



INHIBITORY CAPACITY OF FILTRATES FROM TRICHODERMA INHAMATUM AND CAIOPHORA ANDINA OVER PHYTOPATHOGENS OF THEOBROMA CACAO

Reynaldo Tenorio¹, Patricia A. Mollinedo^{2,*}

¹Faculty of Pharmaceutical and Biochemical Sciences, Biochemical Drug Research Institute IIFB, Universidad Mayor de San Andrés UMSA, P.O. Box 3239, Av. Saavedra 2224, Phone 5912229021, La Paz, Bolivia, farbio@farbio.edu.bo

²Department of Chemistry, Research Institute of Natural Products IIPN, Laboratory of Biological Assays, Universidad Mayor de San Andrés UMSA, P.O. Box 303, Calle Andrés Bello s/n, Ciudad Universitaria Cota Cota, Phone 59122792238, La Paz, Bolivia, pamollinedo@umsa.bo

Keywords: Biocontrol, Theobroma cacao, Trichoderma inhamatum, Caiophora andina, Colletotrichum spp., Phytophthora spp., Moniliophthora spp.

ABSTRACT

The filtrates of cultures of *Trichoderma inhamatum* and hydroethanolic extracts of *Caiophora andina* were assayed *in vitro* over pathogen strains of *Theobroma cacao* (cacao). The inhibition percentage after determination of the hifal growing *in vitro* were: for *Trichoderma inhamatum* Bol 12-QD, 11% in *Moniliophthora* spp (fourth day); 20% in *Colletotrichum* spp. (eleventh day); 46% in *Phytophthora* spp. (ninth day). The inhibition percentage for hydroethanolic extracts of *Caiophora andina* were: for the stem-leaves extract, 36% in *Moniliophthora* spp. (fourth day), for the flowers extract, 27% in *Moniliophthora* spp. (fourth day), for the stem-leaves extract, 20% in *Colletotrichum* spp. (seventh day), for the flowers extract, 24% in *Colletotrichum* spp (seventh day), for the stem-leaves extract, 31% in *Phytophthora* spp. (ninth day), for the flowers extract, 38% in *Phytophthora* spp. (ninth day). These results indicate that these filtrates are appropriate for the control of growing of phytopathogen fungi in *Theobroma cacao*.

*Corresponding author: pattymollinedo@gmail.com

RESUMEN

Spanish title: Capacidad inhibitoria de filtrados de *Trichoderma inhamatum* y *Caiophora andina* sobre fitopatógenos de *Theobroma cacao*. Se trabajó con extractos de filtrados de cultivos de *Trichoderma inhamatum* y extractos hidro-etánicos de *Caiophora andina* sobre cepas patógenas de cacao *Theobroma cacao*. Los porcentajes de inhibición obtenidos luego de la determinación del crecimiento hifal *in vitro* bajo el efecto del filtrado fúngico de cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12-QD fueron: para *Moniliophthora* spp. 11 % (en el día 4), para *Colletotrichum* spp. 20 % (día 11) y para *Phytophthora* spp., 46 % (día 9). Mientras que, los porcentajes de inhibición del crecimiento bajo el efecto de los extractos hidroetanólicos vegetales, extracto 1 (tallos-hojas) y extracto 2 (flores) fueron: para el patógeno *Moniliophthora* spp. 36% y 27 % respectivamente (a los 4 días), para *Colletotrichum* spp. 20 y 24 % respectivamente (a los 7 días) y finalmente para *Phytophthora* spp. 31% y 38 % respectivamente (ambos al día 9). Por ende, se propone ambos filtrados para el control de hongos fitopatógenos en *Theobroma cacao*.

INTRODUCCION

Las pérdidas económicas por plagas de hongos fitopatógenos se han incrementado en los últimos años. La FAO ve como una amenaza a la seguridad alimentaria las plagas y enfermedades que afectan a los cultivos, lo que causa pérdidas significativas a los agricultores. Si antes se destacaba la enfermedad del cacao llamada “Escoba de bruja” (*Crinipellis pernicioso* y *Moniliophthora pernicioso*) como un agresor del cacao, ahora la principal amenaza es la



Moniliasis (*Moniliophthora roreri*). Esta plaga se está propagando de forma vertiginosa, causando la pérdida de ejemplares de cacao nativo que tiene un valor muy elevado para el país, así como también cuantiosas pérdidas en la producción.

El uso continuo y persistente de plaguicidas está causando problemas severos de salud en diversas regiones agrícolas, razón por la cual estos productos no son utilizados en Alto Beni, considerada como la región de producción orgánica.

En este contexto, el uso de biocontroladores ha despertado el interés en los productores agrícolas, en especial el uso de por ejemplo de esporas de *Trichoderma* o de *Bacillus thuringiensis*. También se tiene información del uso de cepas de *Trichoderma* para el control de enfermedades del cacao, utilizando esporas del hongo, no tomando en cuenta que este tipo de tratamientos podrían alterar la microfauna existente.

Lo que se busca es poder controlar las enfermedades fúngicas usando tanto filtrados activos de cultivos de hongos (así como extractos de plantas) que fueron exitosos en otros cultivos como: habas, tomates, papas, quinua y tuna (Espinal, Huanca, Terrazas, & Giménez, 2010 [7]; Vallejos, Espinal, Mollinedo, & Terrazas, 2014 [29]).

Trichoderma es un género de hongos que está presente en todos los suelos cultivables, muchas especies de este género se pueden caracterizar como oportunistas o simbiosiontes de plantas y no virulentas. Se refiere a la capacidad de varias especies de *Trichoderma* para formar relaciones endofíticas mutualistas con varias especies de plantas. Varias cepas de *Trichoderma* se han desarrollado como agentes de control biológico contra las enfermedades fúngicas de las plantas (López, Pérez, Llobel, Monte, & Zea, 1999 [13]; González, Maruri, & González, 2005 [11]).

Los diversos mecanismos incluyen antibiosis, el parasitismo, la inducción de la resistencia de la planta hospedante y la competencia. La mayoría de los agentes biocontroladores son las especies *T. harzianum*, *T. viride* y *T. inhamatum*. El agente de biocontrol crece generalmente en su hábitat natural en la superficie de la raíz, y así afecta a la enfermedad, en las raíces en particular, pero también puede ser eficaz contra las enfermedades foliares (*Caiophora* es un género con 95 especies de plantas de flores, está ampliamente distribuido en los Andes, desde Argentina/Chile en el Sur, hasta el centro de Ecuador en el Norte, crecen a altitudes de 3000 a 5000 msnm, pertenece a la familia Loasaceae, es una planta urticante (Ackermann & Weigend, 2007 [1]) (Noguera, 2012 [17]).

Se busca evaluar la capacidad inhibitoria in vitro del filtrado del cultivo de *Trichoderma inhamatum* Cepa BOL12-QD sobre los fitopatógenos aislados.

Evaluar capacidad inhibitoria in vitro de extractos etanólicos de *Caiophora andina* sobre los fitopatógenos aislados.

Se busca estudiar de una capacidad biocontroladora (*in vitro*) de extractos fúngicos y plantas sobre hongos fitopatógenos, en Mazorcas de Cacao híbrido (*Theobroma cacao*).

EXPERIMENTAL

Este trabajo forma parte del proyecto “Agentes Biocontroladores de Fitopatógenos Fase III”, de la Universidad Mayor de San Andrés con la participación de sus institutos: el Instituto de Investigaciones de Productos Naturales (IIPN) y el Instituto de investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB).

Colecta del material vegetal: Caiophora andina

La especie vegetal *Caiophora andina* fue seleccionada debido a reportes previos que describen su actividad antifúngica (Tenorio, Terrazas, Alvarez, Vila, & Mollinedo, 2010 [26]).

Las muestras de plantas fueron colectadas en regiones cercanas a la región “La Cumbre” carretera a Yungas, sector denominado La Apacheta, a 24 Km de la ciudad de La Paz. Las plantas fueron identificadas de acuerdo a sus características morfológicas (Noguera, 2012 [17]).

Obtención de extractos hidroetanólicos de Caiophora andina

Secado y pulverización

La planta recolectada fue separada en tallos, flores y hojas, clasificándose en dos grupos: el primer grupo correspondió a tallo + hojas y, el segundo grupo correspondió a las flores.

Se realizó la pulverización de ambos grupos utilizando una licuadora marca “Oster”, pesando ambos grupos y conservándolos para el proceso posterior de extracción.



Extracción hidroetanólica de plantas

Se realizó una extracción sólido-líquido de los dos grupos de *Caiophora andina* anteriormente mencionados, en agua-etanol (30/70) por 24 horas por triplicado. Ambos extractos fueron concentrados en un rotavapor marca Heidolph a 80 rpm, a una temperatura aproximada de 45 °C y posteriormente se llevó a una estufa BINDER a 40 °C para el secado final durante 72 a 96 horas, para su posterior evaluación y determinación de la actividad anti fúngica (Tenorio, Terrazas, Alvarez, Vila, & Mollinedo, 2010 [26]).

Hongos patógenos de mazorca de cacao

Se trabajó con cepas *Colletotrichum spp.*, *Phytophthora spp.*, *Moniliophthora spp.* de un aislamiento previo.

Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron el Sabouraud Dextrose Agar Difco™, Potato Dextrose Agar Difco™ (PDA), Papa Dextrosa Caldo (PDC), Malt Extract Agar OMIOD (MEA) (Anexo A) (Tenorio, Terrazas, Alvarez, Vila, & Mollinedo, 2010 [26]).

Método de la cámara húmeda

En la base interna de un frasco de vidrio de boca ancha de un litro de capacidad, se colocó un algodón y papel filtro (esterilizados a 121 °C durante 20 minutos). En una campana de flujo laminar se introdujo el fruto infectado, se tapó y se dejó incubando a 22 °C durante 5 días. Luego de este tiempo de cultivo, se realizaron cortes en el fruto infectado que ya presentaba crecimiento fúngico, de manera tal que los pedazos cortados e infectados fueron colados al centro de una caja Petri que contenía ya sea los medios PDA y MEA (Tenorio, 2013 [25]).

Enfrentamiento dual controlador biológico vs. fitopatógeno

Se realizó el enfrentamiento dual con la cepa Bol 12-QD *Trichoderma inhamatum* y las cepas fúngicas aisladas del cacao, en placas Petri con medio MEA. A partir de un cultivo fúngico de 4 días, se realizó un lavado de esporas obteniéndose una suspensión de 10^8 esporas/mL. en medio de cultivo MEA, se inoculó 100 mL del lavado de esporas (10^8 esporas/mL) del patógeno, en el caso de un basidiomiceto (que no posee esporas) se sembró un disco de agar de 6 mm de diámetro obtenido con sacabocado un medio de cultivo de 4 días de crecimiento y se colocó en uno de los puntos equidistantes. Se colocó el biocontrolador de la misma manera que el patógeno inoculando 100 mL del lavado de esporas en un orificio realizado con un sacabocado de 6 mm de diámetro, y profundidad de 4 mm en el segundo punto equidistante. Ambos hongos (patógeno y biocontrolador) estuvieron separados a 4 cm de distancia, después de 3 a 5 días se observó el desarrollo de la inhibición, solapamiento entre el hongo patógeno y el posible biocontrolador (Fernández & Suárez, 2009 [8]) (Parra, Centeno, & Araque, 2009 [21]), se esperó el crecimiento de 3 a 5 días al cabo de los cuales se observó el halo de inhibición y si el hongo biocontrolador tiene actividad inhibitoria. (Tenorio, 2013 [25]).

Obtención de filtrados activos del cultivo fúngico de la cepa BOL 12-QD

Se tomó las esporas de la cepa Bol 12-QD de un cultivo de 4 días, y se las resuspendió en 5 mL de solución fisiológica, se realizó un recuento de las esporas en cámara de Neubauer, y se llegó a una concentración de 10^{12} esporas/mL, se colocaron 300 μ L de la suspensión en un matraz de 1 L, con un volumen de 300 mL de medio PDC (Caldo papa dextrosa), así se llegó a una concentración de 10^6 esporas/mL, esto se realizó por triplicado, se incubó durante un periodo de 15 días con 12 horas de luz y oscuridad a una temperatura de 22°C (Espinal, Huanca, Terrazas, & Giménez, 2010 [7]).

Ensayos filtrados activos del cultivo fúngico

Del cultivo en Batch (después de los 15 días de cultivo) se procedió a separar el líquido de las hifas y esporas con cuidado de no arrastrar esporas. El líquido separado se centrifugó en tubos falcon (estériles) a 8000 rpm durante 20



minutos, se recuperó el sobrenadante y se volvió a centrifugar durante 20 minutos a 8000 rpm, el sobrenadante se recuperó en un frasco estéril y se procedió a esterilizar por filtración (filtros Millipore de 0,22 μm) conservando el filtrado para los ensayos de dilución en placa. (Denominándose a todo este proceso filtrado de cultivo) (Espinal, Huanca, Terrazas, & Giménez, 2010 [7]).

Técnica de dilución en placa

Para el ensayo de la dilución en placa, se utilizó la totalidad del filtrado del cultivo en batch de la cepa Bol 12-QD (*Trichoderma inhamatum*) dilución 1/2, y el total del extracto etanólico de la *Caiophora andina* extracto etanólico 1 mg/mL.

Se vertió en una placa Petri de 9 cm de diámetro (exceptuando para el Basidiomiceto que se utilizó una placa de 10 cm de diámetro) el filtrado fúngico y el medio de cultivo MEA (Anexo A) en proporción 1:1, mezclando homogéneamente (técnica de dilución en placa), y se esperó que el medio solidifique (procedimiento realizado por triplicado) (Tenorio, Terrazas, Alvarez, Vila, & Mollinedo, 2010 [26], Tenorio, 2013 [25]).

Para el caso del extracto etanólico de *Caiophora andina* de ambos grupos (Flores y Tallos-hojas) se realizaron los cálculos para la concentración final de 1 mg/mL para un volumen de 40 mL (para tres placas Petri), la cantidad calculada se mezcló en un matraz Erlenmeyer que contenía el medio de cultivo MEA, se mezcló homogéneamente, teniendo cuidado que no se gelifique y forme grumos. Se vertieron en placas Petri de diámetro de 9 cm (exceptuando para el basidiomiceto que se utilizó una placa de 10 cm de diámetro) se realizó por triplicado para cada hongo (Tenorio, Terrazas, Alvarez, Vila, & Mollinedo, 2010 [26], Tenorio, 2013 [25]).

Para el control positivo se utilizó MANCOZEB (3 g/L) como antifúngico químico, procediéndose de manera similar a los extractos hidroetanólicos. El control negativo (agua) solo se adiciona al medio MEA antes de gelificar.

Análisis estadístico

Para la evaluación del trabajo de investigación se empleó el diseño al azar en la selección del fungicida como control positivo para diferentes fitopatógenos.

Una vez obtenidos estos datos se realizó un diseño de bloques al azar, con la selección de las muestras para cada fitopatógeno para comparar entre el control negativo (control de crecimiento) y la cepa seleccionada. El mismo tratamiento fue aplicado en ambos fitopatógenos.

Para los análisis de ANOVA y test de Tukey, se utilizó el programa R-PROJECT, (R Development Core Team, 2012)R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

RESULTADOS Y DISCUSION

Evaluación in vitro de la actividad biológica inhibitoria del filtrado del cultivo de la cepa BOL 12-QD *Trichoderma inhamatum*.

La pruebas de enfrentamiento dual hongo:hongo de *Trichoderma inhamatum* vs. *Moniliophthora spp.* demostraron que éstos podían retrasar el desarrollo de este patógeno. De igual manera el mismo fenómeno fue observado en la inhibición de *Phytophthora spp.*, hasta los días 13 y 14 de crecimiento de este patógeno (Anexo H2).

Para *Colletotrichum spp.* el desarrollo del micelio en condiciones de enfrentamiento dual recién fue establecido después de 3 y 4 días, pero su crecimiento fue lento.

La actividad biológica inhibitoria del crecimiento determinada a través del método de dilución en placa fue establecida tanto para el filtrado fúngico del cultivo de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12-QD (Anexo I), al igual que para los extractos hidroetanólicos vegetales.

Existe inhibición del crecimiento de *Phytophthora spp.* ejercida por el filtrado del cultivo de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12-QD desde el inicio de su desarrollo micelial hasta el día 10. Existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$). Dicha determinación fue establecida por comparación con un control de crecimiento (control negativo) y un control positivo como inhibidor del crecimiento: Mancozeb. Figura 1.

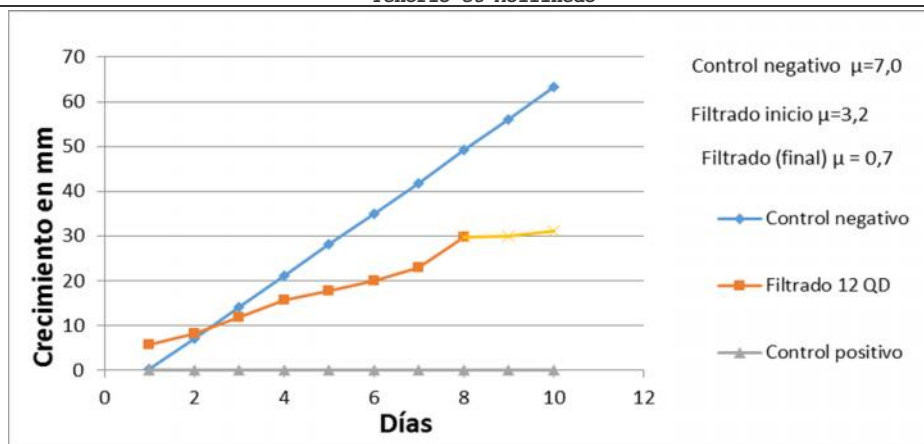


Figura 1. Cinética de crecimiento de *Phytophthora spp.* bajo el efecto ó no del filtrado del cultivo fúngico de *Trichoderma inhamatum* cepa BOL 12-QD. Agente químico para la inhibición del crecimiento: Mancozeb (Control Positivo).

Observese que la μ del filtrado es inferior en los primeros días (3 mm/día) y en los últimos disminuye drásticamente (1 mm/día) comparado con el control negativo (7 mm/día).

Existe inhibición del crecimiento de *Moniliophthora spp.* ejercida por el filtrado del cultivo de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12-QD desde el inicio de su desarrollo micelial hasta día 4. Existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$). Dicha determinación fue establecida por comparación con un control de crecimiento (control negativo) y un control positivo como inhibidor del crecimiento: Mancozeb. Figura 2.

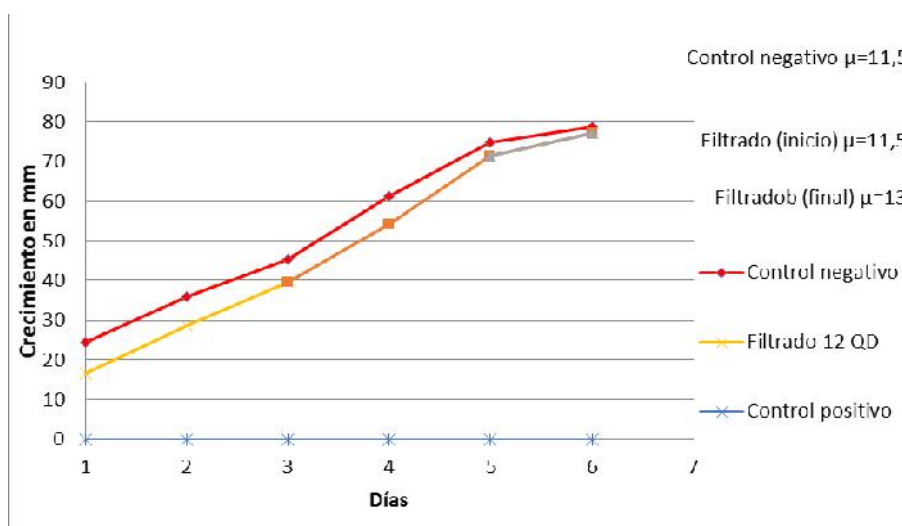


Figura 2. Cinética de crecimiento de *Moniliophthora spp.* bajo el efecto ó no del filtrado del cultivo fúngico de *Trichoderma inhamatum* cepa BOL 12-QD. Agente químico para la inhibición del crecimiento: Mancozeb (Control Positivo).

La μ casi son iguales (12 mm/día) tanto del control negativo y el filtrado a pesar que este último creció un día después, el último día incrementó su cinética (13 mm/día).

Existe inhibición del crecimiento de *Colletotrichum spp.* ejercida por el filtrado del cultivo de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12-QD desde el inicio de su desarrollo micelial hasta el día 11. Existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$). Dicha determinación fue establecida por comparación con un control de crecimiento (control negativo) y un control positivo como inhibidor del crecimiento: Mancozeb. Figura 3.

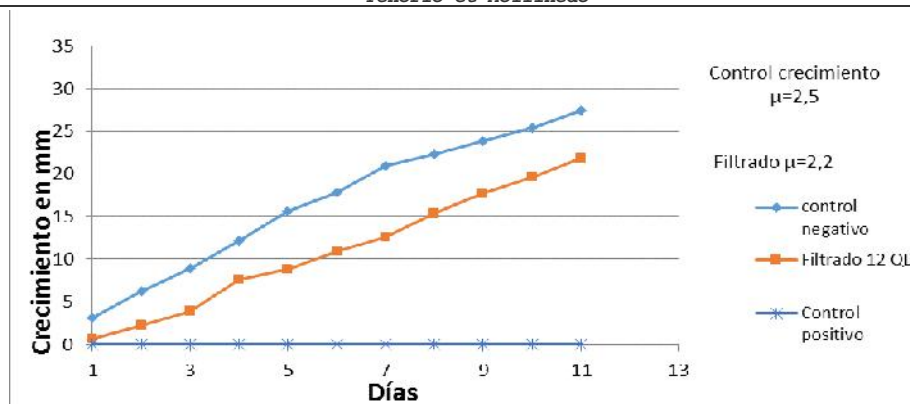


Figura 3. Cinética de crecimiento de *Colletotrichum* spp. bajo el efecto ó no del filtrado del cultivo fúngico de *Trichoderma inhamatum* cepa BOL 12-QD. Agente químico para la inhibición del crecimiento: Mancozeb (Control Positivo).

El filtrado disminuye la μ (2 mm/día) comparado con el control negativo (3 mm/día).

Evaluación in vitro de la actividad biológica inhibitoria de extractos vegetales.

Existe inhibición del crecimiento de *Phytophthora* spp., ejercida por el extracto hidroetanólico de tallos-hojas como del extracto hidroetanólico de flores obtenidos de *Caiophora andina* desde el día 4 y 2 respectivamente del desarrollo micelial hasta el día 11. Existe una diferencia estadísticamente significativa para ambos casos ($p < 0.01$). Dicha determinación fue establecida por comparación con un control de crecimiento (control negativo) y un control positivo como inhibidor del crecimiento: Mancozeb. Figura 4.

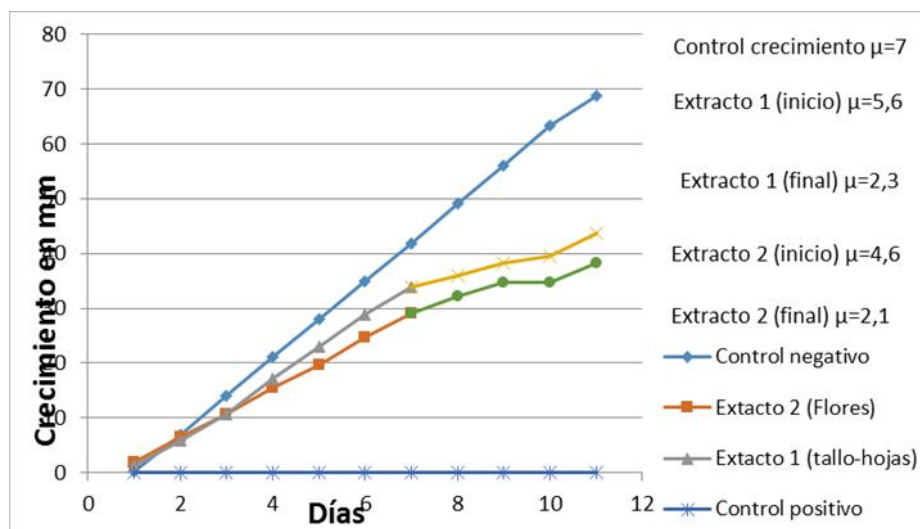


Figura 4. Cinética de crecimiento de *Phytophthora* spp. bajo el efecto ó no del extracto hidroetanólico de *Caiophora andina*. Agente químico para la inhibición del crecimiento: Mancozeb (Control Positivo).

Ambos extractos, el de flores y el de tallos y hojas disminuyen la μ (6 y 5 mm/día respectivamente) en los primeros días, y en los últimos se acentúa la inhibición (2 mm/día para ambos). comparado con el control positivo (7mm/día).

Existe inhibición del crecimiento de *Moniliophthora* spp., ejercida por el extracto hidroetanólico de tallos-hojas como del extracto hidroetanólico de flores obtenidos de *Caiophora andina* desde el día 2 y del inicio de crecimiento respectivamente del desarrollo micelial hasta el día 6. Existe una diferencia estadísticamente significativa para ambos casos ($p < 0.01$). Dicha determinación fue establecida por comparación con un control de crecimiento (control negativo) y un control positivo como inhibidor del crecimiento: Mancozeb. Figura 5.

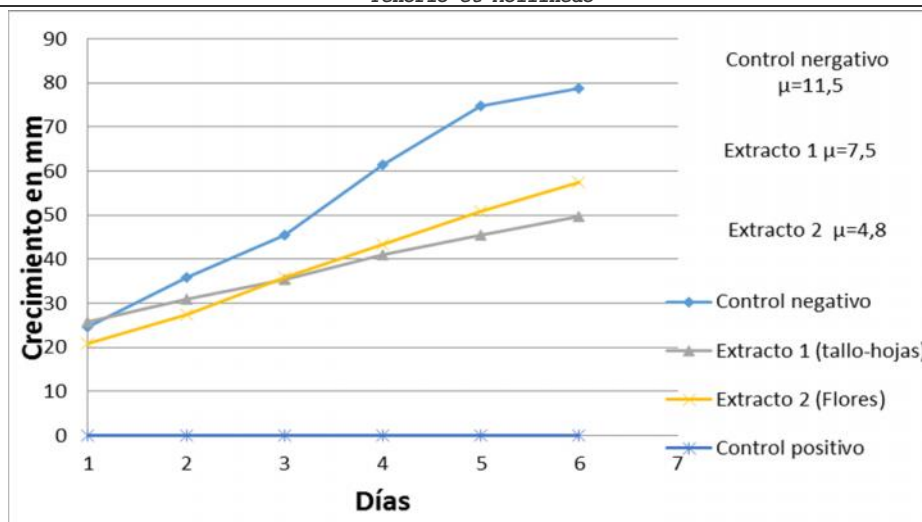


Figura 5. Cinética de crecimiento de *Moniliophthora* spp. bajo el efecto ó no del extracto hidroetanólico de *Caiophora andina*.
Agente químico para la inhibición del crecimiento: Mancozeb (Control Positivo).

Los extractos de flores y de tallos-hojas disminuyen la μ (4 y 7 mm/día respectivamente), comparado con el control positivo (12 mm/día).

Actividad biológica inhibitoria del crecimiento de *Colletotrichum* spp. determinada por el extracto hidroetanólico de *Caiophora andina*

En la figura 6 se observa que existe inhibición del crecimiento de *Colletotrichum* spp., ejercida por el extracto hidroetanólico de tallos-hojas como del extracto hidroetanólico de flores obtenidos de *Caiophora andina* desde del inicio de crecimiento y el día 2 respectivamente del desarrollo micelial hasta el 9° día. Existe diferencia estadísticamente significativa para ambos casos ($p < 0.01$, ver Anexo M2), Dicha determinación fue establecida por comparación con un control de crecimiento (control negativo) y un control positivo como inhibidor del crecimiento: Mancozeb.

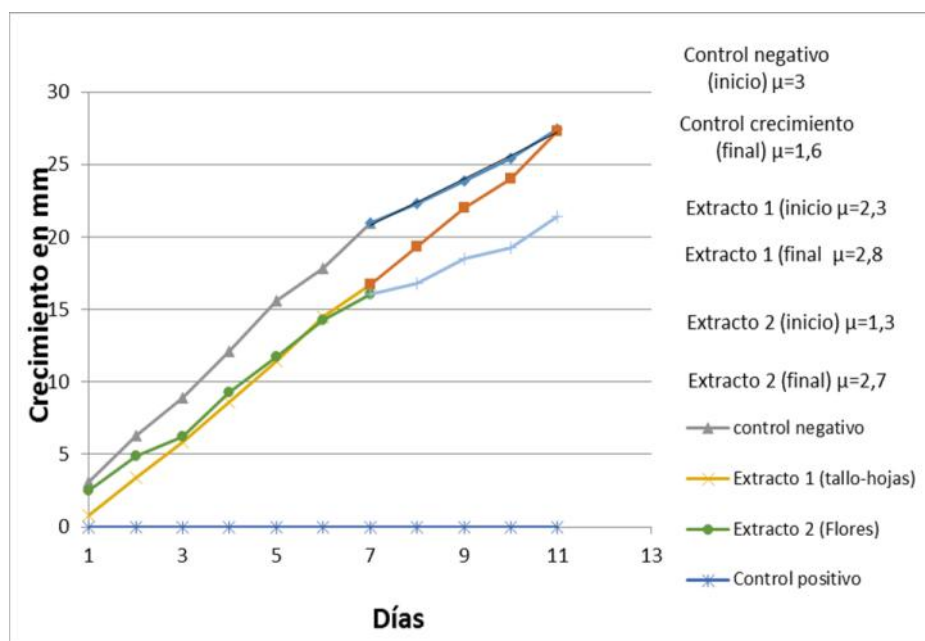


Figura 6. Cinética de crecimiento de *Colletotrichum* spp. bajo el efecto ó no del extracto hidroetanólico de *Caiophora andina*.
Agente químico para la inhibición del crecimiento: Mancozeb (Control Positivo).



Para ambos extractos de flores y tallos-hojas la μ es de 3 y 2 mm/día respectivamente en los primeros días, y en los últimos la μ es de 3 y 1 mm/día respectivamente. comparado con el control positivo 3mm/día en los primeros días y 2 en los últimos.

Porcentajes de inhibición del filtrado del cultivo de la cepa Trichoderma inhamatum Bol 12-QD y del extracto hidroetanólico de Caiophora andina

De acuerdo a los resultados obtenidos tenemos las tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Porcentaje de crecimiento e inhibición tanto del filtrado fúngico como del extracto hidroetanólico vs *Phytophthora spp.*

<i>Phytophthora spp.</i>	Día 3	Día 6	Día 9
	% de inhibición	% de inhibición	% de inhibición
Filtrado 12 QD	15	43	47
Extracto 1 (tallos-hojas)	31	18	32
Extracto 2 (flores)	24	29	38
Control negativo (Medio MEA)	0	0	0
Control positivo (Mancozeb)	100	100	100

El porcentaje de inhibición máxima de *Phytophthora spp.* determinado cuando se aplica el filtrado fúngico 12 QD y los extractos vegetales 1 y 2 de *Caiophora* fueron de 47, 32 y 38 % respectivamente

Tabla 2. Porcentaje de crecimiento e inhibición tanto del filtrado fúngico como del extracto hidroetanólico vs *Moniliophthora spp.*

<i>Moniliophthora spp.</i>	Día 2	Día 4	Día 6
	% de inhibición	% de inhibición	% de inhibición
Filtrado 12 QD	20	12	2
Extracto 1 (tallo-hojas)	14	33	37
Extracto 2 (Flores)	23	29	27
Control negativo (medio MEA)	0	0	0
Control positivo (Mancozeb)	100	100	100

El porcentaje de inhibición máximos de *Moniliophthora spp.* determinado cuando se aplica el filtrado fúngico 12 QD y los extractos vegetales 1 y 2 de *Caiophora andina* fueron de 20, 37 y 29 % respectivamente

Tabla 3. Porcentaje de crecimiento e inhibición tanto del filtrado fúngico como del extracto hidroetanólico vs *Colletotrichum spp.*

<i>Colletotrichum spp.</i>	Día 4	Día 7	Día 11
	% de inhibición	% de crecimiento	% de inhibición
Filtrado 12 QD	38	40	20
Extracto 1 (tallo-hojas)	29	20	1
Extracto 2 (Flores)	24	24	22
Control negativo (medio MEA)	0	0	0
Control positivo (Mancozeb)	100	100	100



El porcentaje de inhibición máximo de *Colletotrichum* spp. determinado cuando se aplica el filtrado fúngico 12 QD y los extractos vegetales 1 y 2 de *Caiophora ansina* fueron de 40, 29 y 24 % respectivamente,

CONCLUSIONES

En los enfrentamientos duales se registró una inhibición únicamente con el hongo *Phytophthora* spp., obteniéndose un mejor resultado que el encontrado por Rivas [23], donde los enfrentamientos *in vitro* realizados tuvieron una duración de 16 días y en ningún caso se observaron halos de inhibición, pero si hubo crecimiento de todas las cepas de *Trichoderma* spp. como se reporta en bibliografía (Rivas & Pavone, 2010 [23]). Resultados similares fueron reportados anteriormente, contra *Botrytis fabae*, para filtrados de cultivos fúngicos de *Trichoderma in vitro* (Espinal, Huanca, Terrazas, & Giménez, 2010 [7]).

Con respecto a los extractos de plantas, ambos extractos determinaron una inhibición de los tres hongos reportados en este estudio, siendo el extracto de flores el de mayor efecto, posiblemente esta actividad inhibitoria del crecimiento se deba a la presencia de metabolitos secundarios como ser flavonoides, terpenos u otros. Experimentos con la *Caiophora andina*, inhibiendo a *Fusarium* spp. y *Aspergillus flavus* fueron previamente reportados (Tenorio, Terrazas, Alvarez, Vila, & Mollinedo, 2010 [26]).

Se realizó el análisis estadístico del fermento de *Trichoderma inhamatum* Cepa BOL-12-QD) mediante una comparación en días y extracto de *Caiophora andina* de *Phytophthora* spp., *Moniliophthora* spp. y *Colletotrichum* spp. obteniéndose resultados de inhibición estadísticamente significativos para el fermento de la cepa BOL 12-QD *Trichoderma inhamatum* y para los patógenos *Phytophthora* spp. y *Colletotrichum* spp. y no así sobre *Moniliophthora* spp. Sin embargo, el porcentaje de inhibición está en el orden del 20 al 40%, lo cual determinaría quizás futuros estudios para incrementar la cantidad de resultados.

Una inhibición estadísticamente significativa frente a los tres hongos (*Phytophthora* spp., *Moniliophthora* spp. y *Colletotrichum* spp.) fue la obtenida con el extracto de flores por sobre los tallos y hojas.

Los resultados demuestran que la mayor inhibición se produce con el filtrado de la cepa BOL 12-QD de *Trichoderma inhamatum*, respecto al extracto de *Caiophora andina*. Esto puede deberse a la presencia de enzimas como las quitinasas o algún tipo de metabolito secundario, producido por el hongo. Algo similar fue reportado sobre *Trichoderma inhamatum* y la obtención de enzimas (Vallejos, Espinal, Mollinedo, & Terrazas, 2014 [29]). (Paredes, y otros, 2011 [20]) (Cotes, 2014 [6]) (González, y otros, 2010 [10]).

De las muestras de mazorcas de cacao (*Theobroma cacao*), se aislaron *Moniliophthora* spp., *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. y a *Phytophthora* spp.

Se evaluó la capacidad inhibitoria *in vitro* de la cepa BOL 12-QD *Trichoderma inhamatum* sobre patógenos, determinándose que ésta manifiesta una máxima inhibición sobre *Phytophthora* spp. con un porcentaje de inhibición del 47 %, sobre *Moniliophthora* spp. y una inhibición del 20 % únicamente al segundo día, y *Colletotrichum* spp. con un porcentaje de 40 % de inhibición.

Se evaluó la actividad biológica inhibitoria *in vitro* de extractos de tallos-hojas y de flores de la *Caiophora andina*. La mayor actividad fue manifestada por el extracto hidroetanólico de flores, a una concentración de 1 mg/mL sobre los tres hongos patógenos, *Phytophthora* spp. Ambos extractos T-H y F mostraron una inhibición máxima de 32 % y 38 % respectivamente con *Moniliophthora* spp. y de 37 % y 27 % respectivamente con *Colletotrichum* spp. y de 29 % y 24 % respectivamente con *Phytophthora* spp.

Se estudió la capacidad biocontroladora (*in vitro*) de los extractos de filtrados fúngicos y de planta sobre hongos fitopatógenos, en Mazorcas de Cacao (*Theobroma cacao*). Por lo que se propone ambos biocontroladores BOL 12-QD y extracto de planta para los hongos fitopatógenos en *Theobroma cacao*, así mismo se logró modificar y adaptar los métodos para la evaluación de biocontroladores *in vitro* de origen vegetal, así como los filtrados de microorganismos.

Recomendaciones

- Realizar una identificación molecular de los hongos encontrados.
- Realizar el aislamiento de *Monilia in situ* en el lugar geográfico de ataque (Sapecho), dadas las características ambientales de las mismas y los cambios que puedan ocurrir en el traslado de las muestras.
- Realizar la identificación de los posibles componentes de los extractos de *Caiophora andina* para determinar qué componentes están presentes: carotenoides, glicósidos (saponinas), glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y Glucosinolatos, compuestos fenólicos como: flavonoides, antocianinas, taninos, etc.



- Realizar mezclas de los extractos de la *Caiophora andina*, frente los fitopatógenos aislados.
- Realizar mezclas de los extractos de la *Caiophora andina* y la cepa BOL 12-QD, frente los fitopatógenos aislados.
- Desarrollar más estudios para poder comprobar el comportamiento de los extractos en campo.

REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFIA ADICIONAL*

1. Ackermann, M., & Weigend, M. 2007. Notes on the genus *Caiophora* (Loasoideae, loasaceae) in Chile and neighbouring countries. *Darwiniana*, 45 (1), 45-67.
2. Agrios, G. N. 2007. *Fitopatología*. Mexico D.F.: Limusa S.A.*
3. Aime, M. C., & Phillips, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, 97(5), 1012-1022.*
4. Arbelaez, L. M. 2010. *Análisis de la diversidad intraespecie de Moniliophthora roreri (cif.) Evans et al. por medio de marcadores morfológicos y genéticos*. Medellín: Tesis de Maestría.*
5. Castillo, P., Rizo, C., Gladstone, S., & Cruz, I. (*alice*). Recuperado el 20 de Julio de 2015, de Capítulo XXXVI Laboratorio sobre patógenos microbiales: Postulados de Koch. Técnicas de aislamiento, inoculación y verificación de síntomas externos: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/488629/1/Laboratoriopatogenos.pdf> (17 de Febrero de 2005).*
6. Cotes, C. A. 2014. Evaluación de la actividad quitinasa en procesos de control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* en tomate, mediante fitoinvigoración de semillas en presencia de *Trichoderma koningii*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(2), 58-66.
7. Espinal, C., Huanca, M., Terrazas, E., & Giménez, A. 2010. Evaluación de la actividad biocontroladora de *Trichoderma inhamatum* cepa BOL 12 QD, frente a *Botrytis fabae*, causante de la mancha chocolate en cultivos de haba (*Vicia faba*). *Biofarbo*, 28 (1), 13-30.
8. Fernández, R. J., & Suárez, C. L. 2009. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *passiflorae* en Maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. *Rev.Fac.Nal.Agr.*, 57(1), 4743-4748.
9. Garces, C. 1946. La Escoba de Bruja del Cacao. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 6(24), 329-369.*
10. González, I., Infante, D., Peteira, B., Martínez, B., Arias, Y., González, N., y otros. 2010. Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico. I. expresión de actividad quitinasa. *Rev. Protección Veg.*, 25(1), 58-63.
11. González, J. C., Maruri, J. M., & González, A. 2005. Evaluación de diferentes concentraciones de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum* agente causal de la pudrición de plántulas en papaya (*Carica papaya* L.) en Tuxpan, Veracruz, México. *Revista UDO Agrícola*, V(1), 45-47.
12. Koneman, W., & Allen, S. 2008. *Diagnostico Microbiologico*. Panamericana.*
13. López, C. J., Pérez, R. M., Llobel, A., Monte, E., & Zea, T. 1999. Estudios in vivo de *Trichoderma* como agente de biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix*. *Revista Chapingo Serie*, 5, 61-265.
14. Lozada, B. S., Herrera, L. V., Perea, J. A., Stashenko, E., & Escobar, P. 2012. Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, LXI(2), 102-110.*
15. Maridueña, G., Jiménez, M. L., & Peralta, E. L. 2010. Actualización de la Micobiota Patogénica del Cacao "arriba" *Theobroma cacao*) presente en la Costa Ecuatoriana. *Revista Tecnológica ESPOL- RTE*, 23(1), 21-26.*
16. Mier, T., Toriello, C., & Ulloa, M. 2002. *Hongos microscópicos saprobios y parásitos*. Mexico D.F.: UNAM.*
17. Noguera, E. 2012. Revisión taxonómica de loasaceae en Venezuela. *Caldasia*, 34, 43-67.
18. Orozco, A. C., Osorio, C., Botero, J. M., Rivera, F. A., & López, A. G. 2010. Evaluación microbiológica y molecular de *Moniliophthora perniciosa* (Agaricales : marasmiaceae). *bol.cient.mus.hist.nat.*, XV(1), 41 - 47.*
19. Osorio, C., Orozco, A. C., López, A. G., & Rivera, A. F. 2012. Variabilidad genética de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime y Phillips-Mora, comb. nov. (Agaricales - Marasmiaceae) en variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta de agronomía*, 56(2), 93-101.*
20. Paredes, J. E., Carrillo, J. A., Sañudo, J. A., Allende, R., García, R. S., Roberto Gregori, R., y otros. 2011. Enzimas Líticas Producidas por *Trichoderma* spp. y su Correlación con la Inhibición in vitro de Patógenos Causantes de la Pudrición de la Raíz del Garbanzo. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29(1), 73-75.
21. Parra, E., Centeno, S., & Araque, Y. 2009. Actividad antifúngica de *Burkholderia cepacia* aislada de maíz amarillo (*Zea mays* L.) bajo diferentes condiciones de cultivo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29, 103-109.
22. R Development Core Team. 2012. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Obtenido de ISBN 3-900051-07-0: <http://www.R-project.org/>.*
23. Rivas, M., & Pavone, D. 2010. Diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de *Theobromacacao* L. del estado Caracaibo Venezuela, y su capacidad biocontroladora sobre *Crinipellis perniciosa* (Stahel) singer. *Interciencia*, 35(10).
24. Sánchez, D. F., & Garcés, F. R. 2012. *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. en el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria*, 3, 249 - 258.*
25. Tenorio, R. 2013. (T. d. La Paz, Ed.) *Aislamiento, identificación y ensayos de control biológico in vitro de fitopatógenos de la quinua (Chenopodium quinoa), la tuna (Opuntia picus-Indica), la castaña (Castanea sativa Miller)*.
26. Tenorio, R., Terrazas, E., Alvarez, M. T., Vila, J. L., & Mollinedo, P. 2010. Concentrados de saponina de *Chenopodium quinoa* *Caiophora andina*: alternativas como biocontroladores de hongos fitopatógenos. *Revista Boliviana de Química*, 27(1), 33-40.
27. Tovar, G. 1991. Capítulo XIV La escoba de bruja del cacao [*Crinipellis perniciosa* (Stahel Singer)] en la región del Piedemonte llanero de Colombia: Interpretación del estudio epidemiológico para el manejo de la enfermedad, *Agronomía Colombiana*, 8(1), 209-226.*



28. Urdaneta, L. M., & Delgado, A. E. **2007**. "Identificación de la micobiota del filoplano del cacao (Theobroma cacao L.), en el municipio Carraciolo Parra Olmedo, estado Mérida, Venezuela". *24*, 47-68.*
29. Vallejos, J. G., Espinal, C., Mollinedo, P., & Terrazas, E. **2014**. Evaluación de actividad insecticida y quitinolítica de *Trichoderma inhamatum* y *Beauveria bassiana* en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. *Revista Boliviana de Química*, *31*(1), 5-9.

*Sin llamada en el texto