

**CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y  
ENSEÑANZA (CATIE)**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**INDUCCIÓN DE LA GERMINACIÓN PARA MEJORAR LA EFICACIA DE DOS AGENTES  
ANTAGÓNICOS PARA EL CONTROL DE LA MONILIA (*Crinipellis royeri*) DEL CACAO  
(*Theobroma cacao*)**

Tesis sometida a la consideración de la Escuela de Posgraduados, Programa de Educación para el Desarrollo y la conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza como requisito parcial para optar el grado de:

**Magíster Scientiae**

Por:

**LEONARDO WLADIMIR UQUILLAS PAZMIÑO**

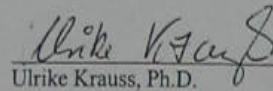
TURRIALBA, COSTA RICA

2004

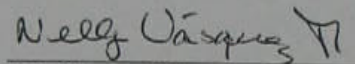
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

*MAGISTER SCIENTIAE*

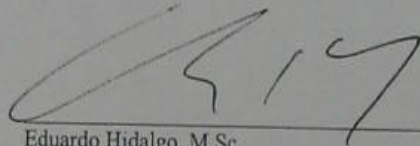
**FIRMANTES:**



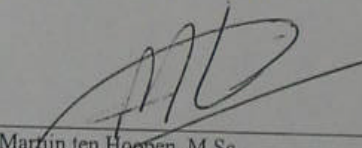
Ulrike Krauss, Ph.D.  
**Consejero Principal**



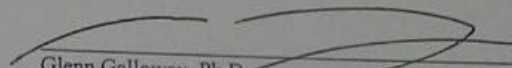
Nelly Vásquez, M.Sc.  
**Miembro Comité Consejero**



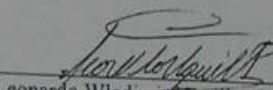
Eduardo Hidalgo, M.Sc.  
**Miembro Comité Consejero**



Marijn ten Hoopen, M.Sc.  
**Miembro Comité Consejero**



Glenn Galloway, Ph.D.  
**Director Programa de Educación y  
Decano de la Escuela de Posgrado**



Leonardo Uquillas Pazmiño  
**Candidato**

## **DEDICATORIA**

Madre, no te preocupes por mi, me encuentro bien, no me vengas a buscar, por que nunca pienso regresar.

Queridos hermanos: Esmeralda, Cumanda, Raúl. Adorados sobrinos: Aldrin y Zully, que impacientes esperan mi pronto retorno, pues que sigan esperando.

A Shakyra de Santa Rosa, hermosa flor, juntos rompimos esquemas y dimos mucho de que comentar.

A Sheyla, grata compañía, a Wanda, tienes el mundo por delante, Francis estimada amiga, y a tus hermanos, que me recibieron con cariño y aprecio.

A todas mis noviecitas, por los agradables momentos pasados en su compañía. ¡Proveeecho!

A ti amiga, donde quiera que te halles en este mundo, espero que encuentres lo que buscas, aprovecha lo más hermoso que te pueda brindar la vida, que el tiempo pasa rápido. Cuídate mucho, Hasta nunca.

## AGRADECIMIENTO

A LASPAU-OEA, por haber financiado dos inolvidables años de CATIE “resort”.

A mi profesora consejera, a pesar de las diferencias que existió, por sus aportes y valiosas reflexiones en el desarrollo de esta investigación.

A Eduardo Hidalgo, y Martijn ten Hoopen por su estrecha colaboración y disposición incondicional durante el desarrollo de la investigación..

A Nelly Vásquez, más que consejera, amiga, que siempre estuvo apoyándome en los momentos difíciles.

A Hannia y Lisseth, por sus consejos a veces maternos y otras amigables.

A Jeannette, Noyli, , por la calidez de su amistad brindada.

A Cristina Vidal, Francisco Parrado, Sonia Ospina, amigos y confidentes.

A mis compatriotas: Carlitos, Cristina, Santy y Byron, por esas noches de jerga, como olvidarse de ellas?

A Samaria, Chio, Rojo, Marcia, José Luis, Pata, Juan Andrés, Manuelito, Mario pastuso, Pavel, Nestor, Lalo, las Adrianas, Edilberto, Milton, Hope, Nelly, Macha y a mis otros amigos jurasicos, que hicieron placenteros mi estadía en CATIE.

A Eric, Camila, Maria Camila, Camila, Sofía, intrañables sobrinos de CATIE.

A Natalia, y su familia: Alba Ruth, padre y hermanos, que me brindaron calor de hogar, les voy a extrañar.

Al personal de biblioteca, por el apoyo brindado.

Al bar “El Prado” por las noches gastadas en su seno, cuna de tres menciones honoríficas, lugar de relax, encuentro con la vida y calidez de sus mujeres.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>IX</b>
<b>INDICE DE ANEXOS</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XII</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Justificación</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Objetivos</b>	<b>1</b>
1.2.1 General	1
1.2.2 Específicos	1
<b>1.3 Hipótesis</b>	<b>2</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Cultivo del cacao e importancia</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Enfermedades del cacao</b>	<b>4</b>
<b>2.3 Germinación de conidios de monilia en mazorcas de cacao</b>	<b>5</b>
<b>2.4 Métodos de control de monilia</b>	<b>5</b>
<b>2.5 Control biológico de enfermedades</b>	<b>6</b>
<b>2.6 Hongos endofíticos.</b>	<b>6</b>
<b>2.7 Control biológico de monilia</b>	<b>7</b>
<b>2.8 Factores ambientales que afectan la germinación de conidios de hongos antagonistas</b>	<b>8</b>
2.8.1 Factores abióticos	8
2.8.2 Factores bióticos	9
<b>3. METODOLOGÍA</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Localización del estudio</b>	<b>12</b>
<b>3.2 Efecto de soluciones nutritivas sobre la germinación de los conidios de los hongos antagonistas.</b>	<b>13</b>
3.2.1 Efecto de soluciones nutritivas en la actividad metabólica de los hongos antagonistas.	13
3.2.2 Determinar el efecto de medios nutritivos sobre la germinación de conidios de los hongos antagonistas.	15
3.2.2.1 Factores en estudio	16
3.2.2.2 Tratamientos en estudio	16

3.2.2.3	Diseño experimental	16
3.2.2.4	Variable evaluada	17
<b>3.3</b>	<b>Evaluación del efecto de la humedad sobre la germinación de los conidios de los hongos antagonistas</b>	<b>17</b>
3.3.1	Materiales y métodos	17
3.3.2	Manejo del ensayo	18
3.3.3	Tratamientos en estudio	18
3.3.4	Diseño experimental	18
3.3.5	Variable evaluada	19
<b>3.4</b>	<b>Efecto de la temperatura sobre el poder germinativo de los conidios de los hongos antagonistas</b>	<b>19</b>
3.4.1	Materiales y métodos	19
3.4.2	Factores en estudio	20
3.4.3	Tratamientos en estudio	20
3.4.4	Diseño experimental	20
<b>3.5</b>	<b>Efecto de la oxigenación del medio nutritivo sobre la germinación de conidios de los hongos antagonistas.</b>	<b>21</b>
3.5.1	Materiales y métodos	21
3.5.2	Factores en estudio	21
3.5.4	Diseño Experimental	22
3.5.5	Variable evaluada	22
<b>3.6</b>	<b>Efecto de lavado de la mazorca sobre la germinación y el crecimiento de los hongos antagonistas</b>	<b>22</b>
3.6.1	Materiales y métodos	22
3.6.2	Tratamientos en estudio	23
3.6.3	Diseño experimental	23
3.6.4	Variable evaluada	23
<b>3.7</b>	<b>Efecto del lavado de las mazorcas de cacao sobre el crecimiento de hongos y bacterias epifíticas</b>	<b>24</b>
3.7.1	Materiales y métodos	24
3.7.2	Factores en estudio para colonias de hongos	25
3.7.3	Tratamientos en estudio	25
3.7.4	Factores en estudio para colonias de bacterias	25
3.7.5	Tratamientos en estudio	25
3.7.6	Diseño Experimental	26
3.7.7	Variables evaluadas	26
<b>3.8</b>	<b>Evaluación de la interacción de hongos y bacterias epifíticos con el lavado de la mazorca en el crecimiento de los micelios de los hongos antagonistas.</b>	<b>26</b>
3.8.1	Materiales y métodos	26
3.8.2	Factores en estudio para colonias de hongos	27
3.8.3	Factores en estudio para colonias de bacterias	27
3.8.4	Diseño Experimental	28
3.8.5	Variable evaluada	28
<b>3.9</b>	<b>Efecto de los hongos antagonistas con diferentes soluciones nutritivas sobre el control de monilia</b>	<b>28</b>
3.9.1	Materiales y métodos	28
3.9.2	Tratamientos en estudio	29

3.9.3 Análisis estadístico.	29
3.9.4 Variable evaluada	29
<b>3.10 Evaluación de la persistencia en el campo de los hongos antagonistas</b>	<b>29</b>
3.10.1 Materiales y métodos	29
3.10.2 Tratamientos en estudio	30
3.10.3 Diseño experimental	30
3.10.4 Variable evaluada	30
<b>3.11 Estudio del hábito de crecimiento de los hongos antagonistas</b>	<b>30</b>
3.11.1 Materiales y métodos	30
3.11.2 Tratamientos en estudio	31
3.11.3 Variable evaluada	31
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>32</b>
<b>4.1. Evaluación del efecto de soluciones nutritivas sobre la germinación de esporas de hongos antagonistas.</b>	<b>32</b>
<b>4.2 Efecto de la humedad sobre la germinación de conidios de TK1 y GK7</b>	<b>36</b>
<b>4.3 Efecto de la temperatura sobre el poder germinativo de las esporas de los hongos antagonistas.</b>	<b>37</b>
<b>4.4 Efecto de la oxigenación del medio nutritivo sobre la germinación de esporas de los hongos antagonistas.</b>	<b>39</b>
<b>4.5 Efecto de lavado de la mazorca sobre la germinación y crecimiento radial de los hongos antagonistas</b>	<b>41</b>
<b>4.6 Efecto del lavado de las mazorcas sobre el crecimiento de hongos epifíticos y bacterias epifíticas</b>	<b>42</b>
4.6.1 Evaluación del efecto del lavado de las mazorcas sobre el crecimiento de hongos epifíticos	42
4.6.2 Evaluación del efecto del lavado de las mazorcas sobre el número de colonias de bacterias epifíticas.	43
<b>4.7 Evaluación de la interacción de hongos y bacterias epifíticas con el lavado de la mazorca en el crecimiento de los hongos antagonistas.</b>	<b>45</b>
4.7.1 Evaluación de la interacción de hongos epifíticos con el lavado de la mazorca en el crecimiento de los hongos antagonistas.	45
4.7.2 Evaluación de la interacción bacterias epifíticas con el lavado de la mazorca en el crecimiento de los hongos antagonistas.	47
<b>4.8 Evaluación del efecto de los hongos antagonistas con diferentes soluciones nutritivas sobre el control de monilia.</b>	<b>49</b>
<b>4.9 Evaluación de la persistencia en el campo de los hongos antagonistas</b>	<b>50</b>
<b>4.10 Estudio del hábito de crecimiento de TK1 y GK7</b>	<b>54</b>
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>56</b>

<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>62</b>
<b>7. RECOMENDACIONES</b>	<b>64</b>
<b>8. LITERATURA CITADA</b>	<b>65</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>71</b>



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mazorca de cacao (derecha) infectada de monilia.....	4
Figura 2. Porcentaje de humedad en cámaras húmedas para humedad baja (<60%).....	36
Figura 3. Porcentaje de humedad existente en cámaras húmedas para humedad alta (100%).....	37
Figura 4. Efecto de la humedad en la germinación de esporas de GK7.....	37
Figura 5. Efecto de la temperatura-tiempo de exposición en la germinación de esporas de GK7.....	38
Figura 6. Efecto de la temperatura-tiempo de exposición en la germinación de TK1.....	39
Figura 7. Efecto de medios nutritivos-burbujeo en la germinación de esporas de GK7.....	40
Figura 8. Efecto de medios nutritivos-burbujeo en la germinación de esporas de TK7.....	41
Figura 9. Tasa de crecimiento radial de hongos epifíticos (mm/día).....	43
Figura 10. Número de colonias de bacterias por caja petri.....	45
Figura 11. Efecto de hongos epifíticos en la tasa de crecimiento radial de GK7.....	46
Figura 12. Efecto de hongos epifíticos en la tasa de crecimiento radial de TK1.....	47
Figura 13. Efecto de colonias de bacterias en TCR. (mm/día) de GK7.....	48
Figura 14. Efecto de colonias de bacterias en la TCR. (mm/día) de TK1.....	48
Figura 15. Efecto de hongos antagonistas con medios nutritivos en el porcentaje de cojines activos en cacao.....	49
Figura 16. Precipitación durante el ensayo de persistencia de hongos antagonistas. Ver Anexo 3 para promedios de largo plazo.....	50
Figura 17. Persistencia de GK7 en mazorcas de cacao en diferentes medios nutritivos.....	51
Figura 18. Colonización de <i>Clonostachys</i> spp. sobre mazorcas de cacao tratadas con GK7.....	51
Figura 19. Colonización de <i>Fusarium</i> spp. sobre mazorcas de cacao tratadas con GK7.....	52
Figura 20. Colonización de otros hongos epifíticos sobre mazorcas de cacao.....	52
Figura 21. Persistencia de TK1 en mazorcas de cacao en diferentes medios nutritivos.....	53
Figura 22. Colonización de <i>Clonostachys</i> spp. sobre mazorcas de cacao tratadas con TK1.....	53
Figura 23. Colonización de <i>Fusarium</i> spp. sobre mazorcas de cacao tratadas con TK1.....	54
Figura 24. Recolonización otros hongos sobre mazorcas de cacao tratadas con TK1.....	54

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de fuentes de carbono presentes en Ecoplate de Biolog .....	14
Tabla 3. Reacción de TK1 y GK7 en la utilización de medios nutritivos.....	34
Tabla 4: Efecto del medio nutritivo- tetrazolium sobre la germinación de esporas de GK7 después de 24 horas de incubación.....	35
Tabla 5: Efecto del medio nutritivo y del tetrazolium sobre la germinación de esporas de TK1. ....	36
Tabla 6. Valores promedios de germinación (%) y TCR en GK7 .....	41
Tabla 7. Valores promedios de germinación (%) y TCR en TK1 .....	42
Tabla 8. Métodos utilizados para la identificación y selección de colonias de bacterias.....	44

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Humedad Relativa (%) de Cabiria durante el ensayo (30 abril-11 junio 2004).....	71
Anexo 2. Humedad Relativa (%) de La Lola (1958-2003).....	71
Anexo 3. Temperatura media (°C) y Máximas (°C) de La Lola. (1952-2003).....	72
Anexo 4. Precipitación (mm) de La Lola (1949-2003).....	72

## RESUMEN

Uquillas, LW. 2004. Inducción de la germinación para mejorar la eficacia de dos agentes antagonistas para el control de monilia (*Crinipellis roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE, Turrialba, Costa Rica. 72 p.

Palabras Clave: cacao, control biológico, *Crinipellis roreri*, *Cylindrocarpon victoriae*, factores bióticos, factores abióticos, germinación, lavado de mazorca, moniliasis, *Theobroma cacao*, *Trichoderma ovalisporum*.

Tanto en América Central como en América del Sur se han llevado a cabo trabajos para el control biológico de la moniliasis (*Crinipellis roreri*) en cacao (*Theobroma cacao*) por medio de la aplicación de agentes antagonistas. No obstante, la baja germinación de algunos hongos antagonistas a nivel de campo ha limitado mucho su potencial. El objetivo principal de la presente investigación fue evaluar el efecto de los factores abióticos y bióticos sobre la germinación de los conidios de *Trichoderma ovalisporum* (TK1) y *Cylindrocarpon victoriae* (GK7) sobre mazorcas de cacao, así como su persistencia en el campo. Se encontró que a alta humedad relativa (100%) incrementó la germinación de GK7. Temperaturas de 24, 28, 32° C por 1, 5 y 24 horas de exposición no afectaron el poder germinativo, mientras que la exposición de conidios a una temperatura de 36° C por 24 horas disminuyó el poder germinativo de GK7 a 27% y de TK1 a 87%. Conidios de GK7 germinaron en muchos medios nutritivos, en cambio conidios de TK1 solo en extracto de corteza y de hojas de cacao. La germinación fue mayor tanto para GK7 como para TK1 en tratamientos oxigenados, sobre todo cuando se utilizó extracto de corteza. A partir del lavado de la mazorca se aislaron cinco tipos de hongos y cinco tipos de bacterias epifíticas que fueron utilizados para medir su influencia sobre el crecimiento de los hongos antagonistas. Entre ellos cabe destacar el efecto inhibitorio de *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento radial de TK1 y GK7, así como de las colonias de bacterias 1 y 4. El lavado de mazorcas no influyó la germinación ni el crecimiento de GK7 y TK1 bajo condiciones de relativa abundancia de nutrientes; un hongo epifítico no identificado aprovechó el lavado. La aplicación de conidios de TK1 y GK7 sobre mazorcas de cacao, utilizando medios nutritivos priorizados, resultó en la desaparición de estos antagonistas después de dos y tres semanas, respectivamente, acompañado por un aumento de *Clonostachys* spp. De los ensayos realizados, se puede concluir que el principal factor que limitó la germinación de conidios de TK1 son fuentes nutritivas y, para GK7, factores bióticos.

## SUMMARY

Uquillas, LW. 2004. Induction of germination for the efficacy improvement of two antagonistic agents for the control of monilia (*Crinipellis roreri*) in cocoa (*Theobroma cacao*). Tropical Agricultural Research and Higher Education Center, CATIE, Turrialba, Costa Rica. 72 p.

**Key words:** abiotic factors, biological control, biotic factors, cocoa, *Crinipellis roreri*, *Cylindrocarpon victoriae*, germination, moniliasis, *Theobroma cacao*, *Trichoderma ovalisporum*. washing of pods.

In Central and South America efforts have been made to biologically control moniliasis (*Crinipellis roreri*) in cocoa (*Theobroma cacao*) through the application of antagonistic agents. Nevertheless, the low germination rates of some antagonistic fungi are reducing the potential of such agents. The main goal of the present research was to evaluate the effect of abiotic and biotic factors on the germination of conidia of *Trichoderma ovalisporum* (TK1) and *Cylindrocarpon victoriae* (GK7) on pods of cocoa, as well as antagonist persistence in the field. Results showed that high relative humidity (100%) increased the germination of GK7. Temperatures of 24, 28, and 32° C and exposures of 1, 5 and 24 hours did not affect the germination potential, but an exposure of conidia for 24 hours to a temperature of 36° C reduced the subsequent germination of GK7 and TK1 to 27% and 87%, respectively. Conidia of GK7 germinated in a variety of nutritional media, whereas conidia of TK1 only germinated in extracts of cocoa bark and leaves. The germination of GK7 and TK1 increased in oxygenated environments, especially in the presence of bark extract. Through washing the pods, five different types of epiphytic fungi and five types of bacteria were isolated and used to measure their influence on the growth of antagonistic fungi. Among them, *Trichoderma* sp. and bacteria 1 and 4 showed a significant inhibitory effect on radial growth of TK1 and GK7. Pod wash-off did not influence the germination or the growth of GK7 and TK1 in relatively nutrient-rich media. Treatments of cacao pods with TK1 and GK7 using prioritized nutrient media resulted in the disappearance of antagonists after two and three weeks, respectively. Simultaneously, an increase of *Clonostachys* spp. was observed. Summarizing the results of the experiments it can be concluded that the main limiting factors for germination are nutrient sources in the case of TK1, and biotic factors in the case of GK7.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Justificación

La monilia (*Crinipellis roreri* o *Moniliophthora roreri*) está entre las principales enfermedades que atacan al cultivo del cacao, cuya incidencia sobre la mazorca es destructiva, provocando una considerable disminución en el rendimiento. Entre los métodos de control de esta enfermedad se encuentra el control biológico utilizando agentes antagonistas que disminuyan la cantidad de inóculo del patógeno.

El control biológico es definido como la regulación de la población de un organismo por medio de otro y parte del principio de que en la naturaleza todo organismo tiene uno o más antagonistas que lo eliminan o compiten con él (Hanson y Hilje 1993). El antagonismo microbial es un factor de control contra las enfermedades ya que una supresión general de los agentes patógenos puede ser proporcionada por la microflora nativa o por microorganismos introducidos.

El convenio CABI-CATIE ha realizado trabajos sobre el control biológico de monilia utilizando principalmente microorganismos antagonistas como el hongo *Trichoderma* spp., que ha tenido resultados prometedores. Además de una reducción en el gasto económico en comparación con el método de control químico.

Sin embargo, algunos factores ambientales y biológicos podrían limitar la germinación de las esporas de los hongos antagonistas, reduciendo considerablemente su eficacia en el control de monilia, lo que hace necesario realizar estudios que nos permitan entender estos factores y crean la posibilidad de desarrollar nuevas formulaciones en el manejo de estos antagonistas que permitan mejorar la eficiencia en el control de esta enfermedad.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 General

Inducir la germinación para mejorar la eficacia de dos agentes antagónicos para el control de monilia que afecta la mazorca de cacao.

### 1.2.2 Específicos

1. Determinar los factores bióticos y abióticos que afectan la germinación de los conidios de *Trichoderma ovalisporum* y *Cylindrocarpon victoriae* sobre la mazorca de cacao.

2. Evaluar el efecto de estos dos agentes antagónicos con diferentes soluciones nutritivas sobre el control de monilia.
3. Evaluar el efecto del uso de soluciones nutritivas sobre la persistencia de los antagonistas en las mazorcas de cacao en el campo.
4. Estudiar el hábito de crecimiento de los antagonistas y su interacción con el hospedero en la superficie de la mazorca.

### **1.3 Hipótesis**

1. Los factores bióticos y abióticos no afectan la germinación de las esporas de hongos antagonistas sobre las mazorcas de cacao.
2. La adición de nutrientes a las suspensiones de los hongos antagonistas no tienen influencia en la persistencia de estos a través del tiempo.
3. La adición de nutrientes a las suspensiones de conidios de los antagonistas no tienen efecto sobre la eficiencia de éstos.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Cultivo del cacao e importancia

El cacao (*Theobroma cacao* L., Sterculiaceae) es una planta nativa de América Tropical, con su centro de origen probablemente situado al noreste de Sudamérica en los bosques ecuatoriales de la región amazónica. Actualmente, más de 20 millones de personas de todo el planeta dependen directamente del cultivo del cacao para subsistir, pues el 90% de la producción de cacao procede de minifundios de superficie inferior a 5 hectáreas (European Food Information Council 2003).

La producción mundial al 2003 se estimó en 3055000 TM en grano de cacao. Entre los principales países productores se encuentran Costa de Marfil con el 43% de la producción mundial, Ghana con el 16%, Brasil con el 14% (Organización Internacional del Cacao 2003). En el año 2002, el cultivo de cacao en América cubría 1.35 millones de hectáreas, con una producción total de 448000 TM. Los principales países latinoamericanos productores de cacao son: Brasil (569097 ha), Ecuador (302056 ha), República Dominicana (125786 ha), Colombia (98846 ha), México (83350 ha), Venezuela (65000 ha), Perú (41000 ha). Los siete países centroamericanos (Belice, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y Panamá) cultivan en conjunto unas 18825 ha (CATIE 2002).

El cacao es una fuente de ingreso para campesinos e indígenas en esas regiones, las cuales son muchas veces los sectores más pobres, con menor nivel de desarrollo, y poco acceso al crédito. Los bajos precios y los graves problemas de enfermedades han desmotivado a los gobiernos y productores latinoamericanos a incentivar y mejorar su cultivo (CATIE 2002).

#### **Biología floral del cacao.**

Las flores del cacao nacen agrupadas en sectores especializados que se denominan cojines florales, los que están localizados alrededor del punto de inserción de las hojas, tanto en el tronco como en las ramas (Enríquez 1985).

Los primordios florales nacen endógenamente del floema. El período desde el momento que emerge el botón floral hasta la apertura de la flor es de aproximadamente 30 días, y es afectado por las condiciones ambientales. La inflorescencia es de tipo definido. Normalmente hay una alta producción de flores luego de las primeras lluvias (Enríquez 1985).

El número de flores por cojín varía de acuerdo al clon. Parece ser esta una característica genética bien definida. El botón maduro inicia su apertura a partir de las 2 p.m., generalmente con movimientos muy lentos de los sépalos. Por la mañana las anteras están abiertas y el grano de polen listo para fecundar la flor. Los granos de polen son esferoides y muy pequeños (16-23  $\mu\text{m}$ ). Muchos insectos actúan como



agentes de polinización, especialmente una mosquita del género *Forcipomyia*. El mayor porcentaje de flores polinizadas se tiene cuando ocurre el mismo día que la flor se abre. Si la flor es fecundada, se torna amarillenta y las partes florales se van secando paulatinamente y el ovario crece rápidamente. Si la flor no es polinizada hasta el segundo día, entonces se produce la abscisión de ésta (Enríquez 1985).

El cigoto inicia su actividad de división después de 40 ó 50 días después de producida la fecundación, época en que la mazorca ha alcanzado unos 8 –10 cm de largo. El período de crecimiento que sigue es rápido y la mazorca crece de acuerdo al desarrollo de los óvulos. La máxima velocidad de crecimiento se da alrededor de los 75 días después de la fecundación; a los 90 días, aproximadamente, el crecimiento se vuelve lento. Los óvulos se llenan de un endosperma gelatinoso que poco a poco es consumido por el embrión, hasta los 140 días. Para entonces la madurez fisiológica de la semilla termina y se inician los procesos de madurez de la mazorca, que tardan entre 10-15 días (Enríquez 1985).

## 2.2 Enfermedades del cacao

Se estima que se pierde del 10% al 20% de la producción mundial de cacao debido a las enfermedades que lo afectan, estando las enfermedades fungosas entre las principales limitantes de la producción de cacao en América Latina (López *et al.* 1996). Algunas de las principales enfermedades del cacao son: escoba de bruja (*Crinipellis pernicioso*), mazorca negra (*Phytophthora palmivora*) y monilia (*Crinipellis roleri*).



Figura 1. Mazorca de cacao (derecha) infectada de monilia.

La monilia se encuentra presente a América tropical, y ha sido reportada en nueve países, como son Colombia (Anon 1832), Ecuador (Jorgensen 1970), Perú, Venezuela, Panamá (Orellana 1956), Costa Rica (Enríquez y Suárez 1978), Nicaragua (López y Enríquez 1980), Guatemala en el año del 2002

(comunicación personal con Wilbert Phillips) y Belice en el año 2004 (comunicación personal con Ulrike Krauss).

Esta enfermedad representa uno de los principales limitantes de la producción en varios países, puede causar pérdidas que van desde 20% -30% (Jorgensen 1970) de la producción total hasta un 95% (Rorer 1918, 1926). La monilia puede infectar mazorcas de cacao de cualquier edad. El hongo invade tejidos, produciendo los síntomas característicos de esta enfermedad como son: necrosis, deformación y pudrición. Los síntomas son externos, aunque mazorcas entre los 60 a 80 días pueden completar su desarrollo sin presentar síntomas externos de la enfermedad, pero con el tejido interno necrosado (Reuck 1997).

### **2.3 Germinación de conidios de monilia en mazorcas de cacao**

Flores y Galindo (1998) indican que la mazorca de cacao presenta una epidermis con ornamentación alveolada. Sobre las protuberancias se localizan gran cantidad de estomas, distribuidos en grupos de 2-10. La superficie presenta tricomas de tipo glandular y raramente tricomas de tipo estrellado. Los conidios de monilia se localizan generalmente en la base de los tricomas glandulares y ocasionalmente cerca de los estomas, presentan pared ornamentada y un poro germinativo en un extremo. Existen dos formas de conidios: esféricos y ovalados y dos formas de germinación a través del poro germinativo o directamente a través de su pared. El tubo germinativo presenta en el extremo distal una estructura apresorial y una hifa infectiva. El tubo germinativo es único y raras veces es doble. La penetración del hongo se lleva a cabo directamente por la epidermis de la mazorca Flores y Galindo (1998).

### **2.4 Métodos de control de monilia**

La idea de un control de la enfermedad por medio de la práctica cultural de eliminar los frutos enfermos cada semana y dejarlos en el campo para su degradación natural ha dado buenos resultados (Barros 1982). Enríquez (2004) aconseja revisar la plantación de cacao regularmente, para que las mazorcas afectadas por moniliasis sean destruidas antes de que produzcan esporas que transmitan la enfermedad a otros frutos. La recolección debe hacerse cada 5-7 días, de esta manera poder detectar las mazorcas enfermas en el inicio de los síntomas y retirarlas a tiempo antes de que el micelio esporule. Esta práctica debe estar complementada con otras labores de cultivo, como son la poda y la cosecha (Suárez 1987, Compañía Nacional de Chocolates S.A. 1988). Barros (1982) recomienda modificar el microclima de la plantación y producir condiciones desfavorables para el desarrollo del hongo y de la enfermedad; entre estas labores tenemos la regulación de la sombra que asegura una buena penetración de la luz, buena ventilación y reducción de la humedad relativa.

Suárez (1987) señaló que el combate químico de monilia se puede hacer con algunos fungicidas protectores de base cúprica, con aplicaciones cada siete o quince días. Barros (1977) indica que el costo de las aplicaciones resulta a menudo demasiado elevado.

La resistencia de enfermedades en las plantas puede definirse como la capacidad del hospedero para reducir la incidencia o desarrollo del patógeno (Robison 1969). Ampuero (1967) indicó que su uso es factible debido a la gran diversidad genética del género *Theobroma*. Phillips (2003) reportó resistencia a monilia de los clones de cacao ICS-95 y SCC-61 en Colombia y del clon UF-273 en Costa Rica.

## **2.5 Control biológico de enfermedades**

El control biológico es definido como la reducción de la densidad de inóculo o sus estructuras productoras de la enfermedad de un patógeno o parásito en su estado activo o de dormancia, por uno o más organismos, obtenido naturalmente, o a través de la manipulación del medio ambiente, huésped, o del antagonista, o por introducción de uno o más organismos antagonistas y puede estar acompañado de prácticas culturales que crean un ambiente favorable para el desarrollo de los agentes antagonistas, obtención de plantas resistentes a enfermedades, introducción masiva de antagonistas y organismos benéficos (Baker y Cook 1982).

El control biológico puede ser clásico o inundativo. El primero es una forma de control biológico aplicado que abarca el descubrimiento, importación y establecimiento de enemigos naturales del mismo origen de la plaga exótica con el fin de regular o disminuir poblaciones o inóculos de plagas o enfermedades introducidas (Andrews y Quezada 1989). Al contrario, el control biológico inundativo esta dado por la colonización de grandes cantidades de un enemigo natural nativo con el fin de disminuir la población de la peste inmediatamente (Stinner 1977).

Entre las ventajas que presenta el control biológico radica en que es barato, efectivo, permanente y no interfiere negativamente con ningún otro proceso del ecosistema. Una gran desventaja reside que los organismos importados a veces no logran adaptarse a las condiciones climáticas de la nueva región (Andrews y Quezada 1989).

## **2.6 Hongos endofíticos.**

Los hongos endofíticos colonizan los tejidos u órganos internos de una planta sin causar ningún tipo de síntomas. Cuando la colonización de los tejidos le confiere una protección a la planta hospedera contra el ataque de agentes bióticos y abióticos se denominan hongos endofíticos mutualistas (Carroll 1990).

Los hongos endofíticos son mutualistas si:

1. No causan síntomas de enfermedad en la planta hospedera.
2. Son transmitidos a través de la semilla u horizontalmente de una planta a otra.
3. Colonizan y están extendidos en un hospedero definido.
4. Pueden producir metabolitos secundarios como antibiosis o de naturaleza tóxica.

Pocasangre *et al.* (2000) sugirieron que la mayoría de los hongos endofíticos son ascomicetos y están presentes la mayoría de su ciclo de vida dentro del tejido de las plantas de plátano. Estos pueden brindar dos tipos de beneficios a las plantas:

1. Alterar la fisiología de la planta llevándoselas a aumentar su crecimiento.
2. Incrementar la resistencia al estrés causado por factores abióticos.

## **2.7 Control biológico de monilia**

Trabajos en el control biológico para el manejo de enfermedades del cacao se han realizado en América Central y del Sur, siendo uno de estos la aplicación de agentes antagonistas como *Clonostachys rosea* y *Trichoderma* spp. Krauss y Soberanis (2001) señalaron que en ensayos llevados a cabo en el este del Perú para el control de monilia (*C. roseri*), escoba de bruja (*C. perniciososa*) y mazorca negra (*P. palmivora*), la mezcla de cepas de micoparásitos (*Clonostachys* spp.) redujo la incidencia de monilia en un 14.6-24.9%. El control de esta enfermedad y el rendimiento fueron positivamente correlacionados con el número de micoparásitos presentes en el inóculo, lo cual sugiere que un control simultáneo de estas tres enfermedades con la mezcla de agentes de biocontrol es altamente promisorio. En cambio, en ensayos realizados para el control de monilia y mazorca negra en Bocas del Toro, Panamá, Krauss *et al.* (2003) indicaron que la mezcla de cepas de biocontrol disminuyó la incidencia de monilia o de mazorca negra, pero no las dos enfermedades al mismo tiempo.

Evans *et al.* (2003) encontraron varias cepas de micoparásitos con potencial para controlar la monilia, siendo estas: *Trichoderma ovalisporum* Samuels & Schoers, sp. nov., localizada en el noreste del Ecuador, en el Parque Nacional de Yasuni (Provincia de Sucumbios), río Anangu, Yanayacu-Panacocha. Este hongo es un endofítico de tejidos leñosos de *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae) y fue re-aislado de semillas y mazorcas de cacao. *Cylindrocarpon vitoriae* comb. nov. se encontró colonizando pseudostromas de *C. roseri* en la superficie de mazorca de cacao en Río Este, Bocas del Toro (Panamá).

A pesar de que el control biológico de monilia con *T. ovalisporum* se presenta como una buena alternativa, la baja germinación de conidios a nivel de campo limita su eficiencia por que compite de manera desventajosa con el hongo patógeno, por lo que es necesario determinar los factores involucrados que perjudican su acción (Krauss 2004 comunicación personal).

## **2.8 Factores ambientales que afectan la germinación de conidios de hongos antagonistas**

### 2.8.1 Factores abióticos

Entre los factores ambientales que influyen sobre la germinación de conidios y el desarrollo de los hongos antagonistas está la humedad relativa, temperatura, pH y nutrientes:

a. Humedad: la humedad influye sobre la germinación y el desarrollo de hongos. Puede presentarse en forma de lluvia, como alta humedad relativa en la atmósfera y como rocío. El efecto más importante de la humedad se centra en la germinación de las esporas de los hongos y sobre la penetración del tubo germinativo en el hospedante (Agrios 1998).

Sanogo *et al.* (2002) estudiaron el efecto de la humedad (baja ? 75% y alta ? 100%) y de la temperatura (15, 20, 25, 30°C). Determinaron que no hubo esporulación de *Trichoderma stromaticum* en presencia de humedad relativa baja (75%) y a una temperatura de 25 – 30° C, pero a alta humedad relativa (100%) y a la misma temperatura hubo una buena producción de conidios.

b. Temperatura y pH: Bandyoadhyay *et al.* (2003) evaluaron el efecto de diferentes niveles de pH (5, 6, 7, 8, 9) y temperaturas (15, 20, 25, 30, 35°C) en el crecimiento y la esporulación de cepas de *Trichoderma* spp., determinando que rangos de pH entre 5 y 7, con temperaturas entre 25-30°C fueron óptimas para el crecimiento y esporulación de este hongo antagonístico.

Corroborando los datos anteriores, Sanogo *et al.* (2002) encontraron que *T. stromaticum* produjo conidios abundantes a temperaturas de incubación de 20°C y 25°C, pero al incrementar la temperatura a 30°C no hubo producción de conidios. Además, la germinación de estos estuvo alrededor del 80% a temperaturas que van de 20 a 30°C (Sanogo *et al.* 2002). Bastos (2001) indicó que a temperaturas de 10°C y 35°C no hubo esporulación ni crecimiento del hongo antagonista. Sanogo *et al.* (2002) señalaron que con temperaturas de 20- 25°C *T. stromaticum* suprimió el desarrollo de escoba de bruja (*C. pernicioso*) en cacao.

c. Fuentes de nutrientes: estudios nutricionales de agentes de control biológico revelaron que las fuentes de nitrógeno fueron esenciales para la germinación de esporas (Monga 2001).

Monga (2001) estudió el efecto de distintas fuentes de carbono en la esporulación y crecimiento de *Trichoderma viride*. La esporulación de *T. viride* fue baja en todas las fuentes de carbono utilizadas en

esta investigación; mientras que para *Gliocadium virens*, fue excelente, exceptuando maltosa. *Trichoderma koningii* y *Trichoderma harzianum* tuvieron una buena esporulación en sucrosa y glucosa respectivamente. Además, la fructosa fue la mejor fuente de carbono para la producción de biomasa de *T. viride* y *G. virens*. Sin embargo, *T. koningii* y *T. harzianum* produjeron la máxima cantidad de biomasa en presencia de maltosa y glucosa.

Bastos (2001) estudió el efecto de varios medios líquidos sobre la producción de conidios en *T. stromaticum*, como fueron: melaza-maíz empapado en licuor, almidón de maíz empapado en licuor, extracto de levadura de maíz, papa-maíz empapado en licuor, papa-melaza, caldo de dextrosa de papa, jugo V-8 y glucosa-maíz empapado en licuor. Papa-melaza dio la más alta producción de conidios (Bastos 2001).

Saikia y Azad (2001) evaluaron el efecto de siete fuentes de carbono (sucrosa, fructosa, galactosa, maltosa, dextrosa, manitol y xylosa) y seis fuentes de nitrógeno (nitrato de sodio, nitrato de potasio, tryptona, asparagina, urea y nitrato de amonio) sobre la actividad antagónica de los agentes de control biológico (*T. harzianum*, *T. viride* y *Bacillus subtilis*) contra *Colletotrichum falcatum*, en la que todos los agentes de control biológico tuvieron la máxima actividad antagónica en presencia de sucrosa.

Krauss *et al.* (2003) realizaron un experimento durante dos años consecutivos, en que probaron cepas de agentes de biocontrol (*Clonostachys* spp. y *Trichoderma* sp.) en dos formulaciones (en agua y en 3% v/v de melaza) para el control de *Phytophthora* spp. y monilia; indicaron que los agentes de biocontrol mezclados con melaza aumentó el porcentaje de mazorcas sanas de cacao, debido a un mayor control de *Phytophthora* spp. Sin embargo, los agentes de control biológico mezclados con melaza reaccionaron de manera distinta en diferentes años.

## 2.8.2 Factores bióticos

Un ecosistema siempre involucra a más de una especie de microorganismo que interactúa con los factores abióticos. Invariablemente la comunidad está compuesta por un número de especies que pueden competir unas con otras, pero que también pueden ser de ayuda mutua (Bélanger y Avis 2002).

Sikora (1992) define el término “antagonista” como un conjunto de microorganismos, que actúan como parásitos, predadores, competidores que repelen, inhiben o matan a los nemátodos parásitos de las plantas, insectos u hongos.

Rivera (1999) indica que en principio general, los hongos antagonistas interactúan con los microorganismos patógenos en la planta en uno de las tres vías:

- a. Compiten por alimento y espacio.

b. Parasitismo.

c. Antibiosis.

La competencia, el parasitismo y antibiosis son formas de interacción que ocurren en la superficie de las hojas de la planta entre hongos que ocupan el mismo nicho. El poseer una o varias de estas propiedades permitirá al hongo filósfero colonizar un espacio de una manera más eficiente en este ambiente. Sin embargo, es importante anotar que los hongos de la superficie han evolucionado y desarrollado estas características específicas para cohabitar con otros hongos, en la medida que los hongos puedan sustentar sus ciclos de vida en la filósfera; ellos compartirán este ambiente con otros organismos para crear un ecosistema balanceado (Bélanger y Avis 2002).

a. La competencia: todos los hongos que tienen una fase saprofita o epifítica podrán competir con otros hongos porque la disponibilidad de nutrientes es limitada. Varios saprofitos han sido probados como agentes de biocontrol, ya que ellos pueden colonizar rápidamente hospederos débiles que podrían servir de alimento para patógenos de plantas, reduciendo la densidad de inóculo del hongo patógeno. A través de la prevención del acceso al campo de la infección, el agente de biocontrol puede confinar al patógeno en su desarrollo y más tarde no alcanzaría niveles poblacionales que conduzcan a una substancial infección. En el curso de competencia contra los patógenos los saprofitos pueden también parasitar o producir antibiosis para facilitar su acceso a fuentes de nutrientes por retraso del desarrollo del patógeno (Bélanger y Avis 2002).

A lo largo de este mismo punto, diversos intentos han sido hechos en modificar artificialmente las poblaciones de hongos en la superficie de la hoja en un esfuerzo por reemplazar hongos patógenos con saprofitos no dañinos. Sin embargo, casi todo en la naturaleza prevalece a largo plazo con las poblaciones de hongos originales el mismo balance ecológico que ha sido colocado inicialmente (Piper *et al.* 2000; Kinkel *et al.* citado por Bélanger y Avis 2002; ten Hoppen *et al.* 2003).

b. Parasitismo: el parasitismo es un ataque directo de un antagonista contra un patógeno. Ha sido sugerido como una estrategia potencial de biocontrol contra patógenos necrotróficos y biotróficos (Blakeman y Fokkema 1982). Los antagonistas que tienen una relación parasítica con su hospedero microbial posiblemente tendrán poblaciones o total de biomasa dependiendo de la densidad o biomasa del hospedero (Cook y Baker 1983).

*Trichoderma* spp. son los hongos más citados como agentes de biocontrol, pues no solo son polífagos, sino que tienen además un amplio rango de propiedades que contribuyen a su potencial, aunque el hiperparasitismo puede ser el más importante (Sundheim y Tronsmo, citado por Bélanger y Avis,

2002). Generalmente se ha sugerido que el parasitismo fue el principal, pero no el modo de acción exclusivo de algunos *Trichoderma* spp. (Elad *et al.* 1983).

Bélanger y Avis (2002) estudiaron detalladamente los eventos cronológicos de la interacción parasítica de *T. harzianum* sobre *Botrytis cinerea*, y en estudios previos *in vitro* fueron capaces de reproducir el “factor de enrollamiento” que sugirió parasitismo. Sin embargo, las observaciones microscópicas de transmisión del electrón revelaron que el citoplasma del hongo huésped fue claramente degradado antes de los signos de penetración por *T. harzianum* dentro de *B. cinerea*. Además, el etiquetado dorado de monómeros de quitina mostró poca degradación de la pared celular de *B. cinerea*. Los autores concluyeron que la antibiosis en lugar del parasitismo fue responsable de la actividad de biocontrol en esta cepa particular de *T. harzianum*. Ellos sugirieron que lo que apareció como parasitismo en este caso, fue una forma de saprofitismo donde los hongos podían usar los recursos nutricionales de la hifa del hongo muerto posiblemente afectados por toxinas liberadas por *T. harzianum*. Incidentalmente, *Trichoderma* spp. son conocidas por liberar un gran número de toxinas y a la fecha varias han sido descritas y caracterizadas (Ghisalberti y Sivasithamparam 1991). Esto podría explicar la naturaleza no específica de las interacciones de *Trichoderma* spp. contra otros hongos en la rizosfera y en la filósfera (Bélanger y Avis 2002).

c. Antibiosis: Blakeman y Fokkema (1982) indicaron que la antibiosis puede ser una manera eficiente de reprimir los patógenos de la planta tanto necrotróficos como biotróficos en la superficie de la hoja. Como regla general, muchos hongos liberan metabolitos extracelulares con algún grado de actividad antifungal. Esta propiedad tiene su importancia por que permite a los hongos de proteger un nicho ecológico que el ocupa de invasores potenciales o a través de desalojo de hongos de un espacio que ellos quieren ocupar. Prácticamente hablando, visualizar hongos para antibiosis es una manera fácil por la cual los candidatos son sometidos a pruebas de confrontación contra otros hongos en cajas petri. Una zona de inhibición entre los hongos indicará usualmente la producción de metabolitos antifungales. Sin embargo, la producción de antibióticos *in vitro* no siempre esta correlacionada con el potencial de biocontrol (Andrews, citado por Bélanger y Avis 2002).



### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Localización del estudio

La presente investigación a nivel de campo se llevó a cabo en la finca Cabiria y los ensayos de laboratorio en las instalaciones de Fitoprotección, en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), ubicado en el cantón Turrialba, Provincia de Cartago, Costa Rica, localizado a 9° 53' de latitud Norte y 83° 38' de longitud Oeste, a una altura de 602 m.s.n.m, precipitación promedio anual de 2679 mm, temperatura media 21.8°C, humedad relativa del 88% (CATIE 2003).

Medio de cultivo es una sustancia o solución que permite el crecimiento de uno o más organismos (French y Hebert 1980). Los medios de cultivo utilizados en la presente investigación fueron medio PDA/2 (20 g papa agar dextrosa + 10 g agar granulado/1 litro de agua) para la multiplicación de hongos y medio AN/2 (11.5 g agar nutritivo + 11 g agar granulado /1 litro de agua) para bacterias.

La esterilización de los medios de cultivo se realizó en el autoclave a una temperatura de 121°C por el tiempo de 30 minutos (French y Hebert 1980).

Los cultivos de los hongos antagonistas se conservaron en incubadoras a una temperatura de 24°C en un régimen de oscuridad.

La cuantificación de esporas de hongos se hizo con el uso del hemacitómetro, para lo cual se preparó, en agua destilada, una suspensión de esporas del hongo a contar, de mayor concentración que la deseada. La suspensión se colocó en el hemocitómetro y se cuantificó el número de conidios en la celda central. Los conteos se realizaron utilizando el microscopio con el objetivo de 40X. Para todos los experimentos reportados a continuación, se ajustaron las concentraciones a  $1 \times 10^6$  esporas/ml para TK1 y  $2.3 \times 10^5$  esporas/ml para GK7. Las diferentes concentraciones para los dos hongos se debió a la diferencia de tamaño de los conidios entre ellos.

La preparación de suspensiones a una concentración deseada se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$V_i C_i = V_f C_d$$

Donde:

$V_i$ : volumen inicial de la suspensión.

$C_i$ : concentración de esporas inicial.

$V_f$ : volumen final de la suspensión.

C<sub>d</sub>: concentración de esporas deseada.

Se evaluó el efecto de la humedad, temperatura, medios nutritivos y aireación, presencia de microorganismos epifíticos y lavado de las mazorcas de cacao sobre la germinación de conidios de *Trichoderma ovalisporum* (TK1) y *Cylindrocarpon victoriae* (GK7).

### **3.2 Efecto de soluciones nutritivas sobre la germinación de los conidios de los hongos antagonistas.**

#### 3.2.1 Efecto de soluciones nutritivas en la actividad metabólica de los hongos antagonistas.

Se realizaron dos ensayos. En el primer ensayo se usaron como fuentes de carbono los medios nutritivos presentes en las placas Biolog EcoPlate (BIOLOG s.f.) y para el segundo ensayo se utilizaron medios nutritivos preparados en el laboratorio.

**ENSAYO 1:** Determinación de fuentes de carbono para medir la actividad metabólica de esporas de *Trichoderma ovalisporum* (TK1) y *Cylindrocarpon victoriae* (GK7) utilizando los platos Biolog.

#### **Materiales y métodos**

- a. Se utilizaron para este ensayo los Biolog Eco Plates, que constan de 32 celdas con diferentes fuentes de carbono (cuadro 1), y tres repeticiones.
- b. Se añadió a cada una de las celdas 20 µl de una suspensión de esporas de TK1 y GK7.
- c. Las placas se colocaron en una incubadora por 24 horas y se procedió a determinar la actividad metabólica de los hongos antagonistas por medio del color púrpura que tomó el indicador (tetrazalium de violeta) cuando el hongo usó la fuente de carbono.

Tabla 1. Lista de fuentes de carbono presentes en Ecoplate de Biolog

<p><b>CARBOHIDRATOS</b></p> <p>D-Garacturonic Acid <math>\beta</math>-Lactone  D-Manitol  N-Acetyl D-Glucosamide  D-Glucosamic Acid  Glucosa 1-Fosphate  <math>\beta</math>-Cyclodextrin  Glycogen  D-Celubiose  <math>\beta</math>-D -Lactose  D-Xylose  <math>\beta</math>-Methyl-D-Glucoside  Glucose-1-Phosphate  Pyruvic Acid Methyl Ester</p>	<p><b>LÍPIDOS</b></p> <p>D,-<math>\beta</math>-Glycerol Fosfato  Tween 40  Tween 80  D-Mannitol  N-Acetyl-D-Glucosamine  D-Glucosaminic Acid  i-Erythritol  D-Galactonic acid</p>
<p><b>AMINOÁCIDOS</b></p> <p>L-Arginina  L-Asparigina  L-Phenylalanina  L-Serina  L-Threonina  Glycyl-LGlutamic acid (peptido) Putrescine  Phenylethyl-amine</p>	<p><b>OTROS</b></p> <p>2- Hydroxido Acido Benzoico  4-Hydroxido Acido Benzoico  <math>\beta</math>-Hydroxybutyric Acid  Itaconic Acid  <math>\beta</math>-Ketobutyric Acid-  D- Acido málico</p>

**ENSAYO 2** Determinación de la actividad metabólica de *Trichoderma ovalisporum* (TK1) y *Cylindrocarpon victoriae* (GK7) en la utilización de diferentes medios nutritivos.

**Materiales y métodos**

a. Se prepararon las siguientes fuentes de nutrientes:

Agua (testigo)

Fructosa (40 g l<sup>-1</sup>)

Glucosa (40 g l<sup>-1</sup>)

Galactosa (40 g l<sup>-1</sup>)

Maltosa (40 g l<sup>-1</sup>)

Sacarosa (40 g l<sup>-1</sup>)

Trehalosa (40 g l<sup>-1</sup>)

Almidón de yuca (5 g l<sup>-1</sup>)

Almidón de papa (5 g l<sup>-1</sup>)

Manitol (40 g l<sup>-1</sup>)

Leche en polvo (10 g l<sup>-1</sup>)

Sacarosa (40 g l<sup>-1</sup>) + almidón de papa (5 g l<sup>-1</sup>)

Sacarosa (40 g l<sup>-1</sup>) + leche en polvo (40 g l<sup>-1</sup>)

Fructosa (40 g l<sup>-1</sup>) + almidón de papa (5 g l<sup>-1</sup>)

Fructosa (40 g l<sup>-1</sup>) + leche en polvo (40 g l<sup>-1</sup>)

Agar (5 g l<sup>-1</sup>) (algas rojas: heteropolisacárido, azarosa, agarpectina)

Gelatina (5 g ml<sup>-1</sup>) (Colágeno, residuos de matadero, hueso y cartílago de bovinos y porcinos)

Pectona (10 g l<sup>-1</sup>)

Extracto de madera de cacao (5 g l<sup>-1</sup>)

NP7(0.001%). Alquil aril poliglicoleter producto adherente. Casa comercial Bayer.

Bayfolan (25 ml l<sup>-1</sup>). Fertilizante foliar (11% de N, 8% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y 6% de K<sub>2</sub>O; además, la presencia de microelementos, Vitamina B<sub>1</sub>, auxinas de crecimiento). Casa Comercial Bayer.

b. Se colocó 200  $\mu$ l de cada medio nutritivo en cápsulas plásticas de 1.5 ml de volumen.

c. Se añadió de 100  $\mu$ l TK1 o GK7.

d. Se añadió 200  $\mu$ l de tetrazolium de violeta (2% p/v) como indicador de la actividad metabólica de los hongos.

e. Las cápsulas plásticas se colocaron en una incubadora a 24 °C por 24 horas, y se procedió a observar esporas germinadas de los hongos antagonistas con ayuda de un microscopio.

f. Como testigo se utilizó agua destilada.

#### **Variable evaluada**

Se utilizó la misma metodología para los dos ensayos. La evaluación se hizo de manera visual, de acuerdo a la coloración púrpura que toma el medio nutritivo por efecto de tetrazolium cuando existe actividad metabólica por parte de los hongos antagonistas

También se determinó el porcentaje de germinación de las esporas de TK1 y GK7.

3.2.2 Determinar el efecto de medios nutritivos sobre la germinación de conidios de los hongos antagonistas.

#### **Materiales y métodos.**

a. Se utilizaron los siguientes medios nutritivos:

Leche en polvo (40 g l<sup>-1</sup>)

Sacarosa (40 g l<sup>-1</sup>)

Fructosa (40 g l<sup>-1</sup>)

Almidón de papa (5 g l<sup>-1</sup>)

Extracto de corteza de cacao (80 g l<sup>-1</sup>)

Extracto de hojas de cacao (80 g l<sup>-1</sup>)

Para obtener los extractos de las ramas y hojas de cacao se realizó el siguiente procedimiento:

- Las ramas y hojas utilizadas se obtuvieron del clon Catongo, de la colección de cacao de Cabiria.

- Se limpio la parte exterior de las ramas de cacao de musgos.

- Se cortó la corteza de cacao en pedazos pequeños.

- Se maceró las muestras con ayuda del mortero y se aumentó agua destilada (2 g de muestras 25 ml<sup>-1</sup> de agua).

- Se filtró el extracto obtenido con tela cristal.
- El extracto de hojas se consiguió con el mismo procedimiento descrito para el de corteza. Se utilizaron hojas de diferentes tamaños y edades.
- b- Para evaluar la germinación de los conidios de los hongos antagonistas se colocó 500  $\mu$ l de cada medio nutritivo en viales de 1.50 ml.
- c- Se añadió una suspensión de 100  $\mu$ l TK1 y GK7 en cada medio nutritivo.
- d- Se colocó 200  $\mu$ l de tetrazolium de violeta, como testigos se utilizó los mismos tratamientos sin tetrazolium.
- e- Los viales se colocaron en una incubadora a 24° C por 24 horas, y se procedió a observar esporas germinadas de los hongos antagonistas con ayuda de un microscopio.

### 3.2.2.1 Factores en estudio

Factor A (Tretazolium de violeta)

- ? Sin tretazolium (T0)
- ? Con Tetrazolium (T1)

Factor B (Medios Nutritivos)

- ? Agua (N0)
- ? Leche en polvo (N1)
- ? Sacarosa (N2)
- ? Fructosa (N3)
- ? Almidón de papa (N4)
- ? Extracto de corteza de cacao (N5)
- ? Extracto de hojas de cacao (N6)

### 3.2.2.2 Tratamientos en estudio

T0N0	T1N0
T0N1	T1N1
T0N2	T1N2
T0N3	T1N3
T0N4	T1N4
T0N5	T1N5
T0N6	T1N6

### 3.2.2.3 Diseño experimental

El Diseño Experimental empleado es un DIA, en un factorial de 2 x 7 con tres repeticiones.

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + N_j + TN_{ij} + ?_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  es la  $i$ -ésima respuesta del  $j$ -ésimo tratamiento.

$\mu$  es la media general.

$T_i$  el efecto del  $i$ -ésimo tetrazolium de violeta.

$N_j$  es el efecto del  $j$ -ésimo medio nutritivo.

$TN_{ij}$  es el efecto de la interacción tetrazolium y medios nutritivos.

$\epsilon_{ijk}$  es el error experimental.

Para las diferencias significativas entre tratamientos se realizó la prueba de Duncan para medias.

#### 3.2.2.4 Variable evaluada

La utilización del medio nutritivo por parte de TK1 y GK7 se determinó por la coloración violeta que toma el medio por la reducción del tetrazolium de violeta.

El porcentaje de germinación de esporas de los hongos antagonistas.

### **3.3 Evaluación del efecto de la humedad sobre la germinación de los conidios de los hongos antagonistas**

Los conidios de los antagonistas fueron sometidos a dos condiciones de humedad relativa contrastantes (humedad alta ? 98%, humedad baja ? 75%).

#### 3.3.1 Materiales y métodos

##### Calibración de la humedad

##### a. Humedad alta (humedad alta ? 98%).

- ? Se utilizaron cajas plásticas para cámaras húmedas de dimensiones 21x29x11 cm<sup>3</sup>.
- ? Se vertió 100 ml agua destilada estéril al fondo de las cajas y se cubrió con espuma para floristería (marca comercial “Aavaland”), localmente conocida como oasis, para evitar el contacto directo del agua con la mazorca del cacao.
- ? Un sensor de humedad marca GRANT serie 1200, fue colocado en el interior de la caja para monitorear la humedad durante 48 horas.

##### b. Humedad baja (humedad baja ? 75%).

Se realizó el mismo procedimiento del numeral anterior, pero en vez de toallas húmedas se añadió 450 g de sílica-gel para reducir la humedad en el interior de las cajas.

### 3.3.2 Manejo del ensayo

- a. Se seleccionaron mazorcas sanas de aproximadamente 10 cm de largo.
- b. La superficie de las mazorcas se esterilizó con alcohol al 70% v/v. El alcohol fue aplicado por aspersión.
- c. Los agentes antagonistas fueron aplicados sobre mazorcas de cacao utilizando un rociador manual de 200 ml, para asperjar agua en el cabello.
- d. Se dejaron secar las mazorcas por el tiempo de 30 minutos a temperatura ambiente.
- e. Se colocó una mazorca de cada tratamiento por cada caja plástica y se procedió a taparlas.
- f. Las cajas fueron colocadas a temperatura de laboratorio (de 24°C) por el tiempo de 24 horas y se procedió a evaluar la germinación de los conidios después de este tiempo.

### 3.3.3 Tratamientos en estudio

Para cada antagonista (TK1 y GK7) se evaluó el efecto de:

H0: Humedad Alta

H1: Humedad Baja

### 3.3.4 Diseño experimental

El modelo estadístico utilizado es un Diseño Irrestringidamente Aleatorizado (DIA); este diseño se utilizó para todos los ensayos de esta investigación. Para diferencias significativas entre tratamientos se hizo la prueba de Duncan para comparación de medias.

$$Y_{ij} = \mu + H_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  es la  $i$ -ésima respuesta del  $j$ -ésimo tratamiento.

$\mu$  es la media general.

$H_i$  es el efecto de la  $i$ -ésima humedad.

$\epsilon_{ij}$  es el error experimental.

### 3.3.5 Variable evaluada

Se utilizó el método de réplica con esmalte transparente, cuyo procedimiento es el siguiente:

- a. Se realizaron cortes circulares de la cáscara de la mazorca de cacao (12 mm de diámetro) con un sacabocados (3 muestras por mazorca).
- b. Las muestras fueron secadas al medio ambiente por el tiempo de 30 minutos.
- c. Sobre esta sección de la muestra se colocó una capa ligera de esmalte transparente para uñas (marca Raquel Carbo).
- d. Se dejó secar 10 minutos.
- e. Se levantó la capa del esmalte con una pinza y se colocó sobre un portaobjetos con una gota de colorante (safranina 2% p/v).
- f. Con ayuda del microscopio se contaron 100 conidios con el objetivo de 40 X registrando germinados y no germinados y se registró el porcentaje de germinación.
- g. Se transformó el porcentaje de germinación de las esporas por raíz cuadrada para normalizar la distribución del error. Esta transformación se hizo para todos los ensayos en que se realizaron conteos de esporas germinadas

## **3.4 Efecto de la temperatura sobre el poder germinativo de los conidios de los hongos antagonistas**

### 3.4.1 Materiales y métodos

- a. Se preparó una suspensión de los hongos antagonistas en las concentraciones indicadas en el numeral 3.2.3.
- b. Se preparó un sustrato de PDA/2 y se colocó aproximadamente 10 ml de sustrato a las cajas petri. Se dejó solidificar el medio.
- c. Se agregó 50  $\mu$ l de suspensión con conidios de los antagonistas a cada plato petri.
- d. Se realizó el rayado del sustrato para una distribución uniforme de la suspensión del antagonista.
- e. Se colocaron los platos petri en incubadoras, tres de marca LMS y una de marca GCA, modelo 4EG, a diferentes temperaturas y a diferentes tiempos de exposición correspondiente a cada tratamiento. Se aleorizaron las placas por incubadoras. Las temperaturas interiores se controlaron con termómetros de mercurio, y se compararon con las temperaturas que indicaban las pantallas de las incubadoras.



f. Después los platos petri se colocaron en una incubadora a 24°C para completar las 24 horas de incubación en oscuridad para todos los tratamientos.

g. El testigo fue el tratamiento que estuvo a 24°C por 24 horas.

h. Se procedió a determinar el porcentaje de germinación de conidios para cada hongo antagonista con la ayuda de un microscopio.

### 3.4.2 Factores en estudio

Factor A: Temperatura

? 24°C (T0)

? 28 °C (T1)

? 32°C (T2)

? 36°C (T3)

Factor B: Tiempo de exposición (Horas):

? 1 h (H1)

? 5 h ( H2)

? 24 h (H3)

### 3.4.3 Tratamientos en estudio

T0H3 (Testigo)

T1H1                    T2H1                    T3H1

T1H2                    T2H2                    T3H2

T1H3                    T2H3                    T3H3

### 3.4.4 Diseño experimental

Se utilizó un DIA, y para tratamientos un factorial 3 x 3 + 1 testigo y tres repeticiones.

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + H_j + TH_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  es la i-ésima respuesta del j-ésimo tratamiento.

$\mu$  es la media general.

$T_i$  es el efecto del  $i$ -ésima temperatura.

$H_j$  es el efecto del  $j$ -ésimo tiempo de exposición.

$TH_{ij}$  es la interacción la temperatura y tiempo de exposición.

$\epsilon_{ijk}$  es el error experimental.

### 3.4.5 Variable evaluada

Porcentaje de germinación de esporas de los hongos antagonistas.

## **3.5 Efecto de la oxigenación del medio nutritivo sobre la germinación de conidios de los hongos antagonistas.**

### 3.5.1 Materiales y métodos

- a. Los conidios (1 ml de suspensión) de los agentes antagónicos en estudio se colocaron en 50 ml de tres medios nutritivos líquido en un Erlenmeyer de 250 ml de capacidad.
- b. Los Erlenmeyer con los medios líquidos fueron sometidos a burbujeo constante por el tiempo de 24 horas. El burbujeo se realizó utilizando un motor eléctrico marca GAST, de 115V, en la salida de aire del motor se colocaron mangueras de polietileno transparente de 7 mm de diámetro cuyo extremo estuvieron sumergidos en los Erlenmeyer conteniendo el medio líquido.
- c. Los tratamientos testigos no fueron sometidos a burbujeo.
- d. Se colocó 50  $\mu$ l de la suspensión en una placa portaobjetos.
- e. Con ayuda del microscopio se procedió a contar los conidios que han germinado.

### 3.5.2 Factores en estudio

Factor A (Medios nutritivos):

- ? Agua (M0)
- ? Extracto de corteza (M1)
- ? Extracto de hoja (M2)

Factor B (Oxigenación):

- ? Sin burbujeo (SO)
- ? Burbujeo constante (CO)

### 3.5.3 Tratamientos en estudio

M0SO            M0CO

M1SO            M1CO

M2SO            M2CO

### 3.5.4 Diseño Experimental

Se utilizó un DIA en arreglo factorial 3 x 2, con cuatro repeticiones.

$$Y_{ijk} = \mu + M_i + O_j + MO_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  es la i-ésima respuesta del j-ésimo tratamiento.

$\mu$  es la media general.

$M_i$  es el efecto del i-ésimo medio nutritivo.

$O_j$  es el efecto del j-ésima oxigenación.

$MO_{ij}$  es la interacción entre medio nutritivo y oxigenación.

$\epsilon_{ijk}$  es el error experimental.

### 3.5.5 Variable evaluada

Porcentaje de germinación de esporas de los hongos antagonistas.

## **3.6 Efecto de lavado de la mazorca sobre la germinación y el crecimiento de los hongos antagonistas**

### 3.6.1 Materiales y métodos

- a. Se lavaron las mazorcas de cacao con agua destilada estéril, en una bolsa plástica tipo ziploc se vertió 300 ml de agua destilada sobre las mazorcas y se procedió a agitar la bolsa por el tiempo de 5 minutos; se lavaron seis mazorcas.
- b. El lavado se filtró utilizando una membrana cuyo tamaño del poro fue de 0.2  $\mu$ m.
- c. Se incorporó 1 ml de lavado por cada 9 ml de PDA/2 tibio (aproximadamente 50°C de temperatura) en los platos petri, se dejó solidificar.

- d. Se colocó 50  $\mu$ l de suspensión de los conidios de los hongos antagonistas distribuyendo de forma uniforme sobre la superficie de PDA/2.
- e. Como testigo se colocaron los hongos antagonistas en PDA/2 sin lavado.
- f. Las cajas petri se colocaron en una incubadora a 24°C por 24 horas y se procedió a determinar el porcentaje de germinación de las esporas de TK1 y GK7.
- g. En otro ensayo, para evaluar el crecimiento radial de TK1 y GK7 se inocularon los centros de los platos petri de PDA/2 con y sin lavado de mazorca, con discos de agar colonizados por los antagonistas.
- h. Las mediciones se realizaron diariamente por el tiempo de 7 días.

### 3.6.2 Tratamientos en estudio

TK1LO (TK1 Sin Lavado)

TK1L1 (TK1 Con Lavado)

GK7LO (GK7 Sin Lavado)

GK7L1 (GK7 Con Lavado)

### 3.6.3 Diseño experimental

Se utilizó un DIA con 4 repeticiones:

$$Y_{ij} = \mu + L_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  es la  $i$ -ésima respuesta del  $j$ -ésimo tratamiento.

$\mu$  es la media general.

$L_i$  Es el efecto del  $i$ -ésimo lavado.

$\epsilon_{ij}$  es el error experimental.

### 3.6.4 Variable evaluada

El crecimiento radial se reportó en mm/día y se analizó por análisis de varianza. Para las diferencias estadísticas se utilizó la prueba de Duncan para comparar las medias de los tratamientos.

La germinación de los conidios se evaluó en porcentaje, de acuerdo al procedimiento utilizado en el numeral 3.2.7.

### 3.7 Efecto del lavado de las mazorcas de cacao sobre el crecimiento de hongos y bacterias epifíticas

#### 3.7.1 Materiales y métodos

- a. Se utilizó el lavado del ensayo anterior sin filtración y se procedió a aislar colonias de hongos y bacterias epifíticas.
- b. Para el aislamiento de bacterias, con un haza se distribuyó el lavado sobre agar nutritivo (AN).
- c. Para el aislamiento de hongos se hicieron diluciones ( $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ) de la siguiente manera: con una micropipeta se tomó 1 ml de suspensión y se colocó en un tubo de ensayo que contuvo 9 cc de agua destilada estéril (dilución  $1 \times 10^{-1}$ ).
- d. El tubo de ensayo se colocó en un agitador electrónico para homogenizar la muestra.
- e. Se repitió el paso anterior hasta obtener un rango de concentraciones hasta de  $1 \times 10^{-4}$ .
- f. Se colocó 50  $\mu$ l de esta suspensión en cajas petri, se vertió 10 ml de Czapek-Dox Agar (40 g l<sup>-1</sup>) tibia, Rose Bengal (40  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>), con antibióticos (Streptomycin 50 ppm y Penicilina 40 ppm) y se mezcló bien por rotación horizontal.
- g. Se colocaron las cajas petri en una incubadora a 24°C.
- h. Cuando aparecieron las colonias de hongos y bacterias epifíticas, se seleccionaron las cinco colonias más comunes de cada grupo y se aislaron en PDA/2 y AN/2 respectivamente.
- i. La identificación de hongos se realizó en base a la forma y coloración de las colonias, y observación de la formas de los conidióforos y las esporas de los hongos epifíticos.
- j. La identificación de las colonias de las bacterias se realizó en base a la forma y coloración de las colonias (Tabla Munsell), tinción Gram (French y Hebert 1980), reacción al KOH (Suslow *et. al.* 1981), y movilidad.
- k. Para evaluar el efecto del lavado sobre hongos epifíticos se incorporó 1 ml de lavado por cada 9 ml de a PDA/2 tibio (aproximadamente 50°C de temperatura) en los platos petri.
- l. Se inocularon en forma central los platos petri con los hongos epifíticos (bloques de agar colonizado por los hongos epifíticos).
- m. Para las bacterias epifíticas, se colocó 1 ml de lavado por cada 9 ml de AN/2 y después de solidificar; se procedió a rayar el agar con las colonias respectivas.

- n. Las cajas petri sin lavado sirvieron como testigo.
- o. Se colocó la caja petri en una incubadora a 24°C y se midió el desarrollo de las colonias de los epifíticos diariamente.

### 3.7.2 Factores en estudio para colonias de hongos

#### Factor A

- ? Sin Lavado ( L0)
- ? Con Lavado (L1)

#### Factor B (colonias de hongos)

- ? H1
- ? H2
- ? H3
- ? H4
- ? H5

### 3.7.3 Tratamientos en estudio

L0 H1	L1 H1
L0 H2	L1 H2
L0 H3	L1 H3
L0 H4	L1 H4
L0 H5	L1 H5

### 3.7.4 Factores en estudio para colonias de bacterias

#### Factor A

- ? Sin Lavado (L0)
- ? Con Lavado (L1)

#### Factor B (colonias de bacterias)

- ? B1
- ? B2
- ? B3
- ? B4
- ? B5

### 3.7.5 Tratamientos en estudio

L0 B1	L1 B1
L0 B2	L1 B2
L0 B3	L1 B3
L0 B4	L1 B4
L0 B5	L1 B5

### 3.7.6 Diseño Experimental

El mismo diseño experimental fue empleado para los dos ensayos de hongos y bacterias. Se utilizó un DIA en arreglo factorial 2 x 5 con 3 repeticiones:

$$Y_{ijk} = \mu + L_i + C_j + LC_{ij} + ?_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  es la i-ésima respuesta del j-ésimo tratamiento.

$\mu$  es la media general.

$L_i$  es el efecto del i-ésimo lavado.

$C_j$  es el efecto de la j-ésima colonia de agentes epifíticos.

$LC_{ij}$  es el efecto de la interacción de lavado con los agentes epifíticos.

$?_{ijk}$  es el error experimental.

### 3.7.7 Variables evaluadas

Se evaluó el crecimiento radial diario de las colonias de hongos epifíticas expresado en mm y se contó el número de colonias de bacterias epifíticas frente al lavado de las mazorcas. El análisis se hizo a través de análisis de varianza. Para el caso de conteos se normalizó la distribución del error por la transformación de raíz cuadrada.

Los datos de desarrollo de los hongos y bacterias se evaluaron como experimentos separados.

## **3.8 Evaluación de la interacción de hongos y bacterias epifíticos con el lavado de la mazorca en el crecimiento de los micelios de los hongos antagonistas.**

### 3.8.1 Materiales y métodos

Los siguientes cuatro ensayos se realizaron para los hongos antagonistas de manera independiente: interacción lavado-colonia de hongos epifíticos y *Trichoderma ovalisporum*, interacción lavado-colonia de bacterias epifíticas y *Trichoderma ovalisporum*, interacción lavado-colonia de hongos epifíticos y *Cylindrocarpon victoriae*, interacción lavado-colonia de bacterias epifíticas y *Cylindrocarpon victoriae*.

- a. Se trabajó con los mismos cinco hongos epifíticos y cinco bacterias epifíticas del ensayo anterior.

- b. En cajas petri conteniendo PDA/10 (3.9 g de PDA + 18 g de Agar Granulado/litro de agua) para hongos, y AN/10 (2.3 g de AN + 18 g de Agar Granulado/litro de agua) para bacterias, sin y con lavado, se colocaron bloques de agar precolonizado por los hongos antagonistas a un lado de la caja petri.
- c. Al otro lado de la caja petri se colocaron bloques de agar precolonizados con los hongos epifíticos.
- d. Para el ensayo de la interacción de las colonias de bacterias sobre el crecimiento de TK1 y GK7, se realizó un rayado sobre el agar con una suspensión de bacterias epifítica en agua. La concentración de las colonias de bacterias se determinó por uniformización de la densidad óptica de Biolog, con un valor del 85% para todas las colonias (BIOLOG 2001).
- e. Cajas petri sin organismos epifíticos sirvieron como testigo.
- f. Las cajas petri fueron colocadas en una incubadora a 24°C y se midió el desarrollo de las colonias de los hongos antagonistas diariamente.

### 3.8.2 Factores en estudio para colonias de hongos

Factor A (Lavado):

- ? Sin Lavado (L0)
- ? Con Lavado (L1)

Factor B (colonias de hongos)

- ? H0 (testigo)
- ? H1
- ? H2
- ? H3
- ? H4
- ? H5

### 3.8.3 Factores en estudio para colonias de bacterias

Factor A (Lavado de mazorca):

- ? Sin lavado (L0)
- ? Con lavado (L1)

Factor B (colonias de bacterias):

- ? B0 (testigo)
- ? B1
- ? B2
- ? B3
- ? B4
- ? B5



### 3.8.4 Diseño Experimental

El mismo modelo estadístico fue empleado en los cuatro ensayos anteriormente enunciados.

Se utilizó un DIA, y para tratamientos un factorial 2 X 6 con tres repeticiones.

$$Y_{ijk} = \mu + L_i + C_j + LC_{ij} + ?_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  es la i-ésima respuesta del j-ésimo tratamiento.

$\mu$  es la media general.

$L_i$  es el efecto del i-ésimo lavado.

$C_j$  es el efecto de la j-ésima colonia de agentes epifíticos.

$LC_{ij}$  es el efecto de la interacción de lavado con los agentes epifíticos.

$?_{ijk}$  es el error experimental.

Para diferencias estadísticas entre tratamientos se utilizó la prueba de Duncan.

### 3.8.5 Variable evaluada

Se evaluó el crecimiento radial diario de los hongos antagonistas frente a los diferentes hongos y bacterias epifíticos, expresado en mm.

## **3.9 Efecto de los hongos antagonistas con diferentes soluciones nutritivas sobre el control de monilia**

### 3.9.1 Materiales y métodos

- a. Se seleccionaron 210 cojines florales sobre los cuales se aplicaron los diferentes medios nutritivos seleccionados previamente. El clon utilizado en el presente estudio fue el UF-613.
- b. Las soluciones utilizadas para inducir la germinación de cada hongo antagonista fueron: agua, extracto de corteza y extracto de hoja.
- c. Se aplicaron los hongos antagonistas suspendidos en las soluciones sobre los cojines florales con un rociador manual.
- d. Como testigo se utilizó los cojines florales asperjados con agua estéril.

### 3.9.2 Tratamientos en estudio

T0	Testigo (agua)
T1	TK1 + agua
T2	TK1 + extracto de corteza
T3	TK1 + extracto de hoja
T4	GK7 + agua
T5	GK7 + extracto de corteza
T6	GK7 + extracto de hoja

### 3.9.3 Análisis estadístico.

Se realizó el análisis de  $X^2$  (Chi cuadrado)

### 3.9.4 Variable evaluada

La evaluación se hizo semanalmente de manera visual determinando el número de cojines activos y flores abiertas por tratamiento. Se realizaron cuatro lecturas.

## **3.10 Evaluación de la persistencia en el campo de los hongos antagonistas**

### 3.10.1 Materiales y métodos

- a. Se seleccionaron 105 mazorcas de cacao en el campo menores de 10 cm de largo. El clon utilizado para este estudio fue el Catongo.
- b. La superficie de las mazorcas de cacao fueron esterilizadas con alcohol (70%).
- c. Se aplicaron los hongos antagonistas con los diferentes medios nutritivos sobre los cojines florales con un aspersor manual.
- d. Los cojines florales que solo se les aplicó agua sirvieron como los testigos negativos.
- e. Los muestreos se realizaron semanalmente. Se hicieron cortes circulares de la cáscara de la mazorca de cacao (10 mm de diámetro) con un sacabocados (3 muestras por mazorca) por tratamiento (Piper *et al.* 2000).
- f. Las muestras circulares fueron secadas al medio ambiente por tres días.
- g. Luego, se colocaron sobre platos petri pre-colonizados con *Phytophthora palmivora*, cepa C13 Phy.
- h. Las cajas petri se colocaron a temperatura ambiente de laboratorio.
- i. La presencia o ausencia de los hongos antagonistas fueron observados durante dos semanas a diario.

### 3.10.2 Tratamientos en estudio

T0	Testigo (agua)
T1	TK1 + agua
T2	TK1 + extracto de corteza
T3	TK1 + extracto de hoja
T4	GK7 + agua
T5	GK7 + extracto de corteza
T6	GK7 + extracto de hoja

### 3.10.3 Diseño experimental

Se utilizó un DCA con medición en el tiempo. Las evaluaciones se hicieron semanalmente, durante seis semanas. Se utilizó el siguiente modelo estadístico para medidas repetidas en el mismo individuo a través del tiempo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{k(i)} + S_j + ?_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ij}$  es la  $i$ -ésima respuesta del  $j$ -ésimo tratamiento.

$\mu$  es la media general.

$T_i$  es el efecto del  $i$ -ésimo tratamiento.

$e_{k(i)}$  es el error del tratamiento

$S_j$  es el efecto de la  $j$ -ésima semana.

$?_{ijk}$  es el error experimental.

### 3.10.4 Variable evaluada

Se identificó los hongos antagonistas por sus características de formación de conidios, y se determinó la presencia de los hongos en el tiempo.

## 3.11 Estudio del hábito de crecimiento de los hongos antagonistas

El ensayo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Histología perteneciente al CATIE, en Turrialba.

### 3.11.1 Materiales y métodos

a. Se seleccionaron 5 cojines florales por cada tratamiento. El clon utilizado en este ensayo fue el UF-613.

b. Se aplicaron los hongos antagonistas con agua y extracto de corteza sobre los cojines florales con un aspersor manual.

c. Se tomaron muestras de flores por tratamiento a las 24, 48 y 72 horas después de la aplicación, y en el laboratorio se observó por medio del microscopio la presencia y germinación de esporas de TK1 y GK7.

### 3.11.2 Tratamientos en estudio

T1	TK1 + agua
T2	TK1 + extracto de corteza
T3	GK7 + agua
T4	GK7 + extracto de corteza

### 3.11.3 Variable evaluada

Presencia y germinación de esporas de los hongos antagonistas en los tejidos florales de cacao.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Evaluación del efecto de soluciones nutritivas sobre la germinación de esporas de hongos antagonistas.

Ensayo 1: Determinación de la actividad metabólica de esporas de *Trichoderma ovalisporum* (TK1) y *Cylindrocarpon victoriae* (GK7) utilizando los platos Biolog.

En este ensayo se encontró que luego de crecer durante 24 horas en los platos Biolog, el tetrazolium solo reaccionó ante la presencia de GK7, ya que como reacción metabólica al tetrazolium, el medio tomó una coloración violeta que indica la utilización de la fuente de nutrientes por parte del hongo. Estos resultados pueden ser observados en la Tabla 2, donde además se puede apreciar que no hubo ninguna reacción del tetrazolium de violeta a la actividad de TK1.

Tabla 2. Reacción de TK1 y GK7 a diferentes fuentes de carbono de los platos Biolog.

FUENTE DE CARBONO	TK1	GK7
<b>CARBOHIDRATOS</b>		
D-Garacturonic Acid ?-Lactone	-	+
D-Manitol	-	+
N-Acetyl D-Glucosamide	-	+
D-Glucosamic Acid	-	+
Glucosa l-Fosphate	-	+
? -Cyclodextrin	-	+
Glycogen	-	+
D-Celubiose	-	+
? -D –Lactose	-	+
D-Xylose	-	+
?-Methyl-D- Glucoside	-	+
Glucosa-1-Phosphate	-	+
Pyruvic Acid Methyl Ester	-	+
<b>AMINOACIDOS</b>		
L-Arginine	-	+
L-Asparagine	-	+
L-Phenylalanine	-	+
L-Serine	-	+
L-Threonine	-	+
Glyeyl-LGlutamic acid (pectido)	-	+
Putrescine	-	+
Phenylethyl-amine	-	+
<b>LIPIDOS</b>		
D,L-? -Glycerol Phosphate	-	+
Tween 40	-	+
Tween 80	-	+
D-Mannitol	-	+
N-Acetyl-D- Glucosamine	-	+
D- Glucosaminic Acid	-	+
Glucosa-l-Phosphate	-	+
i-Erythritol	-	+
D- Galactonic acid	-	+
2- Hydroxy Benzoic Acid		+
4-Hydroxy Benzoic Acid	-	+
?-Hydroxybutyric Acid	-	+
Itaconic Acid	-	+
? -Ketobutyric Acid-	-	+
D-Malic Acid	-	+

+: Reacción positiva al tetrazolium

-: sin reacción

**Ensayo 2:** Determinación de la actividad metabólica de TK1 y GK7 en la utilización de diferentes medios nutritivos.

Como puede observarse en la Tabla 3, la actividad metabólica de ambos antagonistas quedó demostrada al utilizar algunos de los medios de cultivo que parecen en dicha Tabla. En esta puede observarse que, en el caso de GK7, hubo reacción a 12 de los 22 medios de cultivo utilizados, en los cuales se detectó la coloración violeta, típica de la reacción del tetrazolium, mientras que para TK1 no se presentó reacción de ninguno de ellos.

Tabla 3. Reacción de TK1 y GK7 en la utilización de medios nutritivos.

Medios nutritivos	TK1	GK7
Agua (testigo)	-	-
Fructosa	-	+
Glucosa	-	+
Galactosa	-	+
Maltosa	-	+
Sacarosa	-	-
Trehalosa	-	+
Almidón de yuca	-	-
Almidón de papa	-	+
Manitol	-	+
Leche en polvo	-	+
Sacarosa + almidón de papa	-	+
Sacarosa + leche en polvo	-	-
Fructosa + almidón de papa	-	-
Fructosa + leche en polvo	-	-
Agar	-	-
Gelatina	-	-
Pectona	-	+
NP7	-	-
Bayfolan	-	-
Extracto corteza cacao	-	+
Extracto de hojas de cacao	-	+

+ Reacción con tetrazolium

- no hubo reacción.

**Ensayo 3.** Germinación de esporas de GK7 y TK1 en varios medios nutritivos.

Los medios de cultivo utilizados (Tabla 4) para GK7, permitieron observar diferentes respuestas de germinación en cada uno de ellos, encontrándose respuestas que oscilaron entre un 1.67% y 14.67%, dependiendo del medio. Cabe destacar que en 4 de los medios utilizados hubo una disminución de la germinación al utilizar el tetrazolium, respuesta que queda demostrada al aplicar los análisis de variancia, donde se observaron diferencias significativas ( $P=0.0030$ ). En la misma Tabla puede observarse que en 3 de los medios utilizados (extracto de corteza, almidón de papa y fructuosa) hubo un ligero incremento de la germinación en presencia de tetrazolium. No obstante, los análisis de

variancia no permitieron establecer diferencias significativas. Aquí puede resaltarse el hecho de que en la presencia de tetrazolium en extracto de corteza la germinación de esporas fue mayor que el testigo (agua).

La comparación de la germinación del GK7 en los distintos medios de cultivo, independientemente de la presencia o ausencia del tetrazolium, permitió observar diferencias significativas entre ellos ( $P=0.0002$ ), y además, interacción significativa para tetrazolium-medios nutritivos ( $P=0.0050$ ), situación que se refleja con la prueba de medias de Duncan para la interacción Medio nutritivo-tetrazolium (Tabla 4). En términos generales, los medios nutritivos leche, sacarosa y extracto de corteza, sin tetrazolium, fueron los que proporcionaron los mayores porcentajes de germinación de las esporas de GK7.

Tabla 4: Efecto del medio nutritivo- tetrazolium sobre la germinación de esporas de GK7 después de 24 horas de incubación.

Medio nutritivo	Sin tetrazolium	Con tetrazolium
Leche	14.67 a	6.00 b c
Sacarosa	13.33 a	3.67 b c
Extracto de corteza	13.00 a	13.33 a
Extracto de hojas	7.00 b c	4.67 b c
Almidón de papa	5.00 b c	6.33 b c
Agua	9.00 a b	2.00 c
Fructosa	1.67 c	5.33 b c

Medias con la misma letra no evidenciaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

En la Tabla 5 puede observarse el análisis de la variancia para TK1, donde se indica diferencias altamente significativas para la presencia de tetrazolium ( $P= 0.0001$ ), medios nutritivos ( $P= 0.0001$ ) y significancia para la interacción tetrazolium-medios nutritivos ( $P= 0.0001$ ) para el porcentaje de esporas germinadas.

Es importante mencionar que no hubo germinación de TK1 para la mayoría de los medios de cultivo utilizados, en presencia o ausencia del tetrazolium. No obstante cabe destacar que los tratamientos con extracto de corteza-sin tetrazolium y extracto de hojas-sin tetrazolium fueron los únicos tratamientos que presentaron germinación de conidios siendo en cada caso del 12% y 10% respectivamente. Por otro lado el extracto de corteza tuvo un efecto similar con GK7 y TK1, ya que fue el que permitió el mayor porcentaje de germinación en ambos antagonistas.



Tabla 5: Efecto del medio nutritivo y del tetrazolium sobre la germinación de esporas de TK1.

Medio nutritivo	Sin tetrazolium	Con tetrazolium
Leche	0 c	0 c
Sacarosa	0 c	0 c
Extracto de corteza	12.33 a	0 c
Extracto de hojas	10.00 b	0 c
Almidón de papa	0 c	0 c
Agua	0 c	0 c
Fructosa	0 c	0 c

Medias con la misma letra no hay diferencia significativas ( $P < 0.05$ ).

#### 4.2 Efecto de la humedad sobre la germinación de conidios de TK1 y GK7

En la Figura 2 se observa las condiciones de temperatura y humedad en la cámara húmeda utilizada para establecer el efecto de baja humedad sobre el porcentaje de germinación. En dicha cámara, la temperatura varió entre 21 y 30°C, mientras que la humedad varió entre 16 y 47%.

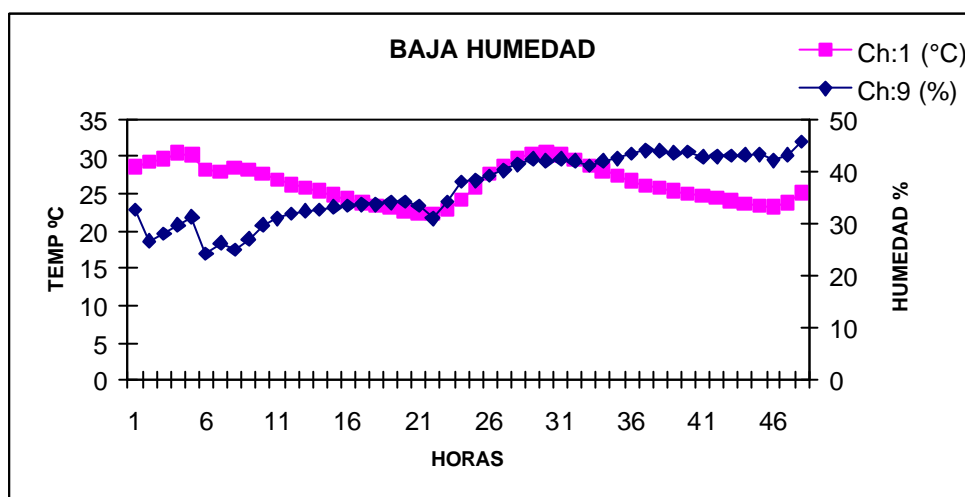


Figura 2. Porcentaje de humedad en cámaras húmedas para humedad baja (<60%).

La Figura 3 muestra las condiciones de temperatura y humedad en la cámara húmeda utilizada para establecer el efecto de alta humedad sobre el porcentaje de germinación de TK1 y GK7. Aquí puede observarse que la temperatura varió entre 22 y 27 °C, mientras que la humedad se mantuvo en un 100%.

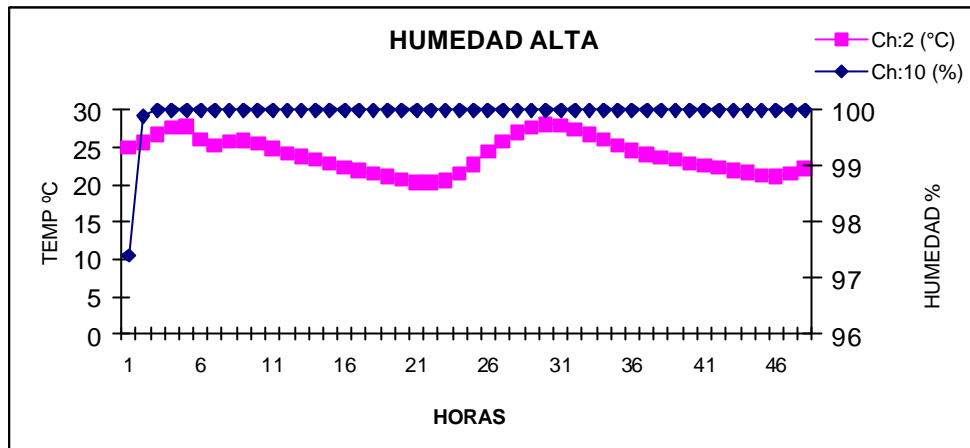
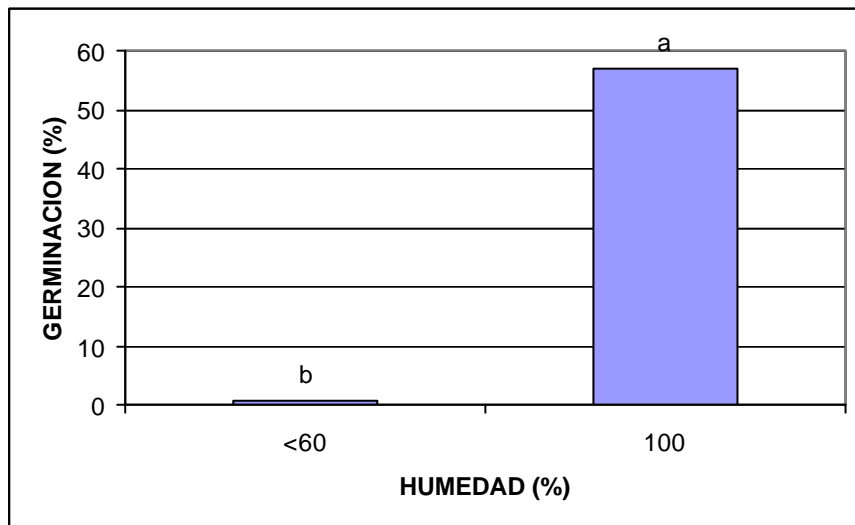


Figura 3. Porcentaje de humedad existente en cámaras húmedas para humedad alta (100%).

En la Figura 4 puede apreciarse que la germinación para GK7 varió entre 1% y 57%, siendo mayor en la cámara húmeda que se mantuvo en un 100% de humedad relativa. El análisis de variancia indicó diferencias altamente significativas para humedad ( $P < 0.0001$ ). En el caso de TK1 no se observó germinación de las esporas bajo ninguna de las dos condiciones de humedad utilizadas en el ensayo.



Medias con la misma letra no hay diferencia significativas ( $P < 0.05$ ).

Figura 4. Efecto de la humedad en la germinación de esporas de GK7

#### 4.3 Efecto de la temperatura sobre el poder germinativo de las esporas de los hongos antagonistas.

El análisis de la Figura 5 muestra diferencias de germinación cuando las esporas se mantuvieron a una temperatura de 36 °C durante 24 horas, ya que se produjeron los porcentajes de germinación más bajos

(26%). Asimismo, la permanencia de las esporas a 32 °C durante 24 horas, mostró una ligera disminución de la germinación en comparación con el resto de los tratamientos (89%), donde se alcanzaron valores de hasta un 99 % de germinación. En esa misma Figura se puede observar que a temperaturas de 28, 32 y 36 °C, por el tiempo de exposición de 1 y 5 horas, no afectaron el poder germinativo de las esporas.

Al realizar el análisis de la variancia para GK7 se encontró que existen diferencias altamente significativas para temperatura ( $P < 0.0001$ ), tiempo de exposición de las esporas ( $P < 0.0001$ ), además, interacción significativa temperatura-tiempo ( $P < 0.0001$ ).

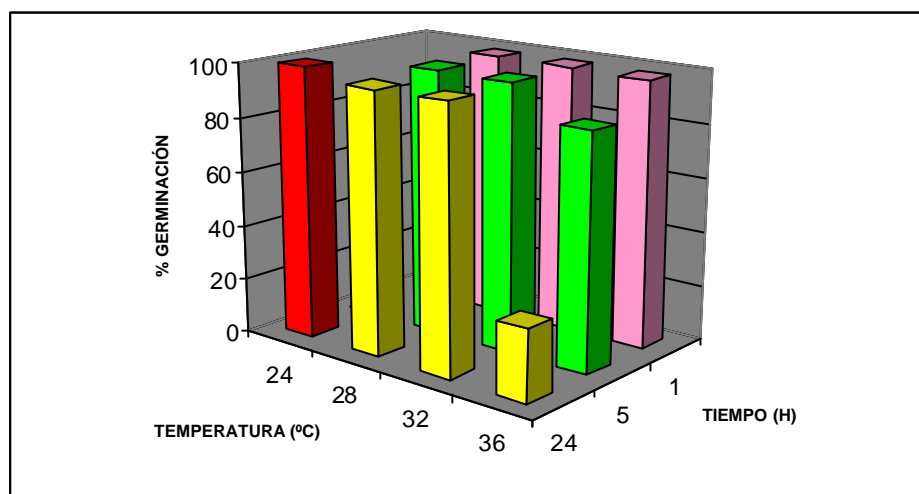


Figura 5. Efecto de la temperatura-tiempo de exposición en la germinación de esporas de GK7.

El análisis de la variancia para TK1 indicó diferencias significativas para temperatura ( $P = 0.0424$ ), ninguna significancia para tiempo de exposición ( $P = 0.6020$ ), y una respuesta significativa para la interacción temperatura-tiempo ( $P = 0.0020$ ).

La Figura 6 presenta el efecto de la interacción temperatura-horas de exposición sobre la germinación de esporas de TK1. Se observa que a 36°C y 24 horas de exposición el porcentaje de germinación disminuyó ligeramente (87%).

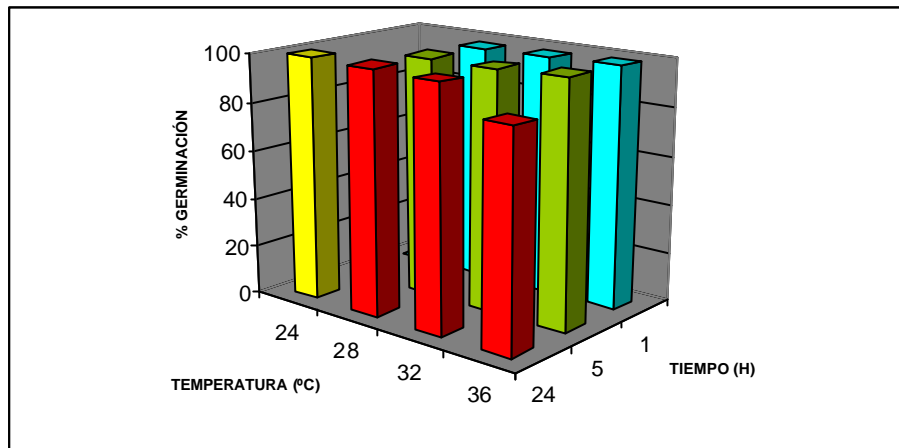
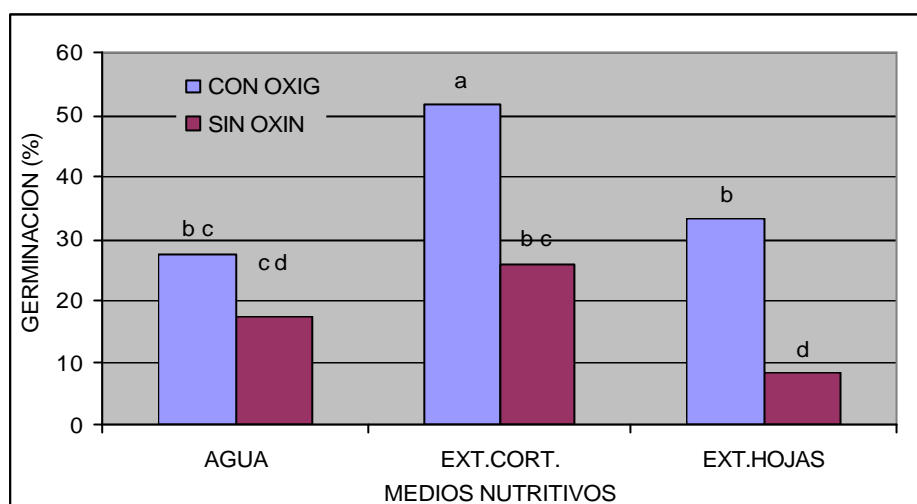


Figura 6. Efecto de la temperatura-tiempo de exposición en la germinación de TK1.

#### 4.4 Efecto de la oxigenación del medio nutritivo sobre la germinación de esporas de los hongos antagonistas.

El análisis de variancia para GK7 indicó que existen diferencias altamente significativas para la oxigenación ( $p < 0.0001$ ) y para medios nutritivos ( $P = 0.0001$ ) y significancia para interacción oxigenación-medio nutritivo ( $P = 0.0271$ ).

El porcentaje de germinación fue mayor en los medios con burbujeo (oxigenación), y disminuyó en ausencia de él en todos los medios nutritivos utilizados (Figura 7). El extracto de corteza con burbujeo (51%) se diferenció significativamente del resto de los tratamientos. El extracto de hojas tuvo un aumento del 25%, agua del 10% y extracto de hojas del 21% de germinación de esporas en presencia de burbujeo que con los tratamientos sin burbujeo.

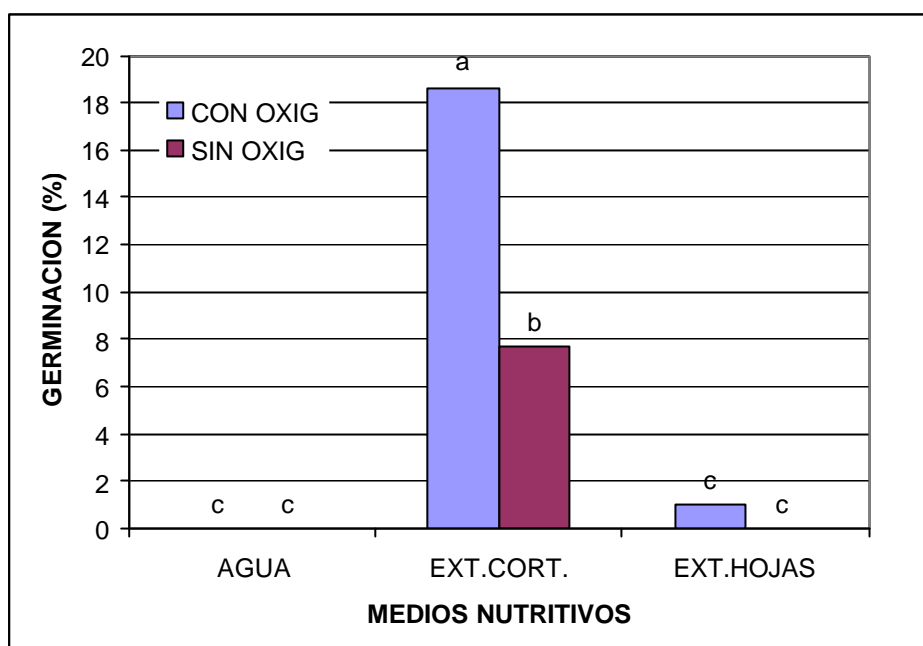


Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Figura 7. Efecto de medios nutritivos-burbujeo en la germinación de esporas de GK7

El análisis de variancia para TK1 encontró diferencias altamente significativas para medios nutritivos ( $P < 0.0001$ ), significativas para oxigenación ( $P = 0.0030$ ) e interacción significativa para medios nutritivos-burbujeo ( $P = 0.0100$ ).

La Figura 8 presenta la interacción medio nutritivo-burbujeo. Los medios nutritivos donde se presentó germinación de conidios fueron en extracto de corteza y extracto de hojas. El mayor porcentaje de germinación de esporas correspondió al tratamiento extracto de corteza (18%) en presencia burbujeo y disminuye en ausencia de él al 7.66%. Los tratamientos testigos (agua), independientemente de la presencia o ausencia de oxigenación del medio de cultivo, no mostraron germinación.



Medias con la misma letra no hay diferencia significativas ( $P < 0.05$ ).

Figura 8. Efecto de medios nutritivos-burbujeo en la germinación de esporas de TK7.

#### 4.5 Efecto de lavado de la mazorca sobre la germinación y crecimiento radial de los hongos antagonistas

Las pruebas realizadas para medir la germinación de las esporas en medio PDA/2 al cual se le adicionó el lavado de la mazorca no mostraron diferencias con respecto al medio sin lavado de la mazorca. En ambos casos la germinación de las esporas de GK7 fue mayor al 94%. Este resultado se hizo más evidente a través del análisis de variancia para medir el efecto del lavado de la mazorca para GK7, donde no se encontró ninguna significancia para germinación de esporas ( $P=0.0591$ ) ni para la tasa de crecimiento radial ( $P=0.6704$ ). En la Tabla 6 se presentan los valores promedios de germinación de esporas y la tasa de crecimiento radial (TCR) de GK7.

Tabla 6. Valores promedios de germinación (%) y TCR en GK7

MEDIO	GERMINACIÓN (%)	TCR (mm/día)
PDA/2	97.00	1.78
PDA/2+LAVADO	94.25	1.75

El análisis estadístico para TK1 no mostró diferencias significativas para porcentaje de germinación de esporas ( $P=0.3906$ ), ni para el crecimiento radial diario de este hongo ( $P=0.2782$ ). Los valores promedios de la germinación de esporas y de TCR se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Valores promedios de germinación (%) y TCR en TK1

MEDIO	GERMINACION (%)	TCR (mm/día)
PDA/2 + LAVADO	98.75	10.00
PDA/2	98.25	9.81

#### 4.6 Efecto del lavado de las mazorcas sobre el crecimiento de hongos epifíticos y bacterias epifíticas

##### 4.6.1 Evaluación del efecto del lavado de las mazorcas sobre el crecimiento de hongos epifíticos

El lavado de los frutos permitió la selección e identificación de gran cantidad de hongos. No obstante la forma y el color de la colonia, así como la forma de las estructuras fructíferas permitieron una mejor selección de las mismas. Entre los hongos identificados se encontraron:

*Trichoderma* sp.

*Clonostachys* sp.

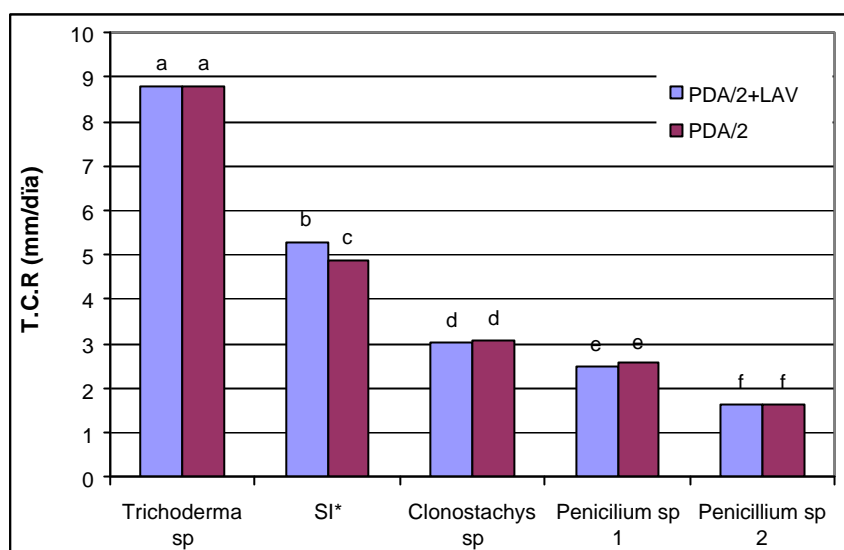
*Penicillium* sp. 1

*Penicillium* sp. 2

SI (Sin Identificar)

Al realizar el análisis de la variancia para la tasa de crecimiento radial (mm/día) de hongos epifíticos se observa que existen diferencias altamente significativas entre colonias de hongos ( $P < 0.0001$ ), ninguna diferencia para el lavado de mazorca ( $P = 0.2362$ ), pero significancia para la interacción colonias de hongos epifíticos-lavado ( $P = 0.0200$ ).

La Figura 9 presenta la prueba de medias de Duncan para la tasa del crecimiento radial de los hongos epifíticos con presencia y ausencia de lavado de mazorca.



Medias con la misma letra no hay diferencia significativas ( $p < 0.05$ ).

Figura 9. Tasa de crecimiento radial de hongos epifíticos (mm/día).

No se observaron diferencias en la TCR por la presencia o ausencia de lavado de mazorcas en *Trichoderma* sp., *Clonostachys* sp., *Penicillium* sp. 1 y *Penicillium* sp. 2. Solamente SI tuvo mayor crecimiento radial (5.30 mm/día) con lavado que en ausencia de él (4.89 mm/día). *Trichoderma* sp. presentó la mayor tasa de crecimiento radial con el 8.80 mm/día, seguido por SI con una TCR de 5.1 mm/día. *Penicillium* sp. 2 es la colonia de más lento crecimiento radial con un 1.63 mm/día. Por lo tanto, la diferencia en la TCR de los hongos epifíticos se debe principalmente al comportamiento del hongo y no a la presencia del lavado de mazorca.

4.6.2 Evaluación del efecto del lavado de las mazorcas sobre el número de colonias de bacterias epifíticas.

La Tabla 8 muestra los métodos utilizados para la identificación y selección de cinco colonias de bacterias epifíticas para el presente estudio.



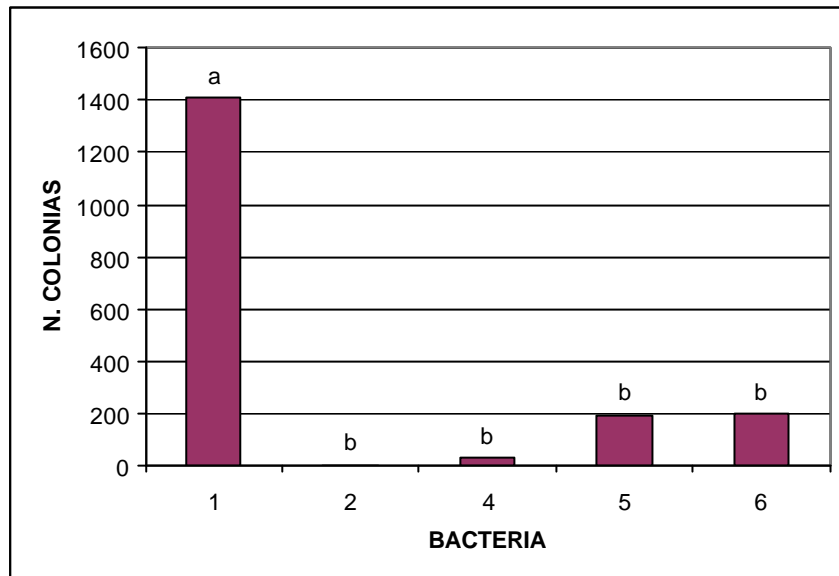
Tabla 8. Métodos utilizados para la identificación y selección de colonias de bacterias.

COLONIA	COLOR*	FORMA DE COLONIA	TINCION GRAM	RECCION KOH	FORMA BACT	CATALASA	MOVILIDAD
1	8/2, 10YR, blanco	Irregular	+	-	Ovalada	-	-
2	8/8, 2.5Y, Amarillo	Circular, bordes irregular	+	-	Ovalada	+	+
3	8/2, 10YR, blanco	Circular, bordes irregular	-	+	Cocos	+	-
4	8/2, 10YR, blanco	Circular y plano	-	+	Cocos	+	-
5	7/8, 2.5Y, Amarillo	Irregular ligeramente levantado	-	+	Cocos	+	+
6	8/6, 5Y, amarillo	Irregular ligeramente levantado	+	-	Cocos	+	-
7	Transparente	Irregular y plano	-	+	Ovalado	-	+

\*Tabla MUNSELL, Soil color chart.

El análisis de la variancia para número de colonias de bacterias epifíticas indicó diferencias altamente significativas ( $P < 0.0001$ ). No obstante no mostró significancia para la presencia del lavado de mazorca en el medio nutritivo ( $P = 0.771$ ) ni para la interacción hongos-lavado ( $P = 0.307$ ).

En la Figura 10 se puede observar que la colonia 1 presentó el mayor número de colonias (1410), y se diferenció de las colonias 2 (1.67), 4 (27), 5 (195) y 6 (197). No existen diferencias entre las colonias 2, 4, 5 y 6.



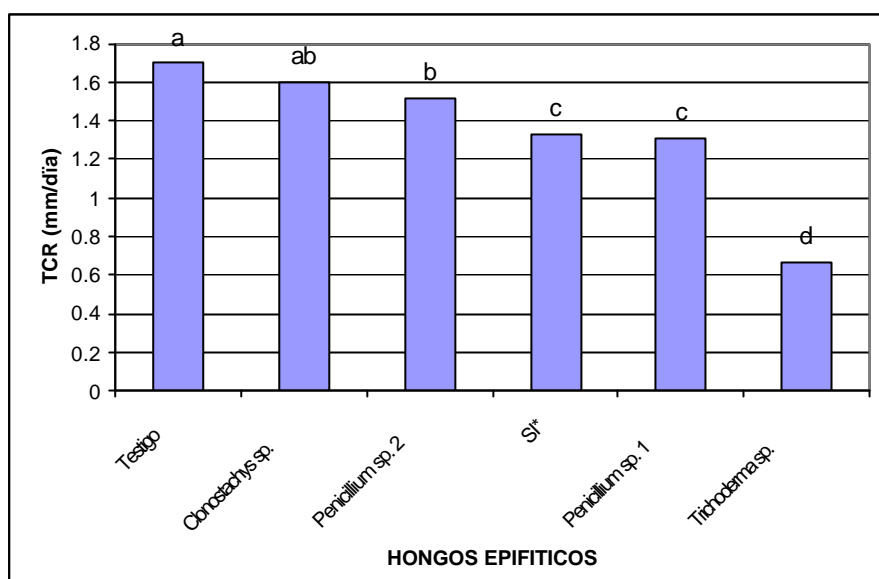
Medias con la misma letra no hay diferencia significativas ( $P < 0.05$ ).

Figura 10. Número de colonias de bacterias por caja petri

#### 4.7 Evaluación de la interacción de hongos y bacterias epifíticas con el lavado de la mazorca en el crecimiento de los hongos antagonistas.

4.7.1 Evaluación de la interacción de hongos epifíticos con el lavado de la mazorca en el crecimiento de los hongos antagonistas.

Al realizar el análisis de la variancia para GK7 se encontró que existen diferencias altamente significativas para hongos epifíticos ( $P < 0.0001$ ), ninguna significación para presencia de lavado de mazorca en el medio nutritivo ( $P = 0.7850$ ), ni para la interacción hongo epifítico-lavado ( $P = 0.5710$ ).



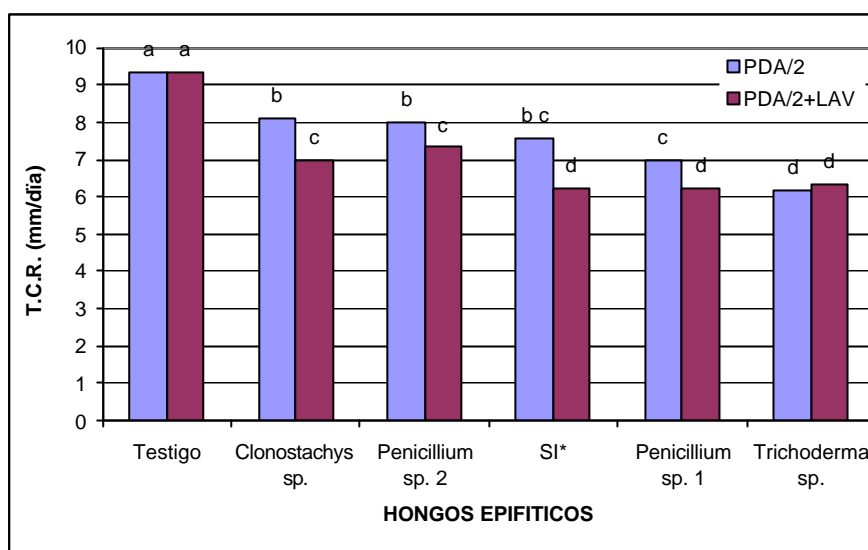
Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Figura 11. Efecto de hongos epifiticos en la tasa de crecimiento radial de GK7.

La Figura 11 presenta la prueba de medias de Duncan. Se observa que la mayor tasa de crecimiento radial corresponde al testigo (GK7) con un incremento de 1.70 mm/día, mientras que en presencia de hongos epifiticos la tasa de crecimiento disminuye, presentándose el menor crecimiento en presencia de *Trichoderma* sp. (0.67 mm/día), seguido por *Penicillium* sp. 1 (1.31 mm/día) y SI (1.33 mm/día), y menor influencia tuvo *Penicillium* sp. 2 (1.52 mm/día) y *Clonostachys* sp. Esta última no fue significativa para la disminución de la TCR (1.60 mm/día). El crecimiento radial de GK7 se vio afectado por todos los hongos antagonistas, excepto *Clonostachys* sp.

El análisis estadístico para TK1 mostró diferencias significativas para hongos epifiticos ( $P=0.0001$ ), presencia de lavado de mazorca en el medio de cultivo ( $P=0.0001$ ), y además, una interacción significativa para la interacción hongos epifiticos- lavado ( $P=0.0022$ ).

La Figura 12 indica la interacción hongos epifiticos-presencia de lavado sobre el crecimiento radial de TK1. El hongo antagonista independientemente de la presencia o ausencia de lavado de mazorca, mostró una tasa de crecimiento de 9.33 mm/día. Esta disminuyó en presencia de hongos epifiticos, principalmente con *Trichoderma* sp. (6.17 mm/día).



Medias con la misma letra no hay diferencia significativas ( $P < 0.05$ ).

Figura 12. Efecto de hongos epifiticos en la tasa de crecimiento radial de TK1

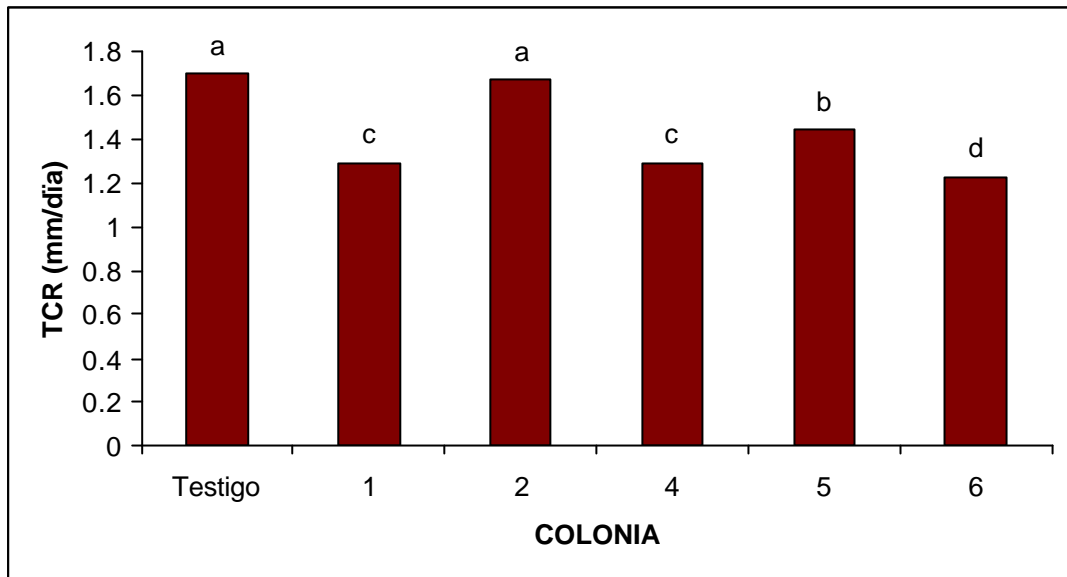
*Trichoderma* sp., *Clonostachys* sp., SI, *Penicillium* sp. 1., y *Penicillium* sp. 2. inhibieron el desarrollo de TK1. El efecto fue mayor en medios con presencia de lavado de mazorca que en los medios sin lavado.

*Trichoderma* sp., *Clonostachys* sp. y SI, son los hongos con mayor efecto sobre el desarrollo de TK1. *Trichoderma* sp. con lavado y sin lavado presentó el mismo efecto sobre el desarrollo de TK1.

4.7.2 Evaluación de la interacción bacterias epifíticas con el lavado de la mazorca en el crecimiento de los hongos antagonistas.

Al realizar el análisis de la variancia para GK7 se encontró que existen diferencias altamente significativas para colonias de bacterias ( $P < 0.0001$ ), ninguna significación para presencia de lavado de mazorca ( $P = 0.6800$ ), y no se observó interacción entre colonias de bacterias-lavado de mazorca ( $P = 0.2800$ ).

La prueba de medias de Duncan para el crecimiento radial se presenta en la Figura 13, en el que se puede observar que el testigo (GK7) tiene la tasa de crecimiento más alto con 1.70 mm/día. La colonia 2 no tuvo ninguna influencia sobre la TCR de GK7 (1.62 mm/día). La colonia 6 (1.23 mm/día) tuvo el mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de GK7, seguida por colonias 1 y 4 (ambas 1.29 mm/día) y colonia 5 (1.49 mm/día).

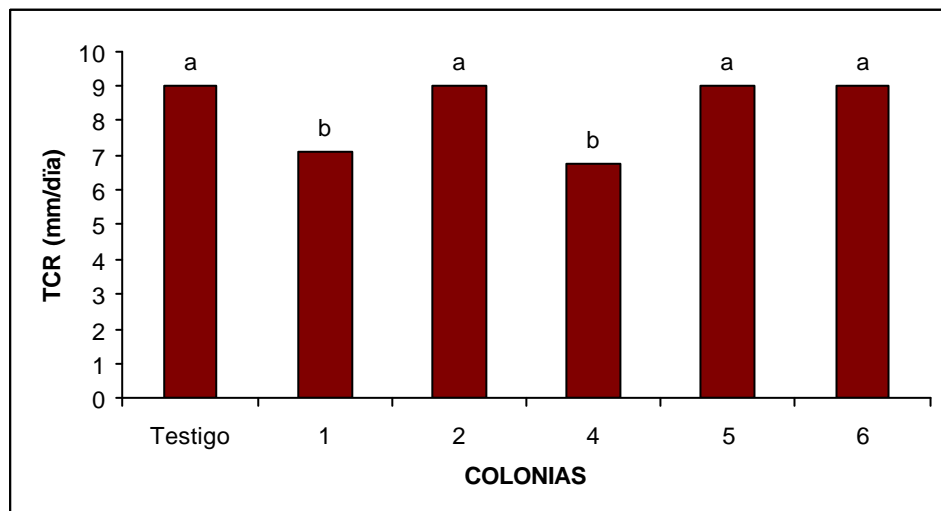


Medias con la misma letra no hay diferencia significativas ( $P < 0.05$ ).

Figura 13. Efecto de colonias de bacterias en TCR. (mm/día) de GK7

El análisis de variancia para TK1 indica que existen diferencias altamente significativas para colonias de bacterias ( $P < 0.0001$ ), ninguna significancia para presencia de lavado de mazorca en el medio nutritivo ( $P = 0.44$ ) ni interacción entre colonias de bacterias-lavado de mazorca ( $P = 0.38$ ).

En la Figura 14 se muestra la prueba de medias de Duncan para el crecimiento radial de TK1. Las colonias de bacterias 2, 5 y 6 no inhibieron el crecimiento de TK1. En cambio, las colonias 1 y 4 disminuyeron el crecimiento de este hongo antagonista.



Medias con la misma letra no hay diferencia significativas ( $P < 0.05$ ).

Figura 14. Efecto de colonias de bacterias en la TCR. (mm/día) de TK1

#### 4.8 Evaluación del efecto de los hongos antagonistas con diferentes soluciones nutritivas sobre el control de monilia.

Por la razón de que durante el tiempo que duró el ensayo no se formaron frutos, los resultados se presentan únicamente en relación con botones florales.

Los tratamientos seleccionados fueron agua, extracto de corteza y extracto de hojas. Esta selección se realizó por que estos medios de cultivo presentaron valores más altos de germinación de esporas (Tabla 5).

La prueba de  $\chi^2$  presentó diferencias significativas ( $P=0.0210$ ) para medios nutritivos en la presencia de cojines florales activos e inactivos, y ninguna significación para el número de flores por cojín floral para los mismos tratamientos ( $P=0.1900$ ).

Todos los tratamientos aumentaron el porcentaje de cojines activos comparado con el testigo (Figura 15). El tratamiento GK7 + agua presentó el mayor porcentaje de cojines florales activos (90%), seguido de los tratamientos TK1 + extracto de corteza (87%) y GK7+ extracto de corteza (87%) de cojines activos. El tratamiento testigo (agua) tuvo el más bajo porcentaje de cojines activos (70%).

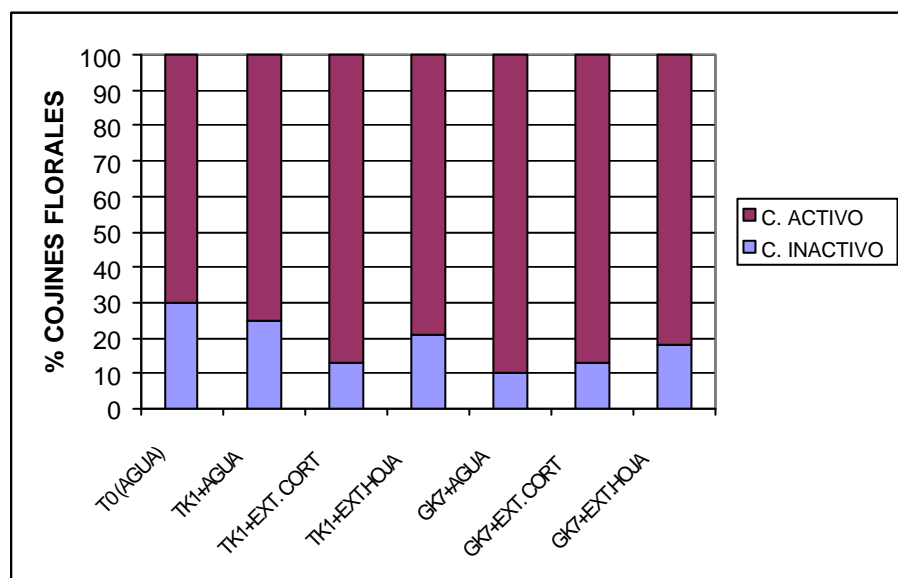


Figura 15. Efecto de hongos antagonistas con medios nutritivos en el porcentaje de cojines activos en cacao

#### 4.9 Evaluación de la persistencia en el campo de los hongos antagonistas

En la Figura 16 se presenta la precipitación acumulada y radiación solar durante el ensayo de persistencia. El ensayo se inició el 30 de abril y terminó el 11 de junio.

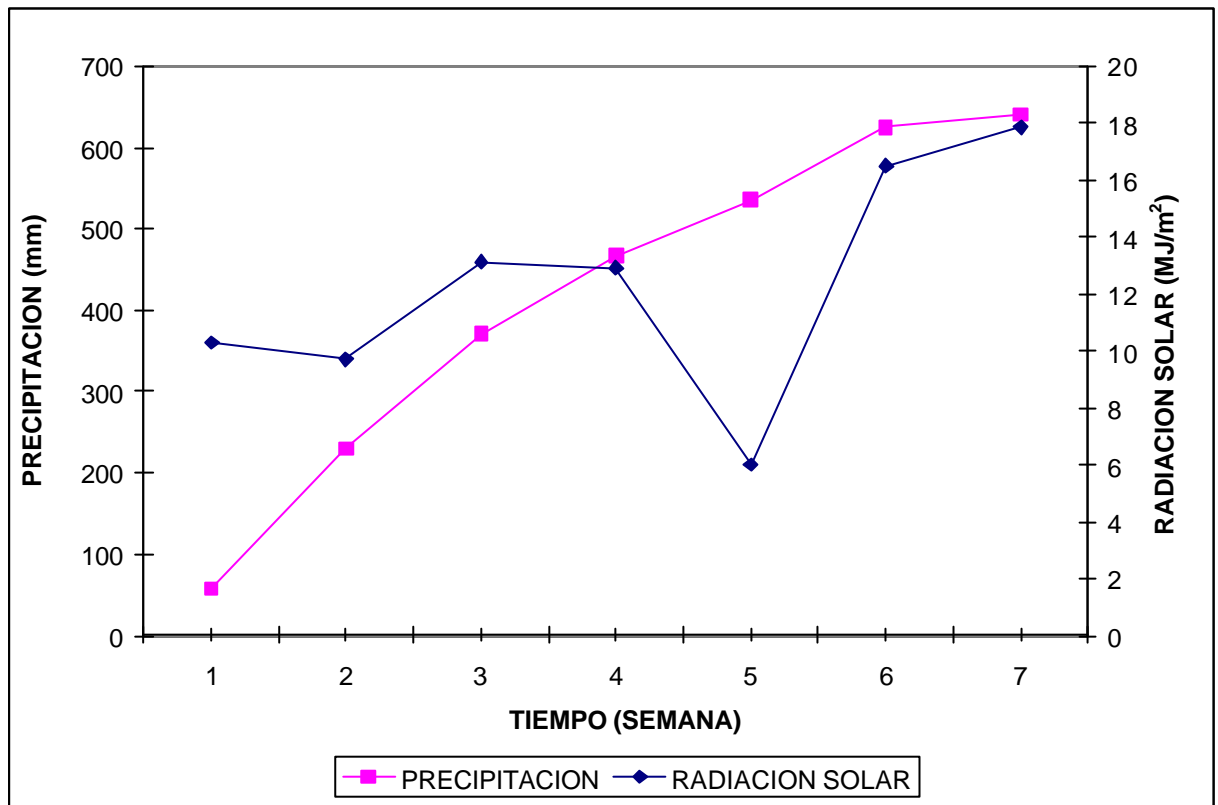


Figura 16. Precipitación durante el ensayo de persistencia de hongos antagonistas. Ver Anexo 3 para promedios de largo plazo

El análisis de la persistencia en el campo de los hongos antagonistas aplicados a frutos de cacao permitió determinar que posterior a dos semanas de su aplicación, no habían conidios viables de GK7 sobre el fruto para ninguno de los medios de cultivo utilizado, lo que demuestra una baja persistencia, si se toma en consideración que las evaluaciones se efectuaron durante 35 días (Figuras 17 y 21). Aquí es importante tomar en consideración que, durante la época del estudio, hubo un aumento de precipitación en el área de estudio, que pudo provocar el lavado de los tratamientos. Por otro lado, este bajo nivel de persistencia también puede estar relacionado con el hecho de que una vez depositada la suspensión de esporas sobre el fruto, las mismas se deslizaran sobre su superficie cerosa, ubicándose en las regiones apicales del mismo; o bien, que hubieran esporas al momento de la colecta, pero que las mismas hubieran perdido su viabilidad, razón por la cual no respondieron al medio de cultivo.

El análisis de la variancia para GK7 presentó diferencias significativas para inoculación comparada con el control ( $P= 0.028$ ), pero no existieron diferencias entre medios nutritivos.

Los medios nutritivos tuvieron el mismo comportamiento a través del tiempo (Figura 17), iniciándose con una presencia de GK7 de alrededor del 80% de colonización, hasta llegar a la segunda semana con el 0% de permanencia.

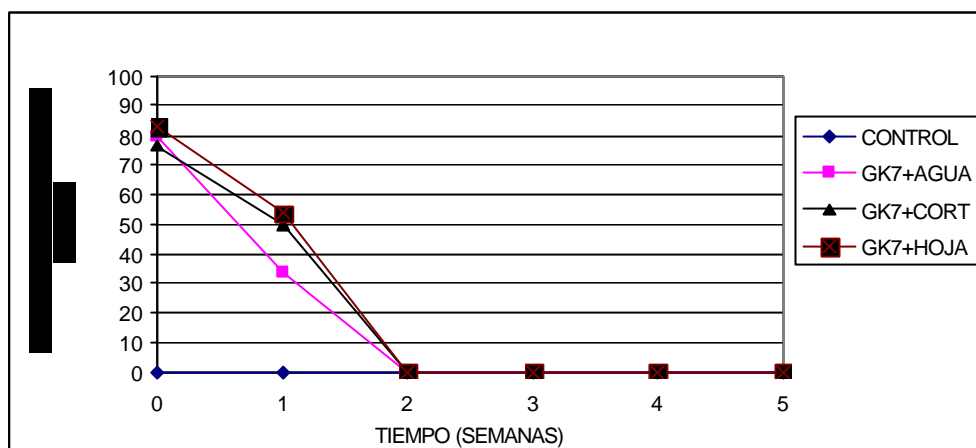


Figura 17. Persistencia de GK7 en mazorcas de cacao en diferentes medios nutritivos

En cambio, la presencia de *Clonostachys* spp. sobre las mazorcas de cacao aumentó con el tiempo, hasta llegar al 100% de recolonización a la tercera semana después de la aplicación del antagonista (Figura 18). La presencia de *Fusarium* spp. (Figura 19) y de otros hongos (Figura 20) mostró una tendencia diferente; aumentaron la colonización de la mazorca hasta la primera semana y luego disminuyeron, independientemente del tratamiento aplicado.

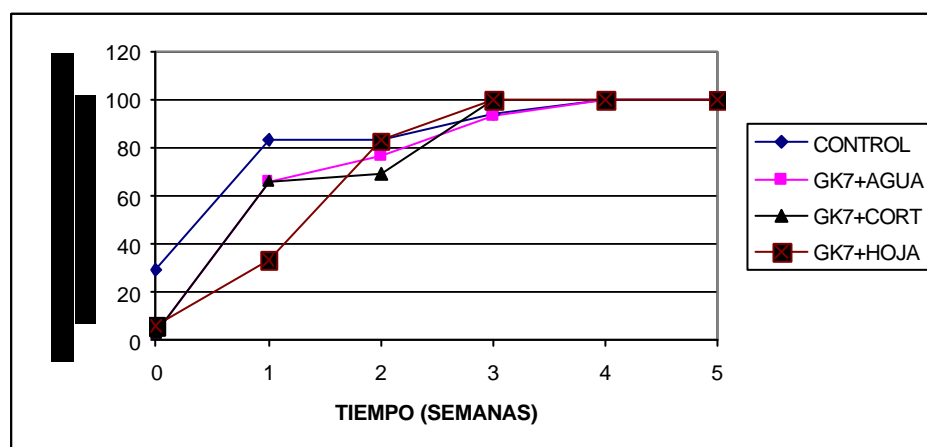


Figura 18. Colonización de *Clonostachys* spp. sobre mazorcas de cacao tratadas con GK7



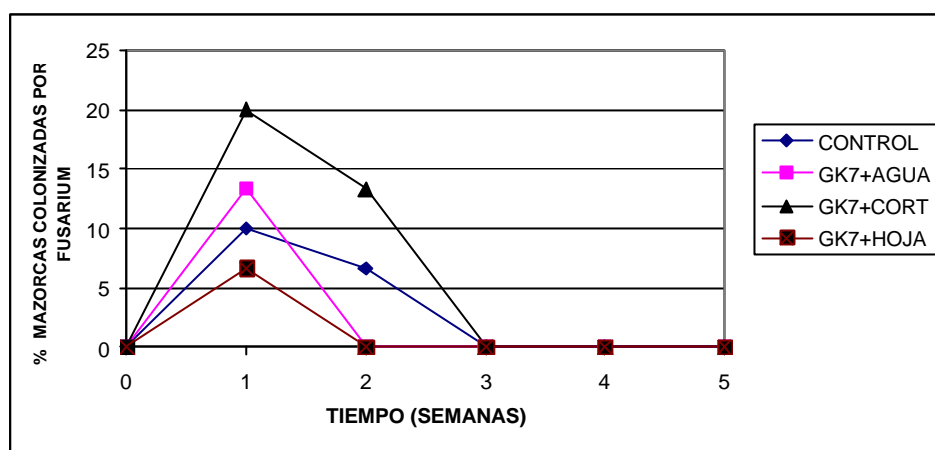


Figura 19. Colonización de *Fusarium* spp. sobre mazorcas de cacao tratadas con GK7

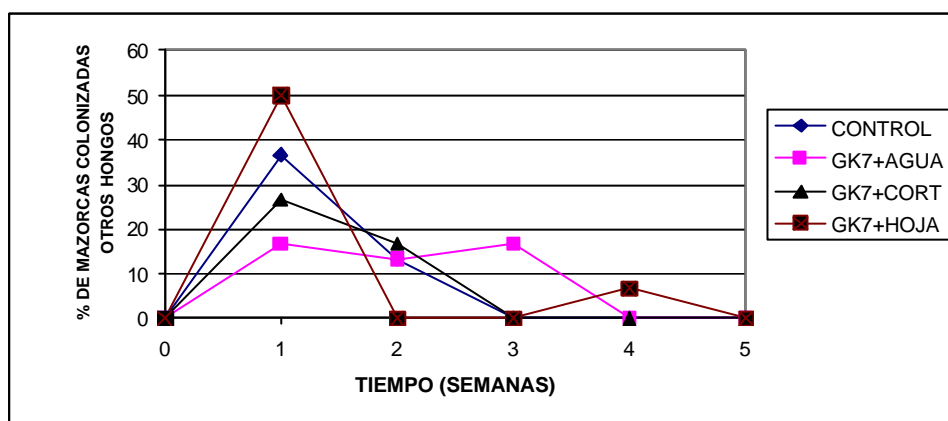


Figura 20. Colonización de otros hongos epifíticos sobre mazorcas de cacao

El análisis de la variancia para TK1 indicó que existen diferencias significativas para inoculación comparada con el control ( $P= 0.0020$ ). No se presentó diferencias entre medios nutritivos. En la Figura 21 se observa que el comportamiento de TK1 en los distintos medios nutritivos utilizados es similar, disminuyendo su presencia a las tres semanas de su aplicación. La precipitación acumulada desde el 30 de abril al 11 de junio de 2004 fue de 475 mm (Figura 16).

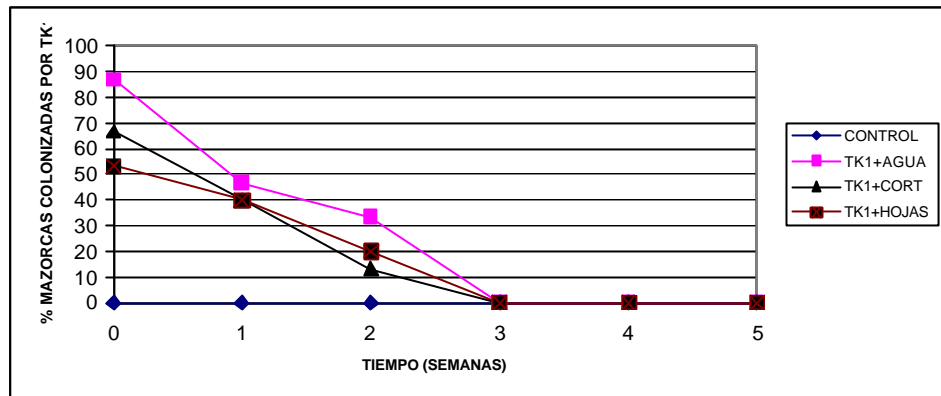


Figura 21. Persistencia de TK1 en mazorcas de cacao en diferentes medios nutritivos

La presencia de *Clonostachys* spp. sobre la mazorca aumentó con el tiempo hasta llegar al 100% de colonización de las mazorcas a la tercera semana (Figura 22). *Fusarium* spp. (Figura 23) y otros hongos epifíticos (Figura 24) tuvieron la misma tendencia, como en el ensayo con GK7: aumentaron hasta la segunda semana y luego disminuyeron su presencia, independientemente del tratamiento utilizado. En este experimento se evidenció que *Clonostachys* spp., normalmente, son los hongos más agresivos ya que fueron los únicos que reemplazaron los demás. Cabe destacar que no se detectaron en ningún momento *Trichoderma* spp., y además, TK1 desapareció en tres semanas.

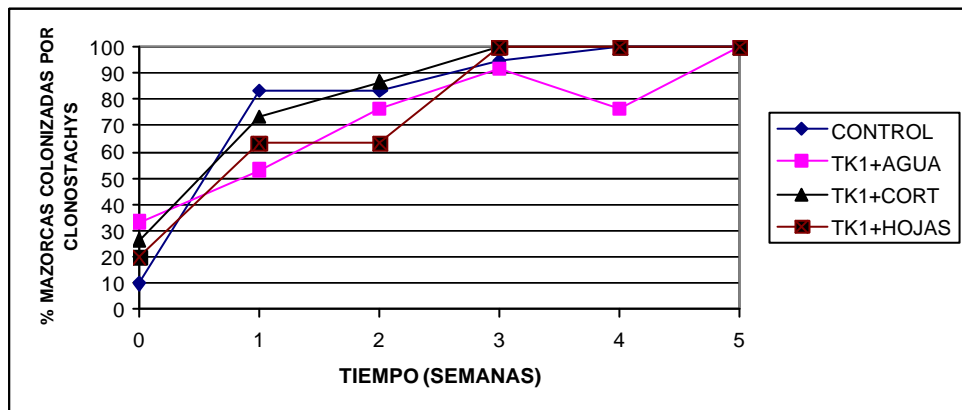


Figura 22. Colonización de *Clonostachys* spp. sobre mazorcas de cacao tratadas con TK1

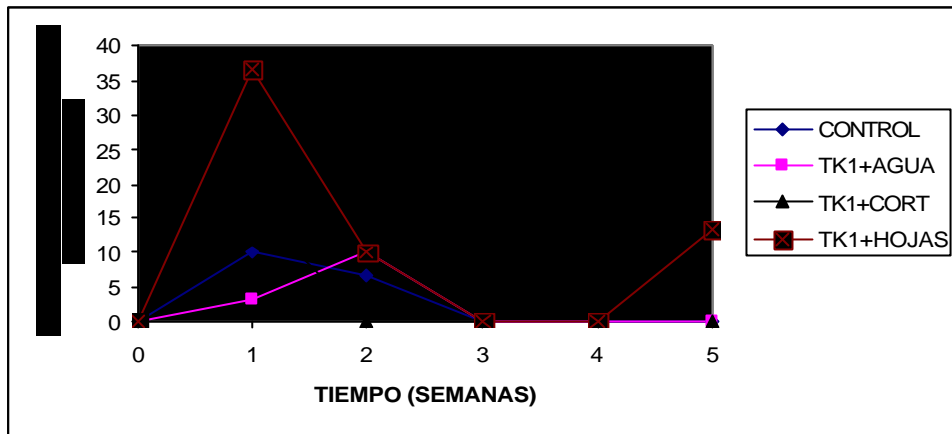


Figura 23. Colonización de *Fusarium* spp. sobre mazorcas de cacao tratadas con TK1

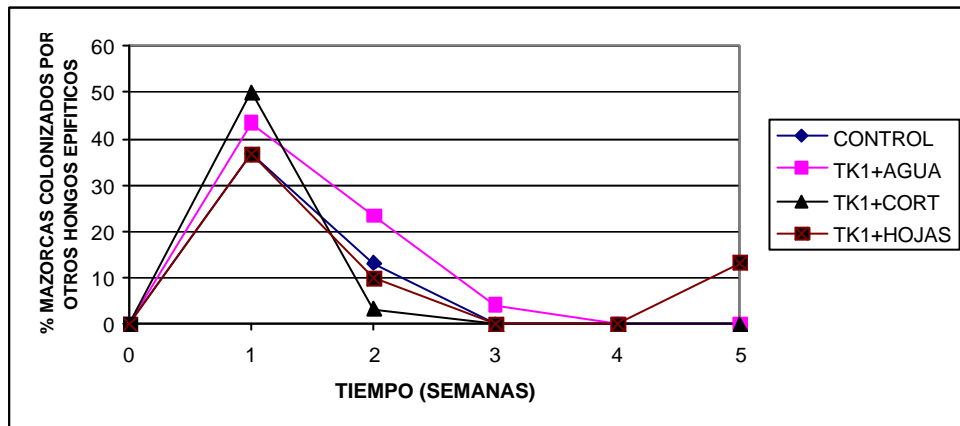


Figura 24. Recolonización otros hongos sobre mazorcas de cacao tratadas con TK1

#### 4.10 Estudio del hábito de crecimiento de TK1 y GK7

Los tratamientos utilizados en este ensayo fueron: GK7+Agua, GK7+ Extracto de corteza, TK1+ Agua y TK1+ Extracto de corteza.

La inoculación de los antagonistas provenientes de colonias de 20-25 días, sobre los botones florales no permitió observar esporas germinadas en ninguno de los tres períodos de evaluación. En ambos antagonistas, GK7 y TK1, las esporas permanecieron sobre los botones florales o flores abiertas, sin embargo el porcentaje de germinación en todos los casos fue de cero, posiblemente relacionado con las condiciones climáticas durante el muestreo, o bien, a la edad de las esporas utilizadas para dicho experimento (colonias de 20-25 días). Aún así, las esporas permanecieron sobre los botones florales

hasta 15 días después de su aplicación, fecha en que se notó un marcado deterioro de las mismas. Este deterioro se dio por deshidratación y ruptura de sus paredes celulares.

Resultados obtenidos posteriormente en laboratorio permitieron observar que la suspensión de conidios de GK7, preparadas de colonias de 45 días de edad, mostraron antes de su aplicación al botón floral, un 60% de esporas germinadas. La suspensión de esporas tenía treinta minutos de haber sido preparada. El muestreo realizado 24 horas después de su aplicación en laboratorio, al botón floral, reflejó un 97% de germinación para los tratamientos GK7 + agua y GK7 + extracto de corteza. No se observó germinación de esporas de TK1 en ninguno de los tratamientos en estudio.

No se observó penetración del tubo germinativo de las esporas de GK7 a través de los estomas o por penetración directa de sus tejidos epidermales. Asimismo, debido a que sobre la epidermis de las flores se encontraron esporas germinadas provenientes de hongos diferentes, no se realizaron los cortes histológicos ya que en caso de encontrarse micelio en los tejidos internos, no había seguridad sobre su procedencia.

## 5. DISCUSIÓN

La humedad ambiental es considerada uno de los factores limitantes en el crecimiento y la germinación de esporas de hongos, por el incremento del gasto de energía de la osmoregulación bajo condiciones secas o por disminución del oxígeno disponible en hábitats húmedos (Harman y Kubicek 1998). Un mayor efecto de la humedad se observó sobre la germinación de esporas de GK7, ya que a alta humedad relativa (HR=100%) se presentó un 57% de germinación, pero a baja humedad (HR<75%) ésta fue del 1%. Resultados similares han sido encontrados en *Fusarium* por Beyer y colaboradores (2004) quienes indicaron que los conidios de *Fusarium* spp. germinaron a alta humedad (HR=100%) en un medio rico en nutrientes (sucrosa 5 g l<sup>-1</sup>), y la germinación fue suprimida a HR<53%. TK1, por su parte, no presentó germinación en ninguno de los dos niveles de humedad (germinación=0%), lo que imposibilitó medir el efecto de la misma sobre la germinación. Es importante destacar que para el caso de TK1, la presencia de extractos de corteza o de hoja al parecer juegan un papel importante sobre la germinación, razón por la cual en este ensayo, al depositarse las esporas de TK1 y GK7 sobre los frutos, en presencia únicamente de agua, pudo provocar que no hubiera germinación en TK1. De acuerdo con Elad y Kirshner (1993), la germinación de conidios de *Trichoderma* es sensible a la humedad ya que debe tomarse en consideración que esta especie de hongo es más efectiva colonizando hábitats con alto contenido de humedad, por lo que es de esperarse que en ambientes de alta humedad y sobre sustratos nutritivos adecuados, la germinación de TK1 aumente.

La mayoría de esporas de los hongos resisten rangos bastantes amplios de temperatura; sin embargo, las esporas requieren temperaturas adecuadas para poder germinar (Agrios 1983). Para GK7 se observó que el porcentaje de germinación después de un rango de temperaturas de 24 a 32°C durante diferentes períodos de exposición alcanzó hasta el 99%, no obstante cuando las esporas fueron sometidas a una temperatura de 36°C durante 24 horas, la germinación se redujo a un 26%. Tan *et al.* (2002) indicaron que a temperaturas de 35°C la germinación de esporas de *Fusarium* se redujo notablemente, siendo el rango de 23-31°C el óptimo para su crecimiento y desarrollo.

Las diferentes temperaturas (24, 28, 32 y 36°C) y tiempos de exposición (1, 5 y 24 h), en medio nutritivo PDA/2 no afectaron la germinación de esporas de TK1 (Figura 6) ya que para todas ellas el porcentaje de germinación fue casi del 99%, con excepción de la temperatura de 36°C durante 24 horas, donde la germinación se redujo a un 87%. Esto demuestra nuevamente la necesidad de TK1 de un medio de cultivo adecuado que estimule su crecimiento y germinación de las esporas. Es importante anotar además que una exposición previa a una temperatura de 36°C también redujo el desarrollo del micelio de los hongos antagonistas.

Tomando en consideración que parte de los objetivos de nuestro trabajo fue ver la posibilidad de utilizar hongos antagonistas para el control de monilia, es importante resaltar que para la Estación experimental La Lola (propiedad del CATIE), en la cual el cultivo del cacao ocupa gran parte de su extensión, se dan condiciones adecuadas de humedad relativa (91%) y temperaturas (24.7°C) (Anexos 2 y 3), que podrían favorecer el establecimiento y desarrollo de dichos antagonistas, utilizables en un programa de biocontrol, pudiendo realizarse las aplicaciones en cualquier época del año, preferiblemente al atardecer por ser un ambiente más fresco y húmedo.

Los resultados encontrados durante la determinación de la actividad metabólica de esporas de TK1 y GK7, utilizando los platos Biolog y otros medios nutritivos, mostraron que GK7 fue capaz de utilizar todos los sustratos presentes en las placas ecoplate (Tabla 2) así como la mayoría de medios nutritivos preparados en el laboratorio (Tabla 3), situación que quedó reflejada en el color violeta que tomó el medio nutritivo debido a la reacción del tetrazolium durante la actividad metabólica del microorganismo (Biolog Ecoplate). Por el contrario, en TK1 no fue posible observar la utilización de estos sustratos. Es importante destacar que tal y como lo señala la casa comercial (BIOLOG s. f.), el tetrazolium (colorante) puede ser tóxico para muchas especies de hongos y posiblemente inhibió a TK1, razón por la cual deberían probarse otras condiciones o placas específicas basadas en la turbidez del medio nutritivo, tales como SF-N y SF-P (Preston-Mafham *et al.* 2002), que permitan mostrar la actividad metabólica de TK1. En el caso de *Trichoderma* spp. es bien conocido que por tener esporas pequeñas necesitan nutrientes exógenos para su desarrollo y pueden crecer bien en una gran variedad de compuestos de carbono como glucosa, fructosa, manosa, galactosa, xylosa, tehalosa y celobiosa (Danielson y Davey 1973a). No obstante los resultados obtenidos con TK1, no permitieron observar reacción a los medios utilizados.

Estos resultados fueron complementarios con la evaluación de la germinación de los dos antagonistas frente a los medios nutritivos evaluados. Nuevamente GK7 mostró buena reacción a todos los medios empleados ya en cada uno de ellos hubo estímulo para su germinación, condición que le confiere cierta ventaja al querer utilizarlo como biocontrolador. En el caso de TK1, la germinación únicamente fue posible durante el empleo de PDA/2, extracto de corteza y extracto de hoja. Es importante tomar en consideración que al provenir estos extractos de la especie arbórea que estos dos antagonistas utilizan para su desarrollo endofítico, puede suponerse que existe alguna sustancia en la planta que estimule su desarrollo y germinación.

En los resultados se pudo constatar que el extracto de corteza favoreció la germinación de esporas de GK7 y TK1. Además aquellos tratamientos con oxígeno presentaron mayor porcentaje de germinación que aquellos que carecieron de este elemento. Esto pone en evidencia nuevamente la disponibilidad de

algún nutriente en los extractos que favorece la germinación de ambos antagonistas. Pudo observarse también que aún en presencia de extracto de corteza o extracto de hoja, la ausencia de oxígeno en los medios nutritivos, disminuyó el porcentaje de germinación de esporas de GK7 a un 50%, y un 24% respectivamente en relación a los medios nutritivos con oxigenación. Para TK1 la disminución en extracto de corteza fue del 42% y en extracto de hojas de 14%. Al respecto puede mencionarse que *Trichoderma* spp. son hongos aeróbicos obligados, aunque varios aislados han sido obtenidos de hábitats con muy bajo oxígeno parcialmente presurado (Kubicek y Harman 1998). Esta disminución de la germinación en TK1 en medio con bajo contenido de oxígeno, puede deberse a que el dióxido de carbono, producto de la actividad metabólica, se acumula en el medio de crecimiento sólido inhibiendo su desarrollo, tal y como ha sido observado en varias especies de *Trichoderma* (Danielson y Davey 1973b). Otras especies de hongos han manifestado una inhibición de la germinación cuando son expuestos a condiciones anaeróbicas (Jeffries y Young 1994). El burbujeo de medios líquidos ayudaría en la producción masiva de TK1 y GK7, y a incentivar ligeramente la germinación de los conidios antes de ser aplicados en el campo, después el oxígeno no sería un factor limitante para la germinación, por que los conidios estarían en contacto directo con el aire.

Los nutrientes sobre partes aéreas de las plantas pueden provenir de exudados, residuos de polen, secreciones dulces de los áfidos, células muertas y biomasa microbial muerta. Los exudados se pueden mover a través de la cutícula y estomas (Cook y Baker 1983). Los materiales de los exudados incluyen además, nutrientes inorgánicos, orgánicos (azúcar, aminoácidos, sustancias promotora del crecimiento, vitaminas alcaloides y sustancias fenólicas) (Preece y Dickinson citado por Cook y Baker 1983). Dichos exudados envuelven mecanismos activos y pasivos, que pueden sostener actividad metabólica de microorganismos (Cook y Baker 1983), convirtiéndose en depósitos externos de nutrientes para microorganismos epifíticos.

No hubo relación entre los lavados del fruto y el crecimiento y germinación de los hongos antagonistas, lo que parece demostrar que las sustancias que se localizan sobre la superficie del fruto no ejercen efecto significativo sobre dichos hongos.

El lavado de los frutos permitió detectar también gran cantidad de hongos y bacterias epifitas, dentro de los que destacan *Clonostachys* sp., *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp. así como otros no identificados, información que concuerda con los datos obtenidos por Ten Hoopen *et al.* (2003) y Krauss y Soberanis (2001). De igual manera, se encontraron siete especies de bacterias que por motivo de tiempo no fueron identificadas a nivel de género y especie, sin embargo no hubo relación entre el número de colonias y la presencia de los lavados.

La prueba para desarrollo de GK7 y TK1 en presencia de bacterias epifíticas mostró una disminución del crecimiento de ambos hongos en presencia de las colonias identificadas como 1 y 4, por lo que se recomienda su identificación con el fin de dar una mejor explicación de los resultados. La inhibición de los antagonistas por bacterias fue independiente del lavado. Eso indica que las bacterias epifíticas no aprovechan significativamente esta fuente de nutrientes.

El análisis de los resultados para GK7 mostró una tendencia a reducir el crecimiento, en presencia de la mayoría de los hongos endofíticos encontrados. No obstante el mayor efecto inhibitorio lo tiene el género *Trichoderma*. Estos resultados fueron completamente independientes de la presencia o ausencia de lavados provenientes del fruto. Para el caso de TK1, se observó una clara inhibición por *Trichoderma* sp. sobre su desarrollo, independiente de lavado, mientras para los demás hongos epifíticos, se notó una mayor disminución del crecimiento de TK1 en presencia de los hongos epifíticos junto con el lavado del fruto. Parece que los hongos epifíticos, tal vez con excepción de *Trichoderma* sp., usan nutrientes del lavado por lo menos hasta cierto punto. Aunque no influyó la competencia con GK7, si afectó a TK1. Es importante tomar en cuenta que de acuerdo con Ko y Lockwood (1967), esporas pequeñas son más sensibles a la falta de nutrientes exógenos que esporas grandes que son nutricionalmente independientes. La forma y tamaño de los conidios de TK1 es ovalada de 3-4.5 x 2.4-3  $\mu\text{m}$  (Holmes *et al.* 2004, Watanabe 1994) y los macroconidios de *Cylindrocarpon* sp. de forma cilíndrica, septada, y de 6-6.5 x 58-71  $\mu\text{m}$  (Brayford *et al.* 2004). Esta diferencia en tamaño puede resultar que TK1 sea más susceptible a la competencia.

En medios con alto contenido de nutrientes (PDA/2 y AN/2) la presencia de lavado de mazorcas no afectó el crecimiento de los hongos antagonistas ni de los microorganismos epifíticos, en cambio, la presencia de lavado en medios con bajo contenido de nutrientes (PDA/10 y AN/10), se observó un mayor efecto inhibitorio en el crecimiento principalmente de TK1 en co-cultivo con hongos epifíticos, debido posiblemente, a que los nutrientes contenidos en el lavado son insignificantes comparados con PDA/2 y AN/2, pero similares con el valor nutritivo de PDA/10 y AN/10. Se recomienda repetir las pruebas de antagonismo por organismos epifíticos en la presencia o ausencia del lavado con medios muy pobres en nutrientes, como el agar agua.

Cabe mencionar que *Trichoderma* sp. esta biológicamente adaptada para ser un colonizador agresivo de fuentes nutritivas. Dicho organismo en presencia de medios nutritivos adecuados, coloniza el sustrato rápidamente, algunas veces empleando antibiosis o micoparasitismo contra sus competidores (Harman y Kubicek 1998). Esto queda reflejado en los resultados anteriores, sin embargo se sugieren más estudios que permitan demostrar este supuesto.



En ensayos de co-cultivo a nivel de laboratorio se observó que *Clonostachys* sp. limitó ligeramente el crecimiento de GK7 pero tuvo un mayor efecto inhibitorio sobre TK1. En cambio, en las pruebas de persistencia a nivel de campo se observó que *Clonostachys* sp. recolonizó rápidamente las mazorcas de cacao, mientras que la presencia de GK7 y de TK1 fue disminuyendo con el tiempo, debido a que *Clonostachys* sp. parasitó a *Trichoderma* sp. Piper *et al.* (2000).

En las pruebas de laboratorio se observó que los hongos epifíticos limitan el desarrollo de GK7 y TK1 ocupando espacios más rápidamente que las bacterias epifíticas, observándose la formación de un halo entre las dos colonias, posiblemente debido a antibiosis o a producción de sustancias tóxicas que impidió el crecimiento de los hongos antagonistas. Mientras en el laboratorio *Trichoderma* sp. fue el hongo epifítico más agresivo y *Clonostachys* sp. el menos agresivo, observamos lo contrario en el campo durante el ensayo de persistencia, donde *Clonostachys* spp. reemplazaron a *Trichoderma*. Esto indica que pruebas de antagonismo *in vitro* no necesariamente se ajustan bien a la realidad del campo. La competencia relativa de *Clonostachys* y *Trichoderma* merece más estudios.

La evaluación de los hongos antagonistas en diferentes soluciones nutritivas, sobre el control de monilia no se pudo realizar, debido a que durante el desarrollo del ensayo no hubo formación de mazorcas de cacao en los clones que se seleccionaron, razón por la cual se recomienda realizar esta misma prueba en otra época del año, básicamente por la razón de que los árboles seleccionados ya habían dado fruto con anterioridad. Otra manera de asegurar la presencia de frutos es realizar con anterioridad polinizaciones artificiales, técnica bien conocida en el CATIE. Sin embargo deberán tomarse precauciones para estar completamente seguro que el hongo que se desarrolla sobre el fruto (o el cojín floral) corresponda con el objeto de estudio.

Los ensayos tendientes, a medir la persistencia de los antagonistas sobre las mazorcas de cacao en Cabiria, mostraron una rápida disminución de ambos hongos, debido posiblemente a factores ambientales como: precipitación, radiación solar (Figura 16), humedad (Anexo 1), o competencia con otros microorganismos epifíticos. En este sentido, a pesar de que en el material proveniente del campo fue posible identificar TK1 y GK7, los análisis de laboratorio mostraron que conforme transcurrió el tiempo, no fue posible detectar la presencia de estos antagonistas a los 21 y 15 días después de su inoculación, respectivamente. También se encontró que conforme disminuyó la presencia de nuestros antagonistas, se incrementó la presencia de hongos epifíticos, como *Clonostachys* sp., *Fusarium* sp. y otros, en el medio precolonizado con *Phytophthora palmivora*. Esta tendencia concuerda con lo encontrado por ten Hoopen *et al.* (2003) quienes midieron la dinámica de la población de *Clonostachys* sp. y *Fusarium* sp. en las superficies de mazorcas de cacao.

En el ensayo de hábito de crecimiento, los resultados de este ensayo no permitieron establecer el crecimiento de los antagonistas en el campo, debido a que las esporas de TK7 y GK1 aplicadas sobre los cojines florales no germinaron durante las 72 horas de evaluación en campo y más bien, la persistencia de ellos sobre los cojines florales tuvo un marcado descenso.

De los datos obtenidos en el ensayo de persistencia, se infiere la necesidad de realizar aplicaciones de estos bio-controladores con una frecuencia de 15 días para TK1 y de 21 días para GK7, para asegurar la permanencia de estos antagonistas sobre los órganos aplicados, pero el número de aplicaciones dependerá de la eficiencia en el control de monilia así como de los costos de las aplicaciones. Además, se debe proteger el cultivo cuando produce mazorcas, que, para las condiciones de Costa Rica, coincide con la época lluviosa, Por lo tanto, es importante evaluar el efecto de adherentes sobre la permanencia de las esporas en el fruto o cojines florales.

De acuerdo a los resultados se estableció que el principal factor limitante para la germinación de conidios de TK1 son las fuentes de nutrientes debido a que solamente se observó un ligero incremento de la germinación en el extracto de corteza de cacao. Para GK7 los factores bióticos mostraron tener mayor efecto, ya que en presencia de microorganismos epifíticos como *Trichoderma* sp. y bacterias 1 y 4 se observó una disminución del crecimiento radial de este antagonista.

## 6. CONCLUSIONES

1. Los conidios de GK7 tienen la capacidad de germinar sobre mazorcas de cacao en presencia de alta humedad relativa, mientras que el efecto de la humedad no indujo germinación en conidios de TK1. La baja humedad relativa (< 75%) inhibió la germinación de conidios de GK7.
2. Temperaturas de 24-28 y 32 °C durante períodos de exposición de 1, 5 y 24 horas no afectaron negativamente el poder germinativo de los conidios de TK1 Y GK7, siendo éste de un 99% en ambos casos. Únicamente una temperatura de 36 °C durante 24 horas, redujo el poder germinativo de los conidios de TK1 a un 87%, y para GK7 al 27%.
3. Las condiciones ambientales de La Lola, con una temperatura promedio de 24.7°C y humedad relativa del 91% hacen que el medio sea óptimo para la germinación y desarrollo de estos hongos antagonistas.
4. El tetrazolium de violeta inhibió en desarrollo de TK1, debido posiblemente a que provocó un efecto tóxico sobre dicho antagonista, por lo que no se debe utilizar para este tipo de ensayos. Se recomienda utilizar otras pruebas que permitan detectar el uso de los nutrientes por parte de los hongos objeto de estudio.
5. TK1 presentó germinación de conidios en extracto de corteza y extracto de hojas de cacao, pero la germinación continuó siendo bajo.
6. GK7 es un hongo generalista en el uso de diferentes fuentes nutritivas.
7. La poca información disponible para TK1 en el uso de fuentes nutritivas hace que se presente como un factor limitante para la germinación de conidios del hongo antagonista.
8. El burbujeo en medios líquidos con extractos de corteza y de hoja indujo un ligero aumento en la germinación de conidios de GK7 y TK1.
9. *Trichoderma* sp. ejerce una fuerte competencia sobre los antagonistas evaluados en el laboratorio, especialmente sobre GK7, razón por la cual hay que determinar con mayor

exactitud, los requerimientos nutricionales que permitan a estos biocontroladores ser más efectivos al competir con hongos epifíticos.

10. En pruebas *in vitro* los hongos endofíticos afectaron en mayor grado el crecimiento de los hongos antagonistas. En cambio, la influencia de las bacterias sobre su desarrollo fue menor.
11. El lavado, en términos generales, no afectó el desarrollo de TK1, GK7 o las bacterias epifíticas. Solamente un hongo epifítico aprovechó el lavado. La interacción de GK7 con los organismos epifíticos fue independiente del lavado, mientras la inhibición de TK1 por hongos epifíticos fue aumentado por el lavado, excepto por *Trichoderma* sp.
12. En el ensayo de persistencia de los antagonistas sobre las mazorcas de cacao en el campo, se detectó la presencia de TK1 y GK7 hasta 15 y 21 días después de su aplicación respectivamente.
13. En pruebas de laboratorio en co-cultivo, *Trichoderma* sp. se presentó como el hongo epifítico más agresivo sobre TK1 y GK7, pero en condiciones de campo, *Clonostachys* spp. fueron los que más rápidamente recolonizaron las mazorcas de cacao, reemplazando a TK1 y GK7.

## 7. RECOMENDACIONES

1. Para medir la actividad metabólica de hongos no se debe utilizar como indicador el tetrazolium de violeta, sino pruebas basadas en la turbidez del medio nutritivo. Por este motivo se recomienda utilizar los microplate SF-N y SF-P para futuras investigaciones.
2. Realizar estudios sobre la composición de extracto de corteza y extracto hojas de cacao para conocer el compuesto o grupo de compuestos que incrementaron la germinación de esporas en TK1.
3. Identificar colonias de bacterias 1 y 4 que mayor efecto tuvieron sobre el crecimiento radial de GK7 y TK1.
4. Realizar estudios de mezclas de los extractos de corteza y hojas con otras fuentes nutritivas para mejorar aun más la germinación de los conidios de TK1.
5. Repetir ensayos de antagonismos por organismos epifíticos en presencia y ausencia de lavado de mazorca de cacao utilizando fuentes muy pobres en nutrientes.
6. Para probar la eficiencia de TK1 y GK7 como biocontroladores, realizar ensayos sobre cojines florales y mazorcas de cacao recién formadas.
7. Realizar investigaciones para determinar el número óptimo de aplicaciones de GK7 y TK1 para el control de monilia.
8. Realizar estudios sobre la utilización de adherentes en la aplicación de TK1 y GK7 para asegurar su presencia sobre los cojines florales y evitar su lavado debido a la precipitación.
9. Utilizar en cada uno de los nuevos ensayos, colonias GK7 de aproximadamente 45 días de crecimiento en laboratorio, para asegurar que una mayoría de conidios estén en un grado óptimo de madurez fisiológica.

## 8. LITERATURA CITADA

- Agrios, NG. 1998. Fitopatología. Departamento de Fitopatología, Universidad de Massachusetts. 2<sup>da</sup> ed. UTHEA, Noriega eds. Mexico, D.F. p. 62.
- Ampuero, CE 1967. Monilia pod rot of cocoa. Cocoa Growers' Bulletin 9:15-18.
- Andrews, K; Quezada, J. 1989. Manejo Integrado de Plagas Insectiles en la Agricultura: Estado Actual y Futuro. Tegucigalpa, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano. 623 p.
- Anon. 1832. El cacao. El Cultivador Cundinamarqués o Periódico de la Industria Agrícola y de la Economía Doméstica, no. 7, 1 de mayo de 1832.
- Baker, FK; Cook, JR. 1982. Biological Control of Plant Pathogens. St. Paul, MN. American Phytopathological Society. 433 p.
- Bandyoadhyay, S; Jash, S; Dutta, S. 2003. Effect of different pH and temperature levels on growth and sporulation of *Trichoderma*. Environment and Ecology 21(4):770-773.
- Barros, NO. 1977. Investigaciones sobre el hongo *Monilia rozeri*, Cif &Par., causante de la pudrición acuosa de la mazorca del cacao: sus daños y su control. Cacaotero Colombiano 3:42-52.
- Barros, NO. 1982. El control de la moniliasis en «Cacaoteras del Dique». Cacaotero Colombiano 15:31-44.
- Bastos, CN. 2001. Effect of temperature, pH and nutrition on growth and sporulation of *Trichoderma stromaticum* sp. nov., an antagonist of cocoa witches' broom pathogen. Summa Phytopathologica 27(1):73-76.
- Bélanger, R; Avis, T. 2002. Ecological processes and interactions occurring in leaf surface fungi. In Phyllosphere Microbiology. Cap. 13. The American Phytopathology Society. St. Paul, MN. p. 193-206.
- Beyer, M; Röding, S; Ludewig, A; Verreet, J. 2004. Germination and survival of *Fusarium graminearum* macroconidia as affected by environmental factors. Journal of Phytopathology 152(2):92-93.
- BIOLOG. 2001. Microlog System, Release 4.2 User Guide. Hayward, CA. 270 p.
- BIOLOG. s.f. Eco Plate. Microbial community analysis. En línea. Consultado el 15 de abril de 2004. Disponible en <http://www.biolog.com/pdf/GN2b%20Brochure.pdf>.

- Blakeman, J; Fokkema, N. 1982. Potential for biological control of plant diseases in the phylloplane. *Annual Review of Phytopathology* 20:167-192.
- Carroll, CG. 1990. Fungal endophytes in vascular plants: Mycological research opportunities in Japan. *Transoceanic Mycology Society* 31:103-116.
- CATIE. 2002. Modernización y competitividad de la cacaocultura latinoamericana. En línea. Consultado el 28 de enero de 2004. Disponible en: <http://www.catie.ac.cr>.
- CATIE. 2003. Datos meteorológicos. (En línea). Consultado el 14 de enero de 2004. Disponible en: <http://www.catie.ac.cr>.
- Compañía Nacional de Chocolates S.A. 1988. Manual para el Cultivo del Cacao. Colombia. 140 p.
- Cook, JR; Baker FK. 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 539 p.
- Danielson, R y Davey, B. 1973a. Carbon and nitrogen nutrition in *Trichoderma*. *Soil Biology and Biochemistry* 5:506-515.
- Danielson, R y Davey, B. 1973b. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 5:485-494.
- Elad, Y; Chet, I ; Boyle, P; Henis, Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*-scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* 73: 85-88.
- Elad, Y; Kirshner, B. 1993. Survival in the phylloplane of an introduced biocontrol agent (*Trichoderma harzianum*) and populations of the plant pathogen *Botrytis cinerea* as modified by abiotic conditions. *Phytoparasitica* 21:303-313.
- Enríquez, G. 1985. Curso Sobre el Cultivo de Cacao. Turrialba, Costa Rica, CATIE. p. 30-31. (CATIE. Serie Materiales de Enseñanza no. 22).
- Enriquez, G. 2004. Cacao orgánico: Guía para productores ecuatorianos. Quito, Ecuador, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. 360 p. (Manual no. 54).
- Enríquez, G; Suárez, C. 1978. Monilia disease of cacao in Costa Rica. *Turrialba* 28(5): 339-340.
- European Food Information Council (EUFIC). 2003. Un futuro sostenible para el cacao. Disponible en <http://www.eufic.org/sp/what/what.htm>.

- Evans, H; Holmes, K; Thomas, S; Arroyo, C. 2003. Field screening in Costa Rica of Ecuadorian mycoparasites of the cocoa frosty pod pathogen *Crinipellis (Moniliophthora) roreri*. In 14<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference, Proceedings. Accra, Ghana, 13-18 Oct. 2003.
- Flores, D; Galindo, J. 1998. Estudio de la germinación de conidios de *Moniliophthora roreri* en mazorcas de cacao. XXVIII Reunión Anual. Sociedad Americana de Fitopatología. Division Caribe. San Andrés, Colombia. 14-17 Septiembre. Resúmenes.
- French, E; Hebert, T. 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. San José, C.R., IICA. 289 p.
- Ghisalberti, E; Sivasithamparam, K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil Biology and Biochemistry 23:1011-1020.
- Hanson, P; Hilje, L. 1993. Control Biológico de Insectos, Turrialba, CR, CATIE. 40 p. (CATIE. Serie Técnica. Informe Técnico, no. 208).
- Harman, G; Kubicek, C. 1998b. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Volume 2: Enzymes, biological control and commercial applications. London, Taylor and Francis. 393 p.
- Holmes, A; Schroers, H; Thomas, S; Evans, H; Samuels, G. 2004. Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America (en línea). Mycological Progress 3(3): 199-210. Consultado el 4 de enero 2005. Disponible en <http://www.mycological-progress.com/1024/abstracts-03-03.html>
- Jeffries, P; Young, T. 1994. Interfungal Parasitic Relationships. Wallingford, UK, CAB INTERNATIONAL. 296 p.
- Jorgensen, H. 1970. Monilia pod rot in Ecuador. Cacao (Costa Rica) 15:4-13.
- Ko, W; Lockwood, J. 1967. Soil fungistasis: relation to fungal spore nutrition. Phytopathology 57:894-901.
- Krauss, U; Soberanis, W. 2001. Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. Biological Control 22: 149-158.
- Krauss, U; Soberanis, W. 2002. Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. Biological Control 22: 82-89.



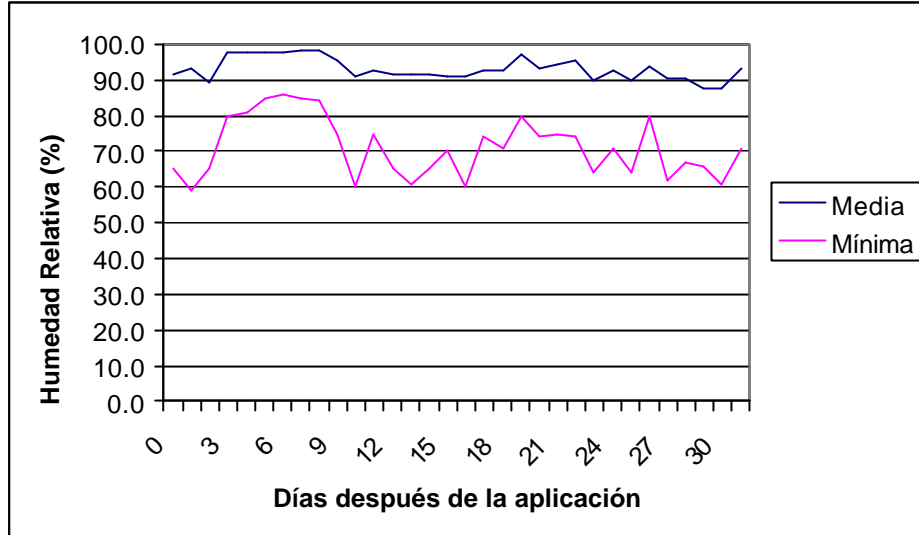
- Krauss, U; ten Hoopen, M; Hidalgo, E; Martínez, A; Arroyo, C; García, J; Portuguéz, A; Palacios, M. 2003. Biocontrol of moniliasis (*Moniliophthora roreri*) and black pod (*Phytophthora* spp.) in Panama with mycoparasites in two formulations. In 4<sup>th</sup> INCOPEP Seminar. Proceedings. Accra, Ghana, 19-22 Oct.2003. p.53-58. CACAO, P. irr.
- Kubicek, C; Harman, G. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics. London, Taylor and Francis. 277 p.
- López, G; Enríquez, V. 1980. Presencia de *Monilia roreri* Cif et Par. en el cacao, *Theobroma cacao* L. en la frontera de Costa Rica-Nicaragua. Managua, Nicaragua: Ministerio de Desarrollo Agropecuario, Laboratorio de Fitopatología. 150 p.
- López, P; Delgado, V; Aspeitia, A; López, J. 1996. Manual de Producción del Cultivo de Cacao en Tabasco: Rehabilitación y Renovación. Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias "Campo Experimental Huimanguillo". Folleto Técnico. p. 17–21.
- Monga, D. 2001. Effect of carbon and nitrogen sources on spores germination, biomass production and antifungal metabolites by species of *Trichoderma* and *Gliocladium*. Indian Phytopathology 54(4):435-437.
- Orellana, RG. 1956. La moniliasis y otras enfermedades del cacao en el este de Panamá. Boletín Fitosanitario de la FAO 4:168-169.
- Organización Internacional del Cacao. 2003. Producción mundial del cacao. Proyecto MAG/SICA – Ecuador. Consultado el 1 de febrero de 2004. Disponible en: <http://www.sica.gov.ec>.
- Phillips, W. 2003. Origen, Biogeography, Genetic Diversity and Taxonomic Affinities of the Cacao (*Theobroma cacao*) Fungus *Moniliophthora roreri* (Cif) Evans *et al.* as Determined using Molecular, Phytopathological and Morpho-physiological Evidence. Ph.D. Thesis. UK, University of Reading. UK. 349 p.
- Piper, S; Martínez, A; Hidalgo, E; Krauss, U. 2000. Effect of formulation on population dynamics of mycoparasites on the surface of cocoa pods. In Proceedings of the INCOPEP 3<sup>rd</sup> International Seminar on Cocoa Pest and Diseases. eds CL. Bong, CH. Lee & FS. Shari. Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia, 16-17 October, 2000. p. 21-26.
- Pocasangre, L; Sikora, RA; Vilich, V; Schuster, RP. 2000. Survey of banana endophytic fungi from Central America and screening for biological control of *Radopholus similis*. Acta Horticulturae 531:282-289.

- Preston-Mafham, J; Boddy, L; Randerson, P. 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles-a critique. *FEMS Microbiology Ecology* 42:1-14.
- Reuck, D. 1997. Monilia del cacao: ¿Una amenaza semejante a la escoba de bruja?. *Revista Café & Cacao: Noticias*. Nestlé R & D Center. Quito, Ecuador. Vol. 2 No 1. p. 1-2.
- Rivera, G. 1999. Conceptos Inntroductorias a la Fitopatología: Combate de Enfermedades de Plantas. Organismos Antagónicos. 1 ed. San José, Costa Rica. EUNED. p. 223.
- Robison, R. 1969. Disease resistance terminology. *Review of Applied Mycology* 11-12:593-605.
- Rorer, JB. 1918. Ecuador cacao (Part 1). *Tropical Agriculture, Trinidad* 3:46-47.
- Rorer, JB. 1926. Ecuador cacao (Part 2). *Tropical Agriculture, Trinidad* 3:68-69.
- Saikia, R; Azad, P. 2001. Effect of certain carbon and nitrogen sources on the antagonistic activities of some biocontrol agents against *Colletotrichum falcatum* Went. *Environment and Ecology* 19 (4): 849-852.
- Sanogo, S; Pomella, A; Hebbar, P; Bailey, B; Costa, J; Samuels, G; Lumsden, R. 2002. Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis perniciosa* on cacao. *Phytopathology* 92(10): 1032-1037.
- Sikora, RA. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review Phytopathology* 30:245-270.
- Stinner, RE. 1977. Efficacy of inundative releases. *Annual Review of Entomology* 22:515-531.
- Suárez, C. 1987. Enfermedades del Cacao y su Control. *In* Manual del Cultivo del Cacao. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Quevedo- Ecuador. p. 86-87.
- Suslow, T; Schroth, M; Isaka, M. 1981. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72(7) 917-918.
- Tan, W; Li, Q; Qing, L. 2002. Biological control of alligatorweed (*Alternanthera philoxeroides*) with a *Fusarium* sp. *BioControl* 47(4):463-479.
- Ten Hoopen, GM; Rees, R; Aisa, P; Stirrup, T; Krauss, U. 2003. Population dynamics of epiphytic mycoparasites of the genera *Clonostachys* and *Fusarium* for the biocontrol of black pod (*Phytophthora palmivora*) and moniliasis (*Moniliophthora roreri*) on cocoa (*Theobroma cacao*). *Mycological Research* 107(5): 587-596.

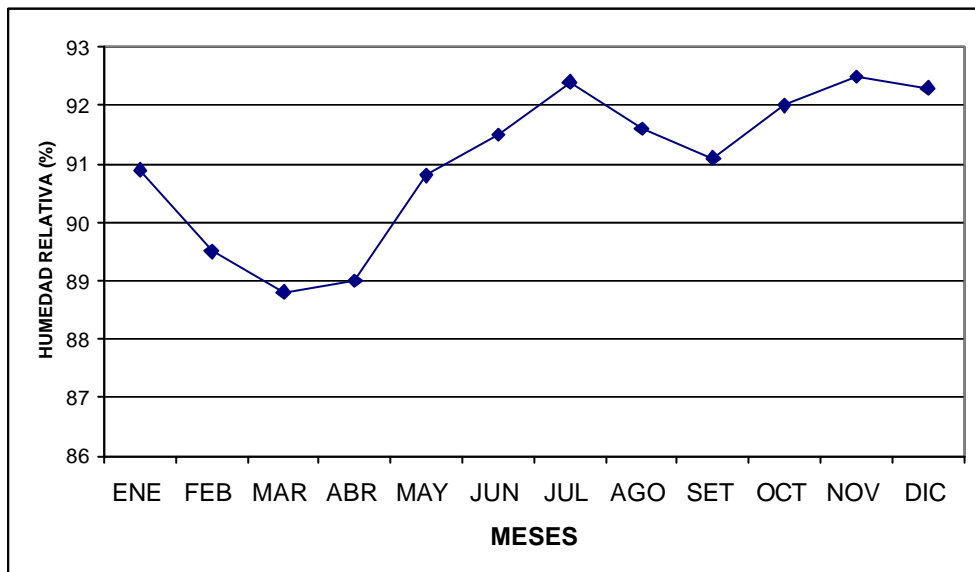
Watanabe, T. 1994. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. Boca Ratón, FL, CRC Press. 404 p.

## 9. ANEXOS

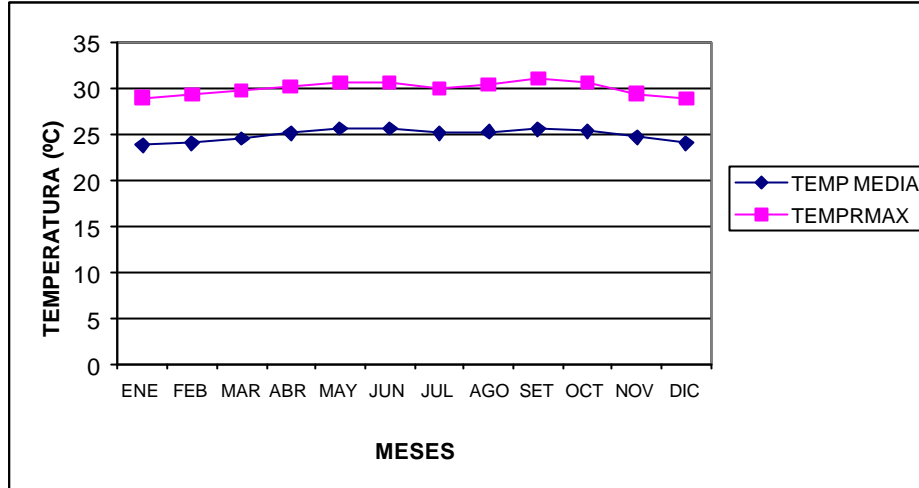
Anexo 1. Humedad Relativa (%) de Cabiria durante el ensayo (30 abril-11 junio 2004)



Anexo 2. Humedad Relativa (%) de La Lola (1958-2003)



Anexo 3. Temperatura media (°C) y Máximas (°C) de La Lola. (1952-2003)



Anexo 4. Precipitación (mm) de La Lola (1949-2003)

