

Muerte repentina de *Theobroma cacao* L. causado por *Verticillium dahliae* Kleb. en el Perú y su biocontrol *in vitro*

Sudden death of *Theobroma cacao* L. caused by *Verticillium dahliae* Kleb. in Peru and its *in vitro* biocontrol

Betsabe Leon - Ttacca,^{1*} Enrique Arévalo - Gardini², Anne-Sophie Bouchon³

¹ Investigador, Universidad Nacional del Altiplano Puno y Universidad Nacional de Cañete, Instituto de Cultivos Tropicales, Departamento de Fitopatología. San Martín, Perú.

Correo: betsalet@yahoo.es

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-4343-2431>

² Investigador y coordinador, Universidad Nacional Agraria La Molina, Universidad Nacional Autónoma del Alto Amazonas, Instituto de Cultivos Tropicales. San Martín, Perú.

Correo: enriquearevaloga@gmail.com

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-1725-6788>

³ Estudiante de PhD, University of Aberdeen, School of Biological Sciences.

Correo: anne_sophie.bouchon@yahoo.fr

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-2236-701X>

Editor temático: Leonora Rodríguez Polanco (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [AGROSAVIA])

Fecha de recepción: 03/05/2017

Fecha de aprobación: 20/04/2018

Para citar este artículo: Leon-Ttacca, B., Arévalo-Gardini, E., & Bouchon, A. (2019). Muerte repentina de *Theobroma cacao* L. causado por *Verticillium dahliae* Kleb. en el Perú y su biocontrol *in vitro*. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 20(1), 117-132

DOI: https://doi.org/10.21930/rcta.vol20_num1_art:1251



Esta licencia permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de la obra de modo no comercial, siempre y cuando se dé el crédito y se licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

* Avenida Circunvalación Sur N.º 1522 Int. A, Barrio Santa Rosa, Puno, Perú.

Resumen

En el sector Atusparia, Tocache, de la Región de San Martín, Perú, plantas de *Theobroma cacao* L. (Malvaceae) clon CCN-51 de dos años de edad presentaron, por primera vez en enero de 2010, síntomas de amarillamiento en hojas, marchitez y muerte, e internamente obstrucción del sistema vascular. Para el aislamiento del agente causal, tejidos enfermos fueron sembrados en placas Petri que contenían medio papa dextrosa agar oxitetraciclina, cuya identificación fue con base en un análisis morfológico, microscópico y secuenciación de Sanger. Las pruebas de patogenicidad se hicieron en *T. cacao* clon ICS-1 con edad de tres meses, inoculadas con una suspensión de conidias de 1×10^7

ufc/mL por dos métodos de inoculación (*Drench* al suelo y punción en el tallo). La capacidad antagónica (micoparasitismo y antibiosis) se determinó *in vitro* con aislamientos de *Trichoderma* endófito sobre el patógeno. En ambos métodos de inoculación, se observaron síntomas de marchitez de diferentes grados de severidad y se confirmó que el agente causal de la muerte súbita del *T. cacao* fue el hongo *Verticillium dahliae* Kleb. El análisis de la secuencia BLAST reveló que el aislamiento tuvo un 100 % de homología con las secuencias de *V. dahliae* en GenBank. El *Trichoderma* TE-91 fue identificado como el micoparásito más agresivo, debido a que sus metabolitos inhibieron completamente el crecimiento micelial del patógeno.

Palabras clave: control biológico, endófito, marchitez, *Trichoderma*

Abstract

In the Atusparia sector, Tocache, of the San Martín region in Peru, two-year-old plants of *Theobroma cacao* L. (Malvaceae) of the CCN-51 clone showed for the first time in January 2010, symptoms of leaf yellowing, wilt and dieback, with an internal obstruction of the vascular system of the plant. To isolate the fungus, diseased tissues were cultured in Petri dishes containing potato dextrose agar oxytetracycline, and the identification was based on morphological and microscopic analyses and by the Sanger sequencing. Pathogenicity tests were carried out on three-months-old *T. cacao* ICS-1 clone plants and were inoculated with a conidia suspension of 1×10^7 cfu/mL employing two inoculation methods

(*Drench* to the soil and stem puncture). Likewise, the antagonistic capacity (mycoparasitism and antibiosis) was established *in vitro* with endophytic *Trichoderma* isolates on the pathogen. With both inoculation methods symptoms of wilt of different degrees of severity were observed and the causal agent of sudden death in *T. cacao* was confirmed to be the fungus *Verticillium dahliae* Kleb. BLAST sequence analysis revealed that the isolate showed 100 % homology with *V. dahliae* sequences in GenBank. *Trichoderma* TE-91 was identified as the most aggressive mycoparasite because its metabolites inhibited completely the mycelial growth of the pathogen.

Key words: biological control, endophyte, wilt, *Trichoderma*

Introducción

El *Theobroma cacao* L. (Malvaceae) es una especie vegetal con centro de origen en los bosques húmedos de América del sur; sus granos y derivados son un insumo básico para la industria del chocolate, cosmética y farmacéutica (Zhang & Motilal, 2016). Las tres principales enfermedades del *T. cacao* que limitan la producción mundial son la pudrición parda (causado por *Phytophthora* spp.), moniliasis (*Moniliophthora roreri*) y escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) (Bailey & Meinhardt, 2016). Estos fitopatógenos son capaces de limitar significativamente la producción comercial y reducir los rendimientos en un 20%; por ejemplo, la disminución de la producción de *T. cacao* en el 2012 se estimó en 1,3 millones de toneladas de grano seco (Bailey & Meinhardt, 2016). Otra enfermedad que limita severamente la producción en Uganda, Brazil y Colombia es la muerte repentina del *T. cacao* causado por *Verticillium dahliae* Kleb (Resende, Flood, & Cooper, 1994).

Las especies *V. dahliae* y *V. albo-atrum* son altamente patogénicas al causar marchitez en más de 200 especies de plantas, incluyendo cultivos importantes desde el punto de vista económico (Pegg & Brady, 2002; Schnathorst, 1981). *Verticillium dahliae* ocasiona pérdidas en los rendimientos de hasta el 80%, siendo su control un desafío debido a que su patogenicidad es altamente variable y por su gran capacidad de supervivencia (Wang et al., 2016).

Actualmente, no hay un manejo o tratamientos de biocontrol para las plantas infectadas, ni existen fungicidas efectivos disponibles para controlar la marchitez por *Verticillium*, siendo la prevención el único método efectivo para evitar pérdidas (Yildiz & Benlioglu, 2010; Yuan et al., 2017). Las medidas de control y prevención actualmente disponibles no son completamente exitosas cuando se aplican individualmente. Por lo tanto, la única forma de controlar eficazmente la enfermedad en los campos agrícolas es a través del manejo integrado para reducir la enfermedad hasta niveles de coexistencia (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011).

Una estrategia ecológica prometedora dentro del manejo integrado de las enfermedades es el uso de hongos endófitos del cultivo de interés, ya que estos son taxonómica y biológicamente diversos, colonizan los tejidos internos de las

plantas sin causar síntomas visibles y pueden mejorar el crecimiento y la salud de las plantas, así como inducir la producción de compuestos y activar algunos genes implicados en respuestas de defensa de las plantas a factores bióticos y abióticos (Bae et al., 2009; Bailey et al., 2008; De Souza et al., 2008; Hanson & Howell, 2004). Entre los principales endófitos usados como agentes de control biológico, están algunas especies del género *Trichoderma*, consideradas antagonistas naturales de fitopatógenos, ampliamente utilizados en la agricultura, que contribuyen al mejoramiento del crecimiento y desarrollo de las plantas (Guédez, Cañizález, Castillo, & Olivares, 2009; Harman, 2006; Junaid, Dar, Bhat, Bhat, & Bhat, 2013; Toghueo et al., 2016). En *T. cacao*, recientes estudios han mostrado que hongos endófitos pueden limitar el daño por *M. perniciosa*, *M. roreri* y *Phytophthora palmivora* (Bailey et al., 2008; De Souza et al., 2008; Mejía et al., 2008).

En Perú, personal del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT) realizó una expedición en la región del Alto Amazonas en el 2008, con el propósito de buscar endófitos coevolucionados con los patógenos, obteniendo una colección diversa con 126 aislamientos de *Trichoderma* de tallos y hojas (Márquez et al., 2010). Solo un número pequeño de aislamientos de *Trichoderma* spp. de la colección ha sido estudiado para determinar su habilidad endofítica y de biocontrol de los principales patógenos del cacao (Arévalo, Canto, Leon, & Meinhardt, 2010a; Arévalo, Canto, Leon, Meinhardt, & Cayotopa, 2010b; Leon et al., 2010a; Leon, Rojas, Rodríguez, Arévalo, & Márquez, 2010b).

Verticillium dahliae no ha sido confirmada en el Perú, por lo que se procedió al aislamiento del agente causal a partir de plantas de *T. cacao* clon CCN-51 de dos años de edad, colectadas en el sector Atusparia, Tocache, de la Región de San Martín, Perú, y que presentaron por primera vez en enero del 2010 síntomas de amarillamiento de hojas, marchitez generalizada y muerte, e internamente obstrucción del sistema vascular. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue identificar y caracterizar el agente causal de la muerte repentina del *T. cacao* y determinar la capacidad antagonica *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* endófito sobre el agente causal.

Materiales y métodos

Localización del experimento

Este trabajo de investigación fue realizado en el vivero y en el laboratorio de Fitopatología de la Estación experimental Juan Bernito del ICT, ubicado en el distrito de La Banda de Shilcayo, Provincia y Región de San Martín, Perú, a 76°00'18" O y 06°00'28" S, a una altitud de 315 m s. n. m. La temperatura, humedad relativa y precipitación media fueron de 25 °C, 73 % y 1.188 mm, respectivamente.

Material vegetal

Para el aislamiento e identificación del agente causal se utilizaron muestras de tejidos afectados con síntomas de muerte y plantas “muerte súbita” característicos de *Verticillium*, colectadas en enero del 2010 en una plantación de cacao CCN-51 de dos años de edad del Sector Atusparia, Distrito y Provincia de Tocache de la Región de San Martín, Perú. En esta plantación, el 5 % de las plantas exhibían síntomas de amarillamiento de hojas, marchitez generalizada y muerte de la planta. Al realizar cortes transversales del tallo, internamente se observó obstrucción vascular en forma de puntos, mientras que en los cortes longitudinales se observaron estrías marrones en el sistema vascular. Las muestras fueron llevadas al laboratorio de Fitopatología del ICT para realizar su aislamiento e identificación.

Aislamiento e identificación

El aislamiento del agente causal fue obtenido a partir de tejidos segmentados del tallo, raíz y cuello de plantas enfermas. Los segmentos fueron lavados con agua y desinfectados con hipoclorito de sodio al 1 % durante 10 minutos, para eliminar microorganismos superficiales; además, fueron lavados con agua destilada estéril y colocados sobre papel toalla para su secado. De cada segmento se cortaron porciones de 1 cm, que fueron sembradas en cajas Petri conteniendo medio Papa Dextrosa Agar con Oxitetraciclina (PDAO), e incubados por 7 días a 25 °C (Resende, Flood, & Cooper, 1995). Las placas fueron sometidas a iluminación

artificial a temperatura ambiente de 28 °C ± 0,57 °C y humedad relativa de 70 % ± 1,71 % durante 10 días ± 1 para favorecer la esporulación de los hongos. La identificación taxonómica del hongo se hizo por observación de las características morfológicas macroscópicas de la colonia (aspecto y coloración) y las características morfológicas microscópicas (tipo y tamaño de las estructuras vegetativas y de reproducción). Las claves de Barnett y Hunter (1998), Barron (1968) y Watanabe (2010) fueron empleadas para la identificación.

Asimismo, la identificación del aislamiento se realizó por secuenciación de Sanger. Para ello, el aislamiento se cultivó en matraces que contenían 50 mL de caldo papa dextrosa (PDB, 24 g/L) a 25 °C, hasta que el micelio colonize la superficie del caldo. El micelio fue lavado, filtrado y almacenado a -20 °C hasta la extracción del ADN. El micelio se trituró en nitrógeno líquido y el ADN se extrajo utilizando el kit DNeasy PowerPlant Pro (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los partidores ITS1/ITS4 (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990) se usaron para amplificar el ADN. La mezcla de PCR se preparó usando PCR Master Mix 2x (Promega, EE. UU.), en un volumen final de 25 µL que contenía agua Milli-Q, 1x PCR MasterMix, 0,5 µM de cada partidor 5' a 3' (directo), 5' a 3' (inverso) y 2 µL de ADNc.

La PCR se realizó en un termociclador Techne TC-412 (Techne). Las condiciones fueron 94 °C por 2 minutos, seguidas de 35 ciclos de 94 °C durante 10 segundos, 54 °C durante 30 segundos y 72 °C por 1 minuto, con una fase de elongación final de 72 °C durante 10 minutos. Los amplicones se controlaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % antes de la purificación, usando el kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen, Alemania). Los amplicones se secuenciaron en ambas direcciones, haciendo uso de la secuenciación de Sanger (GATC Biotech, Konstanz, Alemania). Las secuencias recortadas y alineadas con BioEdit Sequene Alignment Editor (Hall, 1999) se compararon con las accesiones de *V. dahliae* en GenBank utilizando la herramienta Nucleotide BLAST.

Prueba de patogenicidad

Para la realización de la prueba de patogenicidad, se desarrolló el inóculo de *V. dahliae* a partir de un cultivo joven en medio PDAO. Tres discos de medio colonizado con el hongo (6 mm de diámetro) fueron colocados en 100 mL de caldo papa con 2% de dextrosa, e incubado en agitación a 110 rpm a temperatura ambiente (27 °C), durante una semana, para favorecer el desarrollo del hongo. Para remover el micelio formado y obtener la suspensión de esporas empleada como inóculo, el caldo fue filtrado a través de cuatro capas de gasa estéril, cuyo inóculo obtenido se ajustó a una concentración de 10^7 ufc/mL (Resende et al., 1995). Para la inoculación del patógeno se emplearon 40 plantas procedentes de semillas de *T. cacao* ICS-1 de tres meses de edad (Resende et al., 1994, 1995), crecidas en suelo estéril contenido en bolsas de polietileno negro. El suelo fue autoclavado a 121 °C y 15 lb/pulg² durante dos días consecutivos, por 45 y 30 min (Ormeño-Orrillo & Dávila, 1999). Dos métodos de inoculación fueron evaluados: a) vía *Drench* al suelo, se inoculó con 50 mL de la suspensión de conidias (10^7 ufc/mL) alrededor del cuello de la raíz de 20 plantas (Resende et al., 1995); b) punción en el tallo, con la ayuda de una aguja estéril se realizaron heridas en cuatro puntos en el tallo a una profundidad de 2 mm (dos sobre la yema de las hojas cotiledonales y dos sobre la yema de las primeras hojas verdaderas), y se inocularon 5 µL de suspensión de conidias en cada herida localizada de 20 plantas (Trapero,

Díez, Rallo, Barranco, & López-Escudero, 2013). Las plantas fueron mantenidas en el invernadero del Laboratorio de Fitopatología del ICT, a temperatura de 28 °C ± 0,57 °C, humedad relativa de 70 % ± 5,71 % y condiciones de suelo a capacidad de campo (Resende et al., 1995).

Por otra parte, se evaluó la severidad de la enfermedad con una escala de 0 a 6 (Villarreal-Zaballos, Feng, Iglesias, du Toit, & Correll, 2012), en la que 0 = sin síntomas; 1 = entre 0 y 10% de clorosis o necrosis en la planta; 2 = entre el 10 y el 25% de clorosis o necrosis; 3 = entre el 25 y el 50% de clorosis o necrosis; 4 = entre el 50 y el 75% de clorosis o necrosis; 5 = entre el 75 y el 100% de clorosis o necrosis, y 6 = planta muerta. El reaislamiento del patógeno se realizó a partir de secciones (raíz y tallo) de tejidos de las plantas, en las que se lograron observar los síntomas de la enfermedad, siguiendo la misma metodología de aislamiento descrita con anterioridad.

Trichoderma endófito

Los aislamientos de *Trichoderma* endófito (TE) empleados en este estudio son parte de la colección del ICT. Diez aislamientos de TE (tabla 1), con capacidad endofítica (Arévalo et al., 2010b) y antagonista contra *Moniliophthora perniciosa*, *M. roreri* y *Phytophthora palmivora* (Arévalo et al., 2010a; Leon et al., 2010a, 2010b), fueron seleccionados para determinar la capacidad antagonista contra *V. dahliae*.

Tabla 1. Origen de aislamientos de *Trichoderma* endófitos (TE), aisladas de tallo y hoja de genotipos nativos de cacao de localidades de la región del Alto Amazonas, Perú, en 2008

N.º	Aislamiento	Órgano	Localidad	Especie
1	TE-17	Tallo	Pastaza	<i>T. brevicompactum</i>
2	TE-22	Tallo	Ungumayo	<i>T. virens</i>
3	TE-50	Tallo	Urituyacu	<i>T. harzianum</i>
4	TE-55	Tallo	Urituyacu	<i>T. harzianum</i>
5	TE-68	Tallo	Charupa	<i>T. harzianum</i>
6	TE-72	Tallo	Ungurahui	<i>T. atroviride</i>
7	TE-76	Tallo	Ungumayo	<i>T. harzianum</i>
8	TE-91	Hoja	Charupa	<i>T. asperellum</i>
9	TE-103	Hoja	Urituyacu	<i>T. aggressivum</i>
10	TE-126	Tallo	Ungurahui	<i>T. atroviride</i>

Fuente: Elaboración propia

Antibiosis

Metabolitos inhibitorios solubles fueron producidos en tres caldos de cultivo y la prueba de antibiosis fue adaptada al método descrito por Bailey et al. (2008). Los aislamientos de *Trichoderma* fueron sembrados en placas Petri de 90 cm de diámetro, conteniendo medio de cultivo Extracto Malta Agar (EMA) e incubados a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante cinco días. A partir de estos cultivos se obtuvo una suspensión de conidias por adición de agua destilada estéril (ADE) a cada placa. Para este ensayo, se utilizaron tres caldos de cultivo: 1) a base de mínimo en sales (MIN), 2) extracto de malta (CEM) y 3) papa sacarosa (CPS). Para cada caldo se adiciono 1 mL de suspensión de conidias (10^6 UFC/mL-) por cada 100 mL; fue incubada a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación a 110 rpm durante una semana. Los micelios fueron filtrados a través de una capa de algodón estéril y lo obtenido fue centrifugado por 20 minutos a 2.500 rpm. El sobrenadante fue conservado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser utilizado.

Antes de ser incorporado al medio, el filtrado centrifugado fue colocado en baño María a $90\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ por dos horas para inactivar las enzimas; después, se agregó un volumen igual de medio PSA con agar solidificado (3%) en las cajas Petri. Una rodaja de 4 mm de diámetro de medio con el patógeno desarrollado, de una colonia de cinco días de edad, fue colocada al centro de la caja Petri. Se registraron la inhibición del crecimiento micelial del patógeno cuando el testigo cubrió toda la caja (Osorio Hernández et al., 2016).

Micoparasitismo

Para esta prueba, se utilizó el método de placa precolonizada, descrito por Bailey et al. (2008). Un trozo de inóculo de $2,5 \times 0,5$ cm fue extraído de un cultivo joven de cada aislamiento de *Trichoderma* y localizado en un extremo de la placa, conteniendo medio papa dextrosa agar con oxitetraciclina (PDAO) precolonizadas por *V. dahliae*. Tres placas fueron utilizadas como repeticiones. Las cajas Petri fueron incubadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad. Dos semanas después se realizó el reaislamiento de los hongos. Un total de ocho muestras (discos de medio) de cada caja o réplica fueron removidos

con un sacabocado de 5 mm de diámetro, a partir del punto de donde se sembró el patógeno. Estas muestras fueron localizadas en cajas Petri con medio PDAO e incubadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad; a los 14 días, se observó el crecimiento de *Trichoderma* y el patógeno, y se determinó el porcentaje de colonización del biocontrol *Trichoderma* sobre discos de medio con el patógeno.

Análisis estadístico

Las pruebas de antibiosis y micoparasitismo fueron establecidas bajo un diseño experimental completamente al azar (DCA). Diez tratamientos fueron evaluados y correspondieron a los aislamientos de *Trichoderma* endófitos seleccionados. Tres repeticiones por tratamientos fueron realizadas. Los parámetros evaluados fueron el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y colonización por *Trichoderma* del micelio precolonizado por *V. dahliae*. Los datos expresados en porcentaje fueron transformados angularmente (arco seno \sqrt{X}), con cuya transformación se confirió la normalidad y homogeneidad de varianzas como lo recomendado por Montgomery (2008), y procesados en el software estadístico InfoStat, versión 2008 (Di Rienzo et al., 2008) para realizar el análisis de varianza (ANOVA) y las prueba de contraste de Duncan, con un nivel de significancia de 0,05 %.

Resultados y discusión

Síntomas *in situ*

En la figura 1, se presentan los diferentes síntomas de la muerte repentina en una plantación de *T. cacao* CCN-51 de dos años de edad, ubicada en el Sector Atusparia, Distrito y Provincia de Tocache, Perú. Inicialmente se observaron flacidez, epinastia, clorosis, necrosis de hojas superiores y, finalmente, marchitez de toda la planta. Al realizar un corte transversal de la rama superior, se identificaron puntos necróticos del sistema vascular y, en un corte longitudinal, estrías necróticas, mostrando ennegrecimiento de los vasos infectados en la madera. De igual manera, en el corte transversal de la raíz de plantas afectadas se detectaron anillos necróticos.



Figura 1. Síntomas de la muerte repentina del cacao en una plantación de *T. cacao* CCN-51 ubicado en el Sector Atusparia, Distrito y Provincia de Tocache, Perú. a. Amarillamiento, epinastia y marchitez; b. Decoloración del sistema vascular; c. Puntos necróticos en todo sistema vascular; d. Estrías necróticas en un corte longitudinal de la rama; e. Anillos necróticos en un corte transversal de la raíz.

Identificación morfológica y molecular de *Verticillium*

La coloración de la colonia en medio PDAO fue de grisáceo a negruzco, debido a la formación de los microesclerocios (figura 2a). En el micelio inmerso al medio y ralo, con la ayuda de un estereoscopio, se observaron claramente las conidias inmersas en mucílago como pequeñas gotitas de agua. Estas características de la colonia corresponden a las observadas en el género *Verticillium* (Barnett & Hunter, 1998; Barron, 1968).

Los conidióforos son hialinos, erectos y llevan una masa de conidias apicalmente en cada fialide verticilada en 2-3 porciones fértiles (figura 2b). Las conidias son hialinas, de pared lisa, elipsoidales,

uniceluladas, no septados, y miden en promedio de $6,7 \pm 1,4 \mu\text{m} \times 2,9 \mu\text{m} \pm 0,5 \mu\text{m}$. En las figuras 2a y 2c, se observan los microesclerotes inmersos en el medio de cultivo PDAO, regularmente distribuidos en toda la colonia, de coloración marrón negruzco en cadenas y agregados, redondeados y de pared celular delgada. Las características de morfología microscópica mencionadas ubican el patógeno como perteneciente a la especie de *V. dahliae* (Inderbitzin et al., 2011; Watanabe, 2010).

El análisis de la secuencia BLAST reveló que el aislamiento de *Verticillium* presentó un 100 % de homología con las secuencias de *V. dahliae* en GenBank (número de accesión NCBI: NR_126124.1 y HQ206718.1) y *V. longisporum* (HQ206832.1).

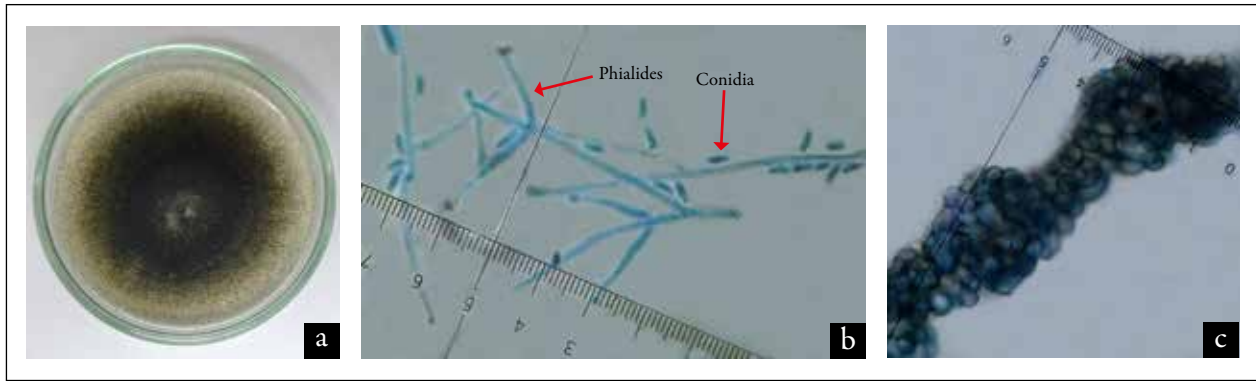


Figura 2. Morfología macroscópica de colonia y microscópica de estructuras vegetativas y reproductivas de *Verticillium dahliae* Kleb. a. Colonia de 15 días de edad en medio PDA; b. Conidias y fialides verticiladas (40 X); c. Microesclerocios (40 X).

Patogenicidad

Con los dos métodos de inoculación se cumplieron los postulados de Koch y se confirmó que el agente causal de la muerte repentina de *T. cacao* fue la especie *V. dahliae*. Tanto el método vía *Drench* al suelo como la inoculación de punción en tallos utilizando suspensiones de conidios de *V. dahliae* fueron capaces de reproducir síntomas de marchitamiento en 28 plantas jóvenes de cacao inoculadas. Sin embargo, el período de incubación en las plantas inoculadas por el método vía *Drench* fue mayor, en el que los primeros síntomas de flacidez de hojas seguido de clorosis y necrosis del ápice de las hojas superiores se observaron

en diez plantas (50%) a los 30 días después de la inoculación (DDI) del patógeno (figura 3a); diez días después se percibieron los primeros síntomas de necrosamiento del área foliar de las hojas superiores (figura 3b) con una severidad de $55\% \pm 1,70$. No obstante, con el método punción en tallos, los primeros síntomas se observaron a los 10 DDI (figura 3c) en 18 plantas ($90\% \pm 2,37$), mostrando síntomas iguales a los del método vía *Drench*. El avance de la enfermedad fue severo; cuatro días después de observar los primeros síntomas, se presentó epinastia, arrugamiento y necrosamiento de todas las hojas de la planta (figura 3d), y dos días después de esto algunas plantas murieron con una severidad de $80\% \pm 2,38\%$ (tabla 2).

Tabla 2. Incidencia y severidad de la muerte repentina del *T. cacao* por *V. dahliae* mediante dos métodos de inoculación, en la estación experimental Juan Bernito del ICT, distrito de La Banda de Shilcayo, Provincia y Región de San Martín, Perú, en 2010

Método de inoculación	Período de incubación	Incidencia (%)	Severidad (%)
Vía <i>Drench</i> al suelo	30 días	$50 \pm 0,42$	$55B \pm 1,70$
Punción en el tallo	10 días	$90 \pm 0,24$	$80A \pm 2,38$

Nota: Datos promedio de 20 plantas para severidad por cada método de inoculación. Letras distintas indican diferencias significativas según Duncan ($p \leq 0,05$).

Fuente: Elaboración propia

En ambos métodos, se realizaron cortes longitudinales y transversales del tallo, y se identificó la presencia de estrías y puntos necróticos respectivamente en todo el sistema vascular (figuras 3f y g). El patógeno se reaisló en medio PDAO a partir de secciones del tejido del tallo superior, de 10 y 18 plantas afectadas (figura 3i), que se inocularon con los métodos vía

Drench y de punción, respectivamente, y de 12 plantas asintomáticas inoculadas. Se observó que las plantas que mostraron 80% de severidad no fueron capaces de retomar el crecimiento a diferencia de algunas de las plantas que habían mostrado ligeros síntomas que sí retomaron su crecimiento.

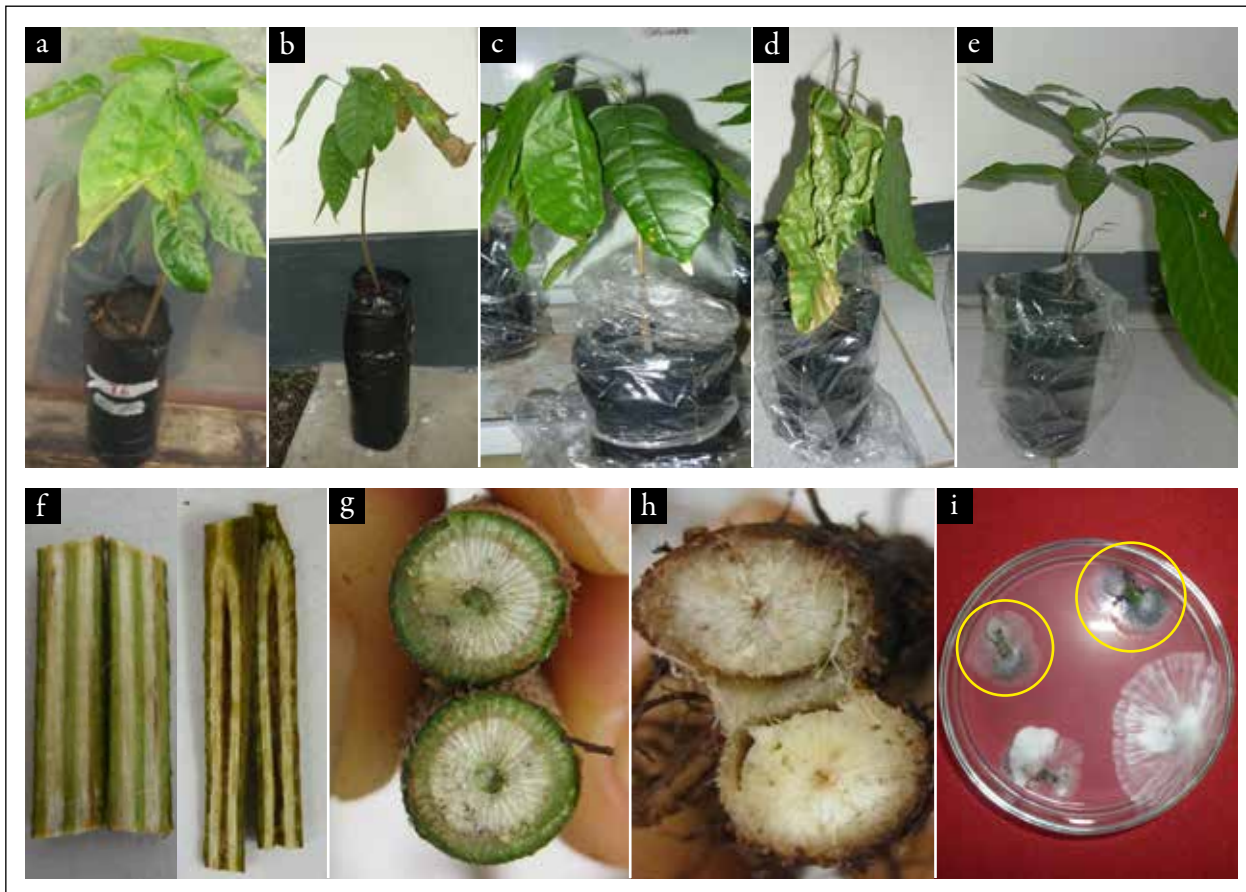


Figura 3. Síntomas de patogenicidad con *V. dahliae* en plantas de *T. cacao* clon ICS-1. Método vía *Drench* al suelo. a. Marchitamiento; b. Necrosis causada mediante método de punción en el tallo; c. Clorosis; d. Marchitamiento; e. Planta sana; f. Tallo mostrando estrías necróticas; g y h. Puntos necróticos en el sistema vascular; i. Patógeno reaislado en medio PDAO (en círculo amarillo).

El presente estudio constituye el primer reporte de la presencia de la muerte repentina del cacao en el Perú, que corrobora mediante los postulados de Koch que *V. dahliae* es el agente causal de la enfermedad. De las 40 plantas inoculadas con el patógeno, 50% y 90% mostraron síntomas característicos de la enfermedad con el método vía *Drench* y de punción en tallos, respectivamente. Esta enfermedad causada por *V. dahliae* fue reportada en

1965 en Uganda (Emechebe, Leakey, & Banage, 1971; Leakey, 1965), y en Brasil se ha convertido en un serio problema en los estados de Bahía y Espírito Santo, en los que se produce el 85% del cacao (Resende et al., 1995). Además, *T. cacao*, en norte-oriental de Brasil, puede ser considerado un hospedante favorito para *Verticillium*, porque todos los aislamientos brasileños de *T. cacao* fueron patogénicos y destructivos (Resende et al., 1994).

En este estudio, la infección de *V. dahliae* fue estudiada en plantas de cacao de tres meses de edad del genotipo ICS-1, con los métodos vía *Drench* y de punción en el tallo, cuyos primeros síntomas se observaron a los 30 días por vía *Drench*; por el contrario, Resende et al. (1994) reportaron los primeros síntomas a los 20 días y al término de los 36 días el índice de enfermedad fue más alto, causando una marchitez en un número pequeño de plantas clon ICS-1. Probablemente esta diferencia de días se deba a las condiciones climáticas, temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,57\text{ }^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de $70\% \pm 5,71\%$, que fueron distintas a las reportadas por Resende et al. (1994) a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa $60\% \pm 10\%$. Sin embargo, el progreso de la enfermedad fue rápido y presentaron síntomas más severos en 90% de plántulas inoculadas por punción, lo que concuerda con lo reportado por Resende et al. (1995), quienes emplearon el mismo método de inoculación, concentración de inóculo y plantas ICS-1, y los primeros síntomas se observaron a los 10 días, lo que probablemente muestra que el patógeno aislado de Perú tenga el mismo comportamiento que el de Brasil. Además, con el reaislamiento del patógeno se cumplieron los postulados de Koch y se indicó su distribución interna dentro de la planta.

De la misma forma, Trapero et al. (2013) señalan que la inoculación con inyección de tallos en plántulas jóvenes (40 días de edad) de olivo fue el método de inoculación más eficaz para comenzar el proceso de selección de genotipos de olivo resistentes al marchitamiento de *Verticillium*, constituyéndose en un método eficaz para ahorrar

trabajo, espacio y recursos. Este método también fue utilizado para aislamientos de *V. dahliae* de cacao en *Abelmoschus esculentus* Medik y *Gossypium hirsutum* L. (Malvaceae), que indujo síntomas similares sobre plántulas de *T. cacao* inoculadas artificialmente (Emechebe et al., 1971).

Capacidad antagonista de *Trichoderma* endófitos hacia *V. dahliae*

En la prueba de antibiosis, los aislamientos de *Trichoderma* endófitos de cacao fueron diferentes en su habilidad para impedir el crecimiento micelial de *V. dahliae* en medio PSA con mezclas de metabolitos inhibitorios (tabla 3). Los metabolitos obtenidos en CPS tuvieron mayor efecto en la inhibición micelial (29,1%) de *V. dahliae*, seguido por MIN (22,2%) en comparación con los metabolitos obtenidos en CEM, que exhibieron el menor porcentaje (16,6%). De acuerdo con los datos promedios de los medios de cultivos, los metabolitos de los aislamientos TE-91, TE-17 y TE-126 impidieron el crecimiento del patógeno con un 66,5%, 55,2% y 51,9%, respectivamente, en comparación con los demás aislamientos que inhibieron menos del 17,2%. En la figura 4, se observa que los metabolitos obtenidos del aislamiento TE-91 en caldo MIN impidieron completamente el crecimiento micelial de *V. dahliae*, seguido de TE-17 con 77,2% y 75,0% en CPS y CEM, respectivamente; TE-126 con 72,8% y 70,5% en CPS y CEM, respectivamente, y TE-22 con 44,3% en MIN. Los demás aislamientos tuvieron un bajo porcentaje de inhibición, menor a 13,5%.

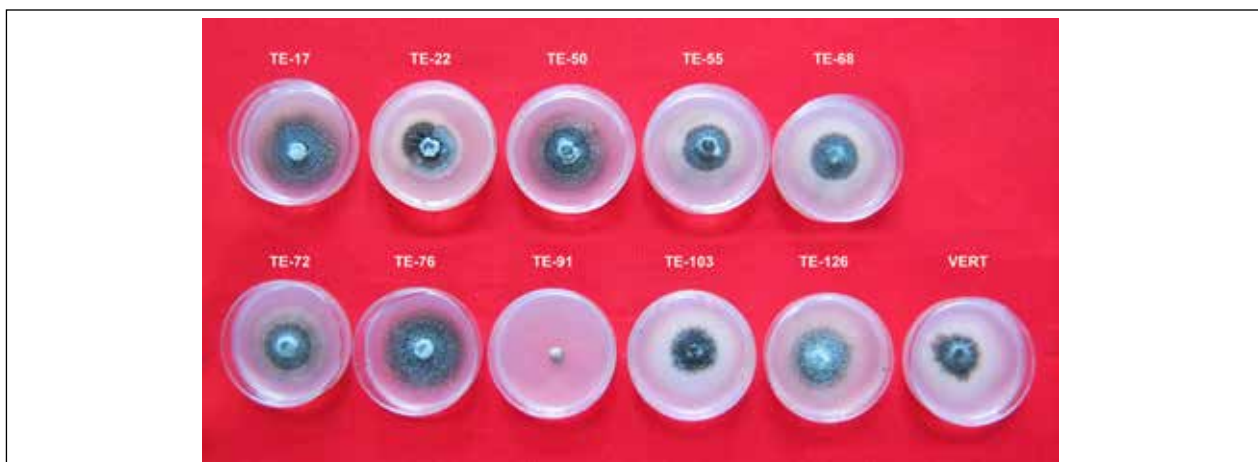


Figura 4. Inhibición del crecimiento micelial de *V. dahliae* con metabolitos inhibitorios solubles de *Trichoderma* endófito.

Tabla 3. Efecto de metabolitos inhibitorios de aislamientos de *Trichoderma* endófito obtenidos en tres caldos de cultivo en el porcentaje de inhibición micelial de *V. dahliae*

Tratamientos	MIN				CPS				CEM				Promedio	
TE-17	13,56	±	0,97	C	77,27	±	0,69	B	75,02	±	2,74	A	55,28	B
TE-22	44,34	±	3,59	B	5,14	±	1,21	CD	2,30	±	0,36	BC	17,26	C
TE-50	11,59	±	2,60	CDE	6,87	±	1,93	CD	1,46	±	1,36	CD	6,64	D
TE-55	8,36	±	1,55	DE	6,08	±	0,94	CD	2,51	±	0,85	BC	5,65	D
TE-68	8,36	±	1,40	CDE	4,20	±	0,45	CD	2,72	±	1,15	BC	5,09	D
TE-72	5,55	±	0,73	E	10,25	±	0,75	C	3,34	±	1,69	BC	6,38	D
TE-76	8,78	±	1,23	CDE	4,85	±	0,62	CD	1,98	±	1,28	BCD	5,21	D
TE-91	100,00	±	0,00	A	99,50	±	0,19	D	0,00	±	0,00	D	66,5	A
TE-103	8,64	±	2,77	CDE	3,92	±	0,50	D	6,05	±	1,16	B	6,20	D
TE-126	12,43	±	1,52	CD	72,89	±	1,09	B	70,56	±	1,95	A	51,96	B
Promedio	22,2			B	29,1			A	16,6			C		

Nota: MIN: Caldo a base de sales minerales; CPS: Caldo papa sacarosa; CEM: Caldo extracto de malta. Promedios seguidos por letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba (Duncan $p \leq 0,05$). Valores a la derecha de la media indican el error estándar.

Fuente: Elaboración propia

En la prueba de micoparasitismo, el ANOVA mostró diferencias significativas entre los aislamientos de *Trichoderma* endófito ($p = 0,05$) en la colonización de *V. dahliae* (figura 5), siendo los aislamientos TE-91 y TE-126 los micoparásitos más agresivos de *V. dahliae* con 100 % de colonización sobre el patógeno, seguidos de TE-68, TE-72 y TE-76, con 80 %, 70 % y 87 % de colonización, respectivamente, en comparación con los aislamientos TE-17, TE-22, TE-50 y TE-55, que colonizaron a *V. dahliae* en porcentajes menores a 30 %.

La antibiosis, la producción de compuestos antimicrobiales, el micoparasitismo y la alimentación de un hongo por otro organismo son algunos de los mecanismos de las especies de *Trichoderma* que brindan protección a las plantas contra sus patógenos (Junaid et al., 2013; Martínez, Infante, & Reyes, 2013). La colonización y la producción de metabolitos inhibitorios solubles de aislamientos de *Trichoderma* endófito obtenidos de diferentes caldos variaron en su habilidad para micoparasitar e inhibir el crecimiento micelial de *V. dahliae* en medio PSA, respectivamente, lo que concuerda con lo reportado por Bailey et al. (2008), cuyos

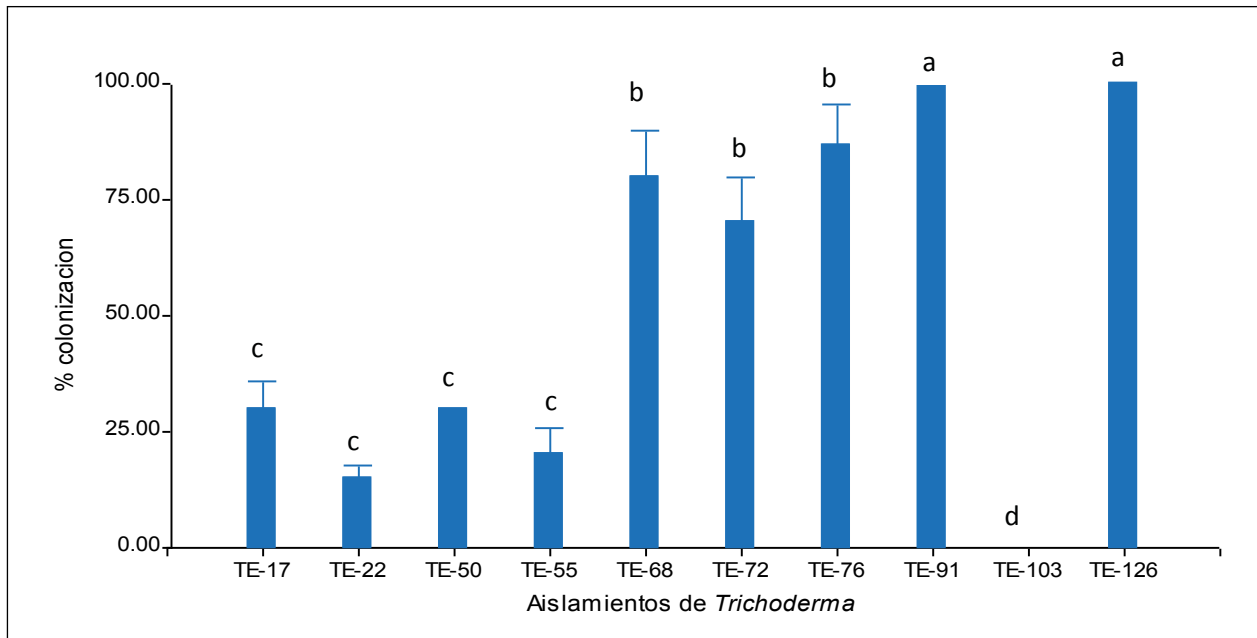


Figura 4. Inhibición del crecimiento micelial de *V. dahliae* con metabolitos inhibitorios solubles de *Trichoderma* endófito.

aislamientos de *Trichoderma* variaron en gran medida en su capacidad para producir compuestos inhibidores de *M. royeri* y en sus capacidades para parasitarlo. En este estudio, *Trichoderma asperellum* (TE-91) resultó ser el micoparásito más agresivo que colonizó e inhibió completamente el crecimiento micelial del patógeno. Probablemente se deba a una acción combinada entre metabolitos secundarios como terpenoides, que libera esta especie de *Trichoderma* hacia el patógeno, inhibiendo la germinación, y las interacciones sinérgicas de enzimas hidrolíticas como quitinasas, glucanasas y proteasas que degradan la pared celular del patógeno hasta ocasionar su muerte (Lorito, Farkas, Rebuffat, Bodo, & Kubicek, 1996; Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998; Zeilinger, Gruber, Bansal, & Mukherjee, 2016). Asimismo, aislamientos de especies de *Trichoderma* han sido reportados como biocontroladores de *V. dahliae* (Carrero-Carrón et al., 2016; Gao, Jun, Pan, Wu, & Zhang, 2007; Jabnoun-Khiareddine, Daami-Remadi, Ayed, & El Mahjoub, 2009; Meng, Tang, Huang, Ye, & Kan, 2007) y *Phytophthora megacarya* (Mbarga et al., 2014). Además, los caldos de cultivo tienen influencia en la producción de metabolitos inhibitorios

como péptidos no ribosómicos (peptaibióticos, sideróforos y dicetopiperazinas), como la gliotoxina y la gliovirina, los policétidos, terpenos, pironas y metabolitos de isociano, que varían con la especie de hongo y condiciones ambientales (Zeilinger et al., 2016). Los metabolitos de los aislamientos TE-17, TE-91 y TE-126 obtenidos en caldo papa sacarosa fueron los que más inhibieron el crecimiento micelial de *V. dahliae* y pertenecen a las especies de *T. brevicompactum*, *T. asperellum* y *T. atroviride*, respectivamente. Al mismo tiempo, el TE-126 resultó también ser un micoparásito muy agresivo, a tal punto que no pudo ser recuperado el patógeno. *Trichoderma atroviride*, reportado como un micoparásito, responde a un número de estímulos externos, produce enzimas hidrolíticas en presencia de un hospedante fúngal y se enrolla alrededor de la hifa del hospedante (Harman, 2006). De la misma forma, Degenkolb, Gräfenhan, Nirenberg, Gams y Brückner (2006) analizaron la formación de antibióticos polipéptidos a partir de cuatro aislamientos de *T. brevicompactum*, seleccionados por su potencial antagonista contra la muerte regresiva. Los aislamientos TE-50, TE-55, TE-68 y TE-76, pertenecientes a la especie *T. harzianum*, fueron los que menor inhibieron el

crecimiento micelial del patógeno en la prueba de antibiosis; sin embargo, TE-68 y TE-76 resultaron ser micoparásitos agresivos. Bailey et al. (2008) indican que aislamientos de *T. harzianum* tienden a tener de moderada a baja actividad de antibiosis, y de moderada a alta actividad de micoparasitismo. Esto probablemente se debe a la formación paralela de enzimas hidrolíticas, junto con un grupo de antibióticos polipéptidos que activan la membrana, llamados *peptabioticos*, cuya acción sinérgica induce un papel importante en micoparasitismo entre *T. harzianum* y su hospedante fungal (Lorito et al., 1996; Schirmböck et al., 1994).

La selección de las cepas de *Trichoderma* con buena capacidad endófitica, además de otros atributos tales como micoparasitismo, antibiosis o resistencia inducida, puede mejorar en gran medida las posibilidades de desarrollar estrategias de control biológico de las enfermedades del cacao (Bailey et al., 2008).

Conclusiones

Se reporta por primera vez en el Perú la presencia de la especie *V. dahliae*, produciendo la muerte repentina o súbita del cacao. Metabolitos extraídos de los aislamientos de *Trichoderma* endófito en

caldo CPS tuvieron mayor efecto en la inhibición micelial de *V. dahliae*. El aislamiento TE-91 en MIN y CPS presentaron muy buena capacidad de biocontrol *in vitro* por su habilidad para inhibir completamente el crecimiento micelial de *V. dahliae*, seguido de TE-17 y TE-126 obtenidos en CPS y CEM, respectivamente. Asimismo, los aislamientos TE-91 y TE-126 fueron los micoparásitos más agresivos para la especie *V. dahliae*. Estos resultados indican que el uso de *Trichoderma* podría ser una alternativa biológica a considerar en el manejo integrado de la enfermedad.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Servicio de Investigación Agrícola (USDA-ARS), por el soporte técnico; a la Embajada Norteamericana (INL) en Lima, Perú, por su apoyo a este trabajo; al Instituto de Cultivos Tropicales (ICT), por las facilidades de infraestructura y laboratorios, y a todas las organizaciones cacaoteras del Perú que facilitaron el muestreo realizado.

Descargos de responsabilidad

Los autores de la investigación manifiestan que no existe ningún conflicto de interés que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

Referencias

- Arévalo, E., Canto, M., León, B., & Meinhardt, L. (2010a). *Biocontrol potencial de Moniliophthora roreri y Moniliophthora perniciosa con aislamientos de trichoderma endófito de cacao in vitro*. Documento presentado en el XXI Congreso Peruano de Fitopatología, Tarapoto, Perú.
- Arévalo, E., Canto, M., León, B., Meinhardt, L., & Cayotopa, J. (2010b). *Colonización de plántulas de Theobroma cacao por aislamientos de Trichoderma endófitos con potencial de control biológico*. Documento presentado en el XXI Congreso Peruano de Fitopatología, Tarapoto, Perú.
- Bae, H., Sicher, R. C., Kim, M. S., Kim, S.-H., Strem, M. D., Melnick, R. L., & Bailey, B. A. (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, 60(11), 3279-3295. doi:10.1093/jxb/erp165.
- Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Crozier, J., Thomas, S. E., Samuels, G. J., ... Holmes, K. A. (2008). Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*, 46(1), 24-35. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.003.
- Bailey, B. A., & Meinhardt, L. W. (2016). *Cacao diseases: A history of old enemies and new encounters*. Nueva York, EE. UU.: Springer.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*, (3.^a ed.). Minnesota, EE. UU.: Macmillan.
- Barron, G. L. (1968). *The genera of Hyphomycetes from soil*. Baltimore, Canadá: The Williams and Wilkins Co.
- Carrero-Carrón, I., Trapero-Casas, J. L., Olivares-García, C., Monte, E., Hermosa, R., & Jiménez-Díaz, R. M. (2016). *Trichoderma asperellum* is effective for biocontrol of Verticillium wilt in olive caused by the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Crop Protection*, 88, 45-52. doi:10.1016/j.cropro.2016.05.009.
- De Souza, J. T., Bailey, B. A., Pomella, A. W. V., Erbe, E. F., Murphy, C. A., Bae, H., & Hebbbar, P. K. (2008). Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. *Biological Control*, 46(1), 36-45. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.010.
- Degenkolb, T., Gräfenhan, T., Nirenberg, H. I., Gams, W., & Brückner, H. (2006). *Trichoderma brevicompactum* complex: rich source of novel and recurrent plant-protective polypeptide antibiotics (peptaibiotics). *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(19), 7047-7061. doi:10.1021/jf060788q.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2008). *InfoStat software estadístico, Manual del Usuario* (Version 2008). Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Córdoba.
- Emechebe, A., Leakey, C. L., & Banage, W. (1971). *Verticillium* wilt of cacao in Uganda: symptoms and establishment of pathogenicity. *Annals of Applied Biology*, 69(3), 223-227. doi:10.1111/j.1744-7348.1971.tb04674.x.
- Gao, Z.-M., Jun, C., Pan, Y.-M., Wu, X.-H., & Zhang, Z.-H. (2007). Inhibitory Mechanisms of *Trichoderma harzianum* TH-1 against the Pathogens of *Verticillium* Wilt and *Fusarium* Wilt of Cotton [J]. *Cotton Science*, 3, 001.
- Guédez, C., Cañizález, L., Castillo, C., & Olivar, R. (2009). Efecto antagonístico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp.). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29, 34-38.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(2), 95-98.
- Hanson, L. E., & Howell, C. R. (2004). Elicitors of Plant Defense Responses from Biocontrol Strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 94(2), 171-176. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.2.171.
- Harman, G. E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2), 190-194. doi:10.1094/PHYTO-96-0190.
- Inderbitzin, P., Bostock, R. M., Davis, R. M., Usami, T., Platt, H. W., & Subbarao, K. V. (2011). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLoS One*, 6(12), e28341. doi:10.1371/journal.pone.0028341.
- Jabnoun-Khiareddine, H., Daami-Remadi, M., Ayed, F., & El Mahjoub, M. (2009). Biological control of tomato Verticillium wilt by using indigenous *Trichoderma* spp. *The African Journal of Plant Science and Biotechnology*, 3(Special issue 1), 26-36.
- Junaid, J. M., Dar, N. A., Bhat, T. A., Bhat, A. H., & Bhat, M. A. (2013). Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. *International Journal of Modern Plant & Animal Sciences*, 1(2), 39-57.
- Leakey, C. (1965). Sudden death disease of cacao in Uganda associated with *Verticillium dahliae* Kleb. *East African Agricultural and Forestry Journal*, 31(1), 21-24. doi:10.1080/00128325.1965.11662020
- Leon, B., Arévalo, E., Márquez, K., Bailey, B., Cayotopa, J., & Olivera, D. (2010a). *Capacidad antagonística de aislamientos de Trichoderma endófitos de cacao contra Phytophthora palmivora in vitro*. Documento presentado en el XXI Congreso Peruano de Fitopatología, Tarapoto, Perú.

- Leon, B., Rojas, M., Rodríguez, G., Arévalo, E., & Márquez, K. (2010b). *Antibiosis y micoparasitismo a los principales patógenos de cacao (Theobroma cacao) por hongos endófitos*. Documento presentado en el XXI Congreso Peruano de Fitopatología, Tarapoto, Perú.
- López-Escudero, F. J., & Mercado-Blanco, J. (2011). *Verticillium wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen*. *Plant and Soil*, 344(1-2), 1-50. doi:10.1007/s11104-010-0629-2.
- 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*. *Journal of Bacteriology*, 178(21), 6382-6385.
- Márquez, D. K., Arévalo, E., León, B., Cayotopa, J., Olivera, D., & Samuels, J. G. (2010). *Composición de comunidades de hongos endófitos de cacao nativo en cuencas del alto Amazonas del Perú*. Documento presentado en el XXI Congreso Peruano de Fitopatología, Tarapoto, Perú.
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos*. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1-11.
- Mbarga, J. B., Begoude, B., Ambang, Z., Meboma, M., Kuate, J., Schiffrs, B., ... Ten Hoopen, G. M. (2014). A new oil-based formulation of *Trichoderma asperellum* for the biological control of cacao black pod disease caused by *Phytophthora megakarya*. *Biological Control*, 77, 15-22. doi:10.1016/j.biocontrol.2014.06.004.
- Mejía, L. C., Rojas, E. I., Maynard, Z., Bael, S. V., Arnold, A. E., Hebbar, P., ... Herre, E. A. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, 46(1), 4-14. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.012.
- Meng, N., Tang, B., Huang, X.-D., Ye, S.-M., & Kan, Q.-H. (2007). The inhibition of four *Trichoderma* species against *Verticillium dahliae*. *Journal of Biology*, 4, 016.
- Montgomery, D. C. (2008). *Design and analysis of experiments*, (7.^a ed.). Nueva Jersey, EE. UU.: John Wiley & Sons.
- Osorio Hernández, E., Hernández Castillo, F. D., Rodríguez Herrera, R., Varela Fuentes, S. E., Estrada Drouaillet, B., & López Santillán, J. A. (2016). Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* *in vitro*. *Investigación y Ciencia*, 24(67), 5-11.
- Ormeño-Orrillo, E., & Dávila, D. Z. (1999). Optimización del tiempo de esterilización de soportes basados en suelo y compost en la producción de inoculantes para leguminosas. *Revista Peruana de Biología*, 6(2), 181-184. doi:10.15381/rpb.v6i2.8313.
- Pegg, G., & Brady, B. (2002). *Verticillium wilts*. Wallingford, Inglaterra: CABI pub.
- Resende, M., Flood, J., & Cooper, R. M. (1994). Host specialization of *Verticillium dahliae*, with emphasis on isolates from cocoa (*Theobroma cacao*). *Plant Pathology*, 43(1), 104-111. doi:10.1111/j.1365-3059.1994.tb00559.x.
- Resende, M., Flood, J., & Cooper, R. M. (1995). Effect of method of inoculation, inoculum density and seedling age at inoculation on the expression of resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) to *Verticillium dahliae* Kleb. *Plant Pathology*, 44(2), 374-383. doi:10.1111/j.1365-3059.1995.tb02790.x.
- Schirimböck, M., Lorito, M., Wang, Y.-L., Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., Scala, F., ... 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4364-4370.
- Schnathorst, W. (1981). Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. En M. Mace, A. Bell, & C. Beckman (Eds.), *Fungal wilt diseases of plants* (pp. 81-111). Nueva York, EE. UU.: Academic Press.
- Sivasithamparam, K., & Ghisalberti, E. (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. En C. P. Kubicek, & G. E. Harman (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium basic biology taxonomy and genetics* (pp. 139-191). Londres, Reino Unido: Taylor & Francis.
- Toghueo, R. M. K., Eke, P., Zabalgogezcoa, Í., de Aldana, B. R. V., Nana, L. W., & Boyom, F. F. (2016). Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. from *Terminalia catappa* against the causative agent of Common Bean Root Rot (*Fusarium solani*). *Biological Control*, 96, 8-20. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.01.008.
- Trapero, C., Díez, C. M., Rallo, L., Barranco, D., & López-Escudero, F. J. (2013). Effective inoculation methods to screen for resistance to *Verticillium* wilt in olive. *Scientia Horticulturae*, 162, 252-259. doi:10.1016/j.scienta.2013.08.036.
- Villaruel-Zeballos, M. I., Feng, C., Iglesias, A., du Toit, L. J., & Correll, J. C. (2012). Screening for resistance to *Verticillium* wilt in spinach and isolation of *Verticillium dahliae* from seed of spinach accessions. *HortScience*, 47(9), 1297-1303.
- Wang, Y., Liang, C., Wu, S., Zhang, X., Tang, J., Jian, G., ... Chu, C. (2016). Significant improvement of cotton *Verticillium* wilt resistance by manipulating the expression of gastrodia antifungal proteins. *Molecular plant*, 9(10), 1436-1439. doi:10.1016/j.molp.2016.06.013.
- Watanabe, T. (2010). *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species* (3.^a ed.). Boca Raton, EE. UU., Londres, Inglaterra, y Nueva York, EE. UU.: CRC.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315-322). San Diego, EE. UU.: Academic Press.

- Yildiz, A., & Benlioglu, S. (2010). Effects of soil solarization and some amendments to control verticillium wilt in established olive orchards. *African Journal of Biotechnology*, 9(40), 6660-6665. doi:10.5897/AJB10.507.
- Yuan, Y., Feng, H., Wang, L., Li, Z., Shi, Y., Zhao, L., ... Zhu, H. (2017). Potential of endophytic fungi isolated from cotton roots for biological control against verticillium wilt disease. *PLoS One*, 12(1), 1-12. doi:10.1371/journal.pone.0170557.
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., & Mukherjee, P. K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma* e Chemistry meets genomics. *Fungal biology reviews*, 30(2), 74-90. doi:10.1016/j.fbr.2016.05.001.
- Zhang, D., & Motilal, L. (2016). Origin, dispersal, and current global distribution of cacao genetic diversity. En B. A. Bailey, & L. W. Meinhardt (Eds.), *Cacao diseases a history of old enemies and new encounters*. Nueva York, EE. UU.: Springer International.