma* spp: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37:1–20.