

**EVALUACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL  
DE *Phytophthora palmivora* AGENTE CAUSANTE DE LA PUDRICIÓN DEL  
COGOLLO DE LA PALMA DE ACEITE**

**ALEJANDRA MILENA GARCÍA PINILLA**

**CORPORACIÓN UNIVERSITARIA MINUTO DE DIOS  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
INGENIERÍA AGROECOLÓGICA  
BOGOTÁ D.C, COLOMBIA  
2017**

**EVALUACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL  
DE *Phytophthora palmivora* AGENTE CAUSANTE DE LA PUDRICIÓN DEL  
COGOLLO DE LA PALMA DE ACEITE**

**ALEJANDRA MILENA GARCÍA PINILLA**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA EN  
AGROECOLOGÍA**

**DIRECTOR**

**Greicy Andrea Sarria Villa  
Ingeniera Agrónoma MSc.**

**CO – DIRECTOR**

**Omar Guerrero Guerrero  
Ingeniero Agrónomo MSc.**

**INVESTIGADORES PARTICIPANTES**

**Gerardo Martínez López PhD.  
Francia Helena Varón de Agudelo MSc.**

**CORPORACIÓN UNIVERSITARIA MINUTO DE DIOS**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**INGENIERÍA AGROECOLÓGICA**

**BOGOTÁ D.C, COLOMBIA**

**2017**

## NOTA DEDICATORIA

- Dedico este trabajo de grado a cada una de las personas que han estado en apoyo constante de principio a fin de forma incondicional durante mi formación profesional y personal.
- A mi madre Claudia Milena Pinilla Ballesteros, a mis hermanos Yolby Andrés García Pinilla y Miguel Felipe Angarita Pinilla y mi sobrina Paula Catalina García quienes con su apoyo, amor y acompañamiento en cada uno de los caminos que he recorrido; siendo siempre el resguardo y la bendición en mi vida.
- A la luz de mi vida Yolby León García Marconi, por siempre ser mi guía e inspiración en cada uno de mis proyectos y metas.

## AGRADECIMIENTOS

- A Dios, a la Virgen María y a los ángeles celestiales y terrenales por abrirme el camino hacia el desarrollo y culminación de este proyecto de grado, además por cada de una de las enseñanzas y oportunidades que se presentaron durante el trascurso de este trabajo.
- A mi directora de tesis Greicy Andrea Sarria Villa por todo su apoyo, colaboración enseñanzas, consejos, tiempo dedicación y cariño en todo el proceso de la investigación.
- A Omar Guerrero Guerrero por siempre creer en este proyecto, por su tiempo y cariño que siempre se mantuvo desde el primer día hasta la conclusión de la investigación.
- A Yuri Adriana Mestizo Garzón, Investigadora del Laboratorio de Fitopatología en el Campo Experimental Palmar de la Vizcaína, por ser mi compañía y apoyo incondicional durante el tiempo de investigación.
- A Cenipalma, Agroindustrias Villa Claudia y Palmeras de Yarima, por el apoyo económico para la elaboración de este proyecto de investigación.
- A las plantaciones de Zona Central de donde fue posible obtener los aislamientos nativos evaluados.
- A la Dra. Lilliana Hoyos de la Universidad Nacional de Medellín y Bioprotección® por la donación de las cepas del antagonista.
- A la Corporación Universitaria Minuto Dios, especialmente a la Facultad de Ingeniera.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	13
4. OBJETIVOS.....	15
4.1 General.....	15
4.2 Específicos .....	15
5. MARCO TEÓRICO .....	16
5.1 BOTÁNICA DE LA PALMA DE ACEITE .....	16
5.1.1 Morfología de la palma de aceite .....	16
5.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA PALMA DE ACEITE EN COLOMBIA.....	18
5.3 PUDRICIÓN DEL COGOLLO .....	18
5.3.1 AGENTE CAUSANTE.....	20
5.3.1.1 Características de <i>Phytophthora palmivora</i> .....	21
5.4 CONTROL BIOLÓGICO.....	23
5.5 <i>Trichoderma</i> spp. ....	24
5.5.1 Taxonomía y morfología de <i>Trichoderma</i> sp. ....	24
5.5.1.1 Características macroscópicas. ....	25
5.5.1.2 Características microscópicas .....	25
5.6 Condiciones de Crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp. ....	26
5.7 Características como controlador biológico .....	27
5.7.1 Micoparasitismo. ....	28
5.7.2 Competencia.....	29
5.7.3 Antibiosis.....	30
5.8 <i>Trichoderma</i> como control biológico del género <i>Phytophthora</i> .....	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6.1 Localización.....	32
6.2 Aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. ....	32

6.3	Evaluación de la actividad antagonica de <i>Trichoderma</i> .....	35
6.3.1	Velocidad de crecimiento de <i>P. palmivora</i> y <i>Trichoderma</i> spp. ....	35
6.3.2	Capacidad inhibitoria de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>P. palmivora</i> agente causante de la PC. ....	38
6.3.3	Interacciones micoparasíticas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>P. palmivora</i> agente causante de la PC. ....	40
6.3.4	Propiedades antibióticas de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>P. palmivora</i> agente causante de la PC.....	40
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	43
7.1	Evaluación de la velocidad de crecimiento de aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>P. palmivora</i> .....	43
7.2	Capacidad inhibitoria de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>P. palmivora</i> agente causante de la PC.....	49
7.3	Interacciones micoparasíticas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>P. palmivora</i> . ....	53
7.4	Propiedades antibióticas de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>P. palmivora</i> . ....	56
7.4.1	Prueba de Metabolitos no volátiles.....	56
7.4.2	Prueba de metabolitos volátiles.....	58
8.	CONCLUSIONES .....	61
9.	RECOMENDACIONES.....	63
10.	ANEXOS.....	64
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	70

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Procedencia de aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. ....	32
<b>Tabla 2.</b> Descripción de los tratamientos para evaluar la velocidad de crecimiento. .....	36
<b>Tabla 3.</b> Escala de clases de Baker y Cook.....	38
<b>Tabla 4.</b> Prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). Tasa de Crecimiento de doce aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. en tres medios de cultivo. ....	45
<b>Tabla 5.</b> Prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). Tasa de crecimiento radial del aislamiento PCTU095 de <i>P. palmivora</i> en tres medios de cultivo. ....	48
<b>Tabla 6.</b> Interacciones micoparasíticas de aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>P. palmivora</i> . ....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfología de la palma de aceite.....	17
<b>Figura 2.</b> Lesión inicial necrosis al costado de la flecha. ....	19
<b>Figura 3.</b> Estructuras de <i>Phytophthora palmivora</i> .....	22
<b>Figura 4.</b> Ciclo de vida <i>Phytophthora palmivora</i> . ....	22
<b>Figura 5.</b> Estructuras de <i>Trichoderma</i> sp. ....	25
<b>Figura 6.</b> Esquema de siembra y evaluación del crecimiento radial de las colonias. .....	36
<b>Figura 7.</b> Esquema de la ubicación de los discos para prueba de capacidad inhibitoria. ....	38
<b>Figura 8.</b> Esquema de la ubicación de los discos para prueba de propiedades antibióticas (metabolitos volátiles). ....	41
<b>Figura 9.</b> Crecimiento radial diario de aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. en medio de cultivo Agar centeno. ....	43
<b>Figura 10.</b> Crecimiento radial diario de aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. en medio de cultivo Agar jugo V8. ....	44
<b>Figura 11.</b> Crecimiento radial diario de aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. en medio de cultivo Agar zanahoria. ....	45
<b>Figura 12.</b> Crecimiento radial diario del aislamiento PCTU095 de <i>Phytophthora</i> <i>palmivora</i> en tres medios de cultivo (Agar zanahoria, Agar jugo V8, Agar centeno). .....	47
<b>Figura 13.</b> Crecimiento radial diario de <i>P. palmivora</i> en cultivo dual con aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. ....	50
<b>Figura 14.</b> Porcentajes de inhibición de crecimiento radial de <i>P. palmivora</i> en cultivos duales con el antagonista <i>Trichoderma</i> spp. ....	51
<b>Figura 15.</b> Crecimiento en cultivo duales entre el antagonista <i>Trichoderma</i> spp. y el patógeno <i>P. palmivora</i> . ....	52
<b>Figura 16.</b> Peso de micelio de <i>P. palmivora</i> en respuesta a metabolitos no volátiles de <i>Trichoderma</i> spp. ....	56
<b>Figura 17.</b> Porcentaje de inhibición de desarrollo de <i>P. palmivora</i> . Propiedades antibióticas (metabolitos no volátiles). ....	57
<b>Figura 18.</b> Crecimiento radial de <i>P. palmivora</i> en respuesta a metabolitos volátiles de <i>Trichoderma</i> spp. ....	58
<b>Figura 19.</b> Crecimiento en cultivo duales de <i>P. palmivora</i> en respuesta a metabolitos volátiles producidos por <i>Trichoderma</i> spp. ....	59
<b>Figura 20.</b> Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de <i>P. palmivora</i> . Propiedades antibióticas (metabolitos volátiles). ....	60



## ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Análisis de Varianza. Tasa de crecimiento aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. en tres medios de cultivo.....	64
<b>Anexo 2.</b> Prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). Tasa de crecimiento de aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. en tres medios de cultivo.....	64
<b>Anexo 3.</b> Análisis de Varianza. Velocidad de crecimiento aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. en tres medios de cultivo.....	64
<b>Anexo 4.</b> Prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). Crecimiento radial diario aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. en tres medios de cultivo.....	64
<b>Anexo 5.</b> Análisis de Varianza. Crecimiento radial diario de <i>P. palmivora</i> en tres medios de cultivo.....	65
<b>Anexo 6.</b> Prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). Crecimiento radial diario de <i>P. palmivora</i> en tres medios de cultivo.....	66
<b>Anexo 7.</b> Análisis de Varianza. Crecimiento radial de <i>P. palmivora</i> en cultivo dual. .....	66
<b>Anexo 8.</b> Prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). Crecimiento radial de <i>P. palmivora</i> en cultivo dual. ....	66
<b>Anexo 9.</b> Diferencias en los tiempos de siembra entre <i>P. palmivora</i> y aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. ....	67
<b>Anexo 10.</b> Análisis de varianza. Peso de micelio de <i>P. palmivora</i> . Propiedades antibióticas (metabolitos no volátiles).....	67
<b>Anexo 11.</b> Prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). Peso de micelio de <i>P. palmivora</i> . Propiedades antibióticas (metabolitos no volátiles).....	67
<b>Anexo 12.</b> Análisis de varianza. Crecimiento radial de <i>P. palmivora</i> . Propiedades antibióticas (metabolitos volátiles).....	68
<b>Anexo 13.</b> Prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). Crecimiento radial de <i>P. palmivora</i> . Propiedades antibióticas (metabolitos volátiles).....	68
<b>Anexo 14.</b> Resultados de inhibición de <i>P. palmivora</i> para cada uno de los mecanismos de antagonismo de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.....	69

## RESUMEN

En Colombia más de 120 mil hectáreas de palma de aceite han sido afectadas por la Pudrición del cogollo (PC), esta enfermedad ha sido considerada la más importante de la palmicultura colombiana. A pesar de las estrategias de manejo empleadas hasta el momento se hace necesario avanzar en la búsqueda de alternativas de disminución de la enfermedad. Por lo cual se planteó este estudio con el objetivo de evaluar la capacidad antagonica *in – vitro* de aislamientos de *Trichoderma* sp. sobre *Phytophthora palmivora* agente causante de la PC. En total se evaluaron doce aislamientos del antagonista, siete de ellos aislados de diferentes plantaciones de Palma de aceite en Zona Central, dos cepas cedidas por la Universidad Nacional de Medellín y tres cepas comerciales donadas por Bioprotección®. Se determinaron las características de *Trichoderma* como biocontrolador en pruebas de antagonismo, evaluación de velocidad y tasa de crecimiento, competencia por sustrato, interacciones micoparasíticas y propiedades antibióticas por metabolitos de naturaleza volátil o no volátil frente al aislamiento PCTU095 de *P. palmivora*. La tasa de crecimiento fue más alta para el antagonista (15 mm/día) en comparación con la del patógeno (6,8 mm/día). Para evaluar la competencia por sustrato se hizo uso de la escala de Baker & Cook, adicionalmente se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento, se resaltó la capacidad inhibitoria del aislamiento Tr4, las cepas del antagonista alcanzaron la clase II y III en la escala usada. Las interacciones micoparasíticas de *Trichoderma* sp. con *P. palmivora* permitió observar enrollamientos del antagonista, estrangulamientos sobre las hifas y esporulación del patógeno, el aislamiento Tr2 mostró con mayor frecuencia las interacciones. En la evaluación de metabolitos no volátiles el crecimiento de *P. palmivora* fue limitando, los porcentajes de inhibición oscilaron entre 95,4% y 39,3% la mayor actividad antagonica se presentó en los aislamientos Tr3, Tr10 y Tr9. Con relación al efecto antibiótico (metabolitos volátiles) se observó inhibición de crecimiento radial de *P. palmivora*, con porcentajes de 14,7% hasta 22,8% destacando el aislamiento Tr6.

**Palabras clave:** *Phytophthora palmivora*, biocontrol, antagonismo.

## 1. INTRODUCCIÓN

La palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) es una planta de clima cálido, originaria del golfo de Guinea en África occidental (Omoti, 2004). Este cultivo es perenne y su producción puede durar hasta 50 años, sin embargo, su producción máxima se presenta en promedio entre los siete y diez años (Mingorance *et al.*, 2006). La palmicultura ha sido la actividad económica de mayor desarrollo en el país, con un total de 483.734 hectáreas distribuidas en las cuatro zonas palmeras. En la actualidad Colombia ocupa el cuarto lugar a nivel mundial con una producción anual de 1.143.446 toneladas de aceite de palma (Fedepalma - SISPA 2016).

El principal limitante de la producción de palma de aceite en Colombia es la enfermedad Pudrición del cogollo (PC), se encuentra en las cuatro zonas palmeras del país y es causada por *Phytophthora palmivora* (Martínez *et al.*, 2008, Sarria *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2010). Especies de *Phytophthora* ocasionan las enfermedades más importantes de plantas causadas por patógenos del suelo (Drenth & Guest, 2010). Más de 60 especies de este microorganismo son potenciales destructores de plantas en zonas tropicales, afecta cultivos de importancia económica como tomate, papa, cacao, árboles frutales y forestales, algunos herbáceos y hospederos leñosos en el mundo (Erwin & Ribeiro, 1996).

La agresividad de este microorganismo está asociada con la habilidad que tiene de producir estructuras reproductivas como zoosporas y esporangios para su sobrevivencia a corto plazo y su diseminación; mientras que sus oosporas y clamidosporas le permiten su sobrevivencia a largo plazo (Drenth & Sendall, 2001). Adicionalmente, los esporangios pueden ser transportados por el viento, y tienen la capacidad de albergar entre cuatro y 32 zoosporas en condiciones de humedad, que pueden causar múltiples infecciones, además las especies de *Phytophthora* pueden dispersarse en la naturaleza por el aire o transportadas por la actividad de los humanos y algunos invertebrados (Drenth & Sendall, 2001).

Los síntomas de la enfermedad comienzan a manifestarse desde vivero, el síntoma inicial es una necrosis en el costado de la flecha, hasta ocasionar la pudrición del tejido afectado (Noreña *et al.*, 2011). Este síntoma anteriormente era conocido como Pudrición de la flecha, pero posteriormente se identificó que realmente estaba asociado a un síntoma inicial de la Pudrición de cogollo (Martínez & Torres, 2007).

En Colombia, el primer caso documentado de la PC se presentó a principios de la década de 1960 en la plantación La Arenosa ubicada en Turbo, Antioquia devastando la totalidad de las palmas sembradas, posteriormente se desarrolló una epidemia en la Zona Oriental (De Franqueville, 2001). En el año 1985 es detectada la PC en Tumaco (Corrado citado por Drenth *et al.*, 2013), sin embargo, la enfermedad alcanzó características epidémicas a partir del 2007, afectando más de 35000 hectáreas de *Elaeis guineensis*.

A pesar de los registros iniciales de afectación en flechas de palma de aceite en la Zona Central, solo hasta el 2007, se empezaron a tener registros de casos de Pudrición del cogollo, que fueron alcanzando características epidémicas en el municipio de Puerto Wilches en la Zona Central donde entre el 2009 y el 2010 afectó más de 35000 hectáreas. A la fecha en la Zona Central se han registrado más de 40000 hectáreas afectadas por la Pudrición del cogollo.

En la actualidad dentro de las principales medidas de manejo de la enfermedad se encuentran, un correcto manejo agronómico desde la etapa de vivero, el establecimiento y el desarrollo productivo del cultivo. El uso del material híbrido OxG (*Elaeis oleífera* X *Elaeis guineensis*), debido a su tolerancia a la enfermedad. La detección temprana y el manejo oportuno, el cual involucra la remoción de tejidos afectados y la aplicación de productos químicos. Sin embargo, la mayor dificultad es que en muchos casos, estas recomendaciones no se realizan de manera rigurosa y puntual, ocasionando un aumento de las áreas afectadas y favoreciendo la dispersión de la enfermedad. Por lo anterior, y teniendo en cuenta que *P. palmivora* es un habitante natural del suelo, se requiere con urgencia disminuir o regular su población en plantaciones de palma de aceite, buscando alternativas biológicas que

contribuyan en la regulación del patógeno y hagan parte de un manejo ambientalmente sostenible del cultivo de la palma de aceite en Colombia.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La Pudrición del cogollo causada por *Phytophthora palmivora* es el principal limitante de la palmicultura colombiana. A pesar de los esfuerzos de Cenipalma por frenar la enfermedad y de los buenos resultados obtenidos con la implementación del paquete de manejo de la PC desarrollado por Cenipalma, el cual ha mostrado ser efectivo en plantaciones con incidencias inferiores al 10% y donde es aplicado en su totalidad, acompañado de unas buenas prácticas agronómicas. Es necesario realizar estudios encaminados a la evaluación de estrategias de manejo, que involucren una alternativa biológica que permita contrarrestar la severidad del patógeno y que pueda ser incluida dentro de un manejo integrado de la enfermedad. Por lo anterior, se plantea realizar un trabajo tendiente a identificar posibles agentes capaces de contribuir en la regulación biológica de *P. palmivora*. Para esto se planea evaluar a nivel *in vitro* una alternativa de control biológico de tipo fungoso que al final puedan constituirse en una herramienta promisoriosa para la prevención y manejo de la PC en campo.

## **3. JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad la palmicultura se encuentra dentro de uno de los principales renglones agrícolas del país, alcanzando una participación del 6% en la producción agrícola dentro del 42,4% que representa el agro con respecto al producto interno bruto en Colombia (DANE, 2016). Adicionalmente, genera aproximadamente 146000 empleos totales, de los cuales 58000 son directos y 87000 son indirectos en Colombia, convirtiéndose en uno de los principales motores de empleo y desarrollo social de las cuatro regiones palmeras en Colombia (Fedepalma, 2016)

La palmicultura en Colombia se ha visto afectada por la enfermedad Pudrición del cogollo en las últimas tres décadas, alcanzando en total unas 120 mil ha afectadas en estos períodos, lo cual hace de esta enfermedad el principal flagelo para la agroindustria palmera.

A pesar de los esfuerzos en el manejo preventivo de la enfermedad basado en las buenas prácticas agronómicas desde el establecimiento del cultivo, la detección temprana y el manejo oportuno de la PC, hasta el momento la principal herramienta de manejo está en la eliminación de tejidos afectados y el uso de productos químicos, los cuales están siendo usados en plantas afectadas y vecinas (Morales *et al.*, 2009).

Teniendo en cuenta que el uso masivo de fungicidas para el control de enfermedades en producciones agrícolas podría ser una práctica insostenible en los diferentes cultivos generando impactos negativos dentro del agroecosistema (Altieri, 2004). El sector palmicultor ha planteado la necesidad de investigar en mecanismos que generen diferentes estrategias de manejo para la prevención o reducción de enfermedades.

Principalmente, estrategias de control basadas en la conservación, protección de las funciones biológicas, protección de la biodiversidad de los sistemas productivos, manteniendo equilibrio del medio ambiente y de los recursos naturales. Siendo el control biológico de enfermedades una alternativa preventiva económicamente viable y ecológicamente segura en relación a los diversos problemas fitosanitarios presentes en los diferentes sistemas de producción agrícola.

Dentro del grupo de microorganismos que han sido registrados como biocontroladores, se tienen los hongos del género *Trichoderma* que, por sus características de competencia, rápido crecimiento en diferentes sustratos, facilidad de aislamiento y cultivo, capacidad de resistencia y persistencia dentro del ecosistema, además de que han mostrado efectividad en el control preventivo de diferentes patógenos de plantas (Harman, 2000). Siendo éstas, las principales razones por las que en las últimas décadas se ha aumentado la cantidad de estudios encaminados a evaluar su aplicabilidad en diferentes sistemas productivos.

Existen distintas especies de *Trichoderma* que han sido ampliamente calificadas en el control biológico de *Phytophthora* spp. en diferentes hospederos, dentro de este grupo están las especies de importancia agrícola: *P. capsici*, *P. infestans*, *P. sojae*,

*P. cactorum*, *P. parasitica*, *P. ultimum* y *P. palmivora* en cacao (Ezziyanni *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2014; Bae *et al.*, 2016).

Por lo anterior, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar la actividad antagónica *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* sp. sobre *Phytophthora palmivora* agente causante de la Pudrición del cogollo, los cuales podrían constituirse como una alternativa en la regulación biológica de este patógeno en el cultivo de la palma de aceite.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 General

- Evaluar la actividad antagónica de aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora palmivora* agente causante de la Pudrición del cogollo.

### 4.2 Específicos

- Evaluar la capacidad inhibitoria de *Trichoderma* spp. frente al aislamiento PCTU095 de *P. palmivora*.
- Describir las interacciones micoparasíticas de *Trichoderma* spp. sobre *P. palmivora*.
- Evaluar propiedades antibióticas de los aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *P. palmivora*.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 BOTÁNICA DE LA PALMA DE ACEITE

La palma aceitera se clasifica en el Orden Arecales, Familia Arecaceae, género *Elaeis* y Especie *E. guineensis*. Etimológicamente la palabra *Elaeis* viene del griego 'elaion' que significa aceite, y el nombre específico *guineensis* se debe a que se encontró ejemplares de la palma aceitera en la costa de Guinea. Hay dos tipos de *Elaeis* reconocidas, *Elaeis guineensis* (palma africana) y *Elaeis oleífera* (palma americana) siendo *E. guineensis* la más utilizada comercialmente (Corley & Tinker, 2009). Esta especie es nativa de las áreas más húmedas de África tropical, naturalmente se encuentra en márgenes de bosques húmedos y lo largo de los cursos de agua en zonas secas. Mientras que la palma americana *E. oleífera* es originaria de Centroamérica y Suramérica, encontrándose en suelos arcillosos o en las llanuras (Dransfield *et al.*, 2008).

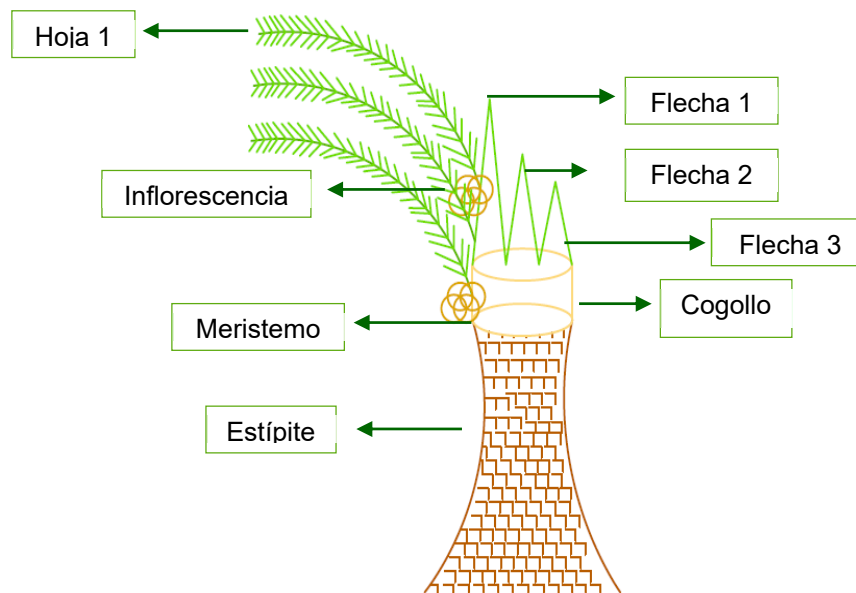
El ciclo de vida de la palma de aceite comienza con el desarrollo del embrión, rompimiento de la dormancia y la germinación de la semilla; posteriormente, los cambios entre cada fase involucran variaciones en tamaño, forma del tallo y de las hojas y, finalmente, en la producción de inflorescencias y frutos.

#### 5.1.1 Morfología de la palma de aceite

Las características principales de la morfología de la palma de aceite están dadas a un solo punto de crecimiento (meristemo apical) lugar donde se origina una sucesión continua de yemas foliares un único tallo de tipo pleonántico, lo que significa que las inflorescencias aparecen en las axilas de las hojas produciéndose a medida que la planta continua su desarrollo vegetativo (Adam *et al.*, 2005; Dransfield & Uhl, 1998). El estípote es erecto y en él permanecen las bases peciolares de las hojas hasta la etapa adulta (Dransfield *et al.*, 2008).



El “cogollo”, “corazón de la palma”; definida por Torres *et al.*, 2014 es el área de la palma comprendida entre la zona superior del área meristemática y la zona de las flechas, en las cuales éstas empiezan su contacto con el exterior (Figura 1), y se caracteriza por el inicio de la pigmentación verdosa. Los tejidos del cogollo son tiernos y carecen de actividad fotosintética.



**Figura 1.** Morfología de la palma de aceite.

Esta especie produce tanto inflorescencias femeninas como masculinas en la misma planta, dependiendo de las condiciones genéticas y ambientales. El desarrollo inicial de una inflorescencia puede tomar de dos a tres años tiempo en el cual esta se encuentra totalmente cubierta por las hojas (Corley & Tinker, 2009).

La antesis de la inflorescencia femenina ocurre en las hojas 17 – 20 y el desarrollo del racimo puede llegar a tardarse 4,5 a 6 meses. El racimo maduro puede llegar a medir más de 50 cm de largo y 35 cm de ancho. El fruto es de una drupa sésil con forma esférica, ovoide y elongada. El pericarpio está formado por exocarpio, mesocarpio, y endocarpio, el ultimo rodea la almendra. La apariencia externa del fruto varia en relación a su desarrollo, siendo la coloración más típica violeta oscuro en el ápice y verde – amarillo en la base antes de la maduración. De acuerdo al

grosor del cuesco se puede clasificar en dura (grueso), tenera (delgado) y pisífera (sin cuesco) (Corley & Tinker ,2009).

## **5.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA PALMA DE ACEITE EN COLOMBIA**

La producción de palma de aceite ocupa un puesto importante en la economía colombiana, de manera que el área sembrada ha aumentado rápidamente durante los últimos años. Actualmente hay sembradas 483734 hectáreas distribuidas en las cuatro zonas palmeras del país (Fedepalma – SISPA, 2016).

La palma de aceite *Elaeis sp.* es la única especie de la que se pueden extraer dos tipos de aceite con características químicas diferentes: el aceite de palma que resulta de los procesos de extracción en el mesocarpio o pulpa del fruto y el aceite de palmiste que proviene de la almendra de la palma. Los dos aceites están separados por el cuesco de las almendras. Estos aceites o grasas pueden ser separados en sus fracciones sólida y líquida, conocidas como estearinas y oleínas respectivamente (Cala & Bernal, 2008).

El rendimiento en la extracción de aceite es el factor más importante de la agroindustria de la palma, el cual depende tanto de la tasa de extracción de aceite (TEA) en la planta como la producción de racimos de fruta fresca (RFF) (Prada & Romero, 2012). El aceite de palma se utiliza actualmente en un alto porcentaje para productos alimenticios debido al aumento en su calidad y disponibilidad en los últimos cincuenta años, además, ha llegado a ser un producto diverso a medida que la refinación, fraccionamiento e hidrogenación se utilizan con mayor amplitud (Corley & Tinker, 2009).

## **5.3 PUDRICIÓN DEL COGOLLO**

La Pudrición del cogollo es la principal enfermedad de la palma de aceite en Colombia, asociado a esta enfermedad ha sido registrado *Phytophthora palmivora* como agente causante (Martínez *et al.*, 2008, Sarria *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2010), a la fecha se han registrado más de 40000 hectáreas afectadas por la Pudrición del cogollo en la Zona Central.

La enfermedad inicia como resultado de la infección de los tejidos inmaduros de las flechas y las lesiones producidas por el patógeno que se hace visible tres o cuatro días más tarde como pequeñas lesiones necróticas sobre los costados de la flecha más joven en la medida en que esta crece (Martínez, 2010). Si las condiciones son apropiadas para una nueva infección, particularmente la presencia de lluvias, nuevas y nuevas infecciones van teniendo lugar y la severidad de la enfermedad se incrementa en la medida en que se presentan más lesiones que, finalmente, destruyen las nuevas flechas, que son infectadas por contacto entre los tejidos infectados y los sanos, en el corazón de la palma (Ariza *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Lesión inicial necrosis al costado de la flecha. (Sarria *et al.*, 2015).

Los tejidos afectados son posteriormente colonizados por hongos y bacterias que continúan el proceso de pudrición y eventualmente destruyen todos los nuevos tejidos, conduciendo finalmente a la Pudrición del cogollo (Vélez *et al.*, 2008).

El manejo de la Pudrición del cogollo se inicia con la identificación temprana de los síntomas de la enfermedad mediante la escala de severidad desarrollada por Cenipalma (Martínez & Torres, 2007), seguido por la eliminación inmediata del tejido afectado, el tratamiento de la planta afectada y de las vecinas con fungicidas, bactericidas e insecticidas, el mejoramiento del drenaje y los programas de nutrición en las parcelas (Aya & Martínez, 2011; Arias *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2010; Morales *et al.*, 2009). Dentro de las 24 horas posteriores al diagnóstico, el tejido enfermo se debe eliminar mediante cirugía, con especial cuidado en asegurarse de que todo el tejido afectado haya sido retirado, siguiendo el procedimiento descrito

por (Arias *et al.*, 2010). Después de la cirugía, la herida se desinfecta con un flameo con calor de aproximadamente 3 segundos, posteriormente, debe ser protegida mediante la aplicación de una mezcla fungicida – bactericida - insecticida. Tres días después se realiza una revisión para ver la evolución de la cirugía. Luego semanalmente son monitoreadas con el fin de verificar el estado sanitario de las nuevas emisiones del tejido, y en el caso de que alguna esté enferma, realizar una segunda intervención de manera oportuna. Adicionalmente, las palmas vecinas a la enferma son tratadas con fungicidas de manera preventiva. Una vez que se observan seis hojas nuevas sanas, el programa finaliza (Martínez *et al.*, 2009a; 2009b). Las palmas que no se recuperan del tratamiento deben ser eliminadas (Arias *et al.*,2010).

Aunque este paquete de manejo de la PC, desarrollado por Cenipalma ha mostrado ser eficaz en plantaciones con incidencias bajas (inferiores al 10%), donde es realizado de manera óptima y completa, es necesario continuar con las investigaciones e identificar otros posibles mecanismos de manejo preventivo.

### **5.3.1 AGENTE CAUSANTE**

Especies de *Phytophthora* ocasionan algunas de las enfermedades más importantes de plantas causadas por patógenos del suelo. Más de 60 especies de este microorganismo son potenciales destructores de plantas en zonas tropicales, lo que afecta cultivos de importancia económica como tomate, papa, cacao, árboles frutales y forestales, algunos herbáceos a huéspedes leñosos (Drenth & Guest, 2004; Erwin & Ribeiro, 1996). Dentro de las principales enfermedades que han sido asociadas a este género se tienen la pudrición negra de los frutos de cacao, pudrición en raíces, tallos y frutos en papaya, pudrición de tallos y raíces en cítricos, pudrición del cogollo en palma de aceite, el rayado negro en caucho (Drenth & Sendall, 2001).

A partir del año 2008, se encontró que el responsable de la Pudrición del cogollo de la palma de aceite era *Phytophthora palmivora*. Este patógeno se encuentra en la siguiente clasificación taxonómica (Thines, 2014):

Súper reino:	<i>Eucaryota</i>
Reino:	<i>Cromista</i>
Subreino:	<i>Chromobiota</i>
Infrareino:	<i>Heterokonta</i>
División:	<i>Oomycota</i>
Clase:	<i>Eumicetes</i>
Orden:	<i>Peronosporales</i>
Familia:	<i>Peronosporaceae</i>
Género:	<i>Phytophthora</i>
Nombre científico:	<i>Phytophthora palmivora</i>

### **5.3.1.1 Características de *Phytophthora palmivora***

*Phytophthora palmivora* se caracteriza por presentar micelio cenocítico (sin septas), ramificado de color blanco, delgado, crecimiento deprimido y consistencia acuosa. El diámetro del micelio se encuentra en 5 - 8  $\mu\text{m}$ , siendo este valor variable y dependiente de las condiciones naturales o químicas de medio de cultivo (Figura 3a).

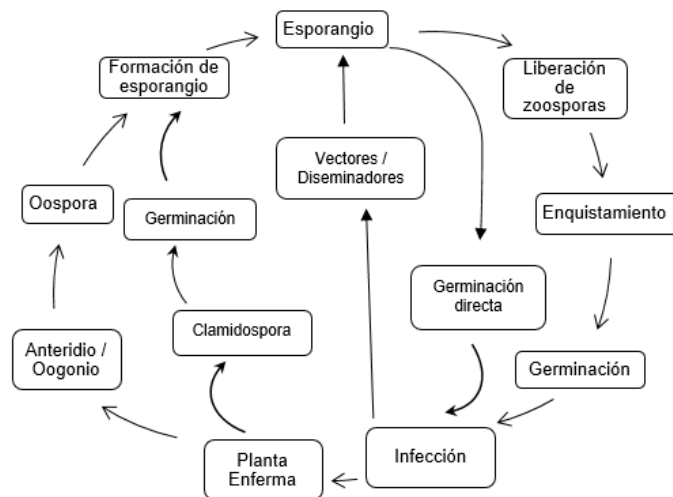
Los esporangios de *P. palmivora* presentan diferentes formas predominan las ovoides, esféricas y elipsoides; son caducos, papilados y de pedicelo corto; con un diámetro entre 50 y 25  $\mu\text{m}$  de ancho y aproximadamente 62,5  $\mu\text{m}$  de largo. (Erwin & Ribeiro, 1996; Gallegly & Hong, 2008) (Figura 3b). Presentan dos tipos de germinación descrita por Ribeiro (1983), la primera, germinación directa con el desarrollo de un tubo germinativo seguida la formación de micelio. La segunda, germinación indirecta, con diferenciación de citoplasmas en el esporangio dando origen a zoosporas, de gran motilidad.

El género *Phytophthora* produce clamidosporas, las cuales son el órgano de conservación y supervivencia del microorganismo. Generalmente, estas son de forma redondeada con una pared definida de más 2  $\mu\text{m}$  de espesor, son normalmente intercalares, pero se pueden encontrar en el punto terminal de la hifa. Inicialmente estas son hialinas, tornándose a un color amarillo (Figura 3c) (Stamps, 1998).



**Figura 3.** Estructuras de *Phytophthora palmivora*. a. Hifas. b. Esporangios. c. Clamidospora.

*P. palmivora* tiene un alto potencial de dispersión debido a sus múltiples generaciones al año. Siendo su característica más relevante la formación de esporangios y cantidades abundantes de zoosporas sobre tejidos enfermos. Su diseminación es fácil y rápida debido a que los esporangios son caducos, se desprenden y dispersan fácilmente, diseminados por el agua lluvia, el viento y otros vectores (Drenth & Sendall, 2001) (Figura 4).



**Figura 4.** Ciclo de vida *Phytophthora palmivora* (Martínez, 2009).

## 5.4 CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico es una práctica agrícola, definida como la reducción del inóculo o de la actividad de un patógeno a través de la acción natural de otros microorganismos mediante el manejo del ambiente, hospedero, antagonistas, o por la introducción masiva al ecosistema de microorganismos con características antagonistas (Tovar, 2008), integrando un conocimiento completo del agroecosistema de cultivo, epidemiología, ecología y dinámica de poblaciones y a su vez la interacción de todas las variables (Adams ,1990; Deacon ,1991). Está basado en la utilización de los diferentes procesos ecológicos del ecosistema y radicando su importancia en la conservación del medio ambiente (Nighann & Mukerji, 1988); llegar a controlar por medio de agentes biológicos, constituye un punto importante dentro de la sostenibilidad del sistema productivo (Miranda *et al.*, 1996).

De acuerdo con Martínez (citado por Cholango 2009), los factores de importancia en el momento de elegir un buen controlador biológico son:

- Elevado grado de reproducción para proliferar, superior a la velocidad de reproducción del patógeno.
- Alta capacidad de operación efectiva contra el patógeno, es decir, sin interferir con miembros de su misma especie.
- Debe actuar en las diferentes condiciones ambientales en las cuales se piensa liberar.
- Baja sensibilidad a la competencia con otros enemigos naturales del patógeno que puedan ser liberados o que estén presentes de forma natural en el ecosistema.

El control biológico microbiano ha crecido en los últimos años, conociéndose más de 1.500 especies de microorganismos que incluyen hongos, bacterias y virus. Los géneros de microorganismos de naturaleza fúngica de más amplio uso en la agricultura actual sobresalen *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Pochonia*, *Purpureocillium*,

*Metharhizium*, *Bacillus* y *Trichoderma* spp. siendo los más destacados *T. harzianum*, *T. viride*, *T. virens*, *T. pseudokoningii* (Claro, 2006).

### **5.5 *Trichoderma* spp.**

*Trichoderma* spp. es un habitante natural del suelo, es un hongo de tipo anaerobio facultativo, caracterizado por un comportamiento saprofito o parasito, características que benefician su capacidad antagónica (Camargo, 2005).

Las características generales de *Trichoderma* sp. en su acción antagónica están relacionadas con su estabilidad genética, capacidad de utilizar diferentes fuentes de nutrición, supervivencia en condiciones adversas del ambiente, efectividad en el control de una amplia gama de patógenos, factibilidad ecológica, resistencia a fungicidas y compatibilidad con otras estrategias de control (Benítez *et al.*, 2004).

Adicionalmente, el género *Trichoderma* se caracteriza por no poseer un estado sexual determinado. Son haploides y su pared celular está compuesta por quitina y glucanos. Se les reconoce fácilmente por su rápido crecimiento. Las colonias en medio de cultivo son de rápido crecimiento, algodonosas, de tonalidad blanco – verde (Humeres, 2004).

#### **5.5.1 Taxonomía y morfología de *Trichoderma* sp.**

*Trichoderma* sp. actualmente se encuentra en la siguiente clasificación taxonómica (Jaklitsch & Voglmayr, 2014):

Reino:	<i>Fungi</i>
División:	<i>Eumycota</i>
Subdivisión:	<i>Ascomycotina</i>
Clase:	<i>Euascomycetes</i>
Orden:	<i>Hypocreales</i>
Familia:	<i>Hypocraceae</i>
Género:	<i>Trichoderma</i>
Especie:	<i>Trichoderma</i> sp.

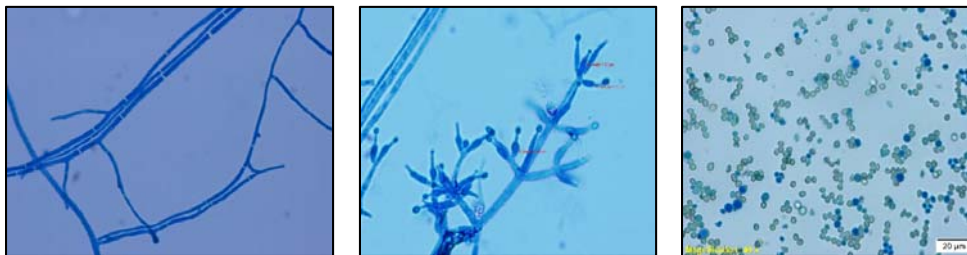


### 5.5.1.1 Características macroscópicas.

Las colonias de *Trichoderma* son de rápido crecimiento, inicialmente el micelio es sumergido, algodonoso y no presenta color dependiendo de la cepa y el medio de cultivo, puede llegar a presentar en su desarrollo varios tonos marrones, amarillos, rojizo o verde; la esporulación se presenta de forma plana o abultada formando pústulas compactas, de color blanco hasta el color verde (Gams & Bisett, 1998).

### 5.5.1.2 Características microscópicas

El género *Trichoderma* en general se caracteriza por presentar hifas septadas (Figura 5a), conidióforos hialinos erectos o arrastrados altamente ramificados, fiálides (Figura 5b), conidias (Figura 5c) y clamidosporas (Figura 5).



**Figura 5.** Estructuras de *Trichoderma* spp. a. Hifas septadas. b. Fiálides. c. Conidias.

**Hifas:** Las hifas pueden ser delgadas y flexibles, dependiendo de la especie pueden ser rugosas; hialinas (sin color), septadas y ramificadas, donde se desarrollan los conidióforos (Samson *et al.*, 2004), suelen ser de un ancho aproximado de 5 – 10 µm (Harman, 2001).

**Conidióforos:** Presenta conidióforos altamente ramificados, tienen forma piramidal o cónica. El conidióforo es el lugar donde se forman las fiálides. Su tamaño oscila entre 18 – 25 µm (Samson *et al.*, 2004).

**Fiálides:** Las células fiálides esporíferas son producidas individualmente, por parejas o ya sea por grupos, son hialinas, pueden presentarse de forma ovalada o en forma de frasco unidas al conidióforo (Cobos, 2011; Humeres, 2004), sus dimensiones son de aproximadamente 5-15 µm de altura por 3-4 µm de ancho,

surgen alternadamente o en pares y con frecuencia forman un ángulo recto con respecto al conidióforo (Warham *et al.*, 1997). A partir de las fiálides se desprenden las conidias (Samson *et al.*, 2004).

**Conidias (espora):** Las conidias son las estructuras viables del microorganismo usado en control biológico, se caracterizan por poseer una pared gruesa exterior, está constituida por tres capas (endospora, epispora y perispora) que tienen la función de proteger la parte más interna de la espora (protoplasto). La pared celular de la espora le permite que sobreviva a condiciones adversas, manteniéndola en estado de dominancia hasta el momento que las condiciones sean propicias para la germinación. Las conidias son las semillas que usa el hongo para sobrevivir en los diferentes medios y es la principal forma de comercialización de *Trichoderma sp.* (Elad *et al.*, 1993), Pueden presentar diferentes formas desde globosas, subglobosas, elipsoides y ovoides (Gams & Bisett, 1998). Las conidias tienen de diámetro aproximadamente 3µm (Cobos, 2011; Humeres, 2004). La superficie de las conidias es lisa en la mayoría de las especies, algunas pueden llegar a presentar superficies rugosas, ásperas y con estructuras adicionales. La tonalidad puede variar desde cuerpos verdes hasta café, en colonias maduras suelen ser de color verde y otras pueden ser pálidas (Gams & Bisett, 1998).

**Clamidosporas:** Comúnmente forma clamidosporas, intercaladas o poco común terminales (Humeres, 2004). Tienden a ser en forma de globo o de elipse, son de color amarillo alcanzando tonalidades de verde, su diámetro es de 6 – 15 µm en la mayoría de las especies (Gams & Bisett, 1998).

### **5.6 Condiciones de Crecimiento de *Trichoderma sp.***

Es un microorganismo que habita en un número importante de suelos agrícolas en diferentes zonas de vida, su desarrollo es óptimo en temperaturas que oscilan entre 20°C y 28°C; dentro de un rango de pH de 2,5 a 9,5, prefiriendo de un pH neutro a ácido de 5,5; su resistencia a inhibidores microbianos le permite colonizar casi todos los tipos de suelo (Benítez & González, 2003).

Los factores físicos, ambientales y nutricionales que afectan el crecimiento de *Trichoderma* son:

**Fototofria:** La mayoría de especies del genero *Trichoderma* son fotosensibles, debido a que presentan una mayor esporulación cuando son expuestos a la luz. Sin embargo, la colonización de diferentes sustratos sólidos es favorecida cuando se someten a periodos alternados de luz y oscuridad (Domsch *et al.*, 2007).

**Esporulación:** *Trichoderma* esporula fácilmente en diferentes sustratos naturales y artificiales en respuesta a la alteración de luz u oscuridad. La exposición de la colonia a la luz durante 20 – 30 segundos induce a la conidiogénesis (Astudillo *et al.*, 1999).

**Humedad:** La humedad optima que favorece el crecimiento del hongo esta alrededor del 70 – 80% (Wakelin *et al.*, 1999).

**Requisitos nutricionales:** Este género es capaz de degradar sustratos muy complejos, como el almidón, pectina, celulosa, entre otros; empleándolos en su desarrollo gracias al complejo enzimático que posee (enzimas hidrolíticas como amilasas, pectinasas y celulosas); *Trichoderma* asimila diferentes elementos y compuestos como fuente nutricional, en este grupo se encuentra el nitrogeno, amoniaco, nitritos y diferentes aminoácidos. (Moore, 1996).

### **5.7 Características como controlador biológico**

Especies del genero *Trichoderma* presentan capacidades para interactuar simbiótica y parasíticamente con diferentes microorganismos, además *Trichoderma* puede utilizar una amplia variedad de fuentes de nutrientes; son uno de los microorganismos más resistentes a las toxinas y productos químicos naturales y artificiales (hidrocarburos, polisacáridos, plaguicidas y fungicidas), siendo capaces de degradar de forma eficaz la mayoría de ellos (Harman & Kubicek, 1998).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* son invasores oportunistas, de crecimiento rápido, alta esporulación y capaces de producir potentes antibióticos, características que hacen que estos hongos sean de importancia ecológica, a su

vez se han encontrado en la mayoría de los ecosistemas en praderas nativas, suelos agrícolas, zonas de bosque, desierto en pantano, en aguas, material vegetal, en raíces de plantas y semillas (Monte, 2001).

En la agricultura, *Trichoderma* es ampliamente utilizado como biocontrolador, bioprotector, biofertilizante y bioestimulante en una amplia variedad de sistemas productivos, debido a que este microorganismo secreta diferentes enzimas capaces de inhibir el desarrollo de fitopatógenos, además de estimular el crecimiento en las plantas, e inducir a la resistencia de las plantas a las enfermedades (Harman & Kubicek, 1998).

*Trichoderma* cuenta con diferentes enzimas (quitinasas, glucanasas, peroxidasas y fitoalexinas) (Yedidia *et al.*, 1999; Yedidia *et al.*, 2000), relacionadas con el control de patógenos que son atribuidas en los cambios estructurales a nivel celular tales como la desintegración del citoplasma y lisis celular (Papavizas, citado por Agamez *et al.*, 2008), además con la inducción de resistencia sistémica en las plantas, siendo este el mecanismo por el cual este microorganismo protege las plantas (Benítez, 2004; Harman *et al.*, 2004).

El modo de acción de especies del género *Trichoderma* sp. como controlador biológico está dada por el uso de diferentes mecanismos, acentuándose entre éstos la competencia por el espacio y nutrientes, el micoparasitismo directo, la producción de compuestos inhibidores ya sean de naturaleza volátil o no volátil, la inactivación de enzimas del patógeno y la inducción a resistencia biológica (Harman *et al.*, 2004).

### **5.7.1 Micoparasitismo.**

Se define como una interacción antagónica entre microorganismos, en este proceso se encuentran involucradas enzimas tales como quitinasas y celulasas capaces de degradar la composición y estructura de las paredes celulares de algunos microorganismos (Díaz, 1994).

*Trichoderma* sp. durante el proceso de micoparasitismo van creciendo hacia el hospedante, adhiriéndose a las hifas del mismo, enrollándose a ellas, penetrándolas

en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso de parasitismo, lo que conlleva al debilitamiento casi total del patógeno (Carsolio *et al.*, 1999).

Las interacciones micoparasíticas de *Trichoderma* se describen como un proceso complejo que para su estudio se ha separado en cuatro etapas, el desarrollo de cada una de las etapas depende de los microorganismos involucrados (antagonista y patógeno) y de las condiciones ambientales. Las etapas de acuerdo a Chet & Benhamou ,1998; son las siguientes:

- **Crecimiento quimiotrófico:** Es el crecimiento directo de las hifas *Trichoderma* en dirección al patógeno como respuesta a un estímulo químico.
- **Reconocimiento:** El reconocimiento del antagonista y el hospedante se realiza a través de interacciones lectinas – carbohidratos, las lectinas son proteína enlazadas a azúcares las cuales juntan células y están involucradas en las interacciones entre los componentes de la superficie de las células y su ambiente extracelular.
- **Adhesión y enrollamiento:** Cuando la respuesta de reconocimiento es positiva, las hifas de *Trichoderma* se adhieren al hospedante, enrollándose alrededor de las hifas del último, lo anterior está mediado por procesos enzimáticos.
- **Actividad lítica:** Esta etapa está asociada a la producción de enzimas líticas extracelulares principalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, capaces de degradar las paredes celulares del hospedante, posibilitando la penetración de las hifas del antagonista.

### 5.7.2 Competencia

Esta definida por el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requisito (espacio, sustrato, nutrientes), con la particularidad de que uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás (Ahmad & Baker, 1987).

*Trichoderma* sp. se caracteriza por su plasticidad ecológica y habilidad como competidor por espacio, sustrato y nutrientes (Samuels, 1996); esta biológicamente

adaptado para colonizar sustratos y en condiciones adversas sobrevivir, debido a su alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la colonización de una amplia gama de sustratos (Hjeljord & Tronsmo, 1998).

### **5.7.3 Antibiosis**

Se define como la inhibición o destrucción de un organismo por la producción metabólica de otro, incluyendo enzimas hidrolíticas, metabolitos secundarios volátiles y moléculas tóxicas (Benhamou & Chet, 1997). La antibiosis ocurre durante la producción de metabolitos volátiles o no volátiles de bajo peso molecular que impiden la colonización de los microorganismos antagonizados (Tovar, 2008). Entre estos metabolitos se encuentran el ácido harzianico, alameticinas, tricholinas, antibióticos, peptaiboles 6-pentil- $\alpha$ -pirona, ácido heptédico, massoilactona, viridina, gliovirina, glisoperonas (Howell, 1998).

### **5.8 *Trichoderma* como control biológico del género *Phytophthora***

Las especies del género *Trichoderma* sp. son efectivas como agentes de control biológico en especies de *Phytophthora* como *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora parasítica* y *Phytophthora ultimum*.

*Trichoderma* sp. como controlador biológico de *Phytophthora palmivora* actúa por medio del parasitismo, parasitando la hifa mediante enrollamientos y cuerpos del apresorio penetrando la pared celular del patógeno por la acción de diferentes enzimas (Harman *et al.*, 2004; Arnold *et al.*, 2003; Bailey *et al.*, 2006). A su vez se ha demostrado que *Trichoderma* sp. produce metabolitos antibióticos volátiles o no volátiles que inhiben el desarrollo de *P. palmivora* (Sid Ahmed *et al.*, 2000).

Del mecanismo de *Trichoderma* en la planta se tiene:

- Colonización del suelo en la rizosfera ayudando a la planta en su proceso de nutrición, y a la transformación de nutrientes disponibles en el suelo para la planta.
- Brinda una protección de alta duración debido a que su crecimiento se da con las raíces durante todo el ciclo de vida de las plantas.

- Protege a la planta de un alto espectro de patógenos y plagas, como por ejemplo de bacterias, hongos e insectos.
- Ayuda a la formación del sistema radicular debido a que las raíces se desarrollan más rápido y son raíces más grandes.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

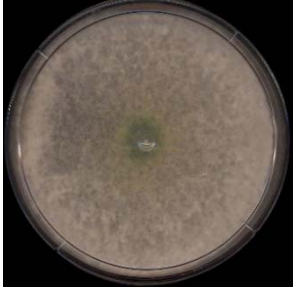
### 6.1 Localización.

El proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Fitopatología de Cenipalma en el campo experimental Palmar de la Vizcaína en la Zona Central, ubicado en la vereda Peroles, del municipio de Barrancabermeja, Santander a una latitud de 6°58'57'' N, una longitud de 73°4'43''O y 110 msnm, en el kilómetro 132 sobre la troncal del Magdalena Medio en la vía Lizama - Puerto Araujo. Cuenta con una temperatura promedio de 28°C, precipitación anual de 2860 mm y un rango de humedad relativa de 72 - 77%, condiciones agroecológicas correspondientes a la zona de vida bosque húmedo tropical.

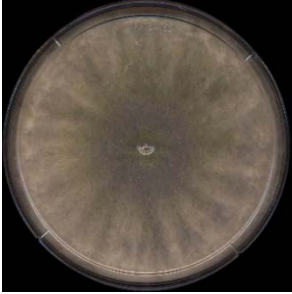
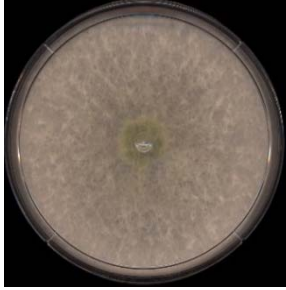

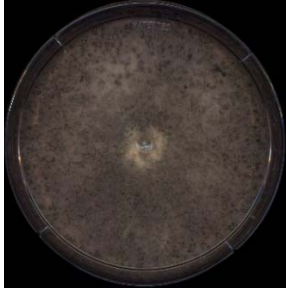
### 6.2 Aislamientos de *Trichoderma* spp.

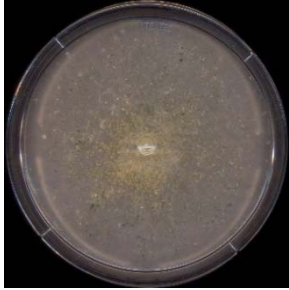
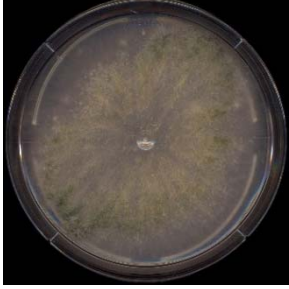
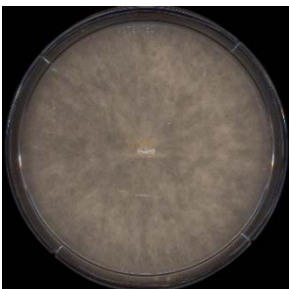
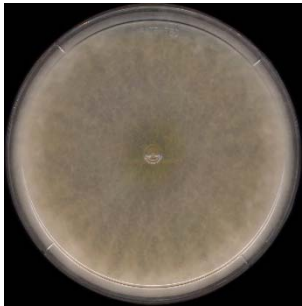
En total se evaluaron doce aislamientos del género *Trichoderma*, siete de ellos aislados de diferentes áreas de palma de aceite de la Zona Central (Tr1, Tr4, Tr5, Tr9, Tr10, Tr11, Tr12), dos cepas donadas por la Dra. Lilliana Hoyos de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (Tr2, Tr3), y tres cepas comerciales (Tr6, Tr7, Tr8), cedidas por la empresa Bioprotección®.

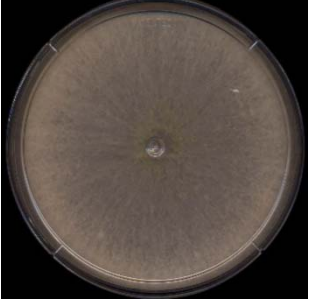
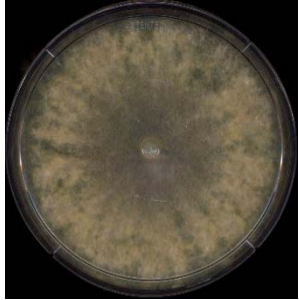
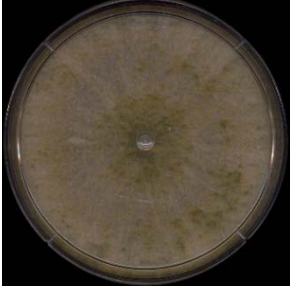
**Tabla 1.** Procedencia de aislamientos de *Trichoderma* spp.

Código	Procedencia	Características Macroscópicas
Tr1	<i>Trichoderma</i> aislado del Campo Experimental Palmar de la Vizcaína ubicado en la vereda Peroles, del municipio de Barrancabermeja, Santander.	



<p><b>Tr2</b></p>	<p><i>Trichoderma asperelloides</i> donado por la Universidad Nacional de Colombia , Sede Medellín</p>	
<p><b>Tr3</b></p>	<p><i>Trichoderma asperelloides</i> donado por la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.</p>	
<p><b>Tr4</b></p>	<p><i>Trichoderma</i> aislado de Palmas de Monterrey del municipio de Puerto Wilches, Santander.</p>	
<p><b>Tr5</b></p>	<p><i>Trichoderma</i> aislado del Campo Experimental Palmar de la Vizcaína ubicado en la vereda Peroles, del municipio de Barrancabermeja, Santander.</p>	

<p><b>Tr6</b></p>	<p><i>Trichoderma harzianum</i> - cepa comercial donada por Bioprotección®.</p>	
<p><b>Tr7</b></p>	<p><i>Trichoderma harzianum</i> - cepa comercial donada por Bioprotección®.</p>	
<p><b>Tr8</b></p>	<p><i>Trichoderma</i> spp. - cepa comercial donada por Bioprotección®.</p>	
<p><b>Tr9</b></p>	<p><i>Trichoderma</i> aislado de la plantación Pravia S.A, ubicada en el corregimiento Papayal, municipio de Rionegro, Santander.</p>	

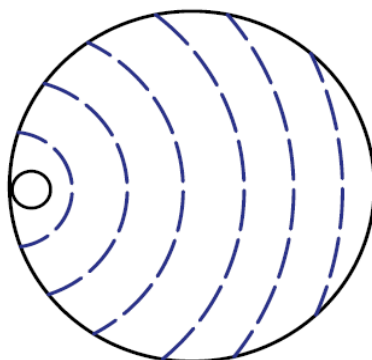
<p><b>Tr10</b></p>	<p><i>Trichoderma</i> aislado de Indupalma S.A, plantación ubicada en el municipio de San Alberto, Cesar.</p>	
<p><b>Tr11</b></p>	<p><i>Trichoderma</i> aislado del Campo Experimental Palmar de la Vizcaína ubicado en la vereda Peroles, del municipio de Barrancabermeja, Santander.</p>	
<p><b>Tr12</b></p>	<p><i>Trichoderma</i> aislado del Campo Experimental Palmar de la Vizcaína ubicado en la vereda Peroles, del municipio de Barrancabermeja, Santander.</p>	

### 6.3 Evaluación de la actividad antagónica de *Trichoderma*

#### 6.3.1 Velocidad de crecimiento de *P. palmivora* y *Trichoderma* spp.

En este trabajo se utilizó el aislamiento PCTU095 de *P. palmivora* aislado de plantas afectadas con la Pudrición del cogollo y doce aislamientos de *Trichoderma* sp. los cuales fueron sembrados en tres medios de cultivo Agar zanahoria AZ (120 g de zanahoria + 16 g de agar/l de agua), Agar jugo V8 AV8 (80 ml de jugo V8 + 16 g de agar/l de agua y Agar centeno AC (60 g de centeno, 16 g de agar y 20 g de sacarosa /l de agua) empleados para el crecimiento de *P. palmivora*. En ambos casos para

realizar la siembra se emplearon cultivos de 7 días de crecimiento a partir de los cuales se tomaron discos de 5mm de diámetro del borde de la colonia; cada disco se ubicó en el borde de la caja Petri, a partir de la cual se realizaron mediciones diarias del crecimiento radial (Figura 2).



**Figura 6.** Esquema de siembra y evaluación del crecimiento radial de las colonias.

Una vez sembradas las cajas Petri fueron mantenidas en condiciones de laboratorio entre 26-28°C. Se usó un diseño completamente al azar, con 39 tratamientos, 6 repeticiones, la unidad muestral en este caso estuvo compuesta por cada caja Petri con medio de cultivo (Agar zanahoria, agar jugo V8, agar centeno) con el disco de crecimiento, la variable de respuesta fue el crecimiento radial.

**Tabla 2.** Descripción de los tratamientos para evaluar la velocidad de crecimiento.

Tratamiento	Descripción
1	AZ + <i>P. palmivora</i>
2	AZ + <i>Trichoderma</i> sp. 1
3	AZ + <i>Trichoderma</i> sp. 2
4	AZ + <i>Trichoderma</i> sp. 3
5	AZ + <i>Trichoderma</i> sp. 4
6	AZ + <i>Trichoderma</i> sp. 5
7	AZ + <i>Trichoderma</i> sp. 6
8	AZ + <i>Trichoderma</i> sp. 7
9	AZ + <i>Trichoderma</i> sp. 8
10	AZ + <i>Trichoderma</i> sp. 9
11	AZ + <i>Trichoderma</i> sp. 10
12	AZ + <i>Trichoderma</i> sp. 11
13	AZ + <i>Trichoderma</i> sp. 12
14	AV8 + <i>P. palmivora</i>
15	AV8 + <i>Trichoderma</i> sp. 1

16	AV8 + <i>Trichoderma</i> sp. 2
17	AV8 + <i>Trichoderma</i> sp. 3
18	AV8 + <i>Trichoderma</i> sp. 4
19	AV8 + <i>Trichoderma</i> sp. 5
20	AV8 + <i>Trichoderma</i> sp. 6
21	AV8 + <i>Trichoderma</i> sp. 7
22	AV8 + <i>Trichoderma</i> sp. 8
23	AV8 + <i>Trichoderma</i> sp. 9
24	AV8 + <i>Trichoderma</i> sp. 10
25	AV8 + <i>Trichoderma</i> sp. 11
26	AV8 + <i>Trichoderma</i> sp. 12
27	AC + <i>P. palmivora</i>
28	AC + <i>Trichoderma</i> sp. 1
29	AC + <i>Trichoderma</i> sp. 2
30	AC + <i>Trichoderma</i> sp. 3
31	AC + <i>Trichoderma</i> sp. 4
32	AC + <i>Trichoderma</i> sp. 5
33	AC + <i>Trichoderma</i> sp. 6
34	AC + <i>Trichoderma</i> sp. 7
35	AC + <i>Trichoderma</i> sp. 8
36	AC + <i>Trichoderma</i> sp. 9
37	AC + <i>Trichoderma</i> sp. 10
38	AC + <i>Trichoderma</i> sp. 11
39	AC + <i>Trichoderma</i> sp. 12

El cálculo para hallar la tasa de crecimiento de los tratamientos evaluados, se realizó teniendo como referencia el crecimiento (radio) y el tiempo de colonización del medio de cultivo en la caja Petri de los aislamientos del antagonista y del patógeno; mediante la siguiente fórmula:

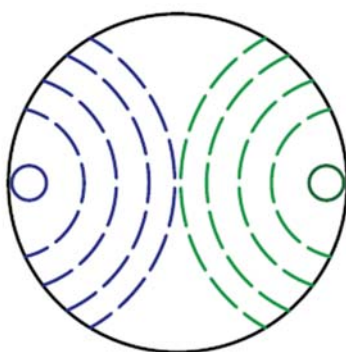
$$\text{Tasa de Crecimiento} = (\text{Radio Final} - \text{Radio Inicial}) / (\text{Tiempo de colonización} - \text{Tiempo Inicial})$$

### **Análisis estadístico**

Los datos de crecimiento radial diario de los aislamientos de *Trichoderma* spp. y del aislamiento PCTU095 de *P. palmivora* se sometieron a un análisis de varianza ANOVA y la comparación entre los tratamientos mediante la prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).

### 6.3.2 Capacidad inhibitoria de *Trichoderma* spp. frente a *P. palmivora* agente causante de la PC.

Con los resultados obtenidos de la prueba previa de velocidad de crecimiento tanto para *P. palmivora* como para *Trichoderma* spp. en los tres medios de cultivo evaluados. Se procedió a evaluar la capacidad inhibitoria *in vitro* de *Trichoderma* sp. sobre *P. palmivora*, la cual se realizó, colocando en cada caja Petri un disco de crecimiento de 5mm del aislamiento *P. palmivora* en un extremo y en el otro extremo se colocó un disco de *Trichoderma* spp. (Cultivo dual – Figura 3); el tiempo de diferencia en la siembra de cada una de las cepas de *Trichoderma* evaluadas, respecto de la siembra de *P. palmivora*, dependió de las diferencias obtenidas en la prueba de velocidad de crecimiento.



**Figura 7.** Esquema de la ubicación de los discos para prueba de capacidad inhibitoria.

Una vez sembrados los cultivos duales, las cajas Petri fueron mantenidas en condiciones de laboratorio entre 26-28°C, y se realizaron mediciones diarias del crecimiento radial durante un periodo 5 a 7 días, utilizando la escala de medición para el análisis de Baker y Cook (citada por Cholango, 2009) (Tabla 2), con el fin de evaluar la competencia por sustrato.

**Tabla 3.** Escala de clases de Baker y Cook.

Clase 1	<i>Trichoderma</i> sp. crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio de cultivo
Clase 2	<i>Trichoderma</i> sp. crece al menos sobre las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo

Clase 3	<i>Trichoderma</i> sp. y el patógeno cubren aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo
Clase 4	El patógeno crece al menos en las dos terceras partes del medio de cultivo limitando el crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp.
Clase 5	El patógeno crece sobre la colonia de <i>Trichoderma</i> sp. Ocupando toda la superficie del medio de cultivo.

Igualmente se midió el porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC), teniendo como referencia el tiempo empleado por los controles donde estaba el patógeno solo; al final cuando la caja Petri estaba totalmente colonizada, se calculó la diferencia mediante la fórmula utilizada por Skidmore y Dickinson (citado por Calvo *et al.*, 2012) dónde:

$$PIC = [(C1 - C2) / C1] * 100$$

C1= Crecimiento radial del testigo (Fitopatógeno sin antagonista).

C2= Crecimiento radial del fitopatógeno en los tratamientos en cultivo dual.

Se utilizó un diseño completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento y un testigo absoluto de *P. palmivora*. La unidad experimental correspondió a una caja Petri con el cultivo dual sembrado en medio de cultivo de Agar zanahoria. Posteriormente, se evaluó el comportamiento del antagonista frente *P. palmivora* durante un periodo 5 a 7 días. El ensayo fue mantenido en condiciones de laboratorio entre 26-28°C.

### **Análisis estadístico**

Al valor de crecimiento radial final del aislamiento PCTU095 en cultivo duales con las diferentes cepas del antagonista, se le realizó un análisis de varianza ANOVA y la comparación entre los tratamientos mediante la prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).

### **6.3.3 Interacciones micoparasíticas de *Trichoderma* spp. sobre *P. palmivora* agente causante de la PC.**

La interacción de las relaciones micoparasíticas se determinó mediante la evaluación en microcultivo de la presencia o ausencia de enrollamientos, colapso de micelio, penetración de hifas y esporulación. Para los microcultivos, se tomaron cajas Petri en cuya base se colocó un pedazo de papel toalla del mismo diámetro, seguido se colocaron dos palillos de madera para servir de base a una lámina portaobjetos y una lámina cubreobjetos, luego se colocó la tapa de la caja Petri, finalmente se envolvieron con papel para la esterilización en autoclave a 120 °C y 15 libras de presión durante 15 minutos. Una vez fueron esterilizadas las cajas Petri, en condiciones de cámara de flujo laminar se tomó un trozo de medio de cultivo Agar zanahoria de 1cm x 2 cm, se colocó en la lámina portaobjeto, seguido se procedió a colocar en un extremo del medio de cultivo a *P. palmivora* y en el otro extremo a *Trichoderma* spp., finalmente se colocó la lámina cubre objetos sobre el medio. En ambos casos para la inoculación se usaron aislamientos con siete días de crecimiento. Los microcultivos fueron incubados a 25 °C por 4 a 5 días.

Para este ensayo, se realizó un diseño completamente al azar con 6 repeticiones y la unidad experimental correspondió a una caja Petri con un microcultivo. Se contó con 6 microcultivos por tratamiento, se evaluó cinco campos por microcultivo, para un total de 30 evaluaciones por tratamiento. En cada campo se contó el número de hifas presentes y el tipo de interacción entre las hifas, número de esporangios y número de esporangios colonizados por el biocontrolador.

### **6.3.4 Propiedades antibióticas de los aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *P. palmivora* agente causante de la PC.**

Para medir las propiedades antibióticas de *Trichoderma* sp. mediante la evaluación de metabolitos no volátiles, se tomaron cajas Petri con siete días de crecimiento, de las cuales se tomaron cinco discos de crecimiento de 5 mm de diámetro del antagonista (*Trichoderma* sp.) y se colocaron en 100 ml de caldo papa dextrosa, pH 5,5 a 28°C durante 8 días. Posteriormente, se procedió a filtrar con la ayuda de una



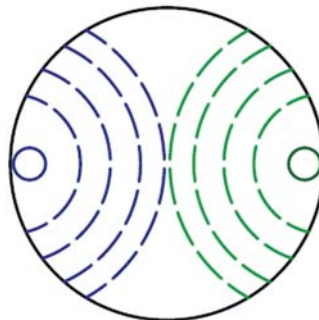
bomba de vacío con filtro miliporo de 0,1  $\mu\text{m}$ , luego 100 mL del medio filtrado fueron vertidos en Erlenmeyer previamente esterilizados, seguido se colocaron 5 discos de crecimiento de 5mm de diámetro de *P. palmivora* en el medio líquido durante un periodo de 8 días a 100 rpm y 26°C en una incubadora agitadora. En este ensayo se utilizó un diseño completamente al azar, con seis repeticiones por tratamiento, la variable de respuesta fue la biomasa de *P. palmivora*.

### Análisis estadístico

Los datos del peso de micelio del aislamiento PCTU095 de *P. palmivora* en respuesta a los metabolitos volátiles del antagonista, se sometieron a un análisis de varianza ANOVA y la comparación entre los tratamientos mediante la prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).

En el caso de los metabolitos volátiles, se realizó una prueba sembrando el antagonista y *P. palmivora* en cultivo dual, utilizando cajas Petri divididas en la base pero que permitían el flujo del metabolito volátil dentro la caja Petri. Una vez sembradas las cajas se incubaron a 26°C. Se realizaron mediciones diarias del crecimiento individual, con el fin de verificar la posible acción de metabolitos volátiles del antagonista sobre el desarrollo del patógeno.

Para cada este ensayo se usó un diseño completamente al azar con 10 repeticiones y la unidad muestral correspondió a la caja Petri.



**Figura 8.** Esquema de la ubicación de los discos para prueba de propiedades antibióticas (metabolitos volátiles).

## **Análisis estadístico**

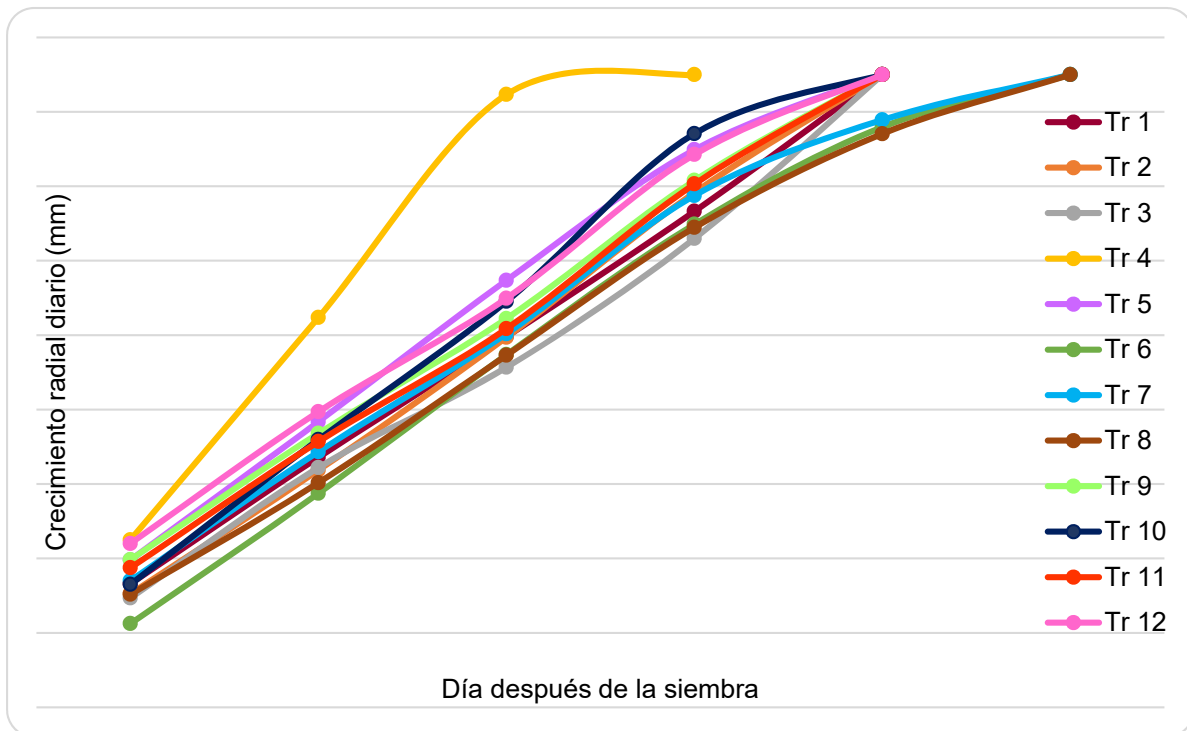
Al valor de crecimiento radial final del aislamiento PCTU095 en respuesta los metabolitos no volátiles de las diferentes cepas del antagonista, se le realizó un análisis de varianza ANOVA y la comparación entre los tratamientos mediante la prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Evaluación de la velocidad de crecimiento de aislamientos de *Trichoderma* spp. y *P. palmivora*.

La morfología y el desarrollo de los aislamientos de *Trichoderma* presentó diferencias en relación a los diferentes medios de cultivo evaluados.

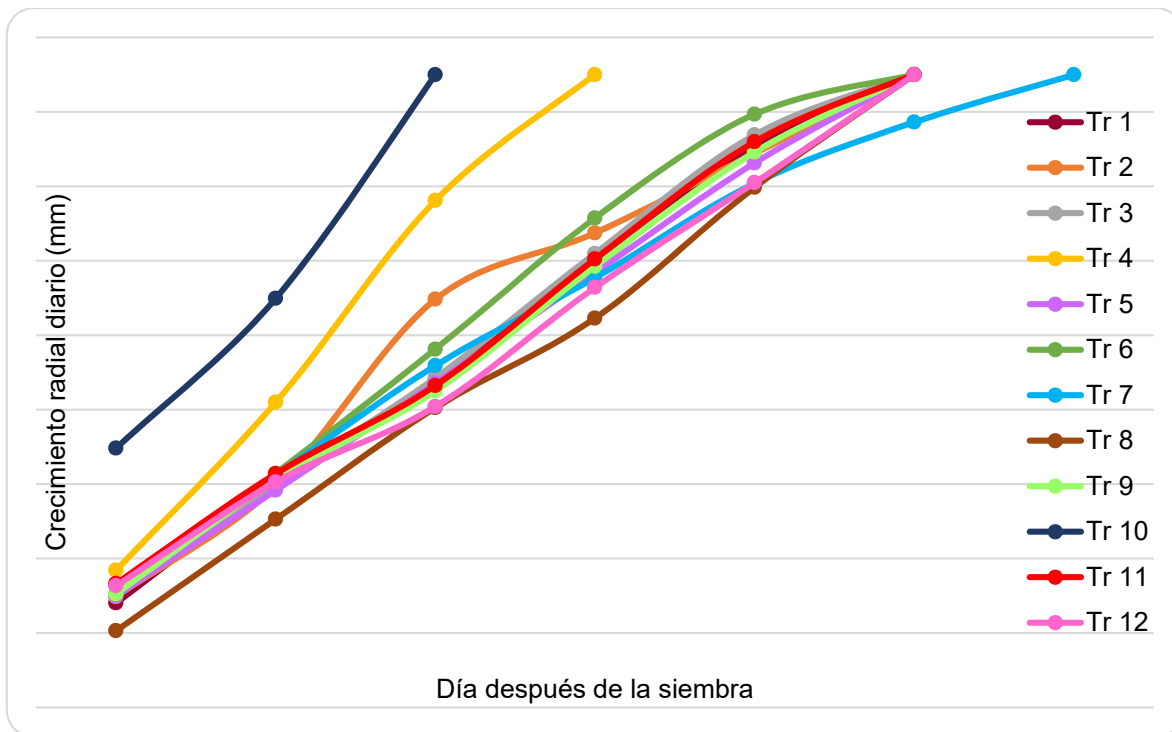
En el Agar centeno se presentaron las mayores tasas de crecimiento con un promedio de crecimiento diario de 16,43 mm. (Anexo 1 y 2), El aislamiento Tr4 registro un crecimiento diario 20,83 mm, mientras que el Tr7 obtuvo la menor tasa de desarrollo (13,59 mm/día) con respecto a los demás tratamientos (Figura 5). Las diferentes cepas evaluadas presentaron durante su crecimiento un micelio sumergido de color blanco, y baja esporulación en comparación con los demás medios de cultivo evaluados.



**Figura 9.** Crecimiento radial diario de aislamientos de *Trichoderma* spp. en medio de cultivo Agar centeno.

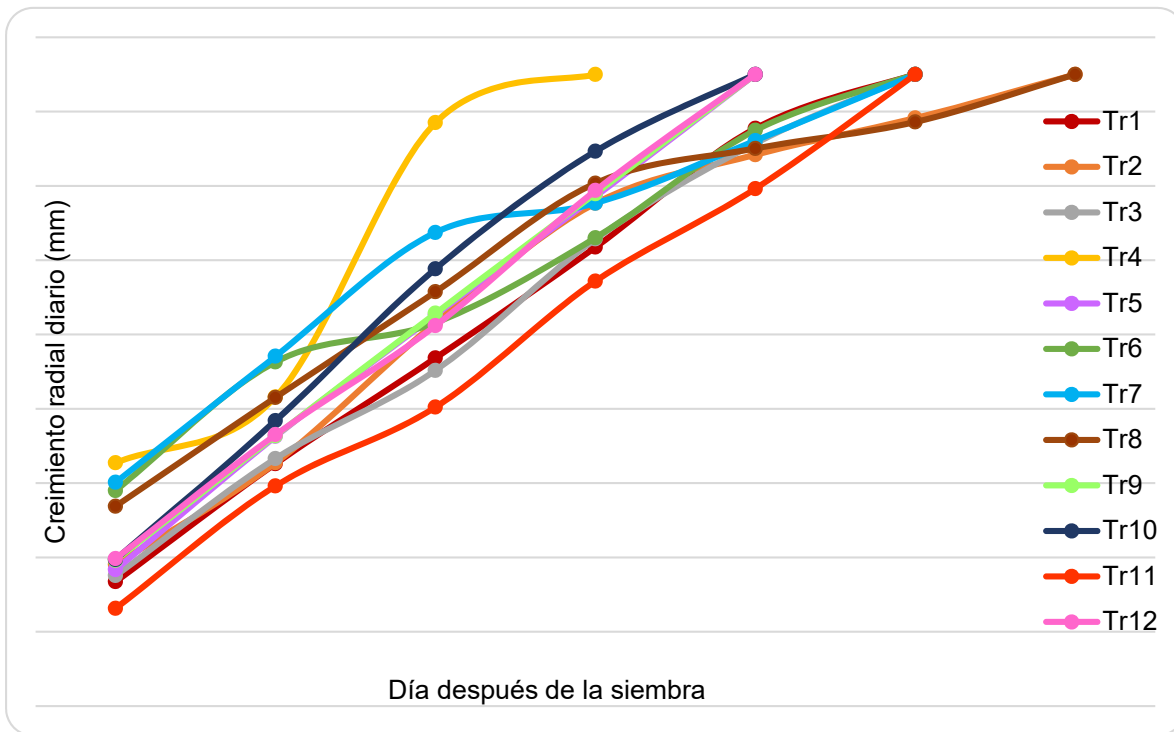
En el medio de cultivo Agar V8 el promedio de crecimiento diario de los aislamientos de *Trichoderma* fue de 15,43 mm. Los aislamientos Tr10 y Tr4 registraron un

crecimiento diario 25,09 y 20,94 mm/día, mientras que el Tr7 obtuvo el menor crecimiento (11,43mm/día) con respecto a los demás tratamientos, que oscilaron en un rango entre 13,67 y 14,94 mm/día (Figura 6). Igual que en el medio Agar centeno las cepas presentaron un micelio sumergido de color blanco, pero con una mayor esporulación.



**Figura 10.** Crecimiento radial diario de aislamientos de *Trichoderma* spp. en medio de cultivo Agar jugo V8.

El crecimiento de los aislamientos de *Trichoderma* en el medio de cultivo Agar zanahoria fue en promedio de 13,95 mm/día. Las tasas de desarrollo más altas se evidenciaron en las cepas Tr4, Tr5, Tr9 y Tr10 con un crecimiento promedio de 16,6 mm diarios, por el contrario, los aislamientos Tr2, Tr7 y Tr8 mostraron valores entre 9,69 y 10,99 mm/día (Figura 7). Dentro de las características sobresalientes en el desarrollo de las cepas de *Trichoderma* en este medio se observaron en estados iniciales colonias de crecimiento deprimido, que se tornaron algodonosas al finalizar la evaluación y alta esporulación en comparación con los demás medios de cultivo.



**Figura 11.** Crecimiento radial diario de aislamientos de *Trichoderma* spp. en medio de cultivo Agar zanahoria.

El promedio de crecimiento diario de los aislamientos de *Trichoderma* se observa en la Tabla 4. El análisis de varianza indicó diferencias significativas entre el crecimiento de las cepas y los medios de cultivo evaluados ( $p < 0,05$ ). La comparación de medias permitió detectar las diferencias en los valores de crecimiento radial diario (Anexo 3 y 4). El aislamiento Tr4 en los tres medios de cultivos, y las cepas Tr2 y Tr3 en Agar centeno; Tr10 y Tr8 en Agar V8 y los aislamientos Tr5 y Tr9 en medio de cultivo Agar zanahoria presentan las tasas de crecimiento más altas estando en un rango de crecimiento que va desde 25,09 a 14,94 mm/día.

**Tabla 4.** Prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). Tasa de Crecimiento de doce aislamientos de *Trichoderma* spp. en tres medios de cultivo.

Tasa de Crecimiento <i>Trichoderma</i> spp. (mm/día)								
Agar Centeno			Agar Jugo V8			Agar Zanahoria		
Aislamiento	Tasa de Crecimiento	Agrupación	Aislamiento	Tasa de Crecimiento	Agrupación	Aislamiento	Tasa de Crecimiento	Agrupación
Tr4	20,83	A B	Tr10	25,09	A	Tr4	17,42	B

Tr3	17,58	M N O P	Tr4	22,19	C	Tr5	16,66	F G H I J
Tr2	17,43	I J K L M N	Tr8	14,94	Q	Tr9	16,35	F G H I J
Tr10	17,12	E F G H I	Tr1	14,19	O P Q	Tr10	16,32	D E
Tr1	17,1	K L M N O P	Tr2	14,02	E F G H	Tr12	16,29	G H I J K
Tr11	16,56	G H I J K L	Tr3	14,02	O P Q	Tr11	14,37	Q
Tr5	16,3	E F	Tr5	14	O P Q	Tr1	13,65	K L M N O P
Tr9	16,29	G H I J	Tr9	13,95	P Q	Tr3	13,48	N O P Q
Tr12	15,75	E F G	Tr6	13,94	J K L M N O	Tr6	11,2	G H I J K
Tr6	14,75	K L M N O P	Tr12	13,73	Q	Tr2	10,99	G H I J K
Tr8	13,96	K L M N O P	Tr11	13,67	P Q	Tr7	10,98	C D
Tr7	13,59	H I J K L M	Tr7	11,43	L M N O P	Tr8	9,69	E F G

\*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

La colonización de la totalidad de la caja Petri en la mayoría de los tratamientos fue al cuarto día después de la siembra, datos similares se encuentran en el estudio realizado por Valencia, 2004; los aislamientos de *Trichoderma* cuentan con radios que están en un rango de 59,6 a 90,00 mm al cuarto día de evaluación, en condiciones de temperatura y luminosidad similares a las usadas en este ensayo.

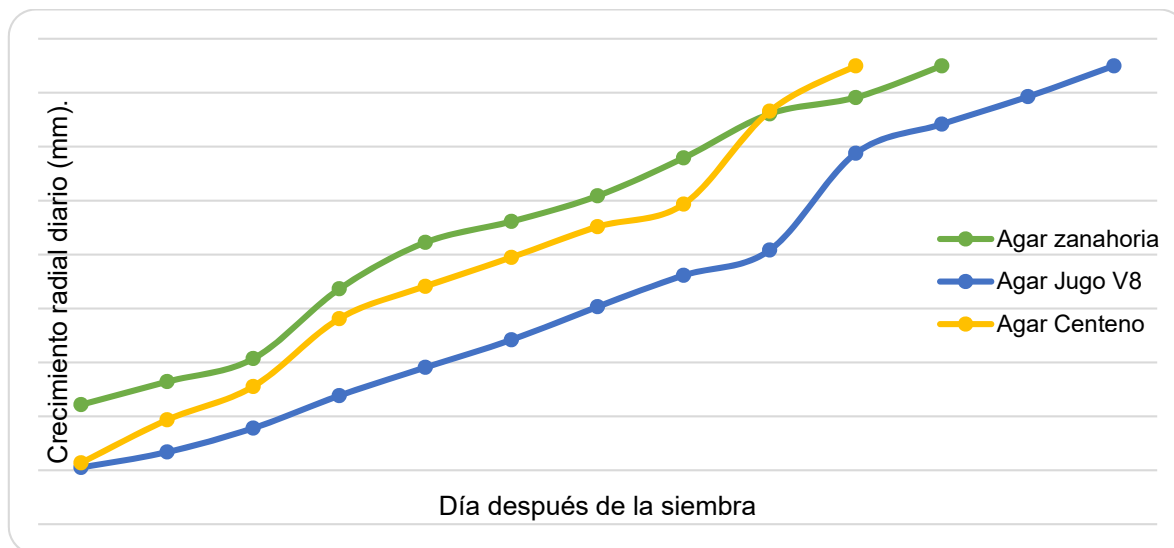
En los medios de cultivo AV8 y AZ los aislamientos *Trichoderma* presentaron un crecimiento típico de la colonia descrito por Druzhinina *et al.*, 2006 & Sánchez 2009, con formación de anillos concéntricos de color verde en los sitios de esporulación, las tonalidades varían de acuerdo a cada aislamiento que van desde coloraciones amarillas hasta verde. Las características morfológicas a nivel microscópico se observan, hifas hialinas con septos, conidióforos, fiálides y conidias de forma redonda y en algunos casos subglobosas (Gams & Bisett, 1998).

En cuanto al desarrollo del patógeno en los tres medios de cultivo, se encontró que la mayor velocidad de crecimiento fue en el medio Agar centeno, colonizando

completamente la caja Petri en el día 11 con una tasa de crecimiento diario de 8,18 mm. En este medio en los estados iniciales del desarrollo de *P. palmivora* se observaron hifas hialinas de crecimiento deprimido, que al avanzar se tornaron de color blanco con apariencia algodonosa, con baja esporulación en comparación con los demás medio de cultivo evaluados.

En el medio de cultivo agar zanahoria AZ, la colonización completa de la caja Petri se dio al día 11 presentando un crecimiento diario de 6,28 mm. El desarrollo de *P. palmivora* en este medio en sus estados iniciales fue de crecimiento del micelio deprimido, hifas hialinas, que en su desarrollo se tornó de color blanco con apariencia algodonosa, con un patrón de crecimiento en forma de estrella similar a lo descrito por Machado *et al.*, 2008; a diferencia de los otros medios de cultivo, el medio AZ presentó la esporulación más alta.

La tasa de crecimiento más baja para el aislamiento PCTU095 de *P. palmivora* se registró en el medio de cultivo AV8, con un crecimiento diario de 5,97 mm, colonizando la totalidad de la caja Petri pasados 13 días después de la siembra. Durante el desarrollo de *P. palmivora* en este medio de cultivo se observó en sus estados iniciales hifas hialinas de crecimiento deprimido, que al paso de los días tomaron un color blanco, apariencia acuosa y alta esporulación.



**Figura 12.** Crecimiento radial diario del aislamiento PCTU095 de *Phytophthora palmivora* en tres medios de cultivo (Agar zanahoria, Agar jugo V8, Agar centeno).

El promedio de crecimiento diario del aislamiento PCTU095 de *P. palmivora*. se observa en la Tabla 5. El análisis de varianza indico diferencias significativas entre el crecimiento del patógeno y los medios de cultivo evaluados ( $p < 0,05$ ). La comparación de medias permitió detectar las diferencias en los valores de crecimiento radial diario. Los promedios de crecimiento oscilaron entre 5,97 y 8,18 mm/día; el medio de cultivo AZ y AV8 cuentan con un crecimiento estadísticamente similar (Anexo 5 y 6).

**Tabla 5.** Prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). Tasa de crecimiento radial del aislamiento PCTU095 de *P. palmivora* en tres medios de cultivo.

Velocidad de crecimiento (mm / día)			
Aislamiento	Medio de cultivo		
	AZ	AV8	AC
PCTU095	6,28 A	5,97 A	8,18 B

Resultados similares son reportados por Páez, 1993; donde *P. palmivora* registró un crecimiento radial diario de 6,57 mm, con características morfológicas de la colonia similares a las observadas en este ensayo, en medio de cultivo AV8 la tasa de desarrollo fue de 5,11 mm/diarios. De igual manera en la evaluación de los tres medios de cultivo (AZ, AV8 y AC), Pérez *et al.*, 2010, observaron el crecimiento típico de la colonia, micelio aéreo, con patrones de crecimiento radiales o ligeramente estrellado, los bordes de la colonia son de forma redondeada. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el aspecto morfológico y el desarrollo de aislamientos de *P. palmivora* está condicionado además del medio de cultivo, por la temperatura y la luminosidad (Erwin, 1983).

En cuanto a las diferencias entre la velocidad del crecimiento de *Phytophthora* comparadas con los aislamientos de *Trichoderma*, coinciden con diferentes trabajos (Widmer & Shishkoff, 2017; Sriwati *et al.*, 2015; Ezziyyani, 2004; Guigón & González, 2003;). Adicionalmente, la velocidad de crecimiento de *Trichoderma* en comparación con la de *P. palmivora*, permite identificar una de las principales



características que hacen de *Trichoderma* un buen antagonista para el control de enfermedades en plantas, gracias a que cuenta con una alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y gama amplia de sustratos donde puede desarrollarse en comparación con otros microorganismos (Samuels, 1996), las anteriores son características determinantes en el modo de acción *Trichoderma* para la regulación biológica de diferentes fitopatógenos (Pérez, 2009).

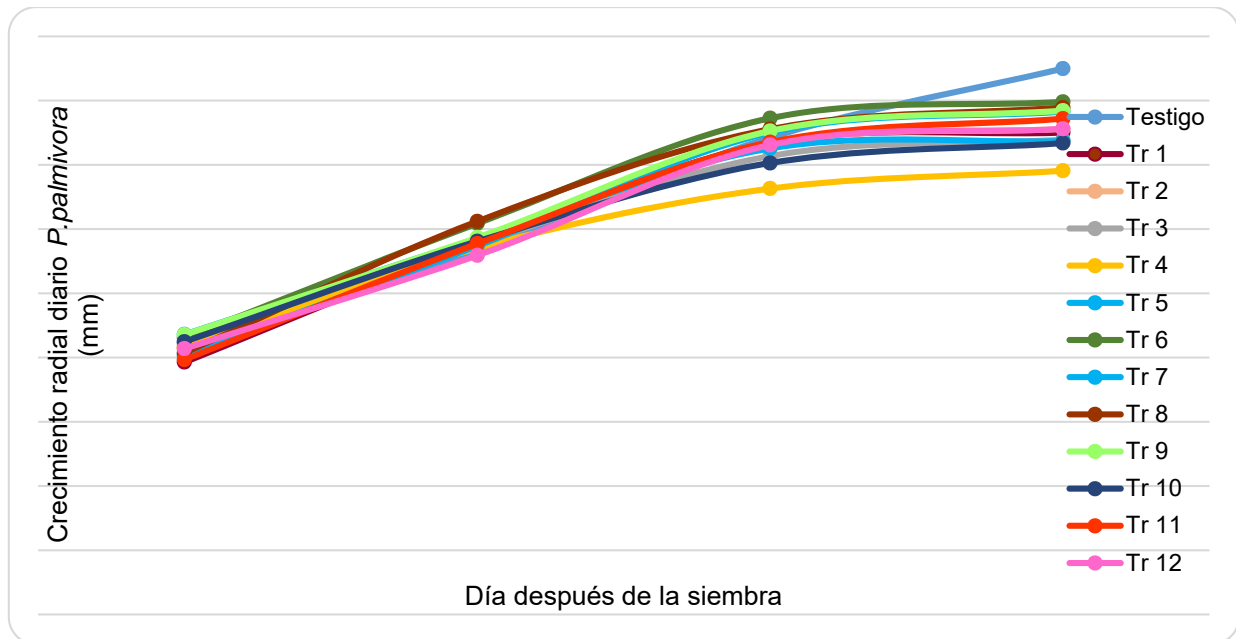
## **7.2 Capacidad inhibitoria de *Trichoderma* sp. frente a *P. palmivora* agente causante de la PC.**

En la evaluación de la capacidad inhibitoria de *Trichoderma* sobre el desarrollo de *P. palmivora* en cada uno de los cultivos duales fue posible determinar la competencia por nutrientes y espacio de los dos microorganismos, evidenciándose el rápido crecimiento del antagonista en comparación con el patógeno, que se manifiesta en la inhibición del crecimiento de *P. palmivora*.

El radio del patógeno en cultivos duales osciló entre 34,54 y 39,90 mm, en cuanto el testigo (patógeno sin antagonista) el radio fue de 42,5 mm al cuarto día después de la siembra (Figura 9). Las cepas Tr4 y Tr10 presentaron un efecto inhibitorio sobre el patógeno que al final de la evaluación registró un radio de 34,54 mm y 36,70 mm, respectivamente, mientras que los aislamientos Tr6, Tr8, Tr9, Tr7 y Tr11 mostraron la menor actividad antagónica.

El análisis de varianza indico diferencias significativas para el crecimiento final del patógeno en cultivo dual con el antagonista ( $p < 0,05$ ). La comparación de medias permitió detectar las diferencias en los valores del crecimiento final de la colonia de *P. palmivora* en cada uno de los tratamientos evaluados y el testigo. Los tratamientos tuvieron un crecimiento similar estadísticamente, con excepción del aislamiento Tr4, siendo esta la cepa que presento mayor actividad inhibitoria sobre el patógeno; los tratamientos evaluados son significativamente diferentes al crecimiento del testigo. (Anexo 7 y 8).

Sin embargo, es importante tener en cuenta, que, a pesar de observarse diferencias estadísticas significativas en esta prueba, el porcentaje de inhibición del crecimiento en cultivos duales registró valores inferiores al 20% de inhibición del desarrollo de *P. palmivora*.



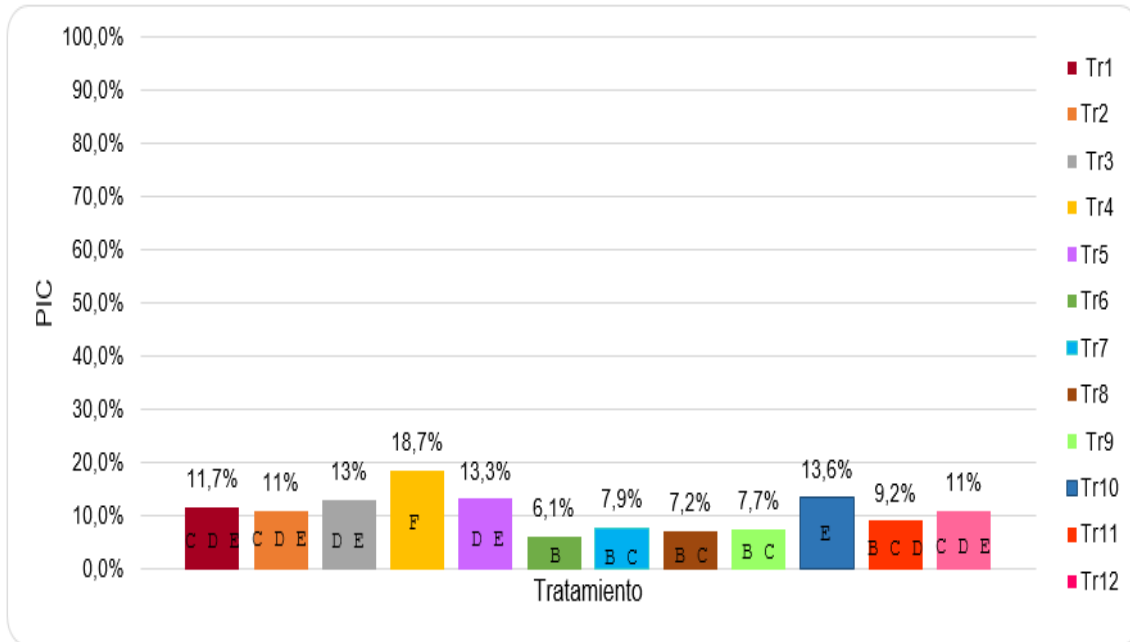
**Figura 13.** Crecimiento radial diario de *P. palmivora* en cultivo dual con aislamientos de *Trichoderma* spp.

Aunque no se presentaron altos porcentajes de inhibición del crecimiento de *P. palmivora*, se observó una limitación en su desarrollo, encontrándose en presencia de los aislamientos de *Trichoderma* Tr4, Tr10 y Tr5 porcentajes de inhibición del patógeno de 18,7, 13,6 y 13,2% respectivamente, por el contrario, los valores más bajos de inhibición se observaron en los cultivos duales de *P. palmivora* con las cepas Tr6, Tr8, Tr9 con porcentajes de 6,1%, 7,1% y 7,7% respectivamente (Figura 10).

Lo anterior, podría ser atribuido a la diferencia de tiempo en la siembra del patógeno vs el antagonista, donde se trató de equiparar las diferencias entre las velocidades de crecimiento diario de éstos (Anexo 9).

Sin embargo los resultados obtenidos, coinciden con los estudios realizados por Sriwati *et al.*, 2015; donde se encontró que *Trichoderma* no cuenta con alta

capacidad inhibitoria sobre aislamientos *Phytophthora* en cultivos duales, para el caso de *P. tropicalis* la inhibición de crecimiento no cuenta con porcentajes superiores a 22,7% y para *P. palmivora* ninguna de las cepas del antagonista reduce significativamente el radio de la colonia.

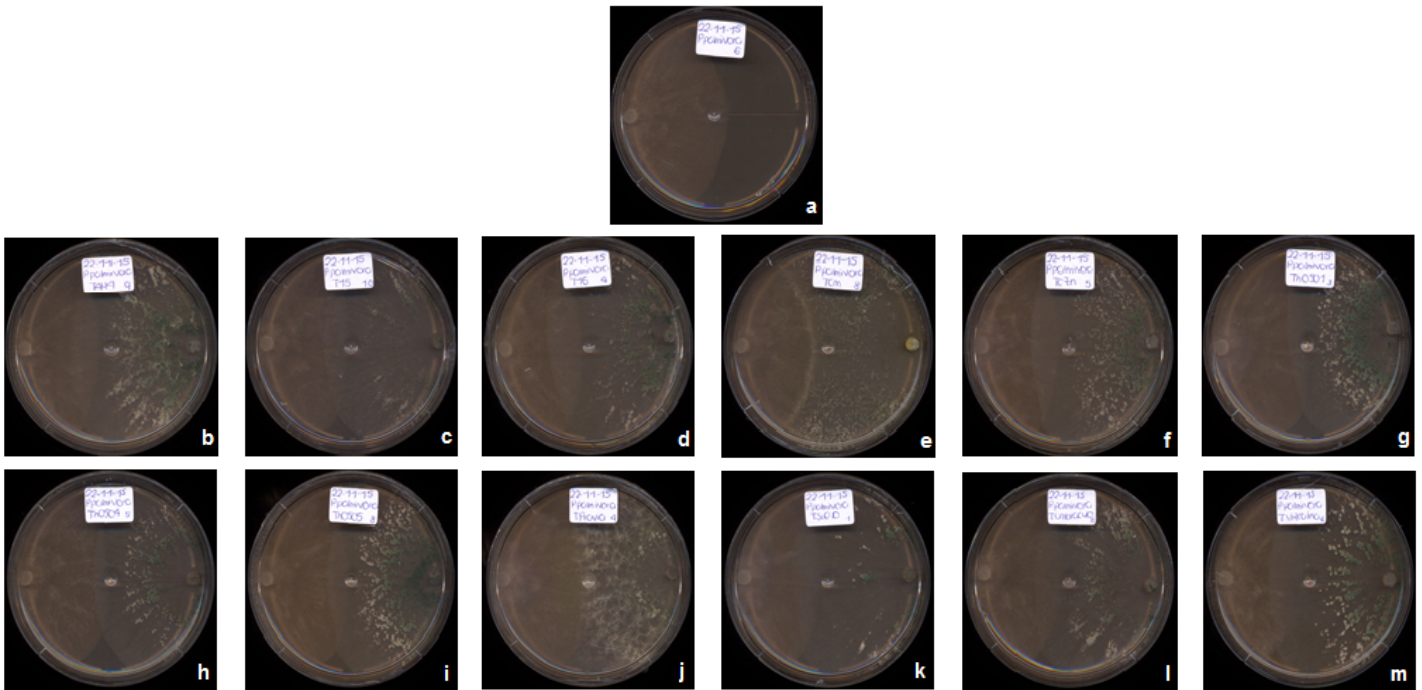


**Figura 14.** Porcentajes de inhibición de crecimiento radial de *P. palmivora* en cultivos duales con el antagonista *Trichoderma* spp.

En el caso de la escala de clasificación Baker y Cook, el aislamiento Tr4 se ubicó en la clase II, se observa que el crecimiento del antagonista en las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo lo que indica una alta capacidad antagónica. Por el contrario, los aislamientos Tr1, Tr2, Tr3, Tr4, Tr5, Tr9, Tr10, Tr11, Tr12 se ubicaron en la clase III, el antagonista y el patógeno cubren aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo (Figura 11).

En la evaluación del comportamiento del antagonista frente a *P. palmivora*, es posible observar una variación de coloración en el punto de contacto de los aislamientos Tr4 y Tr9 con *P. palmivora* indicando incompatibilidad entre los dos microorganismos, debido a que en este punto se estaría dando un parasitismo directo, es decir que *Trichoderma* usa las hifas de *Phytophthora* como sustrato, como ha sido reportado por Hernández *et al.*, 2011, mientras que en los demás

tratamientos fue posible observar a *Trichoderma* crecer sobre la colonia de *P. palmivora*.



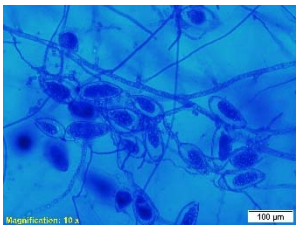
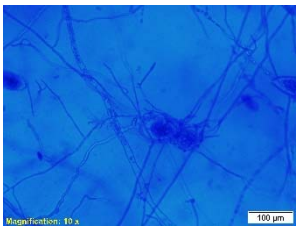
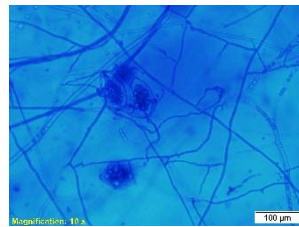
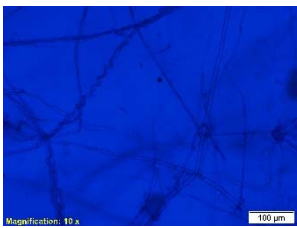
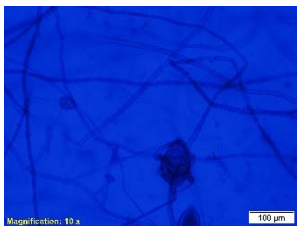

**Figura 15.** Crecimiento en cultivo duales entre el antagonista *Trichoderma* spp. y el patógeno *P. palmivora*. **a.** Testigo (*P. palmivora* sin antagonista), **b.** *P. palmivora* – Tr1, **c.** *P. palmivora* – Tr2, **d.** *P. palmivora* – Tr3, **e.** *P. palmivora* – Tr4, **f.** *P. palmivora* – Tr5, **g.** *P. palmivora* – Tr6, **h.** *P. palmivora* – Tr7, **i.** *P. palmivora* – Tr8, **j.** *P. palmivora* – Tr9, **k.** *P. palmivora* – Tr10, **l.** *P. palmivora* – Tr11, **m.** *P. palmivora* – Tr12.


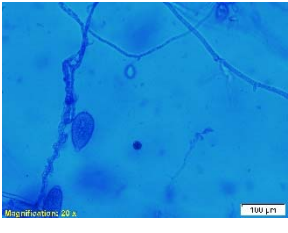
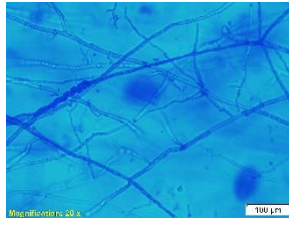

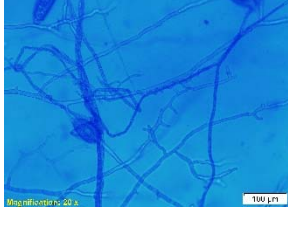

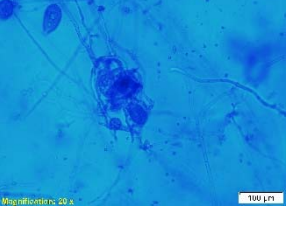
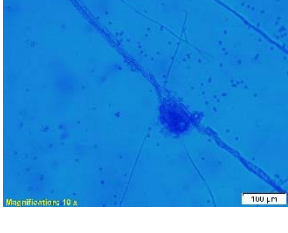
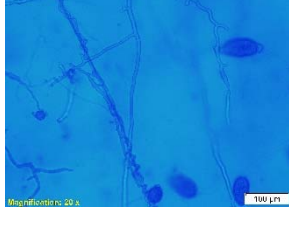
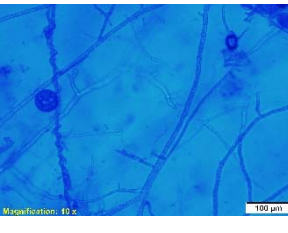
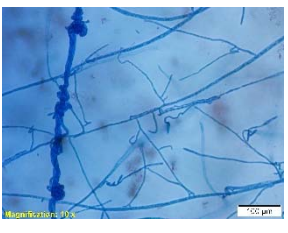
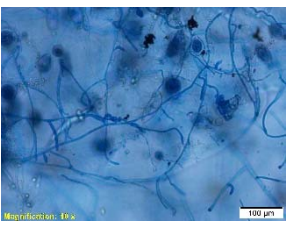
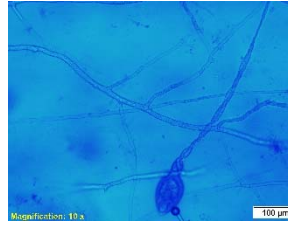
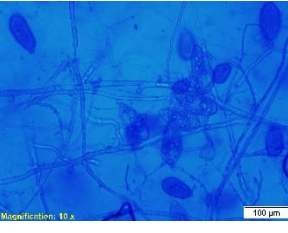
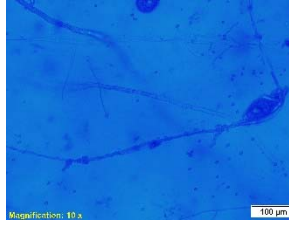
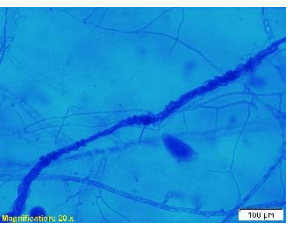
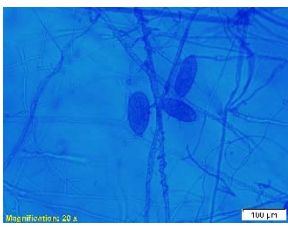
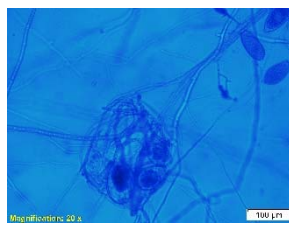
Los aislamientos de *Trichoderma* frecuentemente presentan resultados satisfactorios en las pruebas de competencia por nutrientes y espacio, atribuido a sus características biológicas, en cultivos duales se registran dos tipos de interacciones entre patógeno y antagonista, una de ellas es el deterioro de las hifas del patógeno y con menor crecimiento en relación al antagonista, no solo por compartir el mismo sustrato sino también por la acción de antibióticos volátiles o no volátiles liberados por el biocontrolador (Sid Ahmed *et al.*, 2000; Herrera *et al.*, 1999; Lorito *et al.*, 1993; Papavizas & Lumsden, 1980), la segunda consiste en el enrollamiento de el antagonista sobre el patógeno, utilizando las hifas del microorganismo como sustrato (Lo *et al.* ,1998).

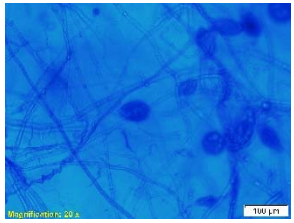
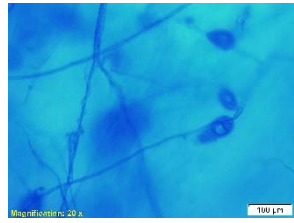
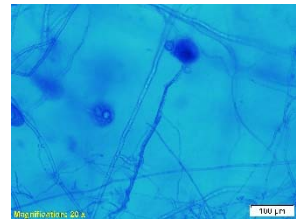
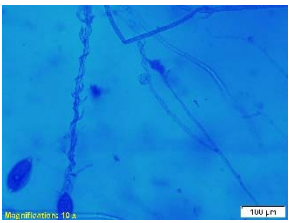
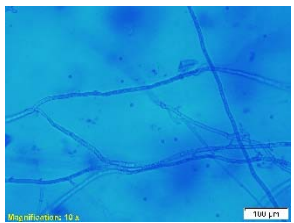
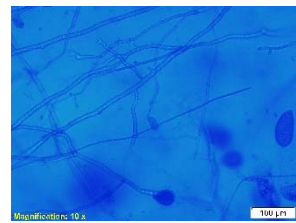
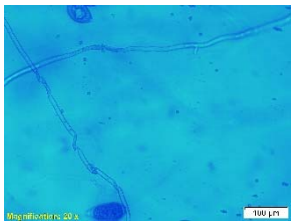

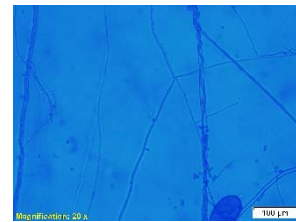
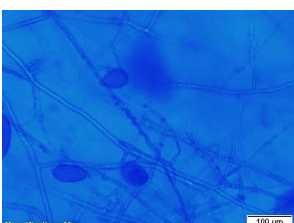

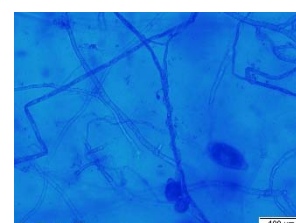
### 7.3 Interacciones micoparasíticas de *Trichoderma* spp. sobre *P. palmivora*.

Pasadas 48 horas, momento en que el antagonista y el patógeno se pusieron en contacto y que el último se superpusiera sobre el otro en la placa de medio de cultivo, fue posible observar enrollamientos o “collings” y estrangulamientos del antagonista sobre *P. palmivora* (Arnold *et al.*, 2003; Harman *et al.*, 2004; Bailey *et al.*, 2006). Con el aislamiento Tr2 se encontró una mayor interacción sobre hifas y esporangios del patógeno, registrando porcentajes de parasitismo de 55 % y 63% respectivamente. La menor actividad micoparasítica se evidenció en los aislamientos Tr5 y Tr7 en cuanto a las hifas el parasitismo fue de 3% y 4% y en esporangios fue de 1,9 y 1,2% respectivamente (Tabla 6). Investigaciones sobre interacciones micoparasíticas de diferentes especies de *Trichoderma*, han demostrado una efectividad sobre patógenos específicos lo que conllevó a pensar que el reconocimiento molecular entre antagonista y el hospedante es el evento esencial que precede al proceso antagónico (Infante *et al.*, 2009; Chet & Benhamou, 1998), lo que explica las diferencias de las interacciones de *P. palmivora* con los aislamientos del antagonista evaluados.

**Tabla 6.** Interacciones micoparasíticas de aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *P. palmivora*.

Tratamiento	Interacciones micoparasíticas (enrollamientos o “collings” y estrangulamientos)			Porcentaje hifas con enrollam.	Porcentaje esporangios parasitados
<i>P. palmivora</i> Tr2				55%	63%
<i>P. palmivora</i> Tr3				20%	4%

<p><i>P. palmivora</i> Tr8</p>				<p><b>18,6%</b></p>	<p><b>2,7%</b></p>
<p><i>P. palmivora</i> Tr11</p>				<p><b>17%</b></p>	<p><b>10,5%</b></p>
<p><i>P. palmivora</i> Tr10</p>				<p><b>13,2%</b></p>	<p><b>3,6%</b></p>
<p><i>P. palmivora</i> Tr1</p>				<p><b>13%</b></p>	<p><b>1%</b></p>
<p><i>P. palmivora</i> Tr4</p>				<p><b>12%</b></p>	<p><b>8,4%</b></p>
<p><i>P. palmivora</i> Tr9</p>				<p><b>12%</b></p>	<p><b>6,9%</b></p>

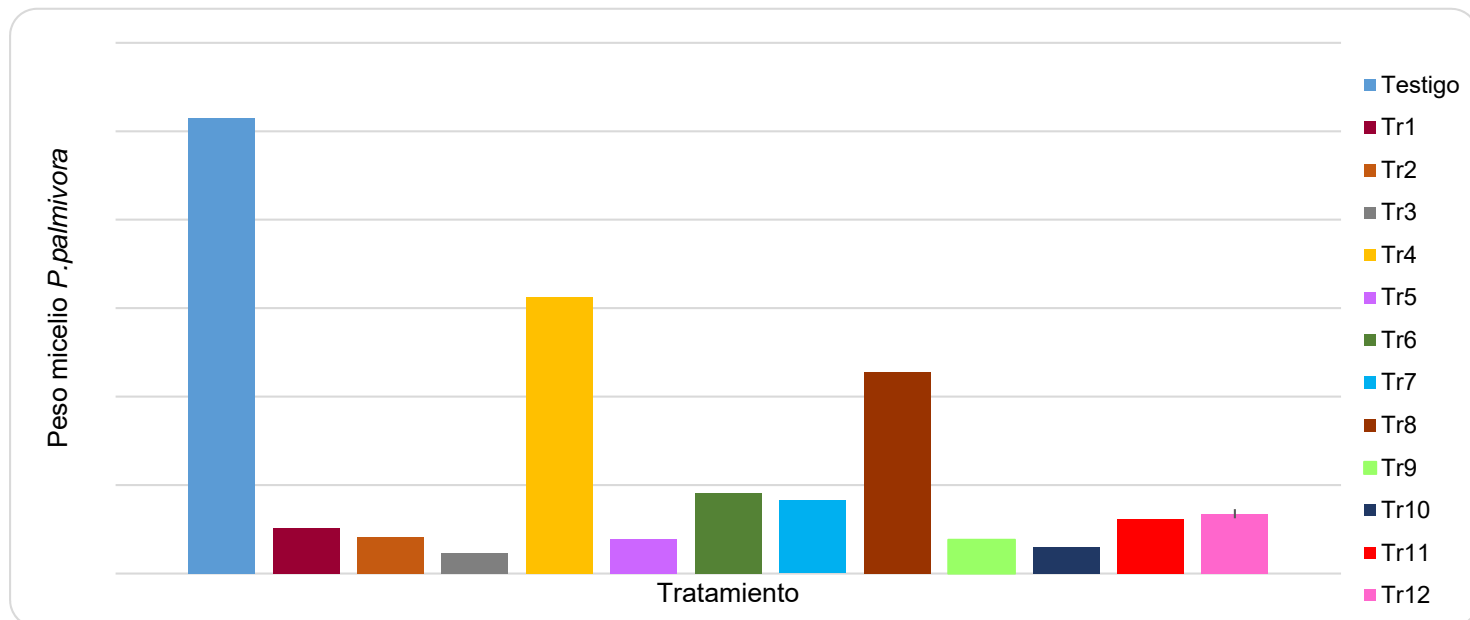
<i>P. palmivora</i> Tr6				<b>7,7%</b>	<b>0%</b>
<i>P. palmivora</i> Tr7				<b>4,6%</b>	<b>1,2%</b>
<i>P. palmivora</i> Tr12				<b>3,4%</b>	<b>4,8%</b>
<i>P. palmivora</i> Tr5				<b>3,2%</b>	<b>1,9%</b>

El proceso de las interacciones, se dio de acuerdo a lo descrito por Chet & Benhamou,1998; donde se observó el crecimiento directo de las hifas del antagonista en dirección a *P. palmivora*, seguido al reconocimiento entre *Trichoderma* y el patógeno a través de las interacciones de lectinas – carbohidratos, las lectinas están involucradas en las interacciones entre los componentes de la superficie de las células y su ambiente extracelular. Siendo la respuesta de reconocimiento positiva las hifas de *Trichoderma* se enrollan sobre las hifas y esporangios de *P. palmivora*. El proceso termina con la producción de enzimas (quitinasas, glucanasas y proteasas), capaces de degradar las paredes celulares, posibilitando la penetración del antagonista sobre el hospedante.

## 7.4 Propiedades antibióticas de los aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *P. palmivora*.

### 7.4.1 Prueba de Metabolitos no volátiles

En esta prueba el crecimiento de *P. palmivora* fue limitado, el peso del micelio no obtuvo valores superiores a 6,24 g; en cuanto al testigo el peso fue de 10,32 g al octavo día de incubación. La mayor actividad inhibitoria la presentaron los aislamientos Tr3, Tr10 y Tr9, el peso de micelio fue de 0,46; 0,59; 0,76 g respectivamente, por el contrario, el aislamiento Tr4 presentó menor efecto antagónico en el desarrollo del patógeno registrando peso de 6,24 g (Figura 12).



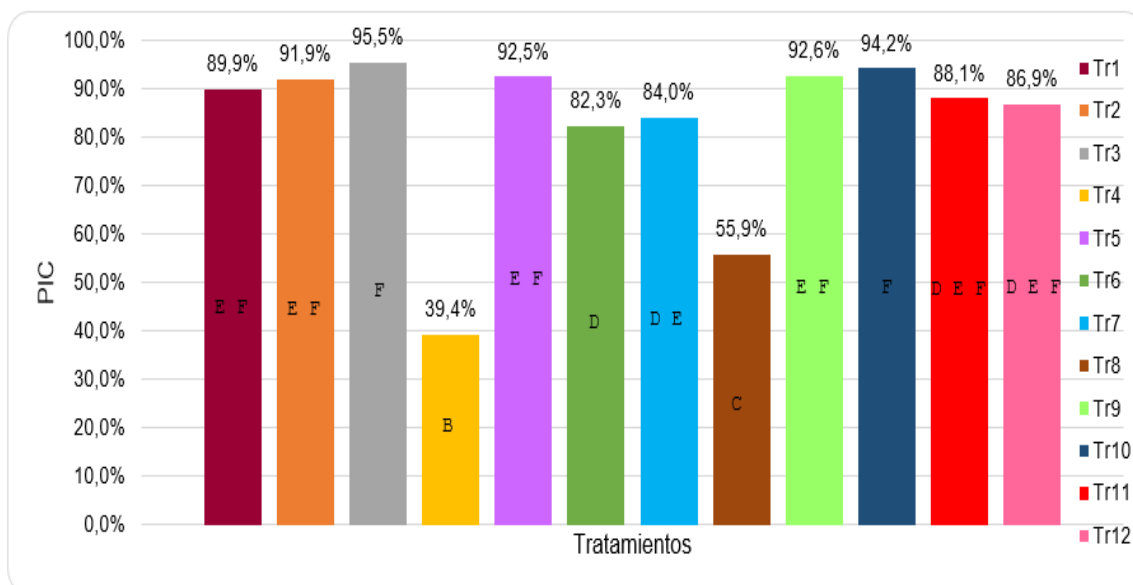
**Figura 16.** Peso de micelio de *P. palmivora* en respuesta a metabolitos no volátiles de *Trichoderma* spp.

El análisis de varianza indico diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ). La comparación de medias permitió detectar las diferencias en los pesos de micelio de *P. palmivora* en respuesta a los metabolitos no volátiles de los aislamientos del antagonista evaluados y el testigo. Los tratamientos registraron un peso final similar estadísticamente, exceptuando los aislamientos Tr4 y Tr8 siendo las cepas con menor efecto antagónico; los tratamientos cuentan con diferencias estadísticamente significativas con el crecimiento radial del testigo (Anexo 10 y 11).



La actividad antagónica atribuida a la producción de metabolitos no volátiles es efectiva en microorganismos del genero *Phytophthora* (Vargas *et al.*,2014 & Bae *et al.*,2016), debido a que estos compuestos tienen la capacidad de inactivar la enzima  $\beta$ -glucano responsable de la formación de la pared celular de *P. palmivora*, en combinación con las diferentes enzimas (glucanasas y celulasas) secretadas por *Trichoderma* las cuales son capaces de degradar las células del patógeno de acuerdo a lo registrado por Lorito *et al.*, 1996 & Schirmbock *et al.*,1994.

En esta evaluación, los porcentajes de inhibición PIC del patógeno se encuentran en un rango que va desde un 39,3% a 95,4%, los porcentajes más altos se presentaron en los aislamientos Tr3, Tr10, Tr9 con un PIC de 95,4; 94,2 y 92,6% respectivamente y los valores más bajos se evidenciaron en las cepas Tr4 y Tr8, con un PIC de 39,3 y 55,8 respectivamente (Figura 13). Resultados similares son reportados por Bae *et al.*, 2016; donde se encontró que el desarrollo de *P. capsici* y *P. nicotiane* fue inhibido en un 80 y 64% respectivamente, además el crecimiento de *P. melonis*, *P. cactorum* y *P. infentans* se inhibió en más de un 50%, en respuesta a los filtrados de *Trichoderma*.

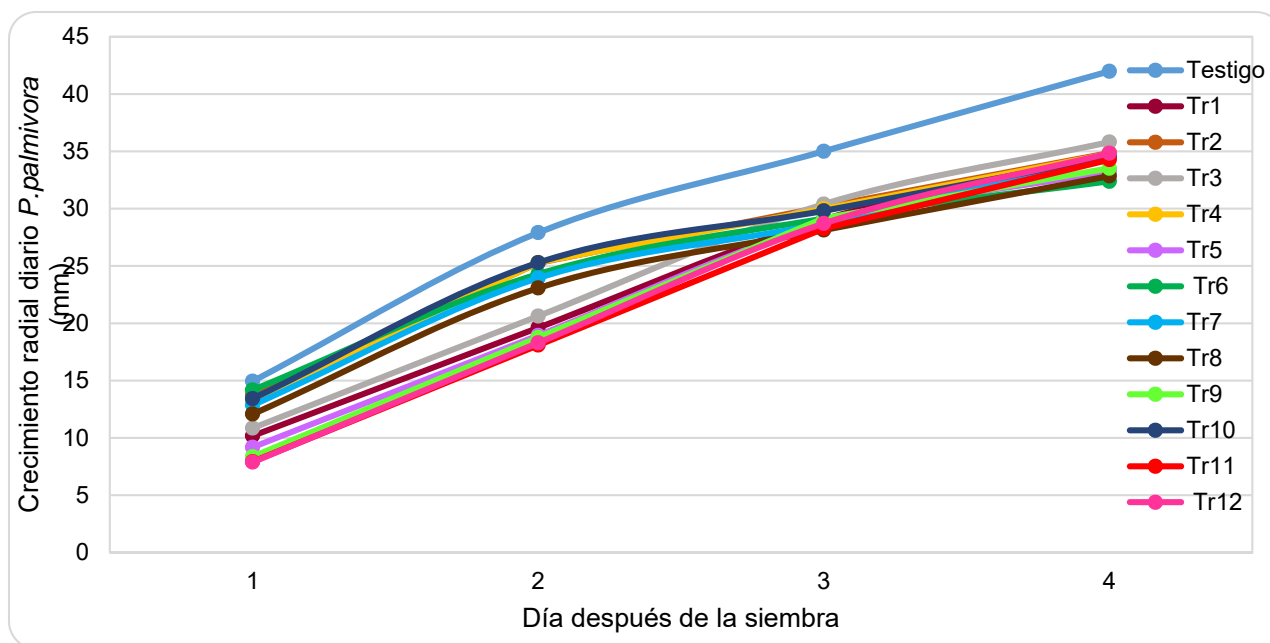


**Figura 17.** Porcentaje de inhibición de desarrollo de *P. palmivora*. Propiedades antibióticas (metabolitos no volátiles).

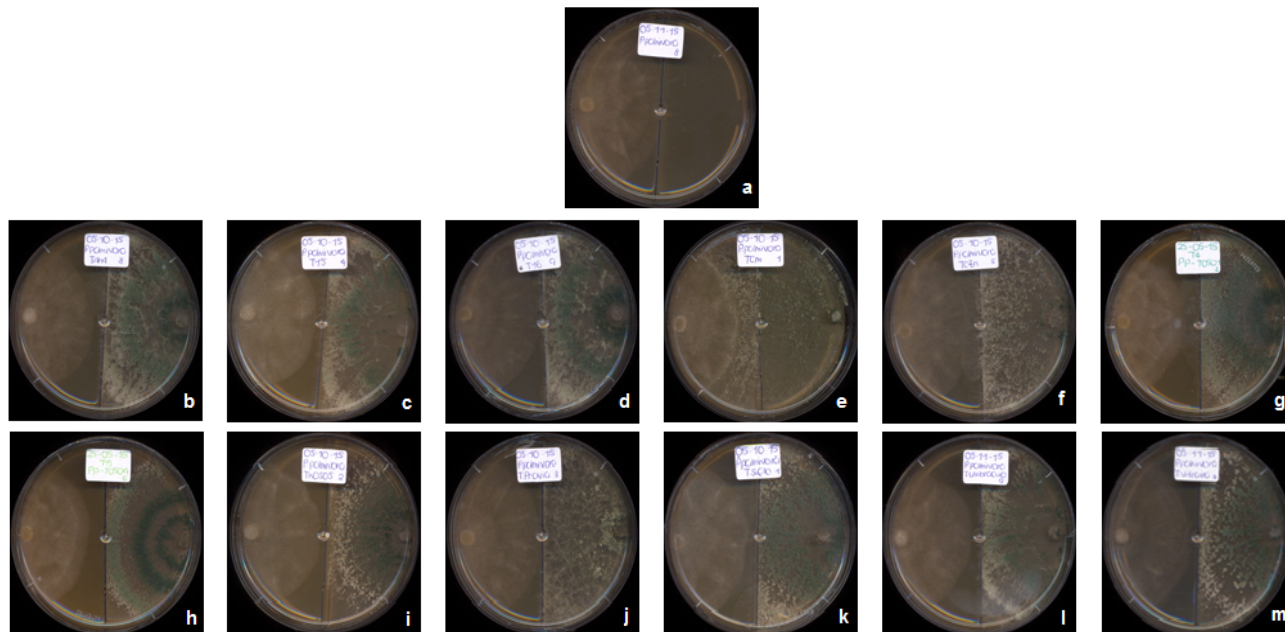
#### 7.4.2 Prueba de metabolitos volátiles

El efecto directo de los metabolitos volátiles de los aislamientos de *Trichoderma* se expresaron en la inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora palmivora*, provocando reducción del tamaño de la colonia en comparación con el testigo.

El radio de *P. palmivora* en presencia de los diferentes aislamientos de *Trichoderma* osciló entre 32,3 y 35,8 mm; en cuanto al testigo (patógeno sin antagonista) el radio fue de 42,5 mm al cuarto día después de la siembra. La mayor actividad inhibitoria se observó en presencia de los aislamientos Tr6, Tr8 con un crecimiento del patógeno de 32,3 y 32,8 mm respectivamente; por el contrario *P. palmivora* en presencia del aislamiento Tr3, alcanzó el mayor radio de crecimiento (35,82mm) (Figura 14). Resultados similares los reporta Stefanova, 1999; quien reporta que el desarrollo de *P. nicotiane* se ve afectado por los metabolitos volátiles emanados por *Trichoderma*, el crecimiento del patógeno en presencia del antagonista fue 36,9 mm al finalizar la evaluación.



**Figura 18.** Crecimiento radial de *P. palmivora* en respuesta a metabolitos volátiles de *Trichoderma* spp.

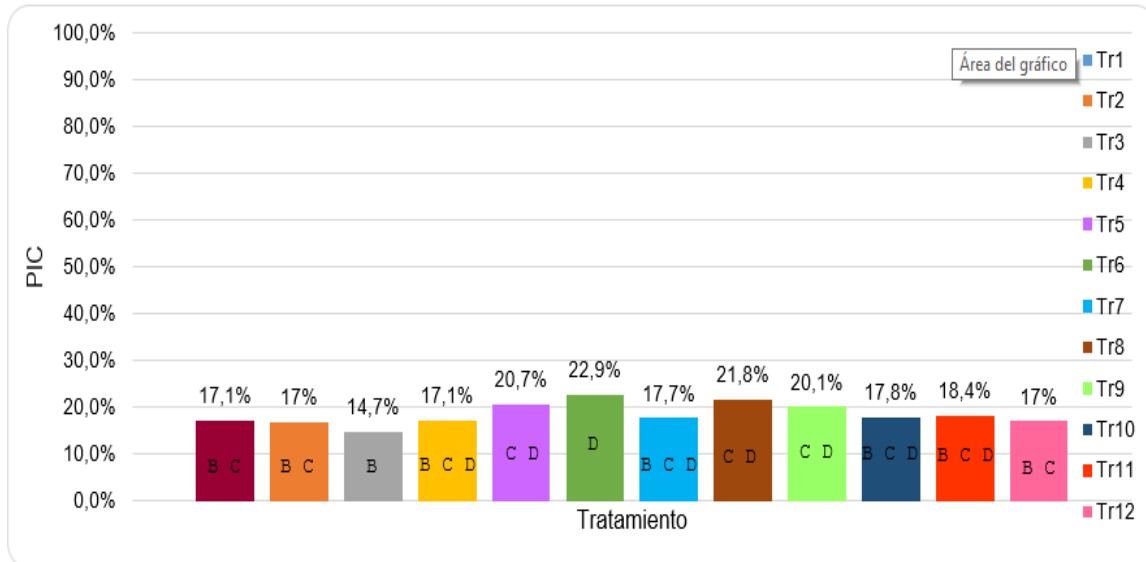


**Figura 19.** Crecimiento en cultivo duales de *P. palmivora* en respuesta a metabolitos volátiles producidos por *Trichoderma* spp. **a.** Testigo (*P. palmivora* sin antagonista), **b.** *P. palmivora* – Tr1, **c.** *P. palmivora* – Tr2, **d.** *P. palmivora* – Tr3, **e.** *P. palmivora* – Tr4, **f.** *P. palmivora* – Tr5, **g.** *P. palmivora* – Tr6, **h.** *P. palmivora* – Tr7, **i.** *P. palmivora* – Tr8, **j.** *P. palmivora* – Tr9, **k.** *P. palmivora* – Tr10, **l.** *P. palmivora* – Tr11, **m.** *P. palmivora* – Tr12.

El análisis de varianza indicó diferencias significativas para el radio al final de la evaluación de *P. palmivora* ( $p < 0,05$ ) en respuesta a los metabolitos volátiles del antagonista. La comparación de medias permitió detectar diferencias en los valores del crecimiento final del patógeno entre los tratamientos evaluados con el testigo. Los tratamientos registraron un crecimiento similar estadísticamente, sin embargo, presentan diferencias significativas con el crecimiento radial del testigo. (Anexo 12 y 13).

El porcentaje de inhibición de crecimiento radial PICR de *P. palmivora* inducida por el efecto de los metabolitos volátiles producidos por las cepas de *Trichoderma* se encuentra en un rango que va desde un 14,7 % hasta 22,9%, los porcentajes de inhibición más altos se presentaron en los aislamientos Tr6, Tr8, Tr5 y Tr9 con un PICR de 22,8; 21,7; 20,7 y 20,1% respectivamente y los valores más bajos se evidenciaron en las cepas Tr3, Tr2, Tr12 y Tr1 con PICR de 14,7; 16,9; 17,0 y 17,1% (Figura 16). A pesar de que en este estudio se encontraron diferencias significativas de los tratamientos respecto al testigo, los porcentajes de inhibición del crecimiento

de *P. palmivora* con los diferentes aislamientos de *Trichoderma* fueron menores al 23%.



**Figura 20.** Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *P. palmivora*. Propiedades antibióticas (metabolitos volátiles).

## 8. CONCLUSIONES

- No todas las cepas de *Trichoderma* son capaces de inhibir el desarrollo de *P. palmivora*. La capacidad antagónica, varía debido a que cada especie cuenta con diferentes mecanismos de acción, capacidad esporulación y rápido crecimiento.
- El aislamiento Tr4 aislado de la plantación Palmeras de Monterrey, mostro la mayor capacidad de competencia por sustrato, resaltando la creación del halo de inhibición y disminución del crecimiento radial de *P. palmivora* en cultivo dual, ubicándose en la clase II en la escala de evaluación usada.
- Las diferentes cepas evaluadas del antagonista presentan actividad micoparasítica sobre *P. palmivora*, observando enrollamientos sobre hifas y esporulación del patógeno, resaltando la actividad del aislamiento Tr2 de *Trichoderma asperelloides* observando con mayor frecuencia la interacción parasítica con *Phytophthora palmivora*.
- Los aislamientos Tr3 de *Trichoderma asperelloides* , Tr10 aislado de la plantación Indupalma, Tr9 aislado de la plantación Pravia S.A, presentaron el mayor porcentaje de inhibición sobre *P. palmivora*, mediante la acción de metabolitos no volátiles, con porcentajes de inhibición superiores al 92,5%.
- Para los antibióticos volátiles producidos por *Trichoderma* el porcentaje de inhibición más alto sobre el crecimiento de la colonia de *P. palmivora* fue de 22,9%, atribuido del efecto fungistático del aislamiento Tr6 de *Trichoderma harzianum*.
- Los aislamientos del antagonista Tr2 y Tr3 de *Trichoderma asperelloides* y las cepas nativas Tr9 aislado de la plantación Pravia S.A y Tr10 aislado de la plantación Indupalma y redujeron significativamente el desarrollo del patógeno a nivel *in vitro*, estas cepas cuentan con potencial para la regulación de *P.*

*palmivora* dentro del cultivo de la palma de aceite, pueden ser incluidas dentro del plan de manejo integrado de la enfermedad Pudrición del cogollo.

- Este estudio, permite demostrar que los aislamientos nativos del antagonista provenientes del agroecosistema de la Palma de aceite, funciona como reserva biológica con potencial para el biocontrol de diferentes fitopatógenos.

## 9. RECOMENDACIONES

- Realizar evaluaciones del efecto de los aislamientos Tr9, Tr10, Tr2 y Tr3 en cultivos comerciales de palma de aceite, los cuales presentaron el mayor grado de antagonismo a *Phytophthora palmivora* a nivel *in vitro*.
- Es importante continuar con investigaciones que permitan un mayor conocimiento en relación a la introducción de estrategias de control biológico para enfermedades en Palma de aceite, el cual se presenta como una alternativa sostenible para el sector palmicultor.
- Realizar ensayos con nuevos aislamientos de *Trichoderma* sp., con el fin de ampliar el banco de cepas antagonistas de *P. palmivora* para su multiplicación y aplicación en plantaciones de Palma de aceite.

## 10. ANEXOS

### Anexo 1. Análisis de Varianza. Tasa de crecimiento aislamientos de *Trichoderma* spp. en tres medios de cultivo.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	37,6	18,799	2,11	0,137
Error	33	293,34	8,889		
Total	35	330,94			

### Anexo 2. Prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). Tasa de crecimiento de aislamientos de *Trichoderma* spp. en tres medios de cultivo.

Factor	Media	Agrupación
AC	16,438	A
AV8	15,43	A
AZ	13,95	A

\*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### Anexo 3. Análisis de Varianza. Crecimiento radial diario aislamientos de *Trichoderma* spp. en tres medios de cultivo.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	35	24588,3	702,523	158,34	0,00
Error	170	754,3	4,437		
Total	205	25342,6			

### Anexo 4. Prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). Crecimiento radial diario aislamientos de *Trichoderma* spp. en tres medios de cultivo.

Factor	Aislamiento	Medio de Cultivo	Media	Agrupación
T22	Tr10	AV8	85,00	A
T28	Tr4	AC	82,34	A B
T4	Tr4	AZ	78,51	B
T16	Tr4	AV8	68,103	C



T7	Tr7	AZ	63,73	C D
T10	Tr10	AZ	58,85	D E
T29	Tr5	AC	57,37	E F
T8	Tr8	AZ	55,748	E F G
T36	Tr12	AC	54,95	E F G
T14	Tr2	AV8	54,84	E F G H
T34	Tr10	AC	54,54	E F G H I
T9	Tr9	AZ	52,877	F G H I J
T5	Tr5	AZ	52,618	F G H I J
T33	Tr9	AC	52,228	G H I J
T6	Tr6	AZ	51,577	G H I J K
T2	Tr2	AZ	51,577	G H I J K
T12	Tr12	AZ	51,183	G H I J K
T35	Tr11	AC	50,874	G H I J K L
T31	Tr7	AC	50,192	H I J K L M
T25	Tr1	AC	49,81	I J K L M N
T26	Tr2	AC	49,723	I J K L M N
T18	Tr6	AV8	48,12	J K L M N O
T30	Tr6	AC	47,382	K L M N O P
T32	Tr8	AC	47,312	K L M N O P
T1	Tr1	AZ	46,842	K L M N O P
T19	Tr7	AV8	45,922	L M N O P
T27	Tr3	AC	45,69	M N O P
T3	Tr3	AZ	45,174	N O P Q
T15	Tr3	AV8	44,264	O P Q
T13	Tr1	AV8	43,858	O P Q
T17	Tr5	AV8	43,542	O P Q
T23	Tr11	AV8	43,25	P Q
T21	Tr9	AV8	42,514	P Q
T24	Tr12	AV8	40,428	Q
T20	Tr8	AV8	40,273	Q
T11	Tr11	AZ	40,228	Q

\*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### Anexo 5. Análisis de Varianza. Crecimiento radial diario de *P. palmivora* en tres medios de cultivo.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	2601,42	1300,71	209,10	0,000
Error	15	93,31	6,22		

Total	17	2694,73		
-------	----	---------	--	--

**Anexo 6.** Prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). Crecimiento radial diario de *P. palmivora* en tres medios de cultivo.

Factor	Medio de Cultivo	Media	Agrupación
T3	AC	76,59	A
T1	AZ	76,09	A
T2	AV8	50,843	B

\*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Anexo 7.** Análisis de Varianza. Crecimiento radial de *P. palmivora* en cultivo dual.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor P
Factor	12	419,9	34,988	26,1	0,00
Error	104	139,4	1,341		
Total	116	559,3			

**Anexo 8.** Prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). Crecimiento radial de *P. palmivora* en cultivo dual.

Factor	Media	Agrupación
Testigo	42,5	A
Tr6	39,909	B
Tr8	39,46	B C
Tr9	39,224	B C
Tr7	39,153	B C
Tr11	38,598	B C D
Tr12	37,814	C D E
Tr2	37,81	C D E
Tr1	37,511	C D E
Tr3	36,956	D E
Tr5	36,85	D E
Tr10	36,704	E
Tr4	34,546	F

\*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Anexo 9.** Diferencias en los tiempos de siembra entre *P. palmivora* y aislamientos de *Trichoderma* spp.

Aislamiento	Crecimiento Inicial (mm)	Crecimiento Final (mm)	Tiempo Inicial	Tiempo Final	Velocidad de Crecimiento (mm/día)	Diferencia de Tiempo PCTU095 – <i>Trichoderma</i> spp. (días)	Diferencia de Tiempo PCTU095 – <i>Trichoderma</i> spp. (horas)
PcTu095	5	85,0	0	11	7,3		
Tr1	5,0	85,0	0	6	13,3	1,94	46,5
Tr2	5,0	85,0	0	7	11,4	1,5	36
Tr3	5,0	85,0	0	6	13,3	1,94	46,5
Tr4	5,0	85,0	0	4	20,0	2,4	57,6
Tr5	5,0	85,0	0	5	16,0	2,33	55,9
Tr6	5,0	85,0	0	6	13,3	1,94	46,5
Tr7	5,0	85,0	0	6	13,3	1,94	46,5
Tr8	5,0	85,0	0	7	11,4	1,5	36
Tr9	5,0	85,0	0	5	16,0	2,33	55,9
Tr10	5,0	85,0	0	5	16,0	2,33	55,9
Tr11	5,0	85,0	0	6	13,3	1,94	46,5
Tr12	5,0	85,0	0	5	16,0	2,33	55,9

**Anexo 10.** Análisis de varianza. Peso de micelio de *P. palmivora*. Propiedades antibióticas (metabolitos no volátiles).

Fuente	GL	SC. Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	12	608,99	50,7494	203,25	0,000
Error	64	15,98	0,2497		
Total	76	624,97			

**Anexo 11.** Prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). Peso de micelio de *P. palmivora*. Propiedades antibióticas (metabolitos no volátiles).

Factor	Media	Agrupación
Testigo	10,302	A
Tr4	6,245	B
Tr8	4,547	C
Tr6	1,827	D
Tr7	1,652	D E

Tr12	1,3528	D E F
Tr11	1,2308	D E F
Tr1	1,038	E F
Tr2	0,8307	E F
Tr5	0,77000	E F
Tr9	0,7633	E F
Tr10	0,5949	F
Tr3	0,4641	F

\*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Anexo 12. Análisis de varianza. Crecimiento radial de *P. palmivora*. Propiedades antibióticas (metabolitos volátiles).**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	12	728,8	60,731	27,96	0,00
Error	112	243,2	2,172		
Total	124	972			

**Anexo 13. Prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ). Crecimiento radial de *P. palmivora*. Propiedades antibióticas (metabolitos volátiles).**

Factor	Media	Agrupación
Testigo	42,5	A
Tr3	35,82	B
Tr2	34,875	B C
Tr12	34,852	B C
Tr1	34,804	B C
Tr4	34,801	B C D
Tr7	34,547	B C D
Tr10	34,520	B C D
Tr11	34,290	B C D
Tr9	33,538	C D
Tr5	33,295	C D
Tr8	32,863	C D
Tr6	32,392	D

\*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Anexo 14.** Resultados de inhibición de *P. palmivora* para cada uno de los mecanismos de antagonismo de los aislamientos de *Trichoderma* spp.

Competencia por sustrato		Interacciones micoparasiticas			Metabolitos no volatiles		Metabolitos volatiles	
Aislamiento <i>Trichoderma</i> spp.	PICR <i>P.palmivora</i>	Aislamiento <i>Trichoderma</i> spp.	Porcentaje hifas parasitadas de <i>P. palmivora</i>	Porcentaje esporangios parasitados de <i>P. palmivora</i>	Aislamiento <i>Trichoderma</i> spp.	% Inhibición Peso <i>P.palmivora</i>	Aislamiento <i>Trichoderma</i> spp.	PICR <i>P. palmivora</i>
Tr4	18,7%	Tr 2	55,0%	63,0%	Tr3	95,5%	Tr6	22,9%
Tr10	13,6%	Tr 3	20,0%	4,0%	Tr10	94,2%	Tr8	21,8%
Tr5	13,3%	Tr8	18,7%	2,8%	Tr9	92,6%	Tr5	20,7%
Tr3	13,0%	Tr 11	17,0%	10,5%	Tr5	92,5%	Tr9	20,1%
Tr1	11,7%	Tr10	13,2%	3,6%	Tr2	91,9%	Tr11	18,4%
Tr2	11,0%	Tr1	13,0%	1,0%	Tr1	89,9%	Tr10	17,8%
Tr12	11,0%	Tr 4	12,2%	8,4%	Tr11	88,1%	Tr7	17,7%
Tr11	9,2%	Tr9	12,1%	6,9%	Tr12	86,9%	Tr4	17,1%
Tr7	7,9%	Tr6	7,7%	0,0%	Tr7	84,0%	Tr1	17,1%
Tr9	7,7%	Tr7	4,6%	1,2%	Tr6	82,3%	Tr12	17,0%
Tr8	7,2%	Tr12	3,4%	4,8%	Tr8	55,9%	Tr2	17,0%
Tr6	6,1%	Tr5	3,2%	1,9%	Tr4	39,4%	Tr3	14,7%

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Adam, H., Jouannic, S., Escoute, J., Duval, Y., Verdeil, J. & Tregear, J. W. 2005. Reproductive developmental complexity in the African oil palm (*Elaeis guineensis*, Arecaceae). *American Journal of Botany*. Vol. 92(11): 1836-1852 p.
- Adams, P. 1990. The potential of mycoparasites for biological control of plants diseases. *Revista Phytopathol.* Vol. 28:59-72 p.
- Agamez, E., Zapata, R., Oviedo, L. & Barrera, J. 2008. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol. 10(2):23-34 p. Universidad Nacional de Colombia Bogotá, Colombia.
- Ahmad, J. & Baker, R. 1987. Rhizosphere Competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*. Vol. 77(2):182-189 p.
- Altieri, M.A. 2004. La agricultura moderna: Impactos ecológicos y la posibilidad de una verdadera agricultura sustentable. Department of Environmental Science, Policy and Management University of California.
- Arias, N., Sánchez, A., Guerrero, J.M., Aya, H., Martínez, G. & Beltrán, J.A. 2010. Guía de bolsillo para la ejecución de cirugías en palmas afectadas por la PC. Guía de bolsillo.
- Ariza, J., Sarria, G.A., Torres, G.A, Varón, F. & Martínez, G. 2008. Relación entre los síntomas externos y el avance interno de la lesión causada por la Pudrición del cogollo (PC) en palmas de vivero en Tumaco. *Fitopatología Colombiana*. Vol. 32 (2): 35-38 p.
- Arnold, E., Mejia, L., Kylo, D., Rojas, E., Maynard, Robbins & Allen, E. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical. *PNAS*, Vol. 100 (26):15649 – 16654 p.

Astudillo, M., Blanco, B., & Martínez, M. 1999. Establecimiento de parámetros de producción semi - industrial de *T. harzianum* usado en control biológico. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana (Colombia).

Aya, H. & Martínez, G. 2011 Manejo de la Pudrición del cogollo de la palma de aceite en el Campo Experimental Palmar de la Vizcaína. Revista Palmas Vol.32 (2) :35 - 43 p.

Bae, S.J., Mohanta, T.K., Chung, J.Y., Ryu, M., Park, G., Shim, S., Hong, S.B., Seo, H., Bae, D.W., Bae, I., Kim, J.J. & Bae, H. 2016. *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. Biological control. Vol. 92: 128 – 138 p.

Bailey, B., Bae, H., Strem, M., Roberts, D., Thomas, S., Crozier J., Samuels. G., Young Choi, I.K. & Holmes, A. 2006. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by in endophytic isolates of for *Trichoderma* species. Planta. Vol. 224: 1449 – 1464 p.

Benhamou, N. & Chet, I. 1997. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *P. ultimum*. Applied and Environmental Microbiology Vol. 63: 2095 – 2099 p.

Benítez, S., González, L. 2003. Aceleración de procesos de compostaje utilizando *Azobacter*, *Azospirillum*, *Lactobacillus*, *Saccharomyes* y *Trichoderma harzianum*. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

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

Cala, G. & Bernal, G. 2008. Procesos modernos de extracción de aceite de palma. Bogotá: Fedepalma, 2008. 153 p.

Calvo, J., Rivera, G., Orozco, S. & Orozco, R.2012. Aislamiento y evaluación *in vitro* de antagonistas de *Botrytis cinérea*. en mora. Costa Rica. Vol.23 (2): 225 – 231 p.

Camargo, H. 2005. Evaluación en campo de la incidencia de *Rhizoctonia solani* en arroz (*Oriza sativa*), luego de la inoculación en semillas de un formulado comercial a base de antagonista *Trichoderma harzianum*.

Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortes, C., Gutiérrez, A., Chet, I., & Herrera-Estrella, A. 1999. Role of *Trichoderma harzianum* Endochitinase Gene, ech42, in Mycoparasitism. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91125/>

Chet, I. & Benhamou, S.H. 1998. Mycoparasitism and lectin enzymes. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman GE, Kubice CP. (Eds.). Taylor & Francis Ltd., London. Vol. 2: 153p.

Cholango, P. 2009. Selección de cepas de *Trichoderma* sp. *in vitro*, para el control de problemas radiculares en flores de verano. Trabajo de grado. Escuela Politécnica del Ejército (Ecuador).

Claro, O. 2006. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV) Ciudad de La Habana, Cuba. Disponible en: <http://www.inisav.cu/OtrasPub/METODOS%20ARTESANALES%20DE%20PRODUCCION%20DE%20BIOPLAGUICIDAS.pdf>

Cobos, M. 2010. Evaluación de cepas nativas de *Trichoderma spp.* para el control de Sigatoka negra (*Paracercospora fijiensis* M.) en el cultivo de banano (*Musa paradisiaca*) en fase de laboratorio. Trabajo de grado. Escuela Politécnica del Ejército (Ecuador).

Corley, R. & Tinker, P. 2009. La palma de aceite, Cuarta edición. Blackwell Science, Ltd., Oxford, UK, 604 p.

DANE, 2016. Cuentas trimestrales – Colombia Producto Interno Bruto. Boletín Técnico.

De Franqueville, H.2001. La Pudrición del cogollo de la palma aceitera en América Latina. Revisión preliminar de hechos y logros alcanzados. Cirad. 35 p.



Deacon, J. 1991. Significance of ecology in the development of biocontrol agent against soil – borne plant pathogens. *Biocontrol Science and Technology*. Vol. 1 (1): 5-20 p.

Díaz, J. 1994. Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* y su posible uso como biocontrol. Trabajo de grado. Universidad Agraria de la Habana (Cuba). Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2893/1/T-ESPE-IASA%20II-002325.pdf>

Domsch, K., Gams, W., Anderson, T. 2007. *Compendium of Soil Fungi*. IHW – Verlag (eds). London. 672 p.

Dransfield, J. & Uhl, N.W. 1998. Families and genera of vascular plants, flowering plants: monocotyledons. Springer-Verlag. Berlín (Alemania). 306-389 p.

Dransfield, J., Uhl, N.W., Asmussen, C.B., Baker, W.J., Harley, M.M. & Lewis, C. E. 2008. *Genera palmarum: The evolution and classification of palms*. Kew Publishing. United Kingdom. 732 p.

Drenth, A. & Guest, D.I. 2004. Diversity and Management of *Phytophthora* in Southeast Asia. *ACIAR Monograph N° 114* - 238 p.

Drente, A., & Guest, D.I. 2010. *Phytophthora: The plant destroyer*. Colombia. *Revista Palmas*. Vol.34:49 – 56 p.

Drenth, A. & Sendall, B. 2001. Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. Brisbane, Australia. CRA for Tropical Plant Protection. 41 p.

Drenth, A., Torres, G.A. & Martínez, G. 2013. *Phytophthora palmivora* la causa de la pudrición del cogollo en la palma de aceite. Colombia. *Revista Palmas*. Vol. 2:87-94 p.

Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G. & Kubicek, C. P. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* Vol. 47: 55-64 p.

Elad, Y., Zimand, G., Zaqs, Y. & Chet, I. 1993. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to the control of cucumber grey mould (*Botrytis cinérea*), under commercial greenhouse conditions. *Plant Pathology*. Vol. 42: 324 – 332 p.

Erwin D.C. & Ribeiro O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society, St. Paul.

Erwin, D.C., Bartnicki, S., and Tsao, P.H., 1983. *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 17. Tuset, J.J. 1983. La “gomosis” y “podredumbre del cuello de la raíz” de nuestros agrios. I. Aspectos biológicos y patológicos. *Levante Agrícola*, No 246: 90-96.

Ezziyani, M., Pérez, C., Sid Ahmed, A, Requena, M.E., Candela, M.E. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). *Anales de Biología*. Vol. 26: 35 – 45 p.

FEDEPALMA – Federación Nacional de Cultivadores de la Palma de Aceite. 2016. Desempeño del sector palmero colombiano.

FEDEPALMA – Federación Nacional de Cultivadores de la Palma de Aceite – SISPA - Sistema de Información Estadística del Sector Palmero. 2016. Áreas en desarrollo y producción.

FEDEPALMA – Federación Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite. 2009. Cultivo de Palma de aceite modelo de desarrollo sostenible. En: Taller de Desarrollo Rural en Colombia Presidencia Francesa. Bogotá: 27 de octubre de 2009.

Gallegly, M.E. & Hong, C. 2008. *Phytophthora: Identifying species y morphology and DNA fingerprints*. The American Phytopathological Society, St. Paul.

Gams, W. & Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Harman G.E., Kubicek C.P., editors. *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis, London. Vol.2: 393 p.

Guigón, C. & González, P.A. Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. Con actividad antifúngica sobre *Phytophthora capsici* L. y promotoras del crecimiento en el cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 22: 117 – 124 p.

Harman, G. Myths and Dogmas of Biocontrol Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T – 22. Plant Disease. Vol. 84 (4): 377 – 393 p.

Harman, G. 2001. *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other sp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system). Cornell University (New York).

Harman, G. & Kubicek, C. P. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*, Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. London. Vol. 2:393 p.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Rev. Microbiol. Vol. 2:43-56 p.

Hernández, J.L., Sánchez, M.I, García, J.G., Pérez, N.M, González, J.M. & Velásquez, J.2011. Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma* spp nativos del noreste de México.

Herrera, J., Pérez, M., Llobel, A., Monte, E. & Zea, T. 1999. Estudios in vivo de *Trichoderma* como agente de biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en aguacate. Revista Chapingo Serie Horticultura Vol. 5: 261-265 p.

Hjeljord, L. & Tronsmo, A.1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman, G.E. & Kubice, C.P. (Eds). London. Vol.2: 131 – 151 p.

Howell, C.R. 1998. The role of antibiosis in biocontrol. *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman, G.E. & Kubicek, C.P. (Eds). London. Vol.2: 173 – 184 p.

Humeres, C. 2004. Evaluación de la capacidad biocontroladora de dos cepas nativas de *Trichoderma spp.* sobre hongos aislados de basidiomicetes asociados a muerte de brazos en kiwi. Trabajo de grado. Universidad de Talca (Chile). Disponible en: <http://dspace.otalca.cl/retrieve/2961/CHumeresV.pdf>

Infante, D., Martínez, B., González, N. & Reyes, Y. 2009. Mecanismo de acción de *Trichoderma sp.* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.* 24(1): 14 – 21 p.

Jaklitsch, W. & Voglmayr, H. 2014. New combinations in *Trichoderma* (Hypocreaceae, Hypocreales). *Mycotaxon* 126: 143–156 p.

Lo, C.T., Nelson, E.B., Hayes, C.K. & Harman, G.E. 1998. Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295 – 22 in the rhizosphere on the phylloplane of creeping bentgrass. *Rev. Phytopathology*. Vol. 88: 129 – 136 p.

Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B. & Kubicek, C.P., 1996. Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.* Vol. 178: 6382 – 6385 p.

Lorito, M., Harman, G.E. Hayes, C. K, Broadway, R.M., Transmo, A., Woo, S.L., & Di Prieto, A. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*. Vol. 83: 302-307 p.

Machado, M., Peña, M., Coto, C., López, M.O., Zamora, V., Cabrera, R.I. & Aranguren, M. 2008. Caracterización morfológica y fisiológica de *Phytophthora spp.* aisladas de plantas de aguacatero con síntomas de marchitez. *Revista Citrifut.* Vol.25 (2): 49 – 56 p.

Martínez, G. & Torres, G.A. 2007. Presencia de la Pudrición del Cogollo de la palma de aceite (PC) en plantas de vivero. Colombia: Revista Palmas. Vol. 28 (4): 13 – 20 p.

Martínez, G., Arias, N., Sarria, G.A., Torres G.A., Varón, F., Noreña, C. & Burgos, C.A. 2009a. Manejo integrado de la Pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite. Cartilla Cenipalma. 24 p.

Martínez, G., Sarria, G.A., Aya, H., Ariza, J., Rodríguez, J., Vélez, D. & Varón, F. 2008. *Phytophthora* sp. es el responsable de las lesiones iniciales de la Pudrición del cogollo de la palma de aceite en Colombia. En: Memorias de la VIII Reunión Técnica Nacional de Palma de Aceite. Bogotá: Compensar, 22 - 24 de septiembre.

Martínez, G., Sarria, G.A., Torres, G.A., Varón, F., Romero, H.M. & Sanz, J.I. 2009b. Advances in the research of *Phytophthora palmivora* the causal agent of bud rot of oil palm in Colombia. In: Proceedings Malaysian Palm Oil Board-PIPOC. 12 p.

Martínez, G. 2009. Identificación temprana y manejo integrado de la enfermedad Pudrición del Cogollo. Colombia. Revista Palmas. Vol.30 (2):63 – 77 p.

Martínez, G. 2009. Pudrición del cogollo, Marchitez sorpresiva, Anillo rojo y Marchitez letal en la Palma de aceite en América. Colombia. Revista Palmas. Vol.31 (1): 43 – 53p.

Mingorance, F. 2006. El flujo de la palma del aceite de palma Colombia – Bélgica/ Europa Acercamiento de una perspectiva de derechos humanos. Colombia: Human Rights Everywhere.

Miranda, D., Martínez, B., 1996. Aplicación de la metodología de superficie respuesta en la optimización de crecimiento y esporulación de *Trichoderma* sp. Departamentos de informática y matemática aplicada y fitopatología. Centro nacional de sanidad agropecuaria. La Habana, Cuba. Disponible en: <http://www.cenicafe.org/modules.php?name=cenicafeAcademico&file=viewpdf>

Monte, E. 2001. Understanding *Trichoderma*: Between biotechnology and microbial ecology. Int. Microbiol. Vol. 4:1- 4 p.

Moore, E. 1996. Fundamentals of the fungi. Fourth edition. Prentice Hall. New Jersey. 574 p.

Morales, L.C., Sarria, G.A., Torres, G., Varón, F. & Martínez. 2009. Experiencias en el manejo integrado de la Pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite en la zona central colombiana. Fitopatología Colombia. Vol. 32(2): 57 – 61 p.

Nighan, M. & Mukerji, K.G. 1988. Biological control. Concepts and practices. Biocontrol of plant diseases. Vol.1: 2 – 9 p.

Noreña, C., Aya, H., Lemus, L., Torres, G.A, Varón, F. & Martínez, G. 2011. Evaluación de tratamientos químicos y prácticas culturales del manejo de la Pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite en plantas de vivero, en Tumaco. Colombia. Revista Palmas. Vol. 32(2): 27 – 32 p.

Omoti, U. 2004. La palma de aceite en África: evolución durante la última década, tendencias y nuevos retos. Colombia. Revista Palma. Vol.25: 147 – 169p

Páez, J.I., Berra, D., Vega, M. & Tello, J. 1993. Identificación de *Phytophthora palmivora* Butler en los jardines de la Exposición Universal de Sevilla. Rev. Bol. San. Veg. Plagas. Vol.19:633 – 647.

Papavizas G.C & Lumsden R. D. 1980. Biological control of soil borne fungal propagules. Annual Review of Phytopathology. Vol. 18: 389-413 p.

Pérez, M.I., Peñaranda, L.F. & Herazo, M.M. 2010. Impacto, manejo y control de enfermedades causadas por *Phytophthora palmivora* en diferentes cultivos. Trabajo de grado. Universidad de Pamplona.

Prada, F. & Romero H.M. 2012. Muestreo y análisis de racimos en el cultivo de la palma de aceite. Tecnologías para la agroindustria de la palma de aceite: Guía para facilitadores. 158 p.

Ribeiro, O.K. 1983, Physiology of asexual sporulation and spore germination in *Phytophthora*. En: Erwin, DC.; Bartnicki-Garcia, S.; Tsao, PH. (eds.). *Phytophthora*.

Its biology, taxonomy, ecology and pathology. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, Estados Unidos. 55-70 p.

Rodríguez., Vélez, D, Sarria, G.A., Torres, G.A., Noreña, C., Navia, M., Romero, H.M., Varón, F. & Martínez, G. 2009. Identificación morfológica, molecular y patogénica de microorganismos asociados a la Pudrición de cogollo de la palma de aceite en Colombia. Fitopatología Colombia. Vol. 33 (2): 49 – 56 p.

Samson, R., Hoekstra, E. & Frisvad, J. 2004. Introduction to food and airborne fungi. Séptima edición. Centraalbureau Voor Schimmelcultures. Utrecht, Países Bajos. 389 p.

Samuels, G. 1996. Trichoderma: a review of biology and systematics of the genus. Mycol Vol. 100 (8) :923-935 p.

Sánchez, A. C., Guerrero, J. M., Arias, N., & Beltrán, J. A. 2010. Resultados de la prueba piloto para el manejo de la Pudrición del cogollo en el Campo Experimental El Palmar de La Vizcaína: una herramienta para la transferencia y adopción de tecnología. Colombia. Revista Palmas. Vol. 31 (2): 13-26 p.

Sánchez, M. 2009. Aislamiento y caracterización molecular y agronómica de *Trichoderma* spp. nativos del norte de Tamaulipas. Trabajo de grado. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica.

Sarria, G.A., Aya, H., Ariza, J., Rodríguez, J., Vélez, D., Varón, F. & Martínez, G. 2008. *Phytophthora* sp., es el responsable de las lesiones iniciales de la Pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite en Colombia. Colombia. Revista Palmas. Vol. 29 (3): 31-41 p.

Sarria, G.A., Martínez, G., Varón, F., Drenth, A. & Guest, D.I. 2015. Histopathological studies of the process of *Phytophthora palmivora* infection in oil palm. Eur. J. Plant Pathol. 10.1007/s10658-015-0810-9.

Schirmbock, M., Lorito, M., Wang, Y.L., Hayes, C.K., Arisan- Atac, I., Scala, F., Harman, G.E. & Kubicek, C.P., 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the

antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. Microbiol. Vol.60: 4364 – 4370 p.

Sid Ahmed, A., Ezziyani, M., Pérez, C. & Candela M.E. 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. European Journal of Plant Pathology. Vol.109: 418 - 426 p.

Sid Ahmed, A., Pérez, C. & Candela, M. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. European Journal of Plant Pathology. Vol. 106: 817-824 p.

Sriwati, R., Melnick., Muarif, R., Strem, M.D., Samuels, G. J & Bailey, B.A. 2015. *Trichoderma* from Aceh Sumatra reduce *Phytophthora* lesions on pods and cacao seedling. Biocontrol. Vol.89: 33 – 41 p.

Stamps, J. 1998. *Phytophthora palmivora*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. United Kingdom. Commonwealth Mycological Institute Vol.: 84.

Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga, L. & Coronado, M.F. 1999. Actividad metabólica de *Trichoderma* spp. para el control de fitopatógenos del suelo.

Torres, G.A., Sarria, G.A., Varón, F., Coffey, M.D., Elliott, M., Martínez, G., 2010. First report of bud rot caused by *Phytophthora palmivora* on African oil palm (*Elaeis guineensis*), in Colombia. Plant Disease 94 (9):1163.

Thines, M. 2014. Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes – a global overview. Eur J Pathol. Vol. 138: 431 – 447p.

Torres, G.A, Acosta, J., Ariza, J., Aya, H., Roa, M., Vélez, D. & Martínez, G .2008. Papel de las palmas espontáneas como hospedero alternativo de *Phytophthora* sp., agente causal de la Pudrición del cogollo (PC), de la palma de aceite en Colombia. Colombia. Revista Palmas. Vol. 29 (3): 45-52 p.



Torres, G.A, Sarria, G.A. & Martínez, G. 2014. Identificación temprana y manejo de la Pudrición del cogollo de la palma de aceite. Cenipalma. Bogotá D.C., Colombia. Guía para facilitadores.76 p.

Tovar, J. 2008. Evaluación de la capacidad antagonista *in vivo* de aislamientos de *Trichoderma* spp. frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Trabajo de grado. Universidad Pontificia Javeriana (Colombia). Disponible en [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522009000100002&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522009000100002&script=sci_arttext)

Valencia, J.C & Castro & B.L. 2004. Estudios de algunos aspectos biológicos de aislamientos de *Trichoderma* sp. antagónicos de *Rosellinia bunodes*. Cenicafé. Vol. 55 (1): 16 – 28p.

Vargas, W.A., Mukherjee, P.K., Laughlin, D., Wiest, A., Moran-Diez, M.E.& Kenerley, C.M.2014. Role of gliotoxin in the symbiotic and pathogenic interactions of *Trichoderma virens*. Microbiology. Vol.160: 2319 – 2330 p.

Vélez, D., Noreña, C., Torres, G.A, Varón, F & Martínez, G. 2008. Evaluación y cuantificación de estructuras de *Phytophthora palmivora* el responsable de la Pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite. Fitopatología Colombiana. Vol. 32 (2): 45-50 p.

Wakelin, S.A., Sivasithamparam, K., Cole, A.L.J. & Skipp, R.A.1999. Saprophytic growth in soil of a strain of *Trichoderma koningii*. New Zealand Journal of Agricultural Research. Vol. 42 (3): 337 – 345 p.

Warham, E.D, Bacon, L.D., Hinton, D.M. 1997. Ensayos para la semilla del maíz y de trigo. Manual de laboratorio. Sistemas sostenibles de maíz y trigo CIMMYT (México, D.F). 84 p.

Widmer, T. & Shishkoff, N. (2017). Reducing infection and secondary inoculum of *Phytophthora ramorum* on *Viburnum tinus* roots grown in potting medium amended with *Trichoderma asperellum* isolate 04 – 22. Biological control. Vol. 107: 60 – 69 p.

Yedidia, I., Benhamou, N. & Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 65:1061 - 1070 p.

Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y. & Chet, I. 2000. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. Plant Physiol. Biochem. Vol.38: 863-873 p.