

CAPACIDAD ANTAGÓNICA *IN VITRO* DE CEPAS DE *TRICHODERMA* FRENTE A *PHYTOPHTHORA PALMIVORA* EN CACAO

IN VITRO ANTAGONISTIC CAPACITY OF *TRICHODERMA* STRAINS AGAINST *PHYTOPHTHORA PALMIVORA* IN COCOA

Y. MATOS CUETO^{1*}, A. MONTOYA RAMOS²

¹Unidad Científico Tecnológica de Base Estación Experimental Agro-Forestal Baracoa, Guantánamo, Cuba.

²Universidad de Guantánamo, Facultad Agroforestal, Guantánamo, Cuba. E-mail: montoya@cug.co.cu

*Autor para correspondencia: yannolis@inafbcoa.gtm.minag.cu

RESUMEN

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) enfrenta graves pérdidas debido a enfermedades como la pudrición negra de las mazorcas, causada por *Phytophthora palmivora*, que puede reducir la producción hasta en un 60%. El control biológico se presenta como una alternativa sostenible para manejar esta problemática. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad antagónica *in vitro* de tres cepas de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride* y *Trichoderma* sp.) frente a *P. palmivora* en cacao. Se activaron y sembraron las cepas de *Trichoderma* y *P. palmivora* en medio PDA suplementado con ácido láctico. Se midió el crecimiento radial de ambos microorganismos y se realizaron pruebas de antagonismo mediante cultivos duales, con la incubación a 25 °C. El diseño experimental fue completamente al azar, con tres repeticiones por tratamiento, y los datos se analizaron con ANOVA y la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). *Trichoderma viride* mostró el mayor crecimiento radial (0,493 mm) y una capacidad antagónica significativa, que superó a *P. palmivora* (0,117 mm). Las cepas de *Trichoderma* sp. y *T. harzianum* también inhibieron el crecimiento del patógeno, aunque en menor medida. El contacto micelial entre *T. viride* y *P. palmivora* ocurrió a las 64 horas, lo que evidencia su rápida acción antagónica. *Trichoderma viride* demostró ser el antagonista más efectivo contra *P. palmivora*. Las cepas de *Trichoderma* mostraron un crecimiento rápido y una capacidad inhibitoria significativa, lo que respalda su uso como agentes de biocontrol. Estos resultados refuerzan el potencial de *Trichoderma* en estrategias integradas para el manejo de enfermedades en cacao.

Palabras clave: biocontrol, crecimiento micelial, cultivos duales, micoparasitismo, inhibición

ABSTRACT

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) crops face serious losses due to diseases such as black pod rot, caused by *Phytophthora palmivora*, which can reduce production by up to 60%. Biological control is presented as a sustainable alternative to manage this problem. The objective of this work was to evaluate the *in vitro* antagonistic capacity of three *Trichoderma* strains (*T. harzianum*, *T. viride* and *Trichoderma* sp.) against *P. palmivora* in cocoa. The *Trichoderma* and *P. palmivora* strains were activated and sown in PDA medium supplemented with lactic acid. The radial growth of both microorganisms was measured and antagonism tests were performed using dual cultures, incubating at 25 °C. The experimental design was completely randomized, with three repetitions per treatment, and the data were analyzed with ANOVA and the Tukey test ($p \leq 0.05$). *Trichoderma viride* showed the highest radial growth (0.493 mm) and significant antagonistic capacity, outperforming *P. palmivora* (0.117 mm). *Trichoderma* sp. and *T. harzianum* strains also inhibited pathogen growth, although to a lesser extent. Mycelial contact between *T. viride* and *P. palmivora* occurred at 64 hours, evidencing their rapid antagonistic action. *Trichoderma viride* proved to be the most effective antagonist against *P. palmivora*. *Trichoderma* strains showed rapid growth and significant inhibitory capacity, supporting their use as biocontrol agents. These results reinforce the potential of *Trichoderma* in integrated strategies for disease management in cacao.

Keywords: biocontrol, mycelial growth, dual cultures, mycoparasitism, inhibition

Recibido: 15/6/2022

Aceptado: 25/8/2022

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de interés



Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0). <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* Lin.) es un cultivo de gran importancia a nivel mundial, especialmente en países tropicales. Esta especie se desarrolla en diversos agroecosistemas bajo condiciones de sombra, principalmente proporcionada por árboles frutales Anzules et al. (2018). Su cultivo es fundamental para la economía de muchas regiones, ya que proporciona una fuente de ingresos para numerosos agricultores.

A nivel global, se producen anualmente 4,3 millones de toneladas de grano de cacao. De esta producción, el 74,9 % se concentra en África Occidental, el 12,1 % en el sureste asiático y el 13 % en América Latina. Costa de Marfil destaca como el mayor productor, contribuyendo con el 35 % de la producción mundial (Solís et al., 2015). Estas cifras reflejan la importancia económica y social del cacao en estas regiones.

Infante (2019) señala que las plagas en el cultivo del cacao pueden causar pérdidas de hasta el 60 % de la producción. Entre las plagas más perjudiciales se encuentra la pudrición negra de las mazorcas, causada por especies del género *Phytophthora*. Esta enfermedad es considerada la principal causa de pérdidas de cosecha a nivel mundial, lo que afecta significativamente la rentabilidad de los cultivos.

Theobroma cacao L. es susceptible a diversas enfermedades fúngicas en todas las zonas de cultivo. Una de las más devastadoras es la pudrición negra de la mazorca, provocada por varias especies de *Phytophthora* (Oomycota). La taxonomía de las especies de *Phytophthora* asociadas al cacao ha sido objeto de controversia durante mucho tiempo. Históricamente, las cepas aisladas de tejidos afectados se identificaron como una sola especie, *P. palmivora* (Fernández et al., 2018).

Entre los agentes de control biológico más utilizados se encuentra *Trichoderma* spp. Este microorganismo presenta un modo de acción combinado. En primer lugar, actúa directamente al parasitar a su presa, la envuelve y rompe su pared celular para luego alimentarse de ella Terrero et al. (2018). Este mecanismo lo convierte en una herramienta eficaz para el manejo de enfermedades en el cultivo del cacao.

El estudio del crecimiento *in vitro* de patógenos y antagonistas en condiciones controladas es una técnica que permite evaluar las características y comportamientos de los microorganismos. Esta metodología contribuye al desarrollo de estrategias para el control de plagas en los cultivos. Por ello, esta investigación tuvo como objetivo determinar la capacidad antagónica *in vitro* de tres cepas de *Trichoderma* frente a *Phytophthora palmivora* (Butl).

MATERIALES Y MÉTODOS

Activación y siembra de antagonistas

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología de la Estación Experimental Agroforestal de Baracoa, perteneciente al Instituto de Investigaciones Agroforestales (INAF). Como antagonistas, se emplearon aislamientos de *Trichoderma harzianum* Rifai

y *Trichoderma viride* Pers., los cuales fueron donados por el Centro de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE), adscrito a la Empresa Agroforestal y Coco de Baracoa. Además, se aisló *Trichoderma* sp. a partir de compost elaborados con residuos de cosecha de cacao en la UBPC José Maceo Grajales, ubicada en el principal polo productivo del municipio de Baracoa.

Posteriormente, los aislamientos se activaron en placas Petri con medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar). Este medio, de base altamente nutritiva, favorece una buena esporulación de los hongos y es ampliamente recomendado para realizar recuentos coloniales. Para su preparación, se añadieron 39 g de PDA en un matraz con 1000 mL de agua. Luego, se agregó ácido láctico para inhibir el crecimiento de bacterias y otros hongos.

El medio se esterilizó durante 30 minutos en autoclave a 120 °C. Una vez esterilizado, se vertió en placas Petri dentro de una cámara de flujo laminar y se dejó solidificar durante 5 minutos. La siembra de las diferentes especies de *Trichoderma* se realizó en la cámara de flujo laminar, mediante una aguja de disección estéril para tomar una porción de micelio. Se hicieron tres repeticiones por especie, y las placas se incubaron a 25 °C durante 120 horas para estimular el crecimiento.

Activación del patógeno

El oomiceto *P. palmivora* se aisló a partir de frutos con síntomas de la afectación causada por este patógeno, obtenidos del banco de germoplasma de la Estación Experimental Agroforestal de Baracoa. Para su activación, se preparó un medio de cultivo PDA suplementado con ácido láctico, con el fin de inhibir el crecimiento de otros agentes patógenos. El medio se esterilizó y se procedió a la siembra del patógeno en placas Petri, según el mismo protocolo utilizado para los antagonistas.

Se realizaron tres repeticiones del proceso, y las placas se incubaron a 28 °C durante 120 horas. Este procedimiento permitió asegurar el crecimiento adecuado del patógeno para su posterior uso en las pruebas de antagonismo.

Crecimiento radial de antagonistas

El crecimiento radial e individual del micelio de las tres cepas de *Trichoderma* se evaluó en medio de cultivo PDA suplementado con ácido láctico, según el protocolo descrito por Dimbi et al. (2004). Se recolectó un fragmento de 5 mm de diámetro del borde de colonias de *Trichoderma* de 4 días de edad, ya que en esta zona se concentra la mayor cantidad de enzimas y la esporulación es más homogénea, lo que favorece un mayor crecimiento micelial y esporulación del hongo. Este fragmento se colocó en el centro de una placa Petri, y el crecimiento se midió con una regla milimetrada.

Por otro lado, el crecimiento radial del micelio de *P. palmivora* se desarrolló en medio de cultivo sólido PDA + ácido láctico, donde creció como aislamiento puro durante 10 días. El crecimiento se midió de manera similar, con una regla milimetrada para cuantificar su expansión.

Evaluación del biocontrol antagonista de *Trichoderma harzianum*, *viride* y *Trichoderma sp.* contra *Phytophthora palmivora*

Para determinar la capacidad inhibidora y de colonización de los diferentes aislamientos de *Trichoderma* sobre el patógeno *P. palmivora*, se realizaron pruebas de antagonismo *in vitro* mediante la técnica de cultivos duales. En esta técnica, se colocó una porción de 3 mm del antagonista en un extremo de la placa Petri y otra porción del patógeno en el extremo opuesto. Las placas se incubaron a 25 °C, y las mediciones se realizaron desde la posición inicial de ambos microorganismos hacia el centro, para evaluar su crecimiento radial individual hasta el enfrentamiento.

Se registraron lecturas del incremento radial micelial cada ocho horas, con el objetivo de determinar el crecimiento hasta el primer contacto entre las hifas de ambos hongos. Esto permitió observar si *Trichoderma sp.* presentaba capacidad antagonica para invadir a *P. palmivora*. Para evaluar la influencia de cada uno de los tres aislamientos de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *P. palmivora*, se midió su crecimiento radial en placas Petri con PDA. Las mediciones se realizaron durante 112 horas, con tres repeticiones por tratamiento.

Diseño experimental y análisis estadístico

El ensayo de antagonismo *in vitro* se realizó por triplicado para cada uno de los tratamientos, bajo un diseño experimental completamente al azar. Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza y comparación de medias, mediante el paquete estadístico InfoStat (versión libre), desarrollado por Di Rienzo et al. (2014). Las medias se compararon mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey al 5 % de significancia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El género *Trichoderma* mostró un crecimiento rápido, lo que permitió cubrir completamente la superficie de la caja Petri con PDA a los 5 días. Este resultado sugiere que el tipo de especie influyó tanto en el crecimiento como en la velocidad. En la evaluación realizada, se observó que la cepa de *Trichoderma viride* (TS-3) presentó un crecimiento radial más rápido, cubriendo un área de 0,43 mm (Tabla 1).

Tabla 1. Crecimiento radial *in vitro* de *Trichoderma* y *P. palmivora*

Antagonistas	Crecimiento radial*
<i>Trichoderma viride</i>	0,438 a
<i>Trichoderma sp</i>	0,363 b
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,322 b
<i>P. palmivora</i>	0,119 c

*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas para Tukey ($p \leq 0,05$).

Por otro lado, las cepas de *Trichoderma sp.* y *Trichoderma harzianum* (A-34) mostraron un comportamiento similar en el crecimiento radial, con valores de 0,363 mm y 0,322 mm, respectivamente (Tabla 1). Finalmente, el crecimiento radial de *P. palmivora* registró el valor más bajo, cubriendo una menor superficie de crecimiento micelial. Este resultado se atribuye al medio de cultivo PDA, que no proporcionó los nutrientes necesarios para su desarrollo *in vitro*.

Según López et al. (2017), quienes estudiaron el papel antagonico de *Trichoderma* en un sistema agroforestal de cacao en México, este género es actualmente uno de los agentes más utilizados en programas de control biológico. Su función como antagonista y regulador de fitopatógenos en sistemas agroforestales-cacaotales ha sido ampliamente documentada.

Resultados similares fueron obtenidos en Ecuador por Terrero et al. (2018) quienes evaluaron la compatibilidad *in vitro* de *Trichoderma spp.* con fungicidas de uso común en cacao. Estos autores informaron que el crecimiento micelial de las cuatro especies de *Trichoderma* estudiadas fue superior en medio PDA mezclado con Azoxistrobina. La especie *Trichoderma ovalisporum* Samuels y Schroers mostró el mayor crecimiento micelial, mientras que *T. harzianum* presentó un crecimiento superior al 55 % en medio con Azoxistrobina.

Evaluación del antagonista o capacidad de biocontrol

En la presente investigación, la capacidad antagonica de *T. viride* contra *P. palmivora* mostró resultados significativos ($p \leq 0,05$). Durante el crecimiento dual, el micelio de *Trichoderma viride* alcanzó 0,493 mm, en comparación con *P. palmivora*, que registró 0,117 mm (Tabla 2). Cabe destacar que, 8 horas después de la siembra, se observó el mayor crecimiento *in vitro* del antagonista (0,433 mm), mientras que *P. palmivora* solo alcanzó 0,1 mm de crecimiento micelial. El contacto entre ambos micelios ocurrió a las 64 horas.

Estos resultados coinciden con los de Samaniego et al. (2018), quienes realizaron un aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma spp.* antagonistas de patógenos del suelo. Los autores informaron que los aislados de *Trichoderma* presentaron los mayores crecimientos lineales miceliales promedio, con un comportamiento similar en cuanto a su desarrollo en medio de cultivo PDA.

Tabla 2. Antagonismo de *Trichoderma spp* contra *P. palmivora* causante de la pudrición negra del fruto del cacao.

	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma sp</i>
Antagonistas	0,49333 a	0,41228 a	0,37111 a
<i>P. palmivora</i>	0,11778 b	0,08947 b	0,11111 b

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas para Tukey ($p \leq 0,05$).

En la evaluación de la cepa de *Trichoderma* spp. frente al antagonismo dual con *P. palmivora*, se obtuvo un crecimiento micelial de 0,371 mm, en comparación con 0,111 mm de *P. palmivora*. El contacto micelial entre ambos se produjo a las 112 horas.

Anzules et al. (2019) evaluó in vitro hongos y bacterias, específicamente del género *Trichoderma* y *Bacillus*, respectivamente, por su antagonismo contra *M. royeri* en cacao. Los autores observaron que los microorganismos nativos, ya sea aislados de las partes aéreas de las plantas o del suelo, tienen potencial para controlar no solo a *M. royeri* y *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Singer, sino también a *Phytophthora* sp.

Estos mismos autores destacan que *Trichoderma harzianum* tiene un alto potencial de inhibición in vitro como agente de control biológico sobre *P. palmivora*. Durante las pruebas de antagonismo, se observó una invasión total de la colonia de *P. palmivora* por parte de los aislamientos de *Trichoderma*.

Alburquerque Andrade & Gusqui Mata (2018), en estudios de antagonismo realizados en Colombia, observaron que, a las 96 horas, el antagonista alcanzó los mayores valores de diámetro. El hongo fitopatógeno detuvo su crecimiento, mientras que *Trichoderma* continuó desarrollándose hasta invadir completamente la colonia del patógeno. Este fenómeno puede considerarse una manifestación de los procesos de micoparasitismo.

Los resultados obtenidos con los tres aislamientos de *Trichoderma* concuerdan con los de Contreras (2017), quien informó efectos excelentes de antagonismo de *Trichoderma* contra *P. palmivora* en cultivos duales in vitro. Cárdenas Pardo et al. (2017), al realizar un análisis espacial de la incidencia de plagas en diferentes genotipos de cacao en Colombia, observaron en frutos infestados por *P. palmivora* la presencia de micelio cenocítico. No se detectó la formación de estructuras reproductivas sexuales, pero sí esporangios diferenciados que contenían zoosporas.

Andrade et al. (2017) destacan que *Trichoderma* es un antagonista imprescindible en el biocontrol de enfermedades causadas por diversos fitopatógenos presentes en el suelo. Según Terrero et al. (2018), es fundamental determinar el comportamiento de las cepas nativas de este género para desarrollar estrategias que integren el uso de agentes de biocontrol con los fungicidas más empleados en el cultivo de cacao.

Resultados similares fueron obtenidos por Leon et al. (2019), quienes observaron in vitro que la colonización y la producción de metabolitos inhibitorios solubles de aislamientos de *Trichoderma* endófito variaron en su capacidad para micoparasitar e inhibir el crecimiento micelial de *Verticillium dahliae* Kleb, agente causal de la muerte repentina del cacao en Perú.

CONCLUSIONES

1. Las cepas de *Trichoderma*, especialmente *T. viride*, mostraron un crecimiento radial significativamente mayor en medio PDA, cubriendo la superficie de la caja Petri en 5 días. Este crecimiento rápido sugiere una ventaja competitiva sobre patógenos como *P. palmivora*, que tuvo un desarrollo micelial limitado en el mismo medio.
2. *Trichoderma viride* demostró una capacidad antagónica superior contra *P. palmivora*, con un crecimiento micelial de 0,493 mm frente a 0,117 mm del patógeno. Este comportamiento sugiere que *Trichoderma* es un agente de biocontrol efectivo, capaz de inhibir e invadir colonias de fitopatógenos en cultivos duales.
3. Estudios en varios países confirman que *Trichoderma*, especialmente *T. harzianum*, tiene un alto potencial para controlar patógenos como *P. palmivora* y *M. royeri* en cultivos de cacao. Su capacidad para micoparasitar y producir metabolitos inhibitorios lo convierte en una herramienta clave para estrategias integradas de manejo de enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

- Alburquerque Andrade, D., & Gusqui Mata, R. (2018). Eficacia de fungicidas químicos para el control in vitro de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldoa*, 25(2), 489-498.
- Andrade, P., Molina-Gayosso, E., Isidro-Cortes, J., Hernández Leal, E., Cortés-González, Y. A., & Rivera-Sosa, L. (2017). Control biológico in vitro de *Phytophthora cinnamomi* con *Trichoderma* spp. *Memorias del V Congreso Latinoamericano del Aguacate. México*. 7p. Recuperado de http://www.avocadosource.com/Journals/Memorias_VCLA/2017/Memorias_VCLA_2017_PG_147.pdf. http://avocadosource.com/Journals/Memorias_VCLA/2017/Memorias_VCLA_2017_PG_147.pdf
- Anzules, T., Ventura, B., Cepero, C., & Otiniano, A. J. (2018). Caracterización y tipificación de fincas productoras *Theobroma cacao* L. Santo Domingo de Los Tsáchilas, Ecuador. *Revista Bosques Latitud Cero*, 8(2), 39-50.
- Anzules, V., Borjas Ventura, R., Alvarado Huamán, L., Castro-Cepero, V., & Julca-Otiniano, A. (2019). Control cultural, biológico y químico de *Moniliophthora royeri* y *Phytophthora* spp en *Theobroma cacao* 'CCN-51'. *Scientia Agropecuaria*, 10(4), 511-520.
- Cárdenas, N. J., Darghan, A., Sosa Rico, M. D., & Rodríguez, A. (2017). Análisis espacial de la incidencia de enfermedades en diferentes genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en El Yopal (Casanare), Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 22(2), 209-220.

- Contreras, P. Y. (2017). *Control fitosanitario en el cultivo de cacao CCN 51 con tres grupos de fungicidas sobre los problemas que afectan a su producción, en la zona de San Antonio, Cantón Pueblo-Viejo* [B.S. thesis, Universidad Técnica de Babahoyo]. <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/3099>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2014). InfoStat versión 2014. InfoStat Group, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Dimbi, S., Maniania, N. K., Lux, S. A., & Mueke, J. M. (2004). Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *BioControl*, 49(1), 83-94. <https://doi.org/10.1023/B:BI-CO.0000009397.84153.79>
- Fernández, Y., Lachenaud, P., Decock, C., Díaz Rodríguez, A., & Abreu Romero, N. (2018). Caracterización de *Phytophthora*, agente etiológico de la pudrición negra de la mazorca del cacao en Cuba y Guyana Francesa. *Centro Agrícola*, 45(3), 17-26.
- Infante, C. A. (2019). *Manejo integrado de los principales insectos-plagas en el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.), en la zona de Mata de Cacao* [B.S. thesis, Universidad Técnica de Babahoyo]. <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/6867>
- Leon, B., Arévalo-Gardini, E., & Bouchon, A.-S. (2019). Muerte repentina de *Theobroma cacao* L. causado por *Verticillium dahliae* Kleb. En el Perú y su biocontrol *In vitro*. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 20(1), 117-148.
- López, U., Brito-Vega, H., López-Morales, D., Salaya-Domínguez, J. M., & Gómez-Méndez, E. (2017). Papel de *Trichoderma* en los sistemas agroforestales-cacaotal como un agente antagonico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 20(1), 91-100.
- Samaniego, L. M., Harouna, M., Corbea, O., Rondón-Castillo, A. J., & Placeres-Espinosa, I. (2018). Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. Antagonistas de patógenos del suelo. *Revista de Protección Vegetal*, 33(3), 1-11.
- Solís, J. L., Zamarripa Colmenero, A., Pecina Quintero, V., Garrido Ramírez, E., & Hernández Gómez, E. (2015). Evaluación agronómica de híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) para selección de alto rendimiento y resistencia en campo a moniliasis. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(1), 71-82.
- Terrero, P., Peñaherrera Villafuerte, S. L., Solís Hidalgo, Z. K., Vera, D., Navarrete Cedeño, J. B., & Herrera Defaz, M. A. (2018). Compatibilidad *in vitro* de *Trichoderma* spp. Con fungicidas de uso común en cacao (*Theobroma cacao* L.). *Rev. Investig. Agrar.*, 20(2), 146-151.