



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA “EVALUACIÓN DE CEPAS DE *TRICHODERMA* SPP.
EN EL CONTROL DE MONILLA (*Moniliophthora roreri*), EN
CACAO (*Theobroma cacao*) *IN VITRO* Y EN CAMPO EN LA
PROVINCIA DE NAPO-ECUADOR.”**

AUTOR: TUQUERRES CURIPALLO, HENRRY LUIS

DIRECTOR: Dr. FRANCISCO FLORES

SANGOLQUÍ

2016

CERTIFICACIÓN



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "EVALUACIÓN DE CEPAS DE *TRICHODERMA* SPP. EN EL CONTROL DE MONILLA (*Moniliophthora roreri*), EN CACAO (*Theobroma cacao*) *IN VITRO* Y EN CAMPO EN LA PROVINCIA DE NAPO-ECUADOR." realizado por el señor HENRRY LUIS TUQUERRES CURIPALLO, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor HENRRY LUIS TUQUERRES CURIPALLO para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 10 de agosto de 2016



Dr. FRANCISCO FLORES

DIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, HENRRY LUIS TUQUERRES CURIPALLO, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación "EVALUACIÓN DE CEPAS DE *TRICHODERMA* SPP. EN EL CONTROL DE MONILLA (*Moniliophthora roreri*), EN CACAO (*Theobroma cacao*) *IN VITRO* Y EN CAMPO EN LA PROVINCIA DE NAPO-ECUADOR," cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 10 de agosto de 2016

HENRRY LUIS TUQUERRES CURIPALLO
C.C. 1600503971

AUTORIZACIÓN



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **HENRRY LUIS TUQUERRES CURIPALLO**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación "EVALUACIÓN DE CEPAS DE *TRICHODERMA* SPP. EN EL CONTROL DE MONILLA (*Moniliophthora roreri*), EN CACAO (*Theobroma cacao*) *IN VITRO* Y EN CAMPO EN LA PROVINCIA DE NAPO-ECUADOR." cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 10 de agosto de 2016

HENRRY LUIS TUQUERRES CURIPALLO
C.C. 1600503971

DEDICATORIA

A mis padres, Martha y Luis, porque siempre estuvieron a mi lado brindándome su apoyo, consejos, valores y motivación para ser de mí una mejor persona.

A mis hermanas Denisse y Aracely quienes han sido una fuente de inspiración para superarme cada día más.

A mis sobrinos Ariel y Melany por su amor y compañía, para que vean en mí un ejemplo a seguir.

A mi novia Adriana quien ha estado a mi lado con sus palabras, motivación y con su apoyo incondicional.

A mis amigos, que nos apoyamos mutuamente en la culminación de la vida universitaria.

A los maestros de la institución que brindaron todos sus conocimientos en nuestro camino universitario.

Henry Luis Tuquerres Curipallo

AGRADECIMIENTO

A mi familia y amigos, por su confianza puesta en mí, este logro es gran parte gracias a ustedes.

Al PhD. Francisco Flores, por haberme brindado la oportunidad de recurrir a sus conocimientos y capacidad científica, y de esta manera permitirme culminar mi proyecto de titulación.

De igual manera agradecer a mi profesora de investigación PhD. Karina Carrera docente-investigadora de la Universidad Estatal Amazónica, quien con su experiencia, conocimientos, apoyo y sobre todo su amistad me permitió realizar con éxito mi proyecto de titulación.

Henry Luis Tuquerres Curipallo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	2
1.3 Objetivos de la investigación	4
1.3.1 Objetivo general.....	4
1.3.2 Objetivos específicos	4
1.4 Hipótesis.....	4
1.5 Marco Teórico	5
1.5.1 Conceptos generales	5
2 METODOLOGÍA	15
2.1 Participantes	15
2.2 Zona de estudio	15
2.3 Periodo de tiempo de investigación	16
2.4 Diseño y análisis de datos	16
2.5 Procedimiento	17
2.5.1 Muestreo	17

2.5.2 Aislamiento <i>Trichoderma</i>	19
2.5.3 Velocidad de crecimiento	20
2.5.4 Cultivo dual	20
2.5.5 Clases y zonas de antagonismo.....	22
2.5.6 Metabolitos volátiles.....	23
2.5.7 Conservación de <i>Trichoderma</i>	25
2.5.8 Actividad biológica de biocontroladores frente a <i>M. royeri</i> en condiciones de campo.....	26
3 RESULTADOS.....	29
3.1 Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	29
3.2 Velocidad de crecimiento diametral de los aislados de <i>Trichoderma</i> spp. y el bioformulado Trichotic.....	30
3.3 Cultivo dual	31
3.4 Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR)	38
3.5 Clases y zonas de antagonismo	40
3.6 Antagonismo hifal (microscopía)	41
3.7 Metabolitos volátiles	42
3.8 Conservación de <i>Trichoderma</i>	43
3.9 Aplicación de biocontroladores en campo	45
4 DISCUSIÓN	49
5 CONCLUSIONES	55
6 RECOMENDACIONES.....	56
7 BIBLIOGRAFÍA	57

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de las suspensiones, frecuencia y número de aplicaciones de Aislados de <i>Trichoderma</i> spp., Trichotic, Rhapsody y Óxido cuproso (Cobre Nordox 50).	27
Tabla 2. Procedencia de aislados de <i>Trichoderma</i> spp.....	29
Tabla 3. Características físicas cualitativas de los 3 aislados de <i>Trichoderma</i> spp. obtenidas de suelo de tres diferentes plantaciones de cacao.	30
Tabla 4. Promedios de crecimiento diametral de tres aislados de <i>Trichoderma</i> spp. en milímetros, para evaluaciones realizadas a las 24, 48, 72 horas.....	30
Tabla 5. Tasa de crecimiento micelial de 3 aislados de <i>Trichoderma</i> spp. al tercer día de incubación y al cuarto día para el bioformulados Trichotic.	31
Tabla 6. Clase y zonas de antagonismo. Cultivo dual de antagonistas frente a <i>M. roreri</i> en medio PDA y medio V8, de acuerdo a la escala de Bell et al. (1982) y Punja y Grogan, (1982).....	41
Tabla 7. Crecimiento de <i>M. roreri</i> en presencia de metabolitos volátiles de antagonistas.	42
Tabla 8. Porcentaje de Inhibición de Esporulación (% I.E) de <i>M. roreri</i> en presencia de antagonistas a las 168 h.	43
Tabla 9. Porcentaje de mazorcas enfermas (<i>M. roreri</i> , <i>Phytophthora</i> spp., y otras enfermedades) registrados cada 15 días durante cuatro meses de evaluación en parcelas aplicadas con fungicidas químicos y biológicos.	46
Tabla 10. Porcentaje de mazorcas enfermas con <i>M. roreri</i> registrados cada 15 días durante cuatro meses de evaluación en parcelas aplicadas con fungicidas químicos y biológicos.....	47
Tabla 11. Efectividad técnica de los Tratamientos en el control de <i>M. roreri</i> evaluados 15 días después de cada aplicación.....	48

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>M. roreri</i> (Robles, 2008)	11
Figura 2. Lugares de origen de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. A) Ecuador, B) Provincia de Napo, C) Sitios de aislamiento de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	19
Figura 3. Prueba de antagonismo. Cultivo dual entre <i>Trichoderma</i> spp. y <i>M. roreri</i> en medio V8.	21
Figura 4. Prueba de metabolitos volátiles enfrentadas entre <i>M. roreri</i> (arriba) y antagonistas (abajo).	24
Figura 5. Aislados de <i>Trichoderma</i> spp.	29
Figura 6. Crecimiento al primer día de <i>M. roreri</i> frente a los antagonistas. Cultivo dual en medio PDA. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ (n=10).....	32
Figura 7. Crecimiento al segundo día de <i>M. roreri</i> frente a los antagonistas. Cultivo dual en medio PDA. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ (n=10).....	32
Figura 8. Crecimiento al tercer día de <i>M. roreri</i> frente a los antagonistas. Cultivo dual en medio PDA. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ (n=10).....	33
Figura 9. Crecimiento al cuarto día de <i>M. roreri</i> frente a los antagonistas. Cultivo dual en medio PDA. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ (n=10).....	34
Figura 10. Crecimiento al quinto día de <i>M. roreri</i> frente a los antagonistas. Cultivo dual en medio PDA. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ (n=10).....	34
Figura 11. Crecimiento al primer día de <i>M. roreri</i> frente a los antagonistas. Cultivo dual en medio V8. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ (n=10).....	35
Figura 12. Crecimiento al segundo día de <i>M. roreri</i> frente a los antagonistas. Cultivo dual en medio V8. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ (n=10).....	36
Figura 13. Crecimiento al tercer día de <i>M. roreri</i> frente a los antagonistas. Cultivo dual en medio V8. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ (n=10).....	37
Figura 14. Crecimiento al cuarto día de <i>M. roreri</i> frente a los antagonistas. Cultivo dual en medio V8. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ (n=10).....	37
Figura 15. Crecimiento al quinto día de <i>M. roreri</i> frente a los antagonistas. Cultivo dual en medio V8. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ (n=10).....	38
Figura 16. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial, al quinto día de <i>M. roreri</i> frente a los antagonistas. Confrontación dual en medio PDA. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ (n=10)	39

- Figura 17.** Porcentaje de inhibición de crecimiento radial, al quinto día de *M. roleri* frente a los antagonistas. Confrontación dual en medio V8. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ ($n=10$)40
- Figura 18.** Micoparasitismo del aislado de *Trichoderma* UEA-T3 en *M. roleri*.41
- Figura 19.** Concentración de esporas del aislado de *Trichoderma* UEA-T3. sobre micelio de *M. roleri*.42
- Figura 20.** Crioconservación a -80 °C de aislados de *Trichoderma* spp. en glicerol. .44
- Figura 21.** Conservación de las cepas a) UEA-T3 (T1) y b) UEA-T2 (T2) en arroz a los siete y diez días post-inoculación, respectivamente.45

LISTADO DE ABREVIATURAS

°C: Grados centígrados

d: día

h: hora

mm: milímetros

min: minutos

mL: mililitros

μL: microlitros

s: segundos

PDA: Papa Dextrosa Agar

msnm: metros sobre el nivel del mar

ufc: unidad formadora de colonias

ha: hectáreas

RESUMEN

En la actualidad existe una gran pérdida en la producción de cacao debido a la presencia de fitopatógenos. Los hongos del género *Trichoderma* se caracterizan por ser potenciales controladores biológicos. En el presente proyecto se utilizaron tres cepas nativas de *Trichoderma* de la amazonia ecuatoriana y se evaluó su capacidad antagónica frente a *Moniliophthora roreri*, *in vitro*, junto a dos bioformulados comerciales Trichotic (*T. harzianun*, *T. koningii* y *T. viride*) y Rhapsody (*Bacillus subtilis*). Se midió el porcentaje de inhibición de crecimiento radial utilizando la técnica de cultivos duales y pruebas de metabolitos volátiles en medio agar papa dextrosa y medio V8. Adicionalmente, las cepas de *Trichoderma* se conservaron en arroz, para ser evaluadas en campo y validar su potencial en el control de monilla. Se elaboraron dos bioformulados con base en los aislados que presentaron los mejores resultados en las pruebas *in vitro* bajo un diseño completamente aleatorizado. Los arboles de cacao fueron sometidos a cinco tratamientos y fueron evaluados junto a un testigo a nivel de campo. Los tratamientos incluyeron a los dos bioformulados de cepas nativas, dos bioformulados comerciales (Trichotic y Rhapsody) y un tratamiento químico de cobre (Nordox 50). Todos los cultivos de cacao estuvieron sometidos al mismo manejo y condiciones ambientales. Las variables evaluadas fueron porcentaje de mazorcas infectadas con monilla y la eficacia técnica de los tratamientos. El análisis de varianza presentó diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento químico tuvo los mejores resultados tanto para porcentaje de mazorcas infectadas como para la eficacia técnica. Entre los tratamientos biológicos, el de mejores resultados fue el bioformulado UEA-T3, que podría constituirse en una alternativa para el control del fitopatógeno *M. roreri*.

Palabras clave:

- FITOPATÓGENO
- BIOFORMULADO
- CONTROL BIOLÓGICO

ABSTRACT

At present there is a great loss in cocoa production due to the presence of pathogens. Fungi of the genus *Trichoderma* are characterized as potential biological control agents. In this project three native strains of *Trichoderma* of the Ecuadorian Amazon were used and their antagonistic capacity was evaluated against *Moniliophthora roreri*, *in vitro*, with two commercial bioformulateds Trichotic (*T. harzianun*, *T. viride* and *T.koningii*) and Rhapsody (*Bacillus subtilis*). The percentage of inhibition of radial growth technique using the dual culture and testing volatile metabolites in potato dextrose agar medium and V8 medium was measured. Additionally, *Trichoderma* strains were preserved in rice, to be evaluated in field and validate their potential control Monilla. Two bioformulateds were developed based on the strains showing the best results in the *in vitro* tests under a completely randomized design. Cacao trees underwent five treatments and were evaluated by a witness at the field level. Treatments included the two bioformulated of native strains, two commercial bioformulated (Trichotic and Rhapsody) and a chemical treatment of copper (NORDOX 50). All cocoa crops were subject to the same management and environmental conditions. The variables evaluated were percentage of infected ears with Monilla and technical effectiveness of treatments. Analysis of variance showed significant differences between treatments. The chemical treatment had the best results for both percentage of infected ears to technical efficiency. Among the biological treatments, the best results was the UEA-T3 bioformulated, which could become an alternative for controlling phytopathogen.

Keywords:

- **PHYTOPATHOGEN**
- **BIOFORMULATED**
- **BIOLOGICAL CONTROL**

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

El cacao (*Theobroma cacao*), es uno de los principales productos agropecuarios de exportación. Este producto, es muy importante para el desarrollo económico del Ecuador, representa la materia prima para la producción de chocolates en sus diferentes presentaciones (Sánchez, 2010).

Actualmente, el cultivo de cacao es uno de los principales productos agrícolas de exportación de Latinoamérica, especialmente de Ecuador, hoy en día es uno de los actores importantes de la economía nacional (CORPEI, 2005). En Ecuador el cacao, conocido como “la pepa de oro”, fue el principal generador de divisas para el país durante varios siglos, 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 (PROECUADOR, 2013).

El cacao ve amenazada su producción debido principalmente a problemas fitosanitarios que producen severos daños en plantaciones, lo que reduce su potencial productivo. Uno de los principales problemas que los productores cacaoteros del Ecuador deben afrontar son los ataques de enfermedades de presencia endémica, es decir, que afecta habitualmente a los cultivos de cacao, entre los principales se encuentra la escoba de bruja (*Crinipellis pernicioso*) y la monilla (*Moniliophthora roreri*). 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).

Los agricultores son afectados por la falta de recursos especializados para combatir a la monilla, *Phytophthora* sp. y escoba de bruja. Para contrarrestar las

enfermedades, las comunidades agropecuarias utilizan agentes agroquímicos, ocasionando fitotoxicidad y afecciones a seres humanos y áreas vulnerables del ecosistema como agua, suelos, y especies endémicas de las zonas donde existen cultivos (Barragan, 2010).

1.2 Justificación del problema

Las exportaciones ecuatorianas al finalizar el 2015 alcanzaron un volumen total de 260 toneladas métricas de grano de cacao y de productos derivados, incrementando su producción en un 10% a relación del 2014. Ecuador es el sexto mayor productor de cacao a nivel mundial (ANECACAO, 2015).

Según ANECACAO (2015), las exportaciones de cacao en el 2015 estuvieron destinadas a mercados comerciales en Estados Unidos de Norte América con 91300 t equivalentes al 39% de la producción, seguidas de Holanda con 34000 t representando el 14% de la producción, por encima de Malasia con 21000 t que equivale el 9 % de la producción. En el 2015 Ecuador llegó a los 601,3 millones de dólares en exportaciones de cacao, evidenciando un incremento con respecto al 2014 cuando las exportaciones fueron de 488,7 millones de dólares.

El cacao constituye es uno de los productos más importantes en la economía de los pobladores en la región amazónica del Ecuador debido a la aportación en el patrimonio de las personas que la cultivan; sin embargo, el cultivo no está libre de plagas como: Monilla, Mazorca negra y Escoba de bruja, los cuales constituyen los principales factores limitantes de la producción y donde el manejo integrado del cultivo es la estrategia más exitosa (INIAP, 2012).

La monilla del cacao fue descrita por primera vez en la región litoral en la provincia de Los Ríos. El agente causal, el hongo *Monillioophthora roreri*, infecta a frutos de los géneros *Theobroma* y *Herrania*. El Ecuador presenta un promedio de

pérdida en la producción de un 30% a causa de la monilla, la enfermedad se agudiza en años y lugares donde existe mayor pluviosidad registrando un promedio de 50 a 80% de pérdida en la producción (Porrás y Sánchez, 1991).

El control de la monilla tradicionalmente se realiza mediante podas sanitarias, remoción de frutos enfermos, control químico y resistencia genética. En la actualidad la búsqueda de alternativas de solución mediante el control biológico, constituye una alternativa prometedora en el control del fitopatógeno (Fravel, 2005). Krauss et al. (2003) afirman que se han realizado numerosos reportes en los que se evidencia el 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* (CATIE, 2015).

El motivo principal para la realización del presente estudio es aislar, identificar y seleccionar hongos del género *Trichoderma*, para su aplicación como biocontrolador de monilla en cultivos de cacao, debido al potencial antagónico que poseen los hongos de este género (Contreras y Riano, 2013).

El presente estudio avista el uso de tecnologías limpias y sustentables ya que emplea cepas propias de la rizósfera amazónica para aliviar, de manera amigable con el medio ambiente, el principal problema en la pérdida de producción cacaotera y permitir un manejo sostenible de plantaciones de cacao mediante el biocontrol de *M. royeri*.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Evaluar aislados de *Trichoderma* spp. en el control de monilla (*Moniliophthora roreri*), en cacao (*Theobroma cacao*), *in vitro* y en campo en la Provincia de Napo-Ecuador.

1.3.2 Objetivos específicos

- Aislar cepas de *Trichoderma* spp. nativas de la amazonia para su empleo como alternativa de control frente a *Moniliophthora roreri*.
- Evaluar *in vitro* la actividad antagónica de cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Moniliophthora roreri*.
- Evaluar la eficacia de los aislados nativos de *Trichoderma* spp. para controlar monilla en condiciones de campo.
- Propagar y conservar cepas de *Trichoderma* spp. en laboratorio.

1.4 Hipótesis

Las cepas aisladas de *Trichoderma* spp. de suelo de la Provincia de Napo son capaces de controlar *M. roreri* al mismo nivel que tratamientos con productos comerciales.

1.5 Marco Teórico

1.5.1 Conceptos generales

Generalidades del cacao.

El cacao fue cultivado en sus principios en México y América Central. Cuando llegaron los españoles no lo vieron cultivado en el sur de América, sin embargo, existían de manera natural en bosques a las riveras de los ríos en el Amazonas, donde en la actualidad prevalecen varios tipos con mucho valor genético (Batista, 2009).

En México, el cacao era aprovechado por los aztecas para la elaboración de bebidas, además era una utilizado como moneda. Existía la creencia que las bebidas que se obtenían del árbol de cacao otorgaba sabiduría al ser de origen divino. Por esta razón Lineo estableció el nombre de *Theobroma*, que significa “alimento de los dioses”. Los mayas eran especialistas en el cultivo de cacao donde perfeccionaron técnicas de curar y conservar semillas; de esta manera hacer una bebida con agradable sabor. Toda clase social podía consumir esta bebida en su dieta diaria y llegaron a comercializar el producto con los aztecas, quienes apreciaron de buena manera sus excelentes cualidades (Batista, 2009; Jaimes y Aranzazu, 2010).

El origen del cultivo de cacao se encuentra en el noreste de América del Sur, después se distribuyó por el norte de la costa pacífica en países como Ecuador, Colombia, Perú y Brasil, en la que se descubrió alta variación en el material genético. Desde su origen, las especies se dispersaron y fueron evolucionando hasta obtener dos importantes colecciones de cacao (Criollo y Forastero) con rasgos fenotípicos y genotípicos específicos (Enriquez, 2010).

Después de la llegada de los españoles, el cultivo de cacao se ha extendido a otros países, que en la actualidad son líderes mundiales en la producción; se cultiva principalmente en países del continente africano como Costa de Marfil, Ghana,

Nigeria y Camerún, con una producción cercana al 60%. En el continente americano, Brasil aporta con el 18% de la producción; seguido de Ecuador con el 6% y Colombia y México que juntos constituyen el 1% de la producción mundial. Existe un aproximado de 20 millones de personas dependen directamente del cacao para subsistir y que el 90% de la producción se cosecha en minifundios con menos de 5 ha (Ramírez, 2008).

Ecuador se asienta como país que más produce cacao fino de aroma en el mundo, con un volumen aproximado del 62%; el cacao se estableció en el Ecuador como el producto de exportación de mayor importancia para su economía. Incluye a pequeños y medianos productores alrededor de 100 000 familia. El cacao ecuatoriano es reconocido a nivel mundial sus evidentes características de aroma, sabor y color, sumamente reconocidas para la elaboración de chocolates finos (ACEPROCACAO, 2012).

La región amazónica constituye un importante punto de origen del cacao. Se localiza de manera nativa en muchas zonas de la amazonía ecuatoriana, con las siguientes características climáticas como la precipitación que esta entre 2 000 y 4 000 mm/año, a una altitud de 200 a 1 100 msnm, con temperaturas de 19 a 25 °C y una intensidad lumínica entre 1 050 a 1 350 horas luz/año. La producción de cacao está vinculada a especies maderables y frutales que aportan sombra necesaria para el sistema agroforestal (chakra), lo cual constituye un valor agregado en los mercados. (ECORAE, 2001; Ordoñez, Gavilanez, y Salazar, 2011; Pérez, 2013).

Con el objeto de encontrar el origen de cacao Nacional se ha realizado comparaciones de huellas genéticas de ADN entre material nativo y la variedad nativa Nacional, demostrando un gran parentesco con árboles colectados hace 30 años en el sur de Ecuador en la provincia de Zamora Chinchipe. En los últimos años el cultivo de cacao está más desarrollado en la región costera del Pacífico, probablemente la región amazónica resulta ser el origen de la domesticación del cultivar Nacional (ANECACAO, 2015).

En Ecuador consta de 500 000 ha de cacao, en su mayoría cultivadas en asociación con otras especies, aproximadamente en 100 000 fincas la cultivan, siendo cultivado por pequeños productores en la amazonia, y es el tercer producto de exportación agrícola con mayor importancia en el país (ANECACAO, 2015).

El valor de la producción de cacao en el año 2008 aumentó de USD (dólares americanos) 94,3 millones a 229 millones en el año 2013, es decir existió un alza de USD 205 millones en la producción global, casi el equivalente al valor de la producción anual de Brasil. El auge de la “pepa de oro” está dado gracias a los excelentes montos que ofrece el mercado internacional. Durante el año 2012 el precio promedio por tonelada fue de USD 2 392, en el 2013 fue de USD 2 439 y en el 2014 este precio subió a USD 3 126, y para el segundo semestre de 2015 fue de USD 3 165 (ANECACAO, 2015).

El cacao se produce en las regiones Costa y Amazónica de Ecuador, las provincias con mayor producción se encuentra Los Ríos, Guayas, Manabí y Sucumbíos, donde se cultivan dos tipos de cacao: cacao Nacional y cacao CCN-51 (Colección Castro Naranjal, resultados del estudio para resistencia a enfermedades del cacao realizado por el ecuatoriano Homero Castro en 1965). En el país existen aproximadamente 500 000 ha cultivadas de cacao, los pequeños productores cultivan 110 000 ha, con propiedades que no sobrepasan las 5 ha. El cacao constituye para el Ecuador cerca del 7% del producto interno bruto (PIB), lo que benefició a pequeños y medianos productores agrícolas (ANECACAO, 2015).

Una de las principales limitaciones a nivel de Ecuador en la producción de cacao es el manejo de enfermedades fúngicas, aproximadamente se pierde el 30% de la producción mundial a causa de estas enfermedades en las que se encuentran la escoba de bruja y la monilla (Enríquez, 2004).

Principales enfermedades fúngicas del cultivo de cacao

La planta de cacao ofrece condiciones favorables para el desarrollo de enfermedades fungosas; es atacado por microorganismos que afectan su producción y calidad, incrementando los costos de producción (Fulton, 1989; Porras y Sánchez, 1991). En Ecuador la pérdida causada por enfermedades fúngicas se aproxima al 80% superando a plantaciones infestadas por insectos (Philips-Mora y Wilkinson, 2007). Entre las principales enfermedades que atacan negativamente a las plantaciones de cacao se encuentran las siguientes:

Escoba de bruja

Es procedente por el microorganismo basidiomicete *Moniliophthora perniciosa* (Aime y Philips-Mora, 2005) puede ocasionar pérdidas del 50 al 90% (Meinhardt et al., 2008). Estimula la multiplicación de yemas apicales y axilares a manera de escobas de bruja. Infecta principalmente a órganos en crecimiento activo, en especial a los brotes nuevos, cojinetes florales y frutos, en los que se presentan hipertrofias y crecimientos anormales. Según el órgano o parte de la planta y a la edad del hongo cuando infecta, se manifiesta diversos signos y síntomas, lo que genera hipertrofias de los brotes vegetativos y reproductivos que ocasionan un continuo debilitamiento del árbol. Los rebrotes jóvenes, son lo más susceptibles, cuando son afectados, provoca el aborto de los mismos (Esquivel, Flores, Domínguez, y Marquéz, 2012).

Mazorca negra

Es causada por el hongo *Phytophthora* sp., con mayor frecuencia en la región de Centroamérica. Sin embargo, en otras partes del planeta la enfermedad la producen otras especies como *Phytophthora capsici*, *Phytophthora citrophthora*, que se encuentran con mayor frecuencia en varias regiones de América del Sur y el Caribe, y *Phytophthora megakarya*, con presencia en varios países africanos. Avances sobre

el estudio de esta enfermedad en el Ecuador la asocian con *Phytophthora palmivora* (Mfegue et al., 2012).

Monilla

Conceptos generales de *M. roreri*

En 1916 se detectó por primera vez la monilla en Ecuador (Najar y Thomas, 2001). Estudios desarrollados por Phillips-Mora (2006) indican a Colombia como el punto de origen de esta enfermedad, en el año 1800. Desde entonces se ha dispersado a países de Sudamérica y Centroamérica como Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Venezuela, Panamá, Costa Rica, Honduras, Guatemala, Belice, México y El Salvador donde esta enfermedad ha ocasionado pérdidas hasta en un 90% del total de la producción y el abandono de los cultivos. Esta situación ha causado efectos negativos en los cacaoteros, sus comunidades, y en los agroecosistemas en que se produce cacao.

El hombre, es un factor muy importante para la diseminación indirecta de monilla en las plantaciones de cacao debido ayuda a la diseminación de las esporas del hongo a largas distancias (Evans, 1981). Sobre las plantaciones afectadas, hay una importante presencia de esporas del hongo suspendidas en el aire, debido al alto nivel de adaptación a diferentes ambientes, en consecuencia, la infección del fruto puede suceder en diversas condiciones favorables (Schmitz, 1985).

Los nombres comunes son: Monilla del cacao, pudrición de fruto, helada, mancha ceniza, enfermedad de Quevedo (Phillips-Mora y Wilkinson, 2007). Clasificación taxonómica, según (BIOSCIENCE, 2004).

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Subclase: Agaricomycetidae

Orden: Agaricales

Familia: Marasmiaceae

Género: *Moniliophthora*

Especie: *roreri*

Ciclo de vida del patógeno

De acuerdo con Evans, Stalpers y Benny (1978), *M. roreri* representa el estado mitótico (anaformo) de un teleomorfo desconocido. Posteriormente, Evans (1981) supuso que el hongo teleomorfo pertenecía a una especie de *Crinepellis*, dado el inusual ciclo vital pleomórfico, hemibiotrófico que presenta *M. roreri*, características similares presenta el patógeno *C. pernicioso*.

Evans, Holmes , Philips, y Wilkinson, (2002) encontraron evidencias de que la meiosis ocurre dentro de los conidios, un fenómeno que tiene coherencia con el contenido nuclear variable de los mismos; por lo que proponen que la fase reproductiva observada en *M. roreri* es sexual, y que este patógeno corresponde a un teleomorfo modificado.

Los residuos de cosecha es el principio para la sobrevivencia del hongo (mazorcas contaminadas con el microorganismo). A continuación, el viento y la lluvia aportan en la dispersión de conidios, lo que produce contaminación de frutos o mazorcas infectadas con monilla a plantaciones aledañas (Navarro y Mendoza, 2009). Según Oliveira y Luz (2005), la diseminación de los conidios se realiza por el viento, donde el agua de lluvia tiene un papel importante en las infecciones a corta distancia en la copa del cacao. Además, debido al movimiento producido por las labores de cosecha, los conidios se dispersan en el aire, y bajo óptimas condiciones ambientales (humedad y temperatura), infectan los frutos en formación (Amores et al., 2009).

Una de las características del microorganismo, es su período de incubación que se extiende por varios días antes de la aparición de los síntomas (Jhonson, Bonilla y Aguero, 2008). El tiempo de infección puede ser de 3 a 8 semanas, en dependencia a la edad del fruto, severidad de infección, susceptibilidad del árbol de cacao y condiciones climatológicas, en especial las fuertes lluvias, mientras que, en frutos jóvenes con altas precipitaciones y días calurosos, el tiempo de incubación se acorta a 21 días; sin embargo, Cruz (1993) reportó que la incubación se encuentra en un periodo de 30 y 70 días (Figura 1).

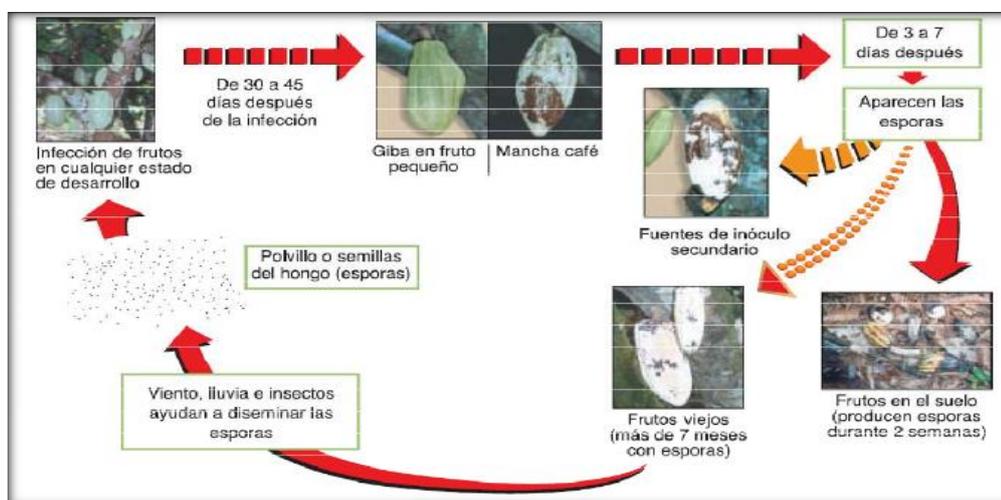


Figura 1. Ciclo de vida de *M. royeri* (Robles, 2008)

Medidas de control

Control biológico

Se define como la reducción de la densidad de inóculo o de estructuras productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o de dormancia, por uno o más organismos obtenidos naturalmente (Uquillas, 2004). Aunque con menor aplicación a nivel de campo, el manejo biológico surge como una alternativa promisorio para el control de fitopatógenos con resultados exitosos contra un amplio rango de ellos. En la actualidad se ha demostrado las ventajas que poseen hongos y bacterias para el control de la monilla. Los microorganismos más

representativos están las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, así como hongos de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma* (Suarez y Rangel, 2014).

El control biológico presenta una serie de ventajas entre las que se encuentra su efectividad, permanencia, bajo costo e inocuidad para el ecosistema, sin embargo, existe una potencial desventaja con microorganismos introducidos al no adaptarse a las condiciones climáticas de la nueva región (Andrews y Quezada, 1989).

Trichoderma

Hongos del género *Trichoderma* son ampliamente estudiados como agentes de biocontrol para varios hongos fitopatógenos, además como un potenciador de crecimiento de plantas, se caracterizan por su alto metabolismo, metabolitos antimicrobianos y la conformación fisiológica son factores que contribuyen al antagonismo de estos hongos. El micoparasitismo, la competencia por espacio y nutrientes, antibiosis y metabolitos secundarios son sistemas de defensa típicos de este género. Por otra parte, *Trichoderma* es utilizado para la producción de enzimas comerciales celulasas, hemicelulasas, proteasas y β -1,3-glucanasas (Chavez, 2006).

Según Gumedo, Alarcón, Ferrera y Peña (2009), *Trichoderma* se clasifica de la siguiente manera:

Reino: Myceteae

División: Eumycota

Subdivisión: Ascomycotina

Clase: Euascomycetes

Orden: Hyphocreales

Familia: Hypocraceae

Género: *Trichoderma* e *Hypocrea*

El género *Trichoderma* también se caracteriza por ser saprofítico, se alimenta de materia orgánica con la capacidad de descomponerla, revelando una mayor

plasticidad en su ecología. Se ha registrado su presencia en todas las latitudes que va de la zona ecuatorial hasta los polos, lo que permite su amplia distribución y resistencia ecológica, estas características están ligadas con su capacidad enzimática para la degradación de varios sustratos con un metabolismo versátil y resistencia a la inhibición microbiana (Nacimiento, Stecca y Nevez, 2014).

Mecanismos de acción de *Trichoderma*

Competencia

Los hongos presentan una fase saprofitica o epifítica en la que pueden competir con otros microorganismos por nutrientes o espacio cuando sus requerimientos se ven limitados. Este tipo de hongos se ven favorecidos por su velocidad para colonizar hospederos que son patógenos de plantas y han sido probados como agentes de biocontrol reduciendo drásticamente la cantidad de inóculo del patógeno. El agente de control está biológicamente adaptado para prevenir su infección y puede restringir el desarrollo del patógeno para evitar que alcance niveles poblacionales de una substancial infección. Los hongos saprofitos tienen la capacidad adicional de parasitar y producir antibióticos para acceder a nutrientes y de esta manera retrasar el desarrollo del patógeno (Bélanger y Avis, 2002).

Hongos del género *Trichoderma* presenta una plasticidad ecológica gracias a su crecimiento de manera natural en diversos suelos, es un excelente competidor por espacio y nutrientes. *Trichoderma* adaptado para sobrevivir en condiciones desfavorables en forma de clamidosporas (Infante, Martínez, González y Reyes , 2009).

Parasitismo

Es la competencia entre un antagonista de forma directa frente un patógeno, en la que se encuentran involucradas enzimas extracelulares capaces de degradar

estructuras de las paredes celulares de los hongos patógenos. Tiene un crecimiento quimiotrópico hacia el hongo parasitado interactuando con mecanismos de adhesión, penetración y enrollamiento lo que lleva a un debilitamiento del hongo patógeno (Infante, Martínez, González y Reyes , 2009).

Antibiosis

Es la acción de producir metabolitos extracelulares tóxicos para reprimir el crecimiento de hongos patógenos tales como necrotróficos y biotróficos. Esta propiedad es muy importante porque le permite al hongo antagonista defender y desalojar su nicho ecológico de hongos potencialmente invasores (Blakeman y Fokkema, 1982).

2 METODOLOGÍA

2.1 Participantes

El presente proyecto “Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. en el control de monilla (*Moniliophthora roreri*), en cacao (*Theobroma cacao*) *in vitro* y en campo en la Provincia de Napo-Ecuador.” fue financiado en su totalidad por el Laboratorio de Microbiología y el el Centro de Investigación, Posgrados y Conservación Amazónica (CIPCA) de la Universidad Estatal Amazónica, ubicado en la vía Puyo-Tena Km. 2 ½ Provincia de Pastaza-Ecuador.

La presente investigación se llevó a cabo gracias a la colaboración científica de la Dr. Karina Carrera Sánchez, Docente-Investigadora de la Universidad Estatal Amazónica, así mismo la dirección del proyecto de titulación fue realizada por el Dr. Francisco Flores, Docente de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.

2.2 Zona de estudio

Zonas de Muestreo

Las cepas de *Trichoderma* aisladas fueron obtenidas del suelo rizosférico, en las zonas de Borja, Ahuano y Arosemena Tola de la Provincia de Napo, ubicado en la región amazónica del Ecuador.

Fase de Laboratorio

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal Amazónica con ubicación en el kilómetro 2 ½, vía Puyo-Tena, cantón Pastaza, parroquia Puyo, provincia de Pastaza, Ecuador. En el laboratorio las condiciones fueron controladas a una temperatura estable de 23 ± 1 °C y humedad relativa de 85 ± 5 %.

Fase de campo

El experimento se realizó desde el mes de septiembre de 2015 hasta enero de 2016 en una Plantación de Cacao de 5 años de edad. En el Centro de Investigación, Posgrados y Conservación Amazónica (CIPCA) que se encuentra ubicado en el Km 42 vía Puyo-Tena, Latitud: $1^{\circ}15'39,708''$ S (m), Longitud: $77^{\circ}53'23,490''$ O (m). Altura: 575 (msnm). Las características climáticas tomadas de registros del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI) los datos muestran una temperatura media diaria de 16,5 a 28,3 °C, una precipitación media de 4580 mm año⁻¹ y una humedad relativa de 69 % (MAE, 2013).

2.3 Periodo de tiempo de investigación

La investigación tuvo un tiempo de duración de ocho meses.

2.4 Diseño y análisis de datos

El análisis estadístico *in vitro* se evaluó bajo un diseño completamente al azar, con un análisis de Varianza (ANOVA) de clasificación simple y una prueba de comparación de medias de Tukey al 5% ($p < 0.05$), se consideró como unidad experimental una caja de Petri con diez repeticiones de seis tratamientos, de los

cuales cinco pertenecieron a cultivos duales de los antagonistas frente al patógeno y uno correspondiente al testigo.

Las variables que se midieron fueron: velocidad de crecimiento radial, pruebas de antagonismo, conidiación, porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR). Además, los factores estudiados fueron: factor patógeno *M. royeri*, factor antagonista *Trichoderma* spp. nativos de la amazonia ecuatoriana, *Trichoderma* comercial (Trichotic) y *B. subtilis* comercial (Rhapsody).

El ensayo de antagonismo en campo se empleó árboles de cacao (*Theobroma cacao*) como unidad experimental, con un diseño completamente al azar con doce repeticiones y seis tratamientos teniendo un total de 72 árboles. Se llevó a cabo un Análisis de Varianza (ANOVA) y una comparación de medias mediante la prueba de Tukey al 5% ($p < 0.05$).

Instrumentos de registro utilizados

Como instrumento principal de registro se utilizó una plantilla de recolección de datos correspondiente a cada evaluación *in vitro* y en campo de las cepas aisladas, el software para almacenar y procesar los datos fue Excel e InfoStat versión 2015e.

2.5 Procedimiento

2.5.1 Muestreo

Se colectaron muestras de suelo de diferentes sectores de la Provincia de Napo (Figura 2).

UEA-T1: Borja, ubicado en el Valle de los Quijos-Napo, Latitud: $0^{\circ}18'49,046''$ S (m), Longitud: $77^{\circ}47'0,458''$ O (m). Altura: 1455 (msnm). Sistema agroforestal que incluye cacao.

UEA-T2: Ahuano, Napo. Latitud: $1^{\circ}3'42,302''$ S (m), Longitud: $77^{\circ}32'52,33''$ O (m). Altura: 355 (msnm). Sistema Agroforestal que incluye cacao, de 7 años de edad.

UEA-T3: Centro de Investigación, Posgrados y Conservación Amazónica (CIPCA) que se encuentra ubicado en el Km 42 vía Puyo-Tena, Latitud: $1^{\circ}15'39,708''$ S (m), Longitud: $77^{\circ}53'23,490''$ O (m). Altura: 575 (msnm). Plantación de cacao de 5 años de edad.

Las muestras fueron transportadas en frascos estériles en refrigeración al laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal Amazónica y se secaron 24 h a temperatura ambiente.

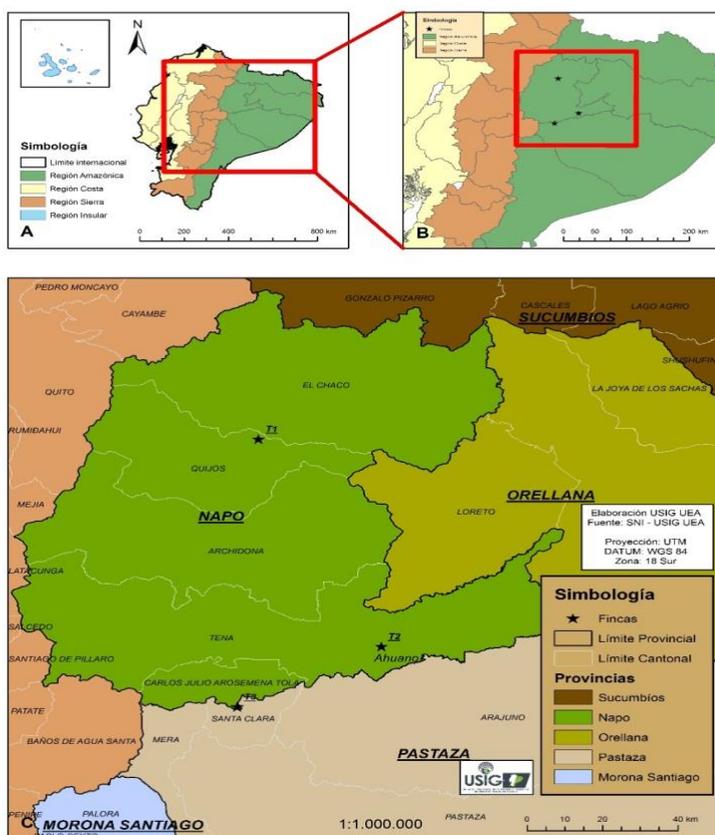


Figura 2. Lugares de origen de cepas de *Trichoderma* spp. A) Ecuador, B) Provincia de Napo, C) Sitios de aislamiento de cepas de *Trichoderma* spp.

2.5.2 Aislamiento *Trichoderma*.

Para aislar *Trichoderma* de las muestras de suelo, se realizó una dilución al 10% p/v con 1 g de muestra de suelo en 10 mL de agua destilada, se dejó reposar por 5 minutos, y se tomó una alícuota de 200 μ L de solución con la que se inoculó en cajas de Petri con medio Difco™ Papa Dextrosa Agar (Anexo 1). Las colonias de *Trichoderma* se reconocerán con base en morfología con la ayuda de un microscopio trilocular óptico (MT4300H, MEIJI, USA) con cámara (DINOLITE).

Para la purificación del cultivo se extrajo cuidadosamente el micelio en pequeñas proporciones de agar de cada colonia identificada como *Trichoderma* y se sembraron en medio PDA y medio V8 compuesto por 15 g/L de agar, 3 g/L de CaCO_3 ; 15 g/L

de extracto de malta y 200 mL/L de jugo V8 200. Posteriormente se esterilizó en un autoclave a 121°C y 1 atm por 15 minutos, según lo recomendado por Villavicencio (2010).

Para evaluar las características culturales y morfológicas de *Trichoderma* spp. se sembraron discos de 4,3 mm en el centro de las cajas de Petri (90 mm). Con el uso de las técnicas de tinción con azul de metileno y lactofenol, con un microscopio compuesto trilocular, se observó estructuras como: conidias, conidióforos, micelio, fiálides, y clamidosporas.

2.5.3 Velocidad de crecimiento

Se midió el crecimiento radial de todas las cepas de *Trichoderma* a las 24, 48 y 72 horas post-inoculación y se evaluó la tasa de crecimiento micelial según la fórmula de Lilly y Barnet (1951), donde CL1 y CL2 representan el crecimiento radial a los tiempos T1 y T2, respectivamente.

$$T.C = \frac{CL_2 - CL_1}{T_2 - T_1}$$

2.5.4 Cultivo dual

Para la prueba de antagonismo se empleó el aislado de *M. roreri* UEA-Mr 8.9 el que presentó mejores respuestas en velocidad de crecimiento y agresividad, y es perteneciente al cepario del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal Amazónica. Se evaluó con tres aislados de *Trichoderma* spp. seleccionadas de las diluciones seriadas del suelo, el cuarto tratamiento con *Trichoderma* comercial (Trichotic) y un quinto tratamiento con *B. subtilis* (Rhapsody) (Anexo 2). Se sembraron discos del patógeno *M. roreri* de 4,3 mm a una distancia de 20 mm del extremo de la caja de Petri de 90 mm de diámetro con medios de cultivo PDA y medio V8, y fueron incubados a 26±2 °C.

Cuando *M. royeri* alcanzó un desarrollo de 30 mm de diámetro (cinco días después de la siembra) se enfrentaron mediante cultivo dual con los microorganismos antagonistas. Para la evaluación de los aislados de *Trichoderma* se colocó en el extremo opuesto de la caja de Petri un disco de 4,3 mm de diámetro con micelio del antagonista (seis días de edad) con 50 mm de separación entre antagonista y patógeno (Howell, 2003) (Figura 3). Mientras que en la evaluación de los bioformulados Trichotic y Rhapsody se colocó en un extremo de la caja de Petri discos de papel filtro estériles de 6 mm de diámetro embebidos con los bioformulados siguiendo las recomendaciones de campo para Trichotic y Rhapsody (0,5 mL/ L y 5 mL/ L respectivamente) y con una separación de 50 mm entre el bioformulado y patógeno.

Los cultivos se incubaron a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ y oscuridad y pasado las 24 horas se midió el crecimiento radial del micelio de los hongos hasta los siete días de inoculados. Se realizaron 10 repeticiones de cada tratamiento incluyendo 10 repeticiones de *M. royeri* como control (Anexo 3).

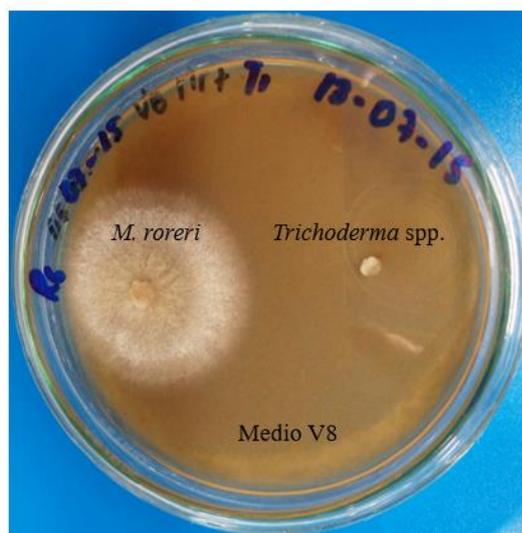


Figura 3. Prueba de antagonismo. Cultivo dual entre *Trichoderma* spp. y *M. royeri* en medio V8.

Para la evaluación del mecanismo de acción de *Trichoderma* (competencia por espacio y nutrientes) se realizó mediante la comparación de la velocidad del

crecimiento. Para esto, se tomó las medidas de los radios de crecimiento del patógeno (RCP) y del antagonista (RCA) con la ayuda de un calibrador. Conjuntamente, se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), con el empleo de la fórmula de (Samaniego, Ulloa y Herrera, 1989).

$$PICR = \frac{RCP - RCA}{RCP} * 100$$

Para la evaluación *in vitro* del potencial antagónico mediante la técnica del cultivo dual frente a *M. royeri*, los datos del crecimiento de la colonia y la esporulación de *M. royeri*, fueron sometidos al análisis de varianza, y en dependencia de la significancia, las medias se compararon mediante la prueba Tukey al 5% ($p < 0.05$), utilizando el paquete estadístico Info Stat Versión 2015e.

2.5.5 Clases y zonas de antagonismo

Al cuarto y quinto, día se determinó la capacidad antagónica del *Trichoderma* spp., frente a *M. royeri* de acuerdo a las clases de antagonismo descritas en la escala de (Bell, Well y Markham, 1982):

Clase 1. Antagónico que cubre por completo al patógeno y a la superficie de medio de cultivo.

Clase 2. Antagónico que cubre al menos el 75 % de la superficie del medio de cultivo.

Clase 3. Antagónico cada uno coloniza el 50 % de la superficie del medio de cultivo.

Clase 4. Agentes patógenos colonizan al menos el 75 % de la superficie del medio de cultivo y parece resistir la invasión del antagonico.

Clase 5. Agentes patógenos que cubren completamente la superficie del medio de cultivo.

A su vez la zona de antagonismo se evaluará con la escala propuesta por (Punja y Grogan , 1983), que consta de los siguientes niveles.

0. No hay zona de antagonismo.
1. Aversión ligera (Zona de antagonismo de +/- 1 mm de ancho).
2. Aversión moderada (Zona de antagonismo de 2 a 4 mm de ancho).
3. Aversión fuerte (Zona de antagonismo de más de 4 mm de ancho).

2.5.6 Metabolitos volátiles

Se realizaron además pruebas de metabolitos volátiles de los antagonistas, según el protocolo propuesto por Dennis y Wester (1971). En una base de caja de Petri de 90 mm de diámetro que contenía medio de cultivo PDA, se inoculó micelio de *M. roreri* de 4,3 mm de diámetro y se dejó incubar a 26 ± 2 °C hasta alcanzar un diámetro de 30 mm. En la base de otra caja Petri se añadió medio de cultivo PDA con un disco de micelio de *Trichoderma* spp. de 4,3 mm de diámetro y para los bioformulados Trichotic y Rhapsody se utilizaron discos de papel filtro estériles de 6 mm de diámetro embebidos sobre los bioformulados. Se colocaron las dos bases una frente a la otra y se sellaron con Parafilm® (Figura 4). Las cajas se incubaron a 26 ± 2 °C durante siete días. Al séptimo día observó el proceso de inhibición de *M. roreri* y se comparó con el control en ausencia del antagonista para la evaluación del Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR).

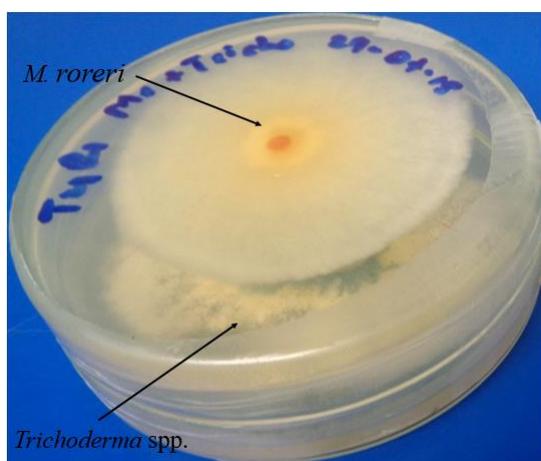


Figura 4. Prueba de metabolitos volátiles enfrentadas entre *M. roseri* (arriba) y antagonistas (abajo).

A las 105 h se procedió a la cuantificación de esporas *M. roseri*, para cada uno de los tratamientos. Se procedió a extraer un disco de micelio del hongo sobre cada uno de los cuatro extremos, a 1 mm del centro de la caja de Petri, con la ayuda de un sacabocados de 4,3 mm de diámetro. Los cuatro discos obtenidos por caja, fueron colocados en un tubo de ensayo con 10 mL de agua destilada estéril, se adicionó una gota de Tween 20 y se agitó por 10 min, para liberar la mayor cantidad de esporas del micelio. La cuantificación se realizó en un microscopio trinocular óptico (MEIJI) con cámara (DINOLITE), con ayuda de una cámara de Neubauer, para determinar la concentración final de conidios por mL. La fórmula para el cálculo fue la reportada por Bastidas (2009).

$$C = \frac{\text{número de células} * 10000}{\text{números de cuadros} * \text{disolución}}$$

Se calculó el porcentaje de inhibición de esporulación (% I.E.) según Vásquez, Montes, Pérez, y Flores (2014) de la siguiente manera:

$$\% I.E = \frac{N^{\circ} \text{ de esporas del control/mL} - N^{\circ} \text{ de esporas del tratamiento/mL}}{N^{\circ} \text{ de esporas del control/mL}} * 100$$

2.5.7 Conservación de *Trichoderma*

Conservación en Glicerol.

Los aislados de *Trichoderma* fueron sembrados en cajas de Petri que contenían medio de cultivo PDA. Transcurridos 7 días de su crecimiento, se procedió a conservarlos. Se utilizó 20 tubos eppendorf de 2 mL por aislado. En autoclave, se esterilizó 60 eppendorf, 200 mL de agua destilada, y 200 mL de glicerol al 15% a una temperatura de 121°C y 1 atm de presión por un tiempo de 15 min. En la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, se colocó 1 mL de agua destilada estéril en 10 tubos eppendorf y en los otros 10 tubos se colocó 1 mL de glicerol al 15%.

Con sacabocados de 4,30 mm de diámetro se extrajo cuatro discos de micelio del hongo y se colocó en cada tubo eppendorf y fueron sellados con Parafilm®. Se procedió a conservar 5 muestras tanto en glicerol como en agua estéril de cada cepa de *Trichoderma* a una temperatura de $-4\pm 2^{\circ}\text{C}$ en un refrigerador (Indurama) y las diez muestras sobrantes de las cepas (5 muestras en glicerol y 5 muestras en agua estéril) se conservaron en un ultra congelador (WUF-D300, Daihan Scientific, USA) a una temperatura de $-80\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Prueba de viabilidad.

Se realizó con el fin de evaluar la estabilidad morfológica, viabilidad y pureza de los aislados que fueron conservados a valores de temperaturas diferentes ($-80\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $-4\pm 2^{\circ}\text{C}$) en dos soluciones (agua estéril y glicerol al 15%).

Se preparó medio PDA, el mismo que fue colocado en cajas de Petri previamente rotuladas. Transcurrido 24 horas se procedió a sembrar un disco de micelio, con cuatro repeticiones de cada aislado conservado. La evaluación del crecimiento micelial de los aislados se realizó diariamente.

Conservación en arroz

Se utilizó 500 gramos arroz precocido contenido en bolsas resistente al proceso autoclavado. Este material se esterilizó en un autoclave a 121°C durante de 15 minutos, se inoculó con las cepas aisladas del hongo *Trichoderma* previamente sembrado en medio PDA en ambientes controladas de luz, temperatura y pH. Con anterioridad se eligió los aislados que mostraron mejores respuestas en pruebas *in vitro* (aislados de *Trichoderma* UEA-T2 y UEA-T3). Dentro de la cámara de flujo laminar se procedió a añadir 10 ml de agua estéril por cada caja Petri que contenía el hongo. La concentración que se utilizó es de 1×10^8 esp/mL por gramo de arroz, se adicionó 5 ml de la solución en cada bolsa. Finalmente se colocaron bajo temperatura ambiente y cada dos días se agitó para facilitar el proceso de colonización hasta observar el cubrimiento total de los granos de arroz por el hongo.

2.5.8 Actividad biológica de biocontroladores frente a *M. royeri* en condiciones de campo.

Antes de las aplicaciones de los tratamientos, se realizó una poda sanitaria de los árboles para reducción de la copa, junto con una eliminación de chupones y malezas (Anexo 4).

Aplicación en el campo de los biocontroladores y fungicidas

Las aplicaciones de los biocontroladores y fungicidas, se realizaron con atomizadores manuales, para asegurar la descarga exacta por árbol. Para cada tratamiento se utilizaron equipos y materiales diferentes, con la finalidad de evitar la contaminación entre tratamiento, las aplicaciones se dirigieron a todo el árbol.

Las suspensiones de esporas de los biocontroladores se prepararon un día antes de la aplicación de los tratamientos. Para las aplicaciones de los bioformulados producidos en el laboratorio de microbiología de la Universidad Estatal Amazónica se utilizaron esporas procedentes de un sustrato sólido (arroz). Las suspensiones de esporas se calibraron a 10^8 esporas/ha y se añadió 10 gotas de Tween 20 para facilitar la liberación de las esporas. Por otra parte, los tratamientos que

correspondieron a los bioformulados comerciales (Trichotic y Rhapsody) y al fungicida químico se prepararon según las especificaciones del proveedor.

Los tratamientos se mantuvieron por separado en botellas plásticas de seis litros a 5 °C, desde su preparación hasta el momento de ser transportadas al campo dentro de una caja térmica. La germinación de las esporas de los bioformulados a base de aislados de *Trichoderma* fue confirmada con siembras de las suspensiones finales en PDA, para de esta forma garantizar la viabilidad de las esporas que fueron llevadas al campo. La frecuencia y número de aplicaciones se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1.

Concentración de las suspensiones, frecuencia y número de aplicaciones de Aislados de *Trichoderma* spp., Trichotic, Rhapsody y Óxido cuproso (Cobre Nordox 50).

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN	APLICACIONES	
	DE LA SUSPENSIÓN	FRECUENCIA	Nº
1. UEA T3 (Aislado <i>Trichoderma</i> 3)	10 ⁸ esp/mL	Mensual	4
2. UEA T2 + UEA T3 (Aislados <i>Trichoderma</i> 2 y 3)	10 ⁸ esp/mL	Mensual	4
3. TRICHOTIC (<i>Trichoderma</i> Comercial)	0,15 mL p.c./árbol	Mensual	4
4. RHAPSODY 1.34 SC (<i>B. subtilis</i>)	1 mL p.c./ árbol	Mensual	4
5. Oxido cuproso (Cobre Nordox 50)	3.0 g i.a/árbol	Mensual	4
6. Control	Sin aplicación		

Se calculó un gasto de 250 mL de cada tratamiento por árbol y con frecuencia quincenal se cosecharon y se registraron el número de mazorcas sanas, mazorcas con síntomas de monilla, mazorcas con síntomas de escoba de bruja, mazorcas con *Phytophthora* spp. y aquellas que presentaron otro tipo de infección. Las mazorcas muertas que presentaron una longitud de hasta 10 cm se consideraron como Cherelle Wilt, (marchitamiento prematuro) todas las mazorcas enfermas se eliminaron en cada fecha de evaluación (Anexo 5). Toda esta información fue registrada por cada árbol de la parcela útil.

El experimento de campo se desarrolló bajo un diseño de bloques completos al azar, con distribución aleatoria, con seis tratamientos por tres repeticiones. Donde cada tratamiento estuvo formado por una parcela de 4 árboles sembrados a 4 metros de distancia. Entre parcelas de un mismo bloque y réplicas se dejó un área de cuatro hileras de plantas para evitar el efecto de borde (Anexo 6). Para la prueba de comparación entre las medias se utilizó la prueba de Tukey al 0,05 % de probabilidad.

Eficacia técnica

La eficacia técnica para cada uno de los tratamientos se calculó mediante la fórmula Sun-Shepard`s (Püntener, 1981).

$$\% ET = \frac{\% \text{ mortalidad del tratamiento} \pm \% \text{ de cambio de la poblacion control}}{100 \pm \% \text{ de cambio en la poblacion control}} * 100$$

$$\% \text{ Cambio de la población control} = \frac{\text{poblacion control después del tratamiento} - \text{población control antes del tratamiento}}{\text{población control antes del tratamiento}} * 100$$

Los datos de porcentaje fueron transformados mediante $2 \arcs \sqrt{p/100}$, según (Lerch, 1977), Los datos fueron procesados por el paquete estadístico Info Stat versión 2015e, aplicando un análisis de varianza simple, las medias se compararon según la prueba de Tukey al 0,05 % de probabilidad.

3 RESULTADOS

3.1 Aislamiento de *Trichoderma*

Se obtuvieron un total de tres aislados del género *Trichoderma*, las mismas que fueron aisladas de tres diferentes fincas con plantaciones de cacao (Tabla 2).

Tabla 2.
Procedencia de aislados de *Trichoderma* spp.

Finca	Provincia	Cantón	Sector	Código del aislado
1	Napo	Quijos	Borja	UEA-T1
2	Napo	Tena	Ahuano	UEA-T2
3	Napo	Arosemena Tola	CIPCA	UEA-T3

En la figura 5 se puede diferenciar a simple vista las diversas formas de crecimiento de las tres cepas aisladas en la que se identificó la diferencia en su forma, color de sus colonias y esporulación de cada una de las cepas aisladas de *Trichoderma* que presentaron al final de la prueba de velocidad de crecimiento.



Figura 5. Aislados de *Trichoderma* spp.

Se observaron distintivos en los aislados de *Trichoderma* spp. de acuerdo a Los rasgos que presenta este género, entre las características cualitativas más relevantes de las tres cepas aisladas se evidencia en la tabla 3.

Tabla 3.

Características físicas cualitativas de los 3 aislados de *Trichoderma* spp. obtenidas de suelo de tres diferentes plantaciones de cacao.

Aislados	Forma del micelio	Color del micelio	Tipo de micelio	Color de las esporas	Color del medio	Olor	Presencia de Fiálides
UEA-T1	Retorcido	Blanco	Plano	Verde	Cre moso	Ninguno	Si
UEA-T2	Retorcido	Blanco	Plano	Verde	Cre moso	Ninguno	Si
UEA-T3	Retorcido	Blanco	Aéreo	Verde	Cre moso	Aroma a coco	Si

3.2 Velocidad de crecimiento diametral de los aislados de *Trichoderma* spp. y el bioformulado Trichotic.

A las 24 horas los aislados UEA-T1, UEA-T2 y UEA-T3 mostraron un crecimiento promedio de 21,26, 19,89 y 17,22 mm respectivamente, sin diferencias significativas entre aislados, a las 48 horas los aislados UEA-T1, UEA-T2 y UEA-T3 presentaron un crecimiento promedio de 71,58, 68,76 y 71,90 mm respectivamente, Transcurridas las 72 horas los aislados de *Trichoderma* spp. ocuparon la totalidad de la caja de Petri que comprende 90,05 mm de diámetro (Tabla 4).

Tabla 4.

Promedios de crecimiento diametral de tres aislados de *Trichoderma* spp. en milímetros, para evaluaciones realizadas a las 24, 48, 72 horas.

Aislados	Crecimiento diametral (mm)		
	24 h	48 h	72 h
UEA-T1	21,26 a	71,58 a	90,05 a
UEA-T2	19,89 a	68,76 a	90,05 a

UEA-T3 17,22 a 71,9 a 90,05 a

Tukey al 5% (p<0.05), las medias que comparten la misma letra no difieren estadísticamente entre sí.

Al finalizar la evaluación de velocidad de crecimiento se estimó la tasa de crecimiento micelial (mm/día). Entre los tres aislados de *Trichoderma* spp., UEA-T3 presentó una tasa de crecimiento significativamente superior a UEA-T1 y UEA-T2, los que no se diferenciaron entre sí y a su vez tuvieron una tasa de crecimiento superior al biopreparado Trichotic (Tabla 5).

Tabla 5.

Tasa de crecimiento micelial de 3 aislados de *Trichoderma* spp. al tercer día de incubación y al cuarto día para el bioformulados Trichotic.

Aislados	Tasa de crecimiento micelial (mm d ⁻¹)
UEA-T3	36,4152 a
UEA-T2	35,0800 a
UEA-T1	34,3951 a
Trichotic	27,3283 b

Tukey al 5% (p<0.05), las medias que comparten la misma letra no difieren estadísticamente entre sí.

3.3 Cultivo dual

Cultivo dual de antagonistas vs fitopatógeno (*M. roreri*) en medio PDA.

Crecimiento

En la figura 6 se observa el efecto de confrontación sobre el crecimiento en (mm/d) de los tres aislados de *Trichoderma* spp. y dos bioformulados (Trichotic y Rhapsody), confrontadas con *M. roreri*. En el primer día el Fitopatógeno tuvo un crecimiento promedio de 24,91 mm. Los aislados de *Trichoderma* spp., sobresalieron los aislados UEA-T1 y UEA-T2 con un crecimiento de 26,5 y 25,23 mm respectivamente, seguida de UEA-T3 con 23,43 mm. Los bioformulados Trichotic y Rhapsody presentaron los menores promedios de crecimiento con 10,47 y 10, 42 mm.

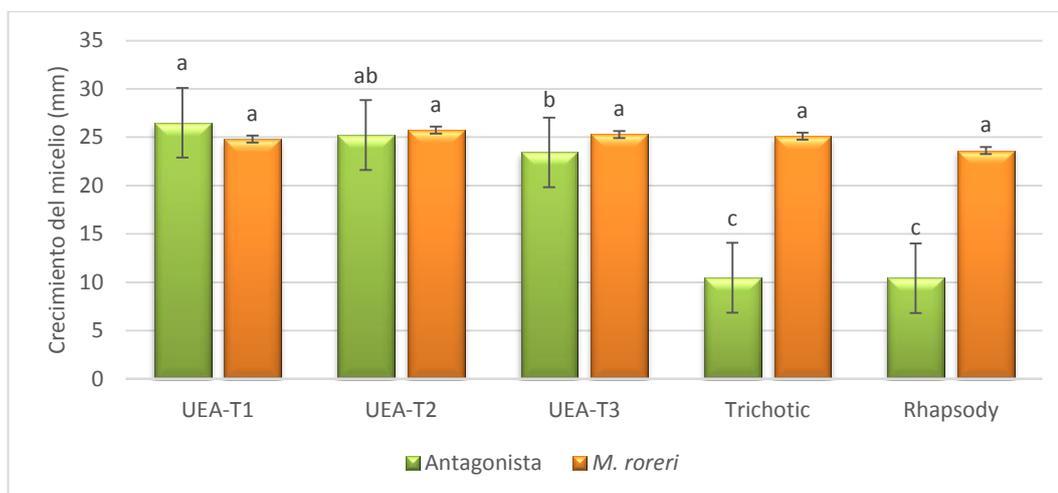


Figura 6. Crecimiento al primer día de *M. royeri* frente a los antagonistas. Cultivo dual en medio PDA. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ ($n=10$)

En el segundo día de evaluación (Figura 7), se evidenció que el aislado de UEA-T3 presentó mayor crecimiento con un promedio de 50,12 mm, seguida de UEA-T1 que alcanzó un promedio de 48,02 mm, el bioformulado Rhapsody presentó el menor crecimiento con un promedio de 27,21 mm; por otro lado, los aislados de *M. royeri* presentaron un crecimiento promedio de 32,91 mm.

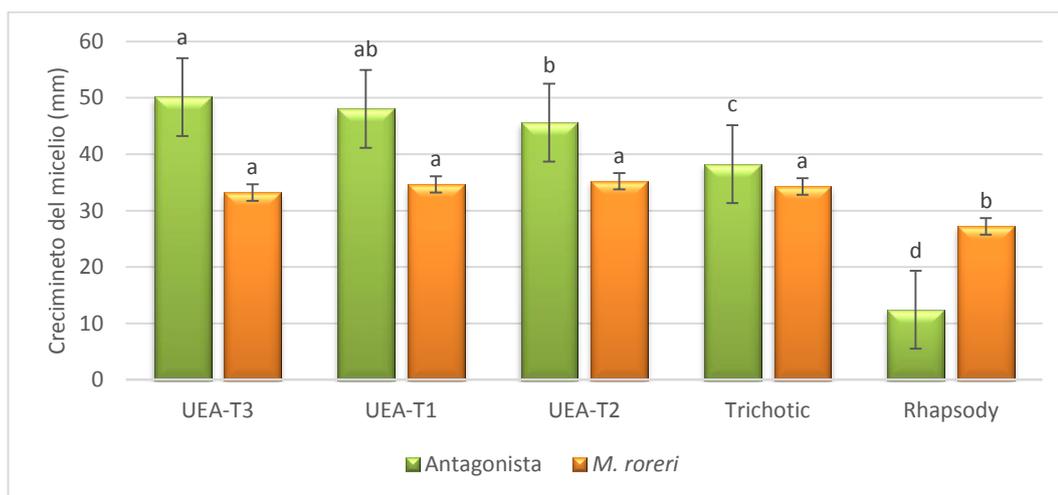


Figura 7. Crecimiento al segundo día de *M. royeri* frente a los antagonistas. Cultivo dual en medio PDA. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ ($n=10$).

En el tercer día de evaluación (Figura 8), los aislados UEA-T3, UEA-T2 y UEA-T1 lograron mayores crecimientos con promedios de 51,91, 49,68 y 48,36 mm respectivamente, mientras que los bioformulados Trichotic y Rhapsody presentaron un crecimiento promedio de 44,93 y 13,99 mm. El patógeno *M. royeri* mostró un crecimiento lento a relación del antagonista con un promedio de 37,00 mm.

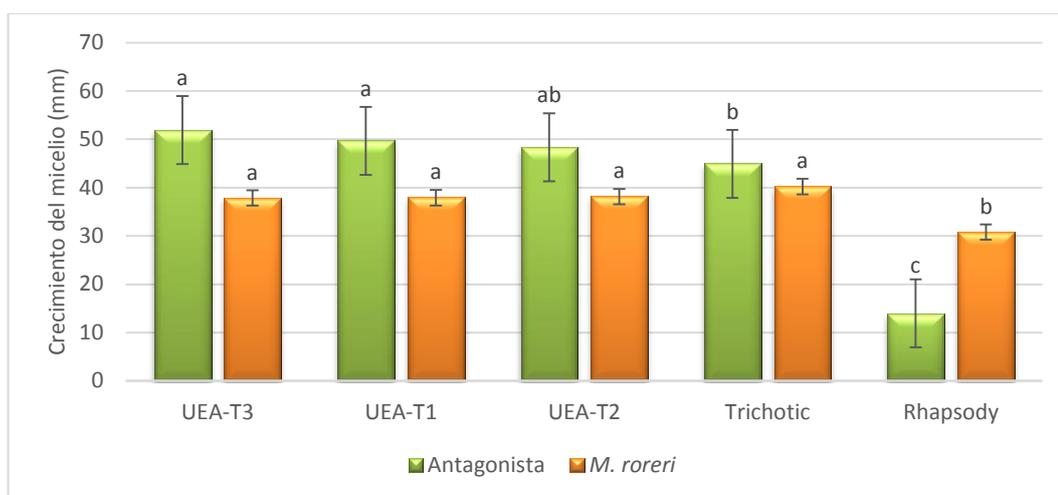


Figura 8. Crecimiento al tercer día de *M. royeri* frente a los antagonistas. Cultivo dual en medio PDA. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ (n=10)

Antagonismo

En el cuarto día de evaluación (Figura 9), los aislados UEA-T3, UEA-T1 y UEA-T2 mostraron los mayores crecimientos sin mostrar diferencias significativas, el aislado UEA-T3 presento el mayor crecimiento con promedio de 54,36 mm, reprimiendo el crecimiento del hongo fitopatógeno y cubriendo dos tercios de la caja de Petri. Rhapsody (*B. subtilis*) presentó el menor promedio de crecimiento con 15,98 mm, sin embargo, inhibe el crecimiento de *M. royeri* con mayor eficacia.

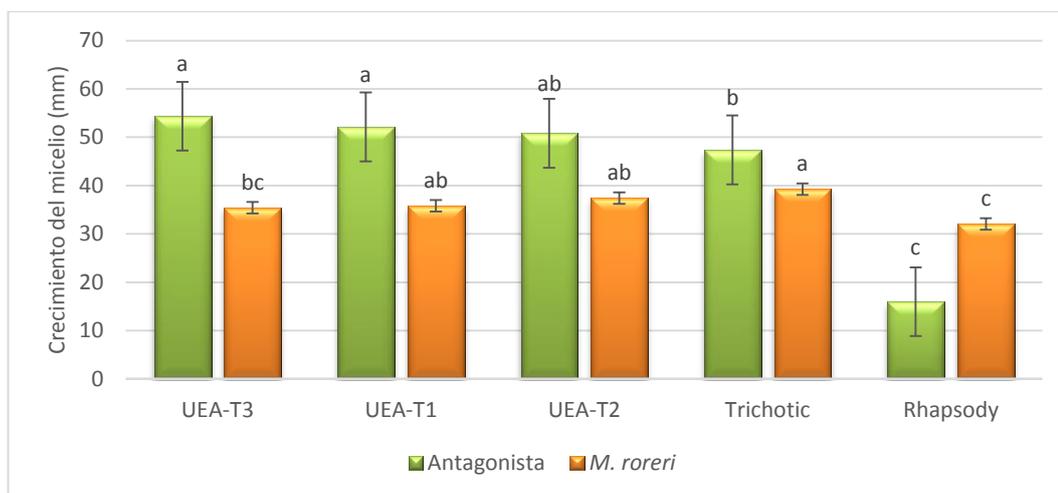


Figura 9. Crecimiento al cuarto día de *M. royeri* frente a los antagonistas. Cultivo dual en medio PDA. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ (n=10).

En el quinto día de evaluación (Figura 10), el aislado UEA-T3 mostró el mejor desempeño con un promedio de 54,82 mm de crecimiento diametral, invadiendo y esporulando sobre el fitopatógeno, los aislados de *Trichoderma* spp. cubrieron la totalidad de la caja de Petri. Rhapsody (*B. subtilis*) presentó el menor promedio de crecimiento diametral con 16,41 mm, y detuvo el crecimiento de *M. royeri*.

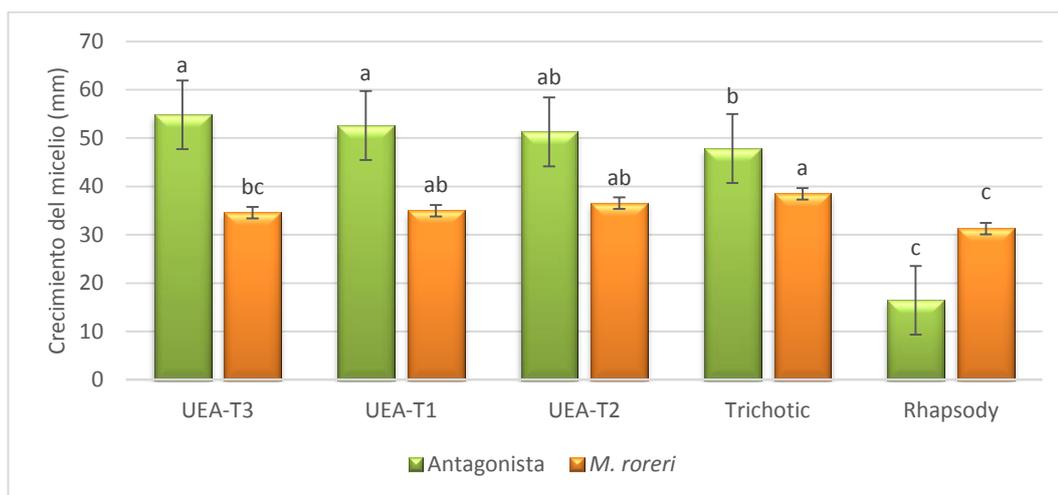


Figura 10. Crecimiento al quinto día de *M. royeri* frente a los antagonistas. Cultivo dual en medio PDA. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ (n=10).

Cultivo dual de antagonistas vs fitopatógeno (*M. royeri*) en medio V8.

Crecimiento

En el primer día los aislados de *Trichoderma* spp, UEA-T1, UEA-T2 y UEA-T3 presentaron crecimientos promedios de 18,17; 17,75 y 16,45 mm respectivamente. Los bioformulados Trichotic y Rhapsody mostraron crecimientos menores con promedios de 11,4 y 13,89 mm. *M. royeri* tuvo un crecimiento promedio de 29,58 mm (Figura 11).

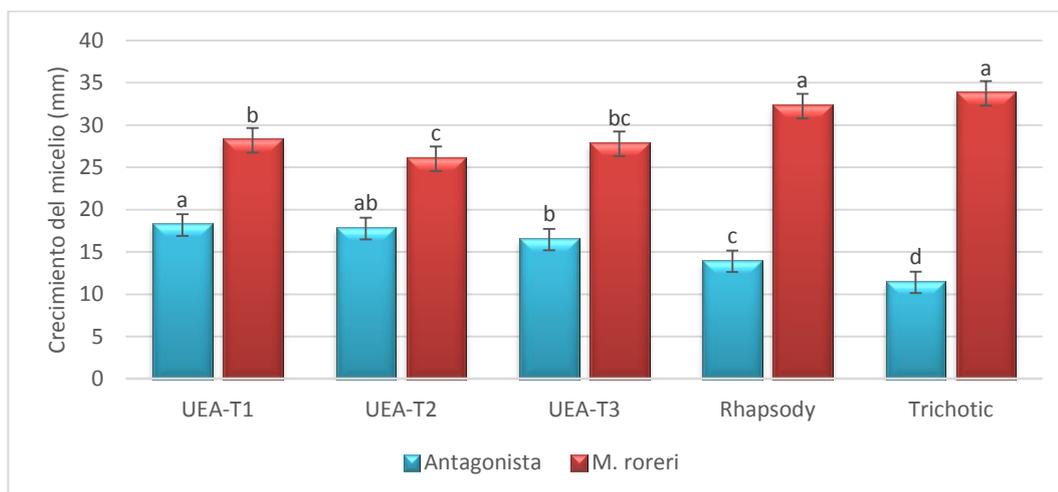


Figura 11. Crecimiento al primer día de *M. royeri* frente a los antagonistas. Cultivo dual en medio V8. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ (n=10)

Al segundo día, el aislado de *Trichoderma* UEA-T3 presenta mayor crecimiento con un promedio de 48,00 mm seguida de UEA-T2 y UEA-T1 que alcanzó promedios de 44,72 y 43,36 mm respectivamente, el bioformulado Rhapsody presentó el menor crecimiento con un promedio de 19,47 mm seguida de Trichotic con promedio de 34,39 mm; por otro lado, los aislados de *M. royeri* presentaron un crecimiento promedio de 36,38 mm, figura 12.

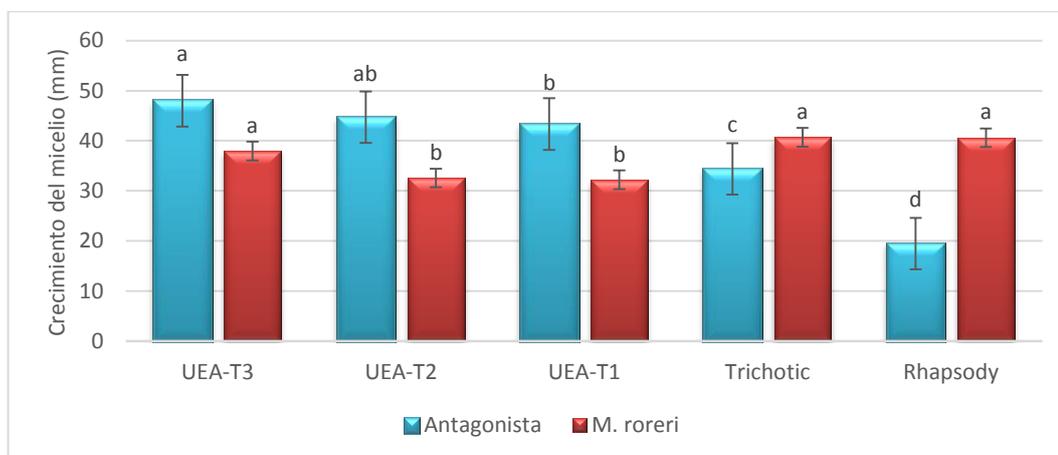


Figura 12. Crecimiento al segundo día de *M. royeri* frente a los antagonistas. Cultivo dual en medio V8. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ ($n=10$)

Para el tercer día de evaluación, el aislado UEA-T3 conservó el mayor crecimiento con un promedio de 61,79 mm, seguidos de UEA-T1 y UEA-T2 con promedios de 56,37 y 56,13 mm respectivamente. Mientras que los bioformulados Trichotic y Rhapsody presentaron un crecimiento promedio de 46,47 y 23,03 mm. El patógeno *M. royeri* mostró un bajo crecimiento en presencia de antagonistas con un promedio de 41,38 mm (Figura 13), mientras que el control creció en promedio 77,01 mm.

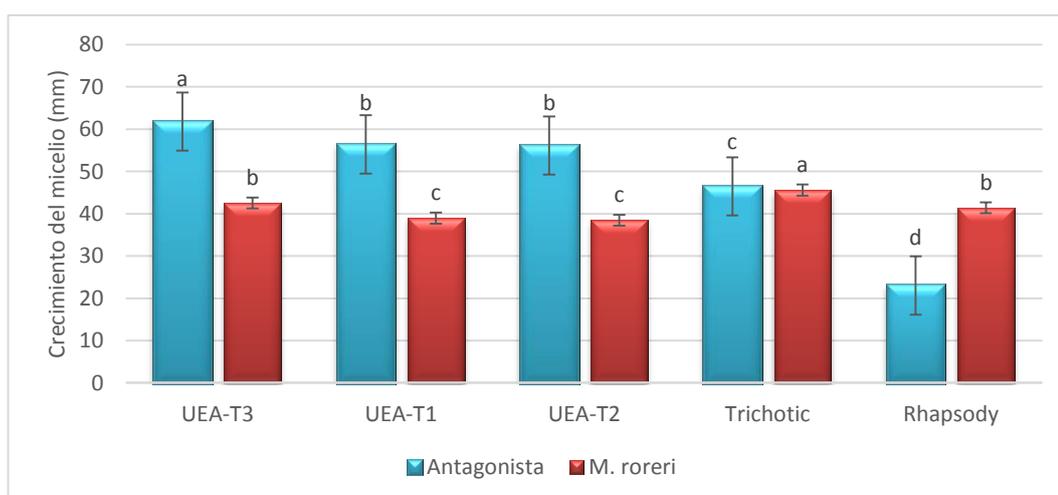


Figura 13. Crecimiento al tercer día de *M. roreri* frente a los antagonistas. Cultivo dual en medio V8. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ (n=10)

Antagonismo

A los cuatro días de enfrentamiento, los aislados UEA-T1, UEA-T2 y UEA-T3 presentaron un crecimiento promedio de 65,46 mm. Los bioformulados Trichotic y Rhapsody presentaron un crecimiento menor con respecto a los aislados con crecimientos promedios de 52,3 y 24,77 mm respectivamente. El patógeno *M. roreri* disminuyó notablemente en crecimiento con un promedio de 42,06 mm, figura 14.

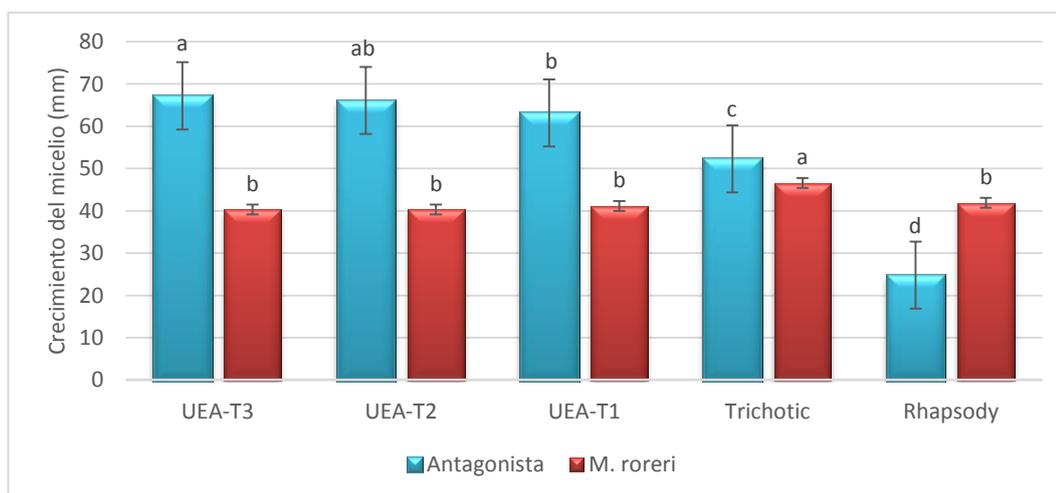


Figura 14. Crecimiento al cuarto día de *M. roreri* frente a los antagonistas. Cultivo dual en medio V8. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ (n=10)

En el quinto día de evaluación, los aislados UEA-T1, UEA-T2 y UEA-T3 presentaron un crecimiento promedio de 65,98 mm, sin embargo, los bioformulados Trichotic y Rhapsody mostraron menores promedios de crecimiento con 52,82 y 25,29 mm respectivamente, mientras *M. roreri* disminuyó su crecimiento con 42,83 mm de promedio, figura 15.

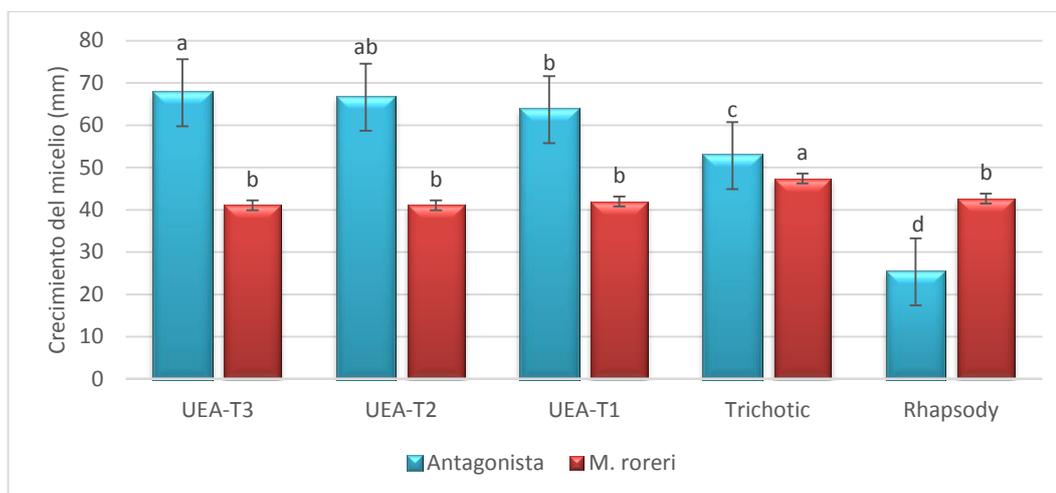


Figura 15. Crecimiento al quinto día de *M. roleri* frente a los antagonistas. Cultivo dual en medio V8. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ ($n=10$)

3.4 Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR)

Porcentaje de inhibición de crecimiento radial en cultivo dual de *M. roleri* frente a los antagonistas en medio PDA

La inhibición del crecimiento del hongo patógeno se observó al quinto día de evaluación, aun cuando el patógeno se encontraba distante, posiblemente a través de antibiosis, mecanismo característico que poseen hongos y bacterias antagonistas.

En la figura 16 se describe el comportamiento de los cultivos duales en medio PDA con relación a la disminución del crecimiento de *M. roleri*, observándose que para el quinto día de evaluación el bioformulado Rhapsody, presentó el mayor PICR con 35,52%, seguido de la cepa nativa de *Trichoderma* UEA-T3, con un 29,61%, sin mostrar diferencias significativas con los aislados UEA-T1 y UEA-T2 con 29,01 y 26,27% respectivamente. El bioformulado Trichotic fue el que presentó el menor porcentaje de inhibición al final de la evaluación con 23,01%.

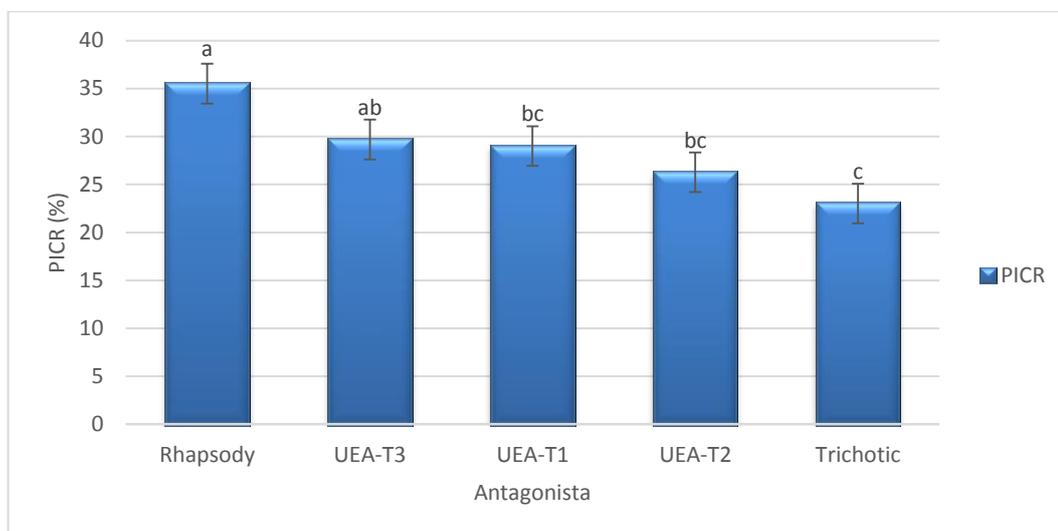


Figura 16. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial, al quinto día de *M. royeri* frente a los antagonistas. Confrontación dual en medio PDA. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ ($n=10$)

Porcentaje de inhibición de crecimiento radial en cultivo dual de *M. royeri* frente a los antagonistas en medio V8

En la figura 17 se observa el comportamiento del enfrentamiento dual de los microorganismos antagonista frente *M. royeri* en medio V8, en relación a la reducción del patógeno, evidenciando que al quinto día de evaluación, los aislados UEA-T3, UEA-T2 y UEA-T1 mostraron el mayor porcentaje de inhibición, sin mostrar diferencias significativas entre sí con PICR de 47,66, 47,64 y 46,45 respectivamente, seguidas de los bioformulados Rhapsody y Trichotic con 45,62 y 39,49 %.

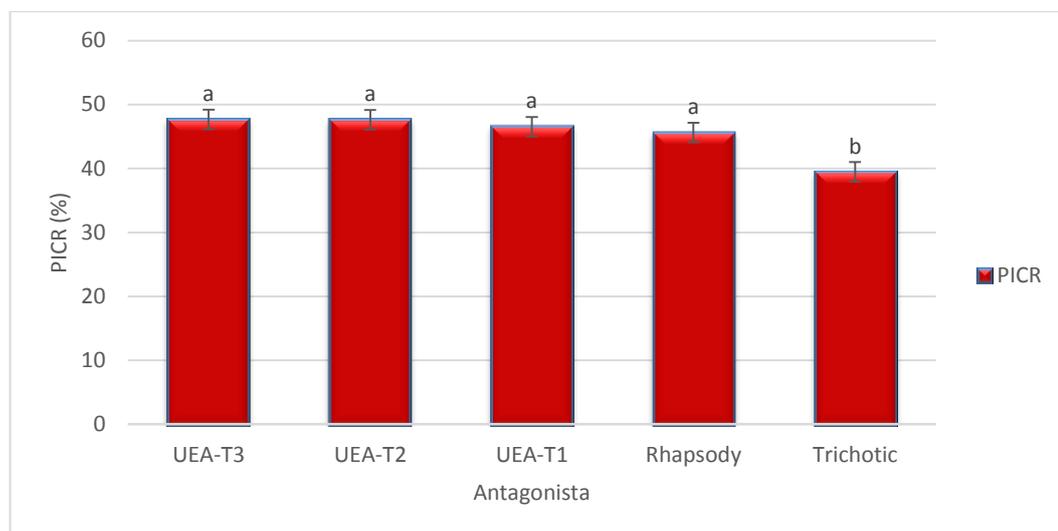


Figura 17. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial, al quinto día de *M. royeri* frente a los antagonistas. Confrontación dual en medio V8. Barras con letras desiguales difieren, por la prueba de Tukey $P < 0,05$ ($n=10$)

3.5 Clases y zonas de antagonismo

Clases y zonas de antagonismo en cultivo dual de antagonistas frente a *M. royeri* en medio PDA y medio V8.

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. y el bioformulado Trichotic se colocaron en la clase 2 de conformidad a la escala de Bell et al. (1982), cubriendo las dos terceras partes del medio de cultivo, en la que se observó un crecimiento superficial del antagonista sobre *M. royeri*. Rhapsody se ubicó en la clase 4 ocupando un tercio de la caja de Petri. Los aislados de *Trichoderma* spp. y el bioformulado Trichotic se ubicaron en la zona 3 de acuerdo con la escala de Punja y Grogan, (1982), mostrando una aversión fuerte. Rhapsody se ubicó en la zona 1 con una aversión ligera sobre el fitopatógeno (Tabla 6).

Tabla 6.

Clase y zonas de antagonismo. Cultivo dual de antagonistas frente a *M. royeri* en medio PDA y medio V8, de acuerdo a la escala de Bell et al. (1982) y Punja y Grogan, (1982).

Antagonista	Clase de antagonismo	Zonas de antagonismo
UEA-T1	2	3
UEA-T2	2	3
UEA-T3	2	3
Trichotic	2	3
Rhapsody	4	1

*Las clases y zonas de antagonismo son iguales en el medio PDA y medio V8

3.6 Antagonismo hifal (microscopía)

Los resultados de las observaciones por técnicas de microscopía de las interacciones entre antagonista y fitopatógeno fueron similares para cada antagonista. Sin embargo, UEA-T3 presentó los daños más drásticos principalmente en micelio y conidios de *M. royeri*, en los que se evidenció mecanismos de control como lisis, estrangulamiento, ruptura y fragmentación. Además, todos aislados del género *Trichoderma* mostraron la propiedad de agrupar esporas sobre el micelio de *M. royeri* (Figura 18).

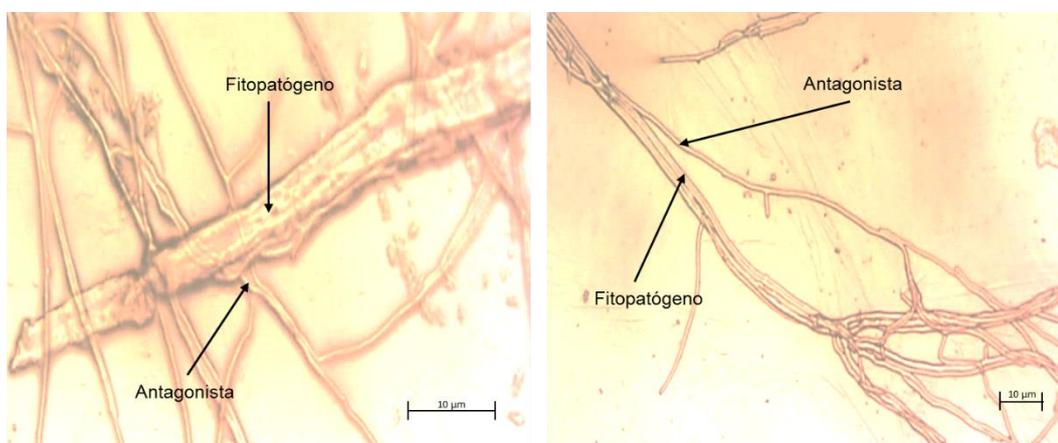


Figura 18. Micoparasitismo del aislado de *Trichoderma* UEA-T3 en *M. royeri*.

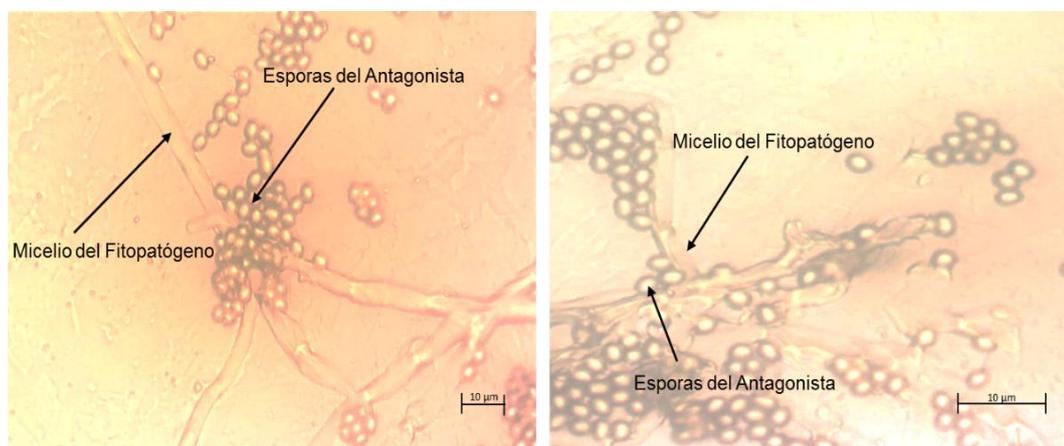


Figura 19. Concentración de esporas del aislado de *Trichoderma* UEA-T3. sobre micelio de *M. royeri*.

3.7 Metabolitos volátiles

El bioformulado Rhapsody fue el que mostró la mayor actividad en la reducción del crecimiento de *M. royeri* con un promedio de inhibición de 43,2 % seguido por el aislado UEA-T3 que logró reducir el crecimiento del fitopatógeno en 21,12 %. Mientras que los aislados UEA-T2, UEA-T1 y el bioformulado Trichotic mostraron los menores promedios en la reducción del crecimiento de *M. royeri* (Tabla 7).

Tabla 7.

Crecimiento de *M. royeri* en presencia de metabolitos volátiles de antagonistas.

Antagonista	Crecimiento radial (mm h ⁻¹) de <i>M. royeri</i>							PICR (%)*
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	
UEA-T1	27,39 b	36,62 ab	45,68 ab	57,16 a	61,09 a	66,97 a	71,39 ab	13,65
UEA-T2	28,41 b	38,72 a	48,55 a	57,17 a	59,24 a	66,69 a	69,54 ab	15,89
UEA-T3	25,46 b	35,03 ab	43,67 b	51,61 a	56,39 a	63,42 a	65,22 b	21,12
Trichotic	34,00 a	37,95 a	45,21 ab	52,93 a	61,1 a	67,56 a	74,9 a	9,41
Rhapsody	26,95 b	32,69 b	44,39 ab	45,08 b	45,32 b	45,77 b	46,96 c	43,2

*Porcentaje de inhibición de crecimiento radial medido a las 168 horas.

Medias con letras diferentes, en el sentido de las columnas difieren por la prueba de Tukey $P \leq 0,05$ (n=10)

Los aislados UEA-T3 y UEA-T2 y el bioformulado Rhapsody tienen una mayor influencia en la reducción de la esporulación de *M. roreri*, con un porcentaje de inhibición de esporulación de 78,24, 72,06 y 75,88 % respectivamente. Los efectos de estos antagonistas en el fitopatógeno se observan en las características culturales de este último, provocando variaciones en los bordes y textura del micelio. El aislado UEA-T1 y el bioformulado Trichotic reprimen la esporulación con menor eficacia que los demás tratamientos (Tabla 8).

Tabla 8.

Porcentaje de Inhibición de Esporulación (% I.E) de *M. roreri* en presencia de antagonistas a las 168 h.

Antagonista	Esporulación (conidias · mL ⁻¹)	% IE
UEA-T1	8,87 x 10 ⁴	47,82
UEA-T2	4,75 x 10 ⁴	72,06
UEA-T3	3,70 x 10 ⁴	78,24
Trichotic	1,28 x 10 ⁵	24,71
Rhapsody	4,10 x 10 ⁴	75,88
Control	1,70 x 10 ⁵	

3.8 Conservación de *Trichoderma*

Conservación en Glicerol.

El glicerol es un agente crioprotector que reduce el daño celular en el momento de la congelación. El método de conservación con glicerol demostró buenos resultados para las tres cepas conservadas. Después de seis meses de almacenamiento cuatro réplicas de cada aislado fueron recuperadas exitosamente (Figura 20).



Figura 20. Crioconservación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de aislados de *Trichoderma* spp. en glicerol.

Conservación en arroz

El crecimiento del aislado UEA-T3 fue óptimo al observarse sus características en el desarrollo y esporulación utilizando como sustrato arroz. El crecimiento fue rápido desarrollando micelio observable desde las 48 horas post-inoculación y cubriendo la totalidad de la superficie del sustrato a las 7 días con presencia de esporas (color verde claro), el aislado UEA-T2 no presentó un buen crecimiento, el micelio fue poco denso con aparición de esporas al décimo día, los aislados UEA-T3 y UEA-T2 presentaron concentraciones de conidios de $1,97 \times 10^8$ conidios $\cdot\text{g}^{-1}$ al séptimo día y $1,21 \times 10^8$ conidios $\cdot\text{g}^{-1}$ al décimo día, respectivamente (Figura 21).



Figura 21. Conservación de las cepas a) UEA-T3 (T1) y b) UEA-T2 (T2) en arroz a los siete y diez días post-inoculación, respectivamente.

3.9 Aplicación de biocontroladores en campo

Los aislados seleccionados por su comportamiento *in vitro* frente a *M. royeri* presentaron resultados muy alentadores para los ensayos en campo. El efecto que presentaron los biocontroladores aislados de la Provincia de Napo (Tratamiento 1 y 2) en la reducción del porcentaje de mazorcas infectadas con fitopatógenos y otras enfermedades no muestra diferencias significativas con los bioformulados comerciales (Trichotic y Rhapsody) y con el fungicida químico (Cobre Nordox 50), pero son estadísticamente diferentes al control (Tabla 9).

Tabla 9.

Porcentaje de mazorcas enfermas (*M. roleri*, *Phytophthora* spp., y otras enfermedades) registrados cada 15 días durante cuatro meses de evaluación en parcelas aplicadas con fungicidas químicos y biológicos.

Tratamientos	Días	Mazorcas Infeccionadas (%)						
		15	30	45	60	75	90	105
1. UEA T 3 (Aisl. <i>Trichoderma</i>)		47,20 b	42,9 b	35,25 b	31,50 b	29,44 bc	19,89 cd	18,14 c
2. UEA T2 + UEA T3 (Aisl. <i>Trichoderma</i>)		52,05 b	41,35 b	38,66 b	38,21 ab	35,16 bc	29,43 bcd	23,41 bc
3. TRICHOTIC (<i>Trichoderma</i> Comercial)		52,40 b	43,90 b	40,63 b	38,9 ab	37,90 b	34,05 b	30,22 b
4. RHAPSODY 1.34 SC (<i>B. subtilis</i>)		50,96 b	42,58 b	42,03 b	43,10 ab	36,05 bc	30,49 bc	28,16 b
5. Oxido cuproso (Cobre Nordox 50)		50,59 b	38,74 b	34,84 b	29,86 b	25,60 c	18,90 d	15,56 c
6. Control		67,55 a	57,69 b	52,83 a	53,19 a	55,14 a	57,41 a	59,08 a

Medias con letras diferentes, en el sentido de las columnas difieren por la prueba de Tukey $P \leq 0,05$ (n=10)

Se realizó una evaluación separada para la infección causada por *M. roleri* en la que se encontró diferencia estadística en los promedios por parte de esta patología. Las plantas a las que se aplicó los tratamientos 1 y 2, correspondiente a los aislados UEA-T3 y UEA-T2 + UEA-T3, presentaron niveles de infección similares a las plantas tratadas con los bioformulados (Trichotic y Rhapsody), mientras que las plantas tratadas con el fungicida químico Cobre Nordox 50 evidenciaron valores de infección ligeramente menores. Sin embargo, todos los tratamientos mostraron diferencias significativas con el control (Tabla 10).

Tabla 10.

Porcentaje de mazorcas enfermas con *M. royeri* registrados cada 15 días durante cuatro meses de evaluación en parcelas aplicadas con fungicidas químicos y biológicos.

Tratamientos	Días	Mazorcas infectadas con <i>M. royeri</i> (%)					
	15	30	45	60	75	90	105
1. UEA T 3 (Aisl. <i>Trichoderma</i>)	40,3 a	38,38 b	31,52 b	30,52 b	25,05 bc	13,04 c	10,75 c
2. UEA T2 + UEA T3 (Aisl. <i>Trichoderma</i>)	44,19 a	40,19 ab	34,27 b	33,27 b	29,75 bc	16,8 bc	15,85 bc
3. TRICHOTIC (<i>Trichoderma</i> Comercial)	45,94 a	45,94 ab	39,94 b	35,94 b	31,54 b	25,85 b	23,13 b
4. RHAPSODY 1.34 SC (<i>B. subtilis</i>)	45,34 a	43,34 ab	39,25 b	37,08 b	29,14 bc	24,46 bc	21,78 bc
5. Oxido cuproso (Cobre Nordox 50)	40,15 a	34,65 ab	30,02 b	29,02 b	15,3 c	12,99 c	9,39 c
6. Control	56,63 a	53,47 a	56,51 a	56,51 a	54,18 a	51,51 a	53,18 a

Medias con letras diferentes, en el sentido de las columnas difieren por la prueba de Tukey $P \leq 0,05$ (n=10)

Efectividad Técnica

Los resultados evidenciaron que los tratamientos presentaron una efectividad técnica considerable sobre el fitopatógeno *M. royeri*. En los que se destacan el Oxido cuproso (Cobre Nordox 50) con más de 82 % de eficacia, seguido de UEA-T3 (Aisl. *Trichoderma*) y UEA-T2 + UEA-T3 (Aisl. *Trichoderma*) que tuvieron una efectividad mayor a 70%. Los bioformulados Trichotic y Rhapsody ejercieron un control aceptable, ya que influyeron en la disminución del fondo infectivo de *M. royeri* en condición de campo (Tabla 11).

Tabla 11.

Efectividad técnica de los Tratamientos en el control de *M. royeri* evaluados 15 días después de cada aplicación.

Tratamientos	Aplicaciones		Eficacia Técnica (%)					
	1		2		3		4	
	\bar{x} Orig	\bar{x} Transf	\bar{x} Orig	\bar{x} Transf	\bar{x} Orig	\bar{x} Transf	\bar{x} Orig	\bar{x} Transf
1. UEA T 3 (Aisl. <i>Trichoderma</i>)	37,57	0,65 a	43,47	0,72 a	56,26	0,85 ab	80,39	1,2 a
2. UEA T2 + UEA T3 (Ais. <i>Trichoderma</i>)	31,58	0,57 a	38,72	0,67 a	44,19	0,72 b	69,94	0,99 ab
3. TRICHOTIC (<i>Trichoderma</i> Comercial)	25,91	0,51 a	35,29	0,63 a	45,72	0,73 b	55,63	0,85 b
4. RHAPSODY 1.34 SC (<i>B. subtilis</i>)	29,32	0,54 a	34	0,59 a	45,73	0,73 b	59,1	0,89 b
5. Oxido cuproso (Cobre Nordox 50)	29,7	0,55 a	45,74	0,74 a	70,95	1,01 a	82,61	1,15 a

Medias con letras diferentes, en el sentido de las columnas difieren por la prueba de Tukey $P \leq 0,05$ (n=10)

4 DISCUSIÓN

El hongo *Trichoderma* habita en los suelos de forma natural (Jensen y Wolffthechel, 1995). La humedad es uno de los factores que influye en la densidad poblacional de especies *Trichoderma* en el suelo. Existen reportes de *T. harzianum* con altas poblaciones en suelos húmedos en comparación con suelos secos (Waquelin, Sivasithamparam, Cole y Skipp, 1999); de la misma manera, hay una alta densidad en la población de *T. koningii* en suelos húmedos con promedios de 70% de humedad que contrasta con suelos secos con 20% de humedad (Eastburn y Butther, 1988). Este estudio se realizó en la Amazonía Ecuatoriana con una humedad histórica promedio del 69% (MAE, 2013). En este estudio pudimos confirmar que *Trichoderma* puede ser aislado fácilmente a partir de suelos con altos porcentajes de humedad.

Se obtuvieron tres aislados de *Trichoderma* los que difirieron en cuanto a sus características morfológicas y culturales. *Trichoderma* presentó diversas formas de crecimiento en relación al micelio, color de sus colonias y esporulación de los tres aislados obtenidos. Se observó que de acuerdo a sus características macroscópicas UEA-T1 y UEA-T2, demostraron similitud a lo descrito por (Rifai, 1969; Romero, Olivera Costa, y Rodríguez, 2015) quienes describen los caracteres de *T. harzianum*. UEA-T3 presentó similitud a lo descrito por (Leickfeldt, Samuels, Nirenberg, y Petrini, 1999) al describir los caracteres morfológicos de *T. viride*.

Entre las características microscópicas relevantes que se observaron en los aislados de *Trichoderma* se pudo determinar que las fiálides estuvieron presentes en los tres aislados, la esporulación fue de color verde coincidiendo con lo descrito por Rifai (1969) y Olivera-Costa y Rodríguez (2014), quienes al referir las colonias de *Trichoderma* mencionan esta coloración como la típica para este género. El aroma a coco que emanó, fue claramente perceptible en el aislado UEA-T3 similar a lo observado por Dennis y Wester (1971) y Leickfeldt, Samuels, Nirenberg y Petrini (1999).

Los antagonistas mostraron un crecimiento similar durante el tiempo de evaluación. Dennis y Wester (1971) y Cook y Baker (1983) afirman que la velocidad de crecimiento de *Trichoderma* sirve como guía para su utilización como antagonistas en el control de fitopatógenos, demostrando así la variabilidad de la actividad antagónica de las especies de *Trichoderma*; siendo esta una característica ventajosa la de colonizar el área de crecimiento rápidamente. Estos resultados coinciden con lo observado por Párraga y Zambrano (2012), quienes al estudiar la tasa de crecimiento de cepas de *Trichoderma* spp. *in vitro* determinaron que las cepas C1, C10, C4 y C9 cubrieron la totalidad de las cajas de Petri a los tres días, después de incubadas. Estos resultados difieren con lo descrito por Arcos (2011), quien al evaluar cepas nativas de *Trichoderma* spp. en el biocontrol de *Botrytis cinerea*. en rosas, determinó que el crecimiento del diámetro de la colonia de *Trichoderma* spp., fue de 89,3 mm a los cuatro días.

Los tres aislados de *Trichoderma* spp. mostraron una velocidad de crecimiento alta, mostrando a las 72 horas un promedio de crecimiento de 35,29 mm.día⁻¹. Solís (1999), quien evaluó organismos antagónicos asociados a *M. royeri* reportó una velocidad de crecimiento de *Trichoderma*, a las 96 horas, de 22,50 mm día⁻¹.

En el quinto día de enfrentamiento los aislados de *Trichoderma* UEA-T1, UEA-T2 y UEA-T3 presentaron un crecimiento promedio de 65,46 mm, sin mostrar diferencias entre sí, cubrió la totalidad del medio de cultivo, y sobrecreció la colonia de *M. royeri*, disminuyendo notablemente en crecimiento del hongo fitopatógeno. Estos resultados son similares a lo descrito por Solís (1999), donde *Trichoderma* spp. presentó un valor de 64,9 mm al quinto día de evaluación. demostrando mayor velocidad de crecimiento, competencia por espacio y por los nutrientes del medio de cultivo. *Trichoderma* spp., tiene un gran potencial para producir enzimas hidrolíticas en presencia de un hongo patógeno (Romero-Arenas, Huerta, Damián, Domínguez y Arellano, 2009). Rhapsody (*B. subtilis*) presentó el menor promedio de crecimiento con 24,77 mm, sin embargo, inhibió el crecimiento de *M. royeri* con mayor eficacia, debido a la liberación de metabolitos secundarios coincidiendo con lo descrito por Bravo y Victoria (1981); CORPOICA (2006); Benito, Arévalo y Garcés (2007);

Villamil, Blanco y Rosero (2012) quienes encontraron antagonismo sobre *M. roreri* y otros fitopatógenos del cacao con *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp y *Bacillus subtilis*.

La capacidad antagónica según la escala de Bell et al. (1982), de los aislados de *Trichoderma* spp. y Trichotic sobre *M. roreri* fue de clase 2, donde a través de observaciones macroscópicas, se evidenció que los antagonistas colonizaron las dos terceras partes de la superficie de la caja de Petri en la que inhibieron el crecimiento de *M. roreri*. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Solís (1999), quien al evaluar a *Trichoderma* spp. sobre *M. roreri*, determinó que se ubicó en clase 1. Otros autores tales como Harman (2003); Bernal, Andreu y Moya (2004) y Infante, Martínez, González y Reyes (2009) afirmaron que *Trichoderma* spp. tiene una alta capacidad de competencia por nutrientes y espacio, dado fundamentalmente porque su velocidad de crecimiento es superior a la del hongo patógeno. Rhapsody colonizó un tercio de la caja de Petri, ubicándose su capacidad antagónica sobre *M. roreri* en clase 4, debido a que *B. subtilis* es capaz de inhibir el crecimiento de *M. roreri in vitro*, a través de la liberación de metabolitos secundarios (Jaimes, Coronado y Jaimes, 2008) y (Suarez y Rangel, 2014).

Los resultados de las observaciones microscópicas de las interacciones entre antagonista y fitopatógeno dependieron del aislado. UEA-T3 presentó un efecto marcado sobre el micelio y conidios de *M. roreri*, en los que se evidenció mecanismos de control previamente descritos como degradación parcial o total (lisis), ruptura y fragmentación del micelio, y penetración y formación de haustorios dentro de las hifas de *M. roreri* (Howell, 2003). Estos resultados coincidieron con lo encontrado por Gonzales (2001), quien al evaluar *T. viride* y *Trichoderma* sp. Cepa C-66 detectó micoparasitismo sobre aislamientos de *R. solani* en frijol con reducción del crecimiento micelial del hongo patógeno.

Los aislados del género de *Trichoderma* mostraron la propiedad de agrupar esporas sobre el micelio de *M. roreri*. UEA-T1 y UEA-T2, fueron capaces de desarrollar estructuras de reproducción. No se observó enrollamiento, estos resultados coinciden con lo encontrado por Acosta-Suárez et al. (2013) quienes

determinaron que *T. harzianum* no causa enrollamiento sobre *Mycosphaerella fijiensis* en condiciones *in vitro*.

Los aislados de *Trichoderma* UEA-T3 y UEA-T2 junto al bioformulado Rhapsody tienen una mayor influencia en la reducción de la esporulación de *M. roreri*. Las afectaciones de este antagonista se observan en las características culturales del fitopatógeno, provocando variaciones en los bordes y textura del micelio. Mientras, el aislado UEA-T1 y el bioformulado Trichotic reprimen la esporulación con menor eficacia. Corroborando lo mencionado por Jaimes, Coronado y Jaimes (2008); Suarez y Rangel (2014) y Villamil, Viteri y Villegas (2015), quienes manifiestan que *Bacillus* sp., puede inhibir a *M. roreri in vitro* mediante la liberación de metabolitos secundarios.

Los aislados seleccionados por su comportamiento *in vitro* frente a *M. roreri*, presentaron resultados muy alentadores para los ensayos en campo. El efecto que presentaron los biocontroladores con cepas nativas (Tratamiento 1 y 2) en la reducción del porcentaje de mazorcas infectadas con hongos fitopatógenos y otras enfermedades mostró diferencias con los bioformulados comerciales (Trichotic y Rhapsody). Se determinó que los bioformulados a base de los aislados de *Trichoderma* (UEA-T2 y UEA-T3) tuvieron un efecto significativo sobre las enfermedades de cacao, sin embargo UEA-T3, tuvo una eficacia técnica muy cercana a Cobre Nordox 50. Esto concuerda con Solis (1999) y Suárez (2006), quienes determinaron que la reducción de enfermedades en parcelas de cacao, tratadas con *T. koningiopsis* y *T. stromaticum* fueron similares a las obtenidas con fungicidas.

Los biocontroladores fueron estadísticamente iguales entre si y diferentes al control en cuanto al porcentaje de mazorcas infectadas con monilla. De acuerdo con estos resultados, *Trichoderma* sería capaz de elevar los niveles de producción de cacao, al compararse con los fungicidas de esta investigación. Resultados similares fueron descritos por Benito, Arévalo y Garcés (2007); Bailey et al. (2008); Osorio (2010) y Villamil, Viteri y Villegas (2015), quienes al evaluar *T. viride*, *T. harzianum* y *T. hamatum*, encontraron antagonismo sobre *M. roreri in vitro* e *in situ*.

Se presentó una disminución en el porcentaje de infección por *M. royeri* a los 75 días después de haber realizado las aplicaciones. El biocontrol UEA-T3 produjo la reducción más alta en los niveles de infección del fitopatógeno, similar a la reducción lograda por el fungicida químico Cobre Nordox 50. El biocontrol UEA-T2+UEA-T3, obtuvo valores de infección muy cercanos a los de los bioformulados comerciales Rhapsody y Trichotic. Todos los tratamientos mostraron un nivel de control significativo con respecto al testigo. Estos resultados coinciden con lo descrito por Osorio (2010), quien determinó la eficiencia de *T. harzianum* como biocontrolador sobre *M. royeri* en la costa ecuatoriana a partir de los 62 días de la primera aspersión. De la misma forma Guerrero y Arias (2006), determinaron que *T. koningiopsis* resultó efectivo en el control de monilla en la misma magnitud que los fungicidas químicos.

Los resultados evidenciaron que los tratamientos presentaron una efectividad técnica considerable sobre el hongo fitopatógeno *M. royeri* en campo. En los que se destacan el Oxido cuproso (Cobre Nordox 50), seguido del biocontrol partir del aislado UEA-T3 con una efectividad de 80,39%. El biocontrol UEA-T2+UEA-T3 obtuvo un valor admisible de eficacia, ejercieron un control aceptable, ya que implica la disminución del fondo infectivo de *M. royeri* en condición de campo, no así los bioformulados comerciales Trichotic y Rhapsody que obtuvieron valores menores al 60 %. Algunos autores señalan la potencialidad de *T. harzianum* en el control de hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* lo que resalta su alta capacidad antagónica; con efectividad técnica que superó el 80 % (García, Ricia, Zambrano y Gutiérrez, 2006); (Reyes, Martínez y Infante, 2008) y (Bernal, Andreu y Moya, 2004). Resultados similares presentó Osorio (2010), al comprobar la eficiencia de *T. harzianum* en campo, como biocontrolador sobre *M. royeri*, al reducir la enfermedad hasta en 17 %.

Según Baker y Cook (1987) existe una marcada desventaja en la efectividad del control biológico sobre fitopatógenos cuando los antagonistas no están adaptados a las condiciones climáticas del lugar donde se realizará la aplicación. Por otra parte, las especies nativas presentan una notable ventaja, además de otros caracteres

fisiológicos de adaptación al clima en el que habitan (Constant, Marchay, Fischer-Le-Saunx, Braiand-Panoma y Mauleon, 1998). Los resultados que se obtuvieron muestran que los biocontroladores de especies nativas de *Trichoderma* presentaron mayor eficiencia en comparación con los bioformulados comerciales (Trichotic y Rhapsody), pues están adaptados al ecosistema y esto les facilita tener una mayor eficacia en campo. Confirmando de esta manera que la selección y especificidad de los aislados de *Trichoderma* constituyen un elemento importante a tomar en cuenta para utilizar a estos hongos como agentes de control biológico.

5 CONCLUSIONES

Los aislados del género de *Trichoderma* presentaron resultados promisorios en la represión de *M. royeri* por el mecanismo de antagonismo a nivel de laboratorio; por consiguiente, el uso de estos biocontroladores puede ser considerado como alternativa para el control de enfermedades del cacao.

Las cepas UEA-T2 y UEA-T3 presentaron una actividad antagónica superior a la mostrada por el aislado UEA-T1 *in vitro*, por lo que los primeros fueron utilizados para las evaluaciones en campo.

Las pruebas *in vitro* de cultivo dual ayudaron a identificar los aislados más idóneos para ser utilizados como biocontrol frente a *M. royeri*.

El arroz es un sustrato adecuado para la producción masiva de *Trichoderma* pues el hongo se adapta rápidamente y produce abundantes conidias.

La aplicación de los bioformulados a base de *Trichoderma* spp. nativas controla *M. royeri* a niveles cercanos a los del fungicida químico y significativamente superiores a los niveles de control de los bioformulados comerciales Rhapsody y Trichotic.

6 RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar ensayos *in vitro* con cepas nativas de *Trichoderma* para determinar si son capaces de controlar a otros microorganismos que atacan al cacao (*Crinipellis Perniciosa*, *Phytophthora* sp.).

Se recomienda seguir un manejo integrado de cacao, en el que se considere al control biológico como alternativa de solución preventiva más no curativa en enfermedades de cacao.

Se recomienda realizar en campo un conteo periódico de concentración de conidias de *Trichoderma* con el objeto de verificar que estas se mantengan dentro de la dosificación recomendada que es 10^8 esporas/ml.

Se recomienda continuar en la línea de investigación de biocontroles con el fin de implementarlos a la agricultura orgánica, libre de productos químicos, fomentando la producción sana del cacao.

7 BIBLIOGRAFÍA

- ACEPROCACAO. (2012). *Proyecto de Fortalecimiento de la Asociación Ecuatoriana de Cacao Nacional Fino de Aroma*. Ecuador.
- Acosta-Suárez, M., Pichardo, T., Roque, B., Cruz-Martín, M., Mena, E., Leiva-Mora, M., . . . Alvarado-Capo, Y. (2013). *Antagonismo in vitro de Trichoderma harzianum, Rifai contra Mycosphaerella fijiensis Morelet.* . Biotecnología Vegetal.
- Aime, M., & Philips-Mora, W. (2005). The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (*Theobroma cacao*) from a new lineage of Marasmiaceae. *Mycology*, 1012-1022.
- Amores, F., Agama, J., Mite, F., Jimenez, J., Loor, G., & Quiroz, J. (2009). EET 544 y EET 558 nuevos clones de cacao nacional para la producción bajo riego en la Península de Santa Elena. *Boletín divulgativo N 134*, 47.
- Andrews, K., & Quezada, J. (1989). Manejo Integrado de Plagas Insectiles en la Agricultura: Estado Actual. 623.
- ANECACAO. (2015). *Asociación Nacional de Exportadores de Cacao- Ecuador*. Recuperado el 21 de Marzo de 2015, de Boletín Estadístico mensual de ANECACAO: <http://www.anecacao.com/es/estadisticas/>
- Arcos, M. (2011). *Obtención y evaluación de cepas nativas de Trichoderma spp. en el biocontrol de Botrytis cinérea en el cultivo de rosas*. Sangolquí, Ecuador: Tesis para aspirar al título de Ingeniero Agropecuario. Escuela Superior Politécnica del Ejército.
- Bailey, B., Bae, H., Strem, M. D., Crozier, J., Thomas, S. E., Samuels, G. J., . . . Holmes, K. A. (2008). *Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic Trichoderma isolates with biological control potential in Theobroma cacao*. Biological control.

- Baker, K., & Cook, R. J. (1987). *Biological control of plant pathogens*. San Francisco: Freeman.
- Barragan, H. (2010). *Desarrollo, salud humana y amenazas ambientales: la crisis de la sustentabilidad*. Obtenido de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/26595/Documento_completo___pdf?sequence=1
- Bastidas, O. (2009). *Technical Note-Neubaver Chamber Cell Counting*.
- Batista, L. (2009). *Guía Técnica del Cultivo de Cacao en la República Dominicana*. Santo Domingo, República Dominicana: CEDAF.
- Bélanger, R., & Avis, T. (2002). *Ecological processes and interactions occurring in leaf surface fungi*. In *Phyllosphere Microbiology*. The American Phytopathology Society.
- Bell, D., Well, D., & Markham, C. (1982). *In vitro antagonism of trichoderma species against six fungal plant pathogens*. *Phytopathology*.
- Benito, J., Arévalo, E., & Garcés, L. (2007). *Manejo Integrado de cacao para el control de enfermedades con énfasis en monilia*. 27: Memorias Foro Binacional ICT-INIA. Situación Actual y perspectivas de investigación en cacao (*Theobroma cacao* L.).
- Bernal, A., Andreu, C., & Moya, M. (2004). *Utilización de Trichoderma spp. como alternativa ecológica para el control de Fusarium oxysporum sp. cubense (EF Smith) Snyd & Hans*. Recuperado el 26 de Diciembre de 2015, de <http://www.virtualcentr.org/es/enllBTJ%20Tallr/bernalalezander.htm>.
- BIOSCIENCE. (2004). *Databases. Classification based on 9th edition of Dictionary of the Fungi*. Recuperado el 8 de Diciembre de 2015, de <http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=219848>.

- Blakeman, J., & Fokkema, N. (1982). Potential for biological control of plant diseases in the phylloplane. *Annual Review of Phytopathology*, 103-116.
- Bravo, N., & Victoria, K. (1981). Posibilidades para el biocontrol de monilia (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 133-141.
- CATIE. (12 de Diciembre de 2015). *Centro Agronómico* . Obtenido de <http://www.catie.ac.cr/es/>
- Chavez, M. (2006). *Producción de Trichoderma spp. y Evaluación de su efecto en cultivo de Crisantemo (Dendranthema grandiflora)*. Bogota.
- Constant, P., Marchay, L., Fischer-Le-Saunx, M., Braiand-Panoma, S., & Mauleon, H. (1998). *Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Guadeloupe islands*. *Fundamentals of Applied Nematology*.
- Contreras, L., & Riano, A. (2013). Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Acta Agronómica*, 370-378.
- Cook, R., & Baker, K. (1983). *The nature and practice of biological Control of Plants Pathogens*. St. Paul, MN, USA: American Phytopathological Society Press. .
- CORPEI. (2005). *El cacao*. Recuperado el 15 de octubre de 2015, de http://www.corpei.org/FrameCenter.asp?Ln=SP&Opcion=3_3_1
- CORPOICA. (2006). *Capacitación sobre uso de metodologías y protocolos para realizar investigaciones con fitopatógenos y potenciales antagonistas en cacao (Theobroma cacao L.)*. Laboratorio de Fitopatología, Corpoica, C.I. Tibaitata, Mosquera (Cundinamarca).
- Cruz, S. (1993). Determinación de fuentes de resistencia de cacao de origen nacional al ataque de *Monilia roreri* (Cif. & Par.). . *Tesis para aspirar a ingeniero agropecuario* , 101.

- Dennis, C., & Wester, J. (1971). *Antagonistic properties of species groups of Trichoderma I. Production of non-volatile antibiotics*. Transactions of the British Mycological Society.
- Eastburn, D., & Butther, E. E. (1988). Microhabitat characterization of *Trichoderma harzianum* in natural soils: evaluation of factors affecting population density. *Soil Biology and Biochemistry*, 541-545.
- ECORAE. (2001). *Compendio de recomendaciones tecnológicas para los principales cultivos de la amazonía ecuatoriana*. Quito, Ecuador: Nina Comunicaciones.
- Enríquez, G. (2004). *Cacao Orgánico. Guía para productores ecuatorianos*. Quito.
- Enríquez, G. (2004). *Cacao Organico:Guia para productores Ecuatorianos*. Quito, Ecuador: Camara Ecuatoriana del Libro-Nucleo de Pichincha.
- Enriquez, G. (2010). *Cacao Orgánico. Guía para productores ecuatorianos*. Quito, Ecuador.
- Errington, J. (2003). *Regulation of endospores formation in Bacillus subtilis*. Nat Rev Microbiol.
- Esquivel, F., Flores, M., Domínguez, M., & Marquéz, F. (2012). Ficha técnica escoba de bruja del cacao *Moniliophthora perniciosa*. *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria*, 21.
- Evans, C. (1981). *Pod Rot of cacao caused by Moniliophthora (Monilla) roreri*.
- Evans, C., Holmes, K., Philips, W., & Wilkinson, J. (2002). What is a name: *Crinipellis*, the final resting place for the frosty pod rot pathogen of cacao. *Mycologist*, 148-152.
- Evans, C., Stalpers, J., & Benny, G. (1978). On the taxonomy of *Monilla roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Canadian Journal of Botany*, 2528-2532.

- Fravel, D. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Phytop*, 1-23.
- Fulton, R. (1989). The cacao disease trilogy black pod, monilia pod rot, and witches broom. *Plant disease*, 601-603.
- García, R., Ricia, R., Zambrano, C., & Gutiérrez, L. (2006). *Desarrollo de un fungicida biológico con base a una cepa del hongo Trichoderma harzianum proveniente de la Región Andina Venezolana*. La Habana: En memorias del Taller Latinoamericano Biocontrol con Trichoderma y otros antagonistas.
- Gonzales, M. (2001). *Utiliación de Trichoderma spp. para el control de hongos patógenos de la semilla y del suelo en el cultivo de frijol*. La Habana, Cuba. : Tesis para aspirar al título de Master en Protección Vegetal. Universidad Agraria de La Habana.
- Guerrero, R., & Arias , D. (2006). *Determinación de dos especies de hongos del género Trichoderma (T. koningiopsis – T. stromaticum) para el control de enfermedades de la mazorca de cacao (Theobroma cacao)*. Quevedo - Ecuador: Tesis para aspirar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Estatal de Quevedo. .
- Gumedo, R., Alarcón, A., Ferrera, R., & Peña, J. (2009). El género Fúngico Trichoderma y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista Contaminantes Ambientales*, 257-269.
- Harman, G. (2003). *Trichoderma harzianum, T. viride, T. koningii, T. hamatum and other spp. (Deuteromycetes, moniliales)*. Recuperado el 12 de Diciembre de 2015, de <http://www.ibun.unal.edu.co/r2r7e.html>.
- Howell, C. (2003). *Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts*. Plant Disease.

- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismo de acción de *Trochoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Proteccion Vegetal*, 14-21.
- INIAP. (2012). *Guía del manejo integrado del cacao (Theobroma cacao L) en la Amazonía ecuatoriana*. Joya de los Sachas-Ecuador.
- INIAP-PROMSA. (2003). *Determinación de metales contaminantes en cultivos de exportación y su repercusión sobre la calidad de los mismos*. INIAP, Los Ríos.
- Jaimes, A., Coronado, A. R., & Jaimes, Y. (2008). *Evaluación in vitro e in vivo de cinco cepas de Bacillus sp. como agentes de biocontrol de M. roleri*. Bucaramanga-Colombia: Memorias Seminario Internacional de cacao. Avances de Investigación. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.
- Jaimes, Y., & Aranzazu, F. (2010). *Manejo de enfermedades de cacao (Theobroma cacao L.) en Colombia, con énfasis en monilla (Moniliophthora roleri)*. Bogotá: CORPOICA.
- Jensen, D., & Wolffthechel, H. (1995). *Biological Control: Benefits and Risks*. Plant and microbial biotechnology research.
- Jhonson, J., Bonilla, J., & Agüero, L. (2008). Manual de manejo y producción del cacaotero. 40.
- Krauss, U., Hoopen, M., Hidalgo, E., Martínez, A., Arroyo, C., García, J., . . . Sánchez, V. (2003). Manejo integrado de la moniliasis (*Moniliophthora roleri*) del cacao (*Theobroma cacao*). 37-38.
- Leickfeldt, E., Samuels, G., Nirenberg, H., & Petrini, O. (1999). *A Morphological and Molecular Perspective of Trichoderma viride: Is It One or Two Species?* 2418–2428: Appl Environ Microbiol.
- Lerch, G. (1977). *La experimentación agrícola en las ciencias Biológicas y agrícolas*. La Habana- Cuba: Científico Técnico.

- Lilly, V., & Barnett, H. (1951). *Physiology of the fungi*. New York: McGraw-Hill.
- MAE, M. d. (2013). *Modelo Bioclimático para la representación cartográfica del Ecosistema del Ecuador Continental*. Quito: Subsecretaría de Patrimonio Cultural.
- Marqués, C. (2015). *El cacao en el mundo*. Obtenido de <http://www.confiteriamarques.com/index.php/m,38/el-cultivo-del-cacao-en-el-mundo>
- Meinhardt, L., Rincones, J., Bailey, B., Ainme, C., Griffith, G., Zhang, D., & Pereira, G. (2008). Moniliophthora perniciosa, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? *Molecular Plant Pathology*, 577-588.
- Mfegue, V., Herail, C., Adreit, H., Mbenoun, M., Techou, Z., Ten, M., . . . Ducamp, M. (2012). Microsatellite markers for population studies of Phytophthora megakarya (Pythiaceae), a cacao pathogen in Africa. *Am. J. Bot.*
- Nacimiento, R., Stecca, A., & Nevez, V. (2014). Metabolic diversity of Trichoderma. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, 363-375.
- Najar, T., & Thomas, S. (2001). El efecto de los microorganismos eficaces en la supresión del hongo Moniliophthora roreri bajo condición de campo y laboratorio con inoculación artificial. 60.
- Navarro, M., & Mendoza, I. (2009). Cultivo del cacao en sistemas agroforestales. . *Guía técnica para promotores.*, 70.
- Oliveira, M., & Luz, E. (2005). Doenças do cacauteiro (Theobroma cacao). *Manual de Fitopatología*, 132.
- Olivera-Costa, V., & Rodríguez, D. (2014). *Evaluación del crecimiento, sanidad y resistencia a heladas de tres híbridos de Eucalyptus grandis con aplicación de bioestimulantes, Trichoderma harzianum (Trichosoil®) y quitosano*

(*Biorend®*), en plantación. Monte Video-Uruguay: Tesis para aspirar al título de Ingeniería Agronómica.

Ordoñez, L., Gavilanez, C., & Salazar, A. (2011). *Secuestro de Carbono de Biomasa Aérea en Sistemas Agroforestales de Cacao y Café ubicados en la Reserva de Biosfera Sumaco*. Quito, Ecuador: Programa GTZ-GESOREN.

Osorio, J. (2010). *Estudio del efecto de Trichoderma harzianum en el control de Moniliophthora roreri en plantas de Theobroma cacao en la provincia de Esmeraldas*. . Quito-Ecuador: Tesis para aspirar al título de Ingeniero agroindustrial. Escuela Politécnica Nacional.

Párraga, J., & Zambrano, J. (2012). *Capacidad antagónica de Trichoderma spp., a nivel in vitro frente a los hongos fitopatógenos Crinipellis pernicioso y Moniliophthora roreri*. Manabí-Ecuador: Tesis para aspirar al título de Ingeniero Agrícola. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí.

Peralvo, D., & Saavedra, L. (2006). *Validación de biopreparados en base a bacterias epifitas para el control de la moniliasis en Cacao fino de aroma en el cantón Valencia de la provincia de los Ríos*. Escuela Superior Politecnica del Ejercito. Santo Domingo: Tesis para aspirar al título de Ingeniería Agropecuaria.

Pérez, S. (2013). *Kallari historia de un grupo de artesanos y agricultores emprendedores y patriotas de la provincia de Napo, Ecuador*. Quito, Ecuador: Estudio de caso.

Phillips-Mora, W. (2006). Cincuenta años de la presencia de Moniliasis de cacao en Centro América: Cronología de su impacto y su dispersión desde Panamá hasta México. *In International Cocoa Research Conference*, 1038-1047.

Phillips-Mora, W., & Wilkinson, M. (2007). *Frosty pod of cacao: A disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage*. Symposium Cacao Diseases: Important threats to chocolate Production Worldwide. Phytopathology.

- Porras, V., & Sánchez, J. (1991). Enfermedades del cacao. *Fundación Hondureña de la Investigación Agrícola*, 5, 14.
- PROECUADOR. (2013). *Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones*.
Obtenido de http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/08/PROEC_AS2013_CACAO.pdf
- Punja, Z., & Grogan, R. (1983). *Hyphal interactions and antagonism among isolates and single basidiospores strains of Athelia (Sclerotium rolfsii)*. *Phytopathology*.
- Püntener, W. (1981). *Manual for field trials in plant protection* (Second ed.). Cuba: Ciba-Geigy Limited.
- Ramírez, S. (2008). *La monillasis es un desafío para lograr la sostenibilidad del sistema de cacao México*. Tecnología en Marcha.
- Reyes, R., Martínez, B., & Infante, D. (2008). *Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de Trichoderma spp. sobre Rhizoctonia sp.* . 112-117: *Rev. Protección Veg.* .
- Rifai, M. (1969). *A revision of the genus Trichoderma*. Surrey-England: Commonwealth Mycological Institute.
- Robles, B. (2008). *Validación de biopesticidas en base a bacterias epífitas para el control de la moniliasis (Moniliophthora roreri Cif y Par. Evans et al.) en el cultivo de cacao híbrido ccn 51 en Santo Domingo, provincia Santo Domingo de los Tsáchilas*. Sangolquí-Ecuador : Tesis para aspirar al título de Ingeniero Agropecuario. Escuela Superior Politécnica del Ejército.
- Romero, G., Olivera Costa, V., & Rodríguez, D. (2015). *Trichoderma harzianum como agente de control biológico*. Universidad de la República de Monte Video.

- Romero-Arenas, O., Huerta, M., Damián, M., Domínguez, F., & Arellano, D. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Biotecnología*, 143-151.
- Samaniego, J., Ulioa, A., & Herrera, T. (1989). *Hongos del suelo antagónicos de Phymatorichum omnivorum*. Fitopatología Mexicana.
- Sánchez, C. (2010). *EL CHOCOLATE AMARGO EN LA COCINA CUENCANA ACTUAL, NUEVAS RECETAS*. Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/1550/1/tgas5.pdf>
- Schmitz, W. (1985). Studies in the Atlantic coast of Costa Rica on the epidemiology of the fungus *Moniliophthora roreri* Evans et al in cacao (*Theobroma cacao* L.) .
- Solis, K. (1999). *Determinación de organismos antagónicos a Monilia roreri a partir de mazorcas de cacao dejadas en el suelo*. . Guayaquil-Ecuador: Tesis para la aspirar al título de Ingeniero Agrónomo.
- Suárez, C. (1993). *Enfermedades del cacao y su control* (Segunda ed.). Quevedo, Ecuador: Manual del cultivo de Cacao.
- Suárez, L. (2006). *Aislamiento e identificación de M. roreri causante de la monilla en municipios de nororiente Colombiano y ensayos preliminares para su control biológico*. Revista Respuestas. Universidad Francisco de Paula Santander.
- Suarez, L., & Rangel, A. (2014). Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Acta Agronomica*, 370-378.
- Uquillas, L. (2004). Inducción de la germinación para mejorar la eficiencia de dos agentes antagónicos para el control de la *Monilia* (*Crinipellis roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*). *Tesis para aspirar al título de Magister Scientiae*, 153.

- Vásquez, D., Montes , R., Pérez, A., & Flores , H. (2014). *Aceites esenciales y extractos acuosos para el manejo in vitro de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici y F. solani.*
- Villamil, J., Blanco, J., & Rosero, S. (2012). *Evaluación in vitro de Microorganismos Nativos por su Antagonismo contra Moniliphthora roreri Cif & Par en Cacao (Theobroma cacao L.).* Revista Facultad Nacional de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia.
- 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.* Medellín. : Rev.Fac.Nal.Agr. .
- Villavicencio, M. (2010). *Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de Moniliophthora roreri aislados de cinco Provincias de la Costa Ecuatoriana.* . Guayaquil, Ecuador : Tesis para aspirar al título de Ingeniería Agrícola y Biológica. .
- Waquelin, S., Sivasithamparam, K., Cole , A. J., & Skipp, R. A. (1999). Saprotic growth in soil of strain of Trichoderma koningii. *New Zealand Journal Agricultural Research* , 337-345.

