
DIVERSIDAD DE *Trichoderma* spp. EN PLANTACIONES DE *Theobroma cacao* L. DEL ESTADO CARABOBO, VENEZUELA, Y SU CAPACIDAD BIOCONTROLADORA SOBRE *Crinipellis pernicioso* (STAHSEL) SINGER

Marzuly Rivas Cordero y Domenico Pavone Maniscalco

RESUMEN

La enfermedad del cacao conocida como “escoba de bruja”, causada por el hongo *Crinipellis pernicioso*, es considerada como una de las amenazas más grave al suministro mundial de chocolate. Una alternativa al control de esta enfermedad es la utilización del hongo biocontrolador *Trichoderma* spp. El presente trabajo pretende la identificación molecular de aislados de *Trichoderma* spp. provenientes de muestras de suelo de las principales zonas productoras de cacao en el estado Carabobo, Venezuela, a través del análisis de las secuencias espaciadoras transcritas internas 1 y 2 (ITS1 e ITS2) del ADN ribosomal (ADNr). También se evaluó la capacidad de las cepas obtenidas para controlar *in vitro* a *C. pernicioso*. Se identificó un total de

seis especies diferentes, siendo *T. harzianum* la más abundante (63,1%), seguida por *T. virens* (15,7%), *T. brevicompactum* (13,1%), *T. theobromicola* / *T. koningiopsis* / *T. ovalisporum* / *T. asperellum* (2,6%), *T. pleurotum* (2,6%), y *T. koningiopsis* (2,6%). El índice de diversidad biológica fue de 0,15 y la localidad con mayor diversidad el Parque Nacional San Esteban. Los ensayos de crecimiento en suelo estéril y los enfrentamientos en cultivos duales en PDA sugieren que *T. harzianum*, *T. virens* y *T. theobromicola* tienen la mayor capacidad biocontroladora *in vitro* sobre *C. pernicioso*. Algunos de estos aislados pudieran ser utilizados en programas de manejo de la enfermedad en cultivos de *T. cacao*.

DIVERSITY OF *Trichoderma* spp. ON *Theobroma cacao* L. FIELDS IN CARABOBO STATE, VENEZUELA, AND ITS BIOCONTROL CAPACITY ON *Crinipellis pernicioso* (STAHSEL) SINGER

Marzuly Rivas Cordero and Domenico Pavone Maniscalco

SUMMARY

The cocoa disease known as “witches’ broom”, caused by *Crinipellis pernicioso*, is one of the greatest threats to the world’s chocolate supply. An alternative for control of this disease is the use of the biocontrol fungus *Trichoderma* spp. This work is an effort towards the molecular identification of *Trichoderma* spp. isolates from the soil of cocoa fields in the Carabobo State, Venezuela, using internal transcribed spacers (ITS1 & ITS2) of ribosomal DNA (rDNA). It has been also evaluated the capacity of *Trichoderma* spp. for *in vitro* control of *C. pernicioso*. Six species were identified, the most abundant (63.1%) being

T. harzianum, followed by *T. virens* (15.7%), *T. brevicompactum* (13.1%), *T. theobromicola* / *T. koningiopsis* / *T. ovalisporum* / *T. asperellum* (2.6%), *T. pleurotum* (2.6%) and *T. koningiopsis* (2.6%). The biodiversity index was calculated as 0.15, and the site of highest diversity was the San Esteban National Park. Bioassays to determine growth rate on sterile soil and dual cultures on PDA suggest that *T. harzianum*, *T. virens* and *T. theobromicola* have the highest *in vitro* biocontrol capacity on *C. pernicioso*. Some of these isolates could be used in biocontrol programs of this disease in *T. cacao* cultures.

Introducción

La “escoba de bruja” es una enfermedad del cacao causada por el hongo *Crinipellis pernicioso* (*Monilophthora pernicioso*) (Stahel) Aime & Phillips-Mora 2006 (Marasmiaceae, Basidiomycota), y se considera una de las amenazas más graves al

suministro de chocolate a escala mundial (Peabody, 2005). El control de esta enfermedad debería realizarse de forma orgánica (sin la aplicación de productos químicos), debido a la fragilidad de los ecosistemas donde se encuentran estas plantaciones, y a que este tipo de producción es muy

valorada en países de Europa, Asia y en los Estados Unidos (Rotz *et al.*, 2007). El hongo *Trichoderma* spp. Persoon 1794, es uno de los agentes de mayor uso en programas de control biológico como regulador de fitopatógenos (Vinale *et al.*, 2008). Se ha reportado su uso en una diversidad de cultivos de im-

portancia agrícola incluyendo el cacao, con gran efectividad de control sobre *Monilophthora roreri* (Cif.) H.C. Evans, Stalpers, Samson & Benny 1978 (Marasmiaceae, Basidiomycota) y *C. pernicioso* (García *et al.*, 2005).

Para lograr un manejo adecuado de plagas con el uso de agentes de control biológi-

PALABRAS CLAVE / Biocontrol / Chocolate / Escoba de Bruja / ITS /

Recibido: 24/05/2010. Modificado: 22/09/2010. Aceptado: 23/09/2010.

Marzuly Rivas Cordero. Licenciada en Biología, Universidad de Carabobo (UC), Venezuela. (UC, 2009). e-mail: marzuly23@hotmail.com

Domenico Pavone Maniscalco. Licenciado en Biología y M.Sc. en Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Profesor, Universidad de Cara-

bobo, Venezuela. Dirección: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología. Universidad de Carabo-

bo, Campus de Bárbula, Naguanagua, Estado Carabobo, Venezuela. e-mail: dpavone@gmail.com.

DIVERSIDADE DE *Trichoderma* spp. EM PLANTAÇÕES DE *Theobroma cacao* L. DO ESTADO CARABOBO, VENEZUELA, E SUA CAPACIDADE BIOCONTROLADORA SOBRE *Crinipellis pernicioso* (STAHLE) SINGER

Marzuly Rivas Cordero e Domenico Pavone Maniscalco

RESUMO

A enfermidade do cacau conhecida como “vasoura de bruxa”, causada pelo fungo *Crinipellis pernicioso*, é considerada como uma das ameaças mais graves ao subministro mundial de chocolate. Uma alternativa ao controle desta enfermidade é a utilização do fungo biocontrolador *Trichoderma* spp. O presente trabalho pretende a identificação molecular de isolados de *Trichoderma* spp. provenientes de amostras de solo das principais zonas produtoras de cacau no estado Carabobo, Venezuela, através da análise das seqüências espaçadoras transcritas internas 1 e 2 (ITS1 e ITS2) do ADN ribossomal (ADNr). Também se avaliou a capacidade das cepas obtidas para controlar *in vitro* a *C. pernicioso*. Identificou-se um total de seis espécies diferen-

tes, sendo *T. harzianum* a mais abundante (63,1%), seguida por *T. virens* (15,7%), *T. brevicompactum* (13,1%), *T. theobromicola* / *T. koningiopsis* / *T. ovalisporum* / *T. asperellum* (2,6%), *T. pleurotum* (2,6%), e *T. koningiopsis* (2,6%). O índice de diversidade biológica foi de 0,15 e a localidade com maior diversidade o Parque Nacional San Esteban. Os ensaios de crescimento no solo estéril e os enfrentamentos em cultivos duais em PDA sugerem que *T. harzianum*, *T. virens* e *T. theobromicola* tenham a maior capacidade biocontroladora *in vitro* sobre *C. pernicioso*. Alguns destes isolados poderiam ser utilizados em programas de manejo da enfermidade em cultivos de *T. cacao*.

co, es fundamental la búsqueda de nuevas cepas con potencial biocontrolador, que mejoren la efectividad de productos comerciales. Este proceso incluye el estudio detallado de las mismas (identificación, parámetros de biocontrol, etc.) con el objeto de comprobar su efectividad sobre organismos fitopatógenos. La correcta identificación de las especies utilizadas es de suma importancia, ya que permite realizar monitoreos eficientes después de la aplicación, además de ser un parámetro fundamental a la hora de registrar un producto comercial con base en hongos biocontroladores.

La caracterización morfológica es el método más utilizado para identificar especies de *Trichoderma* (Druzhinina *et al.*, 2004); sin embargo, ésta es muy propensa a errores, con la consecuencia de que ~50% de los aislados depositados en colecciones bajo esta premisa, están mal identificados (Druzhinina y Kubicek, 2005). La identificación molecular se ha convertido en una herramienta confiable y relativamente económica para identificar especies de *Trichoderma*.

El presente trabajo busca estudiar la diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de *Theobroma cacao* L. del estado Carabobo, Venezuela, a través del aislamiento de cepas y su identificación molecular, además de

estudiar *in vitro* su potencial uso como agentes biocontroladores sobre *C. pernicioso*.

Materiales y Métodos

Ubicación del estudio y colecta de muestras

Las zonas de muestreo se ubicaron en Canoabito (Municipio Bejuma); San Pablo de Urama (Municipio Juan José Mora); La Unión (Municipio Naguanagua); Borburata y el Parque Nacional San Esteban (Municipio Puerto Cabello), todas en el estado Carabobo, Venezuela (Tabla I). En cada sitio se registraron las coordenadas geográficas, utilizando un dispositivo de posicionamiento global (GPS) Magellan, Modelo 310. El material edáfico fue colectado de la rizósfera de plantas de *T. cacao* a una profundidad de 0-20cm con una pala estéril. Se colectaron aproximadamente 200g de suelo por planta. Las muestras fueron rotuladas y trasladadas al laboratorio para su procesamiento.

Aislamiento de Trichoderma spp.

A partir de las muestras del material edáfico colecta-

TABLA I
AISLADOS OBTENIDOS DE *Trichoderma* spp. POR LOCALIDAD

Localidad / Coordenadas UTM	Aislados obtenidos	Identificación
P.N San Esteban Municipio Puerto Cabello Norte: 1150114 Este: 19-608921	TVC01	<i>T. pleurotum</i>
	TVC05	<i>T. virens</i>
	TVC07	<i>T. harzianum</i>
	TVC08	<i>T. harzianum</i>
	TVC10	<i>T. virens</i>
	TVC13	<i>T. brevicompactum</i>
Borburata Municipio Puerto Cabello Norte: 1153372 Este: 19-612816	TVC14	<i>T. harzianum</i>
	TVC18	<i>T. harzianum</i>
	TVC20	<i>T. harzianum</i>
	TVC21	<i>T. harzianum</i>
	TVC23	<i>T. virens</i>
	TVC24	<i>T. harzianum</i>
	TVC25	<i>T. harzianum</i>
	TVC26	<i>T. harzianum</i>
	TVC27	<i>T. harzianum</i>
	TVC28	<i>T. harzianum</i>
	TVC29	<i>T. brevicompactum</i>
	TVC31	<i>T. brevicompactum</i>
	TVC32	<i>T. harzianum</i>
TVC33	<i>T. brevicompactum</i>	
TVC34	<i>T. brevicompactum</i>	
Urama Municipio Juan José Mora Norte: 1161182 Este: 19-568324	TVC36	<i>T. theobromicola</i> / <i>T. koningiopsis</i> / <i>T. ovalisporum</i> / <i>T. asperellum</i>
	TVC37	<i>T. virens</i>
	TVC38	<i>T. virens</i>
La Unión Municipio Naguanagua Norte: 1139012 Este: 19-598405	TVC44	<i>T. harzianum</i>
	TVC46	<i>T. harzianum</i>
	TVC47	<i>T. harzianum</i>
	TVC48	<i>T. harzianum</i>
	TVC49	<i>T. virens</i>
	TVC52	<i>T. harzianum</i>
	TVC53	<i>T. harzianum</i>
Primavera Municipio Bejuma Norte: 1140431 Este: 19-580498	TVC54	<i>T. harzianum</i>
	TVC55	<i>T. harzianum</i>
	TVC56	<i>T. koningiopsis</i> / <i>T. ovalisporum</i>
	TVC57	<i>T. harzianum</i>
	TVC58	<i>T. harzianum</i>
	TVC59	<i>T. harzianum</i>
TVC60	<i>T. harzianum</i>	

Las cepas obtenidas fueron identificadas con las siglas TVC (*Trichoderma* Venezuela Cacao) seguidas de un número que las diferencia.

das, se tomaron submuestras de aproximadamente 20g, las cuales fueron resuspendidas

en agua estéril por separado, agitándose durante 5min. A partir de esta suspensión se

tomaron alícuotas de 1ml para realizar diluciones seriadas de 1/10 y 1/100. Finalmente, se sembraron alícuotas (0,1ml) de las diluciones obtenidas en placas de Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) (HiMedia) suplementado con ampicilina y amoxicilina (1mg·ml⁻¹ cada uno). Las placas fueron incubadas bajo luz artificial fluorescente, a 25 ±2°C, durante una semana. Una vez obtenidas las colonias de hongos, se procedió al reaislamiento en placas de PDA de las cepas que podrían pertenecer al género *Trichoderma*, siguiendo el criterio de crecimiento rápido y extendido de color blanco o verde.

Cultivos monospóricos

Se prepararon suspensiones de cada aislado muy diluidas (una pequeña porción de esporas tomadas con el asa de platino en 10ml de agua destilada estéril). Esta suspensión fue vertida sobre placas de agar agua (1,6%), descartando el exceso de agua inmediatamente. Las placas fueron incubadas por 18-24h bajo luz fluorescente a 25 ±2°C. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico a una magnificación de 40×, se ubicaron en la placa esporas germinadas y separadas, cortando el trozo de agar con una aguja de punta plana. El trozo de agar con una única espora fue colocado en una placa con medio PDA e incubado a 25 ±2°C por una semana.

Extracción del ADN

La extracción del ADN se realizó siguiendo la metodología propuesta por Aljanabi y Martínez (1997). El micelio obtenido de las placas de Petri con los cultivos monospóricos, fue homogeneizado en 400µl de buffer de extracción (Tris-HCl 10mM; NaCl 0,4M; EDTA 20mM; pH 8,0) en un tubo Eppendorf de 1,5ml. Seguidamente fueron agregados 40µl de SDS (20%) y 8µl de Protei-

nasa K (20mg·µl⁻¹). Los tubos fueron incubados durante 1h a 60°C, adicionándose posteriormente 300µl de NaCl 6M. Cada tubo fue agitado en vortex a máxima velocidad por 30seg y centrifugado a 10000rpm durante 20min. Se transfirieron 600µl del sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf al que se le agregó posteriormente el mismo volumen de isopropanol puro, agitándose suavemente por inversión e incubándose a 20°C por 1h. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 10000rpm por 20min, se descartó el sobrenadante y se lavó con etanol 70%. El precipitado seco fue resuspendido en 50µl de agua ultrapura estéril y mantenido a -20°C.

Amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 del ADNr

A partir del ADN extraído se procedió a amplificar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las regiones ITS1 e ITS2 del ADNr con el kit Go Taq (Promega). Para cada reacción de PCR se utilizó un volumen final de 25µl de la mezcla de reacción, conteniendo: Green buffer (5X) 5µl; MgCl₂ (25mM) 3µl, dNTP (10mM) 0,5µl; iniciador ITS1 (sense): 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGT-3' (5µM) 2,5µl; iniciador ITS 4 (antisense): 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (5µM) 2,5µl (White *et al.*; 1990); Taq ADN polimerasa (5U/µl) 0,125µl en 10,4µl de agua ultrapura estéril. Las ampliificaciones fueron llevadas a cabo en un termociclador Modelo Icyler® (BIORAD) bajo las siguientes condiciones: 94°C por 3min; 33 ciclos a 94°C por 45seg, 59°C por 1min, 72°C por 90seg, y finalmente se realizó una extensión a 72°C por 7min. Las ampliificaciones fueron verificadas en un gel de agarosa al 1%. Los productos de PCR fueron purificados utilizando el AxyPrep™ PCR Cleanup Kit (AXYGEN Biosciences).

Secuenciación de los productos de PCR

Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en el Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CESAAN) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Para la PCR de secuenciación se preparó una mezcla de 10µl finales con 20ng del templado y 10pmol del iniciador ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGT-3'). Posteriormente se agregaron 4µl de mezcla de reacción (BygDye® Terminator 3.1, Applied Biosystem) con solución buffer y una mezcla de ddNTPs y dNTPs, completándose el volumen con agua de grado biología molecular. Las muestras preparadas fueron sometidas a 25 ciclos de PCR (98°C por 2min; 59°C por 1min y 60°C por 4min). Finalmente, el ADN purificado y eluido en formamida fue procesado en un secuenciador automático modelo ABI 3130xl (Applied Biosystem).

Análisis de secuencias

Una vez obtenidas las secuencias de las regiones ITS1 e ITS2 del ADNr, éstas fueron analizadas comparándolas con una base de datos específica para el género *Trichoderma* (*TrichOKEY* versión 2.0), disponible en línea en el sitio oficial de la Subcomisión Internacional para la Taxonomía de *Trichoderma* e *Hypocrea* (www.isth.info).

Determinación de la capacidad competitiva de *Trichoderma spp*

Para estudiar la capacidad competitiva de *Trichoderma spp.*, se determinó la velocidad de crecimiento de cada cepa en suelo. El sustrato a utilizar consistió de una mezcla de todas las muestras colectadas en el presente trabajo. La mezcla de suelos fue analizada en el Laboratorio de Suelos del Instituto

Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Estado Lara (INIA-Lara), Venezuela. En placas de Petri de vidrio se colocaron 20g de la mezcla de suelo (estéril o no), la cual fue compactada hasta obtener una superficie plana. El contenido de agua de la mezcla fue ajustado a 50% p/p. Posteriormente, se procedió a inocular cada cepa, colocando un disco de agar con micelio y esporas de 0,5cm de diámetro en el centro de cada placa, por triplicado. El sistema fue incubado a 25 ±2°C y luz artificial continua, determinándose el diámetro de la colonia al cuarto día.

Capacidad biocontroladora de *Trichoderma spp.* sobre *C. pernicioso*

Se realizaron cultivos duales entre ambos hongos. En placas con medio PDA se sembró en un lado de la misma, discos con micelio de *C. pernicioso*, cepa cedida gentilmente por Dercy Parra del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Estado Miranda (INIA-Miranda), Venezuela. Una semana después, se procedió a la siembra de *Trichoderma spp.* en el lado opuesto de cada placa. El sistema fue incubado por 15 días bajo luz fluorescente a 25 ±2°C. Finalmente se determinó la presencia de halos de inhibición, crecimiento de ambos hongos y solapamientos.

Análisis estadísticos

Se realizaron análisis de varianza y comparación de medias por la prueba de Tukey, utilizando el programa Statistix 4.0, para la determinación de la capacidad competitiva de *Trichoderma spp.* sobre suelo.

Resultados y Discusión

Diversidad de *Trichoderma spp.*

El género *Trichoderma* plantea un importante desa-

fío para la sistemática, dado a que las relaciones filogenéticas de muchos de sus miembros todavía no son claras. Así, los conceptos de “especies agregadas” y de “Sección” (Rifai, 1969; Bissett, 1984, 1991a, b, c, 1992) han ayudado a aclarar la clasificación en este género. La caracterización morfológica es el método más utilizado para identificar especies de *Trichoderma*; sin embargo, como se señaló arriba, ésta es muy propensa a errores.

La introducción gradual de los datos moleculares en la sistemática de los hongos, se inició en la década de 1980 y se convirtió en un estándar a finales de 1990, impulsando la investigación sobre la diversidad y la especiación de los grupos de hongos (Druzhinia y Kubicek, 2005; Druzhinia *et al.*, 2006). Varias regiones del genoma pueden ser utilizadas para realizar la identificación de especies de *Trichoderma*; estando entre las más utilizadas las regiones espaciadoras transcritas internas 1 y 2 (ITS1 e ITS2) del ADN ribosomal.

La identificación molecular de un aislado fúngico se basa en someter las secuencias obtenidas a un BLAST (Altschul *et al.*, 1990) en el sitio web de la *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), basándose en el “mejor resultado” o en el grado de similitud de las secuencias. Sin embargo, este tipo de base de datos pública puede tener errores, ya que se han encontrado secuencias mal identificadas (~40% en el caso de *Trichoderma*; Kopchinskiy *et al.*, 2005). Es así como se proponen los servicios de comparación de secuencias *TrichoKEY* (Druzhinia *et al.*, 2005) y *TrichoBLAST* (Kopchinskiy *et al.*, 2005; Druzhinia *et al.*, 2006), específicos para *Trichoderma*.

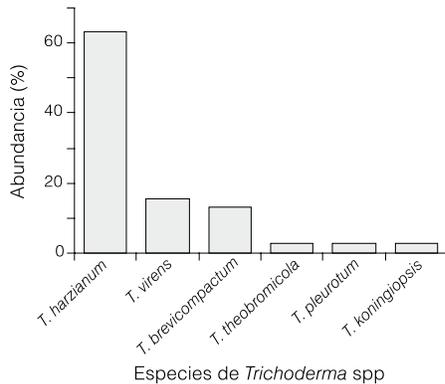


Figura 1. Abundancia de las diferentes especies de *Trichoderma* spp. presentes en plantaciones de *T. cacao* del estado Carabobo, Venezuela.

En América Latina y el Caribe, son pocos los estudios de diversidad de *Trichoderma* spp. (Druzhinia *et al.*, 2006), a pesar de la gran potencialidad biotecnológica que posee este género. *Trichoderma* suele encontrarse en madera en descomposición y en casi todo tipo de suelo (Benítez *et al.*, 2004; Vera *et al.*, 2005; Druzhinia y Kubicek, 2005); siendo la rizósfera un sitio ideal para encontrar cepas de *Trichoderma* que interactúen con plantas de *T. cacao*. Otro sitio importante de muestreo es el interior de la planta, ya que se ha reportado la presencia de especies de *Trichoderma* creciendo endofíticamente en *T. cacao* (Samuels *et al.*, 2006a; Mejía *et al.*, 2008). En el presente estudio se intentó obtener, sin éxito, aislados de *Trichoderma* a partir de zonas internas de ramas (resultados no mostrados).

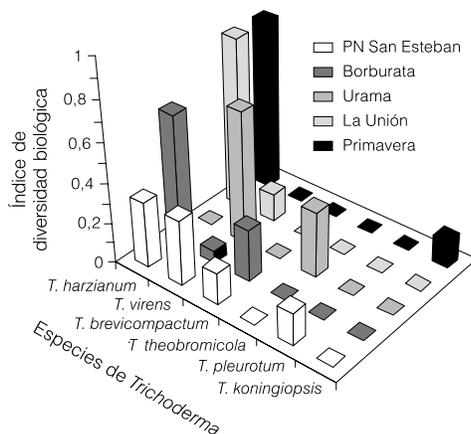


Figura 2. Índice de diversidad biológica de las especies de *Trichoderma* spp. por localidad.

Se obtuvieron 38 aislados (Tabla I), pertenecientes a seis especies distintas de *Trichoderma*. La comparación de secuencias determinó varias posibilidades de identificación en TVC36 y TVC56, debido a que las regiones ITS no aportan suficiente información para dar una identificación definitiva, por lo que requiere el estudio de otras secuencias como el factor de elongación de la transcripción 1 α (*tef1*) para completar la identificación (Druzhinia *et al.*, 2006).

En la Figura 1 se muestra la abundancia de especies de *Trichoderma* spp. encontrada en las plantaciones de *T. cacao* en el estado Carabobo. La especie *T. harzianum* fue la más abundante (63,1%), seguida de las especies *T. virens* y *T. brevicompactum* con 15,7 y 13,1%, respectivamente; *T. theobromicola* / *T. koningiopsis* / *T. ovalisporum* / *T. asperellum* con 2,6%; *T. pleurotium* con 2,6% y *T. koningiopsis* / *T. ovalisporum* con 2,6%. Resultados similares han sido obtenidos estudiando la diversidad de *Trichoderma* en suelos de Sardinia, Italia, encontrando como más abundante (57%) a *T. harzianum* (Migheli *et al.*, 2009).

La diversidad de *Hypocrea/Trichoderma* presente en la rizósfera de plantas de *T. cacao* del Estado Carabobo se asemeja a otras obtenidas en distintos lugares del mundo. Seis especies fueron identificadas entre los 38 aislados, lo que corresponde a un índice de diversidad (ID) de 0,15. Se han reportado valores del ID de *Trichoderma* para el sudeste de Asia (14 especies/96 aislados, ID= 0,15; Kubicek *et al.*, 2003), América del Sur (10/53, ID= 0,20; Druzhinia *et al.*, 2005) y China (13/135, ID= 0,096; Zhang *et al.*, 2005). La mayor diversidad de *Hypocrea/Trichoderma* reportada ha sido en la rizósfera de *Coffea arabica* L. en bosques de

tierras altas en Etiopía con un ID= 0,38 (Belayneh y Druzhinia; citado en Migheli *et al.*, 2009).

Los índices de diversidad biológica de *Trichoderma* por localidad se muestran en la Figura 2. El Parque Nacional San Esteban y la región de Urama, fueron los que presentaron el mayor ID (0,66). Estas zonas se caracterizan por ser poco perturbadas debido a la condición de Parque Nacional de la primera y al abandono de las plantaciones de la segunda. En la localidad de Primavera y La Unión, se encontró un ID de 0,28, mientras que en Borburata el ID fue de 0,2. En el sector La Unión existe una alta perturbación, con cultivos de café, cacao y zonas urbanas adyacentes. Cabe destacar que *T. brevicompactum* solo fue encontrado en el Municipio Puerto Cabello.

Entre las especies encontradas, la más abundante fue *T. harzianum*, una especie muy utilizada en programas de control de hongos fitopatógenos (Harman, 2000; Benitez *et al.*, 2004). Por su parte, *T. virens* ha sido reportado como un hongo benéfico capaz de promover el crecimiento en algunas especies vegetales (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). *T. koningiopsis* y *T. ovalisporum* pertenecen al complejo de especies *Trichoderma koningii*, donde éstas y otras especies se diferencian por detalles en su fenotipo y biogeografía, reportándose como endofíticos en troncos de *T. cacao* y como potenciales agentes de biocontrol (Samuels *et al.*, 2006b). La especie *T. theobromicola* fue hallada inicialmente como organismo endófito en plantas de *T. cacao* en Perú, siendo capaz de producir antibióticos volátiles que inhiben el crecimiento de *M. royeri* (Samuels *et al.*, 2006a). *T. asperellum* es un conocido biocontrolador, antiguamente *T. harzianum*; y es capaz de colonizar el sistema radical de algunas especies vegetales, induciendo resistencia a patógenos (Yedidia *et*

al., 2003; Shores et al., 2005). Otra especie reportada en este estudio fue *T. pleurotum*, el agente causal de grandes pérdidas en cultivos de hongos comestibles (Kredics et al., 2009). Este es el primer reporte de esta última especie en Venezuela. Finalmente, *T. brevicompactum* ha sido reportado como un potencial productor de polipéptidos antibióticos (*peptaibiotics*; Degenkolb et al., 2006).

Determinación de la capacidad competitiva

La determinación de la capacidad competitiva en suelo de las especies de *Trichoderma* se realizó mezclando todas las muestras colectadas de plantaciones de cacao obtenidas en el presente estudio. Los resultados del análisis de esta mezcla se muestran en la Tabla II.

El objetivo del experimento era determinar cual de las cepas posee la capacidad de colonizar más rápidamente el suelo, lo cual sería un indicio de cuán competitiva puede ser. En el tratamiento sin esterilizar ninguno de los aislados fue capaz de crecer a expensas de los nutrientes del suelo durante el experimento (datos no mostrados), probablemente debido a la interacción y competencia con los microorganismos presentes. Con toda la diversidad de organismos, *Trichoderma* no logró desarrollar una de las características más reconocida por este género, la competencia por espacio y nutrientes. Es importante señalar que este experimento estuvo limitado en el tiempo (cuatro días) y no permite predecir que hubiera ocurrido semanas o meses después con el inóculo agregado.

En el caso del experimento con suelo estéril, las cepas de *Trichoderma* spp. sí lograron crecer bajo estas condiciones. En la Tabla III se presentan los valores de diámetro de la colonia a los cuatro días de crecimiento. El resultado del análisis de varianza arrojó un $p < 0,05$, lo cual indica la existencia de diferencias significativas en al menos una de las muestras con respecto a las otras. Un análisis de

TABLA II
RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE MEZCLA
SUELOS DE CULTIVOS DE CACAO DEL ESTADO
CARABOBO, VENEZUELA, UTILIZADO EN LA
DETERMINACIÓN DE VELOCIDAD
DE CRECIMIENTO EN ESTE SUSTRATO

Tipo de análisis	Parámetro	Valor
Físico	Arena (%)	67,2
	Limo (%)	25,2
	Arcilla (%)	7,6
Químico	Fósforo (ppm)	18
	Potasio (ppm)	128
	Calcio (ppm)	646
	Materia orgánica (%)	3,74
	pH	6,1
	Conductividad eléctrica (dS·m ⁻¹)	0,19
	Zinc (ppm)	2,1
	Cobre (ppm)	0,8
	Hierro (ppm)	39,4
	Manganeso (ppm)	17

comparación de medias determinó cuales aislados crecieron más rápidamente que los otros (Tabla III).

Los 10 aislados con mayor tasa de crecimiento fueron TVC18, TVC58 (*T. harzianum*), TVC56 (*T. koningiopsis*), TVC57, TVC20, TVC7, TVC14, TVC8, TVC59 y TVC55 (*T. harzianum*). Resulta evidente que *T. harzianum* es la especie con mayor capacidad de colonizar ambientes edáficos bajo las condiciones del estudio. De los aislados no pertenecientes a *T. harzianum*, los que presentaron mayor tasa de crecimiento fueron TVC56 y TVC10, pertenecientes a *T. koningiopsis* y *T. virens*, respectivamente.

Capacidad antagonista y cultivos duales

Para el estudio de la capacidad antagonista se realizaron los denominados cultivos duales, los cuales, si bien dan información acerca de cuál pudiera ser la capacidad biocontroladora de un hongo, no siempre predicen con exactitud lo que va a ocurrir en campo. Esto es debido a que en los cultivos duales no se simulan las verdaderas condiciones naturales. Las pruebas *in vitro* para determinar la capacidad antagonista de un microorganismo con respecto a otro, no representan necesariamente el grado de antagonismo y de control biológico en condiciones naturales, pero sí

reflejan la capacidad y variabilidad genética del antagonista y la del fitopatógeno para resistir el antagonismo (Ezziyyani et al., 2004).

Para la realización del ensayo solo fueron empleados algunos de los aislados obtenidos, entre los que estaban incluidos algunos que mostraron una mayor tasa de crecimiento en placas de Petri con suelo (TVC18 y TVC56) y cepas representativas de las especies encontradas (TVC36 y TVC37). Los enfrentamientos *in vitro* tuvieron una duración de 16 días y los resultados se muestran en la Figura 3. En ningún caso se observaron halos de inhibición, pero sí hubo crecimiento de todas las cepas de *Trichoderma* spp. utilizadas sobre la colonia del patógeno. Las cepas TVC36 (*T. theobromicola* / *T. koningiopsis* / *T. ovalisporum* / *T. asperellum*) y TVC37 (*T. virens*); lograron colonizar toda la placa en el menor tiempo (9 días) mientras que las cepas TVC18 (*T. harzianum*) y TVC56 (*T. koningiopsis* / *T. ovalisporum*) sólo colonizaron parte de la colonia de *C. perniciososa* entre los 9 y 16 días. De todos estos aislados, el que mayor tasa de crecimiento sobre

TABLA III
COMPARACIÓN DE MEDIAS DEL
CRECIMIENTO DE *Trichoderma* spp.
EN SUELO ESTÉRIL,
EN EL DÍA CUATRO DESPUÉS
DE LA SIEMBRA

Cepa	Diámetro de la colonia (cm)
TVC18	7,40 ±0,23 ab
TVC58	7,00 ±0,057 abc
TVC56	6,90 ±0,11 abc
TVC57	6,83 ±0,088 abc
TVC20	6,80 ±0,20 abcd
TVC7	6,73 ±0,12 abcd
TVC14	6,73 ±0,057 abcd
TVC8	6,60 ±0,26 abcde
TVC59	6,50 ±0,11 abcde
TVC55	6,4 ±0,057 abcdef
TVC27	6,26 ±0,14 bcdefg
TVC51	6,16 ±0,088 bcdefg
TVC10	6,10 ±0,55 bcdefgh
TVC53	5,90 ±0,088 bcdefgh
TVC13	5,73 ±0,31 bcdefgh
TVC54	5,53 ±0,033 bcdefghi
TVC29	5,46 ±0,17 bcdefghi
TVC24	5,43 ±0,20 bcdefghi
TVC50	5,26 ±0,18 cdefghij
TVC31	5,13 ±0,088 cdefghij
TVC28	5,06 ±0,12 cdefghijk
TVC44	4,96 ±0,17 defghijk
TVC47	4,90 ±0,32 defghijk
TVC5	4,86 ±0,17 defghijk
TVC32	4,83 ±0,12 defghijk
TVC48	4,80 ±0,20 defghijk
TVC37	4,76 ±0,14 defghijk
TVC60	4,56 ±0,14 efghijkl
TVC46	4,23 ±0,28 efghijklm
TVC1	4,20 ±0,057 fghijklm
TVC21	3,96 ±0,033 hijklm
TVC36	3,93 ±0,066 ijklm
TVC33	3,86 ±0,12 jklm
TVC45	3,80 ±0,15 klm
TVC34	3,76 ±0,18 klm
TVC43	3,70 ±0,11 klm
TVC52	3,56 ±0,62 lm
TVC26	3,40 ±0,26 lm
TVC35	3,23 ±0,28 lm
TVC23	2,30 ±0,15 m
TVC49	2,00 ±0,088 m
TVC25	1,03 ±0,066 n
TVC38	0,70 ±0,033 o

Los valores presentados son el promedio de tres réplicas con su desviación estándar. Las letras indican la pertenencia a un mismo grupo, según el análisis de comparación de medias realizado.

suelo presentó fue TVC18 (Tabla III), lo cual lo convierte en un posible candidato para ser utilizado como agente biocontrolador de *C. perniciososa*.

T. virens (TVC37) es una especie conocida como excelente biocontrolador de diferentes enfermedades en cultivos (Contreras-Cornejo et al.,

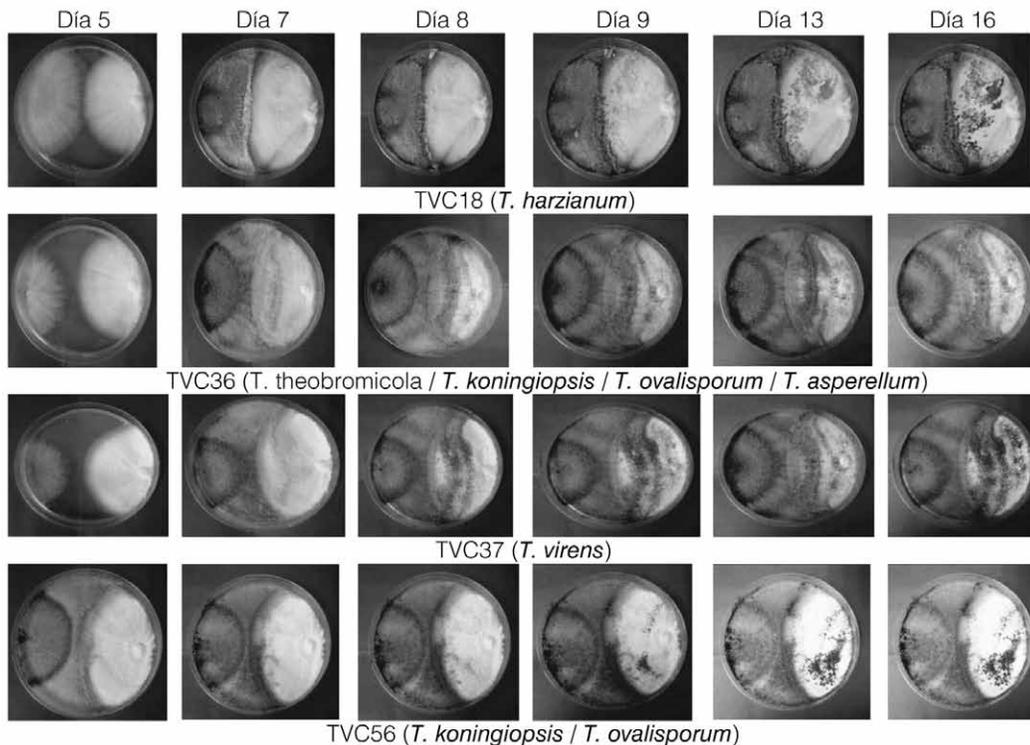


Figura 3. Cultivos duales en placas con medio PDA entre *C. perniciosa* (derecha) y cuatro especies de *Trichoderma* (izquierda) obtenidas en el presente estudio. La evaluación se realizó entre los días 5 y 16 después de la inoculación de *Trichoderma*. Los parámetros a evaluar fueron presencia de halos de inhibición y solapamiento de cepas.

2009) y *T. theobromicola* (TCV36) lo es por inhibir el crecimiento de patógenos de *T. cacao* (Samuels *et al.*, 2006a). De esta forma, el estudio de los efectos sinérgicos al aplicar estas dos especies en conjunto podría aprovechar las cualidades de ambas cepas y ejercer un control más eficiente. En futuros estudios se determinará la capacidad de control en vivero y campo de varias de las cepas obtenidas en el presente estudio sobre *C. perniciosa* y especialmente de una mezcla de TVC18 (*T. harzianum*), TVC36 (*T. theobromicola*) y TVC37 (*T. virens*), tratando de aprovechar la velocidad de crecimiento de la primera y la capacidad específica de controlar a *C. perniciosa* de las otras. Se ha reportado a *Trichoderma stromaticum* Samuels & Pardo-Schultheiss, como un agente biocontrolador con gran potencial sobre *C. perniciosa* (Samuels *et al.*, 2000; Lopes *et al.*, 2009); sin embargo, esta especie no fue aislada en

el presente estudio. Nuevos muestreos tendrán como objetivo la obtención de esta especie para su evaluación como biocontrolador.

Los resultados obtenidos demuestran la gran diversidad de especies de *Trichoderma* spp. que pueden encontrarse en ambientes poco perturbados, siendo ésta un área de investigación con gran potencial biotecnológico. Los ensayos de capacidad biocontroladora *in vitro* aportan información valiosa a la hora de elegir posibles candidatas para ser usadas en programas de manejo integrado. La sinergia y el comportamiento en condiciones naturales de un biocontrolador son parámetros difíciles de predecir, y dado que las condiciones ambientales son importantes, la selección se inicia con una correcta identificación y caracterización de las cepas de biocontrol. Este es el primer paso en la utilización de agentes biocontroladores de enfermedades en campo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Ángel Viloria y Howard Takiff, CESAAN-IVIC, por su apoyo en la secuenciación de las muestras de ADN; a Dercy Parra (INIA Miranda) por la cepa de *C. perniciosa* utilizada; a Monika Komon, Quirico Migheli y Christian Kubicek, por su asesoría en la identificación molecular de las especies de *Trichoderma*; a los productores de cacao de las zonas del estudio por el apoyo logístico prestado; y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo por los fondos otorgados (inversión menor N° CDCH 1472-06).

REFERENCIAS

Aime M, Philips-Mora W (2006) The causal agent of witch's broom and frosty pod rot of cocoa (chocolate, *Theobroma cacao*) from a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97: 1012-1022.

Aljanabi M, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for

PCR-based techniques. *Nucl. Ac. Res.* 25: 4692-4693.

Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.

Benítez T, Rincón A, Limón M, Codón A (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7: 249-260.

Bissett J (1984) A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Can. J. Bot.* 62: 924-931.

Bissett J (1991a) A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can. J. Bot.* 69: 2357-2372.

Bissett J; (1991b). A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Can. J. Bot.* 69: 2373-2417.

Bissett J (1991c) A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Can. J. Bot.* 69: 2418-2420.

Bissett J (1992) *Trichoderma atroviride*. *Can. J. Bot.* 70: 639-641.

Contreras-Cornejo H, Macias-Rodriguez L, Corte's-Penagos C, Lopez-Bucio J (2009) *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149: 1579-1592.

Degenkolb T, Gräfenhan T, Nirenberg H, Gams W, Brückner H (2006) *Trichoderma brevicompactum* complex: Rich source of novel and recurrent plant-protective polypeptide antibiotics (peptaibiotics). *J. Agric. Food Chem.* 54: 7047-7061.

Druzhinina I, Kubicek C (2005) Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 6B: 100-112.

Druzhinina I, Kopchinski A, Komon M, Bissett J, Szakacs G, Kubicek C (2004) A DNA-barcode for strain identification in *Trichoderma*. *Fungal Genet. Biol.* 42: 813-828.

Druzhinina I, Kopchinski A, Komon M, Bissett J, Szakacs G, Kubicek C; (2005) An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet. Biol.* 42: 813-828.

Druzhinina I, Kopchinski A, Kubicek C (2006) The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47: 55-64.

Evans H, Stalpers J, Samson R, Benny G (1978) On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Can. J. Bot.* 56: 2528-2532.

- Ezziyyani M, Pérez C, Sid-Ahmed A, Requena M, Candela M (2004) *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). *Anales Biol.* 26: 35-45.
- García J, George A, Argely T, Hoppen M, Krauss U (2005) Existe la tolerancia genética en cacao (*Theobroma cacao*) a *Rosellinia bunodes* y *Rosellinia pebo*. *Manejo Integr. Plagas Agroecol.* 75: 21-31.
- Harman G (2000) The myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* strain T-22. *Plant Dis.* 84: 377-393.
- Kopchinskiy A, Komon M, Kubicek C, Druzhinina I (2005) *TrichoBlast*: A multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. *Mycol. Res.* 109: 658-660.
- Kredics L, Kocsubé S, Nagy L, Komon-Zelazowska M, Manczinger L, Sajben E, Nagy A, Vágvölgyi C, Kubicek C, Druzhinina I, Hatvani L (2009) Molecular identification of *Trichoderma* species associated with *Pleurotus ostreatus* and natural substrates of the oyster mushroom. *FEMS Microbiol. Lett.* 300: 58-67.
- Kubicek C, Bissett J, Druzhinina I, Gradinger C, Szakacs G (2003) Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet. Biol.* 38: 310-319.
- Lopes L, Carvalho A, Rocha G, De Souza J, Villela A (2009) Selection of *Trichoderma stromaticum* isolates for efficient biological control of witches' broom disease in cacao. *Biol. Control* 51: 130-139.
- Mejía L, Rojas E, Maynard Z, Bael S, Arnold E, Hebbar P, Samuels G, Robbins N, Herre E (2008) Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biol. Control* 46: 4-14.
- Migheli Q, Balmas V, Zelazowska M, Scherm B, Fiori S, Kopchinskiy A, Kubicek C, Druzhinina I (2009) Soils of a Mediterranean hot spot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-European, invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. *Env. Microbiol.* 11: 35-46.
- Peabody E (2005) Los dos patógenos más devastadores del cacao son parientes cercanos. www.ars.usda.gov/isis/espanol/pr/2005/051012.es.htm?pf=1.
- US Department of Agriculture. (Cons. 28/02/2008).
- Rifai M (1969) A Revision of the Genus *Trichoderma*. *Mycol. Papers* 116: 1-56.
- Rotz C, Kamphuis G, Karsten H, Weaver R (2007) Organic dairy production systems in Pennsylvania: a case study evaluation. *J. Dairy Sci.* 90: 3961-3979.
- Samuels G, Pardo-Schultheiss R, Hebbar K, Lumsden R, Bastos C, Costa J, Bezerra J (2000) *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycol. Res.* 104: 760-764.
- Samuels G, Suarez C, Solis K, Holmes K, Thomas S, Adnan I, Evans H (2006a) *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America. *Mycol. Res.* 110: 381-392.
- Samuels G, Dodd S, Lu B, Petrini O, Schroers H, Druzhinina I (2006b) The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies Mycol.* 56: 67-133.
- Shores M, Yedidia I, Chet I (2005) Involvement of Jasmonic Acid/Ethylene Signaling Pathway in the Systemic Resistance Induced in Cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95: 76-84.
- Vera R, Moreno B, Acevedo R, Trujillo E (2005) Caracterización de *Trichoderma* spp. por tipo de antagonismo y electroforesis de Isoenzimas. *Fitopatol. Venez.* 18: 1-8.
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. San Diego, CA, EEUU. pp 315-322.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberty E, Marra R, Woo S, Lorito M (2008) *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* 40: 1-10.
- Yedidia I, Shores M, Kerem Z, Benhamou N, Kapulnik Y, Chet I (2003) Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Appl. Env. Microbiol.* 69: 7343-7353.
- Zhang C, Druzhinina I, Kubicek C, Xu T (2005) *Trichoderma* biodiversity in China: evidence for a north to southern distribution of species in East Asia. *FEMS Microbiol. Lett.* 251: 251-257.