



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHOYO

CENTRO DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN AGRONOMÍA: MENCIÓN EN PROTECCIÓN VEGETAL

TRABAJO DE TITULACIÓN COMO REQUISITO PREVIO PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO

Magíster en Agronomía, Mención en Protección Vegetal

TEMA:

Evaluación de la capacidad antagónica *in vitro* de dos cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Moniliophthora roreri* (Cif. & Par.) y *Phytophthora* spp. en mazorcas de *Theobroma cacao* L.

PRESENTADA POR:

MEDINA PINOARGOTE MARCOS ALEJANDRO

ASESOR:

ING. AGR. VÁSCONEZ GALARZA GUSTAVO, MSc.

BABAHOYO – ECUADOR

2022

DEDICATORIA

*Al Dios Omnipotente, por encender su
llama de amor y darme vida en Cristo
Jesús.*

*A mis amados padres, Marcos Federico y
Electra René.*

*A mis preciosas hermanas, Gabriela
Electra y Fátima René.*

A mi querido sobrino, Elio Sebastián.

A mi abuela materna, Mercedes Electra (†)

*A los Productores de cacao fino de aroma,
por conservar el verdadero Patrimonio Nacional.*

Totus Tuus Mariae.

AGRADECIMIENTO

Con profundo aprecio por su guía, estímulo y paciencia; agradezco Al Máster Gustavo Adolfo Vásconez Galarza, Tutor de mi trabajo de investigación.

Gracias a los miembros del Tribunal de Sustentación Los Másteres: Victoria de Jesús Rendón Ledesma, Yary Gilberto Ruiz Parrales y Nessar Enrique Rojas Jorgge; por sus sugerencias y recomendaciones para mejorar el presente documento.

Agradezco infinitamente al Ingeniero Danilo Xavier Santana Aragone. Líder de los Laboratorios de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias FACIAG-UTB.

Muchísimas gracias a la gran familia de la Universidad Técnica de Babahoyo – UTB y al Centro de Posgrado CEPOS-UTB por permitirme seguir capacitándome humana y profesionalmente para servir al Agro Productivo Ecuatoriano.

Ad Maiorem Dei Glóriam.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTO	II
CERTIFICACIÓN	IV
Informe final de coincidencias aplicando el Sistema URKUND	V
INDICE GENERAL	VI
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
I. CONTEXTUALIZACION DEL PROBLEMA	7
1.1. Formulación del problema	7
1.2. Justificación	8
1.3. Objetivos	9
1.3.1. Objetivo general	9
1.3.2. Objetivos Específicos	9
II. MARCO TEÓRICO	10
2.1. Moniliasis (<i>M. roleri</i>)	10
2.1.1. Historia y distribución geográfica de moniliasis (<i>M. roleri</i>)	10
2.1.2. Morfología del hongo	10
2.1.3. Clasificación taxonómica de <i>M. roleri</i>	11
2.1.4. Ciclo de la enfermedad	12
2.1.5. Sintomatología	12
2.2. Mazorca negra (<i>P. spp.</i>)	13
2.2.1. Distribución de <i>Phytophthora</i> en las regiones del mundo	13
2.2.2. Sintomatología de la mazorca negra en cacao, causada por <i>P. spp.</i>	14
2.2.3. Origen de <i>P. spp.</i>	15
2.2.4. Clasificación taxonómica de <i>Phytophthora</i>	15
2.2.5. Ciclo de vida de especies del género <i>Phytophthora</i>	15

2.2.6.	Características morfológicas.....	16
2.2.7.	Morfología de las colonias <i>in vitro</i>	16
2.3.	Antecedentes investigativos del control biológico de <i>M. roreri</i> y <i>P. spp.</i>	17
III.	METODOLOGÍA.....	23
3.1.	Ubicación del área de estudio	23
3.1.1.	Condiciones climáticas	23
3.2.	Materiales, equipos, reactivos y medios de cultivos de laboratorio	23
3.2.1.	Materiales de laboratorio	23
3.2.2.	Equipos de laboratorio.....	24
3.2.3.	Reactivos de laboratorio	24
3.2.4.	Medios de cultivos de laboratorio	24
3.3.	Recolección de muestras.....	24
3.4.	Aislamiento de <i>M. roreri</i>	25
3.5.	Aislamiento de <i>P. spp.</i>	25
3.6.	Variables operacionales	25
3.7.	Tratamientos y diseño experimental	26
3.8.	Características de la unidad experimental y ADEVA.....	26
3.9.	Pruebas de antagonismo “ <i>in vitro</i> ”	27
3.10.	Variables evaluadas.....	27
3.10.1.	Variables de crecimiento	27
3.10.1.1.	Ritmo de crecimiento radial.....	28
3.10.1.2.	Media de crecimiento radial	28
3.10.1.3.	Tasa de crecimiento radial	28
3.10.2.	Competencia por espacio y nutrientes	29
3.10.2.1.	Tiempo de contacto antagonista-patógeno	29
3.10.2.2.	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial.....	29
3.10.2.3.	Competencia por sustrato.....	29
3.10.3.	Micoparasitismo	30
3.11.	Análisis estadístico.....	30
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1.	Resultados obtenidos en la investigación	32

4.1.1.	Aislamiento del patógeno <i>M. roreri</i>	32
4.1.2.	Identificación del hongo <i>M. roreri</i>	33
4.1.2.1.	Características macroscópicas de <i>M. roreri</i>	33
4.1.2.2.	Características microscópicas de <i>M. roreri</i>	33
4.1.3.	Aislamiento del patógeno <i>P. spp.</i>	34
4.1.4.	Identificación del hongo <i>P. spp.</i>	35
4.1.4.1.	Características macroscópicas de <i>P. spp.</i>	35
4.1.4.2.	Características microscópicas de <i>P. spp.</i>	35
4.1.5.	Variables de crecimiento.....	36
4.1.5.1.	Ritmo de crecimiento radial.....	36
4.1.5.2.	Media de crecimiento radial.....	37
4.1.5.3.	Tasa de crecimiento radial.....	39
4.1.6.	Competencia ´por espacio y nutrientes.....	40
4.1.6.1.	Tiempo de contacto antagonista – patógeno.....	40
4.1.6.2.	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR).....	41
4.1.6.3.	Competencia por sustrato.....	42
4.1.7.	Micoparasitismo.....	44
4.2.	Pruebas estadísticas aplicadas.....	45
4.3.	Análisis e interpretación de datos.....	46
4.4.	Discusión de resultados.....	46
V.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	51
5.1.	Conclusiones.....	51
5.2.	Recomendaciones.....	52
VI.	BIBLIOGRAFIA.....	53
	ANEXOS.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Tratamientos utilizados en la investigación.....	22
Tabla 2. Fuentes de variación y sus grados de libertad.....	23
Tabla 3. Grado de antagonismo de agentes de control biológico respecto a la competencia por sustrato, propuesta por Bell <i>et al.</i> (1982).....	26
Tabla 4. Características macroscópicas de las colonias de aislados de <i>M. roreri</i> en medio de cultivo PDA.....	29
Tabla 5. Características macroscópicas de las colonias de aislados de <i>P. spp</i> en medio de cultivo PDA.....	31
Tabla 6. Tasa de crecimiento radial.....	36
Tabla 7. Grado de antagonismo competencia por sustrato de aislados de <i>T. sp</i> frente a <i>M. roreri</i> y <i>P. spp</i> de acuerdo a la escala de Bell <i>et al.</i> , (1982).....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Ciclo de la moniliasis causada por <i>M. rozeri</i> Fuente: Paredes (2016).....	57
Figura 2.	Síntomas externos e internos de moniliasis (Paredes, 2016).....	57
Figura 3.	Síntomas externos de mazorca negra (McMahon & Purwantara, 2004).....	58
Figura 4.	Ciclo vital de <i>Phytophthora</i> spp., (Jaimes & Aranzuzu, 2010).....	58
Figura 5.	Proceso de medición del crecimiento radial para hongos, adaptado de French & Hebert (1982).....	24
Figura 6.	Recolecta de frutos con Moniliasis: (a) síntomas iniciales con manchas y abultamiento, (b) síntomas intermedios mancha generalizada, (c) fruto con inicio de esporulación y (d) fruto esporulación completa.....	28
Figura 7.	Forma de las esporas de <i>M. rozeri</i> . Globosas.....	29
Figura 8.	Frutos con síntomas externos por infección de mazorca negra (A y B). Frutos con daño externo por mazorca negra y almendras sanas (C y D).....	30
Figura 9.	Características microscópicas de <i>P. spp.</i>	31
Figura 10.	Crecimiento radial acumulado (mm).....	33
Figura 11.	Medias de crecimiento radial acumulado.....	34
Figura 12.	Actividad antagónica ejercida por <i>Trichoderma</i> sp. sobre el crecimiento radial de los patógenos <i>M. rozeri</i> y <i>P. spp.</i>	37
Figura 13.	(A) Primer día de siembra Cultivo dual de <i>T. spp</i> frente a <i>M. rozeri</i> izquierda (B) 360 horas después de la siembra <i>M. rozeri</i> derecha <i>T. spp.</i>	39
Figura 14.	Enfrentamiento <i>T. spp</i> (T) y <i>P. spp</i> (P). (A): Inhibición de crecimiento vegetativo de <i>P. spp</i> en presencia de <i>T. spp</i> en medio PDA. (B) Reducción máxima de la colonia de <i>P. spp</i> y expansión de <i>T. spp.</i>	39
Figura 15.	Micoparasitismo de <i>T. sp</i> (T) sobre <i>M. rozeri</i> (M). Penetración (a y b), Enrollamiento hifal (c y d), Lisis (e y f).....	40
Figura 16.	Micoparasitismo de <i>T. spp.</i> sobre <i>P. spp.</i> (A) cepa de <i>T. spp</i> la cual se observa hifa penetrando a <i>P. spp</i> (B) cepa de <i>T. spp.</i> enrollando a <i>P. spp.</i>	41
Figura 17.	Preparación y desinfección de materiales de laboratorio.....	63
Figura 18.	Preparación de medio de cultivo PDA.....	63
Figura 19.	Siembra de microorganismos dentro de la cámara de flujo laminar.....	64

Figura 20.	(A): Cepa 1 (<i>T. spp</i>) y (B) Cepa 2 (<i>T. spp</i>), macro y microscópicamente.....	64
Figura 21.	A): Control antagónico de Cepa 1 (<i>T. spp</i>) frente a <i>M. roreri</i> y (B) Control antagónico de Cepa 2 (<i>T. spp</i>) frente a <i>M. roreri</i>	65
Figura 22.	Antagonismo por competencia demostrado por cepas de <i>T. spp</i> sobre <i>P. spp</i> . (A): se muestra el borde de avance (1) de la cepa 1 (<i>T. spp</i>) y el borde de avance del aislado <i>P. spp</i> (2). (B): se puede observar que la cepa 2 (<i>T. spp</i>) creció completamente sobre la colonia del aislado <i>P. spp</i>	65

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo general: Evaluar la capacidad antagónica *in vitro* de dos cepas de *Trichoderma* sp. frente a fitopatógenos de la mazorca del cacao. El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Babahoyo, ubicada en el Km 7,5 de la vía Babahoyo - Montalvo, provincia de Los Ríos. Para las pruebas de antagonismo del hongo *Trichoderma* spp. frente a los fitopatógenos *Phytophthora* spp. y *M. royeri* aislados de frutos de cacao, se empleó dos cepas (probablemente especies diferentes). Una cepa 1 aislada desde plantaciones de *T. cacao* L. (cacao) de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP, y una segunda cepa 2 aislada desde un cultivo de *Capsicum annuum* L. (pimiento) en el cantón Portoviejo, provincia de Manabí. Se aplicó 10 tratamientos, basados en la combinación dual de hongos antagonistas y hongos fitopatógenos, más testigos absolutos, con cinco repeticiones por tratamiento, distribuidos en un diseño completo al azar (DCA). La unidad experimental consistió en una placa de Petri de 90 mm de diámetro, ajustado a pH 5.5 e incubados a 25 ± 1 °C, con períodos alternos de 12 horas luz y 12 oscuridad. Para la determinación de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos para las variables analizadas, se aplicó la prueba de Tukey al 5 %. Se evaluó las siguientes variables: Ritmo de crecimiento radial, Media de crecimiento radial, Tasa de crecimiento radial, Tiempo de contacto antagonista-patógeno, Porcentaje de inhibición del crecimiento radial, Competencia por sustrato y Micoparasitismo. Mediante el análisis de los resultados se logró evidenciar lo siguiente: Los aislados de *M. royeri* y *P.* spp presentaron las características patogénicas y morfológicas deseables para desarrollar las pruebas de antagonismo. La cepa 1 (*T.* spp) y cepa 2 (*T.* spp) presentaron excelentes características antagónicas sobre el control de *M. royeri* y *P.* spp. En relación al enfrentamiento dual la cepa 2 (*T.* sp.) (39.2 mm) presentó sobre *M. royeri* (5.8 mm), un alto crecimiento radial acumulado, a diferencia de la cepa 1 (*T.* sp.) (37.2 mm) que presentó sobre *M. royeri* (7.2 mm), un bajo crecimiento radial acumulado. En el enfrentamiento dual el tratamiento con la cepa 2 (*T.* sp) (19.6 mm) presentó una media de crecimiento radial superior sobre el patógeno *M. royeri* (2.9 mm). El enfrentamiento dual con la cepa 1 (*T.* sp) (18.6 mm) que presentó una media de crecimiento radial superior sobre

el patógeno *M. roreri* (3.9 mm). En el enfrentamiento dual el tratamiento con la cepa 1 (*T. sp*) (1.53 mm.h⁻¹) presento una tasa de crecimiento radial superior sobre el patógeno *M. roreri* (0.13 mm.h⁻¹). En el enfrentamiento dual con la cepa 1 (*T. sp*) (3.66 mm.h⁻¹) que presento una tasa de crecimiento radial superior sobre el patógeno *P. spp* (0.22 mm.h⁻¹). En relación al enfrentamiento dual con la cepa 2 (*T. sp*) (1.63 mm.h⁻¹) que mostro una tasa de crecimiento radial superior sobre el patógeno *M. roreri* (0.04 mm.h⁻¹). Se obtuvo una tasa de crecimiento superior con la cepa 2 (*T. sp*) (3.64 mm.h⁻¹) sobre el patógeno *P. spp* (0.84 mm.h⁻¹). En el enfrentamiento dual el efecto de inhibición del crecimiento radial de la cepa 2 (*T. spp.*) fue mayor sobre el patógeno *M. roreri* (84.44 %), mientras que para el patógeno *P. spp* (83.11 %) fue menor, a diferencia de la cepa 1 (*T. spp.*) que mostro un menor efecto de inhibición del crecimiento radial sobre *M. roreri* (81.33 %) y sobre el *P. spp* (82.22 %). El efecto de inhibición del crecimiento radial de la cepa 1 (*T. spp.*) sobre el patógeno *P. spp* (84.44 %) fue estadísticamente igual al efecto de inhibición del crecimiento radial de la cepa 2 (*T. spp.*) sobre el *P. spp* (84 %). Los mecanismos de antagonismo encontrados fueron el micoparasitismo y competencia por espacio y nutrientes para las cepas de *T. spp*, ubicadas en el grado 1 de la escala de antagonismo.

Palabras claves: Fitopatógenos, antagonismo, control, eficacia, cacao.

ABSTRACT

The general objective of the present investigation was: To evaluate the in vitro antagonistic capacity of two strains of *Trichoderma* sp. against phytopathogens of cocoa pod. The present study was carried out in the Phytopathology Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences of the Technical University of Babahoyo, located at Km 7.5 of the Babahoyo - Montalvo Road, province of Los Rios. For the antagonism tests of the fungus *Trichoderma* spp. against the phytopathogens *Phytophthora* spp. and *M. roleri* isolated from cocoa fruits, two strains (probably different species) were used. One strain 1 was isolated from plantations of *T. cacao* L. (cacao) from the Tropical Experimental Station Pichilingue of INIAP, and a second strain 2 was isolated from a crop of *Capsicum annum* L. (bell pepper) in the canton of Portoviejo, province of Manabí. Ten treatments were applied, based on the dual combination of antagonistic fungi and phytopathogenic fungi, plus absolute controls, with five replicates per treatment, distributed in a complete randomized design (CRD). The experimental unit consisted of a 90 mm diameter Petri dish, adjusted to pH 5.5 and incubated at 25 ± 1 °C, with alternating periods of 12 hours of light and 12 hours of darkness. For the determination of significant statistical differences between treatments for the variables analyzed, the Tukey test was applied at 5%. The following variables were evaluated: Radial growth rate, radial growth mean, radial growth rate, antagonist-pathogen contact time, radial growth inhibition percentage, substrate competition and mycoparasitism. The analysis of the results revealed the following: The isolates of *M. roleri* and *P. spp* presented the pathogenic and morphological characteristics desirable to develop the antagonism tests. Strain 1 (*T. spp*) and strain 2 (*T. spp*) presented excellent antagonistic characteristics on the control of *M. roleri* and *P. spp*. In relation to the dual confrontation, strain 2 (*T. sp.*) (39.2 mm) presented a high accumulated radial growth on *M. roleri* (5.8 mm), in contrast to strain 1 (*T. sp.*) (37.2 mm) which presented a low accumulated radial growth on *M. roleri* (7.2 mm). In the dual confrontation, the treatment with strain 2 (*T. sp*) (19.6 mm) showed a higher mean radial growth over the pathogen *M. roleri* (2.9 mm) and the dual confrontation with strain 1 (*T. sp*) (18.6 mm) showed a higher mean radial growth over the pathogen *M. roleri* (3.9 mm). In the dual confrontation, the treatment with strain 1 (*T. sp*) (1.53 mm.h⁻¹) showed a higher

radial growth rate over the pathogen *M. royeri* (0.13 mm.h⁻¹). In the dual confrontation with strain 1 (*T. sp*) (3.66 mm.h⁻¹), it presented a superior radial growth rate over the pathogen *P. spp* (0.22 mm.h⁻¹). In relation to the dual confrontation with strain 2 (*T. sp*) (1.63 mm.h⁻¹), which showed a superior radial growth rate over the pathogen *M. royeri* (0.04 mm.h⁻¹). A superior growth rate was obtained with strain 2 (*T. sp*) (3.64 mm.h⁻¹) over the pathogen *P. spp* (0.84 mm.h⁻¹). In the dual confrontation, the radial growth inhibition effect of strain 2 (*T. spp.*) was higher on the pathogen *M. royeri* (84.44 %), while for the pathogen *P. spp* (83.11 %) it was lower, unlike strain 1 (*T. spp.*) which showed a lower radial growth inhibition effect on *M. royeri* (81.33 %) and on *P. spp* (82.22 %). The radial growth inhibition effect of strain 1 (*T. spp.*) on the pathogen *P. spp* (84.44 %) was statistically equal to the radial growth inhibition effect of strain 2 (*T. spp.*) on *P. spp* (84 %). The mechanisms of antagonism found were mycoparasitism and competition for space and nutrients for *T. spp.* strains, located in grade 1 of the antagonism scale.

Key words: Phytopathogens, antagonism, control, efficacy, cocoa.

INTRODUCCIÓN

El cultivo cacao (*Theobroma cacao* L.) es de gran importancia para la economía del Ecuador, debido a las exportaciones y la generación de empleo para los pobladores de los sectores rurales del país (Philips *et al.*, 2007). Ecuador aporta el 50 % de la producción mundial de cacao fino de aroma, único en el mundo y denominado como “Nacional” (Melo & Hollander, 2013).

Las exportaciones de productos agrícolas en enero del 2019 alcanzaron el 61 % de los ingresos no petroleros tradicionales dentro de la balanza comercial en el Ecuador. Entre los exponentes de esta actividad se encuentran el banano, camarón, café, cacao y atún (BCE, 2019).

La producción de cacao, está sometida a la presencia de diversas enfermedades de la mazorca, entre las que destacan hongos del género *Moniliophthora* y *Phytophthora*, mismos que poseen diferentes niveles de virulencia en condiciones apropiadas (Loor *et al.*, 2013). Entre ellas, la moniliasis (*M. roreri*), se considera una enfermedad fúngica causante de grandes pérdidas económicas en el noroeste de Sudamérica (Ecuador, Perú, Colombia y parte de Venezuela) y Centroamérica (Panamá, Costa Rica, Nicaragua y Honduras) (Evans, 2007). La moniliasis es capaz de provocar pérdidas de producción de hasta un 100 % (Sánchez & Garcés, 2012).

Considerando que en el país la moniliasis (*M. roreri*) y escoba de bruja (*M. pernicioso*) son consideradas las principales enfermedades por causar hasta el 80% de pérdidas directas en el cultivo de cacao. Sin embargo, en los últimos 10 años las enfermedades la mazorca Negra y el chancro del tallo causadas por *Phytophthora* spp. han provocado pérdidas de frutos cada vez más importantes y quizás más grave causando la muerte de las plantas (Sánchez & Garcés, 2012).

Desde algunos años se ha venido buscando nuevas alternativas de control para las enfermedades del cultivo de cacao, en donde ha despertado especial interés en la utilización de microorganismos antagonistas para el control biológico de patógenos en cultivos de importancia económica, debido a su potencial de control y a la gravedad de los impactos

ecológicos causados por la permanente y creciente aplicación de agroquímicos en los agroecosistemas (Villamil *et al.*, 2012).

Existen dos métodos de mitigación para la moniliasis y mazorca negra, el más empleado y efectivo son las labores culturales, seguido de aplicaciones químicas. De ahí que, la frecuencia en que las mazorcas infectadas son retiradas del campo constituye una estrategia esencial para un control efectivo de la moniliasis y mazorca negra (Loor *et al.*, 2013).

Dentro de los microorganismos antagonistas importantes están los del género *Trichoderma*, mismo que tienen la capacidad de actuar contra una amplia variedad de patógenos del suelo (*Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. y *Sclerotinia* sp.) y del follaje (*Botrytis* spp. y *Peronospora* spp.) (Martínez *et al.*, 2013).

Los agentes microbianos, dentro del control biológico ha sido evidenciado como una opción alternativa y eficaz, frente al uso de fungicidas químicos para el control de enfermedades en los cultivos (Liu *et al.*, 2013). Muchas especies de *Trichoderma* se han estudiado ampliamente en condiciones de laboratorio y son propuestas como biocontroladores de *M. roleri* y *P.* spp. (Suárez & Cabrales, 2008).

De acuerdo a lo manifestado anteriormente se fundamentó en realizar la presente investigación para lograr encontrar nuevas alternativas de control para monilia y mazorca negra en la mazorca del cacao.

I. CONTEXTUALIZACION DEL PROBLEMA

1.1. Formulación del problema

El cacao (*T. cacao*) es uno de los principales productos agropecuarios de exportación de Latinoamérica, siendo este producto muy importante para el desarrollo económico del Ecuador, mismo que representa la principal materia prima para lograr la producción de chocolates en sus diferentes presentaciones (Sánchez & Garcés, 2012).

Durante varios siglos el cacao, es el principal generador de divisas para el país, antes de la exploración y explotación de hidrocarburos, desarrollando varios sectores importantes como la banca, el comercio y la industria. En la actualidad, el Ecuador es el mayor productor de cacao fino de aroma en el mundo con más del 70 % de la producción (Paredes, 2016).

La producción de cacao se ve amenazada debido principalmente a problemas fitosanitarios que provocan severos daños en plantaciones cacaoteras, lo que reduce al mínimo el potencial productivo. Las enfermedades es uno de los principales problemas que los productores cacaoteros del Ecuador deben afrontar, debido presencia endémica de las principales enfermedades como la monilla (*M. rozeri*) y Mazorca negra (*Phytophthora* spp.). La monilla está considerada como el primer problema fitosanitario del cacao debido a las pérdidas que ocasiona y su característica es la presencia de una mancha blanquecina y polvorienta en los frutos y mazorcas del cacao (Suárez, 1993). Las pérdidas por mazorca negra son del 10 al 30 por ciento, considerándose en la enfermedad más importante en un 80 por ciento de los países productores de cacao (Hernández *et al.*, 2014).

Principalmente los agricultores se ven afectados por la falta de recursos especializados para lograr controlar la monilla y mazorca negra. Para mitigar la presencia de estas dos enfermedades, las comunidades o asociaciones agropecuarias utilizan productos agroquímicos, provocando fitotoxicidad, afecciones a seres humanos y residualidad en áreas vulnerables del ecosistema como agua, suelos, y especies endémicas de las zonas donde prevalecen cultivos.

1.2. Justificación

El cacao representa uno de los productos más importantes en la economía del Ecuador debido al fomento de aportación en el patrimonio de las personas que lo cultivan; sin embargo, en este cultivo se manifiestan enfermedades tales como: monilla y mazorca negra, siendo los principales factores limitantes de la producción y donde el control biológico es una estrategia importante para el control de estas enfermedades (INIAP, 2012).

Fravel (2005), manifiesta que el control de la monilla tradicionalmente se realiza mediante podas sanitarias, remoción de frutos enfermos, control químico y resistencia genética, mientras que el control de mal de machete se lo realiza con la desinfección de herramientas de trabajo, para evitar la diseminación del hongo dentro de la plantación de cacao. En la actualidad la búsqueda de alternativas de solución mediante el control biológico, constituye una alternativa prometedora en el control de los hongos fitopatógenos del cacao.

Krauss *et al.* (2003) resaltan que se han realizado numerosos reportes de investigaciones en donde se evidencia el gran potencial de hongos y bacterias endofíticas como controladores biológicos. Entre los microorganismos endofíticos con potencial biocontrolador más representativos se encuentran bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* y hongos de los géneros *Trichoderma* y *Gliocladium*.

Se ha comprobado mediante estudios realizados que el uso de microorganismos antagonistas en combinación con el método de control cultural frente a *M. royeri* la producción de mazorcas infectadas llega a un 100 % en terrenos abandonados, 78 % en terrenos que tienen un manejo cultural mejorado y un 36 % en terrenos tratados con antagonistas. En cuanto a los rendimientos aumentaron exponencialmente en un 300 % y también se tiene como sustento que mediante el control biológico no solo se protege los frutos de nuevas infecciones, sino que también se previene el desarrollo y la reproducción de este patógeno (Krauss *et al.*, 2003).

La principal razón de la realización del presente estudio fue el uso de cepas de *Trichoderma* sp. para su aplicación como biocontrolador de monilla y mazorca negra en el cultivo de cacao,

debido al potencial antagónico que poseen los hongos de este género (Contreras & Riano, 2013).

La gran importancia de esta investigación es el uso de tecnologías limpias y sustentables, en donde se van a emplear cepas propias de la rizósfera para armonizar, de manera amigable con el medio ambiente, el principal problema en la pérdida de producción cacaotera, permitiendo así un manejo sostenible de plantaciones de cacao mediante el biocontrol de *M. roleri* y *Phytophthora* spp.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad antagónica *in vitro* de dos cepas de *Trichoderma* sp. frente a fitopatógenos de la mazorca del cacao.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Aislar e identificar morfológicamente cepas de los hongos *M. roleri* y *Phytophthora* spp. desde mazorcas de cacao enfermas.
- Determinar la velocidad de crecimiento *in vitro* de dos cepas nativas de *Trichoderma* sp. en medio de cultivo PDA.
- Estimar la eficacia antagónica *in vitro* de dos cepas de *Trichoderma* sp. frente a *M. roleri* y *Phytophthora* spp.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Moniliasis (*M. roreri*)

Una de las enfermedades más importantes en el cultivo de cacao y con una capacidad de afectar la producción entre un 40 % y 50 %, siendo esta enfermedad conocida en Latinoamérica como moniliasis, cuyo agente causal es el hongo *M. roreri* (Evans, 2002).

2.1.1. Historia y distribución geográfica de moniliasis (*M. roreri*)

Enríquez (2004), expresa que la enfermedad conocida con los nombres de Monilla, Pudrición acuosa o Enfermedad de Quevedo, es causada por el hongo Monilla (*M. roreri*). El origen de la enfermedad ha sido estudiado por varios autores, algunos creen que su centro de origen está en Ecuador y que de ahí pasó a Colombia, Perú, Bolivia y a algunos lugares de Venezuela.

En Ecuador la moniliasis fue reportada en la Provincia de los Ríos, en el lado occidental de los Andes, siendo denominado el patógeno como *M. roreri*. De allí viene el nombre “Moniliasis”, término genérico utilizado para designar enfermedades producidas por hongos del género Monilla (Arévalo, 2010).

2.1.2. Morfología del hongo

Correa *et al.* (2014) expresan que *M. roreri* se caracteriza por ser un hongo mitospórico dentro de los Agaricales. Estudios realizados por microscopía electrónica revelaron que este hongo presenta una única espermatogénesis basipetal, como en Monilia (antiguo término referido al género *Moniliophthora*) y posee septos doliporos en el micelio. Esto fue considerado como el estado mitótico (anamorfo) de un basidiomycete. Por estudios citológicos se observó que las conidias han sido postuladas a servir como meiosporas; lo que sugiere que estas esporas representan un basidium modificado que perdió la forma, espesor y carnosidad del basidiocarpio, formando solo un pileus vestigial. Las esporas son multifuncionales y sirven no solo para el intercambio genético sino también para la dispersión, infección y sobrevivencia. La geometría de las esporas varía de esféricas a ovaladas y presentan dos casos de germinación, ya sea por medio del poro germinativo o en ocasiones directamente desde la pared celular. El tubo germinativo se localiza en el extremo

distal y se pueden encontrar estructuras similares a un apresorio. Las esporas de mayor edad se caracterizan por sus paredes con mayor grosor y tonalidades oscuras, las cuales dan inicio a la fase de dormancia.

Enríquez (2004), comenta que, desde la penetración superficial de las hifas, hasta el apareamiento de los primeros síntomas, transcurren aproximadamente de seis a diez semanas, una vez que todos los tejidos han sido consumidos, se produce la pudrición y momificación del fruto.

Sánchez & Garcés (2012), detallan que los conidios se producen en cadenas en las superficies de las mazorcas enfermas que siguen siendo verdes, o en las mazorcas que están momificadas y de color negruzco, las esporas permanecen viables de ocho a nueve meses después de su esporulación, por lo que se considera como fuente de inóculo primario. Las mazorcas pueden ser infectadas en cualquier edad, siendo los estados iniciales de su desarrollo los más propensos al ataque del patógeno. Para la germinación e infección exitosa, los conidios requieren de agua y ambiente saturado, como mínimo, de cinco a ocho horas.

2.1.3. Clasificación taxonómica de *M. roreri*

- **Dominio:** Eukaryota
- **Reino:** Hongos
- **Phylum:** Basidiomycota
- **Clase:** Basidiomycetes
- **Subclase:** Agaricomycetidae
- **Orden:** Agarical
- **Familia:** Marasmiaceae Fuente: (Evans, 2002)

M. roreri representa el estado asexual de un Basidiomycete, cuyo estado perfecto no es conocido o nunca ha sido formado; pues el micelio de este hongo presenta septas tipo dolíporo, característica propia de los Basidiomycetes. Mediante estudios genéticos, *M. roreri*, pertenece a una especie del género *Crinipellis*, que incluye al agente causal de la

escoba de bruja, *C. perniciosa*, por lo cual, el nombre correcto del agente causal de la Moniliasis del cacao sería *C. royeri* (Enríquez, 2004).

2.1.4. Ciclo de la enfermedad

El ciclo de *M. royeri* (Anexo, figura 1) inicia con los despojos de la cosecha (frutos contaminados), después, las conidias se dispersan por factores abióticos como la lluvia y el viento (Paredes, 2016).

Amores *et al.* (2009) resaltan que debido al movimiento generado en labores de cosechas las esporas son movilizadas en el aire, las cuales, bajo condiciones propicias de humedad y temperatura, llegan a infectar los frutos recién formados.

Phillips-Mora (2006), concluye mediante un estudio realizado en microambientes, que la mayor concentración de esporas de *M. royeri* se encuentra a 1 metro de altura de los árboles de cacao, las conidias depositadas en la mazorca mueren si existe radiación/desecación o viven en presencia de agua; al germinar penetran directamente la cascara del fruto.

Las conidias tienden a penetrar a través de las estomas, reproduciéndose entre las células del córtex, de esta manera se producen conidias dentro y fuera de los frutos (Albuquerque *et al.*, 2005). *M. royeri* presenta un periodo de incubación largo antes de que se presenten los síntomas (Correa *et al.*, 2014). Este periodo puede ser de 3 a 8 semanas, y depende de la susceptibilidad de árbol, condiciones climáticas, severidad del ataque y edad de las mazorcas, no obstante, hay estudios que relatan que el período de incubación varía entre 30 a 70 días (Sánchez & Garcés, 2012).

2.1.5. Sintomatología

Paredes (2016), describe que la moniliasis puede expresar síntomas internos y externos en las mazorcas o frutas en todas sus etapas de desarrollo (Anexo, figura 2). El daño en el interior del fruto causado por la enfermedad generalmente es más grave que el daño en el exterior, causando la pérdida de casi todas las almendras. Tejidos como almendras, pulpa y exocarpo, al descomponerse se tornan en una masa de una sustancia acuosa debido a su descomposición, en algunos casos siendo las almendras destruidas, dependiendo del tiempo

de infección algunas almendras pueden o no ser afectadas. En frutos menores a dos meses, la infección muestra pequeñas protuberancias en la superficie del fruto, luego presenta una mancha café que se extiende a lo largo del fruto, por último, aparece una felpa blanca conocida como el micelio del hongo y después de siete días emergen esporas de color crema.

Generalmente hasta las 10 semanas de edad los frutos pequeños presentan mayor susceptibilidad a la enfermedad (Amores *et al.*, 2009).

Correa *et al.* (2014) expresan que, en frutos a la mitad del desarrollo, la enfermedad forma puntos traslucidos, los cuales forman manchas cafés, el borde es irregular y origina un color amarillo que avanza en la epidermis de la mazorca, días después en la mancha café aparece micelio el cual luego forma esporas, que se encuentran por millones. En frutos que superan los tres meses de edad, la podredumbre no sobrepasa el exocarpo pudiendo aprovecharse las almendras del interior de la mazorca.

En cuanto al daño externo se caracteriza por pudrición, necrosis y deformación de los frutos, aunque frutos de dos meses y medio en adelante no presentarían síntomas externos; mientras que el tejido interno estaría en descomposición, lo cual mata al fruto, convirtiéndose en una tonalidad café, formando una pelusa de color crema y posteriormente aparición de esporas del hongo (Correa *et al.*, 2014).

2.2. Mazorca negra (*P. spp.*)

Esta enfermedad es generada por un pseudohongo del complejo *Phytophthora*, puede afectar plántulas y diferentes partes del árbol de cacao, tales como cojines florales, chupones, brotes, hojas, ramas, tronco y raíces, y su principal daño en las mazorcas, se estima que las pérdidas causadas por este organismo a nivel mundial son del 10 % al 30 %. Es considerada la enfermedad más importante en un 80 % de los países productores de cacao (Hernández *et al.*, 2014).

2.2.1. Distribución de *Phytophthora* en las regiones del mundo

El género *Phytophthora* presenta una distribución amplia en todo el mundo predominando diferentes especies de acuerdo con la zona geográfica y el hospedero. En cacao se han

reportado siete especies patógenas; *P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. nicotianae* var. *P. parasitica*, *P. megasperma* y *P. arecae*. La especie con mayor incidencia y más ampliamente diseminada en el mundo es *P. palmivora* responsable de 20 % a 30 % de pérdidas anuales de la producción mundial de grano y aproximadamente 10 % de muerte de árboles. *P. heavae* probablemente está presente en América del Sur y Malasia. *P. megakarya* está presente solamente en África del Oeste (Molina *et al.*, 2016).

2.2.2. Sintomatología de la mazorca negra en cacao, causada por *P. spp.*

La enfermedad mazorca negra, causada por especies de *Phytophthora*, se inicia sobre la superficie de la mazorca con una mancha descolorida, sobre la que posteriormente se desarrolla una lesión chocolate o negra con límites bien definidos. Unas 30 horas después de ocurrida la infección se manifiestan manchas de apariencia acuosa, que luego se torna de color café, las cuales avanzan rápidamente hasta cubrir la totalidad de la mazorca Jaimes & Aranzuzu (2010).

McMahon & Purwantara (2004), señalan que el borde de la lesión progresa unos 12 mm en 24 horas, la infección puede ocurrir en cualquier parte del fruto, pero habitualmente empieza en los extremos de la mazorca, en el cual se acumula agua y en dos semanas, ésta se empieza a diseminar hasta cubrir toda la superficie de la mazorca (Anexo, figura 3). Sobre mazorcas mayores a tres meses de edad, las infecciones inician principalmente en la punta o al final del pedúnculo que une a la mazorca. Los granos o almendras de las mazorcas enfermas permanecen sin daño por varios días, después de iniciar la infección en la cáscara. Esto significa que la cosecha frecuente puede prevenir muchas pérdidas de la producción.

Se ha constatado que las infecciones de la mazorca están prácticamente relacionadas con el daño por heridas de la superficie de la mazorca; en este caso, casi con seguridad se produce la pudrición total del endocarpio, mesocarpio y semillas. Los frutos 8 próximos a la maduración fisiológica, con semillas no muy grandes y sin contacto cercano con la cáscara no presentan infección de semillas y pueden ser cosechados. El microorganismo emerge sobre la superficie de la mazorca como una pelusa blanquecina, sobre esta se concentran los esporangios, finalmente la mazorca ennegrece, y puede ser colonizada por hongos secundarios (McMahon & Purwantara, 2004).

2.2.3. Origen de *P. spp.*

La enfermedad llamada mazorca o pudrición negra fue identificada desde 1727 en la isla Trinidad, en la actualidad es una enfermedad del cacao (*T. cacao*) provocada por especies del género *Phytophthora*: *P. palmivora*, *P. heveae* Thompson, *P. megakarya* Braz et Griff, *P. capsici* Leonian y *P. citrophthora* Smith & Smith, todas relacionadas con esta enfermedad. En África, *P. megakarya* es la especie más agresiva de las encontradas en los campos del cultivo del cacao; sin embargo, no está informada su presencia en América, siendo *P. palmivora* la más difundida en América Sur (Hernández *et al.*, 2014).

2.2.4. Clasificación taxonómica de *Phytophthora*

El agente causal de la enfermedad mazorca negra en cacao es un organismo Stramenopila del género *Phytophthora* (del griego phytón, "planta" y phthorá, "destrucción", destructor de plantas), fue identificado en 1876 por Heinrich Antón De Bary como un "hongo inferior" en el reino fungí (Rodríguez & Vera, 2015).

Según Rodríguez & Vera (2015), la clasificación del patógeno es la siguiente:

- **Reino:** Stramenopila
- **Phylum:** Oomycota
- **Clase:** Oomycetes
- **Orden:** Pythiales
- **Familia:** Pythiaceae
- **Género:** *Phytophthora*
- **Especies:** citrophthora, palmivora, capsici, parasítica, megasperma, nicotina.

2.2.5. Ciclo de vida de especies del género *Phytophthora*

Jaimes & Aranzuzu (2010), expresan que existe una diferencia bien marcada entre *Phytophthora spp.* y los hongos es la motilidad, la cual posee un rol de amplia importancia dentro de los patrones de dispersión. El ciclo de vida de *Phytophthora spp.* presenta dos tipos de reproducción asexual y sexual, que dependen de las condiciones ambientales

predominando el “estado asexual, el cual inicia cuando la estructura vegetativa o esporangio germina en condiciones óptimas de humedad y temperatura de 15 a 38 °C liberando las zoosporas estas son estructuras o esporas móviles, de vida corta y poseen dos flagelos”, “uno anterior y otro posterior (Anexo, figura 4). El anterior es el responsable de mover la zoospora a través del agua hasta 1,5 cm, mientras que el flagelo posterior actúa como una hélice que le da la dirección a la célula.

2.2.6. Características morfológicas

La mayoría de especies del género *Phytophthora* presentan características morfológicas que son clásicamente identificadas, en donde se detalla lo siguiente (Erwin & Ribeiro, 1996).

- Morfología del esporangio; forma, tamaño, relación longitud – ancho.
- Papilación del esporangio.
- Presencia o ausencia de caducidad (desprendimiento del esporangio en la madurez, longitud del pedicelo del esporangio (corto, intermedio o largo).
- Proliferación de esporangio (producción de nuevos esporangios dentro de un esporangio que ha germinado directamente).
- Presencia o ausencia de Clamidospora.
- Ramificación del esporangióforo en la que se asumen los esporangios.
- Presencia o ausencia de hinchazones en las hifas (globosas a protuberancias. irregulares en micelio por el septo.
- Temperatura máxima para el crecimiento.

2.2.7. Morfología de las colonias *in vitro*

La identificación taxonómica a nivel de especies de hongos patógenos generalmente se basa en los caracteres morfológicos; en este sentido, la forma de la colonia (tipo de colonia) depende de la extensión de las ramificaciones de las hifas, así como de la frecuencia de sus ángulos y se sugiere que el tipo cultural es variable. No obstante, se destaca que ciertos tipos culturales son típicos como es el caso de *P. citricola* 18 que crece en forma de crisantemo, *P. palmivora* en forma estrellada y *P. cinnamomi* en forma petaloide. En algunos casos el

micelio crece sin un patrón definido y existen combinaciones de los mismos (Machado, 2008).

Rodríguez & Vera (2015), señalan que existen muchos géneros, incluyendo *Phytophthora*, los caracteres morfológicos son difíciles de observaren las poblaciones naturales y, a menudo se ven afectados por el medio ambiente. Muchos de éstos también son comunes entre las diferentes especies y se someten a cambios de acuerdo al medio de cultivo, la edad de las colonias, condiciones de incubación, entre otros factores, que pueden causar problemas para la identificación y clasificación de los aislamientos.

2.3. Antecedentes investigativos del control biológico de *M. roreri* y *P. spp.*

León *et al.* (2018) manifiesta que el control biológico ha despertado gran interés en contrarrestar los patógenos de plantas y es una respuesta al creciente uso de pesticidas químicos. Existe un grupo importante de hongos, bacterias, levaduras y actinomicetos que poseen efectos antagónicos con otros microorganismos, acción que puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales.

Infante *et al.* (2009) describen que el género *Trichoderma* es un grupo de hongos ampliamente utilizado por el efecto antagónico contra un amplio rango de hongos fitopatógenos, por su gran capacidad parasítica que presenta frente a otros microorganismos causantes de enfermedades en plantas, entre las enfermedades del suelo que controla *Trichoderma sp.* se pueden mencionar: *Phyitium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium* y *Sclerotinia*. Algunas enfermedades del follaje que controla: *Botrytis*, el mildew polvoroso, entre otras. Tienen la capacidad de producción de antibióticos que le permite inhibir el desarrollo de otros hongos o bacterias que compiten por nutrientes y espacio, como ocurre sobre flores y frutos con *Botrytis* y *Monilia*.

Mediante ensayos realizados *in vitro* Suárez & Cabrales (2008), expresan que los resultados son beneficiosos en cuanto a la capacidad antagónica que presentaron frente a *M. roreri* por ser especie de gran interés para el control biológico de enfermedades en plantas. Se ha demostrado que *T. asperellum* a través de la expresión de un gen (agn13.2) y secreción de enzimas (α -1,3-glucanasa) presenta capacidad antagónica.

López (2017), demuestra que en varios estudios se ha observado en *T. longibrachiatum* una gran capacidad de colonización micelial como agente biocontrolador sobre el fitopatógeno. Como también la capacidad de inhibir mediante el mecanismo de antibiosis.

Según los resultados obtenidos en el estudio de enfrentamiento las seis cepas de *Trichoderma* sp. y las siete cepas de *M. roleri*, las mejores cepas de *Trichoderma* sp. fueron T1-T3 y T5, debido a que ellos produjeron un 100% de antagonismo al sexto de día de evaluación de los ocho días que duró la prueba (León, 2018).

Mediante ensayos en laboratorio Villamil *et al.* (2014) expresan que la capacidad antagónica de los aislamientos de *Trichoderma* sp. frente a *M. roleri* estudiados aumenta hasta el sexto día, en donde se demuestra que el hongo fitopatógeno deja de crecer mientras que el hongo antagonista continúa creciendo hasta invadir totalmente la superficie de la colonia del hongo fitopatógeno, lo cual es la manifestación microscópica de los procesos de micoparasitismo.

Cross & Kenerley (2004), demostraron en un ensayo que el crecimiento del hongo *M. roleri* hasta el borde del plato de Petri (45 mm de radio) fue alcanzado en 5 días bajo una concentración de *Trichoderma* spp. Los factores limitantes para la cobertura micelial en ambientes oligotrópicos han sido postulados, por ende, los propágulos del hongo pueden ser incorporados con una adición de una apropiada sustancia que potencialice el mantenimiento y expansión de las hifas por un largo período.

En estudios realizados a nivel de laboratorio, se evidencio que las cepas de *Trichoderma* sp. presentan fuerte competencia por los nutrientes, y muestran mayor capacidad de colonización del sustrato que el hongo fitopatógeno, por su gran velocidad de crecimiento. Es importante que los ensayos realizados en el laboratorio se lleven a campo para poder comprobar el comportamiento de las cepas antagónicas ante otros microorganismos y observar su velocidad de crecimiento (Cross & Kenerley, 2004).

Suárez & Cabrales (2008), mencionan que *Trichoderma* sp. posee una alta capacidad de competencia por el sustrato, como consecuencia, el organismo afectado tiende a entrar en un estado de latencia que puede ser por deficiencia de nutrientes o la presencia de cierto nivel de sustancias inhibitorias, lo cual reprime que *M. roleri* llegue a esporular.

Phillips (2003), en ensayo realizados evidencia que el hongo fitopatógono no manifiesta germinación de esporas durante las 24 horas de evaluación y además el hongo muestra muy baja germinación de esporas a las 24 horas de incubación, siendo su máximo porcentaje de germinación de un 2.66 %. Estos resultados sugieren una baja viabilidad de las esporas que se producen artificialmente, mientras que en campo podría existir algún factor de tipo ambiental que ayuda a que la germinación de esporas sea elevada.

De acuerdo con Párraga *et al.* (2017) en su estudio sobre la capacidad antagónica de 12 aislados de *Trichoderma* spp., frente a *M. pernicioso*, el aislado A1 mostró ser el que mayor antagonismo presentó y sus características físicas fueron: intenso aroma a coco, conidios de color verde, estructura plana y rápido crecimiento; demostrando así el poder biocontrolador de *Trichoderma* spp., al colonizar la superficie de crecimiento rápidamente y limitar el crecimiento del fitopatógono. No obstante, las características de aroma, estructura y velocidad de crecimiento no resultaron estar necesariamente asociadas a la capacidad antifúngica de los diferentes aislados de *Trichoderma* spp.

Bailey *et al.* (2008) afirman que en el campo relativo al control biológico de las enfermedades causadas por *M. royeri* Cif & Par, *M. pernicioso* (Stahel) y *Phytophthora* sp., se han realizado numerosos estudios con los hongos antagonistas *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp., y con bacterias antagonistas *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp., bajo condiciones *in vitro* y campo en pruebas piloto en Ecuador, Perú, Costa Rica y Colombia, donde evidencian que dichos microorganismos actúan como antiesporulantes de *M. royeri* y que algunos de ellos inclusive, tienen habilidad para inducir resistencia sistémica en la planta.

En condiciones *in vitro*, ha sido posible identificar microorganismos con potencial para el biocontrol de las enfermedades en el cultivo del cacao, lo cual permite inferir que existe la posibilidad de encontrar agentes que efectivamente controlen *M. royeri*, bajo condiciones de campo (Suárez & Cabrales, 2008).

Se ha reportado mediante ensayos realizados por Villamil *et al.* (2012) que el crecimiento de *M. royeri* en medio PDA es muy lento, característica que resulta una gran ventaja para la conservación de las cepas, bajo condiciones de laboratorio. La velocidad de crecimiento de

los aislamientos fue de 2,8 mm cada tres días de incubación, suficiente para cubrir toda la superficie del plato de Petri, a los 48 días.

Las cepas de *Trichoderma* pueden activar un mecanismo nativo de defensa en las plantas contra diferentes plagas, conocido como Resistencia Sistémica Inducida (SIR- Systemic Induced Resistance). Diversas clases de compuestos pueden ser liberados por *Trichoderma* en la zona de la rizosfera y estar relacionados con la IRS en las plantas (Martínez *et al.*, 2013).

Con relación a *M. roreri* y *M. pernicioso*, especies de los géneros *Trichoderma* y *Gliocladium* han sido ampliamente calificadas como agentes eficaces en el control biológico de las enfermedades causadas por estos patógenos, tanto en condiciones *in vitro* como *in situ*, en diferentes áreas geográficas (Hernández *et al.*, 2014).

Existen resultados reportados por Villamil *et al.* (2015) quienes al evaluar cepas de *T. viride*, *T. harzianum* y *T. hamatum*, encontraron antagonismo sobre *M. roreri* *in vitro* e *in situ*.

Krauss *et al.* (2010) mencionan que los bioensayos realizados con *Trichoderma* sp. han sido efectivos y que, por su naturaleza, el control biológico no elimina, sino que reduce las poblaciones del patógeno reduciendo la incidencia de la enfermedad.

Trichoderma harzianum es eficaz contra diversos organismos; tanto en el suelo contra pudriciones de raíces como *Armillaria*, *Rhizoctonia*, *Phytium*, *Phytophthora*, *Fusarium*, enfermedades que se presentan en numerosas especies tanto anuales como perennes, o bien, contra enfermedades de órganos aéreos como *Botritis* o *Stereum*. Se han estudiado cuatro modos de acción de esta especie de hongo: la competencia por nutrientes, la antibiosis, el micoparasitismo y la estimulación de defensas de la planta (Vásconez *et al.*, 2020).

De acuerdo a estudios *in vitro* e *in situ* realizados por Hanada *et al.* (2008) se evidencia que especies de *Trichoderma* inhiben el crecimiento de *Phytophthora* spp., tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. En este sentido, se aislaron cepas de *T. asperellum* Samuels, *T. martiale* Samuels y *T. viride* Pers. de la rizosfera de *T. cacao* con potencial para el control de diferentes especies de *Phytophthora*, en la cual *T. martiale* causó

reducción de la enfermedad ocasionada por *P. megakarya* en frutos de cacao en condiciones *in situ*, con resultados similares a los obtenidos con la aplicación de fungicidas.

Hanada *et al.* (2008) expresan que *T. martiale* coloniza y permanece en la superficie del fruto de cacao por más de 80 días y estableciendo una asociación endofítica con el cultivo que pudo ser evidenciada en las plantas tres meses posteriores a la inoculación. Estos resultados demostraron las potencialidades de *T. martiale* y sus perspectivas de uso en las estrategias de manejo del cultivo.

Uno de los principales mecanismos de acción que despliega *Trichoderma* sobre *Phytophthora* es el parasitismo. Estos hongos pueden parasitar la hifa del patógeno mediante enrollamientos, ganchos y cuerpos de tipo apresorios, que penetran la pared celular por la acción hidrolítica de las enzimas quitinasas, glucanasas y celulasas (Martínez *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que *Trichoderma* produce metabolitos secundarios, que inhiben otros microorganismos con los que no se establece contacto físico. Algunas cepas producen trichodermina, dermadina, suzukacilina, viridina, alameticina, richotoxina, metabolitos que son responsables del mecanismo antagónico ante *Phytophthora* spp. (Vinale *et al.*, 2006).

Mejía *et al.* (2008) demostraron mediante ensayos realizados *in vitro* e *in situ* que hongos endófitos son potencialmente eficientes como agentes de control biológico de plagas que afectan a *T. cacao*; por tal motivo en un ensayo se seleccionaron ocho aislamientos endófitos de los géneros *Trichoderma*, *Pestalotiopsis*, *Curvularia*, *Tolyposcladium* y *Fusarium* con actividad antagonista *in vitro* e *in vivo* contra *P. palmivora* en plantas desarrolladas en condiciones axénicas, en la cual hongos endófitos aislados de tejidos sanos de *T. cacao*, tuvieron actividad antagonista *in vitro* contra *P. palmivora*. Mediante este ensayo se demostró que estos antagonistas tienen la capacidad de colonizar de forma eficiente los tejidos del cultivo y que la competencia por el sustrato y la antibiosis son los principales mecanismos mediante los cuales ejercen su acción.

En Cuba, en la Estación de Investigaciones de Cacao en Baracoa, Guantánamo, se emplearon cepas de *Trichoderma* sp. para el control biológico de *P. palmivora* en plantaciones de *T. cacao*. Se destaca, la aplicación de *Trichoderma* cepa G-6, cuya aplicación disminuyó la incidencia de la enfermedad en condiciones de campo y las pérdidas económicas en el cultivo del 12% a 2%. Estos resultados confirman que la aplicación de productos con cepas de *Trichoderma* permiten mitigar los efectos deletéreos ocasionados por *P. palmivora* en *T. cacao* y sus potencialidades de uso en el cultivo (Hernández *et al.*, 2014).

III. METODOLOGÍA

3.1. Ubicación del área de estudio

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Babahoyo, ubicada en el Km 7,5 de la vía Babahoyo - Montalvo, provincia de Los Ríos. Las coordenadas de ubicación en el centro del área de investigación son: longitud 147503 m y latitud 7929046 m de la zona 17, según la proyección UTM y el sistema de referencia WGS84.

Las muestras vegetales con síntomas y signos de monilia y mazorca negra, fueron colectadas en la Finca Orgánica “El Carmen de Pijullo” ubicada en el Km. 10, vía Ricaurte - Caluma, recinto San José de Pijullo, parroquia Ricaurte, cantón Urdaneta, provincia de Los Ríos - Ecuador. Las coordenadas geográficas del predio son: X = 0679346; Y = 9824305, proyección UTM, zona 17-S. Sistema de referencia: WGS84.

3.1.1. Condiciones climáticas

Dentro del sistema de clasificación de las zonas de vida de Holdridge, el predio Finca Orgánica “El Carmen de Pijullo”, donde fueron colectadas las muestras vegetales con síntomas y signos de monilia y mazorca negra, está catalogado como Bosque Húmedo Tropical con una temperatura promedio de 16°C – 22°C y una precipitación promedio de 1500 mm. a 2000 mm. y una altitud promedio de 37 msnm.

3.2. Materiales, equipos, reactivos y medios de cultivos de laboratorio

3.2.1. Materiales de laboratorio

- Placas de Petri
- Asas de platino
- Cubre objetos
- Porta objetos
- Algodón
- Gasa
- Mascarilla
- Guantes

- Mecheros
- Vasos de precipitación
- Matraz erlenmeyer
- Cinta de parafina
- Pissetas
- Pipetas
- Agitadores de vidrios
- Papel aluminio

3.2.2. Equipos de laboratorio

- Estufa
- Autoclave
- Microscopio invertido compuesto
- Estereomicroscopio
- Calentador
- Baño maría

3.2.3. Reactivos de laboratorio

- Lactofenol
- Hipoclorito de sodio 5%
- Alcohol 70%
- Agua destilada
- Cloranfenicol
- Sulfato de gentamicina

3.2.4. Medios de cultivos de laboratorio

Papa dextrosa agar (PDA).

3.3. Recolección de muestras

En la Finca Orgánica El Carmen de Pijullo, se procedió a seleccionar árboles colectando frutos de cacao con síntomas y signos evidentes de moniliasis y mazorca negra. Cada fruto

se envolvió en papel toalla y se introdujo por separado en una bolsa de papel debidamente etiquetada (lugar, número de muestra, zona, etc.).

Para las pruebas de antagonismo del hongo *Trichoderma* spp. frente a los fitopatógenos *Phytophthora* spp. y *M. royeri* aislados de frutos de cacao, se empleó dos cepas (probablemente especies diferentes). Una cepa 1 aislada desde plantaciones de *T. cacao* L. (cacao) de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP, que reposa en la colección de hongos del laboratorio de Fitopatología de la misma estación experimental, y una segunda cepa 2 aislada desde un cultivo de *Capsicum annuum* L. (pimiento) en el cantón Portoviejo, provincia de Manabí, y que reposa en la colección de hongos del laboratorio de fitopatología de la Universidad Técnica de Manabí.

3.4. Aislamiento de *M. royeri*

Para realizar el aislamiento de *M. royeri* aplicó la metodología propuesta por Villamil *et al.* (2012) con mínimas modificaciones. Se empleó una aguja esterilizada, tomando micelio de esporulada en condiciones de laboratorio, y sembrando en placas de Petri que contienen medio de cultivo PDA, con un pH 5.5 y suplementado con 800 µL de sulfato de gentamicina, para después ser incubadas a 25 °C durante 12 días en condiciones de laboratorio.

3.5. Aislamiento de *P. spp.*

Para realizar el aislamiento de *Phytophthora* spp. se aplicó la metodología descrita por Evans *et al.* (2013) con modificaciones. Las mazorcas con presencia de síntomas fueron sometidas a triples lavados con H₂O estéril y alcohol 70%, recuperando de su epidermis segmentos de corcho de (0,2 cm²). Las muestras de tejido fueron sembradas en placas de Petri con PDA, para después ser incubadas a 28 °C durante 5 días.

3.6. Variables operacionales

- **Variables independientes:** Aplicación de microorganismos antagónicos frente a hongos fitopatógenos de la mazorca del cacao.

- **VARIABLES DEPENDIENTES:** Control antagónico de moniliasis (*M. roreri*) y mazorca negra (*Phytophthora* spp.).

3.7. Tratamientos y diseño experimental

Para formar los tratamientos se emplearon la técnica de enfrentamiento dual empleada por Howell (2003) y Meza *et al.* (2008) con algunas modificaciones. Se aplicó 10 tratamientos, basados en la combinación dual de hongos antagonistas y hongos fitopatógenos, más testigos absolutos, con cinco repeticiones por tratamiento, distribuidos en un diseño completo al azar (DCA), (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos utilizados en la investigación.

Tratamientos	Descripción
T1	Cepa 1 (<i>Trichoderma</i> spp.) + <i>M. roreri</i>
T2	Cepa 1 (<i>Trichoderma</i> spp.) + <i>Phytophthora</i> spp.
T3	Cepa 2 (<i>Trichoderma</i> spp.) + <i>M. roreri</i>
T4	Cepa 2 (<i>Trichoderma</i> spp.) + <i>Phytophthora</i> spp.
T5	Cepa 1 (<i>Trichoderma</i> spp.) + <i>M. roreri</i> + <i>Phytophthora</i> spp.
T6	Cepa 2 (<i>Trichoderma</i> spp.) + <i>M. roreri</i> + <i>Phytophthora</i> spp.
T7	<i>M. roreri</i>
T8	<i>Phytophthora</i> spp.
T9	Cepa 1 (<i>Trichoderma</i> spp.)
T10	Cepa 2 (<i>Trichoderma</i> spp.)

3.8. Características de la unidad experimental y ADEVA

La unidad experimental consistió en una placa de Petri de 90 mm de diámetro, ajustado a pH 5.5 e incubados a 25 ± 1 °C, con períodos alternos de 12 horas luz y 12 oscuridad.

Tabla 2. Fuentes de variación y sus grados de libertad.

Fuentes de Variación	Grados de libertad
Tratamientos (n-1)	9
Repeticiones (m-1)	4
Error (n-1)*(m-1)	36
Total (sumatoria)	49

3.9. Pruebas de antagonismo “*in vitro*”

Para las pruebas de antagonismo “*in vitro*”, se aplicó la técnica de enfrentamiento dual empleada por Howell (2003) y Meza *et al.* (2008) con algunas modificaciones, en donde se describe lo siguiente:

En el enfrentamiento *Trichoderma* spp. + *M. royeri*, se dispuso en un extremo del plato de Petri un disco de 5 mm de diámetro con inóculo de *Trichoderma* spp. y en el extremo opuesto otro disco de 5 mm con inóculo de *M. royeri*, a una distancia de 6 cm entre ambos. Para ello, se le dio al hongo fitopatógeno ventaja competitiva de 6 días debido a que su dinámica de crecimiento es lenta, tal como reporta Villamil *et al.* (2012). La duración del ensayo consiste de 21 días.

En el enfrentamiento *Trichoderma* spp. + *Phytophthora* spp., se dispuso en un extremo del plato de Petri un disco de 5 mm de diámetro con inóculo de *Trichoderma* spp. y en el extremo opuesto otro disco de 5 mm con inóculo de *Phytophthora* spp., a una distancia de 4 cm entre ambos debido a la dinámica de crecimiento lento del antagonista. La siembra se realizó al mismo tiempo, llevando las mediciones del ensayo hasta los 9 días.

3.10. Variables evaluadas

3.10.1. Variables de crecimiento

Estas variables fueron medidas simultáneamente en las pruebas de antagonismo *in vitro*.

3.10.1.1. Ritmo de crecimiento radial

Se expresa como el incremento radial promedio de la colonia del patógeno y antagonista expresado en mm/día-1, a través de la metodología propuesta por French & Hebert (1982) con algunas modificaciones (Figura 5), en la cual se marcó en el reverso de un plato de Petri cuatro radios equidistantes a partir del centro, enumerando cada radio a favor de las manecillas del reloj y para cada replica se le asigno una letra. Se marco y se registró el avance promedio diario hasta que la colonia llena completamente el plato de Petri.

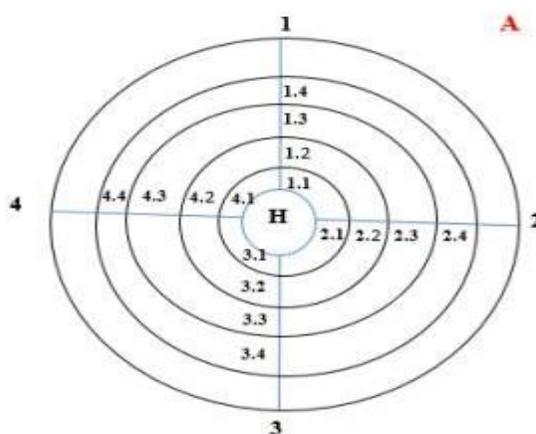


Figura 5. Proceso de medición del crecimiento radial para hongos, adaptado de French & Hebert (1982).

3.10.1.2. Media de crecimiento radial

Es el promedio del crecimiento radial acumulado de la colonia del hongo antagónico o patógeno expresado en mm, procedente de un inóculo de 5 mm de diámetro.

3.10.1.3. Tasa de crecimiento radial

Es el valor promedio de crecimiento radial del patógeno y antagonista que aumenta cada día, expresado en mm/día-1. Se calcula mediante la fórmula propuesta por Guigón *et al.* (2010):

$$TC = \frac{(\text{Crecimiento radial final} - \text{Crecimiento radial inicial})}{\text{Tiempo de incubación}}$$

3.10.2. Competencia por espacio y nutrientes

3.10.2.1. Tiempo de contacto antagonista-patógeno

Es el lapso de tiempo (número de días) en el cual la colonia del hongo antagonista y el hongo patógeno entran en contacto (Calvo *et al.*, 2012).

3.10.2.2. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial

Samaniego *et al.* (1989) expresan que es la inhibición del crecimiento del patógeno por efecto del antagonista expresado en porcentaje. Esta variable se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{PICR} = \frac{(R1 - R2)}{R1 * 100}$$

Donde,

PICR: Es el porcentaje de inhibición del crecimiento radial

R1: Es el radio del patógeno testigo

R2: Es el radio del patógeno en enfrentamiento.

3.10.2.3. Competencia por sustrato

Bell *et al.* (1982) expresan que la competencia es el espacio que ocupa en el sustrato el hongo antagonista y/o patógeno en enfrentamiento dual, incluyendo el medio de cultivo y la colonia del hongo adversario (Tabla 3).

Tabla 3. Grado de antagonismo de agentes de control biológico respecto a la competencia por sustrato, propuesta por Bell *et al.* (1982).

Grado antagónico	Capacidad antagónica (antagonista-patógeno)
1	Antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno
2	Antagonista llega a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo
3	Antagonista y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno parece dominar al otro
4	Patógeno sobrepasa al crecimiento del antagonista colonizando dos terceras partes del plato de Petri
5	Patógeno llega a cubrir totalmente el plato de Petri

3.10.3. Micoparasitismo

Mediante la metodología de Sánchez *et al.* (2017), se realizó esta evaluación, la misma que consistió en realizar observaciones microscópicas de los cultivos duales usando un microscopio binocular con aumento 40X, para poder observar las interacciones hifales entre los antagonistas con el patógeno, ya sea por enrollamiento, penetración, lisis y vacuolización.

3.11. Análisis estadístico

Los datos recopilados en cada variable fueron procesados estadísticamente, determinando parámetros de estadística descriptiva: media, desviación estándar, error estándar, coeficiente de variación. Además, se realizó un análisis de varianza para comparar los tratamientos de acuerdo con las fuentes de variación. Para la determinación de diferencias estadísticas

significativas entre los tratamientos para las variables analizadas, se aplicó la prueba de Tukey al 5 %. Para todos los análisis se empleó en el software de análisis estadístico *Infostat*.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados obtenidos en la investigación

4.1.1. Aislamiento del patógeno *M. roreri*

Se recolectaron varios frutos de cacao con síntomas y signos visibles de la enfermedad moniliasis en la Finca Orgánica “El Carmen de Pijullo” ubicada en el Km. 10, vía Ricaurte - Caluma, recinto San José de Pijullo, parroquia Ricaurte, cantón Urdaneta, provincia de Los Ríos - Ecuador.



Figura 6. Recolecta de frutos con Moniliasis: (a) síntomas iniciales con manchas y abultamiento, (b) síntomas intermedios mancha generalizada, (c) fruto con inicio de esporulación y (d) fruto esporulación completa.

De las muestras recolectadas se lograron obtener varios aislados del patógeno *M. roreri*, a partir de la metodología propuesta por Villamil *et al.* (2012) con mínimas modificaciones. Al aplicar la metodología de aislamiento mencionada anteriormente, se comprobó que es posible aislar el patógeno *M. roreri* a partir de frutos esporulados y con síntomas iniciales.

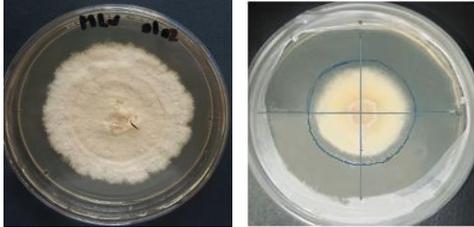
El aislamiento del patógeno *M. roreri* tuvo algo de dificultad debido al crecimiento de otros microorganismos, aun cuando la mazorca de cacao presento signos y síntomas de la enfermedad, entre los cuales se presentaron: *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp., y *Rhizopus* sp.

4.1.2. Identificación del hongo *M. roreri*

4.1.2.1. Características macroscópicas de *M. roreri*

Los aislados obtenidos de *M. roreri*, crecieron en medio de cultivo PDA con periodos alternos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad a 25 °C durante 12 días en condiciones de laboratorio (Tabla 4).

Tabla 4. Características macroscópicas de las colonias de aislados de *M. roreri* en medio de cultivo PDA.

Cepa	Imagen de la colonia	Características
<i>M. roreri</i>		La colonia presentó coloración crema - café claro - blanco, esporulación uniforme en toda la colonia, borde entero, textura afelpada y con ausencia de sectores.

4.1.2.2. Características microscópicas de *M. roreri*

La cepa de *M. roreri* presento esporas hialinas de forma globosa e hifas tabicadas (Figura 7).

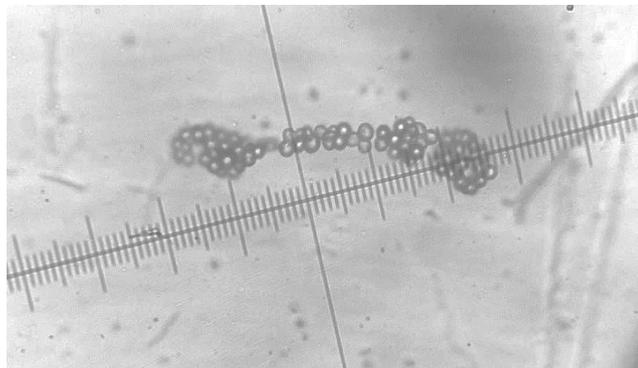


Figura 7. Forma de las esporas de *M. roreri*. Globosas.

4.1.3. Aislamiento del patógeno *P. spp.*

Se recolectaron varios frutos de cacao con síntomas y signos visibles de la enfermedad mazorca negra en la Finca Orgánica “El Carmen de Pijullo” ubicada en el Km. 10, vía Ricaurte - Caluma, recinto San José de Pijullo, parroquia Ricaurte, cantón Urdaneta, provincia de Los Ríos - Ecuador.

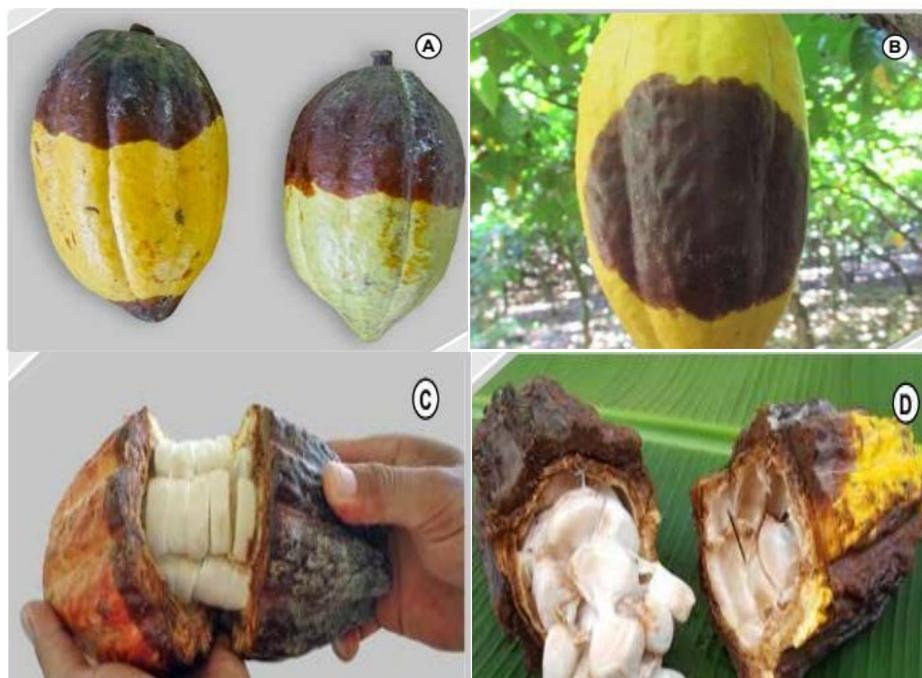


Figura 8. Frutos con síntomas externos por infección de mazorca negra (A y B). Frutos con daño externo por mazorca negra y almendras sanas (C y D).

De las muestras recolectadas se lograron obtener varios aislados del patógeno *P. spp.*, a partir de la metodología descrita por Evans *et al.* (2013) con modificaciones. Al aplicar la metodología de aislado mencionada anteriormente, se comprobó que es posible aislar el patógeno *P. spp.* a partir de frutos esporulados y con síntomas iniciales.

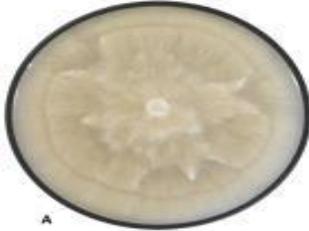
El aislamiento del patógeno *P. spp.* tuvo algo de dificultad debido al crecimiento de otros microorganismos, aun cuando la mazorca de cacao presento signos y síntomas de la enfermedad, entre los cuales se presentaron: *Fusarium sp.*, *Diplodia sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, y *Rhizopus sp.*

4.1.4. Identificación del hongo *P. spp.*

4.1.4.1. Características macroscópicas de *P. spp.*

Los aislados obtenidos de *P. spp.*, crecieron en medio de cultivo PDA con periodos alternos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad a 28 °C durante 5 días en condiciones de laboratorio (Tabla 5).

Tabla 5. Características macroscópicas de las colonias de aislados de *P. spp.* en medio de cultivo PDA.

Cepa	Imagen de la colonia	Características
<i>P. spp.</i>		La colonia presentó patrones de crecimiento estrellados con ligeras variaciones; micelio aéreo algodonoso y abundante hacia el centro de la colonia.

4.1.4.2. Características microscópicas de *P. spp.*

La cepa de *P. spp.* presentó esporangios con variaciones en su forma, desde elíptica a ovoide, con bases redondeadas. Se observaron, además, abundantes clamidosporas unidas al micelio (Figura 9).

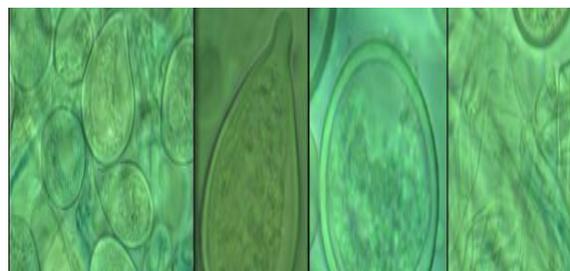


Figura 9. Características microscópicas de *P. spp.*

4.1.5. Variables de crecimiento

4.1.5.1. Ritmo de crecimiento radial

En la Figura 10, se muestra en detalle la cinética de crecimiento radial acumulado para los tratamientos de *T. sp* cepa 1 (45 mm) y *T. sp* cepa 2 (43.6 mm) mostraron un comportamiento casi homogéneo respecto al llenado del plato Petri de 45 mm de radio. Respecto al crecimiento radial acumulado de los tratamientos de *P. spp.* (44.6 mm) y *M. roreri* (44 mm) presentaron un comportamiento homogéneo.

En relación al enfrentamiento dual la cepa 2 (*T. sp.*) (39.2 mm) presentó sobre *M. roreri* (5.8 mm), un alto crecimiento radial acumulado, a diferencia de la cepa 1 (*T. sp.*) (37.2 mm) que presentó sobre *M. roreri* (7.2 mm), un bajo crecimiento radial acumulado.

En el enfrentamiento dual la cepa 1 (*T. sp.*) (38 mm) presentó sobre *P. spp* (7 mm), un adecuado crecimiento radial acumulado, a diferencia de la cepa 2 (*T. sp.*) (37.8 mm) que presentó sobre *P. spp* (7.2 mm), un menor crecimiento radial acumulado.

En relación al enfrentamiento dual la cepa 2 (*T. sp.*) (30.4 mm) presentó sobre *M. roreri* (7 mm) y *P. spp* (7.6 mm) un alto crecimiento radial acumulado, a diferencia de la cepa 1 (*T. sp.*) (28.8 mm) que presentó sobre *M. roreri* (8.4 mm) y *P. spp* (8 mm), un bajo crecimiento radial acumulado.

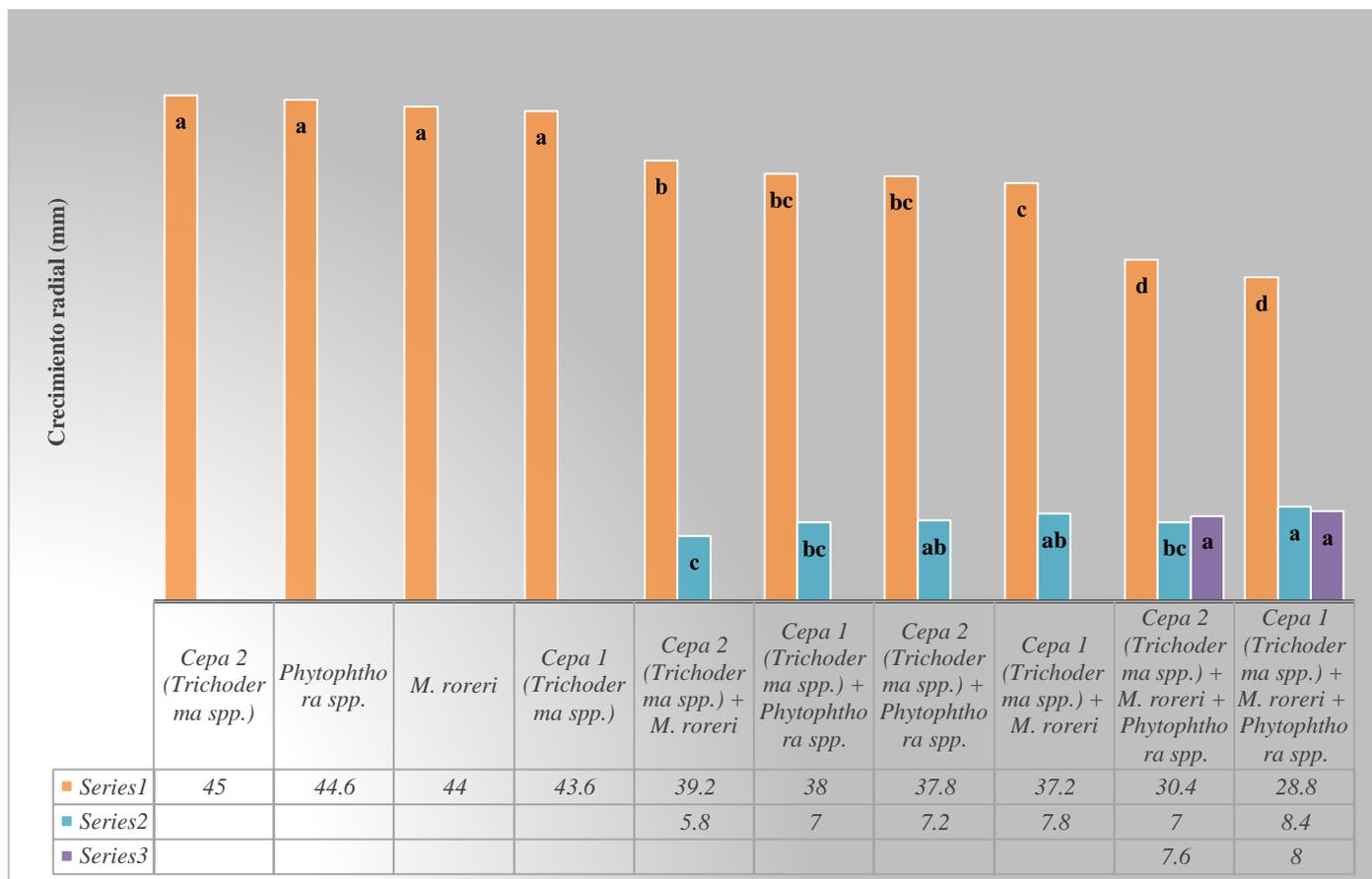


Figura 10. Crecimiento radial acumulado (mm).

4.1.5.2. Media de crecimiento radial

Las medias de crecimiento radial de los tratamientos cepa 2 (*T. sp*) (22.5 mm), *P. spp* (22.3 mm), *M. royeri* (22 mm), cepa 1 (*T. sp*) (21.8 mm) fueron estadísticamente iguales y superiores al resto de tratamientos (Figura 11).

En el enfrentamiento dual el tratamiento con la cepa 2 (*T. sp*) (19.6 mm) presentó una media de crecimiento radial superior sobre el patógeno *M. royeri* (2.9 mm). El enfrentamiento dual con la cepa 1 (*T. sp*) (18.6 mm) que presentó una media de crecimiento radial superior sobre el patógeno *M. royeri* (3.9 mm).

En relación al enfrentamiento dual el tratamiento con la cepa 1 (*T. sp*) (19 mm) presentó una media de crecimiento radial superior sobre el patógeno *P. spp.* (3.5 mm), de igual manera el

enfrentamiento dual con la cepa 2 (*T. sp*) (18.6 mm) presento una media de crecimiento radial superior sobre el patógeno *P. spp.* (3.9 mm).

Respecto al enfrentamiento dual el tratamiento cepa 2 (*T. sp*) (15.2 mm) presento una media de crecimiento radial superior sobre los patógenos *M. roreri* (3.5 mm) y *P. spp.* (3 mm). En el enfrentamiento dual del tratamiento cepa 1 (*T. sp*) (14.4 mm) presento una media de crecimiento radial superior sobre los patógenos *M. roreri* (4.2 mm) y *P. spp.* (3 mm).

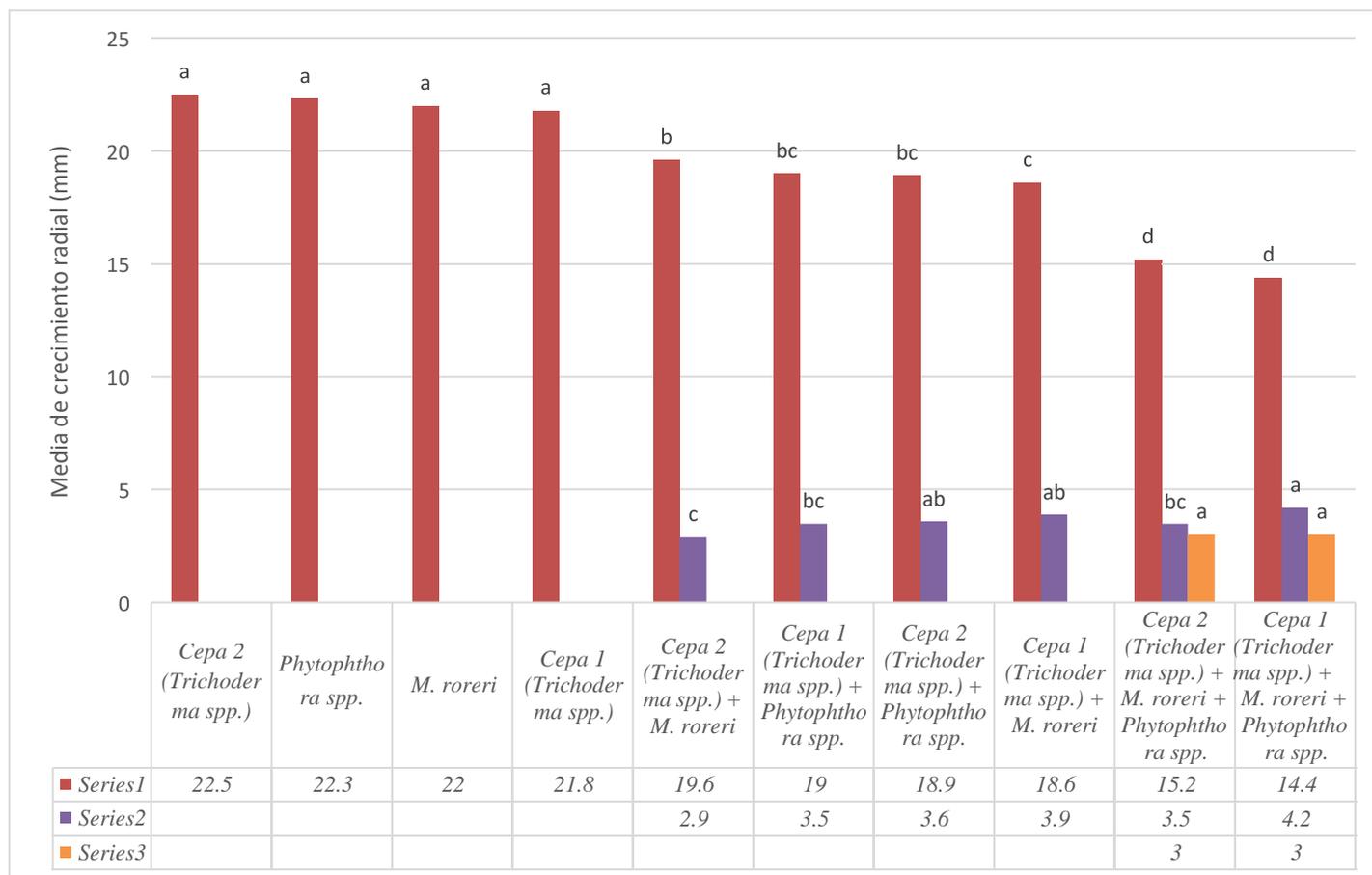


Figura 11. Medias de crecimiento radial acumulado

4.1.5.3. Tasa de crecimiento radial

En el enfrentamiento dual el tratamiento con la cepa 1 (*T. sp*) (1.53 mm.h^{-1}) presento una tasa de crecimiento radial superior sobre el patógeno *M. roreri* (0.13 mm.h^{-1}). A igual que el enfrentamiento dual con la cepa 1 (*T. sp*) (3.66 mm.h^{-1}) que presento una tasa de crecimiento radial superior sobre el patógeno *P. spp* (0.22 mm.h^{-1}) (Tabla 6).

En relación al enfrentamiento dual con la cepa 2 (*T. sp*) (1.63 mm.h^{-1}) que mostro una tasa de crecimiento radial superior sobre el patógeno *M. roreri* (0.04 mm.h^{-1}). De igual manera se obtuvo una taza de crecimiento superior con la cepa 2 (*T. sp*) (3.64 mm.h^{-1}) sobre el patógeno *P. spp* (0.84 mm.h^{-1}).

Se logro una mayor tasa de crecimiento radial con la cepa 2 (*T. sp*) (1.21 mm.h^{-1}) sobre los patógenos *M. roreri* (0.09 mm.h^{-1}) y *P. spp* (0.29 mm.h^{-1}), a diferencia de la cepa 1 (*T. sp*) (1.13 mm.h^{-1}) que presento una menor tasa de crecimiento radial sobre los patógenos *M. roreri* (0.16 mm.h^{-1}) y *P. spp* (0.33 mm.h^{-1}),

El aislado de *M. roreri* presento una taza de crecimiento alta de 1.86 mm.h^{-1} , al igual que el aislado de *P. spp* presento una taza de crecimiento alta de 4.4 mm.h^{-1} .

La cepa 2 (*T. sp*) presento una taza de crecimiento alta de 1.9 mm.h^{-1} , en relación a la cepa 1 (*T. sp*) que presento una taza de crecimiento baja de 1.83 mm.h^{-1} .

Tabla 6. Tasa de crecimiento radial

Tratamientos	Crecimiento (mm.h ⁻¹)		
	<i>T. spp.</i>	<i>M. roreri</i>	<i>P. spp.</i>
Cepa 1 (<i>T. spp.</i>) + <i>M. roreri</i>	1.53	0.13	
Cepa 1 (<i>T. spp.</i>) + <i>P. spp.</i>	3.66		0.22
Cepa 2 (<i>T. spp.</i>) + <i>M. roreri</i>	1.63	0.04	
Cepa 2 (<i>T. spp.</i>) + <i>P. spp.</i>	3.64		0.84
Cepa 1 (<i>T. spp.</i>) + <i>M. roreri</i> + <i>P. spp.</i>	1.13	0.16	0.33
Cepa 2 (<i>T. spp.</i>) + <i>M. roreri</i> + <i>P. spp.</i>	1.21	0.09	0.29
<i>M. roreri</i>		1.86	
<i>P. spp.</i>			4.4
Cepa 1 (<i>T. spp.</i>)	1.83		
Cepa 2 (<i>T. spp.</i>)	1.9		
Promedio	2.07	0.46	1.22

4.1.6. Competencia por espacio y nutrientes

4.1.6.1. Tiempo de contacto antagonista – patógeno

El tiempo de contacto en cultivo dual de la cepa 1 (*T. spp.*) + *M. roreri* ocurrió entre los 3 y 4 días después de establecido el enfrentamiento; mientras que en la prueba de cultivo dual de la cepa 1 (*Trichoderma spp.*) + *P. spp* el tiempo de contacto fue de 4 días.

El tiempo de contacto en cultivo dual de la cepa 2 (*T. spp.*) + *M. roreri* ocurrió a los 4 días después de establecido el enfrentamiento; mientras que en la prueba de cultivo dual de la cepa 2 (*Trichoderma spp.*) + *P. spp* el tiempo de contacto fue de 4 días.

El tiempo de contacto en cultivo dual de la cepa 1 (*T. spp.*) + *M. roreri* + *P. spp* ocurrió a los 4 días después de establecido el enfrentamiento; mientras que en la prueba de cultivo dual de la cepa 2 (*T. spp.*) + *M. roreri* + *P. spp* el tiempo de contacto fue de 3 días.

4.1.6.2. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR)

En el enfrentamiento dual el efecto de inhibición del crecimiento radial de la cepa 2 (*T. spp.*) fue mayor sobre el patógeno *M. royeri* (84.44 %), mientras que para el patógeno *P. spp* (83.11 %) fue menor, a diferencia de la cepa 1 (*T. spp.*) que mostro un menor efecto de inhibición del crecimiento radial sobre *M. royeri* (81.33 %) y sobre el *P. spp* (82.22 %) (Figura 12).

El efecto de inhibición del crecimiento radial de la cepa 1 (*T. spp.*) sobre el patógeno *P. spp* (84.44 %) fue similar al efecto de inhibición del crecimiento radial de la cepa 2 (*T. spp.*) sobre el *P. spp* (84 %).

El efecto de inhibición del crecimiento radial de la cepa 1 (*T. spp.*) sobre el patógeno *M. royeri* (82.22 %) fue superior al efecto de inhibición del crecimiento radial de la cepa 2 (*T. spp.*) sobre el patógeno *M. royeri* (69.5 %).

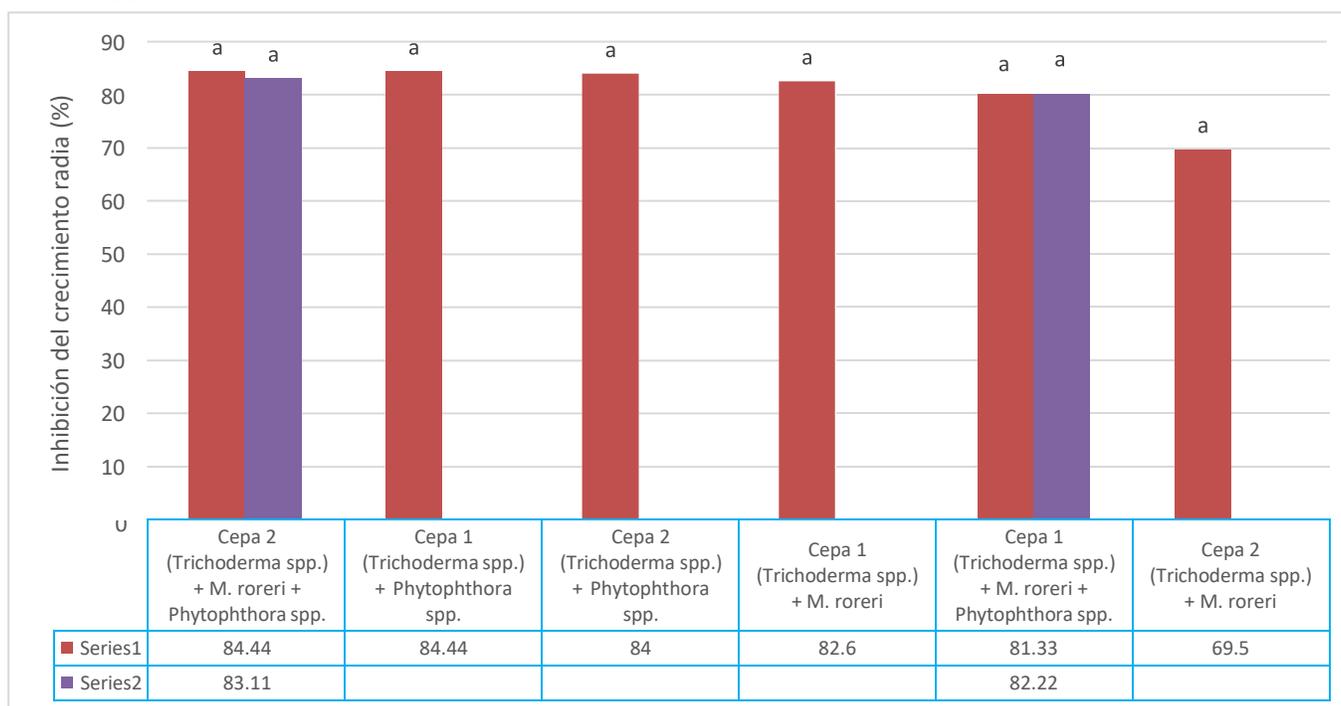


Figura 12. Actividad antagonica ejercida por *Trichoderma sp.* sobre el crecimiento radial de los patógenos *M. royeri* y *P. spp.*

4.1.6.3. Competencia por sustrato

Transcurridos los 21 días de evaluación en los tratamientos para el enfrentamiento *T. spp* - *M. roreri* y los 9 días para los tratamientos con enfrentamientos *T. spp* – *P. spp*, se procedió a determinar el grado de antagonismo según la escala de Bell *et al.*, (1982) (Tabla 7).

Tabla 7. Grado de antagonismo competencia por sustrato de aislados de *T. sp* frente a *M. roreri* y *P. spp* de acuerdo a la escala de Bell *et al.*, (1982).

Tratamientos	Enfrentamiento dual	<i>M. roreri</i>	<i>P. spp.</i>
T1	Cepa 1 (<i>T. spp.</i>)	1	--
T2	Cepa 1 (<i>T. spp.</i>)	1	--
T3	Cepa 2 (<i>T. spp.</i>)	1	--
T4	Cepa 2 (<i>T. spp.</i>)	1	--
T5	Cepa 1 (<i>T. spp.</i>)	1	1
T6	Cepa 2 (<i>T. spp.</i>)	1	1
T7	<i>M. roreri</i>	--	--
T8	<i>P. spp.</i>	--	--
T9	Cepa 1 (<i>T. spp.</i>)	--	--
T10	Cepa 2 (<i>T. spp.</i>)	--	--

a) Enfrentamiento de *T. spp.* – *M. roreri*

La cepa 1 (*T. spp.*) y la cepa 2 (*T. spp.*) frente a *M. roreri* lograron colonizar por completo el sustrato creciendo y esporulando sobre el patógeno, asignándoles el grado 1 de la escala de Bell *et al.*, (1982), caracterizándose como buenos controladores frente a estos aislados por su alta especificidad (Figura 13).

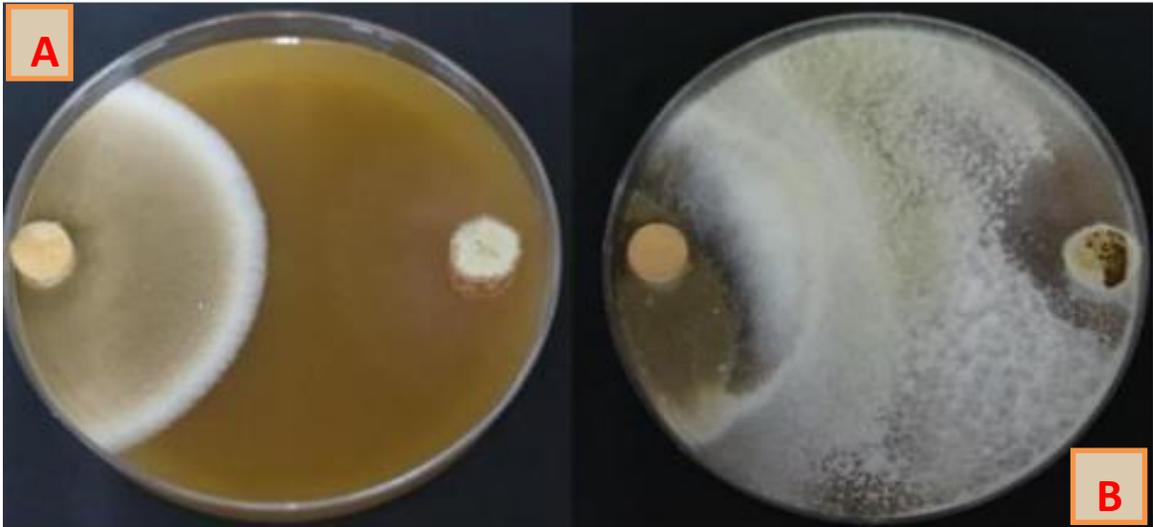


Figura 13. (A) Primer día de siembra Cultivo dual de *T. spp* frente a *M. royeri* izquierda (B) 360 horas después de la siembra *M. royeri* derecha *T. spp*.

b) Enfrentamiento de *T. spp.* – *P. spp.*

La cepa 1 (*T. spp.*) y la cepa 2 (*T. spp.*) frente a *P. spp.* lograron colonizar por completo el sustrato creciendo y esporulando sobre el patógeno, asignándoles el grado 1 de la escala de Bell *et al.*, (1982), caracterizándose como buenos controladores frente a estos aislados por su alta especificidad (Figura 14).

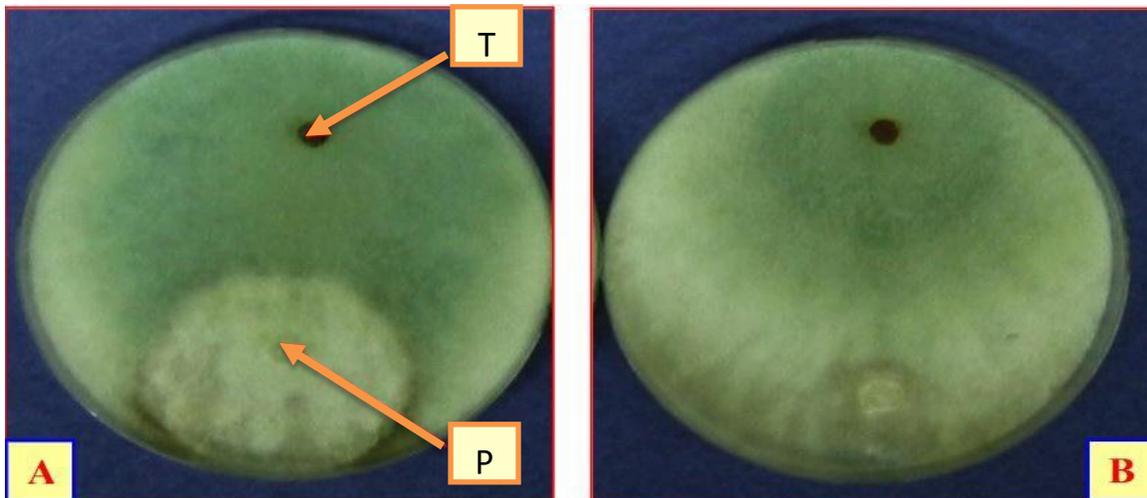


Figura 14. Enfrentamiento *T. spp* (T) y *P. spp* (P). (A): Inhibición de crecimiento vegetativo de *P. spp* en presencia de *T. spp* en medio PDA. (B) Reducción máxima de la colonia de *P. spp* y expansión de *T. spp*.

4.1.7. Micoparasitismo

El efecto de micoparasitismo como mecanismo de acción antagonista, ejercido por la cepa 1 (*T. spp.*) y la cepa 2 (*T. spp.*) frente a *M. roreri*, se observó de manera macroscópica. Por una parte, las cepas estudiadas de *T. sp* cubrieron de forma total y esporularon sobre la colonia del patógeno *M. roreri*.

Microscópicamente se logró observar interacciones hifales de la cepa 1 (*T. spp.*) y la cepa 2 (*T. spp.*) antagonistas en el punto de inoculación de *M. roreri*.

Bajo microscopio óptico con aumento 40X, se observaron interacciones hifales como enrollamiento, penetración y lisis únicamente en la cepa 1 (*T. spp.*) y la cepa 2 (*T. spp.*) (Figura 15).

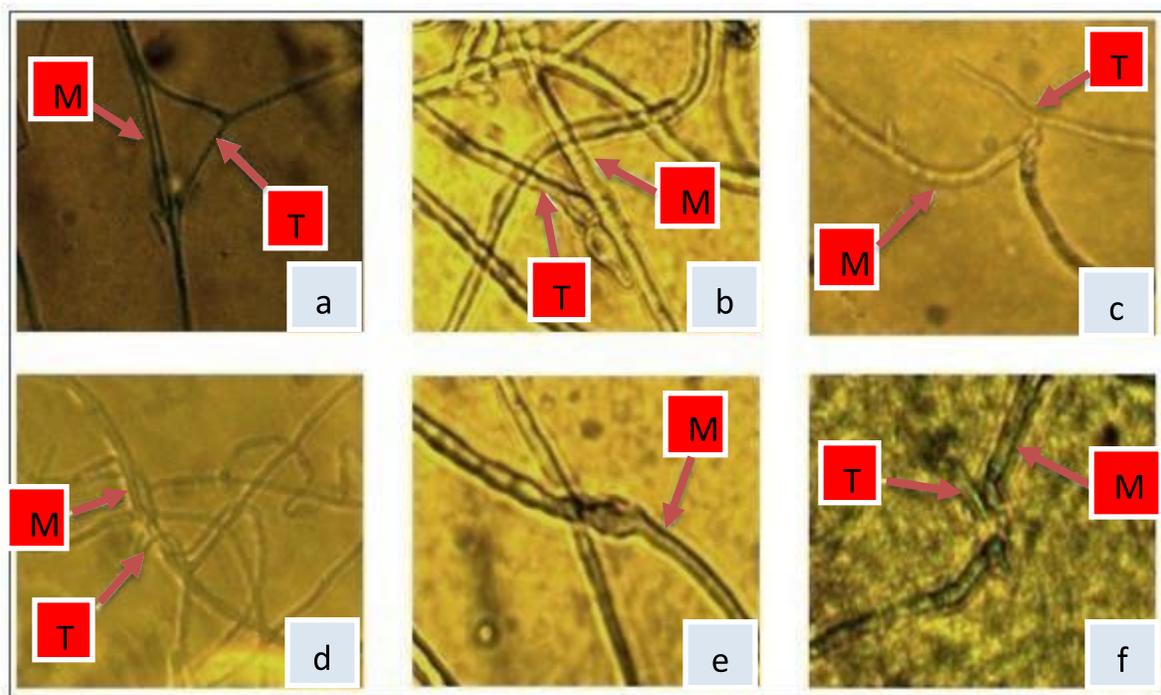


Figura 15. Micoparasitismo de *T. sp* (T) sobre *M. roreri* (M). Penetración (a y b), Enrollamiento hifal (c y d), Lisis (e y f).

El efecto de micoparasitismo como mecanismo de acción antagonista, ejercido por la cepa 1 (*T. spp.*) y la cepa 2 (*T. spp.*) frente a *P. spp*, se observó de manera macroscópica. Las

cepas estudiadas de *T. sp* cubrieron de forma total y esporularon sobre la colonia del patógeno *P. spp.*

Microscópicamente se logró observar interacciones hifales de la cepa 1 (*T. spp.*) y la cepa 2 (*T. spp.*) en el punto de inoculación de *P. spp.*

Bajo microscopio óptico con aumento 40X, se observaron interacciones hifales como enrollamiento, penetración y lisis únicamente en la cepa 1 (*T. spp.*) y la cepa 2 (*T. spp.*) (Figura 16).

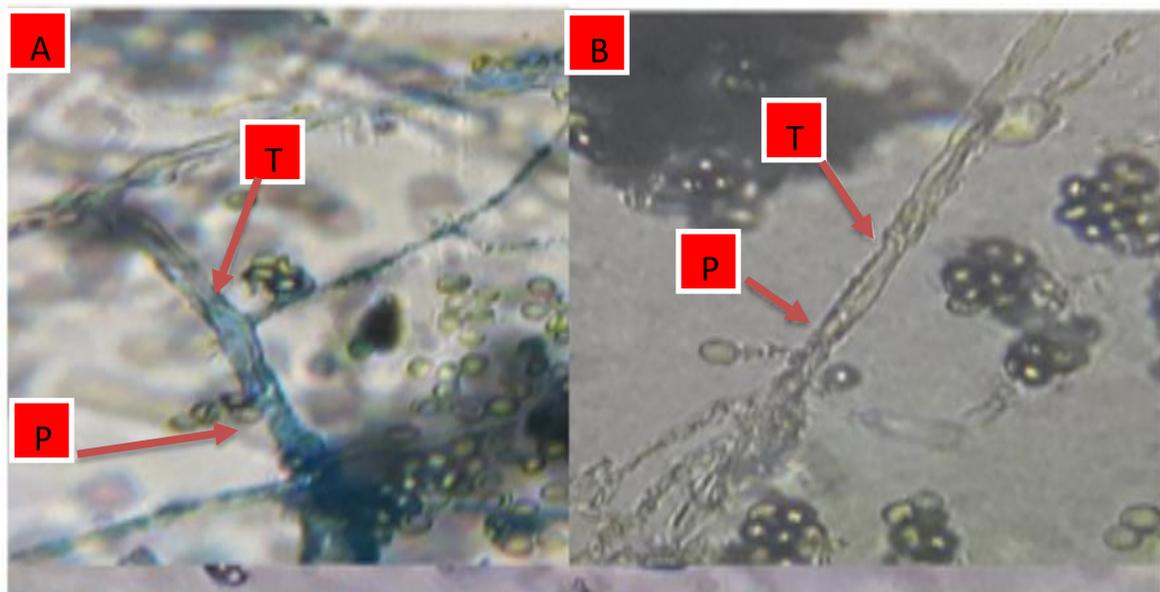


Figura 16. Micoparasitismo de *T. spp.* sobre *P. spp.* (A) cepa de *T. spp.* la cual se observa hifa penetrando a *P. spp.* (B) cepa de *T. spp.* enrollando a *P. spp.*

4.2. Pruebas estadísticas aplicadas

Los datos analizados en cada variable fueron procesados estadísticamente, determinando parámetros de estadística descriptiva: media, desviación estándar, error estándar, coeficiente de variación. Además, se realizó un análisis de varianza para comparar los tratamientos de acuerdo con las fuentes de variación. Para la determinación de diferencias estadísticas

significativas entre los tratamientos para las variables analizadas, se aplicó la prueba de Tukey al 5 %. Para todos los análisis se empleó en el software de análisis estadístico *Infostat*.

4.3. Análisis e interpretación de datos

El análisis e interpretación de datos de cada una de las variables evaluadas se realizó en su prioridad respectiva descrita anteriormente, tomando en consideración la importancia de la investigación realizada.

4.4. Discusión de resultados

De las muestras recolectadas con signos de la enfermedad moniliasis se logró obtener varios aislados del patógeno *M. royeri*, a partir de la metodología propuesta por Villamil *et al.* (2012) con mínimas modificaciones. Al aplicar la metodología de aislamiento mencionada anteriormente, se comprobó que es posible aislar el patógeno *M. royeri* a partir de frutos esporulados y con síntomas iniciales. Es importante resaltar que mediante las modificaciones efectuadas a la metodología descrita por Villamil *et al.* (2012), se logró disminuir notablemente la presencia de flora acompañante permitiendo el crecimiento de colonias con características macro y microscópicas propias del patógeno, características que según estos autores no les fue posible observar por la alta contaminación.

De las muestras recolectadas con signos de la enfermedad mazorca negra se logró obtener varios aislados del patógeno *P. spp.*, a partir de la metodología descrita por Evans *et al.* (2013) con modificaciones. Al aplicar la metodología de aislamiento mencionada anteriormente, se comprobó que es posible aislar el patógeno *P. spp.* a partir de frutos esporulados y con síntomas iniciales. Mediante las modificaciones efectuadas a la metodología descrita por Evans *et al.* (2013), se logró disminuir notablemente la presencia de flora acompañante permitiendo el crecimiento de colonias con características macro y microscópicas propias del patógeno.

En el desarrollo de la investigación se evaluó variables de crecimiento, mismas que los autores Dennis y Webster (1971), definen que la velocidad de crecimiento es un factor ventajoso en la disputa por colonizar un área, compitiendo por espacio y nutrientes; esta es una forma de ejercer control biológico, al detener completamente el desarrollo del micelio

del patógeno.

En la variable ritmo de crecimiento radial el enfrentamiento dual de la cepa 2 (*T. sp.*) (39.2 mm) sobre *M. roreri* (5.8 mm), presento un alto crecimiento radial acumulado, a diferencia de la cepa 1 (*T. sp.*) (37.2 mm) que presento sobre *M. roreri* (7.2 mm), un bajo crecimiento radial acumulado. En el enfrentamiento dual la cepa 1 (*T. sp.*) (38 mm) presento sobre *P. spp* (7 mm), un adecuado crecimiento radial acumulado, a diferencia de la cepa 2 (*T. sp.*) (37.8 mm) que presento sobre *P. spp* (7.2 mm), un menor crecimiento radial acumulado. Resultados similares a los reportados por Valencia y Castro (2004) en cuanto al crecimiento radial de tres aislados de *T. sp* a 26°C, quienes llenaron el plato Petri de 45 mm de radio en 72 horas.

El crecimiento radial acumulado de los aislados de *M. roreri* presentó un comportamiento disminuido en el tiempo, durante los 21 días de ensayo, al igual que *P. spp.* durante los 9 días de ensayo, estos resultados son similares a los obtenidos por Mosquera (2014) y Villavicencio (2010), quienes encontraron que aislados de *M. roreri* y *P. spp* en competencia con *T. spp*, presentan un bajo crecimiento radial acumulado durante los días de post inoculación.

Respecto a la variable media de crecimiento radial en el enfrentamiento dual el tratamiento con la cepa 2 (*T. sp*) (19.6 mm) presento una media de crecimiento radial superior sobre el patógeno *M. roreri* (2.9 mm). El enfrentamiento dual con la cepa 1 (*T. sp*) (18.6 mm) que presento una media de crecimiento radial superior sobre el patógeno *M. roreri* (3.9 mm). En relación al enfrentamiento dual el tratamiento con la cepa 1 (*T. sp*) (19 mm) presento una media de crecimiento radial superior sobre el patógeno *P. spp.* (3.5 mm), de igual manera el enfrentamiento dual con la cepa 2 (*T. sp*) (18.6 mm) presento una media de crecimiento radial superior sobre el patógeno *P. spp.* (3.9 mm). Valencia y Castro (2004), reportan media de crecimiento radial de 28.98 mm a 26 °C, siendo superior a las encontradas en este estudio, posiblemente se atribuya a la temperatura. Schubert *et al.*, (2009), observaron una disminución en la tasa de crecimiento proporcional ala disminución de la temperatura, estableciendo un rango óptimo de 25 a 30 °C.

En relación a la variable tasa de crecimiento se considera que es una característica fisiológica útil para predecir la habilidad de control biológico de las cepas de *Trichoderma* (Uzunovic y Webber, 1998) por lo que es utilizada como una primera referencia al caracterizar cepas nuevas de este antagonista (Hermosa *et al.*, 2000).

La tasa promedio obtenida para las cepas de *T. spp* en este estudio resultó de 2.07 mm.h⁻¹, coincidiendo con lo encontrado por Guigón *et al.*, (2010) de 0.71 a 3.2 mm.h⁻¹.

La tasa de crecimiento radial diaria de *M. roreri* fueron variables en cada tratamiento, con un promedio de 0.46 mm. día⁻¹, similar al reportado por Mosquera (2014) con una tasa de crecimiento radial diario de 0.52 mm. día⁻¹.

La tasa de crecimiento radial diaria de *P. spp* fueron variables en cada tratamiento, con un promedio de 1.22 mm. día⁻¹, similar al reportado por Rodríguez *et al* (2011) con una tasa de crecimiento radial diario de 1.32 mm. día⁻¹.

El tiempo de contacto en cultivo dual de la cepa 1 (*T. spp.*) + *M. roreri* ocurrió entre los 3 y 4 días después de establecido el enfrentamiento; mientras que en la prueba de cultivo dual de la cepa 1 (*Trichoderma spp.*) + *P. spp* el tiempo de contacto fue de 4 días. El tiempo de contacto en cultivo dual de la cepa 2 (*T. spp.*) + *M. roreri* ocurrió a los 4 días después de establecido el enfrentamiento; mientras que en la prueba de cultivo dual de la cepa 2 (*Trichoderma spp.*) + *P. spp* el tiempo de contacto fue de 4 días. El tiempo de contacto en cultivo dual de la cepa 1 (*T. spp.*) + *M. roreri* + *P. spp* ocurrió a los 4 días después de establecido el enfrentamiento; mientras que en la prueba de cultivo dual de la cepa 2 (*T. spp.*) + *M. roreri* + *P. spp* el tiempo de contacto fue de 3 días. Esto hace referencia a lo manifestado por Michel (2001) quien menciona que un tiempo de contacto corto es una característica deseable en un antagonista, ya que entre menor sea éste, implicará una mayor agresividad, característica que fue evidente en los enfrentamientos *T. spp* -*M. roreri* y *T. spp* -*P. spp* en el cual ocurrió el contacto a los 3-4 días después de establecida la prueba de cultivo dual. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores, quienes han determinado que *Trichoderma sp* y otros patógenos entran en contacto entre 1 a 3 días en dependencia de la distancia entre inóculos (Hernández, 2014). En general el crecimiento del patógeno se

detuvo cuando el micelio de éste entra en contacto con el micelio de la cepa de *T. sp* y en algunos casos el patógeno creció un día más después de entrar en contacto con el antagonista.

En el enfrentamiento dual el efecto de inhibición del crecimiento radial de la cepa 2 (*T. spp.*) fue mayor sobre el patógeno *M. roreri* (84.44 %), mientras que para el patógeno *P. spp* (83.11 %) fue menor, a diferencia de la cepa 1 (*T. spp.*) que mostro un menor efecto de inhibición del crecimiento radial sobre *M. roreri* (81.33 %) y sobre el *P. spp* (82.22 %). El efecto de inhibición del crecimiento radial de la cepa 1 (*T. spp.*) sobre el patógeno *P. spp* (84.44 %) fue estadísticamente igual al efecto de inhibición del crecimiento radial de la cepa 2 (*T. spp.*) sobre el *P. spp* (84 %). El efecto de inhibición del crecimiento radial de la cepa 1 (*T. spp.*) sobre el patógeno *M. roreri* (82.22 %) fue superior al efecto de inhibición del crecimiento radial de la cepa 2 (*T. spp.*) sobre el patógeno *M. roreri* (69.5 %). Sin embargo, Magdama (2010) en estudio de efecto de cepas de *Trichoderma sp* para el control de *M. roreri* y *P. spp*, obtuvo porcentajes de inhibición en un rango que varió de 89.57 % a 100 %, resultados superiores a los encontrados en el presente estudio. Esto se debe probablemente a las condiciones en las que se desarrolló el ensayo, siendo establecido a temperatura de 27°C y sin ventaja competitiva de *M. roreri* y *P. spp*.

Transcurridos los 21 días de evaluación en los tratamientos para el enfrentamiento *T. spp* - *M. roreri* y los 9 días para los tratamientos con enfrentamientos *T. spp* – *P. spp*, se determinó el grado de antagonismo según la escala de Bell *et al.*, (1982), en la cual la cepa 1 (*T. spp.*) y la cepa 2 (*T. spp.*) frente a *M. roreri* lograron colonizar por completo el sustrato creciendo y esporulando sobre el patógeno, asignándoles el grado 1 de la escala de Bell *et al.*, (1982), caracterizándose como buenos controladores frente a estos aislados por su alta especificidad. La cepa 1 (*T. spp.*) y la cepa 2 (*T. spp.*) frente a *P. spp*. lograron colonizar por completo el sustrato creciendo y esporulando sobre el patógeno, asignándoles el grado 1 de la escala de Bell *et al.*, (1982), caracterizándose como buenos controladores frente a estos aislados por su alta especificidad. Siendo importante considerar lo manifestado por Infante *et al.*, (2009), quienes sugieren que la competencia por sustrato o espacio depende de la velocidad de crecimiento conjuntamente con otros mecanismos de acción del antagonista, siendo determinante en el control biológico del patógeno y colonización del sustrato. Martínez *et*

al., (2013) mencionan que, si el crecimiento del antagonista es más rápido que el del patógeno, éste no tiene la capacidad de explorar el sustrato debido a la ausencia de germinación y formación de estructuras.

El efecto de micoparasitismo como mecanismo de acción antagonista, ejercido por la cepa 1 (*T. spp.*) y la cepa 2 (*T. spp.*) frente a *M. roreri*, se observó de manera macroscópica. Por una parte, las cepas estudiadas de *T. sp* cubrieron de forma total y esporularon sobre la colonia del patógeno *M. roreri*. Bajo microscopio óptico con aumento 40X, se observaron interacciones hifales como enrollamiento, penetración y lisis únicamente en la cepa 1 (*T. spp.*) y la cepa 2 (*T. spp.*). El efecto de micoparasitismo como mecanismo de acción antagonista, ejercido por la cepa 1 (*T. spp.*) y la cepa 2 (*T. spp.*) frente a *P. spp.*, se observó de manera macroscópica. Las cepas estudiadas de *T. sp* cubrieron de forma total y esporularon sobre la colonia del patógeno *P. spp.* Bajo microscopio óptico con aumento 40X, se observaron interacciones hifales como enrollamiento, penetración y lisis únicamente en la cepa 1 (*T. spp.*) y la cepa 2 (*T. spp.*). Todo esto se debe a lo estudiado por Benítez *et al* (2004) quienes refieren que el enrollamiento y formación de apresorios son estructuras especializadas de *T. sp* involucradas en el micoparasitismo para poder parasitar la hifa del patógeno y causar su degradación celular.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye lo siguiente:

- Los aislados de *M. roreri* y *P. spp* presentaron las características patogénicas y morfológicas deseables para desarrollar las pruebas de antagonismo.
- La cepa 1 (*T. spp*) y cepa 2 (*T. spp*) presentaron excelentes características antagónicas sobre el control de *M. roreri* y *P. spp*.
- En relación al enfrentamiento dual la cepa 2 (*T. sp.*) (39.2 mm) presentó sobre *M. roreri* (5.8 mm), un alto crecimiento radial acumulado, a diferencia de la cepa 1 (*T. sp.*) (37.2 mm) que presentó sobre *M. roreri* (7.2 mm), un bajo crecimiento radial acumulado.
- En el enfrentamiento dual el tratamiento con la cepa 2 (*T. sp*) (19.6 mm) presentó una media de crecimiento radial superior sobre el patógeno *M. roreri* (2.9 mm).
- El enfrentamiento dual con la cepa 1 (*T. sp*) (18.6 mm) que presentó una media de crecimiento radial superior sobre el patógeno *M. roreri* (3.9 mm).
- En el enfrentamiento dual el tratamiento con la cepa 1 (*T. sp*) ($1.53 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$) presentó una tasa de crecimiento radial superior sobre el patógeno *M. roreri* ($0.13 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$).
- En el enfrentamiento dual con la cepa 1 (*T. sp*) ($3.66 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$) que presentó una tasa de crecimiento radial superior sobre el patógeno *P. spp* ($0.22 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$).
- En relación al enfrentamiento dual con la cepa 2 (*T. sp*) ($1.63 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$) que mostró una tasa de crecimiento radial superior sobre el patógeno *M. roreri* ($0.04 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$).
- Se obtuvo una tasa de crecimiento superior con la cepa 2 (*T. sp*) ($3.64 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$) sobre el patógeno *P. spp* ($0.84 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$).
- En el enfrentamiento dual el efecto de inhibición del crecimiento radial de la cepa 2 (*T. spp.*) fue mayor sobre el patógeno *M. roreri* (84.44 %), mientras que para el patógeno *P. spp* (83.11 %) fue menor, a diferencia de la cepa 1 (*T. spp.*) que mostró un menor efecto de inhibición del crecimiento radial sobre *M. roreri* (81.33 %) y

sobre el *P. spp* (82.22 %).

- El efecto de inhibición del crecimiento radial de la cepa 1 (*T. spp.*) sobre el patógeno *P. spp* (84.44 %) fue similar al efecto de inhibición del crecimiento radial de la cepa 2 (*T. spp.*) sobre el *P. spp* (84 %).
- Los mecanismos de antagonismo encontrados fueron el micoparasitismo y competencia por espacio y nutrientes para las cepas de *T. spp*, ubicadas en el grado 1 de la escala de antagonismo.

5.2. Recomendaciones

En base a los resultados obtenidos se recomienda:

- El procesamiento de las muestras debe realizarse lo más pronto posible después de haber sido colectadas y bajo condiciones asépticas controladas para evitar la contaminación y el crecimiento de hongos ambientales.
- Realizar estudios de identificación molecular que permitan caracterizar a nivel de especie los hongos antagonistas.
- Realizar investigaciones *in situ* en plantaciones de cacao para comprobar la capacidad antagónica de los hongos nativos, que permitan llegar a la fase de formulación y producción masiva de formulados a base de estos hongos antagonistas.
- Es importante establecer un programa de ampliación de banco de cepas de hongos nativos antagonistas a través de investigaciones en zonas cacaoteras no estudiadas.

VI. BIBLIOGRAFIA

Albuquerque, P. S. B., Bastos, C. N., Luz, E. D. & Silva, S.D. 2005. Doenças do cacauero (*Theobroma cacao* L.). In: Kimati H.; Amorim L.; Rezende J.A.; (eds) Man. Fitopatol., 4ta ed. Livroceres, Piracicaba, Brasil. p. 151 – 163.

Amores, F., Agama, J., Suárez, C., Quiroz, J. & Motato, N. 2009. EET 575 y EET 576 nuevos clones de cacao nacional para la zona central de Manabí. Boletín divulgativo N 346. Estación Experimental Tropical “Pichilingue”. Quevedo, Ecuador. 28 p.

Arévalo, E., Canto, M., Leon, B., Meinhardt, L. & Cayotopa, J. 2010. *Colonización de plántulas de Theobroma cacao* por aislamientos de *Trichoderma* endófitos con potencial de control biológico. Paper presented at the XXI Congreso Peruano de Fitopatología., Tarapoto, Perú.

BCE (Banco Central del Ecuador). Información Estadística Mensual. Boletín No. 2004 - Participación porcentual de los principales productos de exportación. Recuperado el 17 de Enero de 2021, de <https://contenido.bce.fin.ec/documentos/PublicacionesNotas/Catalogo/IEMensual/Indices/m2004022019.htm>

Bailey, B., Bae, H., Stem, M., Crozier, J., Thomas, S. & Samuels, G. 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao* L. *Biological Control*. 46(1): 24–35.

Benítez, T; Rincón, A; Limón, M; Codón, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma strains*. *International Microbiology*. 7:249-260.

Bell, D., Wells, H. & Markam C. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. against six fungal pathogens. *Phytopathology*. 72(4): 379-382.

Calvo, J., Rivera, G., Orozco, S. & Orozco, R. 2012. Aislado y Evaluación *in vitro* de antagonistas de *Botrytis cinérea* en Mora. *Agronomía Mesoamericana*. 23(2): 225-231.

Contreras, L. & Riano, A. 2013. Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Acta Agronómica*. 62(4): 370-378.

Cross, D. & Kenerley, C. 2004. Modelling the growth of *Trichoderma virens* with limited sampling of digital images. *Journal of Applied Microbiology*. 97(3): 486-494.

Correa, J., Castro, S. & Coy, J. 2014. Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. *Acta Agronómica*. 63(4): 388-399.

Dennis, C. and Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. *Transactions of the British Mycological Society*. 57:363-369.

Enríquez, G. 2004. Cacao orgánico, guía para productores ecuatorianos. INIAP. Manual No.54. Quito. Ecuador, pp. 34, 41.

Erwin, D. C. & Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora Diseases World wide*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minn, USA. 562 p.

Evans, H. C. 2002. Invasive neotropical pathogens of tree crops. *Tropical mycology*. 2(1): 83–112.

Evans, H. 2007. Cacao diseases: The trilogy revisited. *Phytopathology*. 97(12): 1640-1643.

Evans, H., Bezerra, J. & Barreto, R. 2013. Of mushrooms and chocolate trees: aetiology and phylogeny of witches broom and frosty pod diseases of cacao. *Plant Pathology*. 7(4): 728-740.

Fravel, D. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*. 43(1): 337–359.

French, E. & Hebert, T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. IICA. San José, CR. 150 p.

Guigón, C., Guerrero, V., Vargas, F., Carvajal, E., Ávila, G., Bravo, L., Ruocco, M., Lanzuise, S., Woo, S. & Lorito, M. 2010. Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de Crecimiento *in vitro* y Antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28(2): 87-96.

Hanada, R.E., de Souza, J.T., Pomella, A.W.V., Hebbar, K.P. & Pereira, J.O. 2008. *Trichoderma martiale* nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. *Mycological Research*. 112(11): 1335-1343.

Hernández, A., Ruíz, Y., Acebo, Y., Miguélez, Y. & Heydrich, M. 2014. Antagonistas microbianos para el manejo de la pudrición negra del fruto en *Theobroma cacao* L. estado actual y perspectivas de uso en Cuba. *Protección Vegetal*. 29(1): 11-19.

Howell, C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* spp in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Diseases*. 87(1): 4-10.

Hermosa, M; Grondona, I; Iturriaga, E; Díaz, J; Castro, C; Monte, E. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(5):1890-1898.

Infante, D., Martínez, B., González, N. & Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*. 24(1): 14-21.

INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias). 2012. Guía del manejo integrado de enfermedades del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Amazonía ecuatoriana. Joya de los Sachas, Ecuador. 20 pp.

Jaimes, Y. & Aranzuzu, F. 2010. *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L.) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)*. Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica.

Krauss, U., Ten, M., Hidalgo, E., Martínez, A., Arroyo, C., García, A., Portuguese, & Sánchez, V. 2003. Manejo integrado de monilia (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Talamanca, Costa Rica. *Agroforestería en las Américas*. 10(37): 52-58.

Krauss, U., Hidalgo, E., Bateman, R., Adonijah, V., Arroyo, C., García, J., Crozier, J., Brown, N., Ten Hoopen, G. & Holmes, K. 2010. Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical agents against frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Biological Control*. 54(3): 230-240.

Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S. & Liu Y. 2013. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*. 167(2): 153-160.

Leon, B., Ortiz, N., Ticona, C. & Yupanqui, C. 2018. *Cepas de Trichoderma con capacidad endofítica sobre el control del mildiu (Peronospora variabilis Gäum.) y mejora del rendimiento de quinua*. *Revista de Investigaciones Altoandinas*. 20(1): 19-30.

Loor, G.M., Fouet, O.M., Lemainque, A., Pavek, S., Boccara, M., Argout, X., Amores, F., Courtois, B., Marie Risterucci, A. & Lanaud, C. 2013. Insight into the Wild Origin, migration and domestication history of the fine flavor national *Theobroma cacao* L. variety from Ecuador. *Plos One*. 8(2): 10-1371.

López, U., Brito, U., López, D., Salaya, J. & Gómez, E. 2017. Papel de *Trichoderma* en los sistemas agroforestales cacaotal como un agente antagonico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 20(1): 91-100.

Machado, M. 2008. Caracterización morfológica y fisiológica de *Phytophthora* spp., aisladas de plantas de aguacatero con síntomas de marchitez. *Citrifrut*. 5(2): 55.

Martínez, B., Infante, D. & Reyes, Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Protección Vegetal*. 28(1): 1-11.

Mosquera, L. 2014. Caracterización cultural, morfológica y fisiológica in vitro de *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al., agente causante de la Moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L), en comunidades kichwas amazónicas de la provincia de Napo-Ecuador. Tesis Ing. Agrop. Universidad Estatal Amazónica. Pastaza, EC. 89 p.

McMahon, P. & Purwantara, A. 2004. *Diversity and management of cocoa in Asia: Phytophthora in cocoa*. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR).

Mejia, L.C., Rojas, E.I., Maynard, Z., Arnold, E.C., Hebbar, P. & Samuels, G.J. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*. 46(1): 4-14.

Meza, C., Fernández, R., Valero, N., Gámez, R. & Paéz, A. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart) Sacc., asociado a la marchitez de la maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 10(2): 35-43.

Melo, C. & Hollander, G. 2013. Unsustainable development: Alternative food networks and the Ecuadorian Federation of Cacao Producers, 1995-2010. *Journal of Rural Studies*. 32(1): 251- 263.

Molina, S., Pérez, S., Demey, J., Isturiz, M. & Sosa, D. 2016. Diversidad genética de *Phytophthora* spp. en plantaciones venezolanas de cacao mediante marcadores ISSR. *Revista de Protección Vegetal*. 31(1): 1-8.

Magdama, F. 2010. Estudio de efectos de bioles y cepas de *Trichoderma* sp aisladas de zonas cacaoteras, como alternativas de control de *Moniliophthora roreri*, en condiciones *in vitro*. Tesis Ing. Agric. y Biol. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. Guayaquil, EC. 102 p.

Michel, A. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp. (Eufungi:Hyphales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes:Hyphales). Tesis Dr. Biotec. Universidad de Colima. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Colima, MX. 176 p.

Paredes, M. 2016. El manejo fitosanitario del cultivo de cacao nacional (*Theobroma cacao* L.) y el rendimiento del mismo, en la asociación Kallari”. Tesis de Magíster en Agroecología y Ambiente. Universidad Técnica de Ambato. Ambato, Ecuador. p. 5.

Párraga, J., Cañadas, A., Fajardo, P., Rade, D. & Andrade, J. 2017. Caracterización *in vitro* de *Trichoderma* spp. y modelo matemático de su antagonismo en presencia de *Moniliophthora perniciosa*. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*. 38(1): 25-34.

Phillips-Mora, W. 2003. Origin, Biogeography, Genetic Diversity and Taxonomic Affinities of the cacao Fungus *Moniliophthora roreri* as determined using Molecular, Phytopathological and Morpho-Physiological Evidence. Tesis de Doctor en Ciencias. UK: University of Reading. 373 pp.

Phillips-Mora, W., Cawich, J., Garnett, W. & Aime, M. C. 2006. First report of frosty pod rot (moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Belize. *Plant Pathology*. 55(4): 584.

Phillips, W., Aimes, M. & Wilkinson, M. 2007. Biodiversity and biogeography of the cacao

(*Theobroma cacao* L.) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology*. 56(6): 911-922.

Rodríguez, E. & Vera, A. 2015. *Identificación y manejo de la pudrición parda de la mazorca (Phytophthora sp.) en cacao*. Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica.

Rodríguez, G; Flores, E; León, B; Arévalo, E. 2011. Caracterización morfológica de hongos endófitos asociados a cacao nativo y su capacidad antagonica para el control de *Moniliophthora perniciosa*. Universidad Nacional de San Martín. Facultad de Ciencias Agrarias. San Martín, PE. 21 p.

Samaniego, J., Ulloa, A. & Herrera, T. 1989. Hongos del suelo antagonicos de *Phymatorichum omnivorum*. *Fitopatología Mexicana*. 7(1): 86-95.

Sánchez, F. & Garcés, F. 2012. *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.* en el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria*. 3(3): 249-258.

Sánchez, B., Espinosa, E., Villordo, E., Rodríguez, R. & Mora, M. 2017. Identificación molecular y evaluación antagonica in vitro de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Montcalm. 51(1): 63-79.

Suárez, C. 1993. Moniliasis del cacao. Documento Técnico N°10. EET Pichilingue, INIAP. FUNDAGRO. Quito, Ecuador, 18 p.

Suárez, L. & Cabrales, C. 2008. Identificación de las especies de cepas nativas de *Trichoderma* sp., y *Bacillus* sp., y evaluación de su potencial antagonista *in vitro* frente al hongo fitopatógeno nativo *M. roreri* en el departamento de Norte de Santander. *Revista de la Universidad Francisco de Paula Santander*. 13(1): 45-56.

Schubert, M; Mourad, S; Fink, S; Schwarze, F. 2009. Ecophysiological responses of the

biocontrol agent *Trichoderma atroviride* (T-15603.1) to combined environmental parameters. *Biological Control*. 49:84-90.

Uzunović, A. and Webber, J. 1998. Comparison of bluestain fungi grown *in vitro* and in freshlycut pine billets. *European Journal of Forest Pathology* 28:323-334.

Valencia, J. y Castro, B. 2004. Aspectos biológicos de aislamiento de *Trichoderma* sp antagonista *Rosellinia bunodes*. *CENICAFE*. Caldas, CO. 55(1):16-28.

Villavicencio, M. 2010. "Caracterización morfológica, fisiológica y patológica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco provincias de la Costa Ecuatoriana. Tesis. Ing. Agric. y Biol. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. Guayaquil, EC. 59 p.

Vásconez, G., Torres, A., Touma, C. y Ezeta, H. (2022). Incidence of two antagonists (*Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*) on pathogens in pepper crops (*Capsicum annuum* L.) in the Babahoyo area, Los Rios province. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 5(3): 721-737.

Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, L., Lorito, M. & Sivasithamparam, K. 2006. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 43(2): 143-148.

Villamil, J., Blanco, J. & Viteri, S. 2012. Evaluación *in vitro* de microorganismos nativos por su antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 65(1): 6305-6315.

Villamil, J., Viteri, S. & Villegas, W. 2015. Aplicación de Antagonistas Microbianos para el Control Biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. bajo condiciones de campo. *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía de Medellín*. 68(1): 7441-7450.

ANEXOS

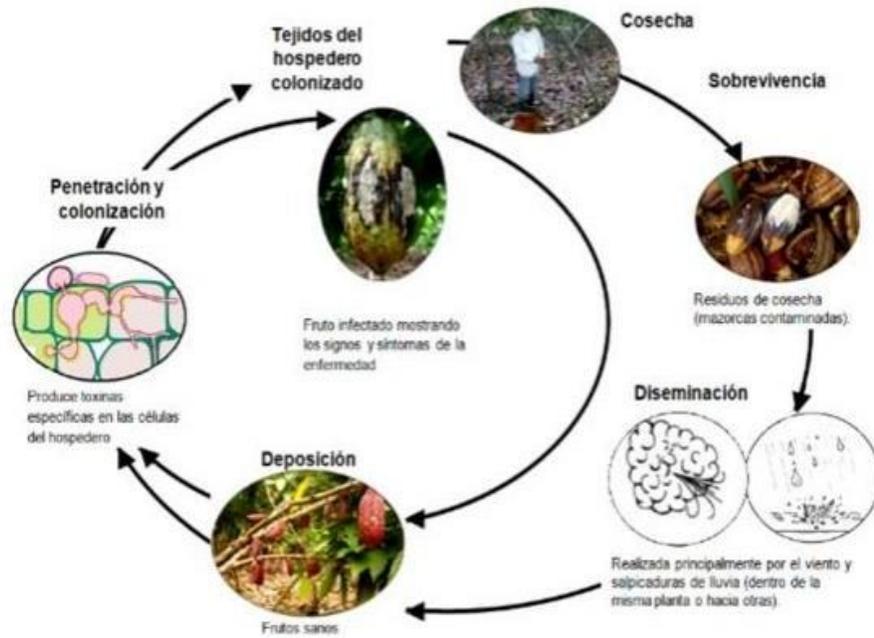


Figura 1. Ciclo de la moniliasis causada por *M. roleri* Fuente: Paredes (2016).



Figura 2. Síntomas externos e internos de moniliasis (Paredes, 2016).



Figura 3. Síntomas externos de mazorca negra (McMahon & Purwantara, 2004).

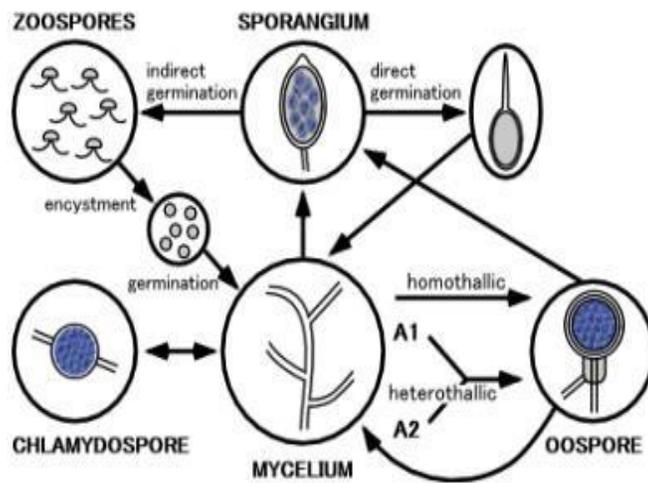


Figura 4. Ciclo vital de *Phytophthora* spp., (Jaimes & Aranzuzu, 2010).

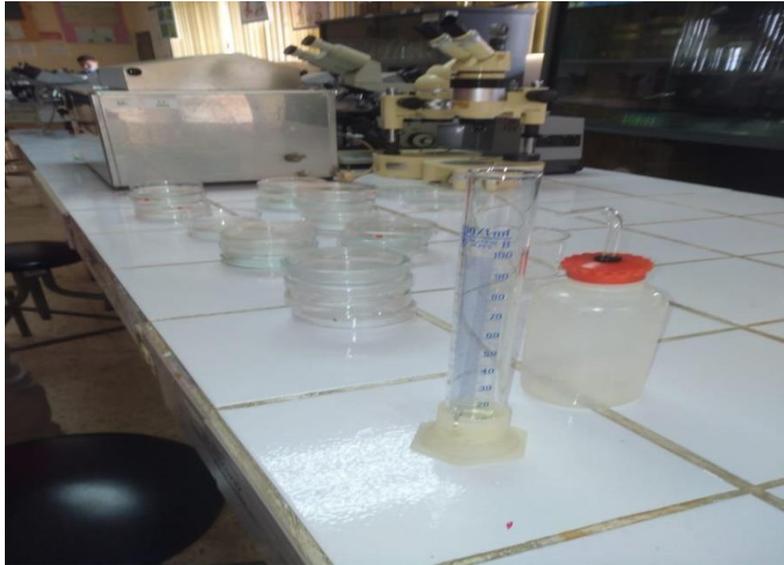


Figura 17. Preparación y desinfección de materiales de laboratorio



Figura 18. Preparación de medio de cultivo PDA



Figura 19. Siembra de microorganismos dentro de la cámara de flujo laminar

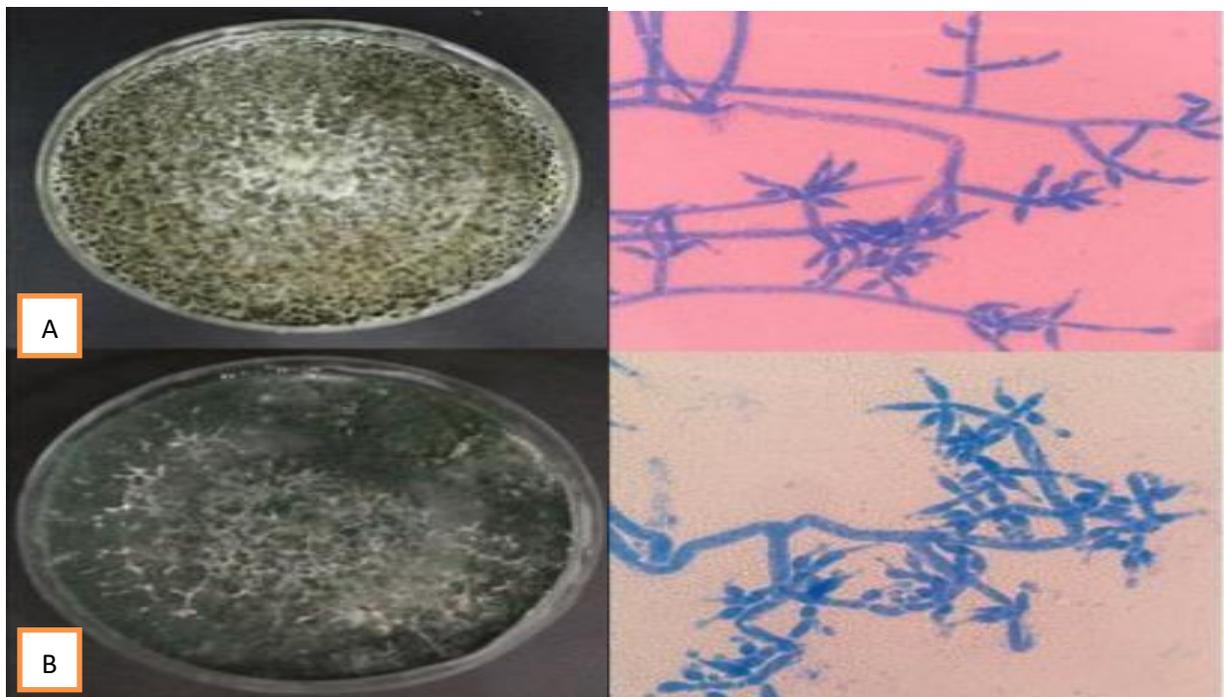


Figura 20. (A): Cepa 1 (*T. spp*) y (B) Cepa 2 (*T. spp*), macro y microscópicamente



Figura 21. (A): Control antagónico de Cepa 1 (*T. spp*) frente a *M. roreri* y (B) Control antagónico de Cepa 2 (*T. spp*) frente a *M. roreri*.

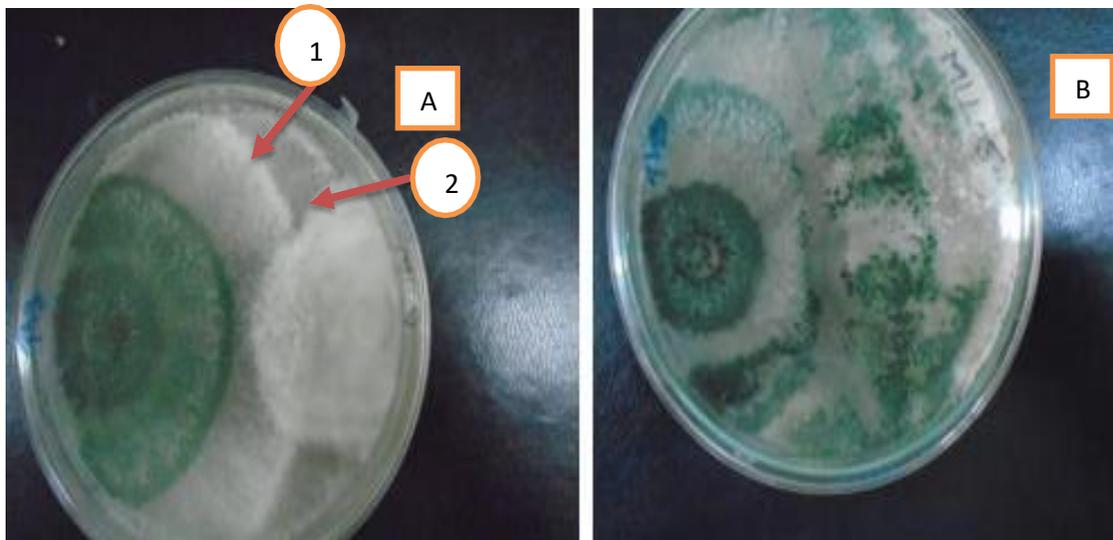


Figura 22. Antagonismo por competencia demostrado por cepas de *T. spp* sobre *P. spp*. (A): se muestra el borde de avance (1) de la cepa 1 (*T. spp*) y el borde de avance del aislado *P. spp* (2). (B): se puede observar que la cepa 2 (*T. spp*) creció completamente sobre la colonia del aislado *P. spp*.