



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

EFFECTIVIDAD DE CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. EN EL CONTROL DE LA MONILIASIS DEL CACAO CAUSADA POR *Moniliophthora roreri*

VÍCTOR DEL CARMEN ARRAZATE ARGUETA

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2020



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **EFFECTIVIDAD DE CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. EN EL CONTROL DE LA MONILIASIS DEL CACAO CAUSADA POR *Moniliophthora roreri***, realizada por el alumno: **Víctor Del Carmen Arrazate Argueta**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Javier Hernández Morales

ASESOR



Dr. Misael Martínez Bolaños

ASESORA



M.C. Victoria Ayala Escobar

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, julio de 2020

EFFECTIVIDAD DE CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. EN EL CONTROL DE LA MONILIASIS DEL CACAO CAUSADA POR *Moniliophthora roreri*

Víctor Del Carmen Arrazate Argueta, M.C
Colegio de Postgraduados, 2020

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue obtener cepas nativas del género *Trichoderma* spp. con capacidad antagonica contra *M. roreri* causante de la moniliasis del cacao, aisladas de parcelas productoras de cacao y conocer mediante evaluación *In vitro*, su nivel de antagonismo. Para esto, se realizó la caracterización morfológica y fisiológica de 30 aislamientos de *Trichoderma* spp., usando técnicas de análisis multivariado con datos cuantitativos y cualitativos, análisis de componentes principales y análisis de conglomerados jerárquicos para distinguir grupo conformados; así mismo, se evaluó la capacidad antagonica bajo un diseño experimental completamente al azar para evaluar la capacidad antagonica de las especies nativas de *Trichoderma* spp. frente a *M. roreri* y finalmente, se identificaron molecularmente las especies con mayor potencial antagonico frente a *M. roreri*. Los resultados mostraron una amplia variación para las variables FC, TM, CA, CR, HC, NAC, TE, CE y FCON, por lo que la variabilidad de los aislamientos evaluadas fue explicada en tres componentes principales y ocho grupos bien conformados, divididos en subgrupos a partir del coeficiente de correlación semiparcial de 0.05. La clasificación del antagonismo tipo 1 predominó en el 86.67 % de los enfrentamientos duales, donde *Trichoderma* spp. cubrió totalmente a *M. roreri*; las cepas 1, 2 y 26 mostraron antagonismo tipo 2 y representó el 10 % de enfrentamientos donde *Trichoderma* spp. sobrecreció en dos terceras partes de la superficie de *M. roreri* y finalmente, la cepa 2 mostró antagonismo tipo 3 con el 3.33 % de enfrentamientos donde ningún organismo dominó al otro. No hubo enfrentamientos ubicados en las clases 4 y 5, lo que indicó que todas las cepas nativas de *Trichoderma* spp. con excepción de la cepa 2, tuvieron mayor capacidad de competencia por espacio y nutrientes con respecto a *M. roreri*. Las secuencias amplificadas se encontró que, de las 21 cepas, el 42.87% (4, 9, 10, 13, 15, 17, 18, 20 y 21) mostraron una identidad del 99% con *T. harzianum*; el 28.57% (2, 5, 6, 7, 14 y 16) mostraron identidad del 99% con *Trichoderma* spp.; 9.52% (23 y 29) mostraron una identidad del 99% con *T. virens*; 9.52% (1 y 8) mostraron una identidad del 99% con *T. spirale*; el 4.76% (1) mostró una identidad del 99% con *T. saturnisporum* y el 4.76% mostró una identidad del 99% con *T. viride*.

Palabras clave: *Theobroma cacao* L., *in vitro*, *Trichoderma* spp., antagonismo, *Moniliophthora roreri*.

EFFECTIVENESS OF NATIVE STRAINS OF *Trichoderma* spp. IN THE CONTROL OF CACAO MONILIASIS CAUSED BY *Moniliophthora roreri*

Víctor Del Carmen Arrazate Argueta, M.C
Colegio de Postgraduados, 2020

ABSTRACT

The objective of this study was to obtain native strains of the genus *Trichoderma* spp. with antagonistic capacity against *M. roreri*, which causes cacao moniliasis, isolated from cocoa-producing plots and to know, through In vitro evaluation, their level of antagonism. For this, the morphological and physiological characterization of 30 isolates of *Trichoderma* spp. Was carried out, using multivariate analysis techniques with quantitative and qualitative data, principal component analysis and hierarchical cluster analysis to distinguish conformed groups; Likewise, the antagonistic capacity was evaluated under a completely randomized experimental design to evaluate the antagonistic capacity of the native species of *Trichoderma* spp. against *M. roreri* and finally, the species with the greatest antagonistic potential against *M. roreri* were molecularly identified. The results showed a wide variation for the variables FC, TM, CA, CR, HC, NAC, TE, CE and FCON, so that the variability of the evaluated isolates was explained in three main components and eight well-formed groups, divided into subgroups from the semipartial correlation coefficient of 0.05. The classification of type 1 antagonism predominated in 86.67% of the dual confrontations, where *Trichoderma* spp. fully covered *M. roreri*; strains 1, 2 and 26 showed type 2 antagonism and represented 10% of confrontations where *Trichoderma* spp. it overgrew in two thirds of the surface of *M. roreri* and finally, strain 2 showed type 3 antagonism with 3.33% of confrontations where neither organism dominated the other. There were no clashes located in classes 4 and 5, which indicated that all the native strains of *Trichoderma* spp. With the exception of strain 2, they had a greater capacity to compete for space and nutrients with respect to *M. roreri*. The amplified sequences were found that, of the 21 strains, 42.87% (4, 9, 10, 13, 15, 17, 18, 20 and 21) showed 99% identity with *T. harzianum*; 28.57% (2, 5, 6, 7, 14 and 16) showed 99% identity with *Trichoderma* spp .; 9.52% (23 and 29) showed 99% identity with *T. virens*; 9.52% (1 and 8) showed 99% identity with *T. spirale*; 4.76% (1) showed 99% identity with *T. saturnisporum* and 4.76% showed 99% identity with *T. viride*.

Keywords: *Theobroma cacao* L., in vitro, *Trichoderma* spp., antagonism, *Moniliophthora roreri*.

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo por el apoyo recibido para realizar los estudios correspondientes al Programa en Fitosanidad/Fitopatología.

Así mismo agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del Programa Nacional de Posgrados de Calidad por la Beca recibida para realizar mis Estudios de Postgrado, al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) campo experimental Rosario Izapa por las facilidades y apoyo en la investigación.

Agradezco a mi profesor consejero y director de tesis Dr. Javier Hernández Morales por su paciencia, dedicación, apoyo y conocimientos compartidos durante mi proceso de formación académica. De manera paralela doy agradezco a la M.C. Victoria Ayala Escobar y al Dr. Misael Martínez Bolaños por su ayuda e interés por mi investigación por sus consejos y recomendaciones para la realización del trabajo.

Finalmente, mis más sinceros agradecimientos a mis padres, a mi hermano y a todos mis amigos que durante estos años me han brindado su apoyo incondicional. Sin el entusiasmo y colaboración de cada uno de ustedes no habría sido posible el desarrollo del presente trabajo. MUCHAS GRACIAS

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS	v
CONTENIDO.....	vi
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	3
2.1. Objetivo general.....	3
2.2. Objetivos específicos	3
2.3. Hipótesis	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA	3
3.1. Características del cacao (<i>Teobroma cacao</i> L.)	3
3.1.1. Origen y distribución.....	3
3.1.2. Taxonomía	4
3.1.3. Morfología	4
3.1.3.1. Árbol.....	4
3.1.3.2. Flor	4
3.1.3.3. Fruto.....	5
3.1.3.4. Hoja.....	6
3.1.3.5. Inflorescencia	6
3.1.3.6. Raíz.....	7
3.1.3.7. Semilla.....	7
3.1.4. Requerimientos climáticos	7
3.1.4.1. Temperatura.....	7
3.1.4.2. Precipitación.....	8
3.1.4.3. Humedad del suelo	8
3.1.4.4. Humedad relativa	9
3.2. Moniliasis del cacao causada por el hongo <i>Moniliophthora roreri</i>	9
3.2.1. Situación actual de la enfermedad	9

3.2.2.	Etiología	10
3.2.3.	Hospedantes	10
3.2.4.	Epidemiología.....	10
3.2.5.	Ciclo de la enfermedad y sintomatología	11
3.2.6.	Manejo integrado de la enfermedad.....	12
3.3.	Aspectos del género <i>Trichoderma</i>	13
3.3.1.	Descripción general.....	13
3.3.2.	Mecanismos de acción.....	15
3.4.	Control biológico de <i>Moniliophthora roreri</i> con especies del género <i>Trichoderma</i>	15
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1.	Diversidad morfológica y fisiológica de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. en suelos cacaoteros	16
4.1.1.	Muestreo de suelo.....	16
4.1.2.	Aislamiento de especies del género <i>Trichoderma</i>	17
4.1.3.	Caracterización morfológica y fisiológica de especies del género <i>Trichoderma</i>	17
4.2.	Capacidad antagónica <i>in vitro</i> de diferentes aislados nativos de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Moniliophthora roreri</i> causante de la moniliasis del cacao 19	
4.2.1.	Evaluación de la actividad antagónica	19
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
5.1.	Diversidad morfológica y fisiológica de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. en suelos cacaoteros	21
5.1.1.	Aislamiento de especies del género <i>Trichoderma</i>	21
5.1.2.	Caracterización morfológica y fisiológica de especies del género <i>Trichoderma</i>	23
5.1.3.	Análisis de componentes principales (ACP).....	25
5.1.4.	Análisis de conglomerados jerárquicos (ACJ)	26

5.2. Capacidad antagónica <i>in vitro</i> de diferentes aislados nativos de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Moniliophthora roreri</i> causante de la moniliasis del cacao	28
5.2.1. Evaluación de la actividad antagónica	28
6. CONCLUSIONES	37
7. BIBLIOGRAFÍA.....	38

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Sitios de colecta de muestras de suelos cacaoteros de México.	16
Cuadro 2. Caracteres morfológicos, microscópicos y fisiológicos de <i>Trichoderma</i> spp., evaluados para estudiar la diversidad de especies nativas.	18
Cuadro 3. Valores propios y proporción de la varianza total explicada por componente principal, basado en caracteres morfológicos, microscópicos y fisiológicos de <i>Trichoderma</i> spp.....	25
Cuadro 4. Valores propios y proporción de la varianza total explicada por componente principal, basado en ANT, EAMr, EZI y ESMr de 30 confrontaciones entre <i>Trichoderma</i> spp. y <i>M. roreri</i>	32

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Frecuencia por clase de caracteres morfológicos (9) de 30 cepas nativas de *Trichoderma* spp. (FC = Forma de la colonia, TM = Textura del micelio, CA = Color anverso de la colonia, CR = Color reverso de la colonia, HC = Halo central de la colonia, NAC = Número de anillos concéntricos, TE = Tipo de esporulación, CE = Capacidad de esporulación y FCON = Forma de conidios). 23
- Figura 2.** Color anverso y reverso de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en medio de cultivo PDA. a-d= Color anverso a los tres días de incubación; a: Blanco; b: Blanco-Marrón; c: Amarillo-Verdoso; d: Amarillo. e-h= Color reverso a los 6 días de incubación; e: Blanco; f: Blanco-Amarillento; g: Blanco-Verdoso y h: Amarillo. 24
- Figura 3.** Halo central de cepas nativas de *Trichoderma* spp. a los tres días de incubación a 25°C en medio de cultivo PDA. a: Ausente; b: Micelial-Hialino; c: Micelial-Algodonoso y d: Esporulativo. 24
- Figura 4.** Tipo de esporulación de cepas nativas de *Trichoderma* spp. a los seis días de incubación a 25°C en medio de cultivo PDA. a: Ausente; b: Dispersa; c: Homogénea y d: Anular. 25
- Figura 5.** Distribución de 30 cepas nativas de *Trichoderma* spp. **a:** Distribución en función de los componentes principales 1 y 2 (CP1 = componente principal 1 y CP2 = componente principal 2). **b:** Distribución en función de los componentes principales 1 y 3 (CP1 = componente principal 1 y CP3 = componente principal 3). 26
- Figura 6.** Dendograma de caracteres cualitativos y cuantitativos para 30 cepas nativas de *Trichoderma* spp. GI= Grupo uno, GII= Grupo dos, GIII= Grupo tres, GIV= Grupo cuatro, GV= Grupo cinco, GVI= Grupo VII y GVIII= Grupo ocho. 27
- Figura 7.** Frecuencia de variables antagónicas de 30 cepas nativas de *Trichoderma* spp. DPCH = Días al primer contacto entre hifas, ANT = Clasificación del antagonismo, EAMr = Capacidad de esporulación antes de *M. roreri.*, EZI= Capacidad de esporulación en la zona de intersección y ESMr=

Capacidad de esporulación después de la zona de intersección con <i>M. roreri</i>	28
Figura 8. Momento del primer contacto entre hifas de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>M. roreri</i> en medio de cultivo PDA. A= <i>Trichoderma</i> spp. y B= <i>M. roreri</i>	29
Figura 9. Capacidad antagónica de 30 cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>M. roreri</i> en medio de cultivo PDA a los 8 días de interacción. a= <i>Trichoderma</i> spp. sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio, b= <i>Trichoderma</i> spp. sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio y c= <i>Trichoderma</i> spp. y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro. 1= <i>Trichoderma</i> spp. y 2= <i>M. roreri</i>	31
Figura 10. Capacidad de esporulación de 30 cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>M. roreri</i> en medio de cultivo PDA a los 15 días de interacción. a= Esporulación antes de la zona de intersección, b= Esporulación en la zona de intersección y c= Esporulación después de la zona de intersección. 1= <i>Trichoderma</i> spp. y 2= <i>M. roreri</i>	32
Figura 11. Distribución de 30 confrontaciones entre <i>Trichoderma</i> spp. y <i>M. roreri</i> . a: Distribución en función de los componentes principales 1 y 2 (CP1 = componente principal 1 y CP2 = componente principal 2). b: Distribución en función de los componentes principales 1 y 3 (CP1 = componente principal 1 y CP3 = componente principal 3).....	33
Figura 12. Selección de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. con mayor potencial antagónico basado en ANT, EAMr, EZI y ESMr de acuerdo al cuadrante IV del ACP explicado por CP1 y CP3.....	34
Figura 13. Amplificación de ADN de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. utilizando los iniciadores ITS1f e ITS4r; MM: Marcador Molecular; (-): Testigo negativo (Agua); (+): Testigo positivo (<i>Fusarium oxysporum</i>).....	36
Figura 14. Relación filogenética de 21 aislamientos de <i>Trichoderma</i> inferido por análisis de secuencias de ADNr (ITS1, ITS2 y 5.8S).	37

1. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L), originario de América del Sur, es un cultivo de alta importancia económica, industrial, social, cultural y ambiental (Motamayor *et al.*, 2002). Pertenece al género *Theobroma*; vocablo griego que significa “alimento de los dioses”. La palabra cacao deriva del maya cacau; cac = rojo y cau = fuerza y fuego. Los mercaderes mayas dieron a conocer el cacao al pueblo azteca, el cual a su vez adoptó su cultivo y empezó a consumirlo en forma de una bebida hecha con cacao molido, agua y miel; a la que se llamó xocolatl, que en náhuatl significa “agua espumosa” (Avendaño *et al.*, 2011).

La producción mundial de cacao se estima en 4,739 millones de toneladas de grano. El continente africano (Camerún, Costa de Marfil, Ghana, Nigeria y Otros) concentra el 76.5% de la producción mundial y el 64 % de la superficie mundial sembrada. Los países de América (Brasil, Ecuador y Otros) contribuyen con el 16 % de la producción mundial y el 17 % de la superficie sembrada, mientras que Asia y Oceanía aportan el 7.5% de la producción y el 19 % de la superficie sembrada (ICCO, 2018).

En México, el cacao es uno de los productos agrícolas más importantes de los trópicos húmedos (Ten Hoopen *et al.*, 2012). Se cultivan 59,841.5 hectáreas, distribuidas en los estados de Tabasco (68.3%), Chiapas (31.3%) y Guerrero (0.4%) (SIAP, 2018). Sin embargo, su producción y superficie sembrada han disminuido en los últimos años con la presencia de nuevas enfermedades como la moniliasis del cacao causado por el hongo *Moniliophthora roreri* (Ten Hoopen *et al.*, 2012), principal limitante parasítica que ocasiona pérdidas de hasta el 80% de la producción por unidad de superficie (Phillips-Mora *et al.*, 2006).

Las medidas intensivas requeridas para el manejo de la enfermedad dependen de un saneamiento eficiente, actividad que encarece el costo de producción (Krauss *et al.* 2010). Las prácticas culturales han sido el método más utilizado para el combate de la enfermedad (Soberanis *et al.*, 1999) y el uso de fungicidas ha sido una práctica poco empleada, debido a las estrategias erráticas de evaluación de fungicidas y al precio fluctuante del cacao (Bateman *et al.*, 2005). También se han establecido programas para

el desarrollo de material genético resistente (Phillips-Mora *et al.*, 2012); sin embargo, no se han obtenido progresos notables en la utilización comercial de clones con resistencia a la enfermedad.

Krauss y Soberanis (2001) mencionan que el biocontrol ofrece potencial en el manejo sostenible de la moniliasis mediante el uso de organismos antagonistas. Los autores reportan que especies del género *Trichoderma* muestran control sobre *M. royeri*. La versatilidad, adaptabilidad y la fácil manipulación de las especies de *Trichoderma* permite tener diferentes roles en la agricultura (Martínez *et al.* 2013). El principal beneficio de *Trichoderma* es el antagonismo con microorganismos patógenos de las plantas (Guedez *et al.*, 2012; Cuervo *et al.*, 2014; Landero *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016; Youssef *et al.*, 2016), además, ha mostrado influencia en la promoción del crecimiento vegetativo (Youssef *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2016) y, otro efecto favorable, es que induce resistencia a fitopatógenos en las plantas con las que se asocia (Liu *et al.*, 2016).

Trichoderma produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios, las cuales son activas contra fitopatógenos en diferentes fases de ciclo de vida, desde la germinación de la spora hasta la esporulación, además ésta reúne una serie de características en su interacción directa con el patógeno. Según Harman (2000) y Howell (2006), hace de este organismo un buen agente antagonista de hongos causantes de enfermedades en los cultivos.

En la búsqueda de estos agentes de control biológico, una de las estrategias básicas es la exploración inicial de los enemigos naturales nativos (Vázquez *et al.*, 2008) dada la importancia de cada uno de ellos en la interacción planta-patógeno-antagonista y de las condiciones ambientales (Chet and Inbar, 1994; Harman, 2000). Por lo anterior, se requiere del uso más extenso del control biológico y para ello es necesario la obtención de nuevos agentes biocontroladores más eficaces de los que existen actualmente, especies de *Trichoderma* nativos que sean capaces de competir con el patógeno dentro de un mismo nicho ecológico; para esto es conveniente distinguir capacidades potenciales de dichos agentes y las medidas en que las mismas se expresan dentro de cada ecosistema (Andrews, 1992).

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. Objetivo general

Generar nuevas alternativas para el manejo agroecológico de la moniliasis de cacao a partir de agentes hiperparásitos biocontroladores.

2.2. Objetivos específicos

Aislar y caracterizar cepas nativas de *Trichoderma* spp. con capacidad antagónica contra *Moniliophthora roreri* causante de la moniliasis del cacao, aisladas de suelos cacaoteros de México.

Evaluar la capacidad antagónica *In vitro* de especies nativas de *Trichoderma* spp. contra *Moniliophthora roreri*.

2.3. Hipótesis

Existe gran diversidad de especies nativas de *Trichoderma* spp. asociadas a suelos cacaoteros y que representan grados de inhibición del desarrollo del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri*.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Características del cacao (*Teobroma cacao* L.)

3.1.1. Origen y distribución

Su centro de origen es la cuenca del Alto Amazonas. El cacao está distribuido en las tierras bajas tropicales y se cultiva principalmente entre los 20° latitud norte y 20° de latitud sur. Sin embargo, las mejores plantaciones están localizadas entre de latitud norte y 10° sur. En América el cacao se cultiva desde el sur de México hasta Brasil y Bolivia (Ochse *et al.* 1974). La distribución natural del cacao en Sudamérica alcanza hasta los 15° de latitud sur, en los ríos Alto Beni y Mamoré del territorio boliviano y por el norte hasta cerca de los 10° de latitud en los límites de los llanos venezolanos por las vertientes bajas de las sierras de Parimá, que dividen a Venezuela de Brasil (Soria 1966).

3.1.2. Taxonomía

El cacao es una especie diploide ($2n=20$ cromosomas), de ciclo vegetativo perenne. Linneo en 1753, primero ubicó el género *Theobroma* en la familia Tiliaceae. Después consideró que podría ser incluido en la familia Sterculiaceae, y actualmente es incluido en la familia Malvaceae. *Theobroma cacao* es una de las 22 especies del género *Theobroma* (Hardy, 1960), originaria de Sudamérica y partes de Centroamérica (Ogata, 2007).

La clasificación taxonómica de *Theobroma cacao* L. es la siguiente:

Dominio: Eukaryota

Reino: Plantae

Phylum: Spermatophyta

Subphylum: Angiospermae

Clase: Dicotyledonae

Orden: Malvales

Familia: Sterculiaceae

Género: *Theobroma*

Especie: *Theobroma cacao*

(CABI,2018)

3.1.3. Morfología

3.1.3.1. Árbol

Tamaño mediano que cuando crece a la sombra puede alcanzar alturas hasta de 20 metros. Presenta un tronco recto que se puede desarrollar de formas muy variadas. El árbol de cacao proviene de semilla, emite su primera ramificación entre los 0.8 m a 1.2 m de tres a seis ramas. Si se deja a libre crecimiento, el árbol emite chupones cerca del molinillo, que luego forman un segundo piso (Avendaño *et al.*, 2011).

3.1.3.2. Flor

Las flores están sostenidas por pequeños pedicelos, unidos al eje en una cima monocacial o bípara por medio de una zona de abscisión, que permite el desprendimiento de la flor cuando no ha sido fecundada. El pedicelo que sostiene la flor es pequeño (de 1 cm a 2 cm) y puede variar en pigmentación, contenido de vellos y glándulas laterales. La flor tiene de 1 cm a 2 cm de diámetro, es hermafrodita, pentámera y de ovario súpero. La fórmula floral es: $K_5, C_5, A_{5-5}, G(5)$, que significa cinco sépalos libres, cinco pétalos libres, 10 estambres en dos verticilos, uno fértil y otro infértil, que reciben el nombre de estaminodios, ubicados alrededor del pistilo a manera de protección, y un ovario súpero de cinco carpelos unidos (Bradeau, 1978). El pistilo está formado por un ovario constituido por la fusión de cinco lóbulos, cada uno de los cuales puede contener de cinco a 15 óvulos, dependiendo del genotipo. El estilo es de unos 5 cm de largo, y termina en un estigma compuesto de cinco filamentos. La flor inicia su apertura generalmente por la tarde, aproximadamente a las 17 horas; la velocidad de apertura depende del ambiente, así, entre más seco y con luz brillante es más rápida. Las anteras se abren por la mañana, pero la dehiscencia realmente se inicia a partir de las 24 hora (Avendaño *et al.*, 2011).

3.1.3.3. Fruto

El fruto es el resultado de la maduración del ovario, que una vez fecundado es una baya indehiscente con tamaños que oscilan de 10 a 42 cm, de forma variable (oblonga, elíptica, ovada, esférica y oblata); de superficie lisa o rugosa, y de color rojo o verde en estado inmaduro, característica que depende de los genotipos. El número de semillas por fruto es un carácter muy variable y al parecer está altamente influenciado por el ambiente; el número máximo de semillas es el número de óvulos por ovario (Hardy, 1961).

El fruto es sostenido por un pedúnculo leñoso, resultado de la maduración del pedicelo de la flor. El pericarpio está formado por tres partes: a) el exocarpio o sección exterior, formado por un tejido esponjoso, con o sin pigmentaciones, de espesor variable; b) el mesocarpio, es una capa de células semileñosas, dura, cuya característica puede variar según el genotipo, así en los cacaos criollos es suave mientras que en los forasteros es

dura, y c) una capa interior o endocarpio carnosa y suave, que tiene continuidad con el mucílago de la semilla (Avendaño *et al.*, 2011).

3.1.3.4. Hoja

Las hojas tienen características propias dependiendo del tipo de tallo en que se originan. Las hojas del tronco ortotrópico comúnmente poseen un pecíolo largo (7 a 9 cm) con dos pulvinos, uno en la inserción del tallo y otro inmediatamente abajo de la lámina, lo cual permite que la hoja se oriente respecto a la luz. Las hojas de las ramas de abanico son de pecíolo corto con un pulvino menos marcado. Las distribuciones de las hojas en el tronco tienen una filotaxia de 3/8, es decir, que a la tercera vuelta la primera y la octava están en el mismo plano; mientras que las de las ramas, están en espiral (Bradeau, 1978).

La mayoría de las hojas tienen pigmentación, cuyo color varía desde un verde claro, casi blanquecino, hasta el violeta oscuro. Aparentemente las más pigmentadas se encuentran entre los cacaos criollos y trinitarios y los menos pigmentadas se encuentran en los amazónicos. También el ápice y la parte basal de la hoja varían considerablemente en la especie, pero se mantienen constantes en un mismo clon y por lo tanto ayudan a identificarlo (Avendaño *et al.*, 2011).

3.1.3.5. Inflorescencia

Las inflorescencias se localizan en el tallo y ramas principales (cauliflor) en la base de las hojas, alrededor de la cicatriz y de la yema axilar que deja una hoja al caer. Con el transcurso del tiempo, en los sitios de origen se produce un engrosamiento secundario que recibe el nombre de cojinete floral. El número de flores formadas por cojín varía dependiendo del genotipo y del sistema de cultivo (Bradeau, 1978).

La floración generalmente se inicia pasados los tres años de edad, aunque existe material híbrido interclonal en el cual la floración ocurre entre los 14 y 18 meses de edad. El cacao florece todo el año, aunque existen variedades que lo hacen únicamente durante cierta época. El ambiente ejerce una fuerte influencia en la floración, pero el

aspecto genético en ocasiones puede ser de mayor efecto, tal como ocurre en algunos cacaos criollos (Avendaño *et al.*, 2011).

3.1.3.6. Raíz

El árbol de cacao proveniente de semilla tiene una raíz pivotante principal, que puede crecer entre 1.2 y 1.5 m dependiendo de las características del suelo. En los primeros 20 a 25 cm, desde la corona radical se desarrolla gran cantidad de raíces laterales o secundarias que dan origen a terciarias y éstas a su vez, cuaternarias, y así sucesivamente. Puesto que cerca del 80% a 90% de las raíces se encuentran en esta sección, cualquier tipo de cultivo o labor al suelo mal empleado puede dañarlas. Los árboles provenientes de estacas no forman raíz pivotante principal, pero forman de dos a tres raíces laterales secundarias, que penetran en el suelo a una profundidad parecida a la que llega la raíz principal y desempeñan una función similar a ésta (Hernández, 1981).

3.1.3.7. Semilla

Las semillas o almendras son de tamaño variable (1.2 a 3 cm), cubiertas con un mucílago o pulpa de color blanco cremoso, de diversos sabores y aromas (floral, frutal) y grados de acidez, dulzura y astringencia. En el interior de la almendra se encuentran los cotiledones, que pueden ser de color morado, violeta, rosado o blanco, según el genotipo (Avendaño *et al.*, 2011).

3.1.4. Requerimientos climáticos

3.1.4.1. Temperatura

La temperatura es un factor de gran importancia debido a su relación con el desarrollo, floración y fructificación del cultivo de cacao. Paredes (2003), afirma que la temperatura media anual óptima debe ser de alrededor de 25 °C; Zúñiga y Arévalo (2008), mencionan que para que el cacao tenga un buen crecimiento, floración y fructificación abundante, y brotación vegetativa bien repartida durante el año, la temperatura media anual óptima debe estar entre los 23 y 28 °C.

3.1.4.2. Precipitación

El cacao es una planta muy sensible tanto a las deficiencias como a los excesos de humedad en el suelo. La cantidad y distribución de la cosecha de cacao está regulada a menudo más por la lluvia que por cualquier otro factor ecológico. El riego en las áreas de baja precipitación y obras de drenaje donde existen excesos de humedad en el suelo, son prácticas que generalmente pueden aumentar la producción y expandir el cultivo a otras regiones (Avendaño *et al.*, 2011).

Vázquez *et al.* (2004) y Olivera (1997) mencionan que la precipitación que requiere el cultivo de cacao oscila entre 1,500–2,500 mm en las zonas de trópico húmedo y de 1,000–1,500 mm en las zonas más templadas o en los valles más altos, la precipitación más adecuada es la que oscila entre los 1 200 mm y 2 500 mm bien distribuida durante todo el año.

Para Rodríguez (2001), el mínimo anual de precipitación requerida o necesaria se sitúa alrededor de los 1 200 mm, siendo preferible una media superior a 1,500 mm.

3.1.4.3. Humedad del suelo

Un régimen de lluvias ideal no significa necesariamente una distribución uniforme durante todo el año, sino una distribución de acuerdo con los cambios en las condiciones climáticas que afectan la demanda de humedad del suelo por parte de la planta. Para una producción óptima de cacao, la provisión de agua al suelo ya sea por la lluvia o el riego, debe mantener la humedad aprovechable entre los niveles de 50% a 70%. En zonas con precipitaciones superiores a los 4,000 mm anuales, el cultivo de cacao solo es económicamente rentable en suelos bien drenados, ya que la inundación por unos días provoca asfixia de las raíces y la muerte del árbol. Cuando la época de sequía no es muy prolongada se pueden tener cosechas permanentes durante todo el año, mientras que, si esta época se prolonga, la cosecha se concentra en periodos cortos (Avendaño *et al.*, 2011).

El cacao desarrolla el 95% de sus raíces en los primeros 60 cm de profundidad del suelo (Cadima, citado por Ruiz *et al.*, 1999) y es en los primeros 30 cm donde se encuentra el

mayor porcentaje de raíces fisiológicamente activas encargadas de la absorción de agua y nutrientes (Zúñiga 2008). Se consideran como áreas no aptas aquellas cuyos suelos presentan fases físicas líticas, ya que contienen pedregosidad en sus primeros 50 cm de profundidad, característica que impide el favorable desarrollo de la planta. Es común observar muerte de árboles de cacao debido a que la raíz pivotante encuentra estratos con rocas, una capa dura o una capa impermeable de arcilla. El cacao raras veces prospera en terrenos poco profundos (Vázquez *et al.*, 2004).

El sistema radical del cacao alcanza aproximadamente 1.5 m, por ello se ha planteado que dentro de las condiciones óptimas de suelo, es necesario tener en cuenta profundidades de más de 1.5 m (Vázquez *et al.*, 2004; Ecocrop, 2008); el suelo debe tener una profundidad mínima de 80 cm, pero es mucho más apropiada cuando se alcanzan 1.5 metros. Las propiedades físicas del suelo son consideradas como las más importantes para el cacao, a pesar de la relevancia de las propiedades químicas en la nutrición del árbol (Rodríguez, 2001).

3.1.4.4. Humedad relativa

Una humedad relativa alta, es una condición necesaria para el desarrollo del cacao y especialmente deseable cuando la humedad aprovechable en el suelo es insuficiente, ya que permite disminuir las pérdidas por transpiración. Sin embargo, no existen evidencias experimentales que demuestren que una humedad atmosférica menor pudiera ser perjudicial. En los lugares donde además se presentan períodos prolongados de neblina y nubosidad, los árboles son víctima de ataques de hongos (Avendaño *et al.*, 2011).

3.2. Moniliasis del cacao causada por el hongo *Moniliophthora roreri*

3.2.1. Situación actual de la enfermedad

La moniliasis del cacao es la principal limitante parasítica que ocasiona pérdidas de hasta el 80% de la producción por unidad de superficie (Phillips-Mora *et al.*, 2006). Es una enfermedad que afecta al fruto y descrita por numerosos investigadores como la enfermedad más severa en plantaciones y altamente destructiva en América Latina, ocasionando serias pérdidas económicas en la producción (Phillips-Mora *et al.*, 2005).

En México, se registran pérdidas en diferentes sentidos, con altos costos económicos, sociales y ambientales, similares a los observados en otros países de América Central. La moniliasis se encuentra diseminada en las plantaciones de los estados de Chiapas y Tabasco. Su alta agresividad afecta negativamente la rentabilidad del cultivo al depender en gran parte del manejo de fungicidas, del material genético y del manejo agronómico y cultural. Por su rápida dispersión se ha llegado a la conclusión que factores como el viento, insectos, mamíferos, aves y además del factor humano han jugado un papel importante en el desplazamiento de este hongo en la mayor parte de las regiones productoras de cacao en el mundo (Avendaño *et al.*, 2011).

3.2.2. Etiología

Estudios recientes sobre la taxonomía del hongo mediante pruebas morfológicas, citológicas y moleculares confirman a este patógeno como Bacidiomicete (Evans *et al.*, 2003), correspondiente al orden Agaricales (Phillips-Mora, 2003), y familia Marasmiaceae (Aime y Phillips-Mora, 2005). En la actualidad se desconoce el estado perfecto del hongo (sexual o teleomorfo), por lo que se cree que su reproducción se realiza asexualmente por conidias, las cuales son la única estructura hasta ahora conocida capaz de causar infección (Evans *et al.*, 2003). Las conidias pueden ser globosas, subglobosas y elípticas, pudiendo medir de 7-10.5, 6.3-9.3, 7.5-11.6 μm , respectivamente (Villavicencio y Jiménez, 2010).

3.2.3. Hospedantes

El hongo *M. roreri* sólo se ha encontrado atacando los frutos de cacao (*Theobroma cacao*) y otras especies como: *T. angustifolium*, *T. bicolor*, *T. gileri*, *T. grandiflora*, *T. mammosum*, *T. simiarum* y *T. sylvestre* (Porrás-Umaña, 1982).

3.2.4. Epidemiología

Esta enfermedad ha sido relatada a una altitud entre 0 y 1520 m.s.n.m., donde existe precipitación fluvial anual de 780 a 5,500 mm y una temperatura de 18 a 28 °C (Phillips, 2006; IICA, 2006). Meléndez (1993) encontró que existe una estrecha relación entre la humedad relativa y el movimiento de esporas del hongo, indicando que la liberación es

realizada entre el 71 y 74% de humedad relativa y las 10:00 am hasta las 14:00 pm aproximadamente. Según Phillips-Mora (2006), menciona que las condiciones secas, humedad relativa baja y temperatura mayor a 26 °C favorecen la liberación y dispersión de las conidias, y las lluvias intensas y frecuentes favorecen la presencia de agua libre sobre los frutos, facilitando la germinación y penetración de las conidias. La germinación de las conidias es favorecida sobre temperaturas medias de 22 °C y humedad relativa del 93 % (Albuquerque *et al.*, 2005).

3.2.5. Ciclo de la enfermedad y sintomatología

El ciclo de vida de *M. royeri* durante el proceso de la enfermedad no ha sido completamente descifrado, mostrando una fase biotrófica y otra hemibiotrófica durante el desarrollo de la enfermedad (Tiburcio *et al.*, 2010).

Una de las características del patógeno es su largo período de incubación antes de aparecer los síntomas (Johnson *et al.*, 2008). El tiempo de infección puede ser de 3 a 8 semanas, pudiendo variar según la edad del fruto, la severidad del ataque, la susceptibilidad del árbol y las condiciones de clima, principalmente presencia de lluvias, mientras que en frutos tiernos, en días lluviosos y calurosos, el período de incubación se acorta a tres semanas (FHIA, 2003), sin embargo, Cruz (1993) relata que el período de incubación (latente) fluctúa entre 30 y 70 días.

En zonas de cultivo, la infección se presenta en la superficie del fruto y en cualquier fase del desarrollo vegetativo. Sin embargo, la susceptibilidad más alta se observa en los primeros estados de desarrollo del fruto (Albuquerque *et al.*, 2005).

El ciclo se inicia cuando la humedad ambiental es baja (periodo seco), donde se generan millones de conidiosporas. Luego, estas son diseminadas por el viento y lluvia, depositándose en la superficie de las hojas y frutos del hospedante (Albuquerque *et al.*, 2005). Los conidios germinan en ambientes húmedos y a temperaturas superiores a 24 °C, en un lapso de 6 a 8 horas, seguido por la penetración de la epidermis a través del desarrollo de hifas infectivas (Merchán, 1981). Es así como las hifas se dirigen hacia los tejidos centrales (mesodermos y semillas) del fruto para producir proteínas relacionadas con necrosis del tejido interno y externo (García *et al.*, 2007). Estas proteínas

relacionadas con la patogénesis tienen alta identidad con proteínas halladas en *Moniliophthora perniciosa*, donde se conoce que son secretadas al apoplasto e inducen necrosis en tejidos infectados. Adicionalmente, análisis filogenéticos muestran evidencias que estos genes fueron probablemente adquiridos por transferencia horizontal de Oomicetes y Ascomicetes que comparte el mismo hábitat (Tiburcio *et al.*, 2010).

En este estado de la infección presenta puntos aceitosos de diámetros pequeños (< 2 mm), aumentando de tamaño a los 10 a 20 días (Jaimes y Aranzazu, 2010). Posterior a este periodo se observan protuberancias en los frutos y después de 2 a 3 meses, manchas aceitosas color café oscuro sobre las lesiones generadas; finalmente genera micelio blanco con esporas infectivas, siendo estas las causantes de la transformación en la pigmentación marrón del fruto (Ram, 1989).

3.2.6. Manejo integrado de la enfermedad

Debido a la arquitectura del árbol y ubicación de las mazorcas, se puede utilizar productos químicos como el sulfato de cobre a una dosis de 2 kg.ha¹ en siembras de alta densidad, realizando aplicaciones semanales durante tres meses a partir de los primeros picos más intensos de floración y dirigido a los frutos en su periodo de mayor crecimiento (Crespo del Campo y Crespo, 1997). Por otro lado, los fungicidas sistémicos pueden mejorar la eficiencia en el control de *M. rozeri*, pero incrementan los costos de producción (Flood y Murphy, 2004).

El control genético ofrece solución con el uso de variedades resistentes que reduce drásticamente el uso de fungicidas, haciendo el cultivo más amigable con el medio ambiente y más atractivo para los pequeños agricultores (Johnson *et al.*, 2008), siendo la mejor alternativa, desde el punto de vista económico, ambiental y de manejo para el productor, la obtención de nuevas variedades con resistencia a monilliasis (Solís *et al.*, 2009). Sin embargo, los programas para el desarrollo de material genético resistente no han generado progresos notables en la utilización comercial de clones con resistencia a la enfermedad (Phillips-Mora *et al.*, 2012).

Avendaño *et al.* (2011) menciona que los métodos de control cultural y biológico es en la actualidad la alternativa más recomendada. La poda frecuente, regulación del estrato superior, buen drenaje, densidades apropiadas, buen control de malezas y correcto programa de fertilización, evita el establecimiento y desarrollo del patógeno; en caso de que la enfermedad llegase a establecerse, con un manejo cultural adecuado estas pueden ser controladas económicamente y se podrá convivir con la enfermedad, y si la enfermedad ya está presente, es de suma importancia remover las partes afectadas para reducir la intensidad (Johnson *et al.*, 2008). Es importante la recolección y destrucción de frutos enfermos, pues es el método de control más recomendado contra la enfermedad (Sánchez *et al.*, 2003), pudiendo ser ella de forma semanal (Krauss *et al.*, 2003).

Por otra parte, el control biológico es una herramienta en el manejo integrado de plagas, que ha adquirido relevancia por la preocupación de la preservación del ambiente y la inocuidad alimentaria (Gutiérrez-Ramírez *et al.*, 2013). Estudios realizados durante los últimos años han demostrado el gran potencial de hongos para el control de la moniliasis (Krauss y Soberanis, 2003; Suárez y Cabrales, 2008), principalmente especies antagonistas del género *Trichoderma* (Suárez y Rangel, 2013).

3.3. Aspectos del género *Trichoderma*

3.3.1. Descripción general

Las especies de *Trichoderma* han sido investigadas como agentes de control biológico de enfermedades fúngicas por cerca de 70 años (Hjeljord y Tronsmo, 1998). Las especies del género *Trichoderma* se caracterizan por ser hongos saprófitos, que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, los cuales son capaces de descomponerla y en determinadas condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica (Rodríguez, 1990).

El éxito de *Trichoderma* es debido a su alta capacidad reproductiva, habilidad para sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables, eficiencia en la utilización de nutrientes, capacidad para modificar la rizósfera, fuerte agresividad hiperparásita,

eficiencia en promoción de crecimiento e inducción de mecanismos de defensa (Benitez *et al.*, 2004).

Trichoderma se ubica taxonómicamente de la siguiente manera:

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

Género: *Trichoderma*

(CABI, 2019)

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa (Rifai, 1969). El micelio es ralo en su mayoría, y visto al microscopio es fino, los conidióforos son ramificados, parecen un árbol pequeño. Los mismos se presentan como penachos compactados que forman anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal. Estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies. Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del período vegetativo de las plantas (Rifai, 1969). Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos. Además de los conidióforos, estas se pueden producir sobre fiálides que emergen directamente del micelio (Harman, 2003).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* presentan clamidosporas, las cuales pueden ser intercalares y en ocasiones terminales. Las clamidosporas toleran condiciones ambientales adversas, son estructuras de sobrevivencia y permiten que el hongo pueda perdurar a través del tiempo (Stefanova *et al.*, 1999). No obstante, las clamidosporas recién formadas presentan más de 75% de germinación, bajo condiciones óptimas de humedad (> 75%) y temperatura (28- 30 °C). Debido a esto se dice, que las especies de

Trichoderma produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios (Díaz, 1994).

3.3.2. Mecanismos de acción

En la acción biocontroladora de *Trichoderma* se han descrito diferentes mecanismos de acción que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos. Entre estos, los principales son la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, los que tienen una acción directa frente al hongo fitopatógeno (Lorenzo, 2001).

3.4. Control biológico de *Moniliophthora roreri* con especies del género *Trichoderma*

En la búsqueda de agentes de control biológico, una de las estrategias básicas debe ser la exploración inicial de los enemigos naturales nativos (Vázquez *et al.*, 2008). Dada la importancia de cada uno de ellos en la interacción planta-patógeno-antagonista y de las condiciones ambientales (Chet and Inbar, 1994; Harman, 2000).

Reyes-Figueroa *et al.* (2016) bajo condiciones in vitro, evaluaron nueve especies de *Trichoderma*, obtenidas de la rizósfera de *T. cacao*. Los aislamientos con micoparasitismo sobre *M. roreri* fueron las especies *T. harzianum* (Rifai), *T. virens* (Mill, Giddens & Foster) Arx, *T. spirale* (Bissett), *T. brevicompactum* (Kraus, Kubicek & Gams), *T. koningiopsis* (Samuels, Suárez & Evans) y *T. asperellum* (Samuels, Lieckf & Nirenberg). Los aislamientos que mostraron antibiosis fueron *T. asperellum*, *T. koningiopsis*, *T. pleuroticola*, *T. virens* y *T. harzianum*. La acción antibiótica de los aislamientos de *T. harzianum* también ha sido descrita sobre el crecimiento micelial de *M. roreri* y *M. pernicioso* (Bailey *et al.*, 2008).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diversidad morfológica y fisiológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en suelos cacaoteros

Se colectaron muestras de suelo para el aislamiento y caracterización de especies antagonistas del género *Trichoderma* y frutos (mazorcas) enfermos para identificar al hongo fitopatógeno causante de la moniliasis del cacao.

Se ubicaron 6 sitios (parcelas) de cacao distribuidos en los estados de Chiapas, Tabasco y Yucatán; sitio 1: Tilo, Pichucalco, Chiapas; sitio 2: El triunfo, Escuintla, Chiapas; sitio 3: Zunú, Tlacotalpa, Tabasco; sitio 4: Maravilla Tenejapa, Chiapas; sitio 5: Unión Jamaica, Escuintla, Chiapas y sitio 6: Valladolid, Yucatán.

4.1.1. Muestreo de suelo

Se colectaron muestras de suelo en seis parcelas productoras de cacao en el Sureste de México. Las muestras correspondieron a tres sistemas de manejo agronómico: Manejo Orgánico, Convencional y Sin Manejo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Sitios de colecta de muestras de suelos cacaoteros de México.

Sitio	Lugar de muestreo	Manejo agronómico
1	El Triunfo, Escuintla, Chiapas	Sin Manejo
2	Maravilla Tenejapa, Chiapas	Sin Manejo
3	Pichucalco, Chiapas	Orgánico
4	Unión Jamaica, Escuintla, Chiapas	Orgánico
5	Valladolid, Yucatán	Sin Manejo
6	Zunú, Tlacotalpa, Tabasco	Convencional

Se utilizó el método cinco de oro para obtener una muestra representativa de 1 Kg por cada sitio de muestreo, resguardada en bolsas de plástico y transportado al Laboratorio de Fitopatología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campo Experimental Rosario Izapa, ubicado en Tuxtla Chico, Chiapas, México.

4.1.2. Aislamiento de especies del género *Trichoderma*

Los aislados de *Trichoderma* spp. se obtuvieron por el método de dilución de esporas en cajas Petri (Acuña y Peña, 2005). Se preparó una solución madre en un matraz con 90 mL de agua destilada y esterilizada + 10 g de suelo. La solución se agitó durante un minuto hasta homogeneizar completamente. Se realizaron diluciones seriadas de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , tomando una alícuota de 1 mL de la solución y 9 mL de agua destilada y esterilizada.

Se incubó 0.1 mL de cada dilución en cajas Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) + Ampicilina ($200 \mu\text{L L}^{-1}$) y Ácido Láctico ($600 \mu\text{L L}^{-1}$), distribuyendo uniformemente la mezcla en toda la superficie del medio. Las cajas fueron incubadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 días y cuantificado el número de colonias del género *Trichoderma*. Las colonias fueron aisladas en cajas Petri con medio de cultivo Agua Agar (AA).

La purificación de cada aislado de *Trichoderma* se hizo a través del método de punta de hifa, tomando la sección final de la hifa en crecimiento e incubado en cajas Petri con medio de cultivo PDA.

4.1.3. Caracterización morfológica y fisiológica de especies del género

Trichoderma

Se incubaron discos de 5 mm en el centro de cajas Petri con medio de cultivo PDA para cada cepa pura. Las características morfológicas y fisiológicas de las colonias de *Trichoderma* se identificaron siguiendo la guía de Barnett y Hunter (1972), Samuels *et al.*, (2002) y Gams, W. y J. Bissett. (1998), considerando características morfológicas de las colonias como: Forma (FC), Color Anverso (CA), Color Reverso (CR), Textura del Micelio (TM), Halo Central (HC), Número de Anillos Concéntricos (NAC), Tipo de Esporulación (TE), Capacidad de Esporulación (CE); características microscópicas: Forma de conidios (FCON), Relación Largo/Ancho de conidios (RLAC), Relación Largo/Ancho de fiálides (RLAF); y características fisiológicas como la Tasa de Crecimiento (TC) (Cuadro 2). La FC, CA, CR, TM, HC y TC, se evaluó a los tres días de incubación y la NAC, TE, CE, FCON, RLAC y RLAF a los seis días de incubación en medio de cultivo PDA a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Cuadro 2. Caracteres morfológicos, microscópicos y fisiológicos de *Trichoderma* spp., evaluados para estudiar la diversidad de especies nativas.

Caracter	Código	Escala
Forma	FC	1: Circular, 2: Irregular y 3: Filamentosa
Textura del micelio	TM	1: Polvorienta, 2: Granulosa, 3: Velloso, 4: Aterciopelada y 5: Algodonosa
Color anverso	CA	1: Blanco, 2: Blanco-Marrón, 3: Amarillo-Verdoso y 4: Amarillo
Color reverso	CR	1: Blanco, 2: Blanco-Amarillento, 3: Blanco-Verdoso y 4: Amarillo
Halo central	HC	1: Ausente, 2: Micelial-Hialino, 3: Micelial-Algodonoso y 4: Esporulativo
Número de anillos concéntricos	NAC	0: Sin anillos, 1: Un anillo, 2: Dos anillos y 3: Tres anillos
Tipo de esporulación	TE	1: Ausente, 2: Dispersa, 3: Homogénea y 4: Anular
Capacidad de esporulación	CE	1: Baja, 2: Media y 3: Alta
Tasa de crecimiento	TC	cm
Relación largo/ancho de conidios	RLAC	μm
Forma de conidios	FCON	1: Globoso, 2: Subgloboso, 3: Elipsoidal y 4: Ovoide
Relación largo/ancho de fiálides	RLAF	μm

Se realizó un análisis multivariado con el paquete estadístico SAS® (Statistical Analysis System, versión 9.4) utilizando datos cualitativos y cuantitativos. Se hizo un Análisis de Componentes Principales (ACP) para observar la distribución de las cepas caracterizadas y un Análisis de Conglomerados Jerárquicos (ACJ) para distinguir grupos conformados por las mismas (González, 2001).

4.2. Capacidad antagónica *in vitro* de diferentes aislados nativos de *Trichoderma* spp. contra *Moniliophthora roreri* causante de la moniliasis del cacao

Se utilizaron 30 cepas nativas de *Trichoderma* spp. como agentes de control biológico, obtenidas de sitios cacaoteros como parte de un estudio de diversidad morfológica y fisiológica de especies nativas de *Trichoderma* spp. en suelos cacaoteros de México. Se utilizó una cepa de *M. roreri* como agente patógeno, obtenida de la región Soconusco, Chiapas, seleccionada por su alta capacidad de esporulación y germinación de conidios.

Se realizaron cultivos pareados bajo un Diseño Experimental Completamente al Azar para evaluar la capacidad antagónica de las especies nativas de *Trichoderma* spp. frente a *M. roreri*. La unidad experimental fue una caja Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA).

4.2.1. Evaluación de la actividad antagónica

La capacidad antagónica de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre *M. roreri* se evaluó en cultivos pareados de acuerdo con Holmes *et al.*, (2004). En un extremo de la caja se incubó un disco de micelio de 5 mm de diámetro de *M. roreri* con 13 días de edad y 7 días posteriores, se incubó un disco de 5 mm de diámetro de cada cepa de *Trichoderma* spp. con diez días de edad a 6 cm de distancia del disco de *M. roreri*. El testigo consistió únicamente en discos de *M. roreri* colocados en un extremo de la caja. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento y testigo.

Las unidades experimentales se incubaron a 25 °C y se realizaron observaciones cada 24 horas durante 15 días para evaluar las siguientes variables: Días al primer contacto entre hifas (DPCH), Distancia de intersección (DI), Tipo de antagonismo (ANT), Capacidad de esporulación antes de *M. roreri* (EAMr), Capacidad de esporulación en la zona de intersección (EZI) y Capacidad de esporulación después de la zona de intersección con *M. roreri* (ESMr). La DI se midió con una regla de plástico desde la base del disco de *Trichoderma* spp. hasta la zona de contacto entre hifas. El tipo de antagonismo se evaluó a los 15 días de interacción de acuerdo con Bell *et al.*, (1982), donde: 1= *Trichoderma* spp. sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio, 2 = *Trichoderma* spp. sobrecrece las dos terceras partes de la

superficie del medio, 3 = *Trichoderma* spp. y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro, 4 = El patógeno coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio y parece resistir a la invasión por *Trichoderma* spp. y 5 = El patógeno sobrecrece completamente a *Trichoderma* spp. y ocupa la superficie total del medio. La capacidad de esporulación de *Trichoderma* spp. antes de *M. roleri*, en la zona de intersección y después de la zona de intersección con *M. roleri* se evaluó a los 15 días de interacción de acuerdo con Michel (2001), donde: 1= Sin esporulación, 2= Esporulación escasa, 3= Esporulación media y 4= Esporulación abundante.

Se realizó un análisis multivariado para distinguir grupos conformados a partir de las variables ANT, EAMr, EZI y ESMr de acuerdo con González (2001), para lo cual se usó el procedimiento PROC PRINCOMP para el Análisis de Componentes Principales y PROC CLUSTER para el Análisis de Conglomerados Jerárquicos. Se utilizó el paquete estadístico SAS ® (Statistical Analysis System, versión 9.4).

4.3. Identificación molecular de especies nativas del género *Trichoderma*

4.3.1. Microorganismos

Se utilizaron 21 cepas aisladas a partir de un estudio de Diversidad morfológica y fisiológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en suelos cacaoteros de México.

4.3.2. Extracción de ADN

El ADN genómico de las especies nativas de *Trichoderma* spp. se obtuvo del micelio de colonias creciendo en cajas Petri con medio de cultivo PDA con 72 h de incubación. La extracción de ADN se realizó por el método de Fosfatasa Alcalina (AP). Se tomó 0.1 g de micelio y se agregó a tubos Eppendorf de 3 mL con valines de acero inoxidable, posteriormente se agregó 750 µL de Buffer AP y se agitó con Vortex hasta macerar por completo el micelio. Los tubos se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente (23°C) y se centrifugaron hasta obtener el ADN puro, finalmente, las muestras fueron resguardadas a -20 °C.

Las regiones ITS1, ITS2 y 5.8s del ARN ribosomal se amplificaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los iniciadores universales ITS1 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGT-3' (forward) e ITS4 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' (reverse). La amplificación se realizó según el protocolo de Ahrens y Seemuller (1992), con modificaciones en las reacciones de PCR cuyo volumen final fue de 25 µL: agua ultrapura estéril (16.25 µL), solución amortiguadora Buffer 10X (2.5 µL), MgCl₂ a 50 mM (1.25 µL), dNTP mezcla a 10 mM (0.5 µL), iniciadores ITS1f e ITSr a 10 pmol (1 µL de cada uno), Taq DNA polimerasa a 1U (0.5 µL) y ADN blanco a 50 ng (2 µL). El procedimiento para la PCR consistió en los siguientes ciclos: desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C, 35 ciclos, segmento máximo de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 45 segundos a 72°C y extensión final de 5 minutos a 72°C. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% para la visualización y medida de la especificidad. La cuantificación del ADN se realizó por espectrofotometría (NanoDro 2000, Thermo Scientific®). Los productos fueron enviados para secuenciación a Macrogen® y las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2020). La alineación de nucleótidos e inferencia filogenética se realizó con el programa MEGA6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski y Kumar, 2013). El soporte de las ramas en el árbol de NJ se estimó mediante el método de Bootstrap, usando 1,000 réplicas (Felsenstein, 1985). Las distancias evolutivas se estimaron usando el método *P. distance* (Nei y Kumar, 2000), excluyendo *gaps* y datos faltantes. Los valores de *Bootstrap* mayor o igual al 70% se consideraron significativos (Felsenstein, 1985).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Diversidad morfológica y fisiológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en suelos cacaoteros

5.1.1. Aislamiento de especies del género *Trichoderma*

Se aislaron y purificaron 30 cepas con características macroscópicas del género *Trichoderma*. El sitio dos (Maravilla Tenejapa, Chiapas) resaltó por obtenerse el mayor número de cepas (10), representando el 33.33 % del total de cepas encontradas; además, el sitio estuvo asociado a un bajo nivel de perturbación por no realizarse

actividades de manejo agronómico. Perfecto *et al.* (1996) resalta que los agroecosistemas tradicionales de cacao pueden contener altos niveles de biodiversidad en flora y fauna, debido a su estructura bajo diferentes especies de árboles, siendo, junto con el café, uno de los modelos más atractivos para la conservación de la biodiversidad.

En el sitio cinco (Valladolid, Yucatán) y seis (Zunú, Tlacotalpa, Tabasco) se encontró solo una cepa, respectivamente; que representó, para cada sitio, el 3.33 % del total de cepas encontradas.

El sitio cinco representó el menor porcentaje de cepas encontradas; sin embargo, este sitio estuvo asociado a un agroecosistema sin actividades de manejo agronómico. Esto sugiere que las características físico-químicas del suelo pueden influir en el desarrollo de hongos del género *Trichoderma*. Elíades *et al.* (2004) estudiando *in vitro* la microbiota alcalofílica y alcalinotolerante, encontraron especies como *T. koningii* y *T. hamatum* hasta pH=7, considerándolas alcalofóbicas en pH superiores, ya que únicamente crecieron en medios ligeramente ácidos. Lo que es confirmado por Wicklow (1986) donde afirma que la presencia de hongos del género *Trichoderma* está fuertemente regulada por el calcio en la solución edáfica.

El sitio seis, al igual que el sitio cinco, estuvo asociado al manejo agronómico tradicional del cultivo, por lo que se puede presumir algún grado de perturbación en la biodiversidad; Perfecto *et al.* (2003) mencionan que los agroecosistemas pueden ser grandes repositorios de biodiversidad, pero el tipo de agricultura puede determinar la biodiversidad contenida en ellos. De la misma manera, (Philpott *et al.*, 2006) menciona que la intensidad del manejo o intensificación de la agricultura es la transición entre un agroecosistema de alta biodiversidad a uno de baja biodiversidad con el uso de maquinaria y agroquímicos. Lecointre y Le Guyader (2006) encontraron que organismos del suelo y hojarasca son altamente susceptibles al uso de pesticidas. Estudios *in vitro* realizados por Terreno *et al.*, (2018) con fungicidas de uso común para combatir enfermedades en cacao, encontraron que los fungicidas a base de Oxido de Cobre inhiben la presencia de especies del género *Trichoderma* como: *T. harzianum*, *T. ovalisporum*, *T. stromaticum* y *T. koningiopsis*.

5.1.2. Caracterización morfológica y fisiológica de especies del género

Trichoderma

Las características morfológicas cualitativas se presentan de manera gráfica, señalando las frecuencias de cada nivel del caracter dentro de cada descriptor (Figura 1).

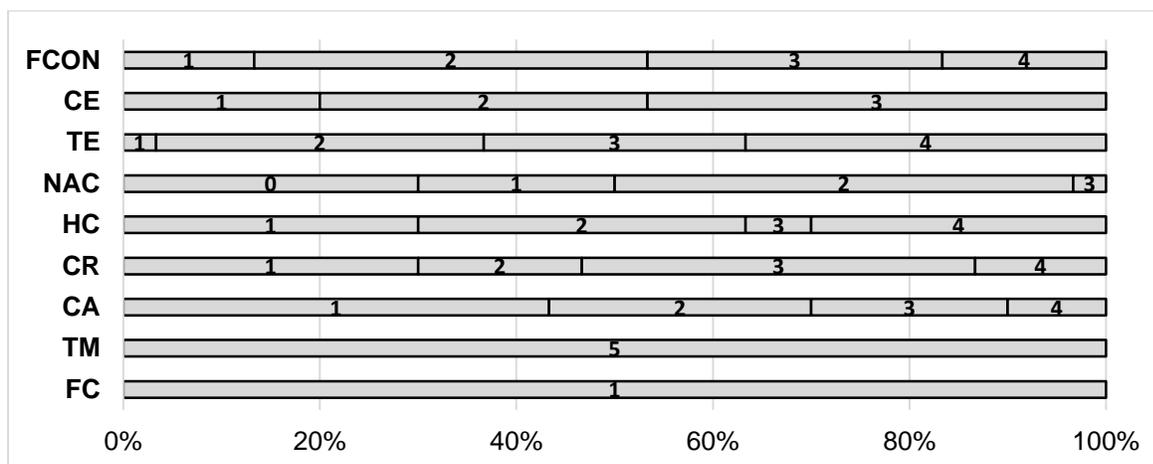


Figura 1. Frecuencia por clase de caracteres morfológicos (9) de 30 cepas nativas de *Trichoderma* spp. (FC = Forma de la colonia, TM = Textura del micelio, CA = Color anverso de la colonia, CR = Color reverso de la colonia, HC = Halo central de la colonia, NAC = Número de anillos concéntricos, TE = Tipo de esporulación, CE = Capacidad de esporulación y FCON = Forma de conidios).

Las variables FC y TM mostraron frecuencias constantes, con forma circular y micelio algodonoso en todas las colonias. El CA blanco (Figura 2a) mostró la mayor frecuencia (43.33 %) y el CA amarillo (Figura 2d) en menor frecuencia (10 %). El CR blanco-verdoso (Figura 2g) mostró la mayor frecuencia (40 %) y en menor frecuencia (13.33 %) el CR amarillo (Figura 2h).

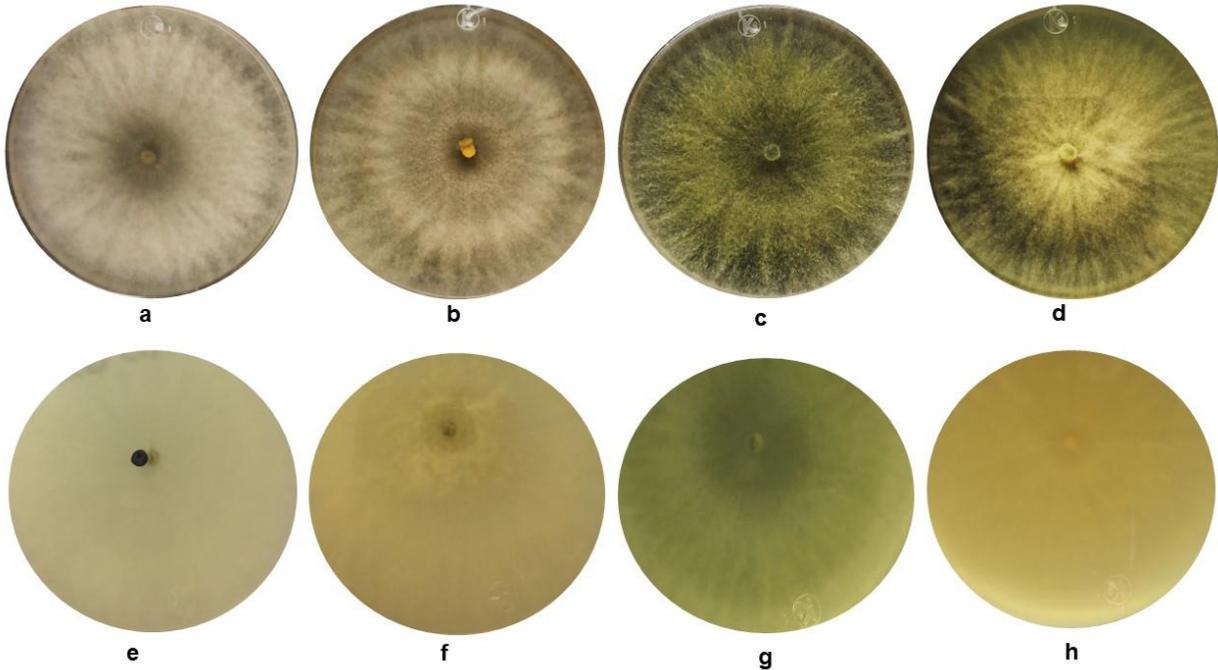


Figura 2. Color anverso y reverso de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en medio de cultivo PDA. a-d= Color anverso a los tres días de incubación; a: Blanco; b: Blanco-Marrón; c: Amarillo-Verdoso; d: Amarillo. e-h= Color reverso a los 6 días de incubación; e: Blanco; f: Blanco-Amarillento; g: Blanco-Verdoso y h: Amarillo.

El HC micelial hialino (Figura 3b) presentó la mayor frecuencia (33.33 %) y con menor frecuencia (6.67 %) el HC micelial algodonoso (Figura 3c).

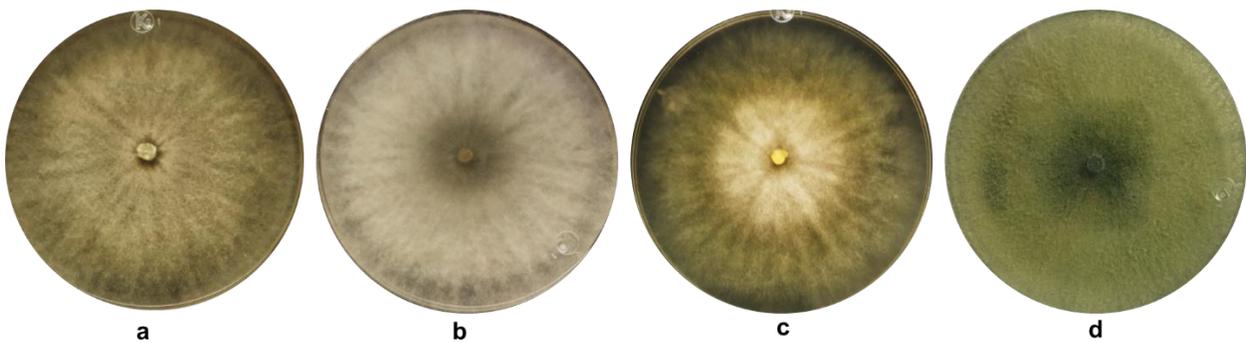


Figura 3. Halo central de cepas nativas de *Trichoderma* spp. a los tres días de incubación a 25°C en medio de cultivo PDA. a: Ausente; b: Micelial-Hialino; c: Micelial-Algodonoso y d: Esporulativo.

El NAC fue variable, donde la mayor frecuencia (46.67 %) mostró dos anillos y en menor frecuencia (3.33 %) tres anillos. El TE anular (Figura 4d) mostró la mayor frecuencia (36.67 %) y en menor frecuencia (3.33 %) no se observó esporulación (Figura 4a). La CE alta (Figura 4c y 4d) mostró la mayor frecuencia (46.67 %) y en menor frecuencia (20 %) la esporulación baja a nula (Figura 4a).



Figura 4. Tipo de esporulación de cepas nativas de *Trichoderma* spp. a los seis días de incubación a 25°C en medio de cultivo PDA. a: Ausente; b: Dispersa; c: Homogénea y d: Anular.

5.1.3. Análisis de componentes principales (ACP)

El ACP mostró que los primeros tres componentes expresaron el 66.27 % de la variabilidad total en las 30 cepas de *Trichoderma* spp., donde el CP1 explicó el 35.54 %, el CP2 15.85 % y el CP3 14.87 % (Cuadro 3).

Cuadro 3. Valores propios y proporción de la varianza total explicada por componente principal, basado en caracteres morfológicos, microscópicos y fisiológicos de *Trichoderma* spp.

CP	Autovalor	Diferencia	Proporción	Acumulado
1	3.5542501	1.9690284	0.3554	0.3554
2	1.5852217	0.0978187	0.1585	0.5139
3	1.4874031	0.3730124	0.1487	0.6627

CP= Componente principal

En la Figura 5a se observa la distribución de las cepas con base al CP1 y CP2 y en la Figura 5b con base al CP1 y CP3, observando una amplia distribución de las cepas a partir del análisis de los caracteres morfológicos, microscópicos y fisiológicos de *Trichoderma* spp.

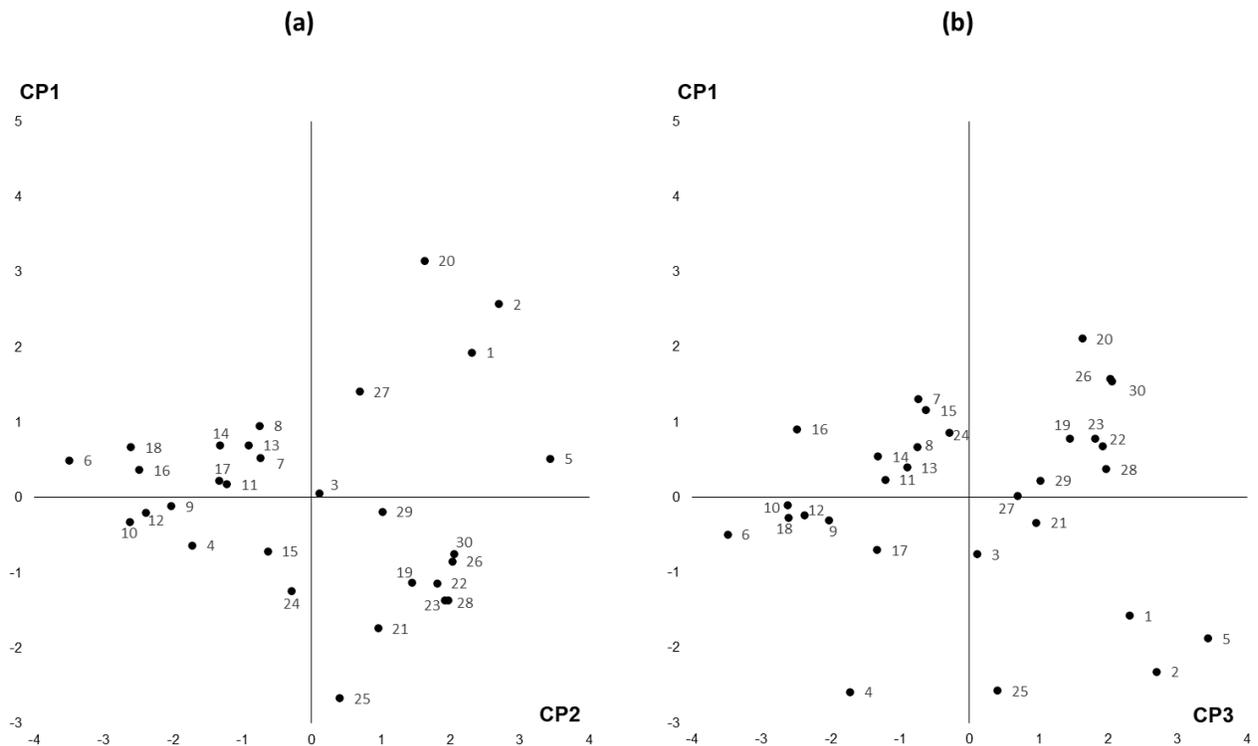


Figura 5. Distribución de 30 cepas nativas de *Trichoderma* spp. **a:** Distribución en función de los componentes principales 1 y 2 (CP1 = componente principal 1 y CP2 = componente principal 2). **b:** Distribución en función de los componentes principales 1 y 3 (CP1 = componente principal 1 y CP3 = componente principal 3).

5.1.4. Análisis de conglomerados jerárquicos (ACJ)

Con las variables morfológicas, microscópicas y fisiológicas, se determinaron ocho grupos (GI, GII, GIII, GIV, GV, GVI, GVII y GVIII) divididos en subgrupos a partir del coeficiente de correlación semiparcial de 0.05 (**Figura 6**).

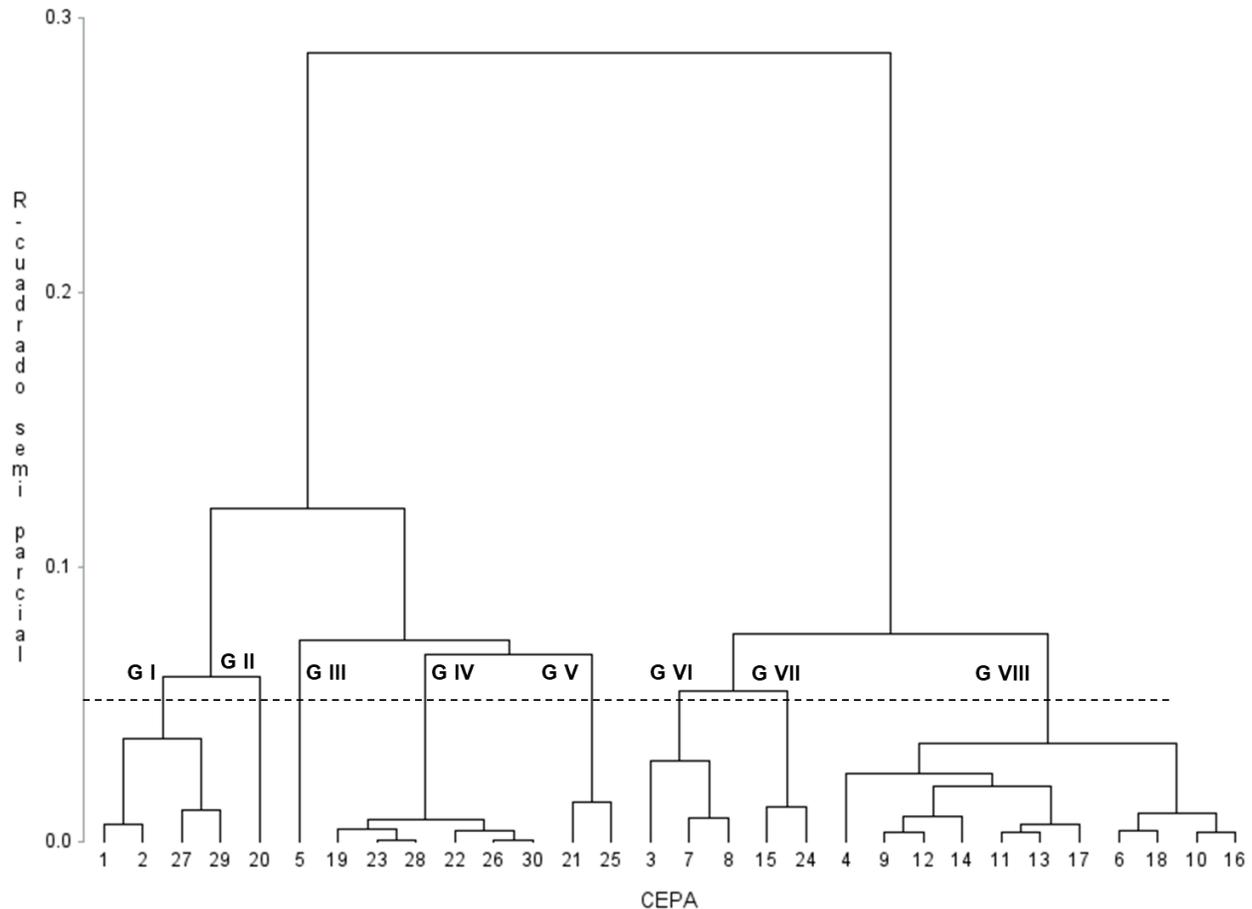


Figura 6. Dendrograma de caracteres cualitativos y cuantitativos para 30 cepas nativas de *Trichoderma* spp. GI= Grupo uno, GII= Grupo dos, GIII= Grupo tres, GIV= Grupo cuatro, GV= Grupo cinco, GVI= Grupo VII y GVIII= Grupo ocho.

Las cepas del G I (1, 2, 27 y 29) presentaron esporulación homogénea, capacidad de esporulación alta y sin formación de anillos concéntricos. El G II (20) presentó la relación largo/ancho de conidios más alta (1.93). El G III (5) presentó la tasa de crecimiento más baja (4.2 cm). El G IV (19, 22, 23, 26, 28 y 30) presentó color anverso amarillo-verdoso, color reverso blanco-verdoso, halo central esporulativo, dos anillos concéntricos, esporulación anular y una alta capacidad de esporulación. El G V (21 y 25) presentó color anverso blanco. El G VI (3, 7 y 8) presentó un anillo concéntrico y baja capacidad de esporulación. El G VII (15 y 24) presentó color anverso blanco-marrón y sin formación de halos centrales. El G VIII (4, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17 y 18) presentó esporulación dispersa y capacidad de esporulación media.

El color anverso y reverso de las colonias pueden estar influenciados por la producción de pigmentos como la Antraquinona (Druzhinina y Kubiack, 2005) y otros metabolitos secundarios como antibióticos y promotores del crecimiento vegetal (Vinale *et al*, 2009).

La forma de las colonias y cantidad de conidiación observada en las placas, puede ser estimulada por factores que propician un ambiente de estrés, como son: la exposición a la luz, la falta de nutrientes o cambios en pH (Osorio-Concepción *et al.*, 2013).

La utilización de fuentes de nutrientes y la adaptación a condiciones ambientales específicas de cada especie nativa de *Trichoderma* spp. pudo ser un indicador de la diversidad observada, al someter todos los organismos a las mismas condiciones de temperatura, humedad relativa, luz, pH y nutrientes.

5.2. Capacidad antagónica *in vitro* de diferentes aislados nativos de *Trichoderma* spp. contra *Moniliophthora roreri* causante de la moniliasis del cacao

5.2.1. Evaluación de la actividad antagónica

La frecuencia de las variables antagónicas estudiadas para evaluar el antagonismo potencial de *Trichoderma* spp. sobre *M. roreri* se muestra en la Figura 7.

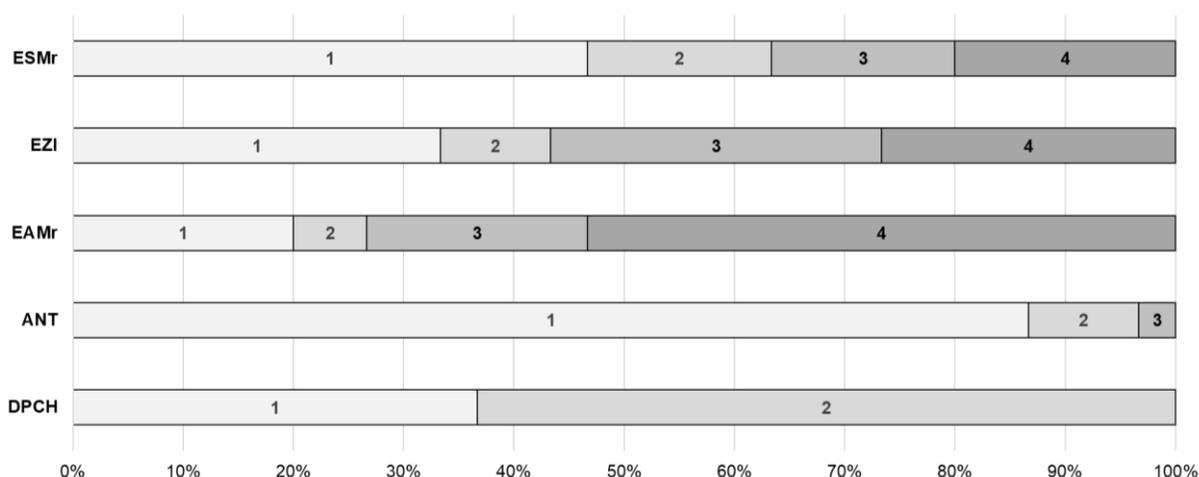


Figura 7. Frecuencia de variables antagónicas de 30 cepas nativas de *Trichoderma* spp. DPCH = Días al primer contacto entre hifas, ANT = Clasificación del antagonismo, EAMr = Capacidad de esporulación antes de *M. roreri*., EZI= Capacidad de

esporulación en la zona de intersección y ESMr= Capacidad de esporulación después de la zona de intersección con *M. royeri*.

El tiempo al contacto entre hifas DPCH (Figura 8) osciló entre el tercer y cuarto día, ubicando el 63.33 % de las cepas que hicieron contacto a los tres días después de la incubación de *Trichoderma* spp. y el 36.67 % a los cuatro días. Por su parte Michel (2001), encontró valores al primer contacto entre cepas nativas de *Trichoderma* spp. y *F. oxysporum* de 3 a 6 días y con *F. subglutinans* de 3 a 10; mientras que Solano (2004) de 3 a 4 días con *F. oxysporum* y de 2 a 3 con *F. subglutinans*. Al respecto, Michel (2001) indica que entre menor sean los días al contacto, es mayor la agresividad que existe por parte del hongo antagónico y menor la resistencia del fitopatógeno.

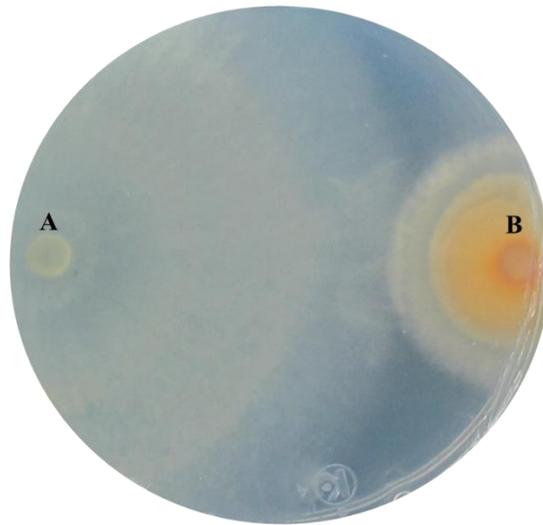


Figura 8. Momento del primer contacto entre hifas de *Trichoderma* spp. y *M. royeri* en medio de cultivo PDA. A= *Trichoderma* spp. y B= *M. royeri*.

Se observó que *M. royeri* detuvo su crecimiento al tener contacto con *Trichoderma* spp. en todos los casos; resultados que concuerdan con lo observado por Gonzalez *et al.* (1999) en pruebas *in vitro* donde observaron que el crecimiento de *Alternaria solani* se detuvo al tener contacto inmediato con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. Resultados similares mencionan Correa *et al.* (2007) con aislados de *T. harzianum*, *T. aureoviride* y *T. crassum* en confrontación dual contra *Sclerotium rolfsii*, donde el crecimiento del patógeno se detuvo por completo al momento del contacto entre hifas. Ezziyyani *et al.* (2007) menciona que la detención del crecimiento del patógeno se debe a la activación

de los mecanismos de acción del antagonista ante la presencia de un patógeno específico. Dennis & Webster (1971) mencionan que algunos aislados de *Trichoderma* spp. producen antibioticos no volátiles que causan la inhibición del crecimiento de patógenos después del contacto entre hifas.

La clasificación del antagonismo tipo 1 (Figura 9a) predominó en el 86.67 % de los enfrentamientos duales, donde *Trichoderma* spp. cubrió totalmente a *M. roleri*; las cepas 1, 2 y 26 mostraron antagonismo tipo 2 (Figura 9b) y representó el 10 % de enfrentamientos donde *Trichoderma* spp. sobrecreció en dos terceras partes de la superficie de *M. roleri* y finalmente, la cepa 2 mostró antagonismo tipo 3 (Figura 9c) con el 3.33 % de enfrentamientos donde ningún organismo dominó al otro. No hubo enfrentamientos ubicados en las clases 4 y 5, lo que indicó que todas las cepas nativas de *Trichoderma* spp. con excepción de la cepa 2, tuvieron mayor capacidad de competencia por espacio y nutrientes con respecto a *M. roleri*; Dennis & Webster (1971) mencionan que la colonización del área compitiendo por espacio y nutrientes es una manera de ejercer biocontrol, al reducir o detener completamente el desarrollo del micelio. Correa *et al.* (2007) mencionan que *T. harzianum* clasificó en antagonismo tipo 1 al confrontarlo con *Sclerotium rolfsii*, sin embargo, otros aislados de *T. harzianum* obtuvieron antagonismo tipo 5 contra el mismo patógeno; esto sugiere que existe variabilidad intraespecifica que modifica la selectividad y modo de acción de *Trichoderma* spp. contra un organismo patógeno.

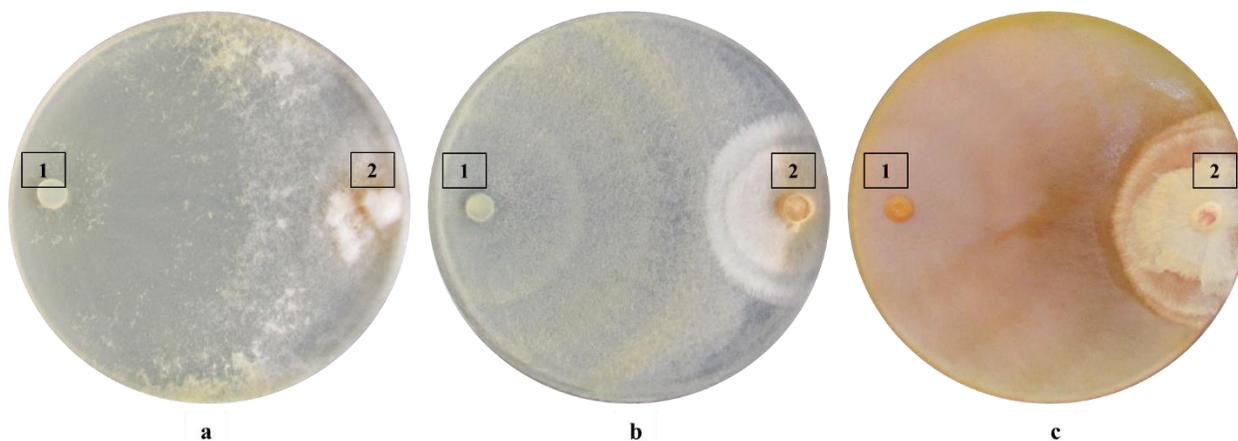


Figura 9. Capacidad antagónica de 30 cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *M. royeri* en medio de cultivo PDA a los 8 días de interacción. a= *Trichoderma* spp. sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio, b= *Trichoderma* spp. sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio y c= *Trichoderma* spp. y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro. 1= *Trichoderma* spp. y 2= *M. royeri*.

La capacidad de esporulación fue variable para cada cepa de *Trichoderma* spp. en confrontación con *M. royeri*. La mayor esporulación antes de *M. royeri* (Figura 10a) se observó en 16 cepas en confrontación (3, 6, 11, 12, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30) que representó el 53.33 % del total; la mayor esporulación en la zona de intersección (Figura 10b) se observó en ocho cepas (3, 4, 10, 19, 21, 22, 23 y 24) que representó el 26.67 % del total y finalmente, seis cepas que mostraron mayor esporulación después de la zona de intersección con *M. royeri* (4, 6, 10, 21, 23 y 25)(Figura 10c) que representó el 20 % del total.

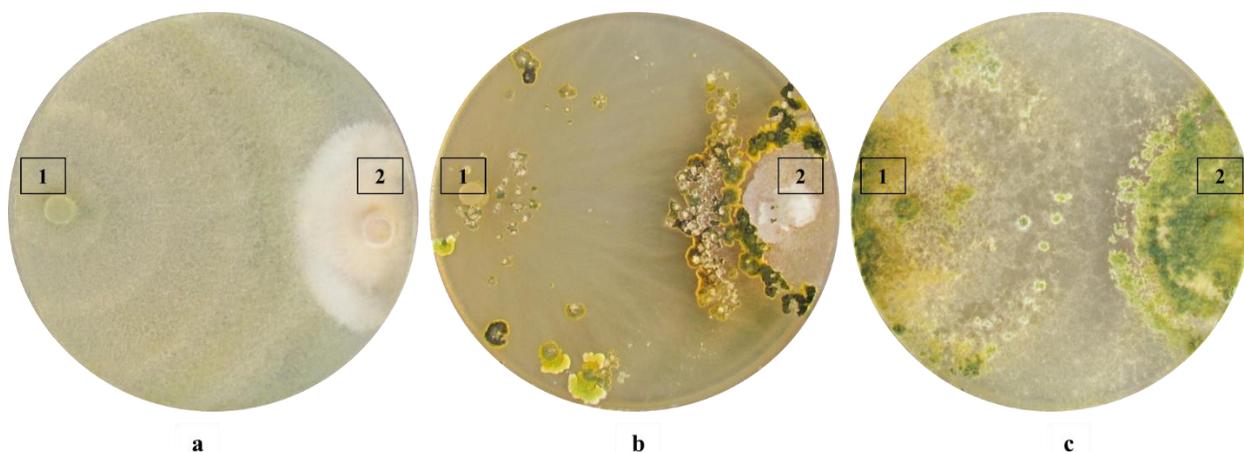


Figura 10. Capacidad de esporulación de 30 cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *M. roreri* en medio de cultivo PDA a los 15 días de interacción. a= Esporulación antes de la zona de intersección, b= Esporulación en la zona de intersección y c= Esporulación después de la zona de intersección. 1= *Trichoderma* spp. y 2= *M. roreri*.

El análisis de componentes principales (ACP) mostró que los primeros tres componentes expresaron el 95.41 % de la variabilidad total de las 30 confrontaciones para las variables ANT, EAMr, EZI y ESMr, donde el CP1 explicó el 64.74 %, el CP2 19.23 % y el CP3 11.44% (Cuadro 4).

Cuadro 4. Valores propios y proporción de la varianza total explicada por componente principal, basado en ANT, EAMr, EZI y ESMr de 30 confrontaciones entre *Trichoderma* spp. y *M. roreri*.

CP	Autovalor	Diferencia	Proporción	Acumulado
1	2.5895302	1.82036817	0.6474	0.6474
2	0.76916203	0.31137192	0.1923	0.8397
3	0.45779011	0.27427246	0.1144	0.9541

En la figura 11a se se observa la distribución de las cepas con base al CP1 y CP2 y en la Figura 11b con base al CP1 y CP3, observando una marcada distribución de las cepas a partir del análisis de ANT, EAMr, EZI y ESMr.

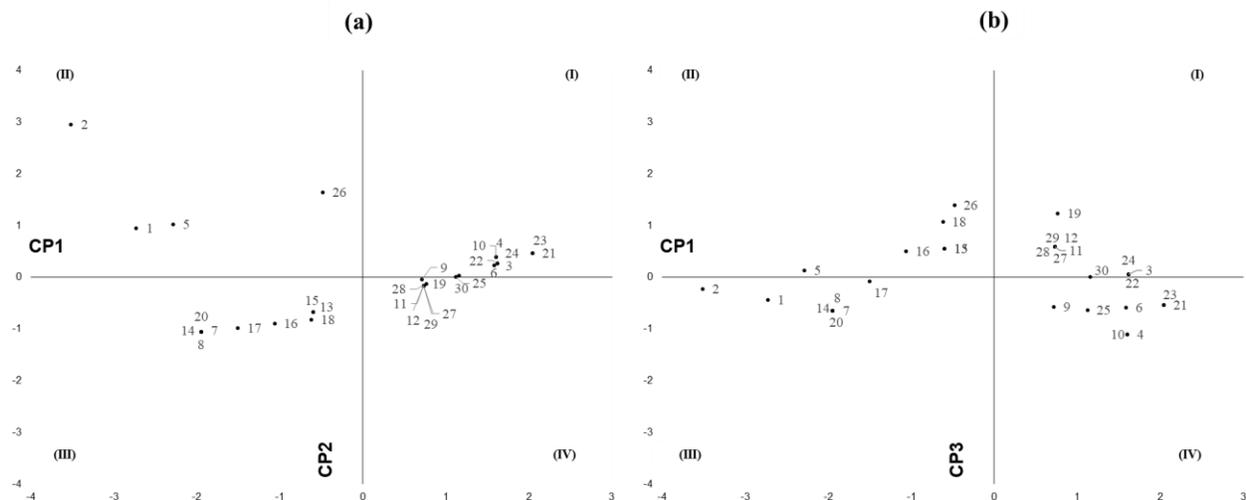


Figura 11. Distribución de 30 confrontaciones entre *Trichoderma* spp. y *M. royeri*. **a:** Distribución en función de los componentes principales 1 y 2 (CP1 = componente principal 1 y CP2 = componente principal 2). **b:** Distribución en función de los componentes principales 1 y 3 (CP1 = componente principal 1 y CP3 = componente principal 3).

El ACP explicado por CP1 y CP3 en el cuadrante IV mostró que las cepas de *Trichoderma* spp. (4, 6, 9, 10, 21, 23 y 25) presentaron mayor potencial antagónico basado en ANT, EAMr, EZI y ESMr.

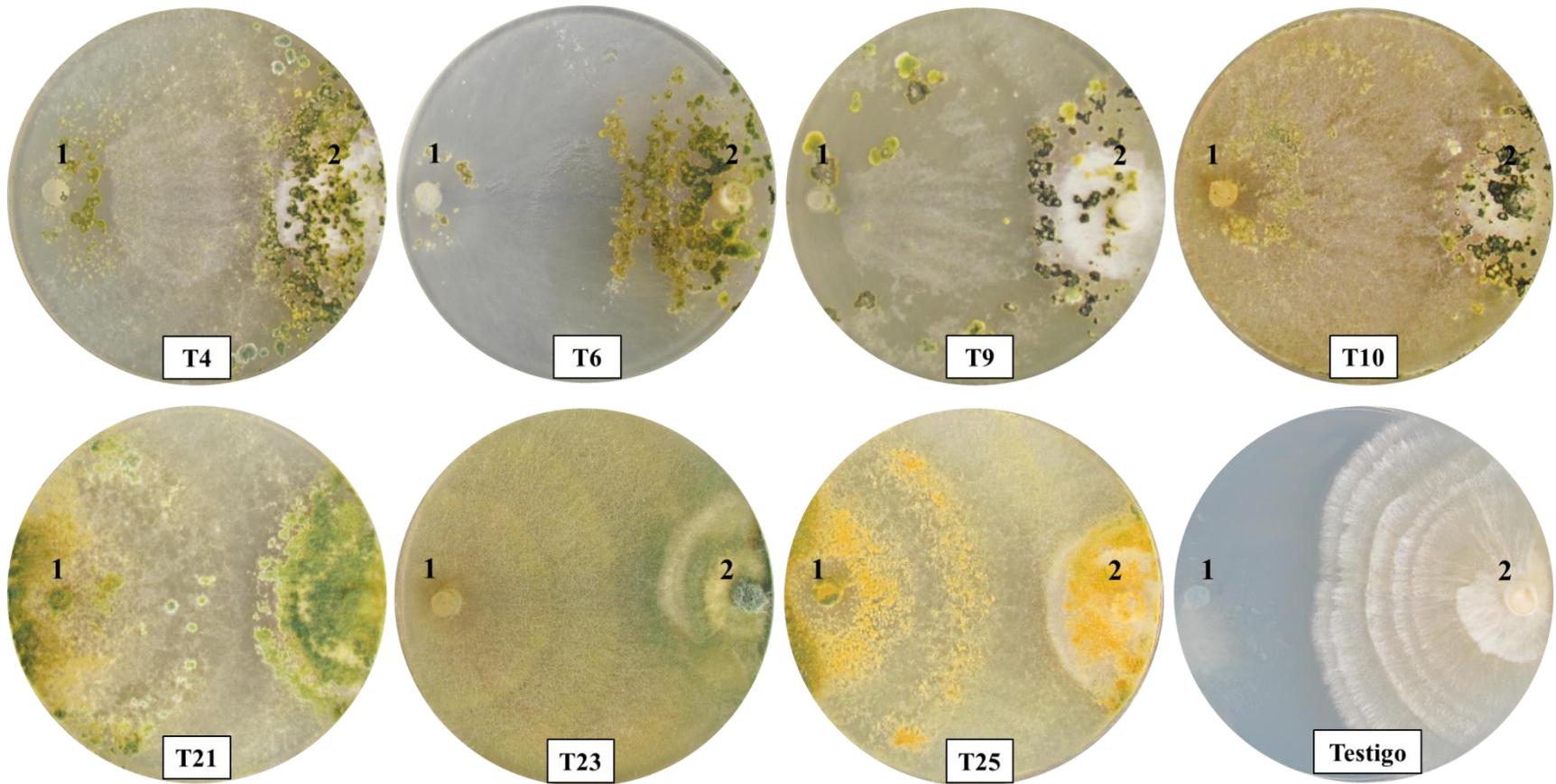


Figura 12. Selección de cepas de *Trichoderma* spp. con mayor potencial antagónico basado en ANT, EAMr, EZI y ESMr de acuerdo al cuadrante IV del ACP explicado por CP1 y CP3.

5.3. Identificación molecular de especies nativas del género *Trichoderma*

A través de la extracción de ADN se pudo observar que de las 30 cepas nativas de *Trichoderma* spp. evaluadas, solo se obtuvieron 21 fragmentos amplificados (Figura 13). La amplificación del ADN genómico de las cepas con los iniciadores ITS1f e ITS4r fue de 600 pb y de acuerdo al análisis en BLAST de las secuencias amplificadas se encontró que, de las 21 cepas, el 42.87% (4, 9, 10, 13, 15, 17, 18, 20 y 21) mostraron una identidad del 99% con *T. harzianum*; el 28.57% (2, 5, 6, 7, 14 y 16) mostraron identidad del 99% con *Trichoderma* spp.; 9.52% (23 y 29) mostraron una identidad del 99% con *T. virens*; 9.52% (1 y 8) mostraron una identidad del 99% con *T. spirale*; el 4.76% (1) mostró una identidad del 99% con *T. saturnisporum* y el 4.76% mostró una identidad del 99% con *T. viride*

Los resultados obtenidos también coinciden con lo reportado por Torres-De la Cruz *et al.* (2015) donde se menciona a *T. harzianum/H. lixii* como la especie más abundante en el agroecosistema de cacao en Tabasco, México, reportándose también especies como: *T. virens/H. virens*, *T. asperellum*, *T. brevicompactum*, *T. koningiopsis/H. koningiopsis*, *T. longibrachiatum/H. sagamiensis*, *T. spirale*, *T. pleuroticola* y *T. reesei/H. jecorina*. Resultados similares encontraron Rivas-Cordero y Pavone-Maniscalco (2010) para el agroecosistema cacao del estado de Carabobo, Venezuela. Sin embargo, otros estudios también evidencian la predominancia de esta especie (Kullnig, Szakacs y Kubicek, 2000; Wuczowski, Druzhinina, Gherbawy, Klug, Prillinger y Kubicek, 2003; Zhang *et al.*, 2005).

De las especies encontradas en este estudio, *T. harzianum/H. lixii*, *T. virens/H. virens*, *T. spirale* son especies que tienen aplicación como agentes de control biológico de hongos fitopatógenos (Evans, Holmes y Thomas, 2003; Hjeljord y Tronsmo, 1998; Krauss y Soberanis, 2001). De manera particular, *T. harzianum/H. lixii* y *T. virens/H. virens* son especies utilizadas para el control de *Phytophthora palmivora* y *Moniliophthora roreri*, 2 hongos de importancia en el cultivo de cacao (Benítez, Rincón, Limón y Codón, 2004; Evans *et al.*, 2003; Harman, 2000; Krauss y Soberanis, 2001; Migheli, Whipps, Budge y Lynch, 1995). También *T. virens/H. virens* se ha registrado como promotor del crecimiento en algunas especies vegetales (Contreras-Cornejo, Macías-Rodríguez, Cortés-Penagos y López-Bucio, 2009).

En la figura 14 se muestra el árbol filogenético obtenido con las secuencias de los 21 aislamientos de *Trichoderma*. El árbol mostró dos ramas principales: en una alberga a *T. virens*, *T. spirale*, *T. harzianum*, *T. viride*, *T. saturnisporum* y *Trichoderma* spp.; en otra se encontró a *T. harzianum* y *Trichoderma* spp. Los estudios de Torres-De la Cruz *et al.* (2015) demuestran que las secuencias ITS permiten identificar exitosamente aislados de *Trichoderma/Hypocrea*. Pero a partir de este estudio, se evidenció que es difícil discriminar entre especies con el uso único de iniciadores ITS; Druzhinina y Kubicek (2005) y Kredics *et al.* (2014) mencionan que, debido a la variabilidad de los ITS, es necesario la amplificación del gen *tef1 α* para corroborar la taxonomía de los aislados nativos. Por esto, es necesario considerar que un solo gen no puede explicar la historia evolutiva de las especies; por lo que se tendría que aplicar un análisis multilocus.

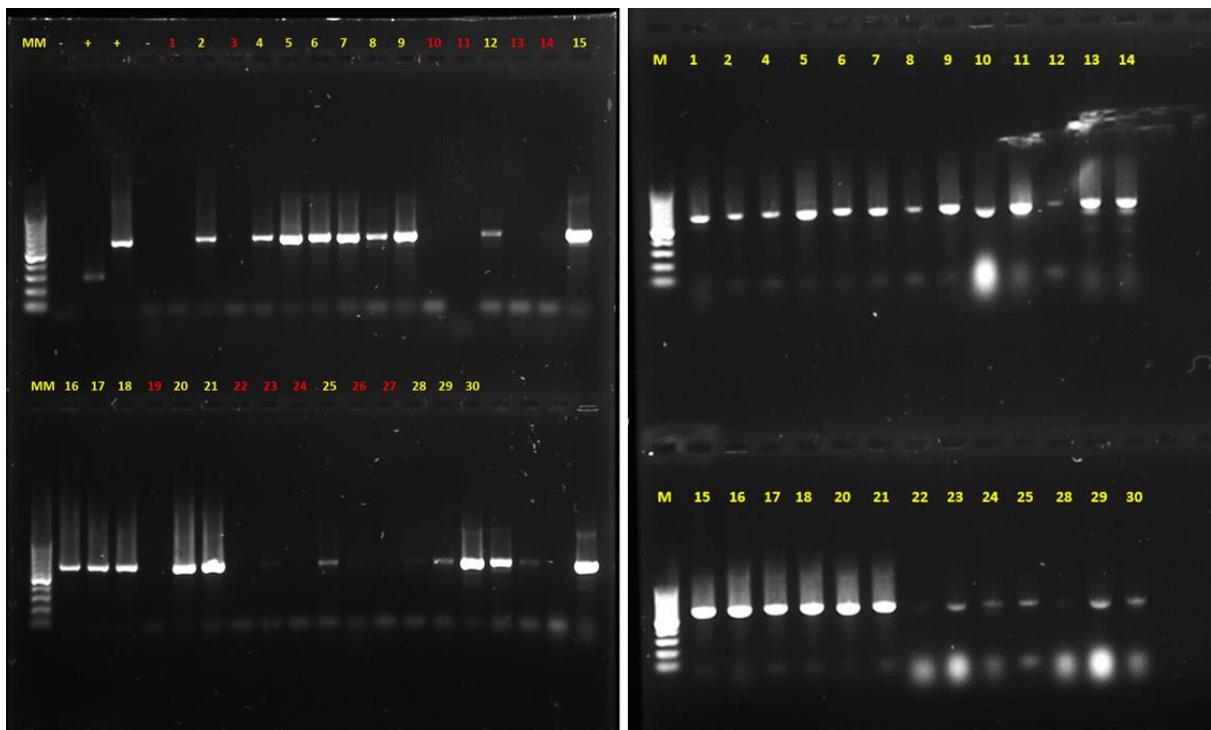


Figura 13. Amplificación de ADN de cepas nativas de *Trichoderma* spp. utilizando los iniciadores ITS1f e ITS4r; MM: Marcador Molecular; (-): Testigo negativo (Agua); (+): Testigo positivo (*Fusarium oxysporum*)

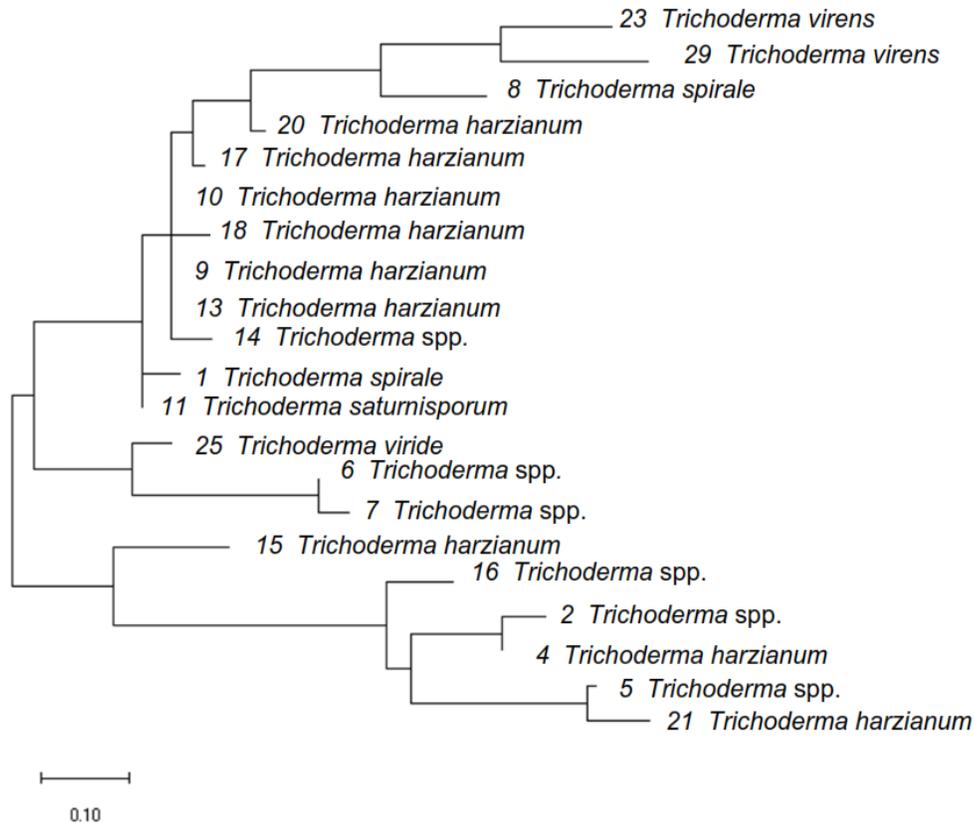


Figura 14. Relación filogenética de 21 aislamientos de *Trichoderma* inferido por análisis de secuencias de ADNr (ITS1, ITS2 y 5.8S).

6. CONCLUSIONES

La calidad de los suelos y la perturbación con la intensificación de la agricultura influye en la diversidad de especies de *Trichoderma* spp. en el agroecosistema cacao.

La caracterización morfológica, microscópica y fisiológica, muestra una alta variabilidad expresada en diferentes caracteres que demuestran la alta diversidad y especificidad de las especies de *Trichoderma* spp. en suelos cacaoteros de México.

Las cepas nativas de *Trichoderma* spp. tienen la capacidad de detener el crecimiento de *M. royeri* en el punto de intersección de sus hifas.

Existe variabilidad expresada en grados de antagonismo definido por la competencia por espacio y nutrientes, capacidad de esporulación y zonas de esporulación.

El mayor grado de antagonismo fue expresado por *T. harzianum*/*H. lixii* (4, 9, 10 y 21), *Trichoderma* spp. (6), *T. virens*/*H. virens* (23) y *T. viride* (25).

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, O. & Peña, W. (2005). Determinación de poblaciones de microorganismos en el suelo mediante técnicas de recuento directo. En: Protocolos de metodologías para análisis de indicadores microbiológicos. Proyecto Innovaciones tecnológicas para el manejo y mejoramiento de la calidad y salud de suelos bananeros en América Latina y el Caribe. Eds. Imbap, Universidad de Costa Rica. San José, CR. pp. 4-7.
- Barnett, H. L. & Hunter, B. B. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi. 3rd edition, 241 pp.
- De Bellis, T., Kernaghan, G. y Widden, P. (2007). Plant community influences on soil microfungus assemblages in boreal mixed-wood forests. *Mycologia*, 99, 356–367.
- Druzhhinina, I. & Kubicek, C. P. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters?. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2005; (2): 100-12.
- Elíades, L., Bucsinszky, A. M. & Cabello, M. (2004). Micobiota alcalofílica y alcalinotolerante en suelos de bisques xéricos en una localidad de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Boletín Micológico* Vol. 19: 41-47.
- Evans, H. C. (2002). Disease and sustainability in the Cocoa agroecosystem.
- Evans, H. C., Stalpers, J. A., Samson, R. A. & Benny, G. L. 1978. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Can. J. Bot.* 56:2528 - 2532.
- Gams, W. & Bissett, J. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. In: *Trichoderma and Gliocladium, Basic Biology, Taxonomy and Genetics*, Harman, G. E. and C. P. Kubicek (Eds.), Vol. 1, Taylor and Francis, London, UK., pp:3-34.
- González-Andrés, F. y Pita-Villamil, J. M. (2001). Conservación y Caracterización de Recursos Fitogenéticos. Ed. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola. Madrid. 279 p.
- Greenberg, R., Bichier, P. y Cruz, A. A. (2000). The conservation value for birds of cacao plantations with diverse planted shade in Tabasco, Mexico. *Animal Conservation*, 3, 105–112.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A. y Chet, I. (2004). *Trichoderma* spp. opportunistic avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 43–56.
- Hebbar, P. K. 2007. Cacao diseases: A global perspective from an industry point of view. *Phytopath.* 97:1658 - 1663.

- Kredics L, Hatvan L, Naeimi S, Körmöczi P, László M, Casaba V y Druzhinina I. 2014. Biodiversity of the Genus *Hypocrea/Trichoderma* in Different Habitats. En: Gupta G. *et al.* (eds.) *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Elsevier, Amsterdam. pp. 3-24. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00001-1> [Links]
- Lecointre, G. & Le Guyader, H. (2006). *The Tree of Life: A Phylogenetic Classification*. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge, MA.
- Matson, P. A., Parton, W. J., Power, A. G. y Swift, M. J. (1997). Agricultural intensification and ecosystems properties. *Science* 277:504-509.
- Migheli, Q., Balmas, V., Komon-Zelazowska, M., Scherm, B., Fiori, S., Kopchinskiy, A. G. (2009). Soils of a Mediterranean hot spot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-european, invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. *Environmental Microbiology*, 11, 35–46.
- Muñoz, D., Estrada, A. & Naranjo, E. (2005). Monos aulladores (*Alouatta palliata*) en una plantación de cacao (*Theobroma cacao*) en Tabasco, México: aspectos de la ecología alimentaria. *Universidad y Ciencia, Num. Esp (II)*, [fecha de consulta 17 de Octubre de 2019] ISSN: 0186-2979. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=154/15421204>.
- Osorio-Concepción, M., Casas-Flores, S. & Cortés-Penagos, C. (2013). Efecto de la limitación de fosfato sobre la conidiación de *Trichoderma atroviride* y mutantes ciegas a la luz. *Revista Mexicana de Micología*, vol. 37. pp. 41-50.
- Pérez-De la Cruz, M., Equihua-Martínez, A., Romero-Nápoles, J., Sánchez-Soto, S., García-López, E. y Bravo-Mojica, H. (2009). Escolítidos (Coleoptera: Scolytidae) asociados al agroecosistema cacao en Tabasco, México. *Neotropical Entomology*, 38, 1–8.
- Perfecto, I., Rice, R. A., Greenberg, R. & Van der Voort, M. (1996). Shade coffee: a disappearing refuge of biodiversity. *Bioscience* 46: 598-608.
- Perfecto, I., Mas, A., Dietsch, T. V. & Vandermeer, J. (2003). Species richness along an agricultural intensification gradient: a tri-taxa comparison in shade coffee in southern México. *Biodiver. Conserv.* 12: 1239-1252.
- Phillips-Mora, W. & Wilkinson, M. J. 2007. Frosty pod of cacao: A disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopath.* 97(12):1644 – 1647.
- Philpott, S. M., Perfecto, I. & Vandermeer, J. (2006). Effect of management intensity and season on arboreal ant diversity and abundance in coffee agroecosystems. *Biodiver. Conserv.* 15: 139-155.
- Ramírez-Meneses, A., García-López, E., Obrador-Orlán, J., Ruiz-Rosado, O. y Camacho-Chiu, W. (2013). Diversidad florística en plantaciones agroforestales de cacao en Cárdenas, Tabasco, México. *Universidad y Ciencia*, versión impresa ISSN 0186-2979 Vol. 29 Num. 3.

- Rivas-Cordero, M. y Pavone-Maniscalco, D. (2010). Diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de *Theobroma cacao* L. del estado Carabobo, Venezuela, y su capacidad biocontroladora sobre *Crinipellis perniciosus* (Stahel) Singer. *Interciencia*, 35, 777–783.
- Samuels, G. (2004). *Trichoderma: a guide to identification and biology*. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. Systematic Botany and Mycology Laboratory. Beltsville, USA. 40pp.
- SIAP. (2019). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre de la producción agrícola por cultivo 2016. Avance de siembras y cosechas por cultivo Consultado: 12 de octubre 2019. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenDelegacion.do
- Stefanova, M. (2007). Introducción y eficacia técnica del biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* spp. en Cuba. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, Ciudad de La Habana, Cuba. *Fitosanidad* 11(3):75-79.
- Ten Hoopen, G.M., Deberdt, P., Mbenoun, M., and Cilas, C. (2012). Modelling cacao pod growth: implications for disease control. *Annals of Applied Biology* 160:260-272. doi:10.1111/j.1744-7348.2012.00539.x
- Terreno, Y. P.I., Peñaherrera, V. S. L., Solís, H. Z. K., Vera, C. D. I., Navarrete, C. J. B. & Herrera, D. M. A. (2018). Compatibilidad *in vitro* de *Trichoderma* spp. con fungicidas de uso común en cacao (*Theobroma cacao* L.). Nota de investigación. 146-151.
- Torres-De la Cruz, M., Ortiz-García C. F., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J. A., Ávalos-Contreras, N. y Capello-García, S. (2015). Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 86 (2015) 947-961.
- Vinale, F., Ghisalbertic, E., Sivasitphamparamb, K., Marra, R., Ritieni, A. *et al.* (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Lett Appl Microbiol.* 2009; 72:2032-2035.
- Wicklow, D. T. (1986). Functional relationship between Quebec forest soil microfungi and their environment. *Can. J. Bot.* 64: 1424-1432.