

# **Evaluación del efecto de fungicidas sobre el desarrollo de dos especies de *Trichoderma* (Fungi: Ascomycota: Hypocreaceae) utilizadas en el biocontrol de hongos patógenos de cacao**

Raquel Guerrero y David Arias

Universidad Estatal Amazónica, Km 2 ½ Vía Napo, Pastaza, Ecuador.  
rguerrero@uea.edu.ec

---

## **Resumen**

En las huertas de cacao de Ecuador, la presencia de dos hongos patógenos *Moniliophthora perniciosa* (escoba de bruja) y *M. roreri* (moniliasis) destruyen gran parte de la producción. Existen varias opciones de manejo disponibles para disminuir este impacto que incluye prácticas culturales, control químico y resistencia. Adicionalmente, varios centros de investigación están evaluando medidas de control biológico con buenas expectativas para integrarlas a la estrategia de Manejo Integrado del Cultivo (MIC). Para el buen éxito del manejo integrado los agentes de biocontrol deben ser resistentes al fungicida químico, caso contrario se verían afectados y no podrían desempeñar su actividad beneficiosa. Dos promisorios agentes de biocontrol para cacao, los hongos *Trichoderma koningiopsis* y *T. stromaticum*, se usaron en esta investigación cuyo objetivo fue determinar si el uso de dos fungicidas (óxido de cobre y azoxistrobina) recomendados en cacao, tiene efecto negativo sobre las dos especies de *Trichoderma*. Para el experimento se preparó el medio de cultivo agregado con los fungicidas óxido de cobre y azoxistrobina sobre el cual se inocularon los hongos. La evaluación se realizó en función del crecimiento de los biocontroladores. Los resultados muestran que *T. koningiopsis* no inhibió su crecimiento en ningún caso; sin embargo, su crecimiento en el medio conteniendo azoxistrobina fue considerablemente mayor al obtenido en el medio con óxido de cobre. Por su parte, *T. stromaticum* únicamente creció en el medio con azoxistrobina. Estos resultados dejan abierta la posibilidad de integrar los agentes de biocontrol y los químicos en la estrategia de manejo integrado del cultivo de cacao según se presente la necesidad.

## Abstract

The presence of the fungal pathogens *Moniliophthora perniciosa* (witches' broom) and *M. roreri* (moniliasis) on cacao crops in Ecuador destroys large percentages of the production. There are various methods currently used to reduce the impact of these pathogens, including cultural practices, chemical control and genetic resistance. Additionally, several research centers are evaluating biological control measures with good prospects for Integrated Crop Management (ICM). For integrated management, in which the application of chemical fungicides is combined with biological control methods, the biocontrol agents should be resistant to the chemical fungicide. This investigation evaluated two biological control agents, *Trichoderma koningiopsis* and *T. stromaticum* that have the potential to be included into integrated control management programs for cacao. The biocontrol agents were tested with two commonly-used cacao fungicides, copper oxide and azoxystrobin. The results show that while *T. koningiopsis* grew in all the treatments, it grew considerably more when used in conjunction with the fungicide azoxystrobin than with copper oxide. *Trichoderma stromaticum* only grew with azoxystrobin. These results demonstrate the possibilities for future use of these two biocontrol agents in integrated management strategies for cacao crops.

**Palabras Claves:** *Trichoderma stromaticum*, *Trichoderma koningiopsis*, biocontrol, cacao, *Theobroma cacao*, fungicidas, azoxistrobina, óxido de cobre

## Introducción

Las semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) son uno de los principales productos agrícolas de exportación del Ecuador y por tanto son importante para la economía nacional (Jano, 2007). El potencial productivo está amenazado por problemas fitosanitarios que producen graves daños en las plantaciones, por la incidencia de enfermedades endémicas que provocan un decremento y grandes pérdidas en la producción de cacao (Suárez, 1993). Los agentes patógenos

más peligrosos del cacao, con respecto a su impacto económico, incluyen *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Philips-Mora, que provoca la enfermedad llamada escoba de bruja y *M. roreri* (Cif.) H.C. Evans, Salpers, Samson & Benny, agente causal de la moniliasis, mancha o helada.

Para controlar estas enfermedades se aplican prácticas culturales, aspersión de fungicidas y resistencia genética (Suárez, 1993; Hebbar *et al.*, 1999); sin embargo, existen opciones amigables con el

medio ambiente tales como el uso de agentes de control biológico. Hebbbar *et al.* (1999) sostienen que el control biológico de enfermedades en cacao, aunque está todavía en fase de desarrollo, ofrece expectativas como una alternativa, o como parte de la estrategia para el control sostenible de las enfermedades mencionadas. En los sistemas de Manejo Integrado del Cultivo (MIC) se combina el uso de fungicidas químicos con agentes de control biológico, pero en este caso, el agente de biocontrol debería ser resistente al fungicida químico. Por tal razón, en la presente investigación se buscó determinar *in vitro* el efecto de los fungicidas óxido de cobre y azoxistrobina sobre el desarrollo de los biocontroladores *Trichoderma stromaticum* Samuels & Pardo-Schulth. y *Trichoderma koningiopsis* Samuels (Fungi: Ascomycota: Hypocreaceae), hongos que han mostrado la capacidad de controlar enfermedades en cacao en un nivel comparable al ejercido por los fungicidas. Los resultados obtenidos pueden ayudar a desarrollar una estrategia de Manejo Integrado de las enfermedades del cultivo de cacao, que incluya tanto el uso de fungicidas como agentes biocontroladores.

## Materiales y Métodos

El estudio del efecto de los fungicidas sobre el desarrollo de los

hongos biocontroladores se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, y para ello se evaluó el crecimiento de *Trichoderma koningiopsis* y *T. stromaticum*. Estos hongos se inocularon en medios de cultivo con los fungicidas óxido de cobre (Cu<sub>2</sub>O) y azoxistrobina (C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>). Las cepas de *T. koningiopsis* (01) y *T. stromaticum* (5.09) proceden de la colección de hongos biocontroladores del INIAP, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador.

Se preparó papa-dextrosa-agar (PDA) con óxido de cobre y separadamente con azoxistrobina, y se distribuyó en cajas Petri (40) separadamente. Se inoculó el hongo *T. koningiopsis* en diez cajas Petri por cada fungicida (20), y el mismo procedimiento para *T. stromaticum* (20). El testigo se preparó con PDA, diez cajas Petri por cada hongo, con un total de 60 cajas Petri observadas. El experimento se desarrolló bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA) con cinco tratamientos y 10 unidades de observación por cada tratamiento. Para la comparación de medias entre los tratamientos se utilizó la prueba de Tukey al  $p < 0,05$ .

El desarrollo del experimento se hizo a partir de las cepas madre de *T.*

*stromaticum* y *T. koningiopsis*, y se obtuvieron colonias mediante subcultivos en el medio papa-dextrosa-agar (DIFCO), esterilizado en autoclave a 150 psi y dispensado (10 ml) en cajas Petri estériles. Se incubó durante 5 días a + 25°C y cuando las colonias alcanzaron los bordes del plato Petri (máximo crecimiento) iniciaron su producción de esporas.

La preparación del medio de cultivo papa-dextrosa-agar más fungicidas se realizó usando las dosis recomendadas por el INIAP en el control de enfermedades de cacao. Con azoxistrobina se usó una concentración de 10 ppm y para óxido de cobre fue de 5.000 ppm. El PDA fue envasado en dos matraces conteniendo 180 ml cada uno, se esterilizó y se añadió una suspensión con un gramo de óxido de cobre en 20 ml de agua destilada estéril que se homogenizó en el agitador calentador magnético. El medio se dispensó en 20 cajas Petri estériles, 10 ml en cada una. Se siguió un procedimiento similar para azoxistrobina, con 18 ml de agua estéril mas 2 ml de azoxistrobina y se mezcló con el PDA, de igual manera homogenizando y distribuyendo 10 ml en cada caja Petri. Para los testigos se preparó PDA, que se envasó en 20 cajas Petri estériles.

La inoculación de *T. koningiopsis* y *T. stromaticum* se hizo

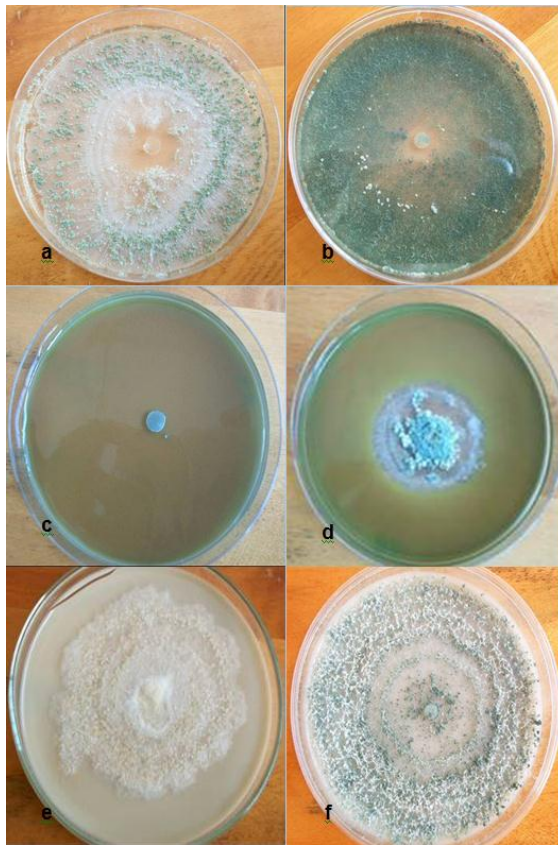
con la ayuda de un sacabocado estéril (0,5 cm de diámetro), se cortaron discos de colonias puras de las dos especies de *Trichoderma* (de 6 días de edad), los mismos que se transfirieron al centro de las cajas Petri de acuerdo al tratamiento.

La evaluación se realizó en base al crecimiento de las colonias de los hongos *T. koningiopsis* y *T. stromaticum* y se suspendió cuando los testigos alcanzaron el borde de la caja Petri. Diariamente se midió el diámetro (cm) de las colonias que se encontraban creciendo en el medio (Figura 1).

## Resultados y Discusión

A los siete días después de la inoculación (d.d.i.) se encontró que los testigos en PDA de *Trichoderma koningiopsis* y *T. stromaticum* cubrieron totalmente el medio de cultivo de la caja Petri. Los tratamientos con azoxistrobina cubrieron la caja Petri a los 12 días, mientras que los tratamientos con óxido de cobre apenas desarrollaron *T. koningiopsis* a los 30 d.d.i. (Figura 2).

Este resultado concuerda con lo señalado con Papavizas (1985), quien sostiene que *Trichoderma* tiene tolerancia a un amplio rango de pesticidas, y también Harman *et al.* (2004) indica que esta tolerancia es una característica innata para este género de hongo.



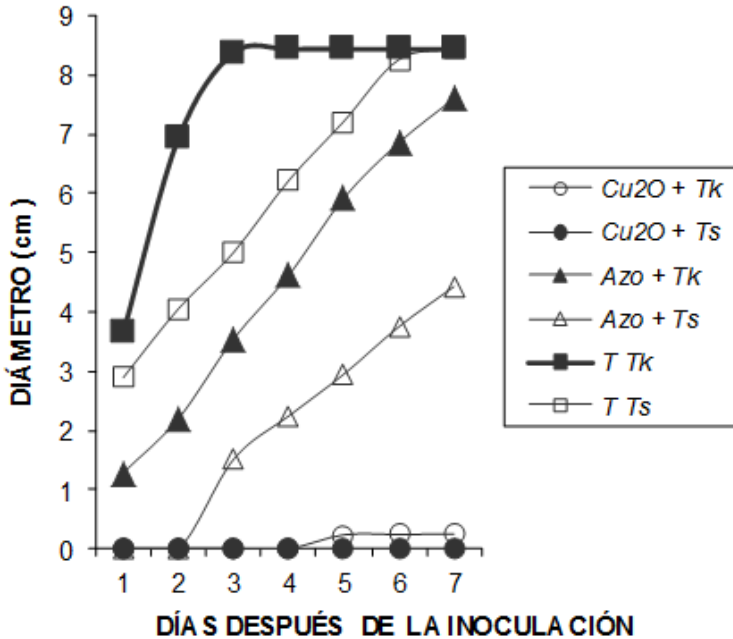
**Figura 1.** Crecimiento de *Trichoderma koningiopsis* y *T. stromaticum* en medios de cultivo con fungicidas, a) *T. stromaticum* creciendo en PDA, b) *T. stromaticum* en PDA, c) *T. stromaticum* en medio con óxido de cobre, d) *T. koningiopsis* creciendo en medio con óxido de cobre, e) *T. stromaticum* en medio con azoxistrobina y f) *T. koningiopsis* creciendo en PDA más azoxistrobina.

La azoxistrobina reprimió el crecimiento de *T. stromaticum* los primeros dos días de la prueba, lo que podría ser interpretado como cierta susceptibilidad a la azoxistrobina. Sin embargo, la especie reaccionó al tercer día y se desarrolló sobre el medio con el fungicida. Estas observaciones de depresión en el desarrollo concuerdan con pruebas realizadas por Neves *et al.* (2005), quienes encontraron que algunos insumos en la agricultura

pueden dificultar la acción de los *Trichoderma*, aunque estas no impiden su desarrollo. En cambio para el óxido de cobre se encontró un retardo importante o una ligera tolerancia al fungicida en el crecimiento de *T. koningiopsis*, pese a que su comportamiento fue variable en cada repetición ya que la producción de esporas no fue inhibida. Esto significa que si bien el hongo retarda su crecimiento éste continúa

reproduciéndose, asegurando así la perpetuación de su especie en esas condiciones y su uso en el campo. Estos resultados concuerdan con Kredics *et al.* (2003) quienes manifestaron que

iones metálicos como el cobre pueden tener incidencia sobre el desarrollo de *Trichoderma*, particularmente en el crecimiento miceliar.



**Figura 2.** Crecimiento diario expresado en cm de diámetro de crecimiento de la colonia y efecto del óxido de cobre ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) y azoxistrobina (Azo) sobre el desarrollo de *Trichoderma koningiopsis* (Tk) y *T. stromaticum* (Ts).

La prueba de Tukey confirmó que no hay diferencias entre los testigos, mientras que entre los tratamientos con fungicidas se presentan diferencias significativas (Tabla 1), lo cual indica que las especies de los hongos *T. koningiopsis* y *T. stromaticum* mostraron tolerancia a los fungicidas utilizados en esta prueba, debido a que estos no detuvieron su crecimiento aún a

las altas concentraciones a que fueron expuestas, excepto en el tratamiento de *T. stromaticum* en  $\text{Cu}_2\text{O}$  en donde el crecimiento miceliar fue completamente inhibido en todas las repeticiones. Al parecer el cobre en la concentración utilizada (5.000 ppm) tendría una fuerte influencia negativa sobre la especie.

Los resultados obtenidos en este estudio dejan abierta la posibilidad de

integrar los agentes de biocontrol, *Trichoderma koningiopsis* y *T. stromaticum*, y los químicos, óxido de cobre y azoxistrobina, en la estrategia de manejo integrado de plagas y enfermedades en el cultivo de cacao.

**Tabla 1.** Diámetro promedio del crecimiento de *Trichoderma koningiopsis* y *T. stromaticum*, en medios de cultivo con los fungicidas óxido de cobre y azoxistrobina, a los 7 días después de la inoculación. Medias a, b, c, d y e para la prueba de Tukey.

Tratamientos	Diámetro (cm)
Azoxistrobina x <i>T. koningiopsis</i>	7,61 <b>b</b> <sup>1</sup>
Azoxistrobina x <i>T. stromaticum</i>	4,43 <b>c</b>
Oxido de cobre x <i>T. koningiopsis</i>	0,25 <b>d</b>
Oxido de cobre x <i>T. stromaticum</i>	0,00 <b>e</b>
<i>Trichoderma koningiopsis</i> testigo	8,44 <b>a</b>
<i>Trichoderma stromaticum</i> testigo	8,44 <b>a</b>
<b>% CV</b>	<b>0,46</b>

## Literatura Citada

- Harman, G., C. Howell, A. Viterbo, I. Chet, and M. Lorito. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 43-56.
- Hebbar, P., U. Krauss, U., W. Soberanis, S. Lambert, R. Machado, C. Dessimoni, and M. Aitken, 1999. *Biocontrol* of cacao diseases in Latin America: Status of field trials. *En* U. Krauss and P. Hebbar (eds.). *Workshop Manual: Research Methodology for the Biological Control of Plant Diseases with special reference to fungal diseases of cacao*. CATIE, Costa Rica.
- Jano, P. 2007. Quality Incentives and the Development of High-value Agrifood Markets: Ecuador's Cacao Marketing Chain. Thesis of Master of Science in Agricultural and Applied Economics. Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Kredics, L., Z. Antal, L. Manczinger, A. Szekeres, F. Kevei, and N. Erzsebet. 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potencial. *Food Technol. Biotechnol.* 41(1): 37-42.
- Neves, P., P. Santoro, and T. Alexandre. 2005. Compatibilidad e entre *Trichoderma* sp. e diferentes herbicidas. 9° Simposio de Control Biológico. CEPLAC/CEPEC. Recife (Brasil). p. 116
- Papavizas, G. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23: 23-24.
- Suárez, C. 1993. Enfermedades de cacao y su control. P. 90-116 *En* C. Suárez, C. (ed.). *Manual del Cultivo de Cacao*. 2da. Ed. Quevedo, Ecuador, EET-Pichilingue. Manual Técnico No. 25.

