



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
POSTGRADO EN AGRONOMÍA

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOCONTROLADORA *in vitro* e *in vivo* DE
Trichoderma crassum Bissett y *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn SOBRE
Phytophthora palmivora (Butler) Butler CAUSANTE DE LA PUDRICIÓN
PARDA DE LA MAZORCA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)**

**AUTORA: ING. YELINA LABRADOR
TUTORA: DRA. NELLY SANABRIA**

MARACAY, DICIEMBRE DE 2011

**TRABAJO PRESENTADO COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR
AL TÍTULO DE MAGISTER SCIENTIARUM EN AGRONOMÍA MENCIÓN
PROTECCIÓN VEGETAL QUE OTORGA LA UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA.**

TUTORA: Dra. NELLY SANABRIA

MARACAY, DICIEMBRE DE 2011

APROBACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO POR EL JURADO

Nosotros los abajo firmantes, miembros del jurado examinador del Trabajo de Maestría: **“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOCONTROLADORA *in vitro* e *in vivo* DE *Trichoderma crassum* Bissett y *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) COHN SOBRE *Phytophthora palmivora* Butler CAUSANTE DE LA PUDRICIÓN PARDA DE LA MAZORCA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)”**, cuyo autor es la Ing. Yelina Labrador, cédula de identidad V-15.926.680, certificamos que lo hemos leído y que reúne las condiciones necesarias para su presentación ante el Postgrado de Agronomía de esta facultad.

Dra. Nelly Sanabria de Albarracín

Tutora

Jurado Principal

Jurado Principal

CONTENIDO

RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN.....	9
OBJETIVOS	12
OBJETIVO GENERAL.....	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	13
2. IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	13
3. SINTOMATOLOGÍA	14
3.1 Frutos	14
3.2 Tallo	14
5. CONTROL.....	17
6. CONTROL BIOLÓGICO	19
6.1 Factores ambientales que afectan la germinación de conidios de hongos antagonistas	20
7. <i>Bacillus subtilis</i> Y OTRAS BACTERIAS UTILIZADAS COMO BIOCONTROLADORES.....	22
8.1 Taxonomía.....	25
8.2 Mecanismos de biocontrol	25
8.2.1 Biocontrol por Competencia.....	26
8.2.2 Biocontrol por Antibiosis.....	26
8.2.3 Biocontrol por micoparasitismo.	27
8.2.4 Inducción de resistencia.....	28
11. USO DE MEZCLAS DE ANTAGONÍSTAS PARA EL CONTROL DE <i>Phytophthora</i> spp Y OTROS PATÓGENOS.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. UBICACIÓN DEL ENSAYO.....	31
2. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS	31
3. AISLAMIENTO DE <i>Phytophthora palmivora</i>	31
4. PROCEDENCIA DE LA ESPECIE <i>Trichoderma crassum</i>	31

5. PROCEDENCIA DE LA ESPECIE <i>Bacillus subtilis</i>	32
5.1 Pruebas morfológicas fisiológicas y bioquímicas.....	32
6. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DEL PATÓGENO Y DE LOS MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS.	32
Estos Inóculos fueron utilizados en las diferentes pruebas, tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i> . 32	
6.2 Preparación del Inóculo de <i>Trichoderma crassum</i>	33
6.3 Preparación del Inóculo de <i>Bacillus subtilis</i>	33
7. PRUEBA DE PATOGENICIDAD	33
8. EVALUACIÓN <i>in vitro</i> DE <i>Trichoderma crassum</i> Y <i>Bacillus subtilis</i> PARA EL CONTROL DE <i>Phytophthora palmivora</i>	34
8.1 Prueba de enfrentamiento.....	34
8.2 Prueba de parasitismo	35
8.3 Evaluación de la acción de metabolitos volátiles.....	36
9. EVALUACIÓN <i>in vivo</i> DE <i>Trichoderma crassum</i> Y <i>Bacillus subtilis</i> PARA EL CONTROL DE <i>Phytophthora palmivora</i>	36
9.1 Preparación de los tratamientos <i>in vivo</i>	36
1. Descripción de síntomas	39
7. EVALUACIÓN <i>in vitro</i> DE <i>Trichoderma crassum</i> Y <i>Bacillus subtilis</i> PARA EL CONTROL DE <i>Phytophthora palmivora</i>	44
7.1 Prueba de enfrentamiento <i>in vitro</i>	44
7.2 Prueba de parasitismo	48
8. EVALUACIÓN <i>in vivo</i> DE <i>Trichoderma crassum</i> Y <i>Bacillus subtilis</i> PARA EL CONTROL DE <i>Phytophthora palmivora</i>	50
CONCLUSIONES.....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Arreglo de los enfrentamientos <i>in vitro</i>	36
Cuadro 2: Arreglo de los tratamientos <i>in vivo</i>	38
Cuadro 3: Crecimiento lineal in vitro de <i>P. palmivora</i> y <i>T. crassum</i> en placas Petri con Agar zanahoria.....	41
Cuadro 4: Pruebas fisiológicas y bioquímicas aplicadas a la bacteria.....	43
Cuadro 5: Valores de las pruebas de medias para el día 1 de evaluación.....	45
Cuadro 6: Valores de las pruebas de medias para el día 3 de evaluación.....	46
Cuadro 7: Valores de las pruebas de medias para el día 5 de evaluación.....	46
Cuadro 8: Valores del PIE al día 6 de la evaluación.....	47
Cuadro 9: Valores de PIC y PIE en la prueba de metabolitos volátiles.....	50
Cuadro 10: Valores de los porcentajes de avance de la mancha para el día 1 de evaluación.....	52
Cuadro 11: Valores de los porcentajes de avance de la mancha para el día 3 de evaluación	53
Cuadro 12: Valores de los porcentajes de avance de la mancha para el día 5 de evaluación.....	53
Cuadro 13: Valores de Intensidad de la enfermedad determinados con los porcentajes de avance máximo de cada tratamiento.....	56

RESUMEN

El cacao es un cultivo íntimamente ligado a la cultura venezolana, tanto por su origen como por su gran importancia en el desarrollo económico y social del país. Es atacado por un sinnúmero de enfermedades, entre ellas la “pudrición parda de la mazorca”, siendo esta la de incidencia más antigua sobre el cultivo ocupando el primer lugar como causante de pérdidas de cosecha. Esta investigación tuvo por objetivo de evaluar el efecto antagónico *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma crassum* y *Bacillus subtilis* por separado y combinados sobre *Phytophthora palmivora*, una vez evaluada la patogenicidad de éste, se realizaron los enfrentamientos. El ensayo *in vitro* se realizó en placas Petri con medio Agar Zanahoria (AZ), con el fin de evaluar el comportamiento de estos antagonistas, y calcular el porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) y el porcentaje de inhibición de esporulación (PIE). Se establecieron tres tratamientos con 10 repeticiones, los cuales consistieron en un testigo formado por el patógeno solo, el segundo enfrentamiento entre el patógeno y *B. subtilis*, otro enfrentamiento con *T. crassum* y el tercer tratamiento formado por la combinación de los antagonistas. En el ensayo *in vivo* se definieron 5 tratamientos los cuales quedaron conformados por un testigo, cuyas mazorcas solo se asperjaron con el patógeno 1×10^4 esporangios/ml, el segundo tratamiento solo con *B. subtilis* 10^8 ufc/ml, el tercero con *T. Crassum* 1×10^6 , el cuarto tratamiento consistió en la combinación de los dos antagonistas y un último tratamiento donde las mazorcas se asperjaron con un fungicida comercial a base de cobre 1g/0.2L. Se calculó el porcentaje de avance de la mancha para cada tratamiento. En ambos ensayos se utilizó un diseño completamente aleatorizado para el análisis de los datos, mediante el programa Statistix 8.0. En condiciones *in vitro* se reportó un porcentaje de inhibición de crecimiento del patógeno (PIC) promedio de 21,67%, 11,59% y 25,72% respectivamente y un porcentaje de inhibición de esporulación (PIE) de 77,24%, 70,65% y 89,22% respectivamente y en condiciones *in vivo*, se obtuvieron valores de avance de la mancha promedio de 5,74%, 16,25% 2,56% respectivamente, lo que indica que el mejor tratamiento fue en ambos ensayos la combinación de los antagonistas, mostrando así la factibilidad del uso combinado de estos agentes de control biológico.

Palabras clave: Control biológico de enfermedades, antagonistas, biocontrol

ABSTRACT

The cocoa is a profoundly joined crop to the Venezuelan culture, as by its origin as by its importance in the economic and social development of the country. It is attacked by a great number of pathogen, such as the black pod disease of cocoa which is reported as the more ancient known disease in this crop, and it is located in the first place as responsible of loss. The target of this investigation was to study the antagonist effect *in vitro* and *in vivo* of *Trichoderma crassum* and *Bacillus subtilis* along and combined upon *Phytophthora palmivora*. With the objective to evaluate the behavior of these antagonisms, calculating the percentage of inhibition of growing and the percentage of inhibition of sporulation the *In vitro* assay was carried out on Petri dishes with carrot agar medium (AZ). Three treatments were established with 10 repetitions witch have consisted by a control, this was the alone pathogen, the second treatment again *B. subtilis*, other with *T. crassum* and the last the combined antagonism. Five treatments were defined in the *in vivo* assay which were made up by a control, sprinkling the cobs only with the pathogen 1×10^4 sporangia/ml, the second with *B. subtilis* 10^8 ufc/ml, the third with *T. Crassum* 1×10^6 , the fourth have consisted in the antagonism combination and the last treatment the cob were sprinkled with a commercial cuprum fungicide 1g/0.2L. A complete random design for both assays was used to analyze the data through the Statistix 8.0 program. *In vitro* conditions, in average, percentages of inhibition of growing of 21, 67%, 11, 59% y 25, 72% and a percentage of inhibition of sporulation of 5,74; 16,25 and 2, 56% were obtained respectively. Values of advance spot were too obtained, 5,74; 16,25 and 2,56% respectively.

Key Words: Biological Control of diseases, antagonism, biocontrol.

INTRODUCCIÓN

El cacao es un cultivo íntimamente ligado a la cultura venezolana, tanto por su origen como por su gran importancia en el desarrollo económico y social del país desde que se estableció su comercialización hace ya más de trescientos cincuenta años. Venezuela llegó a ser el primer productor mundial de cacao, y este producto representó la fuente principal de ingresos durante un largo período de la época colonial (Allison, 2002).

El cacao se puede clasificar en tres grupos: criollo, forastero y trinitario (Marquina, 2005). El cacao más común en Venezuela procede del tipo criollo, que tiene unas excelentes cualidades aromáticas pero es muy sensible a plagas y enfermedades, lo cual se traduce en un rendimiento inferior al de los otros tipos (Allison, 2002).

Venezuela es un productor marginal de cacao, aporta el 0,64% de la producción mundial, el 1,21% de la superficie cultivada mundial y el 0,3% de la capacidad de molienda mundial. Actualmente la producción nacional de cacao es de 15.000 Tn/año, con un rendimiento promedio de 240 kg/ha, lo que representa la mitad del rendimiento promedio mundial. De esta producción, el 69,4 % es comercializado en el mercado internacional, el 30% va a la Industria nacional y una pequeña cantidad es procesada por la industria artesanal. Todo el cacao que exporta Venezuela es considerado como cacao aromático de alta calidad (CORPOANDES, 2010).

Como todos los cultivos tropicales, el cacao es afectado por numerosos patógenos que le ocasionan diversas enfermedades, pero cabe mencionar que los de mayor importancia pertenecen a especies del género *Phytophthora*. De todas las enfermedades que afectan al cultivo del cacao en el mundo, las ocasionadas por este género son las de más amplia difusión y ocupan el primer lugar como causante de pérdidas de cosecha (Suárez, 1987). Se señala que ocasionan un estimado de 44% de pérdidas de las cosechas. La de mayor importancia económica, la mazorca negra, es causada por *P. palmivora* Butler, que produce pérdidas de hasta un 30 % a nivel mundial. La magnitud del daño depende de las condiciones del árbol y del clima (McMahon y Purwantara, 2004).

La enfermedad es mundialmente conocida como “la pudrición parda de la mazorca”. Otros nombres comunes de la misma son “mazorca negra”, “fitoftora de las mazorcas. Cuando se encuentra en el tallo o ramas la enfermedad se conoce como “cáncer del tronco de cacao” (Barrosin, 1981; Ristaino y Gumpertz, 2000).

En Venezuela se encuentra distribuida en todos los estados productores de cacao, presentándose con mayor severidad en Sucre y Miranda, donde ocasiona más del 20% de pérdidas de las cosechas. También se le señala como responsable de la desaparición de muchas zonas cacaoteras del país, especialmente en Barinas, donde existían poblaciones de criollos (Capriles y Reyes, 2000).

El principal método de control de *P. palmivora* se ha basado en el uso de agroquímicos, aunque este método parece haber perdido su eficacia para disminuir la enfermedad, debido principalmente a la generación de resistencia por parte del patógeno (Hanada, 2010).

El control biológico es considerado valioso en los programas de manejo integrado de plagas (MIP). Sin embargo, el control biológico o biocontrol surgió hace pocas décadas con el desarrollo del MIP como una práctica eficiente para el manejo de plagas o enfermedades. El control biológico implica el empleo de organismos vivos o virus que regulan la incidencia de insectos plaga o patógenos. En los últimos cien años se ha visto un rápido incremento en su conocimiento y empleo, lo que ha permitido manipularlos como parte de un sistema efectivo y seguro para el manejo de plagas o enfermedades (Peshin y Dhawan, 2009).

En la actualidad, el control biológico enfatiza en la conservación de los enemigos naturales, los cuales se encuentran en los ecosistemas naturales, generando un equilibrio entre las poblaciones de organismos presentes (Peshin y Dhawan, 2009). Estos organismos son de gran interés por su potencial como agentes de control biológico (ACB) y por su adaptabilidad a los diversos factores bióticos y abióticos de un agroecosistema. Esto se debe a que los enemigos naturales han coevolucionado en el sistema, proporcionando por sí mismos un significativo nivel de control en las poblaciones de patógenos.

La eficiencia de un ACB depende de muchos factores tales como: la especificidad del hospedante, la dinámica de la población, los patrones de colonización del hospedante, la habilidad para moverse dentro de los tejidos y la habilidad para inducir resistencia sistémica en la planta. El conocimiento de la naturaleza de un agente de biocontrol y de sus mecanismos permite asegurar el éxito del control de un patógeno (Backman *et al.*, 1997; Fravel, 2005; Melnick *et al.*, 2008).

Los principales mecanismos de acción de un biocontrolador son la competencia, la antibiosis, el parasitismo y la inducción de resistencia; cada uno puede representar un parámetro de selección; sin embargo, éste tiene más de uno. La selección de un biocontrolador depende del sistema productivo y del producto a cosechar (Fravel, 2005).

En algunas ocasiones, dos o más biocontroladores se usan en mezcla, lo cual produce un efecto más fuerte para controlar un determinado patógeno (Lozoya *et al.*, 2006). Con la presente investigación se evaluó el uso de la mezcla entre *Bacillus subtilis* y *Trichoderma crassum*, conocidos por su efecto individual sobre el género *Phytophthora* para así generar conocimientos que puedan ser utilizados en el diseño de estrategias para el control integrado de la pudrición parda de la mazorca de cacao.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad biocontroladora *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma crassum* y *Bacillus subtilis* sobre aislados de *Phytophthora palmivora* causante de la pudrición parda de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar el efecto antagonista *in vitro* de *Trichoderma crassum* y *Bacillus subtilis* por separado y combinados sobre *Phytophthora palmivora*.
2. Estudiar el efecto antagonista *in vivo* de *Trichoderma crassum* y *Bacillus subtilis* por separado y combinados sobre *Phytophthora palmivora*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La “pudrición parda de la mazorcas de cacao”, es la enfermedad más antigua conocida sobre el cultivo de cacao. Fue señalada por primera vez en 1727, en Trinidad. Por muchos años se consideró a *P. palmivora*, como la única especie asociada a la enfermedad, por lo que es la más estudiada en cuanto a origen, sintomatología y distribución geográfica (Capriles y Reyes, 2000). Después de haberse desarrollado sobre algunas especies de *Theobroma*, previamente consideradas resistentes a sus infecciones, fue dispersada por el hombre, a todos los países cultivadores de cacao, hasta ser introducida en mazorcas y plantas de África Occidental. Actualmente está distribuida en los trópicos en diversos hospedantes (Zentmyer, 1988; Erwin y Ribeiro, 1996).

En el país, “La pudrición parda de la mazorca del cacao” causada por *P. palmivora* fue señalada por primera vez en 1833, reconociéndose al igual que en muchas partes del mundo como la enfermedad más severa en cacao. Cuando se encuentra en tallos o ramas la enfermedad se conoce como “cáncer del tronco de cacao” (Barrosin, 1981; Capriles y Reyes, 2000).

Se han identificado siete especies de *Phytophthora* causantes de la pudrición parda de la mazorca de cacao, siendo *P. palmivora* y *P. megakarya* las más importantes. *P. palmivora* se encuentra distribuida en todo el mundo, mientras que *P. megakarya* se encuentra restringida al oeste de África. Ambas especies presentan el inconveniente de tener un rango amplio de hospedantes, lo cual facilita su diseminación (McMahon y Purwantara, 2004).

2. IMPORTANCIA ECONÓMICA

De todas las enfermedades que afectan al cultivo del cacao en el mundo, las producidas por *Phytophthora* spp son las de más amplia difusión y ocupan el primer lugar como causante de pérdidas de cosecha. En Venezuela, *P. palmivora* produce pérdidas del 20 % pero a nivel mundial, éstas alcanzan un 30 %, y en

situaciones extremas pueden alcanzar hasta un 90% (Suárez, 1987; Ristaino y Gumpertz 2000; McMahon y Purwantara, 2004).

Por otra parte, esta especie también afecta a otras plantas pertenecientes a 41 familias diferentes. Es reconocido como uno de los patógenos más comunes en muchos cultivos de importancia económica, incluyendo, además, pimienta negra, coco, papaya, piña, cítricos, aguacate y muchas plantas ornamentales (McMahon y Purwantara, 2004).

3. SINTOMATOLOGÍA

3.1 Frutos

Las especies de *Phytophthora* pueden afectar frutos en todos sus estados de desarrollo. En este órgano, la infección comienza con una pequeña mancha marrón de forma redondeada o irregular, ubicada en cualquier parte de la mazorca que bajo condiciones favorables de humedad y temperatura recubre de un micelio blanco, aéreo, esponjoso con abundantes esporas. Si está en uno de los extremos del fruto, la mancha avanza hacia el centro del mismo. Si se ubica en el centro adquiere una forma elíptica, debido a la forma del fruto. El aumento del tamaño de la lesión es de 1 - 3 cm/día, dependiendo de las condiciones ambientales. Cuando el patógeno afecta frutos inmaduros, crece lentamente afectando todos los tejidos internos incluyendo la pulpa y las semillas, ocasionando una mazorca momificada (Brasier, 1979; Erwin y Ribeiro, 1996; Capriles y Reyes, 2000; McMahon y Purwantara, 2004).

Se han señalado variaciones en la sintomatología de frutos con producción parda de la mazorcas de cacao, debido a la existencia de diversas especies causantes de la enfermedades, difiriendo de la agresividad con que infectan (Erwin y Ribeiro, 1996).

3.2 Tallo

Los síntomas típicos pueden ser observados en las ramas, horquetas, ocasionando en éstas la “muerte regresiva”, también se ven síntomas en cojines florales, tronco principal o en las cicatrices de heridas ocasionadas sobre el leño

por los implementos de cosecha y poda. Las manifestaciones de las infecciones en el tallo, comúnmente se conocen como “cáncer del tronco,” “llaga” o “cancro” produciendo protuberancias acuosas esponjosas de más de 1 cm sobre la superficie que al ser oprimidas producen un exudado marrón rojizo. Estos síntomas pueden apreciarse tanto externa como internamente, variando en grados de intensidad según las condiciones climáticas prevalentes en la zona (Barrosin, 1981; McMahon y Purwantara, 2004; González, 2007).

Externamente se pueden observar manchas deprimidas, de suborbiculares a oblongas, de 1 cm de longitud y de 2-5 cm de ancho. Las manchas pueden presentarse solas o agrupadas, con bordes difusos y coloraciones variables entre púrpura y negro. Su apariencia puede ser relativamente seca o acuosa con un margen amplio marrón oscuro a negro (Barrosin, 1981).

4. DESCRIPCION DEL AGENTE CAUSAL

Phytophthora palmivora, pertenece al reino Cromista, clase Oomycetes, orden Peronosporales familia Peronosporaceae (Index Fungorum, 2010). Las colonias son de crecimiento lento, estrelladas de color blanquecino, con un micelio aéreo algodonoso, denso, compacto que cubre totalmente la placa de Petri. Posee micelio cenocítico, hialino, poco ramificado, de diámetro regular, no toruloso, las hifas de esta especie son completamente uniformes, pocas veces sobrepasan los 5 µm de diámetro. A menudo, esta especie produce clamidosporas con diámetro entre 30 - 35 µm en abundancia y en las primeras fases de desarrollo. Los esporangióforos son estrechos, simples y con paredes muy bien definidas. Los esporangios se forman fácilmente sobre medio de cultivo, estos son elipsoides u ovoides con un tamaño de 35–60 µm x 20–40 µm y pueden llegar hasta 90x45 µm. No se encuentran normalmente oogonios en cultivos puros, pero abundan cuando son aislados de compatibilidad opuesta (A1 y A2) y se aparean. Presenta anteridios anfígenos, esféricas u ovals con un tamaño de 14x15 µm. Las oosporas casi llenan el oogonio, tienen una pared de 2 µm. Los cultivos *in vitro* son uniformes, ligeramente radiados con escaso micelio aéreo. La temperatura de crecimiento mínima es de 11°C, la óptima está entre 27° y 32°C, y la máxima es de 35°C o menos (Waterhouse, 1963; Griffith *et al* 1992).

En Venezuela, se han identificado las siguientes especies de *Phytophthora* sobre cacao: *P. palmivora*, *P. megasperma*, *P. syringae* y *P. parasitica*, asociadas a la pudrición parda de la mazorca y la muerte regresiva de las plántulas. Posteriormente se indicó la presencia de *P. capsici* y *P. citrophthora* (Parra, 1998; Capriles y Reyes 2000).

4.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Phytophthora* sp., involucra tanto el estado asexual como el sexual, que se presentan dependiendo de las condiciones ambientales. En nuestras condiciones ambientales predomina el estado asexual, el cual inicia cuando la estructura vegetativa o esporangio germina, y en condiciones óptimas de humedad (agua libre) y temperatura (15°–38° C) libera las zoosporas. Éstas son estructuras móviles, de vida corta y poseen dos flagelos, uno anterior y otro posterior. El anterior es el responsable de movilizar la zoospora a través del agua (hasta 1,5 cm), mientras que el flagelo posterior actúa como una hélice que le da la dirección a la célula. Las zoosporas cumplen dos papeles fundamentales para el ciclo de vida del patógeno: 1) transmisión del patógeno de un hospedante a otro y 2) dar la orientación del patógeno hacia el sitio de infección (hospedante) (Judelson y Blanco, 2005; Walker y Van West, 2007).

4.2 Epidemiología

El inicio del proceso de infección depende en gran medida de las condiciones ambientales, la humedad relativa alta y las bajas temperaturas, características de la época de lluvias, son favorables para la liberación de las zoosporas del esporangio y su dispersión. Los vehículos de dispersión de la enfermedad son: la salpicadura de la lluvia, que aprovecha el inóculo presente en el suelo para afectar a las mazorcas más cercanas; la esorrentía, que transporta en la corriente del agua las zoosporas y permite la dispersión del patógeno hasta 2 metros y también el viento moviliza las zoosporas atrapadas en microgotas de agua, las cuales pueden ser transportadas hasta 12 metros de distancia (Efombagn *et al.*, 2004).

Después de su liberación, las zoosporas responden a estímulos generados por el hospedante y a los 20-25 minutos se enquistan en el material vegetal. El proceso de infección se inicia después de esta etapa, la zoospora pierde los flagelos y germina. La germinación se da como respuesta a las señales generadas por la planta, que dependen de los iones de Ca^{2+} , dando lugar a la formación de la hifa infectiva, la cual penetra directamente al tejido e invade los espacios intercelulares. Existen evidencias de que la penetración tiene lugar a través de los estomas. En condiciones ambientales favorables, esta etapa tiene una duración aproximada de 48 horas (Iwaro *et al.*, 1999; Attard *et al.*, 2008).

El desarrollo de la enfermedad está determinado por varios factores que tienen que ver con las características morfogénicas, las cargas iónicas de la planta, los factores ambientales, también la frecuencia y tamaño de los estomas, ya que se cree que el patógeno penetra a través de éstos. La duración del ciclo de fructificación de cada material puede contribuir o no a la susceptibilidad. Otra característica de gran importancia es la edad del fruto, siendo más susceptibles a mayor edad. (Berry y Cilas, 1994; Iwaro *et al.*, 1999; Efombagn *et al.*, 2004).

Durante la infección del fruto de cacao, la concentración de azúcares en los tejidos disminuye, sobre todo en clones altamente susceptibles. Esta disminución se encuentra relacionada con la rápida evolución del área necrótica en el tejido donde *Phytophthora* sp., presenta un alto consumo de los azúcares simples y dobles, predominando en la pared celular la glucosa, fructosa y sacarosa. Por lo tanto, *Phytophthora* sp., no le permite a la planta hospedante la síntesis de componentes relacionados con la patogénesis, similares a los fenoles (Jaimes *et al.*, 2010).

5. CONTROL

Existen cuatro estrategias básicas para controlar el hongo causante de la mazorca negra: control cultural, control químico, uso de materiales resistentes y control biológico. Es necesario conocer la biología del hongo, implementando así un adecuado control cultural lo cual ayuda a minimizar el nivel de daño, éste debe incluir una recolección cuidadosa de frutos, manejo de malezas, podas de formación, podas sanitarias, eliminación de fuentes de inóculo, monitoreo,

adecuada densidad de siembra, buen drenaje y otros factores que puedan considerarse dentro de determinada plantación para disminuir las oportunidades de éxito del patógeno (Martínez, 2005; González, 2007).

El uso de agroquímicos como principal método de control de *P. palmivora*, parece haber perdido su eficacia para controlar la enfermedad, debido principalmente a la generación de resistencia por parte del hongo. Se han utilizado fungicidas de contacto a base de cobre como el óxido cuproso y el oxiclورو de cobre; sin embargo, la eficiencia de estos tratamientos depende de la época y frecuencia de aplicación y de la presencia o ausencia de lluvias. También se realizan aplicaciones con productos sistémicos como metalaxil+mancozeb (Martínez, 2005).

La variabilidad genética de *Phytophthora* está relacionada con el desarrollo de resistencia a fungicidas y por ende ocasionan el rompimiento de la resistencia de varios cultivares mejorados. Es muy probable encontrar fuentes de resistencia en genotipos criollos, sin embargo, es importante destacar que el estudio posterior de su descendencia constituye un factor importante (Gregory 1972).

6. USO DE VARIEDADES RESISTENTES

Por milenios, los organismos vivos han evolucionado, dispersado y esparcido más allá de sus áreas nativas. La confrontación con varios habitantes les ha permitido adaptarse gradualmente a sus nuevos ambientes y climas bajo limitaciones, naturales o generadas por el hombre, que crearon una amplia diversidad genética en cada especie; a esto se le denomina fuentes de diversidad genética (Harman, 2006; Jaimez *et al.*, 2010).

La selección de materiales resistentes es una etapa primordial para aislar fuentes de resistencia a enfermedades y parte de la siguiente premisa: “Las plantas no son hospedantes pasivos ante el ataque de microorganismos, con los cuales interactúa, con gran frecuencia, en su ambiente”. Al igual que otros organismos eucariotas, las plantas se defienden contra los ataques mediante un arsenal de mecanismos de defensa, que pueden ser pasivos o preexistentes, que involucran

barreras estructurales, tales como la cutícula de ceras o reservorios con posición estratégica con compuestos antimicrobianos que funcionan para prevenir la colonización en los tejidos. La resistencia a enfermedades en plantas está controlada por genes que confieren diferentes grados de resistencia, de alto grado sólo cuando son específicos a un patógeno en particular. A los genes que controlan esta respuesta de defensa se les denomina genes de resistencia o genes R. Cada gen R responde a un gen de avirulencia (gen Avr) de un patógeno en especial (Benitez et al., 2004; Attard, 2008).

Las fuentes de diversidad genética representan una vasta librería genética, de la cual se pueden obtener muchos genes de gran utilidad. Cada variedad de planta es valiosa para la humanidad, provee genes específicos o combinados de cualidades agronómicas (resistencia a plagas, enfermedades o sequía; adaptaciones al estrés como la tolerancia a la salinidad, entre otras), de calidad agronómica (altos contenidos de aceite), culinarios y otros factores de importancia cultural (Fernández, 2006).

7. CONTROL BIOLÓGICO

En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrolle la enfermedad, por lo tanto puede decirse que control biológico es el control de los patógenos por uno o más organismos, ya sea de forma natural o a través de la manipulación del medio ambiente, huésped o antagonistas, o por la introducción masiva de uno o más antagonistas (Fernández, 2001).

Por otra parte, se encuentra el concepto clásico que se restringe a que “control biológico es el uso deliberado de un organismo para controlar a otro”. Sin embargo, y en relación a este último concepto, es necesario considerar que las interacciones de múltiples variables presentes en el medio ambiente pueden modificar las interacciones entre los microorganismos y su entorno, muchas de las cuáles pueden favorecer o impedir un control biológico efectivo (Cook y Baker, 1983).

Uno de los problemas técnicos que influye en la investigación con productos microbianos es la presencia simultánea del patógeno y del microorganismo antagonista en el campo. Por otra parte, existen aspectos o variables que intervienen en la efectividad y eficiencia de un programa de control biológico de fitopatógenos como son: ubicación del patógeno en el suelo, tipo de acción antagonista, medio de dispersión y mantenimiento del antagonista, temperatura y pH del suelo, momento de introducción del antagonista en suelo en relación a la época de siembra; tasa de aplicación del antagonista, densidad del patógeno, presencia de otros patógenos en el suelo; origen del antagonista, presencia de antagonistas naturales, tipo de acción del antagonista, medio de dispersión del antagonistas, entre otros (Arcia, 1997).

7.1 Factores ambientales que afectan la germinación de conidios de hongos antagonistas

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. 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 2005).

A través del estudio del efecto de la humedad (baja 75% y alta 100%) y de la temperatura (15, 20, 25 y 30°C) se determinó que no hay esporulación de *Trichoderma stromaticum* en presencia de humedad relativa baja (75%) y a una temperatura de 25–30° C, pero con alta humedad relativa (100%) y a la misma temperatura si existe una buena producción de conidios (Sanogo *et al.*, 2002).

Temperatura y pH: Se ha evaluado el efecto de diferentes niveles de pH (5, 6, 7, 8 y 9) y temperaturas (15, 20, 25, 30 y 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 son óptimas para el crecimiento y esporulación de

este hongo antagonico. Sin embargo Sanogo *et al.*, (2002) señalan que a temperaturas de 10°C y 35°C no hay esporulación ni crecimiento del hongo antagonista.

Se realizó un experimento durante dos años consecutivos, para evaluar 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* spp., donde se encontró que los agentes de biocontrol mezclados con melaza aumentaron el porcentaje de mazorcas sanas de cacao, y por lo tanto ejercieron un mayor control de *Phytophthora* spp. (Krauss *et al.*, 2003).

En condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas. Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagonicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales (Fernández, 2001).

Entre los antagonistas más importantes se encuentran bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* y los hongos más representativos pertenecen a los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma*, este último es el más utilizado en el control de un grupo grande de patógenos de suelo. En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y este aspecto es muy importante a la hora de seleccionarlos, ya que existe el riesgo generar resistencia cuando el patógeno es expuesto a un único modo de acción como sucede con los agroquímicos; por el contrario, si se usa un controlador que actúe por varios mecanismos, dicho riesgo disminuye. Esto es lo que se busca con el uso de combinaciones de antagonistas de diferentes modo de acción (Fernández, 2006).

En el caso de *P. palmivora*, se ha encontrado que los géneros *Pestalotiopsis*, *Curvularia*, *Tolyocladium*, *Fusarium*, *Aspergillus.*, *Penicillium*, y *Paecilomyces* tienen algún efecto positivo en el biocontrol (Hanada *et al.*, 2010).

En un estudio para seleccionar Rizobacterias antagonistas a *P. capsici* se encontraron 16 cepas con potencial, las cuales fueron detectadas en las raicillas de las plántulas de pimentón. De estas seleccionaron cinco cepas que redujeron la enfermedad en las plántulas justo antes del trasplante. Además incrementaron la producción de frutos del mismo cultivo (Kyung *et al.*, 2008).

Los microorganismos empleados en el control de fitopatógenos son generalmente aislados del suelo o de plantas de campos infectados con el patógeno que se desea controlar. Sin embargo, no todos los aislamientos presentan características óptimas para ser usados como antagonistas. Una vez que se han aislado los microorganismos a partir de las muestras, es necesario evaluar su eficacia por medio de bioensayos *in vitro*, los cuales consisten en confrontar al patógeno con el posible antagonista y así evaluar su potencial en la inhibición del crecimiento y desarrollo del patógeno (Mendgen *et al.*, 1992; García, 2004; Fernández, 2006).

Las especies endófitas que son comunes en las plantas bajo condiciones naturales, con frecuencia son buenas colonizadoras y presentan rápido crecimiento *in vitro* en cambio hay otros microorganismos productores de antibiosis, pero usualmente no se encuentran en la naturaleza y tienden a crecer lentamente *in vitro*, además no son buenos colonizadores (Melnick *et al.*, 2008).

8. *Bacillus subtilis* Y OTRAS BACTERIAS UTILIZADAS COMO BIOCONTROLADORES

Bacillus subtilis no es potencialmente patógeno humano; sin embargo puede contaminar los alimentos, pero raramente causa intoxicación alimenticia. Sus esporas pueden sobrevivir la calefacción extrema, no produce endotoxinas y secreta proteínas al medio, algunas de ellas con propiedades antifúngicas, como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las iturinas. Se utiliza industrialmente como insecticida y fungicida. La subtilina liberada por *Bacillus* actúa sobre la pared celular de hongos (González *et al.*, 2002).

Otras características señaladas por Lisboa (2003) son:

1. Producen endosporas, por lo cual resisten factores físicos perjudiciales como la desecación, los ácidos y los desinfectantes químicos.
2. Producen enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuentes de carbono y donadores de electrones.
3. Producen antibióticos como bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y ciculina.
4. Son fermentativos, usualmente fermentan caseína y almidón.
5. Crecen bien en medios sintéticos que contienen azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, etc., como únicas fuentes de carbono y el amonio como única fuente de nitrógeno.
6. Viven dentro de los límites de temperatura de 55 a 70° C
7. El límite inferior de pH para el género es de 2-3.

Algunas variedades de *B. subtilis* también tienen aplicaciones comerciales: Una conocida como *Bacillus natto* es usada en la producción comercial del manjar japonés Nattō. *Bacillus subtilis* QST 713 (comercializado como QST 713 o Serenata) tiene una actividad fungicida natural, y es empleado como un agente de control biológico. *Bacillus subtilis* pBE2C1 y *B. subtilis* pBE2C1AB son usados en la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de desechos de malta como fuente de bajo costo para la producción de PHA. Las enzimas producidas por *B. subtilis* y *B. licheniformis* son usadas extensamente como aditivos en detergentes de lavandería (Hansen, 1992).

La mayoría de los estudios de interacción entre organismos patógenos con hongos y bacterias han sido relacionados con el antagonismo especialmente para la inhibición del crecimiento micelial. Este antagonismo es logrado a través de diversos mecanismos que incluyen la competencia por nutrientes, exclusión de sitio, colonización de la bacteria en el patógeno y/o la liberación de componentes celulares durante el crecimiento, en orden de eliminar o reducir los competidores en su medio ambiente inmediato (Hansen, 1992).

El género *Bacillus* es considerado como uno de los más efectivos para controlar enfermedades foliares y de las raíces. Se han llevado a cabo pruebas de antagonismo para evaluar cepas de *B. subtilis* para el control biológico de *Puccinia Pelargonii-zonalis*, encontrando allí efecto inhibitorio. Así mismo, *B. subtilis* ha sido evaluada para el control de enfermedades fungosas en aguacate, encontrándose que aplicaciones pre y postcosecha tienen un efecto similar al de los fungicidas comerciales (Rytter *et al.* 1989; Korsten *et al.*, 1997).

Se ha logrado aislar de *Pseudomonas cepacia* y *Bacillus subtilis* sustancias activas que poseen la propiedad de reprimir algunos fitopatógenos (Hansen, 1992). Estudiando la interacción entre varios microorganismos se encontró que *Bacillus* es un antagonico promisorio para el control de *Colletotrichum gloesporioides* causante de la antracnosis en tomate (Botero y Aranzazu, 1999; Delmoral, 2009).

También, se han realizado trabajos en los cuales se ha encontrado que *Bacillus* sp tiene efecto sobre la germinación y el desarrollo de semillas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporum*. Además se han obtenido resultados satisfactorios al hacer pruebas *in vitro* con *Pseudomonas* sp y *B. subtilis* aisladas de plátano y arroz, para probar la capacidad de inhibición que tienen las bacterias sobre el crecimiento de algunos patógenos de suelo, tales como *Fusarium oxysporum* f. s. *lycopersici*, *Pythium ultimum*, *R. solani*, *S. rolfsii*, *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani* (Brada *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 2001).

Con el fin de conocer el mecanismo de acción que presenta *Bacillus subtilis* contra los hongos patógenos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium verticillioides*, se realizó un estudio, mediante el uso del microscopio electrónico de barrido; se logró observar las diferencias en la estructura celular de hifas y agrupaciones de conidias, entre otras características con lo cual se concluyó, que el mecanismo de acción que presenta *Bacillus subtilis* contra los hongos patógenos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium verticillioides*, está mediado por un metabolito termoestable extracelular segregado por la bacteria, el cual produce alteraciones morfológicas sucesivas en

las estructuras de las hifas de los hongos, presentando deformaciones, plasmólisis y colapso (Basurto *et al.*, 2006).

Melnick *et al.* (2008) resalta la importancia de las bacterias como efectivos agentes de biocontrol, en especial de *Phytophthora* spp., en cacao.

Ongena y Jacques (2007) evaluaron el uso de tres familias de lipopéptidos de *Bacillus*, surfactina, iturina y fengicina en el antagonismo de hongos y Oomycetes y encontraron que estos lipopéptidos pueden influenciar la capacidad de los patógenos de colonizar los hospedantes, así como también, son un factor clave en las interacciones benéficas de las especies de *Bacillus* con las plantas. Entre las diferentes propiedades estructurales y fisicoquímicas de estas biomoléculas se encuentra que la superficie activa y la membrana anfifílica explican su relación en la mayoría de los mecanismos desarrollados en el biocontrol de los patógenos.

9. *Trichoderma* spp COMO BIOCONTROLADOR

9.1 Taxonomía

Trichoderma es el anamórfico de *Hypocrea* que pertenece a la clase Ascomycetes y familia Hypocreaceae (Index Fungorum, 2010). Este hongo presenta versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación, características típicas del este género, las cuales, han permitido su uso en el control biológico (Fernández, 2001).

Trichoderma spp, es de crecimiento rápido, inicialmente presenta micelio de color blanco que luego se va tomando verde oscuro, algunas especies como *T. crassum* colorean el medio, generalmente la colonia forma anillos concéntricos y presenta aspecto granuloso. Los conidióforos son en forma de pirámide, los conidios subglobosos, cortos y ovoides generalmente produce clamidosporas (Harman, 2006).

9.2 Mecanismos de biocontrol

El hongo *Trichoderma* spp es utilizado como un biocontrolador de hongos patógenos de suelo, ataca otros hongos y se nutre de ellos. *Trichoderma* ha evolucionado y tiene varios mecanismos de biocontrol. Algunos de los

mecanismos son: antibiosis, competencia por nutrientes, solubilización y segregación de sustancias inorgánicas, inducción de resistencia y generalmente micoparasitismo (Harman, 2006).

9.2.1 Biocontrol por Competencia.

Trichoderma es capaz de vencer el efecto de otros hongos de suelo y sobrevivir bajo condiciones extremas. La inanición es la causa más común de muerte de los microorganismos, tanto así, que la competencia por nutrientes limitados se traduce en un biocontrol entre hongos. *Trichoderma* tiene una capacidad superior de movilizar y extraer nutrientes del suelo comparado con otros microorganismos (Benítez *et al.*, 2004).

La causa de muerte más común en microorganismos es por inanición. Algunos patógenos de plantas requieren nutrientes exógenos, para germinar prósperamente, después penetran e infectan el tejido hospedante. Por lo tanto la competencia por factores nutricionales limitantes como carbono, nitrógeno o hierro, pueden resultar en el control biológico de fitopatógenos (Garrett ,1965 Inbar y Chet, 1996).

9.2.2 Biocontrol por Antibiosis.

Algunos autores restringen la definición de antibiosis, para las interacciones que involucran compuestos difusibles de bajo peso molecular o a un antibiótico producido por un microorganismo que inhibe el crecimiento de otro microorganismo; esta definición excluye proteínas o enzimas que pueden matar el patógeno. Un concepto más amplio se refiere a la inhibición o destrucción de un organismo por la producción metabólica de otro, de este modo incluyen pequeñas moléculas tóxicas, volátiles y enzimas hidrolíticas (Baker y Griffin, 1995).

Se habla de antibiosis cuando existe la inhibición o destrucción de un organismo por un producto metabólico de otro (Cook y Baker, 1983). La antibiosis ocurre durante la interacción de compuestos de bajo peso molecular o producción de antibióticos que inhiben el crecimiento de microorganismos. La mayoría de las especies de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden la colonización de otros hongos. Entre estos metabolitos se encuentran el

ácido harzianico, alamicina, tricolin, antibióticos, peptaibols, 6-pentil- α -pirona, entre otros (Benitez *et al.*, 2004; Aponte, 2009).

En estudios sobre el efecto de metabolitos volátiles de *Trichoderma* en hongos fitopatógenos del suelo, se observó que *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia minor* fueron afectados, en cuanto a su crecimiento y a la formación de esclerocios (Dal *et al.* 1997).

9.2.3 Biocontrol por micoparasitismo.

Es el ataque directo de un hongo sobre otro. Es un proceso complejo que involucra eventos secuenciales, incluyendo reconocimiento, ataque, penetración y muerte. (Benítez *et al.*, 2004). Este es el mecanismo más frecuente ejercido por *Trichoderma*, en el cual su micelio crece y se desarrolla dentro de las hifas del patógeno, desintegrando su protoplasma e impidiendo su desarrollo y reproducción (Benhamaou y Chet, 1993).

En el micoparasitismo *Trichoderma* spp forma estructuras llamadas apresorios que contienen una alta concentración de solutos osmóticos como glicerol y su función es penetrar en el hospedante, también produce algunas enzimas que degradan la pared celular de los patógenos como la quitinasa, gluconasa, proteasa. Cuando el micoparásito llega al hospedante, las hifas se enrollan alrededor o son apegadas al hospedante y algunas veces penetran en él (Carsolio *et al.*, 1999).

Cuando un hongo micoparásito ataca directamente a un fitopatógeno (hospedante) en un sistema biótico, éste es considerado como micoparásito. Este proceso se ha dividido de acuerdo a la utilización de nutrientes como: (1) parasitismo necrotrófico (destrutivo), en el cual, la relación resulta en la muerte o destrucción de uno o más componentes del hospedante, y (2) parasitismo biotrófico (balanceado) en el cual el desarrollo del parásito es favorable para vivir antes de que muera el hospedante (Botero y Aranzazu, 1999).

Se logró observar en ensayos de control biológico de *Phytophthora capsici*, agente causal de la podredumbre de pimentón, que *T. harzianum* aumenta los niveles de

enzimas hidrolíticas β -1,3- glucanasa (lisis enzimática), ejerce una mayor competencia por espacio y nutrientes e interacciona directamente con el patógeno (hiperparasitismo), siendo esto importante en la reducción y destrucción de la colonia del patógeno (Mohammed *et al.*, 2004).

Al evaluar el efecto de cuatro aislamientos de *Trichoderma* (*T. crassum*, dos de *T. harzianum* y *T. pseudokoningii*) para el control *in vitro* de *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler, se logró comprobar al establecer comparaciones entre los valores de PIC, PIE y grado antagonismo, que el mayor efecto inhibitorio se obtuvo en el enfrentamiento de *Trichoderma crassum* - *P. palmivora* (Guzmán, 2011).

9.2.4 Inducción de resistencia.

Trichoderma produce un mecanismo de resistencia similar a la respuesta de hipersensibilidad, resistencia sistémica adquirida y resistencia sistémica inducida en plantas (Benítez *et al.*, 2004).

Entre otros mecanismos que presenta *Trichoderma*, y cuya acción biorreguladora es de forma indirecta se pueden mencionar: los que inducen mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos como es la activación en la planta de compuestos relacionados con la resistencia (Inducción de Resistencia), con la detoxificación de toxinas excretadas por patógenos y la desactivación de enzimas de estos durante el proceso de infección; la solubilización de elementos nutritivos, que en su forma original no son accesibles para las plantas. Tienen la capacidad además, de crear un ambiente favorable al desarrollo radical lo que aumenta la tolerancia de la planta al estrés (Harman, 2006).

El uso de *Trichoderma* como biocontrolador ofrece ventajas sobre los métodos químicos de control, ya que en muchos casos los efectos benéficos de este antagonista son mucho más duraderos debido a que se pueden establecer relaciones simbióticas con las plantas así como con otros organismos que habitan las raíces de estas, tales como *Rhizobium* y las micorrizas y proporcionar grandes beneficios (Mohammed *et al.*, 2004).

Con el propósito de estudiar la capacidad de *T. koningiopsis* para inducir respuestas sistémicas de defensa en plantas de tomate afectadas por *Fusarium oxysporum* se llevó a cabo un estudio, en el que se encontró que esta especie estimuló respuestas sistémicas de defensa en la planta, por lo cual se concluyó que presenta habilidad para controlar *F. oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici* en las plantas de tomate (Jaimes *et al.*, 2009).

Se conoce que las especies de *Trichoderma* inducen resistencia en plantas, debido a que algunos componentes inducen la producción de etileno, ácido Jasmónico lo cual se traduce en respuestas de hipersensibilidad en las plantas cultivadas (Howell 2003).

10. USO DE MEZCLAS DE ANTAGONÍSTAS PARA EL CONTROL DE *Phytophthora* spp Y OTROS PATÓGENOS.

En ensayos para estudiar la efectividad antagónica contra *Phytophthora infestans* de algunas cepas de *Pseudomonas* y de *Trichoderma*., se usaron combinaciones de estos encontrando que tienen un efecto inhibitorio significativo sobre la infección (Lozoya *et al.*, 2006).

También para el control de *P. infestans* y otros patógenos del follaje en tomate, se evaluó la utilización *Bacillus subtilis* cepa Antumavida., y *Trichoderma harzianum* cepa Queule en mezcla con *Trichoderma virens* cepa Trailles, tanto en forma separada y combinada. Los autores concluyeron que dos de los cuatro tratamientos (*B. subtilis* y *B. subtilis* + *Trichoderma* spp.) presentaron diferencias significativas en la reducción de estas enfermedades (Rojas, 2009).

Trichoderma harzianum (Queule) también fue evaluado sobre *Botrytis cinérea*, en combinación con el producto comercial Serenade, cuyo ingrediente activo es *Bacillus subtilis*. Se encontró que la incidencia de la enfermedad fue significativamente menor (Lisboa, 2003).

En otra investigación, se evaluó la acción supresora de cepas *Trichoderma viride* 2C-PR, *Bacillus subtilis* 002R y *Streptomyces griseus* 001, en el combate de *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Pseudomonas* sp y *Erwinia carotovora*, en

plantas de jengibre, en comparación con fungicidas y bactericidas usados por el agricultor. En términos generales, observó una tendencia a la disminución del inóculo de los patógenos en el tratamiento biológico, en comparación con el tratamiento químico en ambos muestreos (Chavarria *et al.*, 2006).

La actividad antagonista *in vitro* de aislamientos de microorganismos obtenidos de la rizosfera de plantas de garbanzo fue probada contra el complejo de hongos causantes de la rabia. Las cepas nativas que mostraron el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los patógenos fueron seleccionadas e identificadas como *Trichoderma lignorum*, *T. harzianum*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* (Paredes *et al.*, 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. UBICACIÓN DEL ENSAYO

La investigación se llevó a cabo en la Clínica de Enfermedades de Plantas de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela ubicada en Maracay, estado Aragua.

2. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras se tomaron de frutos de cacao (Forastero) que presentaban síntomas de pudrición parda de la mazorca. Estos fueron recolectados en Tapipa, parroquia Rivas, municipio Acevedo del estado Miranda.

3. AISLAMIENTO DE *Phytophthora palmivora*

Una vez seleccionados los frutos de cacao, se lavaron con agua corriente y se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 3% por 1 min, se dejaron secar sobre papel absorbente esterilizado, posteriormente, se tomó de la parte interna de la lesión trozos de aproximadamente 1-3 mm de diámetro para ser sembrados en medio agar zanahoria (AZ), e incubados a temperatura de laboratorio (28-30° C), durante 4-5 días en presencia de luz fluorescente.

Posteriormente cuando se desarrollaron las colonias se procedió a realizar la caracterización e identificación del patógeno, haciendo revisión de la clave de Stamps *et al.*, 1990) y basándose en los criterios de diversos investigadores sobre las características macroscópicas (forma, tamaño y color de la colonia) y microscópicas (tipo de micelio, tamaño y forma de los esporangios, etc.) (Capriles y Reyes, 1972; Brasier y Griffin, 1979).

4. PROCEDENCIA DE LA ESPECIE *Trichoderma crassum*

Se usó el aislamiento 06141 procedente de un cultivo de tomate de Arenales, estado Aragua, fue aislado en la Clínica de Enfermedades de Plantas de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, e identificada como *Trichoderma crassum*.

5. PROCEDENCIA DE LA ESPECIE *Bacillus subtilis*

Se usó un aislamiento de *Bacillus subtilis* proveniente de Calabozo estado Guárico, proporcionada por el tesista Luis Guillen a la clínica de enfermedades de plantas. Sin embargo fue necesario realizar algunas pruebas de caracterización para corroborar la especie. Estas se describen a continuación:

Características culturales. Se observó color, forma, superficie y consistencia de la colonia.

Características microscópicas. Se aplicaron algunas pruebas fisiológicas y bioquímicas utilizadas en la caracterización; estas pruebas son:

- Rojo congo.
- Prueba del KOH al 3%.
- Requerimientos de oxígeno
- Catalasa.
- Ureasa.
- Oxidasa.
- Manitol.
- Hidrólisis del almidón.
- Tolerancia a sales.
- Crecimiento en Agar nutritivo a 40 y 65°C

6. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DEL PATÓGENO Y DE LOS MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS.

Estos Inóculos fueron utilizados en las diferentes pruebas, tanto *in vitro* como *in vivo*.

6.1 Preparación del Inóculo del *Phytophthora palmivora*

Se tomó un cultivo puro de *Phytophthora palmivora* (sembrado en medio AZ) de seis días de crecimiento, se le agregó 10 ml de agua destilada esterilizada y posteriormente se hizo un raspado de la colonia con el fin de asegurar que los esporangios del patógeno quedaran suspendidos en el agua, se midió la

concentración y se ajustó a 1×10^4 esporangios/ml con la ayuda de una cámara de Neubauer.

6.2 Preparación del Inóculo de *Trichoderma crassum*.

Se tomó un cultivo de *T. crassum* (sembrado en medio AZ) de seis días de crecimiento, se le agregó 10 ml de agua destilada esterilizada, se hizo un raspado de la colonia para que los conidios quedaran en la suspensión y se ajustó la concentración con la cámara de Neubauer a 1×10^6 conidios/ml.

6.3 Preparación del Inóculo de *Bacillus subtilis*

De una colonia *B. subtilis* (sembrada en Agar nutriente) de 48 h de crecimiento, se tomó con un asa de siembra una porción de la colonia bacteriana y se introdujo en un tubo de ensayo con 10 ml de ADE. Se midió la concentración y se ajustó a 10^8 unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/ml) con la ayuda de una escala de tubos de Mc Farland (Klement *et al.*, 1990).

7. PRUEBA DE PATOGENICIDAD

Para llevar a cabo esta prueba, se utilizaron 12 frutos de cacao sanos (Forastero) provenientes de Tapipa, parroquia Rivas, municipio Acevedo del estado Miranda. Se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 3% por 1 min, se dejaron secar sobre papel absorbente esterilizado y posteriormente se inocularon con la suspensión de *Phytophthora palmivora*.

La inoculación se realizó de la siguiente manera:

Se tomaron cuatro frutos y se le hicieron heridas mecánicas con la ayuda de una aguja de disección esterilizada, luego se asperjó la suspensión del patógeno. De igual forma se tomaron cuatro frutos sanos (sin daños mecánicos provocados) y se asperjaron con la misma suspensión. Como testigos se usaron cuatro frutos de los cuales dos se dejaron sin heridas y a dos se le provocaron heridas mecánicas, los cuatro fueron asperjados con ADE. Todos los frutos se incubaron en cámara húmeda a temperatura de 28-30°C.

8. EVALUACIÓN *in vitro* DE *Trichoderma crassum* Y *Bacillus subtilis* PARA EL CONTROL DE *Phytophthora palmivora*.

8.1 Prueba de enfrentamiento

Para *T. crassum*, se colocó un disco de aproximadamente 5 mm de diámetro tomado de una colonia de 3 días de edad, en un extremo de una placa Petri con medio AZ y en el extremo opuesto un disco *P. palmivora* del mismo tamaño de 5 días de edad.

Para *B. subtilis*, se colocaron discos de aproximadamente 5 mm de *P. palmivora* en el centro de cada una de las placas con medio AZ. Alrededor del patógeno se ubicaron 4 discos de papel de filtro equidistantes entre si impregnados con la suspensión bacteriana, preparada como se mencionó anteriormente.

El tratamiento testigo consistió en colocar un disco del patógeno en el centro de la placa Petri, rodeado por dos discos equidistantes impregnados con ADE. Todas las placas se incubaron durante 6 días a 28-30°C.

Para evaluar la mezcla de *T. crassum* y *B. subtilis*, se hizo un enfrentamiento entre el patógeno y la mezcla de los dos microorganismos antagonistas en AZ de la siguiente manera: se tomaron discos de aproximadamente 5 mm de *P. palmivora* y se colocaron en el centro de cada una de las placas. Alrededor del patógeno se colocaron dos discos de papel de filtro, equidistantes entre si, impregnados con suspensión en mezcla de los antagonistas.

Se tomaron medidas del crecimiento/día para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC). Al final se determinó el número de esporangios/cc para calcular el porcentaje de inhibición de esporulación (PIE). Ambos porcentajes vienen dados por las siguientes fórmulas (Menten *et al.*, 1976).

Porcentaje de inhibición de crecimiento:

$$\text{PIC} = \frac{(\text{crec. del testigo} - \text{crec. del tratamiento})}{(\text{Crecimiento del testigo})} \times 100$$

Porcentaje de inhibición de esporulación:

$$\text{PIE} = \frac{(\text{esporulación del testigo} - \text{esporulación del tratamiento})}{(\text{Esporulación del testigo})} \times 100$$

Para los tratamientos *in vitro*, el análisis estadístico se realizó con el programa Statistix 8.0, vía paramétrica ya que se cumplieron los supuestos del análisis de la varianza; se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres tratamientos y 10 repeticiones. Los tratamientos se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Arreglo de los enfrentamientos *in vitro*.

Tratamientos	Descripción
T1	<i>P. palmivora</i> solo
T2	<i>P. palmivora</i> x <i>Bacillus subtilis</i>
T3	<i>P. palmivora</i> x <i>Trichoderma crassum</i>
T4	<i>P. palmivora</i> x Mezcla de <i>B. subtilis</i> y <i>T. crassum</i>

8.2 Prueba de parasitismo

Para evaluar el modo de acción de *T. crassum* sobre el patógeno, se realizó un microcultivo, el cual consistió en poner dentro de una base de una placa Petri, un portaobjeto bañado con una capa muy fina de medio agar agua. En un extremo de dicho portaobjeto se colocó un disco delgado de *T. crassum* de aproximadamente cinco mm de diámetro y al otro lado un disco de *P. palmivora* con las mismas características, esto se cubrió con un cubreobjetos. Se hicieron observaciones a partir de las 24 h tomando el cubre objeto del microcultivo donde se pudo precisar que crecía micelio de ambos organismos, se le agregó una gota de azul de algodón y se llevó al microscopio.

Para evaluar el modo de acción *B. subtilis* sobre el patógeno, se tomó la suspensión bacteriana y se esparció por completo en toda la superficie de la placa con medio AZ y se colocaron cuatro discos equidistantes de *P. palmivora* de aproximadamente cinco mm de diámetro. Se hicieron observaciones al microscopio a partir de las 24 h para determinar el tipo de interacción (Borrero y Silva, 2005).

8.3 Evaluación de la acción de metabolitos volátiles

Se sembró *T. crassum* en una base de una placa Petri con medio AZ y en otra base se sembró *P. palmivora*; se ubicaron las bases una frente a la otra y se sellarán con papel Parafilm de manera que *T. crassum* quedara en la parte inferior. El testigo consistió en poner un disco del patógeno en una base de una placa Petri con el mismo medio. Se incubaron a temperatura de 28-30° C durante 6 días. Se hicieron mediciones diarias para determinar el PIC y al final se determinó el número de esporangios/cc como se señaló en la preparación del inóculo, para calcular el porcentaje de inhibición de esporulación (PIE).

9. EVALUACIÓN *in vivo* DE *Trichoderma crassum* Y *Bacillus subtilis* PARA EL CONTROL DE *Phytophthora palmivora*.

9.1 Preparación de los tratamientos *in vivo*

Para la inoculación se utilizaron frutos de cacao sanos, sin heridas mecánicas (Forastero), recolectados en Tapipa, parroquia Rivas, municipio Acevedo del estado Miranda, que se desinfectaron previamente con hipoclorito de sodio al 3%. Se lavaron con agua destilada esterilizada para eliminar el exceso de hipoclorito de igual manera que para la prueba de patogenicidad, se dejaron secar y posteriormente se inocularon por aspersión con los diferentes tratamientos. Los tratamientos consistieron cada uno de 10 frutos, para un total de 50, tomando a cada uno como una unidad experimental. Los tratamientos quedaron conformados como se señala en el Cuadro 2.

Cuadro 2: Arreglo de los tratamientos *in vivo*.

Tratamientos	Descripción
T1	Aspersión de frutos con la suspensión que contenía solo <i>P. palmivora</i> (Testigo).
T2	Aspersión de frutos con la suspensión de la bacteria antagonista (<i>B. subtilis</i>) 24 horas antes de la inoculación con <i>P. palmivora</i> .
T3	Aspersión de frutos solo con el hongo antagonista (<i>T. crassum</i>) 24 horas antes de la inoculación con <i>P. palmivora</i> .
T4	Aspersión de frutos con la mezcla de la bacteria antagonista (<i>B. subtilis</i>) y el hongo antagonista (<i>T. crassum</i>) 24 horas antes de la inoculación con <i>P. palmivora</i> .
T5	Aspersión de frutos con el fungicida comercial Cobrex a razón de 1g/0.2L 24 horas antes de la inoculación con el patógeno.

Los frutos se incubaron en recipientes plásticos a una temperatura de 28-30° C durante 6 días, tiempo durante el cual se realizaron evaluaciones diarias para identificar el número de manchas y el diámetro de las mismas. Se utilizó la fórmula de avance relativo de la lesión de Perdomo *et al.* (2007), modificada.

La fórmula queda expresada de la siguiente manera:

$$\% \text{ Avance} = \text{LM/LF} * 100$$

Donde:

LM= Largo de la mancha

LF= Largo del fruto

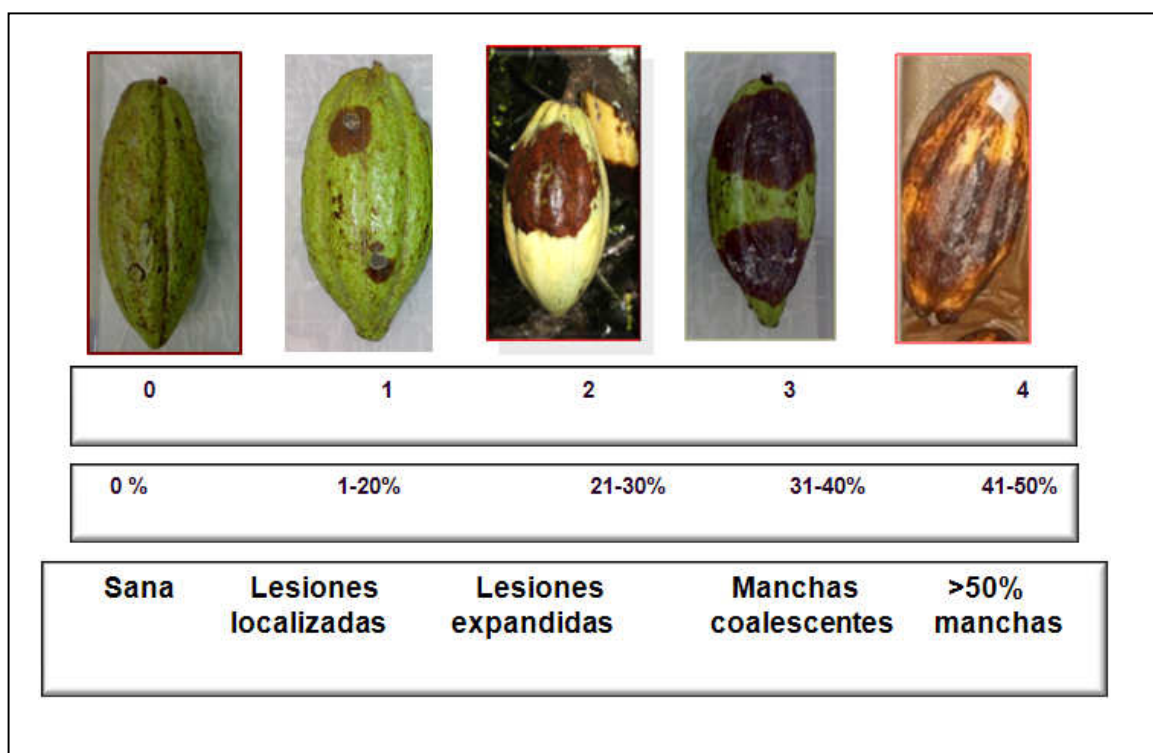
Para los tratamientos *in vivo*, el análisis estadístico se realizó con el programa Statistix 8.0, vía paramétrica ya que se cumplieron los supuestos del análisis de la

varianza; se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cinco tratamientos y 10 repeticiones.

10. Intensidad de la enfermedad

Con los porcentajes de avance obtenidos a partir de esta fórmula se estimó la intensidad de la enfermedad con la ayuda de la de la escala que se presenta en la Figura 1.

Figura 1: Escala de intensidad (Guzmán, 2011).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Descripción de síntomas

Los frutos seleccionados presentaban lesiones pequeñas (1-2,5 cm) color marrón oscuro e irregulares síntomas típicos de la pudrición parda de la mazorca causada por *P. palmivora*. (Brasier and Griffin, 1979; Erwin y Ribeiro, 1996; Capriles y Reyes, 2000; 2003; McMahon y Purwantara, 2004).

Las almendras no presentaban síntomas ni signos del patógeno ya que se tomaron mazorcas con un estado de avance temprano de la enfermedad para evitar contaminación por otros patógenos.

2. Aislamiento y caracterización del patógeno

Una vez desarrolladas las colonias en el medio de cultivo Agar zanahoria, se observaron las siguientes características macroscópicas: colonia con patrón estrellado, bordes bien definidos, micelio aéreo algodonoso, compacto, de color blanco y estructura algodonosa. Al microscopio se observó: micelio continuo hialino, poco ramificado, no toruloso, con sectores presentando hinchazones y vesículas. Los esporangióforos simples y poco ramificados. Los esporangios ovoides de 43x26 μm , papila prominente, con pedicelos cortos persistentes simétricos (Figura 2). Los esporangios germinan con facilidad en agua destilada esterilizada. Las características culturales y morfométricas de los aislamientos del patógeno respecto a forma y tamaño de esporangios, y longitud de pedicelos están dentro de los límites descritos por Waterhouse (1963), Brasier y Griffin (1979), Stamps *et al.* (1990), para *P. palmivora* (Butler) Butler.

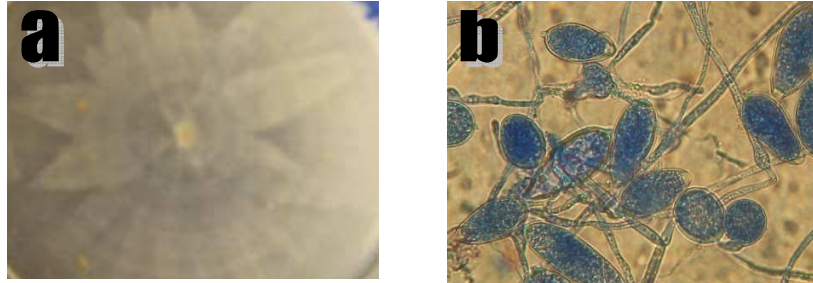


Figura 2: Características morfológicas de *P. palmivora*. a) patrón de crecimiento de *P. palmivora* en medio de cultivo agar zanahoria; b) Esporangios y micelio de *P. palmivora*.

3. Evaluación del crecimiento *in vitro* de *Phytophthora palmivora* y *Trichoderma crassum*

El crecimiento *in vitro* de *P. palmivora* (testigo) y *T. crassum* se muestra en el Cuadro 3. Para *P. palmivora*, la velocidad promedio de crecimiento fue de 0,9 cm/d, lo cual coincide con lo descrito por Parra (1998), quien obtuvo valores de crecimiento *in vitro* de 0,9-1,3 cm/d en medio de cultivo agar zanahoria.

El crecimiento de *T. crassum* fue mucho mayor que el de *P. palmivora* (2,5 cm/d para las primeras 72 h), como se muestra en la Figura 3. Además este antagonista invadió por completo la placa Petri el día número cuatro mientras que al patógeno tardó más de ocho días lograrlo.

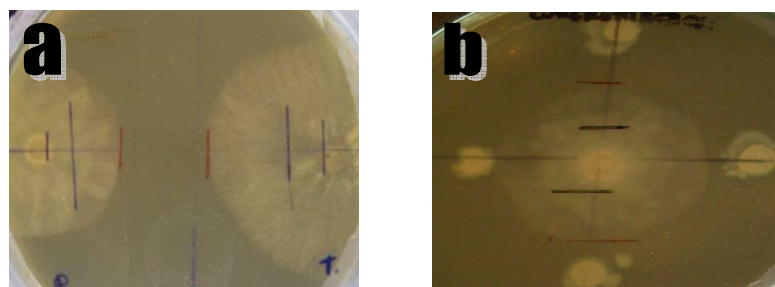


Figura 3: Crecimiento de *P. palmivora* enfrentado a los antagonistas en placas Petri con agar zanahoria. a) *P. palmivora* vs *T. crassum*; b) *P. palmivora* vs *B. subtilis*.

Cuadro 3: Crecimiento lineal *in vitro* de *P. palmivora* y *T. crassum* en placas Petri con agar zanahoria.

Tiempo (días)	1	2	3	4	5	6	7	8
Crecimiento (cm) <i>P. palmivora</i>	0,7	1,7	2,8	3,5	4,6	5,4	6,3	7,5
Crecimiento (cm) <i>T. crassum</i>	0,8	2,5	4,2	8,5	9	9	9	9

4. Caracterización del aislamiento de *Trichoderma crassum*.

Se observaron las características morfológicas y microscópicas de la colonia basándose en los criterios de algunos investigadores para identificar la especie. Entre las características morfológicas se tienen: crecimiento rápido, formando anillos concéntricos, color blanco al inicio y luego ligeramente verde, luego de varios días se tiñó el medio de color amarillo. Asimismo se presentaron las siguientes características microscópicas: micelio hialino, hifas septadas de paredes lisas, fiálides en su mayoría langeliforme y algunas ampuliforme con medidas de 6-10,2 x 2,5 μm ; se observaron 3 fiálides por verticilo, conidióforos cilíndricos con ramificación abierta de 28x2,3 μm , conidios subglobosos a ovoides, con paredes lisas de color verde oliva claro 2,5-4 x 2,6-3 μm , las clamidosporas globosas a subglobosas, apicales e intercalares midiendo 7-11 x 6,2 μm . Todo lo antes descrito concuerda con las características de la especie *Trichoderma crassum* (Stefanova *et al.*, 1999; Harman, 2006; Guzmán 2011).

5. Caracterización del aislamiento de *Bacillus subtilis*

A partir de las pruebas realizadas (Cuadro 4), se encontraron las siguientes características: Colonia color crema tendiendo a amarillo, de aspecto rugoso y bordes ondulados; se determinó que es una bacteria con forma de bacilo, Gram positiva, con presencia de esporas, aerobia facultativa, oxidasa negativa, catalasa

positiva, crecimiento a 40 y 65 ° C positivo, hidrólisis del almidón positiva, Ureasa negativa, manitol negativo, y positiva en la degradación de los azúcares. Estos datos fueron comparados con lo reportado en el manual de Schaad *et al.*, (2001), lo que permitió identificar el antagonista como *Bacillus subtilis*.

Cuadro 4: Pruebas fisiológicas y bioquímicas aplicadas a la bacteria

Prueba	Reacción	
Morfología de la colonia	Aspecto rugoso y bordes ondulados	
Color de la colonia	Crema tendiendo a amarillo	
Forma (Rojo Congo)	Bastones	
Tamaño	2-4 µm de diámetro	
Flagelos	+	
Catalasa	+	
Oxidasa	-	
Ureasa	-	
Manitol	-	
Tolerancia a sales	3%	Igual que el testigo
	5%	Afectó el crecimiento
	7%	No creció
Requerimiento de oxígeno	Aerobio facultativo	
Temperatura crecimiento	45° C	+
	65° C	+
Hidrólisis del almidón	+	
Reacción de Gram (KOH al 3%)	Gram + (No forma hilo)	



Figura 4: Características macroscópicas de la colonia de *B. subtilis*.

En el caso de *Bacillus subtilis* ha sido considerada aerobia lo cual significa que requiere oxígeno para crecer. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que ciertamente puede crecer también en condiciones anaerobias lo cual la convierte en un organismo aerobio facultativo. Además *Bacillus subtilis* contiene catalasa KatA y MrgA, una enzima responsable de la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno y, superóxido dismutasa una enzima que cataliza la ruptura del superóxido y el peróxido de hidrógeno (Bandow 2002).

6. Pruebas de patogenicidad

Los frutos con heridas presentaron los primeros síntomas 48 h después de la inoculación, cuando aparecieron lesiones pequeñas, irregulares, oscuras de aspecto húmedo (Figura 5). Estas evolucionaron rápidamente tornándose de color marrón oscuro, cuyo tamaño osciló entre 1,7 y 6,5 cm durante los 5 días de evaluación. En los frutos sin heridas, las primeras reacciones se observaron a los tres días, siendo menos notables y de evolución más lenta. La sintomatología fue semejante a lo observado en infecciones naturales. Los testigos permanecieron sanos durante la prueba. Del reaislamiento en medio AZ, se desarrolló una colonia del patógeno que presentó las mismas características de crecimiento y morfología del organismo aislado originalmente de los frutos enfermos; por lo antes descrito, se considera que la prueba de patogenicidad resultó positiva indicando que *P. palmivora* es el causante de la parda de la mazorca y además, se confirmó la virulencia del patógeno momificada (Brasier and Griffin, 1979; Erwin y Ribeiro, 1996; Capriles y Reyes, 2000; 2003; McMahan y Purwantara, 2004).

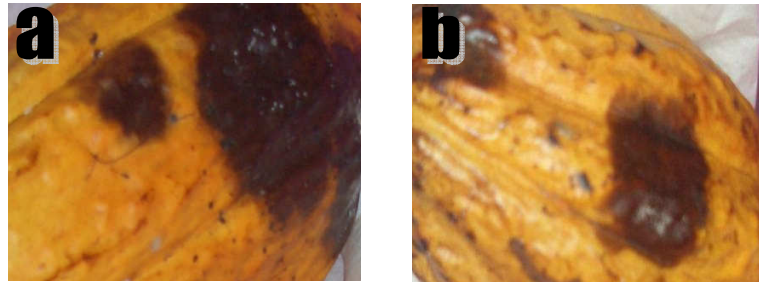


Figura 5: Síntomas de la pudrición parda de la mazorca en frutos inoculados. a) Con heridas mecánicas, b) Sin heridas mecánicas.

7. EVALUACIÓN *in vitro* DE *Trichoderma crassum* Y *Bacillus subtilis* PARA EL CONTROL DE *Phytophthora palmivora*.

7.1 Prueba de enfrentamiento *in vitro*

En las primeras 24 horas de la evaluación de los enfrentamientos entre *Phytophthora palmivora* y los diferentes antagonistas, se observó directamente en la placa Petri inhibición del crecimiento del patógeno en todos los casos. Aunado a esto, al realizar el análisis estadístico vía paramétrica con los valores obtenidos de los porcentajes de inhibición de crecimiento (PIC), se determinó diferencias significativas entre los tratamientos ($P= 0,01$); esto también se puede comprender al observar los promedios del PIC en el Cuadro 5.

El coeficiente de variación es bajo (10,1%), lo que significa que las condiciones fueron homogéneas y no se presentó alguna variabilidad notoria.

Para determinar el mejor tratamiento se usó la prueba de medias, y la comparación múltiple de Tukey. Se estableció que el mejor tratamiento fue la *P. palmivora* Vs la combinación de *T. crassum* y *B. subtilis* ubicándose en el grupo A.

Seguido de éste se encuentra el tratamiento con *P. palmivora* Vs *T. crassum*, ubicado en el grupo AB y por último el tratamiento *P. palmivora* Vs *B. subtilis* ubicado en el grupo B.

Cuadro 5: Valores de las pruebas de medias para el día 1 de evaluación.

Tratamiento	PIC promedio
<i>P. palmivora</i> Vs (<i>T. crassum</i> + <i>B. subtilis</i>)	30,35 A
<i>P. palmivora</i> Vs <i>Trichoderma crassum</i>	22,14 AB
<i>P. palmivora</i> Vs <i>Bacillus subtilis</i>	15,17 B

De acuerdo al Cuadro 6 que muestra el promedio del PIC para el día tres de la evaluación, visualmente el mejor tratamiento fue *P. palmivora* Vs *T. crassum*. Sin embargo el análisis mostró que no hay diferencias estadísticas significativas ($P=0,48$) entre este y el tratamiento *P. palmivora* Vs *T. crassum* + *B. subtilis*, ubicándose con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey en el mismo grupo A, mientras que el tratamiento *P. palmivora* Vs *B. subtilis* se ubicó en el grupo B. En este caso el coeficiente de variación fue de 12% muy similar al primer día.

En el enfrentamiento *P. palmivora* vs *T. crassum*, este antagonista invadió en todos los casos por completo la placa Petri a partir de este día de evaluación, pero en la repetición uno no se logró ver el crecimiento de *P. palmivora* a partir de allí ya que el antagonista lo cubrió.

Cuadro 6: Valores de las pruebas de medias para el día 3 de evaluación.

Tratamiento	PIC promedio
<i>P. palmivora</i> Vs <i>Trichoderma crassum</i>	28,1 A
<i>P. palmivora</i> Vs (<i>T. crassum</i> + <i>B. subtilis</i>)	24,0 A
<i>P. palmivora</i> Vs <i>Bacillus subtilis</i>	9,99 B

El análisis estadístico para el día cinco de evaluación mostró que hubo diferencias significativas ($p= 0,01$) entre los tratamientos, mientras que con la prueba de medias y la de comparación múltiple de Tukey se determinó que el mejor tratamiento fue *P. palmivora* Vs *T. crassum* + *B. subtilis* ubicado en el grupo A, seguido de éste se encuentra el segundo mejor tratamiento fue *P. palmivora* Vs *T. crassum*, ubicado en el grupo AB y por último el tratamiento *P. palmivora* Vs *B. subtilis* ubicado en el grupo B. El coeficiente de variación fue de 9,1%.

Cuadro 7: Valores de las pruebas de medias para el día 5 de evaluación.

Tratamiento	PIC promedio
<i>P. palmivora</i> Vs (<i>T. crassum</i> + <i>B. subtilis</i>)	38,2 A
<i>P. palmivora</i> Vs <i>Trichoderma crassum</i>	26,2 AB
<i>P. palmivora</i> Vs <i>Bacillus subtilis</i>	17,2 B

El resultado de los enfrentamientos permitió observar el comportamiento de los dos antagonistas contra *P. palmivora*. Todos los tratamientos mostraron un comportamiento diferente durante la evaluación.

Con respecto al porcentaje de inhibición de esporulación que fue determinado el día seis de la evaluación, se encontró que todos los tratamientos actuaron de forma positiva provocando una disminución importante en la esporulación del patógeno, lo cual se puede observar en el Cuadro 8 donde se presentan los valores del PIE.

Cuadro 8: Valores del PIE al día 6 de la evaluación

Tratamiento	PIE promedio
<i>P. palmivora</i> Vs (<i>T. crassum</i> + <i>B. subtilis</i>)	89,22
<i>P. palmivora</i> Vs <i>Trichoderma crassum</i>	77,24
<i>P. palmivora</i> Vs <i>Bacillus subtilis</i>	70,65

Con el uso de *B. subtilis* sobre *P. palmivora* se obtuvo un PIC máximo de 17,2%. Sin embargo en otras investigaciones se han encontrado reducción significativa del crecimiento ($p=0,04$) con un PIC de hasta 41% (Lagunas *et al.*, 2001).

Bacillus subtilis, *B. pumilus*, *B. licheniformes* y *B. cereus* han sido reportados como antagonicos frente a otros microorganismos fitopatogénos (Agrios, 2005).

En el caso de *Trichoderma crassum*, este mostró excelente potencial como antagonista de *P. palmivora* en todos los casos, lo cual concuerda con otras investigaciones sobre especies de éste género y de otro grupo de patógenos donde con *Trichoderma* se han obtenido PIC entre 50-97% (Suárez *et al.*, 2008; Kebe *et al* 2009).

También se ha evaluado el uso de este antagonista frente a otros patógenos del cultivo de cacao incluyendo *P. palmivora* y se ha obtenido allí valores de PIC de 40, 65, y 27% para *Moniliophthora roreri*, *P. palmivora* y *Moniliophthora perniciosa* respectivamente; el mecanismo más común de antagonismo fue la competencia por sustrato; sin embargo. También se evidencio una clara antibiosis.

Igualmente Suárez *et al.* (2008) determinaron el antagonismo *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* Rifai, frente a *Fusarium solani*, aislado de plantas enfermas de maracuyá (*Passiflora edulis*). Obteniendo un porcentaje de inhibición de crecimiento de más de 70%.

Con respecto al uso combinado de *T. crassum* y *B. subtilis*, se observó un incremento en su capacidad de control, lo cual se determinó con el porcentaje de inhibición de crecimiento y el porcentaje de inhibición de esporulación cuyos valores oscilaron entre 24-38% y 90% respectivamente, lo que indica que hay un efecto sinérgico entre estos antagonistas tal como ocurre con *P. infestans* según Lozoya *et al.* (2006).

7.2 Prueba de parasitismo

Para establecer el tipo de interacción entre *T. crassum* y *P. palmivora*, se hicieron observaciones a partir de las 24 horas. Se comprobó que el micelio presentaba un enrollamiento anormal de las hifas, las cuales además presentaron lisis (figura 6a). En cuanto a los esporangios, se encontraban vacíos y rodeados externamente por el antagonista (figura 6b), siendo todas estas características muy diferentes de las estructuras normales del patógeno (figura 6d).

En el caso de *B. subtilis*, se logró observar al microscopio que afecta las estructuras de *P. palmivora* produciendo lisis en sus hifas lo cual se puede observar en la Figura 6c.

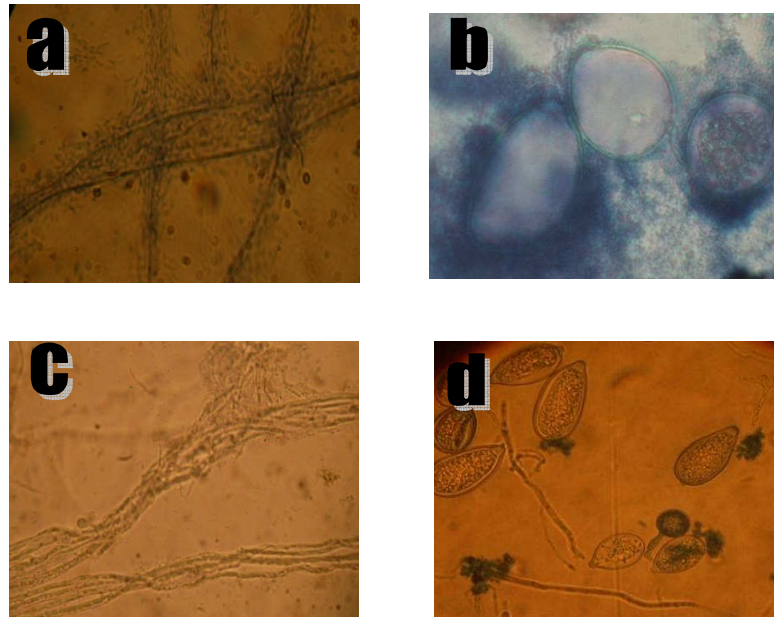


Figura 6: Interacción entre los antagonistas y *P. palmivora*. a) Parasitismo ocasionado por *B. subtilis*; b) Esporangios plasmolisados de *P. palmivora*; c) Parasitismo ocasionado por *T. crassum*; d) Micelio y esporangios normales.

7.3 Metabolitos Volátiles

Al comparar el PIC y el PIE del patógeno en este enfrentamiento con los de su testigo se determinó que hubo inhibición del crecimiento a partir de las 48 horas, y que la producción de esporangios fue muy baja como se observa en el Cuadro 9, lo cual indica que hubo producción de metabolitos secundarios y que estos afectaron el desarrollo del patógeno. El crecimiento de *T. crassum* fue mucho mayor y más rápido que el de *P. palmivora* como se puede observar en la Figura 7.

Cuadro 9: Valores de PIC y PIE en la prueba de metabolitos volátiles

Aislamiento	PIC	PIE
<i>P. palmivora</i> Vs <i>T. crassum</i>	20,3%	80,22%



Figura 7: Prueba de metabolitos volátiles de *T. crassum* contra *P. palmivora*.

Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico (Dal *et al* 1997; Hjeljord y Tronsmo, 1998).

Algunos investigadores detectaron además, que la actividad antibiótica de algunos aislamientos se debía también a la producción de compuestos volátiles. Los antibióticos volátiles tienen un efecto esencialmente fungistático, debilitando al patógeno y lo hacen más sensible a los antibióticos no volátiles, lo que se conoce como un "hiperparasitismo" de origen enzimático (Dennis y Webster, 1971; Martínez *et al.*, 1994).

Así mismo, la producción de sustancias extracelulares por las especies del género *Trichoderma*, ha sido señalada por varios investigadores que han determinado la presencia de metabolitos no volátiles con actividad antifúngica en cuatro aislamientos de *Trichoderma*, los cuales fueron capaces de reducir el crecimiento micelial *P. nicotianae* y *R. solani*. El efecto ejercido por *T. crassum* sobre *P. palmivora* podría ser debido a la producción de metabolitos volátiles, ya que se observó inhibición del crecimiento y de esporulación sin que las colonias se encontraran, es decir sin enfrentamiento directo (Stefanova *et al.*, 1999).

8. EVALUACIÓN *in vivo* DE *Trichoderma crassum* Y *Bacillus subtilis* PARA EL CONTROL DE *Phytophthora palmivora*.

Los síntomas se iniciaron en la superficie de los frutos el día dos después de la inoculación (Figura 8b). Aparecieron manchas irregulares color café, las cuales en

el caso del testigo cubrieron casi totalmente las mazorcas entre los días cinco y seis (Figura 8c). Fue posible apreciar los signos del hongo, ya que se presentó un micelio blanco, poco compacto y superficial luego del día cinco (Figura 8d).



Figura 8: Síntomas en mazorcas inoculadas. 7a) Mazorca sana; 7b) Aparición de los primeros síntomas; 7c) Mazorca cubierta casi en su totalidad por la coalición de manchas; y 7d) Signos del patógeno en las mazorcas.

Lo anteriormente descrito coincide con lo señalado por Gregory (1972) y Leal, (2005), quienes comentan que la lesión al nivel de los frutos se inicia con manchas color café en la superficie, que rápidamente se agrandan y extienden por toda la superficie a través de la mazorca. Sin embargo los mismos autores hacen referencia a la aparición de signos 2 o 3 semanas después de la primera mancha y en este caso, surgieron a partir del día cuatro, lo cual puede ser debido a las condiciones de alta humedad y concentración de inóculo presente en cada mazorca dentro de la cámara húmeda. Las almendras que se infectan resultan inservibles y en un plazo de 10 a 15 días la mazorca está totalmente podrida (Chee 1974; Waterhouse 1983).

El análisis de varianza para el primer día de evaluación, mostró diferencias significativas ($P= 0,001$) entre los diferentes tratamientos. Para determinar los mejores tratamientos se usó en la prueba de medias, y la comparación múltiple de Tukey con la cual se destacaron dos grupos: el grupo A, donde se encuentra el tratamiento solo con el patógeno donde se registró el mayor porcentaje de avance y el grupo B, donde se ubicaron los demás tratamientos. Los valores promedios de porcentaje de avance se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10: Valores de los porcentajes de avance de la mancha para el día 1 de evaluación.

Tratamiento	% Avance promedio
<i>P. palmivora</i>	2,6 A
<i>P. palmivora</i> Vs <i>Bacillus subtilis</i>	0,6 B
<i>P. palmivora</i> Vs <i>Trichoderma crassum</i>	0,0 B
<i>P. palmivora</i> Vs (<i>T. crassum</i> + <i>B. subtilis</i>)	0,0 B
<i>P. palmivora</i> Vs Cobrex	0,0 B

El análisis para el día tres de la evaluación también reveló diferencias significativas ($p= 0,001$) entre los tratamientos lo cual se puede evidenciar claramente en el Cuadro 11, donde se muestra los porcentajes de avance promedio para cada uno, obteniendo el tratamiento del patógeno solo el valor más alto ubicándose en el grupo A, y el tratamiento de la combinación de los antagonistas el valor más bajo en el grupo C junto con el tratamiento químico lo cual indica que fueron los mejores y que redujeron en mayor porcentaje el avance de la enfermedad.

Cuadro 11: Valores de los porcentajes de avance de la mancha para el día 3 de evaluación.

Tratamiento	% Avance promedio
<i>P. palmivora</i>	5,9 A
<i>P. palmivora</i> Vs <i>Bacillus subtilis</i>	3,4 B
<i>P. palmivora</i> Vs <i>Trichoderma crassum</i>	1,3 C
<i>P. palmivora</i> Vs Cobrex	0,4 C
<i>P. palmivora</i> Vs (<i>T. crassum</i> + <i>B. subtilis</i>)	0,0 C

Durante los siguientes días de la evaluación, los tratamientos mostraron el mismo patrón con respecto al porcentaje de avance, destacándose siempre la combinación de los antagonistas como el mejor tratamiento ubicándose en el grupo B junto con los tratamientos *T. crassum* y Cobrex (Cuadro 12). Esto además, pudo detectarse directamente al observar el desarrollo de la enfermedad sobre las mazorcas para cada uno de los tratamientos como se observa en la Figura 10.

Cuadro 12: Valores de los porcentajes de avance de la mancha para el día 5 de evaluación.

Tratamiento	% Avance promedio
<i>P. palmivora</i>	11,5 A
<i>P. palmivora</i> Vs <i>Bacillus subtilis</i>	8,9 A
<i>P. palmivora</i> Vs <i>Trichoderma crassum</i>	3,7 B
<i>P. palmivora</i> Vs Cobrex	1,5 B
<i>P. palmivora</i> Vs (<i>T. crassum</i> + <i>B. subtilis</i>)	1,5 B

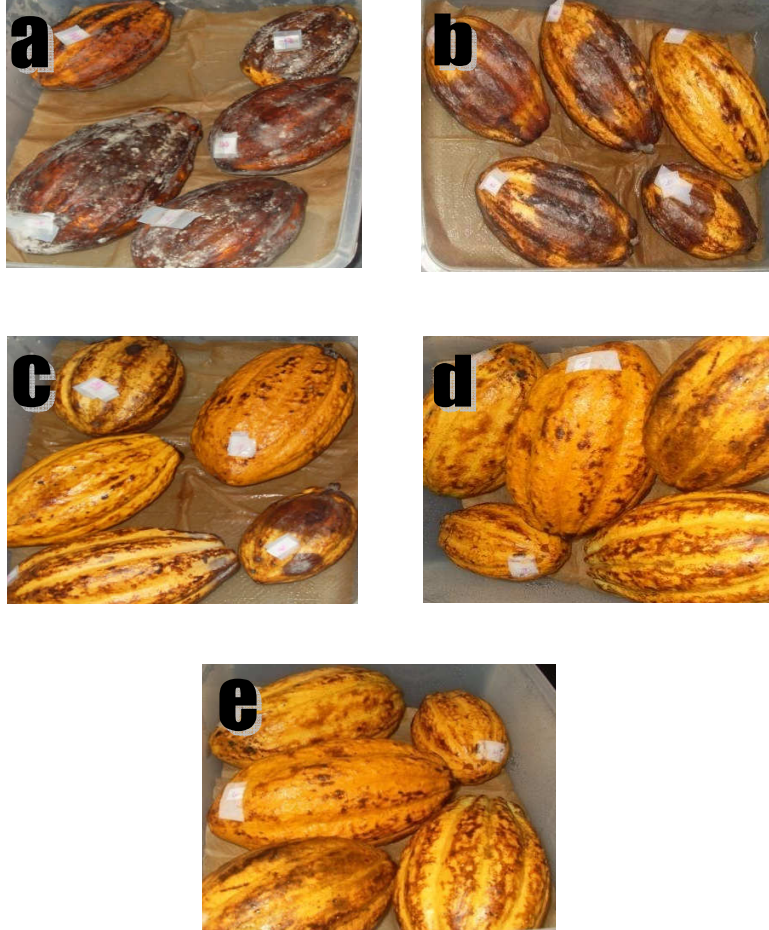


Figura 9: Avance de la enfermedad en las mazorcas con los diferentes tratamientos. a) *P. palmivora* solo; b) *B. subtilis*; c) *T. crassum*; d) Combinación de antagonistas; e) Cobrex.

El aislamiento de *B. subtilis* utilizado en esta evaluación, no redujo de forma significativa el porcentaje de avance del patógeno (16, 25%) cuando se usó solo. Sin embargo, Omur *et al.* (2008) obtuvieron valores de reducción de la incidencia de la enfermedad de hasta 75% con el aislamiento EU07 con otros patógenos entre ellos *Fusarium oxysporum*, esto puede ser debido a que esta especie posee sustancias activas con propiedad de reprimir fitopatógenos, otros autores lo reportan como biocontrolador de *Colletotrichum gloesporioides* (Hansen, 1992; Botero y Aranzazu, 1999; Delmoral, 2009).

Bacillus subtilis es efectivo contra hongos fitopatógenos ya que provoca una fuerte inhibición del crecimiento micelial ya sea por competencia por nutrientes, por exclusión de sitio o colonización del patógeno, así como también por la liberación de metabolitos secundarios, capaz de afectarlos (Hansen 1992; Butt *et al.* (1999). En el caso del género *Phytophthora*, Torres *et al.* (2001) catalogan a esta bacteria como supresor.

Otras especies de este género han sido reportadas como antagonistas efectivos del mismo género *Phytophthora*. Melnick *et al.*, (2008) informan que se logró reducir significativamente la severidad de la enfermedad causada por *P. capsici* ($P= 0.05$) en cacao usando *B. cereus* el cual alcanzó una colonización estable epifítica de las hojas. Sin embargo esta no logró moverse por los tejidos vasculares ya que en las hojas no había presencia de bacteria pero cabe mencionar que si indujo una forma de resistencia sistémica.

Con respecto al antagonista *T. crassum*, los resultados fueron positivos ya que en todos los casos logró disminuir de manera significativa el avance de la enfermedad. Sin embargo, esta especie ha sido reportada poco en la literatura como agente efectivo de control de la pudrición parda de la mazorca en comparación con otras especies de este género. Guzmán (2011) observó efecto inhibitorio con este antagonista sobre *P. palmivora* al establecer comparaciones entre los valores de PIC, PIE y grado antagonismo con los del testigo.

Otras especies del género *Trichoderma* han sido reportadas como antagonistas de *Phytophthora* en el cultivo de pimentón, Mohammed *et al.* (2004) determinaron que *T. harzianum* ejerce una mayor competencia por espacio y nutrientes e interacciona directamente con *Phytophthora capsici* (hiperparasitismo). Aunado a eso, Deberdt *et al.* (2008) usaron *T. asperellum* (cepa PR11) y el fungicida Ridomil, obteniendo resultados positivos en la reducción del avance de la enfermedad.

La combinación de los antagonistas produjo un ligero incremento con respecto al efecto producido de forma individual por cada uno, lo cual puede ser debido a una forma de simbiosis entre estos dos biocontroladores. Aunque en la literatura, principalmente se ha reportado el uso de antagonistas de forma individual en un mismo tratamiento, así es el caso de Lozoya *et al.* (2006), que determinaron la efectividad antagónica de *Pseudomonas* y *Trichoderma* sp contra *Phytophthora infestans*.

Bacillus spp., *Pseudomonas* y *Trichoderma* spp., han sido ampliamente usados en el control *Phytophthora infestans* y otros patógenos tanto de forma separada y conjunta obteniendo diferencias significativas en la reducción de las enfermedades tanto en invernadero y en campo como en campo (Lisboa 2003; Lozoya *et al.*, 2006; Rojas 2009).

9. Intensidad de la enfermedad

Se estimó el índice de intensidad, por medio de la escala de intensidad diseñada por Guzmán (2011), donde se refleja de forma muy precisa el grado y la apreciación cualitativa de la enfermedad de acuerdo a los valores obtenidos en los porcentajes de avance con la fórmula de Perdomo ya mencionada (Cuadro 13).

Cuadro 13: Valores de Intensidad de la enfermedad determinados con los porcentajes de avance máximo de cada tratamiento.

Tratamiento	Índice de intensidad (% de avance máximo obtenido)	Grado de la Enfermedad (escala de intensidad)	Apreciación Cualitativa (escala de intensidad)
1	43	4	>50% con manchas
2	35	3	Manchas coalescentes
3	13	1	Lesiones localizadas
4	7	1	Lesiones localizadas
5	6	1	Lesiones localizadas

CONCLUSIONES

Al evaluar la efectividad antagónica de *Trichoderma crassum* y *Bacillus subtilis* por separado y en combinación ante *Phytophthora palmivora* en condiciones *in vitro*, se observó que el mejor tratamiento fue la combinación de los antagonistas seguido de *T. crassum* aplicado solo y luego *B. subtilis*.

En relación al porcentaje promedio de avance de la mancha promedio se determinó que el mejor tratamiento *in vivo* fue la combinación de los antagonistas, cuyo comportamiento fue igual al del tratamiento químico.

Lo antes mencionado, resalta que mediante esta investigación, se logró determinar que el uso combinado de estos biocontroladores se puede utilizar, junto con otras estrategias dentro del manejo integrado del cultivo, para contribuir a la reducción de la pudrición parda de la mazorca en cacao de manera efectiva.

RECOMENDACIONES

1. Realizar muestreos en las zonas cacaoteras del país para detectar otras posibles cepas endófitas de *Bacillus*. antagonistas de *P. palmivora*.
2. Evaluar en campo el uso combinado de *T. crassum* y *B. subtilis* de *P. palmivora* junto con otras estrategias, dentro del manejo integrado del cultivo, para contribuir a la reducción de la pudrición parda de la mazorca en cacao de manera efectiva.
3. Asimismo evaluar en campo el mejor momento de aplicación de esta combinación de antagonistas, para que su efecto sea positivo.
4. Identificar los metabolitos producidos por *T. crassum* en los enfrentamientos con *P. palmivora*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGRIOS G. 2005. Plant Pathology. Fifth edition. Elsevier Academic Press. London, UK. 922 p.
2. ALLISON, C. 2002. Agronegocios en Venezuela, 1ª edición. IESA. Caracas.
3. APONTE, G. 2009. Determinación de grupos de metabolitos secundarios producidos por aislamientos de *Trichoderma* spp. Tesis de pregrado. Universidad Central de Venezuela. Maracay Venezuela. 27 p.
4. ARCIA, A. 1997. Avance en el control biológico de enfermedades en plantas, algunas experiencias en cultivos hortícolas. En: VII Congreso Nacional de Hortalizas. Memorias. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 43-71 pp.
5. ATTARD A, GOURGUES M, GALIANA E, PANABIÈRES F, PONCHET M, KELLER H. 2008. Strategies of attack and defense in plant-Oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. nicotianae* Breda da Haan). Journal of Plant Physiology 165:83-94.
6. BARROSIN, O. 1981. Cacao. ICA. Manual de Asistencia Técnica nº 23. Bogotá. 285 p.
7. BASURTO, G.; VÁQUEZ, M.; FONT, M. y GARCÍA, J. 2006. Microscopia electrónica de barrido en el estudio de la actividad antagonista de *Bacillus subtilis* frente a los hongos patógenos de fresa: *Fusarium verticillioides* y *Rhizoctonia solani*. Instituto de Ciencias Agrícolas. Universidad de Guanajuato.
8. BACKMAN P, WILSON M, MURPHY J. 1997. Bacterial for biological control of plant disease. In: Rechcigl, N.A., Rechcigl, J.E. (Eds.), Environmentally Safe Approaches to Plant Disease Control. CRC/Lewis Press, Boca Ratón, FL, pp. 95–109.
9. BERRY D, CILAS C. 1994. Etude génétique de la réaction à la pourriture brune des cabosses de cacaoyers issus d'un plan de croisement diallele. Agronomie 14:599-609.
10. BRADA, I.; QUINTANA, E.; PELAYA, E. y ARAUJO, T. 1995 Efecto de *Bacillus* sp. sobre la germinación y desarrollo de semillas de tomate (*Lycopersicum esculentum* M.) infestadas con *Fusarium oxysporum* Schl.var. *cubensis* Smith. Resúmenes Bioplág 95. (1995, Ciudad Habana, Cuba). INIFAT p. 11.

11. BRASIER, C. AND GRIFFIN, M. 1979. Taxonomy of *Phytophthora palmivora* on cocoa; Trans. Br Mycol Soc. 72: 111-14.
12. BENHAMAOU, N. y CHET, I. 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultraestructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. Phytopathology 83: 1062-1071.
13. BENITEZ, T.; RINCON, A.; LIMON, C.; CONDON, A. 2004 Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Universidad de Sevilla. España International Microbiology 7: 249-260.
14. BOTERO, M. y ARANZAZU, F. 1999. Estudios de la interacción biológica de microorganismos relacionados con *Colletotrichum gloesporioides* Penz agente causal de la antracnosis en tomate de árbol. CORPOICA. Manizales. 58pp
15. BORRERO, C. SILVA, M. 2005. Efectos de *Trichoderma* (*in vitro*) en los microorganismos no patógenos descomponedores de la materia orgánica de un suelo Oxisol clase IV del piedemonte llanero. Revista Orinoquia. Vol. 9 Universidad de los Llanos.
16. BRADA, L.; QUINTANA, E.; PELAYA, E. y ARAUJO, T. 1995. Efecto de *Bacillus* sp. sobre la germinación y desarrollo de semillas de tomate (*Lycopersicum esculentum* M.) infestadas con *Fusarium oxysporum* Schl. Var. cubensis Smith. Resúmenes Bioplag. Cuba. 11 p.
17. BUCHANAN, R., y GIBBONS, N. 1974. Endospore forming rods and cocci. Part. Eight Editions. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. . p. 529-549.
18. CAPRILES DE REYES, L. y REYES, H. 2000. El cacao en Venezuela: Moderna tecnología de su cultivo. Editado por Chocolates El Rey, C.A. Caracas, Venezuela. 261 p.
19. CARSOLIO C., BENHAMOU, N., HARAN, S., CORTÉS, C., GUTIÉRREZ, A., CHET, A, and HERRERA-ESTRELLA, A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. Appl. Environ. Microbiol. 65:929-935.
20. CHAVARRIA, M.; L. URIBE y A. BOLAÑOS. 2006. Microorganismos benéficos en el control de enfermedades en Jengibre. Revista Agronomía Costarricense. 29: 145-155.
21. CHEE, K. 1974. Taxonomy of cacao isolates. Rer. appl Mycol 48: 337.
22. COOK, J. y BAKER, K. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. ST. Paul, Minnesota. APS Press. 539 p.

23. CORPOANDES [En línea]. URL: <<http://www.corpoandes.gov.ve/?q=node/109>> [Consulta: 21 de Mar. 2010].
24. DAL, B.; MONACO, C. y CHEVES, A. 1997. Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo. Revista Iberoamericana de Micología 14: 131-1345.
25. DEBERDT, P.; MFEGUE, C.; TONDJE, P.; BON, M. DUCAMP, M.; HURARD, C.; BEGOUDE, B.; NDOUMBE-NKENG, M.; y HEBBAR, P. 2008. Impact of environmental factors, chemical fungicide and biological control on cacao pod production dynamics and black pod disease (*Phytophthora megakarya*) in Cameroon Cilas. Biological Control 44: 149–159.
26. DELMORAL, M. 2009. Evaluación *in vivo* de la efectividad de la bacteria *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn para el control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* penz causante de la antracnosis en frutos de mango (*mangifera indica* L.) Trabajo presentado como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo, Mención Agroindustrial. Universidad Central de Venezuela. 28 P.
27. DENNIS, C., AND WEBSTER, J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. I. Production of nonvolatile antibiotics. Transaction of the British Mycological Society 57:25-39.
28. Efombagn M, Marelli J, Ducamp M, Cilas C, Nyassé S, Vefonfe D. 2004. Effect of fruiting traits in the field resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones to *Phytophthora megakarya*. Journal of Phytopathology 152:557-562.
29. ERWIN, D. and RIBEIRO, O. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. St paul, Minnesota, USA: APS Press.
30. FERNANDEZ, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo integrado de plagas. Costa Rica. Nº 62. pp 86-100.
31. FERNANDEZ, O. 2006. Temas interesantes acerca del control microbiológico de plagas. Segunda edición ampliada y actualizada. Mérida-Venezuela. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. 138 pp.
32. FRAVEL D. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. Annual Review of Phytopathology 43:337-359.
33. GARCÍA, F. 2004. Qué es el Control Biológico. Guía de insumos biológicos para el manejo integrado de plagas. Edición Harmonia. Corporación para el Desarrollo de Insumos y Servicios Agroecológicos. Colombia. 103 p.

34. GONZÁLEZ E. 2007. Denominación de origen Cacao Chuao. Consultoría realizada para la FAO y el IICA en el marco del estudio conjunto sobre los productos de calidad vinculada al origen. [En línea]. URL<http://www.fao.org/ag/agn/agns/Projects_SQP_Santiago/Documentos/Estudios%20de%20caso/Cacao_Venezuela.pdf> [Consulta: 21 de Mar. 2011].
35. GONZÁLEZ, A.; FERNÁNDEZ, J.; RODRÍGUEZ, R.; BELTRÁN, C.; LACASA, A.; y LÓPEZ, J. 2002. Control biológico *in Vitro* de *Phytophthora capsici* mediante cepas de PGPR *Bacillus subtilis*. Phytoma España: La revista Profesional de Sanidad Vegetal. p 24-33.
36. GREGORY, P. 1972. Cocoa: The importance of black pod disease. Journal of the Agricultural Society of Trinidad y Tobago (Trinidad) 72(2):155-160
37. GRIFFITH, J.; SMILLIE, R.; NIERI, J.; and GRANT B. 1992. Target sites of fungicides to control Oomycetes. In W. Koller (Eds.), Target sites of fungicides. CRC Press FL. Boca Ratón, pp. 69–99.
38. GUILLEN, R.; F. HERNANDEZ y G. GALLEGOS. 2006. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo Infestado con *Fusarium spp*, *Rhizoctonia solana* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonina y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 24: 105-114.
39. GUZMÁN, A. 2011. Uso de *Trichoderma* spp para el control *in vitro* e *in vivo* de *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler en mazorcas de cacao (*Theobroma cacao* L.). Trabajo de grado. Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay-Venezuela. 40pp.
40. HANADA, R.; WILLIAM, A.; POMELLA, V.; SALAZAR, H.; COSTA, J.; BEZERRA, J.; LOGUERCIO, L.; and PEREIRA, J. 2010. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuacu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. Fungal Biology 14:901-910.
41. HANSEN, W. 1992. Control fitosanitario moderno precosecha y poscosecha, para proteger la calidad de frutas y verduras de exportación. Sociedad Alemana de Cooperación Técnica. 141-151 p.
42. HARMAN, G. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96:190-194.
43. HJELJORD, L.; and A. TRONSMO. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: Kubice CP. (Eds). 2:131-151.

44. INBAR, J.; and CHET, E. 1996. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biol. Biochem.* 28, 757-763.
45. HOWELL, C. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts
46. INDEX FUNGORUM. 2010. CABI Bioscience. [En línea]. Dirección URL:<<http://www.indexfungorum.org/Names/IndexFungorumPartnership.htm>> [consulta: 05 de abril.2010].
47. IWARO, A.; SCREENIVASAN, T.; and UMAHARAN, P. 1999. *Phytophthora* resistance in Cacao (*Theobroma cacao*): Influence of pod morphological characteristics. *Plant Pathology* 46:557-565.
48. JAIMES, Y.; MORENO, C.; Y COTES, A. 2010. Inducción de resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum* en tomate por *Trichoderma koningiopsis* th003. CORPOICA A.A. Bogotá, Colombia. 51 p.
49. JUDELSON H, BLANCO F. 2005. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology* 3:47-58.
50. KÉBÉ, I.; MPIKA, J.; ISSALI, E.; GUESSAN, N.; DRUZHININA, S.; KOMON-ZÉLAZOWSKA, M.; KUBICEK, C.; and AKÉ, S. 2009. *African Journal of Biotechnology* 20:5280-5293.
51. KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K. Y SANDS, D. 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai. Kiado. Budapest. 568 p.
52. KORSTEN, L.; DE VILLIERS, E. ; WEHNER, R. ; and KOTZET, J. 1997. Field spray of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of pre-harvest fruit disease of avocado in South Africa. *Plant Disease* 8: 455-459.
53. KRAUSS, U.; HOOPEN, M. HIDALGO, E. MARTÍNEZ, A. ARROYO, C. GARCÍA, J. PORTUGUEZ, y A. SÁNCHEZ, V. 2003. Manejo integrado de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*) en Talamanca, Costa Rica. *Agroforestería de las Américas* 10:52-58.
54. KYUNG, M.; SE-CHUL, C.; and KI DEOK K. 2008. Biological control of *Phytophthora* blight of pepper by antagonistic Rhizobacteria selected from a sequential screening procedure. *Biological Control* 46:424–433

55. LAGUNAS, J.; ZAVALETA, E.; OSADA, S.; ARANDA, S.; LUNA, I.; y VAQUERA, H. 2001. *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* LEO en jitomate. Revista Mexicana de Fitopatología 19:57-65.
56. LEAL, A. 2005. Caracterización de árboles superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por el programa de mejoramiento genético del Catie. Tesis de Postgrado. Magister Scientiae. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
57. LISBOA, M. 2003. Efectividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum*, sobre la incidencia y severidad de la pudrición gris (*Botrytis cinerea*), en *Vid vinifera*. Tesis de Grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Talca, Chile. Universidad de Talca. 49 p.
58. LOZOYA, H.; COYOTE, M.; FERRERA, R. y LARA, E. 2006. Antagonismo microbiano contra *Phytophthora infestans* (MONT) DE BARY. Agrociencia 40: 491-499.
59. MCMAHON, P.; and PURWANTARA, A. 2004. *Phytophthora* on cocoa. Diversity and Management of *Phytophthora* in Southeast Asia. Drenth, A.; Guest, D.I. (Editors). Australian Center for International Agricultural Research. Monograph, 114. Canberra, AU. p. 104-115.
60. MARTÍNEZ, S. 2005. Análisis del cultivo del cacao en San Ignacio de Mojos, Beni. Rev. Bol. Quim, 26:10-15.
61. MARTÍNEZ, S.; TERRAZAS, E.; y ÁLVAREZ, T. 1994. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos polares de plantas del género *Baccharis* sobre fitopatógenos. Rev. Bol. Quim, 27:13-18.
62. MARQUINA, J. 2005 "Venezuela se olvida del cacao" en Observatorio de la Economía Latinoamericana 46: 104-115.
63. MELNICK R.; ZIDACK N.; BAILEY B.; MAXIMOVA, S.; GULTINAN, M.; and BACKMAN, P. 2008. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. From annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. Biological control 6:46-56.
64. MENDGEN, K.; SCHIEWE, A.; and FALCONI, C. 1992. Biological control of plant diseases. Biol crop Protection 45: 5-20.
65. MENTEN, L.; MACHADO, C.; MINUSSI, E.; CASTRO, C. y KIMATI, H. 1976. Efecto de algunos fungicidas en el crecimiento micelial de *Macrophomina phaseolina* (TASS) *in vivo*, Revista de Fitopatología Brasileña 1:57-66.

66. MOHAMMED, E.; PÉREZ, C.; AHMED, S.; REQUENA, M. Y CANDELA, M. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.) Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia. Anales de Biología 26: 35-45.
67. MOTAMAYOR, J.; LACHENAUD, P.; DA SILVA, J.; LOOR, R.; KUHN, D.; BROWN, S.; and SCHNELL, R. 2008. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). Journal pone. University of Chicago.
68. MOYA, A.; CASTELLANO, G.; RUMBOS, R.; y QUEVEDO, H. 2007. Situación fitopatológica del cacao criollo en tres localidades del occidente del país. INIA Divulga. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. [En línea].URL<:http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasTecnicas/inia_divulga/numero%204/moya_a.pdf> [Consulta: 21 de Mar. 2011].
69. OMUR, B.; CALISKAN, M.; and YESILOVA, O. 2008. An inhibitory effect of a new *Bacillus subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. radicles-lycopersici. Physiological and Molecular Plant Pathology 73: 25–32.
70. ONGENA, M. and JACQUES, P. 2007. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology 16:115-125
71. PAREDES, J.; CARRILLO, J.; GARCÍA, R.; ALLENDE, R.; SAÑUDO, J.; y VALDEZ, J. 2008. Microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicerarietinum* L.) en el estado de Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 27:27-35.
72. PARRA, D. 1998. Caracterización morfológica y fisiológica de aislamientos de *Phytophthora* de Bary, obtenidos de cacao de la región de Barlovento, Edo. Miranda. Tesis de postgrado. Magister Scientiarum. Universidad Central de Venezuela Maracay. Venezuela.. 70 p.
73. PERDOMO, R.; HERNÁNDEZ, A.; GONZÁLEZ, A.; PINEDA, J. y ALEZONES, J. 2007. Caracterización y evaluación de virulencia en aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn, causante de la mancha bandeada en maíz. Interciencia 32: 48-54.
74. PESHIN, R.; and DHAWAN, A. 2009. Integrated Pest Management: Innovation Development Process. Classical publishing company. New Delhi Springer. 67 pp

75. RISTAINO, J.; and GUMPERTZ, M. 2000. New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus *Phytophthora*. Ann. Rev. Phytopathology 38: 541-576.
76. ROJAS, C. 2009. Evaluación *in vivo* de la efectividad biocontroladora de *Bacillus subtilis* y dos cepas nativas de *Trichoderma* spp sobre la incidencia del tizón tardío (*Phytophthora infestans*) y otros patógenos foliares en plantas de tomate cv. maría Italia. Tesis de grado. Ingeniero Agrónomo. Universidad de Talca. Talca, Chile.
77. RYTTER, J.; LUKESIC, F.; CRAING, R. y MOORMAN, G. 1989. Control biológico de la Roya del geranio por *Bacillus subtilis*. Fitopatología 79: 367-369.
78. SANOGO, S.; POMELLA, A.; HEBBAR, P.; BAILEY, B.; COSTA, J.; SAMUELS, G.; and LUMSDEN R. 2002. Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis pernicioso* on Cacao. Phytopathology 92:1032-1037.
79. SCHAAD, N.; JONES, J.; and CHUN, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3 ed. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul Minnessota. 373 pp.
80. STEFANOVA, A.; L. LEIVA; and F. CORONADO. 1999. Selectividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Rev. Facultad de Agronomía (LUZ) 16:509-516.
81. SUÁREZ, C.1987. Manual del cultivo de cacao. Estación Experimental Tropical Pichilingue. Quevedo, Ecuador. 109 p.
82. SUÁREZ, C.; FERNÁNDEZ, R.; VALERO, N.; GÁMEZ, R.; y PÁEZ, A. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá .Revista Colombiana de Biotecnología 10: 35-43.
83. TORRES, L.; WONG, W.; MIGUEL, A.; FERNANDEZ, A.; y AMAT, Z. 2001. Actividad antagonica de especies de *Bacillus* spp contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. Revista Fitosanida 5:150-163.
84. WALKER, C.; and VAN WEST, P. 2007. Zoospore development in the oomycetes. Fungal Biology Reviews 21:10-18.
85. WATERHOUSE, G. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycological Papers 92: 1-22.

86. WATERHOUSE, G. 1983. *Phytophthora palmivora* and some related species. In *Phytophthora* Disease of Cocoa: 51-70 Ed P.H Gregory, Logman Press London.
87. ZETMYER, G. 1988. Origin and distribution of four species of *Phytophthora*. British Mycological Society 91: 367-378.