



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**TEMA: “EFECTO DE DIFERENTES COADYUVANTES EN EL
ESTABLECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE TRICHODERMA
(*Trichoderma sp.*) SOBRE MAZORCAS DE CACAO, PARA EL CONTROL
BIOLÓGICO DE LA MONILIASIS (*Moniliophthora roreri*)”**

AUTORES: ECHEVERRÍA TAPIA JORGE AURELIO

CAMPOS JUCA VIVIANA GABRIELA

DIRECTOR: Ing. M.Sc. LANDÁZURI ABARCA PABLO ANÍBAL

SANGOLQUÍ

2018



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación *“EFECTO DE DIFERENTES COADYUVANTES EN EL ESTABLECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE TRICHODERMA (Trichoderma sp.) SOBRE MAZORCAS DE CACAO, PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA MONILIASIS (Moniliophthora roreri)”* fue realizado por los señores *Echeverría Tapia Jorge Aurelio* y *Campos Juca Viviana Gabriela*, 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 las Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a los señores para que lo sustenten públicamente.

Sangolquí, 28 de febrero del 2018


.....
Ing. M.Sc. Landázuri Abarca Pablo Aníbal
DIRECTOR DE TESIS

C.C: 1708262348



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Nosotros, *Echeverría Tapia Jorge Aurelio* y *Campos Juca Viviana Gabriela*, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: ***“EFECTO DE DIFERENTES COADYUVANTES EN EL ESTABLECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE TRICHODERMA (Trichoderma sp.) SOBRE MAZORCAS DE CACAO, PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA MONILIASIS (Moniliophthora roreri)”*** es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 28 de febrero del 2018

.....
Echeverría Tapia Jorge Aurelio

C.C:1723216188

.....
Campos Juca Viviana Gabriela

C.C: 1719653931



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN

Nosotros, *Echeverría Tapia Jorge Aurelio* y *Campos Juca Viviana Gabriela*, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: ***“EFECTO DE DIFERENTES COADYUVANTES EN EL ESTABLECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE TRICHODERMA (Trichoderma sp.) SOBRE MAZORCAS DE CACAO, PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA MONILIASIS (Moniliophthora roreri)”*** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

Sangolquí, 28 de febrero del 2018

.....
Echeverría Tapia Jorge Aurelio

C.C:1723216188

.....
Campos Juca Viviana Gabriela

C.C: 1719653931

DEDICATORIA

A mi padre Jorge, por el enorme apoyo brindado, por el valioso ejemplo de constancia y esfuerzo ante las adversidades. A mi madre Barbarita, por su gran sacrificio y abnegación, sin cuyo amor y apoyo incondicional me hubiera sido imposible alcanzar este objetivo.

A mis hermanos Cristina, Daniel, Renán, compañeros de la vida, por haber estado a mi lado en todo momento.

A mis abuelitas Nieves y Aída, por el gran apoyo y colaboración brindada para culminar mi vida estudiantil.

Con gratitud a mis profesores, Ing. Marcelo Arce, Ing. Ramiro León, Ing. Hoel Constante, Ing. Norman Soria, a quienes debo mi vocación por la agronomía.

A un gran amigo ausente Foxi.

A Viviana mi gran amor, junto a quien hemos conseguido este gran objetivo.

Jorge Aurelio Echeverría Tapia

Dedico este trabajo con gran agradecimiento a mis padres, a mi padre Alfonso por todos los sacrificios que tuvo que realizar para que yo pueda culminar mi vida estudiantil, a mi madre Edita por haberme apoyado en los momentos difíciles, a su comprensión brindada durante todo este tiempo.

A mis hermanos Pedro y Diego, por su ejemplo, quienes me han enseñado que con esfuerzo y dedicación se encuentra el éxito profesional.

A mis compañeros fieles Pinky y Junior, los cuales me acompañaron en los momentos más difíciles, nunca me olvidare de ustedes.

A Jorge, por la ayuda brindada todo este tiempo, la cual ha sido sumamente importante para poder culminar este proyecto, me ayudaste hasta donde era posible, incluso mucho más que eso, te lo agradezco muchísimo amor.

Viviana Gabriela Campos Juca

AGRADECIMIENTOS

Al Sr. José Sarango, propietario de la Finca San José, por habernos permitido realizar este trabajo de investigación en su propiedad, y por toda la colaboración brindada.

A nuestro Director de Tesis, Ing. Pablo Landázuri, por habernos brindado sus conocimientos, apoyo y sobre todo su infinita paciencia, que fueron de vital importancia para poder culminar satisfactoriamente este proyecto.

A la Universidad de las Fuerzas ESPE, IASA I, a su personal administrativo, de servicios y en especial a su cuerpo docente, por todos los conocimientos y destrezas adquiridos en este nuestro segundo hogar.

*Un reconocimiento y especial agradecimiento a los señores docentes **Dr. César Falconí, Dr. Jaffer Gutti, Ing. Pablo Landázuri**, así como también al señor laboratorista **Lic. Marco Taco** por su valioso apoyo y colaboración técnica en el desarrollo de la presente investigación.*

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA

| | |
|------------------------------------|-------|
| CERTIFICADO DEL DIRECTOR..... | i |
| AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD..... | ii |
| AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN..... | iii |
| DEDICATORIA..... | iv |
| AGRADECIMIENTOS..... | v |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS..... | vi |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | xiv |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xvi |
| RESUMEN..... | xvii |
| ABSTRACT..... | xviii |

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

| | | |
|-------|----------------------------------|---|
| 1.1 | Planteamiento del problema..... | 1 |
| 1.2 | Antecedentes..... | 2 |
| 1.3 | Justificación e Importancia..... | 4 |
| 1.4 | Objetivos..... | 5 |
| 1.4.1 | Objetivo General..... | 5 |
| 1.4.2 | Objetivos Específicos..... | 5 |

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

| | | |
|----------|---|----|
| 2.1 | Fundamentación teórica..... | 6 |
| 2.1.1 | El cultivo de cacao | 6 |
| 2.1.1.1 | Generalidades del cultivo de Cacao | 6 |
| 2.1.1.2 | Datos botánicos del cultivo | 6 |
| 2.1.1.3 | Humedad relativa en el cultivo de cacao..... | 8 |
| 2.1.1.4 | Labores Culturales en el Cultivo de Cacao | 8 |
| 2.1.1.5 | Enfermedades del Cultivo de Cacao | 9 |
| 2.1.2 | Moniliasis del cacao..... | 9 |
| 2.1.2.1 | Importancia Económica..... | 10 |
| 2.1.2.2 | Origen y Distribución Geográfica | 10 |
| 2.1.2.3 | Agente Causal | 11 |
| 2.1.2.4 | Taxonomía..... | 11 |
| 2.1.2.5 | Características morfológicas | 11 |
| 2.1.2.6 | Ciclo de vida..... | 12 |
| 2.1.2.7 | Síntomas | 13 |
| 2.1.2.8 | Epidemiología | 14 |
| 2.1.2.9 | Control de Monilia | 14 |
| 2.1.2.10 | Control cultural | 14 |

| | |
|--|----|
| 2.1.2.11 Control químico..... | 15 |
| 2.1.3 <i>Trichoderma sp.</i> | 15 |
| 2.1.3.1 Taxonomía..... | 16 |
| 2.1.3.2 Características Morfológicas..... | 16 |
| 2.1.3.3 Ciclo de Vida..... | 17 |
| 2.1.3.4 Mecanismos de Control Biológico..... | 17 |
| 2.1.4 Control biológico..... | 20 |
| 2.1.4.1 Control Biológico de Monilia con <i>Trichoderma</i> | 21 |
| 2.1.5 Epidemiología cuantitativa (patometría)..... | 21 |
| 2.1.5.1 Epidemiología..... | 21 |
| 2.1.5.2 Epidemia..... | 21 |
| 2.1.5.3 Patometría..... | 22 |
| 2.1.5.4 Cuantificación de epidemias..... | 22 |
| 2.1.5.5 Área bajo de la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE)..... | 23 |
| 2.1.6 Coadyuvantes para aspersiones agrícolas..... | 24 |
| 2.1.6.1 SPRAY AIDE (Surfactante)..... | 25 |
| 2.1.6.2 ECUAFIX (Adherente)..... | 25 |
| 2.1.6.3 COSMO OIL (Aceite mineral agrícola)..... | 25 |
| 2.1.7 Coadyuvantes para aspersiones agrícolas con microorganismos..... | 25 |

| | | |
|-----|----------------------------|----|
| 2.2 | Fundamentación legal | 26 |
| 2.3 | Hipótesis | 27 |

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

| | | |
|---------|---|----|
| 3.1 | Fase de Laboratorio..... | 28 |
| 3.1.1 | Aislamiento del hongo fitopatógeno <i>Moniliophthora roreri</i> | 29 |
| 3.1.1.1 | Identificación macroscópica de las colonias. | 29 |
| 3.1.1.2 | Purificación de aislamientos..... | 29 |
| 3.1.1.3 | Identificación microscópica de aislamientos..... | 30 |
| 3.1.1.4 | Obtención de cultivos monospóricos del patógeno..... | 30 |
| 3.1.2 | Aislamiento de <i>Trichoderma sp.</i> de suelos cacaoteros, para su utilización en pruebas de antagonismo frente a <i>Moniliophthora roreri</i> | 31 |
| 3.1.2.1 | Recolección de muestras de suelo..... | 31 |
| 3.1.2.2 | Aislamiento de <i>Trichoderma sp.</i> | 31 |
| 3.1.2.3 | Identificación macroscópica de las colonias. | 31 |
| 3.1.2.4 | Purificación de aislamientos de <i>Trichoderma sp.</i> | 31 |
| 3.1.2.5 | Identificación microscópica de <i>Trichoderma sp.</i> | 32 |
| 3.1.2.6 | Obtención de cultivos monospóricos de <i>Trichoderma sp.</i> | 32 |
| 3.1.3 | Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> entre el controlador biológico <i>Trichoderma sp.</i> y el hongo fitopatógeno <i>Moniliophthora roreri</i> | 32 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.1.3.1 | Variables medidas | 32 |
| 3.1.3.2 | Factores del experimento | 33 |
| 3.1.3.3 | Tratamientos..... | 33 |
| 3.1.3.4 | Diseño y Unidad experimental..... | 33 |
| 3.1.3.5 | Procedimiento experimental..... | 33 |
| 3.1.3.6 | Recolección de datos..... | 33 |
| 3.1.3.7 | Análisis estadístico y Técnicas de comprobación de hipótesis..... | 33 |
| 3.1.4 | Pruebas <i>in vitro</i> de compatibilidad entre el controlador biológico <i>Trichoderma sp.</i> y diferentes coadyuvantes comerciales para aplicaciones agrícolas..... | 34 |
| 3.1.4.1 | Variables medidas | 34 |
| 3.1.4.2 | Factores del experimento | 34 |
| 3.1.4.3 | Tratamientos a comparar..... | 35 |
| 3.1.4.4 | Diseño y Unidad experimental..... | 35 |
| 3.1.4.5 | Procedimiento experimental..... | 35 |
| 3.1.4.6 | Recolección de datos..... | 35 |
| 3.1.4.7 | Análisis estadístico y Técnicas de comprobación de hipótesis..... | 35 |
| 3.2 | Fase de Campo..... | 36 |
| 3.2.1 | Variables medidas | 36 |
| 3.2.2 | Ubicación del lugar de la investigación..... | 37 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.2.2.1 | Ubicación política | 37 |
| 3.2.2.2 | Ubicación Geográfica..... | 38 |
| 3.2.2.3 | Ubicación Ecológica | 38 |
| 3.2.3 | Diseño experimental..... | 38 |
| 3.2.4 | Descripción de los componentes del experimento | 38 |
| 3.2.5 | Tratamientos a comparar | 39 |
| 3.2.6 | Descripción de los tratamientos..... | 39 |
| 3.2.7 | Tipo de Diseño Experimental | 40 |
| 3.2.8 | Repeticiones o Bloques..... | 40 |
| 3.2.9 | Características de las Unidades Experimentales | 40 |
| 3.2.10 | Croquis del diseño experimental | 40 |
| 3.2.11 | Procedimiento experimental | 41 |
| 3.3 | Análisis estadístico | 41 |
| 3.3.1 | Esquema de análisis de la varianza | 41 |
| 3.3.1.1 | Fase de laboratorio | 41 |
| 3.3.1.2 | Fase de campo | 42 |
| 3.3.2 | Desviación estándar | 42 |
| 3.3.3 | Regresiones y correlaciones | 42 |
| 3.3.4 | Técnicas de comprobación de hipótesis | 43 |

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

| | | |
|---------|--|----|
| 4.1 | Fase de Laboratorio..... | 44 |
| 4.1.1 | Aislamiento del hongo fitopatógeno <i>Moniliophthora roreri</i> | 44 |
| 4.1.2 | Aislamiento de <i>Trichoderma sp.</i> de suelos cacaoteros..... | 45 |
| 4.1.3 | Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> entre el controlador biológico <i>Trichoderma sp.</i> y el hongo fitopatógeno <i>Moniliophthora roreri</i> | 47 |
| 4.1.4 | Pruebas <i>in vitro</i> de compatibilidad entre el controlador biológico <i>Trichoderma sp.</i> y diferentes coadyuvantes comerciales para aplicaciones agrícolas | 49 |
| 4.2 | Fase de Campo..... | 51 |
| 4.2.1 | Incidencia de monilia sobre mazorcas asignadas con los diferentes tratamientos..... | 51 |
| 4.2.1.1 | Incidencia de monilia en mazorcas menores a un mes..... | 53 |
| 4.2.1.2 | Incidencia de monilia en mazorcas de uno a tres meses | 54 |
| 4.2.1.3 | Incidencia de monilia en mazorcas mayores a tres meses | 54 |
| 4.2.1.4 | Incidencia total de monilia en mazorcas | 55 |
| 4.2.2 | Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE)..... | 57 |
| 4.2.3 | Establecimiento y Supervivencia de <i>Trichoderma sp.</i> sobre mazorcas de cacao | 57 |
| 4.2.3.1 | Establecimiento de <i>Trichoderma sp.</i> sobre mazorcas de cacao | 59 |
| 4.2.3.2 | Supervivencia de <i>Trichoderma sp.</i> sobre mazorcas de cacao..... | 60 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.2.4 | Análisis de correlación de Pearson entre las variables evaluadas..... | 62 |
|-------|---|----|

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

| | | |
|-----|----------------------|----|
| 5.1 | Conclusiones | 63 |
| 5.2 | Recomendaciones..... | 64 |
| 5.3 | Bibliografía..... | 65 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabla 1 | <i>Tratamientos para pruebas de compatibilidad in vitro</i> | 35 |
| Tabla 2 | <i>Tratamientos a comparar para la fase de campo</i> | 39 |
| Tabla 3 | <i>Análisis de la varianza para pruebas de antagonismo in vitro</i> | 41 |
| Tabla 4 | <i>Análisis de la varianza de pruebas de compatibilidad in vitro</i> | 42 |
| Tabla 5 | <i>Posibilidad de aislamiento de Trichoderma sp. de suelos cacaoteros</i> | 46 |
| Tabla 6 | <i>ANAVA y Prueba de Tukey al 5% para el crecimiento radial de Moniliophthora roreri bajo la influencia de Trichoderma sp.</i> | 48 |
| Tabla 7 | <i>Análisis estadístico de la antibiosis de Trichoderma sp. sobre Moniliophthora roreri</i> | 48 |
| Tabla 8 | <i>Modelos de regresión lineal y parámetros de validación obtenidos para el crecimiento radial de M. roreri bajo la influencia de Trichoderma</i> | 49 |
| Tabla 9 | <i>ANAVA y Prueba de Tukey al 5% para el crecimiento radial de Trichoderma sp. sobre medio PDA adicionado con los diferentes coadyuvantes</i> | 50 |
| Tabla 10 | <i>ANAVA no paramétrico (Kruskall Wallis) al 5% para el nivel de esporulación de Trichoderma sp. sobre medio PDA adicionado con los diferentes coadyuvantes</i> | 50 |
| Tabla 11 | <i>ANAVA no paramétrico (Kruskall Wallis) al 5% para la incidencia de monilia en mazorcas de diferentes edades bajo los diferentes tratamientos</i> | 52 |
| Tabla 12 | <i>ANAVA no paramétrico (Kruskall Wallis) al 5% para el promedio total de incidencia de monilia en mazorcas bajo los diferentes tratamientos</i> | 53 |
| Tabla 13 | <i>ANAVA no paramétrico (Kruskall Wallis) al 5% para el área bajo la curva del progreso de la enfermedad para los diferentes tratamientos</i> | 57 |

| | |
|---|----|
| Tabla 14 ANAVA no paramétrico (Kruskall Wallis) al 5% para el porcentaje de establecimiento y supervivencia de <i>Trichoderma sp.</i> sobre mazorcas de cacao bajo los diferentes tratamientos | 58 |
| Tabla 15 Análisis de correlación de Pearson al 5% entre el Porcentaje de establecimiento de <i>Trichoderma sp.</i> , Incidencia de monilia y Supervivencia de <i>Trichoderma sp.</i> sobre mazorcas de cacao | 62 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1 | Fruto de cacao..... | 7 |
| Figura 2 | Cualificación del nivel de esporulación..... | 34 |
| Figura 3 | Croquis del diseño experimental | 40 |
| Figura 4 | Resultados del aislamiento del hongo fitopatógeno <i>Moniliophthora roreri</i> | 44 |
| Figura 5 | Micoflora presente en mazorcas de cacao | 45 |
| Figura 6 | Resultados del aislamiento de <i>Trichoderma sp.</i> de suelos cacaoteros..... | 47 |
| Figura 7 | Crecimiento radial de <i>M. roreri</i> bajo la influencia de <i>Trichoderma sp.</i> con respecto al tiempo. | 49 |
| Figura 8 | Incidencia total de monilia en función del tiempo para los diferentes tratamientos | 56 |
| Figura 9 | Establecimiento de <i>Trichoderma sp.</i> sobre mazorcas de cacao en función del tiempo..... | 60 |
| Figura 10 | Supervivencia de <i>Trichoderma sp.</i> (crecimiento radial a 7 días de incubación) sobre mazorcas de cacao en función del tiempo | 61 |

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de distintos coadyuvantes comerciales sobre el establecimiento y supervivencia de *Trichoderma sp.* para el control biológico de la moniliasis del cacao, puesto que la moniliasis produce grandes pérdidas en la cosecha que pueden llegar hasta el 80%. Se obtuvieron cultivos puros de *Moniliophthora roreri* y *Trichoderma sp.*, a partir de mazorcas infectadas por el patógeno y muestras de suelo respectivamente. Mediante pruebas duales *in vitro*, se determinó un antagonismo efectivo de *Trichoderma sp.* sobre *Moniliophthora roreri*. Se realizaron además pruebas de compatibilidad *in vitro* entre *Trichoderma sp.*, y los coadyuvantes comerciales Ecuafix®, Sprayaide® y COSMO OIL®, determinándose que ninguno de los coadyuvantes influyó significativamente sobre el desarrollo de *Trichoderma sp.* Para la fase de campo se empleó un Diseño Completamente Aleatorizado con cuatro repeticiones, sobre los arboles escogidos se hicieron aplicaciones cada 15 días de los seis tratamientos a evaluar durante tres meses. Se evaluó la incidencia de *Moniliophthora roreri*, el área bajo la curva del progreso de la enfermedad, además del establecimiento y supervivencia de *Trichoderma sp.* sobre mazorcas de cacao, los mejores resultados se obtuvieron al aplicar una suspensión de *Trichoderma sp.* (1×10^8 esporas.ml⁻¹) adicionada con aceite agrícola COSMO OIL® (10 ml.l⁻¹).

Palabras clave:

- **MONILIOPHTHORA RORERI**
- **TRICHODERMA SP.**
- **COADYUVANTES**
- **CONTROL BIOLÓGICO**
- **ÁREA BAJO LA CURVA DEL PROGRESO DE LA ENFERMEDAD (ABCPE)**

ABSTRACT

The objective of the present research was to evaluate the effect of different commercial adjuvants in the establishment and survival of *Trichoderma sp.* for the biological control of the moniliasis of cocoa, since moniliasis produces large losses in the harvest that can reach up to 80%. Pure cultures of *Moniliophthora roreri* and *Trichoderma sp.* Was isolated from cocoa cobs affected with the pathogen and soil samples respectively, were obtained by means of in vitro dual tests, an effective antagonism of *Trichoderma sp.* about *Moniliophthora roreri*. In vitro compatibility tests were also carried out between *Trichoderma sp.* and the adjuvants Ecuafix®, Sprayaide® and COSMO OIL®, determining that none of the adjuvants significantly influences the development of *Trichoderma sp.* For the field phase a design was used completely randomized with four repetitions, on the chosen trees, applications were made every 15 days of the six treatments to be evaluated during three months. The incidence of *Moniliophthora roreri*, area under the curve of disease progression (ABCPE), as well as the establishment and survival of *Trichoderma sp.* on cocoa cobs, the best results were obtained when applying a suspension of *Trichoderma sp.* (1×10^8 spores.ml⁻¹) added with COSMO OIL® agricultural oil (10 ml.l⁻¹).

Key words:

- **MONILIOPHTHORA RORERI**
- **TRICHODERMA SP.**
- **COADJUVANTS**
- **BIOLOGICAL CONTROL**
- **AREA UNDER THE CURVE OF THE PROGRESS OF THE DISEASE (ABCPE)**

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento del problema

La moniliasis se presenta en casi todas las regiones donde se desarrolla el cultivo de cacao, causando daños y pérdidas a los productores (hasta el 80% de la cosecha). La dificultad para controlar la enfermedad antes mencionada, principalmente en la estación lluviosa, radica en los altos niveles de pluviosidad y humedad en las zonas donde se desarrolla el cultivo.

De manera tradicional se ha venido realizando el control y prevención de estas enfermedades mediante el uso de fungicidas a base de cobre en combinación con la implementación de diferentes labores culturales, sin embargo, los tratamientos de carácter químico no han constituido una alternativa sustentable y mucho menos sostenible, dado que su acción es limitada, su costo elevado y la toxicidad asociada a estos afecta al productor, al consumidor final y al medio ambiente (PROECUADOR, 2013).

A fin de encontrar un mecanismo eficiente de control biológico se han realizado numerosos estudios que identifican al género *Trichoderma* como uno de los principales antagonistas de los patógenos antes descritos, sin embargo, al realizarse las respectivas pruebas en campo, los resultados, en la mayoría de casos, son diferentes a los obtenidos en pruebas *in vitro*, lo cual se debe a la diferencia de condiciones de manejo ambiental, utilización de cepas de regiones distintas al cultivo y, principalmente, la dificultad para lograr establecerse y desarrollarse exitosamente sobre la planta y mazorcas (Solis y Suárez, 2006).

1.2 Antecedentes

En el Ecuador existen 521.091 hectáreas sembradas de cacao, de las cuales 439.618 hectáreas se encuentran en edad productiva, con una producción promedio de 200- 300 kg/ha/año. Es así que en el 2011 se registró un volumen de exportación de 205.000 toneladas métricas, y al finalizar el 2015 de 260.000 toneladas métricas (ANECACAO, 2016).

Nuestro país abarca más del 70% de la producción mundial de cacao fino de aroma lo que lo posiciona como uno de los mayores productores del mundo (AMERICA ECONOMÍA, 2016). Ecuador finalizó el 2014 entre los cinco mayores productores de cacao a nivel mundial. Su producción alcanzó las 240000 toneladas métricas, de las cuales 230000 fueron destinadas al mercado de exportación (PROEcuador, 2013).

En el Ecuador el cultivo es desarrollado en su mayoría por pequeños y medianos agricultores, quienes son de bajos recursos económicos y no poseen un servicio de transferencia de tecnología adecuado, por lo que los rendimientos obtenidos son muy inferiores al promedio nacional de 300 kg/ha (ANECACAO, 2016). Las principales causas que afectan el rendimiento de este cultivo son, entre otras, la presencia de enfermedades, siendo las principales la moniliasis, mazorca negra y escoba de bruja. La moniliasis del cacao causada por el hongo *Moniliophthora roreri*, es considerada la principal enfermedad del cultivo por las pérdidas que ocasiona, mismas que pueden ascender a un 80% de la producción (Enríquez, 2004 citado por Falconí y Yáñez, 2007).

El control biológico de enfermedades agrícolas, su uso y la potenciación de microorganismos ha adquirido mucha importancia, a nivel mundial, principalmente debido a que se ha identificado un grupo importante de hongos y bacterias que actúan como antagonistas de patógenos vegetales (Bravo, 1981; citado por Falconí y Yáñez, 2007). La búsqueda de alternativas, mediante selección y reintroducción de microorganismos antagónicos a *Moniliophthora roreri*, constituye

una atractiva solución presentando riesgos menores que los derivados por fungicidas, reduciendo la capacidad del patógeno para producir inóculo (Solís, 1999; Hebbar et al., 1999; Samuels et al., 2000; Suárez y Solis, 2003; Fokkema, 1995; citados por Solis y Suárez, 2006).

Según evidencias científicas presentadas en las últimas dos décadas con el objeto de resolver la problemática de la moniliasis y otras enfermedades del cacao, las tendencias apuntan al uso del control biológico microbiano con hongos y bacterias epifitos aislados de mazorcas de cacao sanas provenientes de localidades con alta incidencia de enfermedades y bajo manejo de agroquímicos (Falconí et al, 2004; Thévenin y Trocmé, 1996, citados por Falconí y Yáñez, 2007).

En ese contexto, en la Universidad de las Fuerzas Armadas se han realizado algunos trabajos de investigación para el control de la moniliasis utilizando bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, obteniéndose buenos resultados en cuanto al aumento de la producción. Siguiendo la línea del control biológico, el género *Trichoderma* es un grupo de hongos ampliamente utilizado debido a su efecto antagónico contra un amplio rango de hongos fitopatógenos (Bastos, 1998; citado por Osorio, 2010). En cacao, el empleo de *Trichoderma* como antagonista ha mostrado buenos resultados en el control de hongos fitopatógenos, en ensayos preliminares en Ecuador, Colombia, Perú y Costa Rica, los resultados reportan la reducción de la esporulación del patógeno sobre las mazorcas (Peñaherrera, 2013).

Estudios realizados en Camerún por Tondje *et al.* (2007), indican que al tratar las mazorcas con suspensiones de *Trichoderma asperellum*, se reduce ligeramente la incidencia de monilia al comparar con el tratamiento testigo, sin embargo no superó los resultados del tratamiento químico ni mejoró significativamente la producción.

Respecto al uso de *Trichoderma* en nuestro país las experiencias son prometedoras por el eficiente efecto de cepas importadas y nativas de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma*

koningui para el control de enfermedades en distintos cultivos (Enríquez, 2004; Suárez y Solís, 2003; Yáñez, 2003; citados por Falconí y Yáñez, 2007). Solís y Suarez (2006), realizaron un estudio referente al control de *M. royeri* utilizando especies del género *Trichoderma* (*T. koningiopsis* y *T. stromaticum*), los autores reportan el aumento entre el 16 y 20% de la producción de mazorcas sanas. Por lo que resulta necesario profundizar en estudios del efecto en condiciones de campo de diferentes cepas y métodos de aplicación de *Trichoderma* para el control biológico de la moniliasis del cacao.

1.3 Justificación e Importancia

Dada la importancia de la producción cacaotera sobre la economía del Ecuador, así como la importante posición del país sobre las exportaciones a nivel mundial, es evidente que el cultivo de cacao constituye una excelente alternativa de producción agrícola en diferentes puntos del territorio nacional. En contraste, la producción del cultivo de cacao se ve limitada principalmente por enfermedades de tipo fúngico como son la moniliasis, mazorca negra y escoba de bruja, mismas que han ocasionado pérdidas hasta el 80% de las cosechas (ANECACAO, 2016).

En este sentido, el mercado mundial presenta una tendencia creciente a la aceptación de productos agrícolas de origen orgánico, es decir, cuya metodología de producción, entre otras prácticas, no contemple la utilización de agroquímicos (Falconí & Yáñez, 2007). En este sentido, se han realizado numerosos estudios para evaluar distintos microorganismos antagonistas de *M. royeri*, obteniéndose buenos resultados sobre la sanidad del cultivo, sin embargo existen algunos estudios en diferentes áreas que plantean la posibilidad de mejorar el efecto antagonista de los controladores biológicos mediante la utilización de diferentes coadyuvantes en el momento de la aplicación en campo de los microorganismos (Buitrón, 2002).

En ese sentido, se han realizado algunos estudios orientados a incrementar los niveles de

establecimiento y supervivencia de microorganismos (principalmente bacterias) sobre diferentes cultivos (Buitrón, 2002; Chiriboga, 2003), sin embargo no existe mayor información acerca del efecto de coadyuvantes de origen químico sobre la capacidad biocontroladora de *Trichoderma*, específicamente para el combate de la moniliasis del cacao.

En virtud de lo expuesto anteriormente, es necesario determinar el efecto, en condiciones de campo, de la utilización de coadyuvantes, orientado a incrementar los niveles de establecimiento y supervivencia del controlador biológico *Trichoderma sp.*, a fin de ejercer un control sobre el hongo fitopatógeno *M. roleri*.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de diferentes coadyuvantes en el establecimiento y supervivencia de *Trichoderma (Trichoderma sp.)* sobre mazorcas de cacao, para control biológico de la moniliasis (*Moniliophthora roleri*).

1.4.2 Objetivos Específicos

- Determinar el nivel de antagonismo *in vitro* entre el controlador biológico *Trichoderma sp.* y el hongo fitopatógeno *Moniliophthora roleri*.
- Determinar la compatibilidad del controlador biológico *Trichoderma sp.* con diferentes coadyuvantes comerciales para aspersiones agrícolas.
- Evaluar el efecto, en condiciones de campo, de diferentes coadyuvantes sobre el establecimiento y supervivencia de *Trichoderma sp.* sobre mazorcas de cacao.
- Evaluar el efecto, en condiciones de campo, de diferentes coadyuvantes sobre la capacidad antagonista de *Trichoderma sp.* frente al hongo fitopatógeno *Moniliophthora roleri*.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Fundamentación teórica

2.1.1 El cultivo de cacao

2.1.1.1 Generalidades del cultivo de Cacao

El cacao es originario de las zonas tropicales de América (cuencas del Amazonas y del Orinoco). Su manejo fue extensivo en Mesoamérica, y luego cultivado intensivamente por los mayas (México). Después de la llegada de los europeos a América, el cultivo del cacao se ha expandido al Caribe, Asia y África (Mendoza, 2013).

2.1.1.2 Datos botánicos del cultivo

- **Grupos genéticos**

El cacao se divide en cuatro variedades o grupos genéticos, Criollo, Trinitario, Forastero y Nacional (Osorio, 2010).

- **Morfología**

El árbol del cacao normalmente alcanza una altura entre 6 a 8 metros, con excepción del cacao Nacional y Forastero, los que en ocasiones alcanzan alturas hasta unos 12 metros. Sin embargo, bajo condiciones de cultivo y manejo alcanza una altura de 3 metros en promedio. La altura del árbol depende de factores ambientales que influyen en el crecimiento, es así que cultivado con alta luminosidad el tamaño es más reducido que con exceso de sombra (Batista, 2009).

Su producción inicia al tercer o cuarto año de edad, dependiendo del genotipo, así como de las condiciones ambientales y de manejo, teniendo una vida útil de 25 a 30 años (Osorio, 2010).

- **Ramas**

Según Torres (2012), el árbol de cacao presenta dos tipos de ramas, a) ramas verticales, ortotrópicas o chupones, y b) ramas laterales, plagiotrópicas u horquetas.

- **Fruto**

El fruto del cacao, conocido como mazorca, presenta tamaños que oscilan de 10 a 42 centímetros, de forma variable y de superficie lisa o rugosa (García, 2007). Se encuentra sostenido de un pedúnculo no muy largo y robusto (Enríquez, 2004). El epicarpio y el endocarpio son carnosos estando separados por un mesocarpio fino y leñoso (M & O Consulting , 2008). Los frutos presentan cinco lóculos y cada lóculo tiene dos partes formadas por dos lomos o un surco interno (Enríquez, 2004). En estado de madurez, los colores básicos del fruto son amarillo claro a rojo anaranjado, que corresponden respectivamente a los colores verde y morado en estado inmaduro (Suárez et al., 1993).

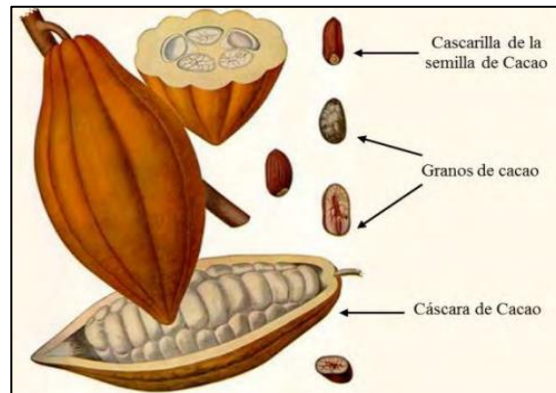


Figura 1 Fruto de cacao

Fuente: (Enríquez, 2004)

- **Semilla**

El número, tamaño y forma de las semillas dependerá de la variedad. Las semillas son de forma aplanada o redonda de 2 a 4 centímetros de longitud, están ubicadas en cinco hileras dentro

del fruto (Ártica, 2008 citado por Torres, 2012). La semilla o almendra de cacao está cubierta por una pulpa ácida, azucarada llamada mucílago, las semillas están unidas a un eje central llamado placenta (Suárez et al., 1993). Las sustancias orgánicas y minerales que integran los cotiledones constituyen el producto que, fermentado y secado adecuadamente, se comercializa para la elaboración del chocolate (Osorio, 2010).

2.1.1.3 Humedad relativa en el cultivo de cacao

Los niveles de humedad relativa superiores al 70% favorecen al establecimiento del cacao después del trasplante y una media, del 75% al 80% parece ser la humedad relativa más conveniente para el cultivo (Arévalo et al., 2004).

Osorio (2010), citando a Suárez (2007), señala que valores superiores al 85% de humedad relativa, combinados con abundante precipitación y altas temperaturas, estimulan la presencia de enfermedades fungosas como la moniliasis y mazorca negra, que disminuyen la producción de cacao en el Ecuador.

2.1.1.4 Labores Culturales en el Cultivo de Cacao

Se realiza el control de malezas con la finalidad de evitar no solamente la competencia por nutrientes, sino también de agua, espacio y luz. En esta labor se suele emplear el machete o la “moto guadaña” que permite el corte de malezas sin dañar las raíces de los cacaotales ya que estas se ubican superficialmente (Paredes, 2003).

También se realizan podas, inicialmente es importante realizar una poda de formación, la cual se realiza con el objetivo de obtener plantas de mayor fortaleza, haciendo que sus ramas tengan una distribución apropiada y una altura adecuada para el manejo (Ártica, 2008 citado por Torres, 2012). La poda se realiza luego de un año desde el trasplante, cuando la planta tiene de tres a seis ramas que forman el molinillo u horqueta. Se eliminan aquellas ramas con crecimiento horizontal

y al interior de la copa, se deja de tres a cuatro ramas vigorosas y adecuadamente ubicadas para que luego estas ramas construyan la estructura principal de la planta (Quiroz & Agama, 2006).

La poda de mantenimiento consiste en eliminar las ramas enfermas, rotas, colgantes y aquellos chupones que se encuentran mal ubicados en el árbol (Ártica, 2008 citado por Torres, 2012).

Finalmente, la poda fitosanitaria permite mantener a las plantas en buen estado de salud. Para lograr este objetivo, se debe eliminar partes del follaje y ramas que han sido afectados por escoba de bruja o insectos, también se elimina mazorcas infectadas con monilla y plantas parasitas que crezcan sobre la copa (Quiroz & Agama, 2006).

La labor final constituye la cosecha. Esto ocurre entre 5 a 6 meses después de fecundada la flor (Quiroz & Agama, 2006). Cuando los frutos han alcanzado su madurez fisiológica, las mazorcas cambian de color según su procedencia genética.

2.1.1.5 Enfermedades del Cultivo de Cacao

El cacao, como cualquier otro organismo viviente, es susceptible a ser atacado por microorganismos patógenos que alteran su desarrollo y causan una o varias enfermedades. Para que se produzca una enfermedad, debe existir un hospedero (la planta) y uno o más patógenos presentes (organismos causales); así como las condiciones ambientales adecuadas para su desarrollo (Suárez et al., 1993).

Algunas de las enfermedades pueden destruir todas las mazorcas de la plantación en un momento dado (Enríquez, 2004). Las enfermedades más importantes en el Ecuador son la escoba de bruja, la moniliasis, el mal del machete, la mazorca negra y las bubas (Osorio, 2010).

2.1.2 Moniliasis del cacao

La enfermedad, es conocida con los nombres de monilia, pudrición acuosa, helada, enfermedad de Quevedo (porque se cree que en este sector apareció por primera vez) o mancha

ceniza (por la masa blanquinosa de micelio y esporas que la caracteriza) (Enríquez, 2004). En inglés se la conoce como “*Monilia podrot*” y carece de equivalentes en otro lenguaje (Osorio, 2010).

2.1.2.1 Importancia Económica

La enfermedad ataca solamente a los frutos del cacao, sin embargo, su ataque es con frecuencia tan severo, que se considera que la enfermedad constituye uno de los factores limitantes, de mayor importancia, en la producción de esa planta. En Ecuador se han reportado pérdidas que van desde el 16% hasta el 80% y aún más, con promedios que fluctúan del 20% al 22 % anual (Enríquez, 2004).

2.1.2.2 Origen y Distribución Geográfica

La Moniliasis del cacao fue descrita por primera vez en Ecuador en el año 1916, por J. B. Rorer. La región de Quevedo en Ecuador, Sur América, fue considerada por casi cien años como el centro de origen de esta enfermedad, pero estudios recientes demuestran que la enfermedad se originó en la zona de Sopetrán (Antioquia), Colombia; a finales del siglo 18.

La enfermedad se encuentra en todos los países cacaoteros de Suramérica, como son Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela y Surinam; hasta el 2012 solo Brasil no reportaba la presencia de este patógeno afectando sus plantaciones. También se encuentra en Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Honduras, Guatemala, Belice y desde el 2008 se ha reportado afectando plantaciones de cacao de México, a donde llegó introducida posiblemente desde Honduras (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola, 2012).

2.1.2.3 Agente Causal

El patógeno causante de la moniliasis es el hongo *Moniliophthora roreri*, un hongo de la clase Deuteromicete (Imperfectos) y del orden Moniliales. Aún no se conoce su estado perfecto (sexual), por lo que se cree que su reproducción se realiza sólo asexualmente por conidios.

Los conidios son las únicas estructuras (semillas) hasta ahora conocidas, capaces de causar infección (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola, 2012).

2.1.2.4 Taxonomía

Osorio (2010), citando a Suárez *et al* (1993), clasifica al hongo de la siguiente manera:

Clase: Deuteromycetes

Orden: Hyphales

Familia: Moniliaceae

Género: *Moniliophthora*

Especie: *Moniliophthora roreri*

2.1.2.5 Características morfológicas

- **Micelio**

En tejido vegetal necrosado o macerado, se observan paredes gruesas, vacuolado, de forma irregular y con hinchamiento que asemejan clamidiosporas en formación; en medio artificial de cultivo se observa un micelio con hifas hialinas, septadas, con septo dolíporo. *M. roreri* sale a la superficie de las mazorcas por aperturas naturales (estomas) o heridas, formando una masa compacta de hifas sobre la que tiene lugar la esporulación (polvo blanco) (Suárez y Delgado, 1993 citado por Osorio, 2010).

- **Conidióforos**

Los conidióforos de *M. royeri* son hialinos, simples o ramificados; no erectos, bifurcados en su parte distal y con una ligera constricción en la septa que lo separa del resto de la hifa de origen. Se forman especialmente en el frente de avance de la colonia; miden de 9 a 50 μm de largo (Suárez y Delgado, 1993 citado por Osorio, 2010).

- **Conidios**

Son de forma globosa o elipsoide. Se traducen en cadenas de longitud variable, desde dos o tres conidios, hasta 35 o más. Su maduración se produce, aparentemente de forma basípeta. Los conidios jóvenes o de reciente separación de la cadena presentan vestigios de la pared celular de origen (Suárez y Delgado, 1993 citado por Osorio, 2010).

2.1.2.6 Ciclo de vida

La infección se presenta en la superficie de los frutos, en cualquier fase del desarrollo vegetativo, sin embargo la susceptibilidad más alta se observa en los primeros estados de desarrollo del fruto (Albuquerque et al, 2005 citado por Álvarez et al 2014). Las esporas son fácilmente desprendidas de los frutos infectados, principalmente por el viento u otros agentes (Ram et al., 2004 citado por Osorio, 2010). Una vez penetra el fruto, el patógeno se desarrolla intracelularmente e invade las células del parénquima cortical. Esta fase es considerada el período más largo de incubación de la enfermedad (Johnson et al., 2008 citado por Álvarez et al, 2014).

Es necesario aproximadamente seis a diez semanas desde la penetración superficial de las mazorcas, hasta que los síntomas sean visibles (Suárez y Delgado, 1993). Dos o tres días después se producen esporas que empiezan a emerger sobre el micelio blanquecino, son esporas del tipo conidio de color crema, que son liberadas y dispersadas en el aire por la acción del agua y

principalmente, el viento; reanudándose el ciclo (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola, 2012).

2.2.2.7 Síntomas

La Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (2012), describe ampliamente la sintomatología de la infección de frutos causada por el hongo *Moniliophthora roreri* en las distintas etapas de desarrollo:

- **En frutos menores de dos meses:** La infección aparece primero como pequeños abultamientos en la superficie de la mazorca, los cuales se decoloran y presentan un aspecto brillante aceitoso. Después aparece una mancha café que se va extendiendo y sobre esta mancha empieza a aparecer una felpa blanca o esporulación del hongo.
- **En frutos infectados a mitad de su desarrollo (3 a 4 meses):** La infección aparece primero en forma de pequeños puntos aceitosos. En muy corto tiempo (días), esos puntos se unen formando una mancha café cuyo borde es irregular. A los pocos días (tres a seis generalmente), sobre la mancha café aparece el micelio y luego las esporas que forman una masa polvosa abundante de color crema.
- **En los frutos adultos (mayores de 4 meses):** El síntoma más común de la Moniliasis es una mancha de color café que puede extenderse hasta cubrir todo el fruto. Esa mancha se caracteriza, y a su vez se diferencia de la Mazorca negra (*Phytophthora palmívora*), por presentar el borde de avance de la lesión en forma irregular y no bien definido como se presenta en la lesión por *Phytophthora*.

El daño interno causado por la moniliasis es más grave que el daño externo, pues se pierden casi todas las almendras, sin importar la edad del fruto.

2.1.2.8 Epidemiología

La presencia constante de frutos en el cacaotal garantiza ininterrumpidamente la existencia de tejido susceptible suficiente para la permanencia de la enfermedad dentro del cultivo. Las esporas pasan de fruto a fruto tanto dentro del mismo árbol como entre árboles vecinos, usando como vehículo principalmente el viento y en menor grado el agua de lluvia, algunos insectos, herramientas y el hombre. El proceso de germinación y penetración de los conidios de *M. roleri* sobre los frutos de cacao es el punto débil del hongo, pues es en esa etapa cuando el efecto de las condiciones ambientales adversas al hongo pueden ser más perjudiciales para que pueda infectar los frutos (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola, 2012).

Las condiciones óptimas para la maduración y penetración del hongo están alrededor de 25 °C y 85 % de humedad relativa. El conidio necesita de la presencia de agua para germinar, por eso la incidencia y severidad del ataque se incrementa en los meses de lluvia (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola, 2012).

2.1.2.9 Control de Monilia

La moniliasis requiere de un manejo permanente y sistemático a través de todo el año. El control de la enfermedad debe de ser de carácter preventivo; tan pronto como el hongo ha penetrado en el interior de los tejidos atacados no puede ser eliminado sin que antes se destruya el órgano enfermo (Pinzón y Rojas, 2008; citado por Peñaherrera 2013).

2.1.2.10 Control cultural

Según la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (2012), entre las prácticas de cultivo que conducen a una modificación del ambiente, tornándolo inapropiado para el desarrollo de la enfermedad, se destacan las siguientes:

- **Podas (al menos dos veces al año):** se realizan para mantener el tronco y ramas principales libres de brotes, chupones o hijos y de ramillas entrecruzadas dentro del árbol o entre árboles vecinos. Esto contribuye a mantener el ambiente seco y fresco (mejor circulación del aire), además de facilitar la cosecha.
- **Regulación del sombrero permanente:** con esta práctica se obtiene una apropiada entrada de luz en la plantación y una buena circulación del aire, favoreciendo un rápido escape del vapor de agua. También, la regulación del sombrero es indispensable para un mejor aprovechamiento de los fertilizantes o abonos aplicados.
- **Adecuado sistema de drenaje:** es necesario evitar el encharcamiento del agua de las lluvias y reducir la alta humedad relativa dentro del ambiente de la plantación.
- **Control de malezas frecuente y oportuno:** mantener libre de malezas el cacaotal, facilita la libre circulación del aire y contribuye a un ambiente más seco, evitando la condensación del rocío durante las noches, que favorece la germinación y penetración de las esporas en el fruto.

2.1.2.11 Control químico

Se puede usar un producto a base de cobre o clorotalonil y hacer las aspersiones de acuerdo con las recomendaciones de las casas comerciales, las aspersiones generalmente se las realiza cada 7 o 15 días, dependiendo de la intensidad de las lluvias; dichas aspersiones deben hacerse por lo menos durante los tres primeros meses, a partir de las curvas más intensas de floración con lo que se protegerá el mayor porcentaje de la cosecha (Suárez y Delgado, 1993).

2.1.3 *Trichoderma sp.*

Las especies de hongos del género *Trichoderma* han sido plenamente caracterizadas por tener aplicación en el ámbito agrícola, principalmente para el control biológico de otros organismos

patógenos que atacan a los cultivos (Argumedo et al., 2009), en ese contexto son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades en plantas producidas por hongos, debido a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Papavizas et al., 1982; citado por Ezziyyani et al., 2004).

2.1.3.1 Taxonomía

De acuerdo con Kuhls *et al.* (1997), Lieckfeldt *et al.* (1999), Samuels y Chaverri (2003), Samuels (2005) y Jaklitsch *et al.* (2006); citados por Ezziyyani *et al.* (2004), la clasificación taxonómica del género *Trichoderma* es:

Reino: Mycetae

División: Eumycota

Subdivisión: Ascomycotina

Clase: Euascomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocraceae

Género: *Trichoderma*

2.1.3.2 Características Morfológicas

Romero *et al.* (2009), citando a Bissett (1991) y a Hoog (2000) menciona que los conidióforos son de color verde, presentan diversas ramificaciones perpendiculares, en algunos casos se observa la formación de ramas laterales en grupos de dos a tres, ubicadas en un ángulo amplio. El sistema de ramificación tiene una apariencia piramidal. Las fiálides son largas y delgadas, asimétricas, con verticilos terminales de hasta 4 conidios subglobosos. Sus clamidosporas son subglobosas, de pared dentada y color verde suave.

Infante *et al.* (2009), señala que las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa. El micelio es ralo en su mayoría, y visto al microscopio es fino, los conidióforos son ramificados, parecen un árbol pequeño. Estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies. Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del período vegetativo de las plantas.

2.1.3.3 Ciclo de Vida

El ciclo de vida de *Trichoderma* inicia cuando germinan los conidios, el hongo crece y se ramifica como una hifa fúngica típica. Posteriormente se forma el micelio y se produce un sinnúmero de conidióforos que a su vez producen los conidios. La esporulación asexual ocurre cuando los conidios son liberados en gran número, también se forman clamidosporas intercaladas, de forma individual, aunque a veces dos o más clamidosporas se pueden fusionar (Romero *et al.*, 2009).

2.1.3.4 Mecanismos de Control Biológico

Se han descrito diferentes mecanismos de acción de *Trichoderma* que regulan el desarrollo de diferentes hongos fitopatógenos. Los principales son la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y antibiosis (Leal, 2000; citado por Infante *et al.*, 2009).

- **Competencia:** Se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado por factores externos como tipo de suelo,

pH, temperatura, humedad, entre otros (Hjeljord et al., 1998; Samuels, 1996; citados por Infante et al., 2009).

En este sentido la presencia de forma natural de *Trichoderma* en diferentes suelos se considera una evidencia de la plasticidad ecológica de este hongo y de su habilidad como excelente competidor por espacio y recursos nutricionales. *Trichoderma* está biológicamente adaptado para una colonización agresiva de los sustratos y en condiciones adversas para sobrevivir, fundamentalmente, en forma de clamidosporas. La alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, debido a la riqueza de enzimas que posee, hacen que sea muy eficiente como saprófito y aún más como agente de control biológico (Hjeljord et al., 1998; Pérez, 2004; citados por Infante et al., 2009).

La competencia por nutrientes puede ser por nitrógeno, carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminarina, y pectinas, entre otros) y microelementos. Esta forma de competencia en los suelos o sustratos ricos en nutrientes no tiene importancia desde el punto de vista práctico.

Por ello, cuando se emplea fertilización completa o existe exceso de algunos de los componentes de los fertilizantes e inclusive en suelos con alto contenido de materia orgánica, este tipo de antagonismo es poco eficaz (Stefanova et al., 1986; Eveleigh et al., 1986 citados por Infante et al, 2009).

- **Antibiosis:** En esta etapa ocurre la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas del antagonista.
- **Micoparasitismo:** El micoparasitismo es definido como una simbiosis antagónica entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como

quitinasas, celulasas, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados (Lorito et al., 1990; Melgarejo, 1989; Ulloa, 1996; citados por Infante et al., 2009). Las especies de *Trichoderma* durante el proceso de micoparasitismo crecen quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno (Carsolio et al., 1999; citados por Infante et al., 2009).

El micoparasitismo es un proceso complejo que para su estudio se ha separado en cuatro etapas. El desarrollo de cada etapa depende de los hongos involucrados, de la acción biotrófica o necrotrófica del antagonista y de las condiciones ambientales. Infante *et al.* (2009), citando a Chet y Benhamou (1998) describen las etapas del proceso de micoparasitismo de hongos del género *Trichoderma*:

- **Crecimiento quimiotrófico:** El quimiotropismo positivo es el crecimiento directo hacia un estímulo químico. En la etapa de localización del hospedante, se ha demostrado que *Trichoderma* puede detectarlo a distancia y sus hifas crecen en dirección al patógeno como respuesta a un estímulo químico.
- **Reconocimiento:** Las cepas de *Trichoderma* han demostrado que estas son efectivas sólo contra patógenos específicos. El reconocimiento molecular entre *Trichoderma* y el hospedante es el evento esencial que precede al proceso antagonista. Esto es un elemento a tener en cuenta para la aplicación práctica de este hongo, y para la búsqueda de nuevos aislamientos más adaptados y eficaces.

El reconocimiento se realiza a través de interacciones lectinas-carbohidratos. Las lectinas son proteínas enlazadas a azúcares o glicoproteínas, las cuales aglutinan células y están involucradas

en las interacciones entre los componentes de la superficie de las células y su ambiente extracelular, las lectinas están involucradas en el micoparasitismo.

- **Adhesión y enrollamiento:** Cuando la respuesta de reconocimiento es positiva, las hifas de *Trichoderma* se adhieren a las del hospedante mediante la formación de estructuras parecidas a ganchos y apresorios, se enrollan alrededor de estas, todo esto está mediado por procesos enzimáticos. La adherencia de las hifas de *Trichoderma* ocurre gracias a la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno.

2.1.4 Control biológico

Control biológico es la manipulación directa o indirecta por parte del hombre de los agentes vivos que de forma natural tienen capacidad de control. Esta manipulación provoca el aumento de su capacidad de ataque sobre las enfermedades (Nighan y Mukerji, 1988; citados por Falconí y Yáñez, 2007). Bajo esta premisa el control biológico está basado en la utilización de principios ecológicos y su importancia radica en el impacto beneficioso para la conservación del ambiente y a su vez la factibilidad tecnológica de poder manejar agentes naturales de biocontrol (Rodríguez et al., 2003; Sholberg et al., 1995; citados por Falconí y Yáñez, 2007).

El control biológico también se puede definir como la reducción de la cantidad de inóculo o de la cantidad infectiva de un patógeno a través de uno o más microorganismos (González, 2000). La utilización de algunos agentes tiende a interferir, de alguna manera con el ciclo biológico del patógeno o a estimular la reacción de la planta afectada y favorece o inicia la creación de barreras de todo tipo, de modo que dichas barreras hayan alcanzado niveles suficientes para retrasar, disminuir o impedir el desarrollo del patógeno cuando éste llegue al contacto con el cultivo (González, 2000). En los últimos años se han realizado investigaciones en control biológico, los

resultados sugieren que las poblaciones de hongos endófitos, como son las cepas de *Trichoderma*, presentes en los tejidos del cacao pueden proteger al árbol cuando éstos son aislados, seleccionados y reintroducidos al sistema del cultivo en un tamaño de población más grande (Guest, 2007).

2.1.4.1 Control Biológico de Monilia con *Trichoderma*

Osorio (2010), citando a Enríquez (2004), menciona que en el año 2001, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias detectó algunos organismos antagónicos identificados como *Trichoderma koningiopsis*. Solís y Suarez (2006), realizaron un estudio referente al control de *M. rozeri* utilizando especies del género *Trichoderma* (*T. koningiopsis* y *T. stromaticum*), los autores reportan el aumento entre el 16 y 20% de la producción de mazorcas sanas.

2.1.5 Epidemiología cuantitativa (patometría).

2.1.5.1 Epidemiología

Algunos autores definen epidemiología como el estudio de los factores que provocan una enfermedad y afectan su velocidad de dispersión. También se define como la interacción entre poblaciones de patógenos y plantas; y de la enfermedad resultante de esa interacción bajo la influencia del ambiente y la interferencia humana. En el sentido amplio la epidemiología es el estudio del progreso de la enfermedad en el espacio y en el tiempo en función de las interacciones entre poblaciones del hospedero, poblaciones de patógenos y el medio ambiente (Nelson, 1978; Kranz, 1980; Kushalappa, 1982; citados por Hernández y Montoya, 1987).

2.1.5.2 Epidemia

Las epidemias son procesos biológicos complejos, cada proceso usualmente está compuesto de un número fácilmente identificable de subprocesos que son los ciclos de infección, por lo tanto,

una epidemia como un total consiste en una secuencia de ciclos de infección que ocurren extensivamente como resultado de la interacción entre una población de unidades infectivas del patógeno sobre una población de plantas hospederas bajo un ambiente favorable (Zadoks Y Schein, 1979; citados por Hernández y Montoya, 1987).

2.1.5.3 Patometría

Para cuantificar una enfermedad generalmente se utilizan las curvas de progreso de la enfermedad, una enfermedad puede ser cuantificada de acuerdo dos términos importantes: incidencia y severidad. La incidencia se determina por el porcentaje de plantas, frutos, etc. infectados y la severidad se determina por el porcentaje de tejido enfermo, en ambos casos el porcentaje puede ser representado como fracción con valores de cero a uno (James, 1974; citado por Hernández y Montoya, 1987).

La cuantificación de una enfermedad comprende dos etapas: La primera consiste en el muestreo de plantas o partes de plantas infectadas mientras que la segunda etapa comprende la evaluación de la severidad de la enfermedad, empleándose escalas diagramáticas. Una vez realizadas estas dos etapas es necesario calcular la proporción acumulativa de enfermedad lo que nos permitirá estimar la tasa de infección o velocidad de aumento de la enfermedad (Hernández y Montoya, 1987).

2.1.5.4 Cuantificación de epidemias

Para diseñar modelos matemáticos de regresión que permitan analizar de manera numérica el comportamiento de epidemias, es necesario diseñar una curva de progreso de la enfermedad, para lo cual se deben registrar cada cierto tiempo (semanas, quincenas, meses, etc.) los porcentajes o síntomas de enfermedad acumulados, para luego mediante paquetes informáticos generar

modelos de regresión. Es importante señalar que cada enfermedad puede ajustarse a modelos lineales o no lineales por lo que se debe utilizar la mayor cantidad de parámetros para validar dichos modelos (Hernández y Montoya, 1987).

2.1.5.5 Área bajo de la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE)

Es una medida de la cantidad total de enfermedad durante un periodo de tiempo, la cual se determina a partir de gráficos o curvas de la enfermedad con respecto al tiempo (D'Arcy et al., 2001). Además de la tasa de infección el área bajo de la curva del progreso de enfermedad es un parámetro generalmente usado en epidemiología comparativa y es calculado por la fórmula:

$$\text{ABCPE} = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i)/2][(X_{i+1} - X_i)]$$

Donde:

ABCPE: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad.

Y_i: Proporción de enfermedad en la n-sima observación.

X_i: Tiempo en la n-sima observación.

n: Número total de observaciones.

Sin embargo, existe una manera de cálculo en función del modelo de regresión al que se ajustan los datos del tiempo y porcentaje de incidencia de la enfermedad basado en la definición de la integral definida. Según varios autores, dada una función f(x) y un intervalo [a,b], la integral definida es igual al área limitada entre la gráfica de f(x), el eje de abscisas, y las rectas verticales x = a y x = b. Por lo que el ABCPE se podría calcular por la fórmula:

$$\int_a^b f(x)dx$$

Donde:

∫: signo de integración entre dos intervalos de tiempo.

f(x): función o modelo de regresión obtenido para la incidencia de la enfermedad..

dx: derivada de la incidencia con respecto al tiempo.

2.1.6 Coadyuvantes para aspersiones agrícolas

Chaves (1995), define a los coadyuvantes agrícolas como aquella sustancia química que contribuye, asiste o ayuda a realizar una mejor acción cuando se mezcla en forma correcta con un plaguicida. El mismo autor citando a McWhorter (1982), señala que estos productos pueden clasificarse de la siguiente manera según su mecanismo de acción:

- **Activadores:** Incluyen surfactantes, otros agentes de mojado, penetrantes y aceites.
- **Modificadores del líquido pulverizado:** Incluyen los pegantes, formadores de película, extensores, extensores pegantes, agentes espesadores y espumantes.
- **Modificadores de utilidad:** Incluyen emulsificantes, dispersantes, agentes estabilizadores, agentes acopladores, agentes compatibilizadores, cosolventes, agentes “buffer” y agentes antiespumantes.

Ocaña (1959) señala al aceite agrícola como un excelente coadyuvante en las aplicaciones de fungicidas químicos, logrando una mayor penetrabilidad y disminuyendo el lavado superficial por lluvias así como también la deshidratación del producto aplicado, además de lograr una distribución eficiente del producto aplicado sobre las hojas y frutos. Estudios posteriores de los

mismos autores permitieron establecer que el aceite agrícola tiene la capacidad de penetrar los tejidos de la hoja y acumularse en espacios intercelulares, propiedades que determinan su eficiencia como coadyuvante. Es importante aclarar que para lograr la emulsificación, es decir, la mezcla de aceites con agua, se necesita adicionar un emulsificador.

2.1.6.1 SPRAY AIDE (Surfactante)

Es un concentrado a base de Alkyl-aryl-polyether-etyl-glycol-fosfato que actúa como agente surfactante. Mejora la compatibilidad de los pesticidas en el tanque de aspersión, regula el pH del agua (EDIFARM, 2017).

2.1.6.2 ECUAFIX (Adherente)

Es un compuesto cuyo ingrediente activo es Eter Fenol Poliglicolico, disminuye la tensión superficial del agua, mejorando la adherencia y dispersión de preparados acuosos de insecticidas y fungicidas. Favorece la humectación de las plantas, aumenta la resistencia de los productos al efecto de lavado causados por lluvias (EDIFARM, 2017).

2.1.6.3 COSMO OIL (Aceite mineral agrícola)

Es un aceite portador no-iónico de las aplicaciones de agroquímicos que mejora el contacto producto-superficie, su ingrediente activo es la mezcla de Aceite Parafínico y Cicloparafínico, permite la permanencia del producto en la superficie de la hoja durante el tiempo necesario para cumplir con su actividad de vehículo, sin perjuicio de las actividades fotosintéticas, evitando daños causados por fitotoxicidad (EDIFARM, 2017).

2.1.7 Coadyuvantes para aspersiones agrícolas con microorganismos.

Corrales M. (1996) realizó un experimento a fin de determinar el efecto de aplicar *Bacillus cereus* y *Serratia marcescens* junto a coadyuvantes químicos para el control de la Sigatoka negra

del banano, no se reportan diferencias significativas a nivel de laboratorio determinándose que dichos coadyuvantes no impedían el normal desarrollo de los microorganismos, sin embargo en pruebas en campo la aplicación de los microorganismos junto a aceite agrícola mostró menores porcentajes de incidencia de la enfermedad.

Desrosiers (1958) citado por Ocaña (1959), señala que el aceite actúa como agente fitoprotector, fungostático y antiesporulativo, impidiendo el desarrollo de *Cercospora* en plantas de banano previamente infectadas. Ocaña (1959), cita el trabajo de Calpouzos (1959) en el cual se determinó que la aplicación de aceite agrícola en banano no inhibía la germinación de conidias ni esporas, tampoco se encontró inhibición de la penetración y esporulación del patógeno en hojas previamente asperjadas; es así que el autor reporta la posibilidad de que el aceite inhiba al patógeno una vez que ha penetrado el fruto, antes de la aparición de los síntomas.

En cuanto a la fitotoxicidad derivada de aplicaciones de aceite agrícola, los autores citados reportan que con aplicaciones a una concentración de 1% de aceite agrícola no se obtiene síntoma alguno de fitotoxicidad.

2.2 Fundamentación legal

Debido a que la presente investigación comprende la utilización de cepas de *Trichoderma* nativas, así como la utilización de estas sobre plantas de cacao variedad CCN-51 producidas en el territorio nacional, se alinea totalmente a las leyes de prohibición y cuarentena para biológicos foráneos. Por otra parte, dadas las características biológicas del hongo *Trichoderma*, no se incumplen preceptos legales-ambientales en cuanto a la liberación de biológicos al medio ambiente.

2.3 Hipótesis

- **H₀**: El uso de diferentes coadyuvantes no mejora el establecimiento, supervivencia y capacidad antagonista frente a *Moniliophthora roreri* de *Trichoderma sp.* sobre mazorcas de cacao.
- **H₁**: El uso de diferentes coadyuvantes mejora el establecimiento, supervivencia y capacidad antagonista frente a *Moniliophthora roreri* de *Trichoderma sp.* sobre mazorcas de cacao.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

Modalidad de la investigación

Investigación aplicada.

Tipo de investigación

Investigación cuantitativa experimental pura.

3.1 Fase de Laboratorio

Durante esta fase se realizó la recolección de muestras afectadas por el patógeno y muestras de suelo, para el aislamiento de *Moniliophthora roreri* y *Trichoderma sp.* respectivamente, además se realizaron pruebas duales de antagonismo *in vitro* entre *Trichoderma sp.* y *Moniliophthora roreri*. La fase de laboratorio contempló además la realización de pruebas *in vitro* de compatibilidad de *Trichoderma sp.* con diferentes coadyuvantes para aspersiones agrícolas.

- **Materiales**

Hielera de espuma flex, bolsas resellables, tijera de podar, pala de jardín, cajas Petri de cristal, pinzas quirúrgicas, bisturí, asa microbiológica redonda, matraces Erlenmeyer, vasos de precipitación, porta y cubreobjetos.

- **Equipos**

pHmetro, cámara de flujo laminar, incubadora, autoclave, microscopio óptico, balanza digital, hornilla eléctrica, refrigerador.

- **Reactivos**

Agar PDA, agar- agar, asparagina, hidróxido de potasio 10% v/v, lactofenol, ácido acético 50% v/v, cloranfenicol 50 mg, hipoclorito de sodio 5.25%, alcohol 97 ° G.L. 70%, agua destilada, COSMO OIL® (aceite agrícola), ECUAFIX® (adherente), SPRAYAIDE® (surfactante).

3.1.1 Aislamiento del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri*.

Se recolectaron mazorcas con síntomas de moniliasis, se envasaron y rotularon para su transporte al laboratorio. Para el aislamiento del patógeno se cortaron porciones de mazorca de la zona de avance de la enfermedad para su desinfección, finalmente se sembraron en cajas Petri con medio Agar agua y se incubaron por 3 días a 26 °C. Cumplido ese tiempo se obtuvo crecimiento micelial semi-transparente, el mismo fue transferido a cajas Petri con medio de cultivo PDA (Anexo 1.1), Agar extracto de cacao (Anexo 1.2) y Agar V8 (Anexo 1.3) hasta que se observó crecimiento micelial y esporulación.

3.1.1.1 Identificación macroscópica de las colonias.

Se procedió a evaluar la forma y coloración del crecimiento fúngico. Según varios autores las colonias de *M. roreri*, macroscópicamente, presentan aspecto polvoso, coloración variable desde blanco hasta marrón, bordes regulares y crecimiento circular en sectores.

3.1.1.2 Purificación de aislamientos.

Una vez identificadas macroscópicamente las colonias, se tomó una porción de medio con micelio de cada colonia y se transfirió a una caja Petri con medio PDA sucesivamente hasta obtener cultivos parcialmente puros.

3.1.1.3 Identificación microscópica de aislamientos.

Con ayuda de cinta adhesiva transparente se tomó una muestra del micelio de los cultivos parcialmente puros de *M. roreri*, se colocó en un portaobjetos y se observó al microscopio. Luego de la identificación microscópica, de las colonias, se tomó una porción de medio con crecimiento fúngico y se sembró en cajas Petri con medio PDA, posteriormente se llevó las cajas a incubación a 26° C por 15 días hasta su esporulación según lo expuesto por Leandro (2006).

3.1.1.4 Obtención de cultivos monospóricos del patógeno.

Se realizó un lavado superficial a un cultivo de *M. roreri* con una solución de Tween 80 al 0.01% y se trasvasó a un vaso de precipitación previamente esterilizado. Se procedió a determinar la concentración de esporas de la solución con ayuda de un hematocitómetro, se ajustó la concentración a un valor de 104 esporas.ml⁻¹, posteriormente se procedió a inocular 0,5 ml de la misma en cajas Petri previamente preparadas con medio PDA.

Las cajas se incubaron a 26°C, hasta que se corroboró la germinación de las esporas y crecimiento fúngico. Una vez detectado el crecimiento fúngico se procedió a transferir cada colonia (espora germinada) a cajas Petri con medio PDA y se mantuvo en incubación a 26°C, hasta que el micelio cubrió todo el plato y esporuló, obteniendo así colonias monospóricas de *M. roreri*, según lo descrito por Leandro (2006).

3.1.2 Aislamiento de *Trichoderma sp.* de suelos cacaoteros, para su utilización en pruebas de antagonismo frente a *Moniliophthora roreri*.

3.1.2.1 Recolección de muestras de suelo.

Se tomó muestras de suelo al azar entre cero y 20 cm de profundidad, correspondientes a la rizósfera del cultivo de cacao. Las muestras fueron rotuladas y trasladadas al laboratorio para su procesamiento según la metodología descrita por Rivas y Pavone (2010).

3.1.2.2 Aislamiento de *Trichoderma sp.*

A partir de las muestras de suelo colectadas, se tomaron submuestras que fueron diluidas, se tomaron alícuotas de 0.1 ml las cuales fueron sembradas en cajas Petri con medio E selectivo para *Trichoderma* (Anexo 1.4). Las cajas Petri fueron incubadas a 26°C durante una semana. Una vez obtenidas las colonias de hongos se procedió al reaislamiento en cajas Petri con medio PDA de las cepas que podían pertenecer al género *Trichoderma* según lo descrito por Chávez (2006).

3.1.2.3 Identificación macroscópica de las colonias.

Para la identificación macroscópica de *Trichoderma* se empleó la descripción propuesta por Chávez (2006), quien indica que las colonias pertenecientes al género *Trichoderma* presentan crecimiento rápido, coloración blanco-verde-amarillo verdosa, áreas con forma de anillos concéntricos donde se encuentran los conidios.

3.1.2.4 Purificación de aislamientos de *Trichoderma sp.*

Una vez identificadas macroscópicamente las colonias, se tomó una porción de medio con micelio de cada colonia y se transfirió a una caja Petri con medio de cultivo PDA, así sucesivamente hasta obtener cultivos parcialmente puros.

3.1.2.5 Identificación microscópica de *Trichoderma sp.*

Se siguió el protocolo utilizado para la identificación de *M. roleri* y se utilizó la descripción propuesta por Chávez (2006).

3.1.2.6 Obtención de cultivos monospóricos de *Trichoderma sp.*

Se utilizó el protocolo propuesto para la obtención de cultivos monospóricos de *M. roleri*.

3.1.3 Pruebas de antagonismo *in vitro* entre el controlador biológico *Trichoderma sp.* y el hongo fitopatógeno *Moniliophthora roleri*.

3.1.3.1 Variables medidas

- **Longitud del crecimiento del patógeno sin el antagonista.**

Se midió la longitud en centímetros desde el punto de siembra del patógeno hasta el punto límite de su crecimiento en el tiempo de evaluación.

- **Longitud del crecimiento del patógeno con el antagonista.**

Se midió la longitud en centímetros desde el punto de siembra del patógeno hasta el punto límite de su crecimiento en el tiempo de evaluación, en presencia del antagonista *Trichoderma sp.*

- **Porcentaje de Antibiosis de *Trichoderma* sobre *Monilia*.**

Para determinar el porcentaje de antibiosis de *Trichoderma* sobre *monilia* se utilizó la fórmula propuesta por Pérez (2017):

$$PA = [(CR - CRT) / CR] \times 100; \text{ donde:}$$

PA = Antibiosis (%)

CR = Crecimiento radial de *M. roleri* sin *Trichoderma* (cm)

CRT = Crecimiento radial de *M. roleri* en presencia de *Trichoderma* (cm)

3.1.3.2 Factores del experimento

Influencia de *Trichoderma*.

3.1.3.3 Tratamientos

Presencia: cultivo de *M. roreri* en presencia de *Trichoderma*.

Ausencia: cultivo de *M. roreri* en ausencia de *Trichoderma*.

3.1.3.4 Diseño y Unidad experimental

Se utilizó un Diseño completamente aleatorizado con cinco repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por una caja Petri con medio PDA sobre la que se sembró una muestra de *M. roreri*.

3.1.3.5 Procedimiento experimental

En una caja Petri con medio PDA se colocó un disco de 0,5 cm de diámetro de un cultivo del hongo fitopatógeno durante el tiempo necesario para que este inicie su crecimiento micelial. Transcurrido este periodo de acondicionamiento, se sembró, de ser el caso, a una distancia de 5 cm, un disco de 0,5 cm de diámetro de un cultivo de *Trichoderma sp.* y se dejó en incubación por 12 días a 26°C según la metodología descrita por Hoyos *et al* (2008).

3.1.3.6 Recolección de datos

A los 12 días se midió el crecimiento fúngico en cada unidad experimental.

3.1.3.7 Análisis estadístico y Técnicas de comprobación de hipótesis.

A fin de determinar posibles diferencias entre tratamientos, los resultados se analizaron mediante un análisis de la varianza y prueba de Tukey a un nivel de significancia de 0,05.

3.1.4 Pruebas *in vitro* de compatibilidad entre el controlador biológico *Trichoderma sp.* y diferentes coadyuvantes comerciales para aplicaciones agrícolas.

3.1.4.1 Variables medidas

- **Longitud del crecimiento de *Trichoderma sp.***

Se midió la longitud en centímetros desde el punto de siembra de *Trichoderma sp.* hasta el punto límite de crecimiento en el tiempo de evaluación.

- **Nivel de esporulación de *Trichoderma sp.***

Cualificación del nivel de esporulación de acuerdo a la siguiente escala:

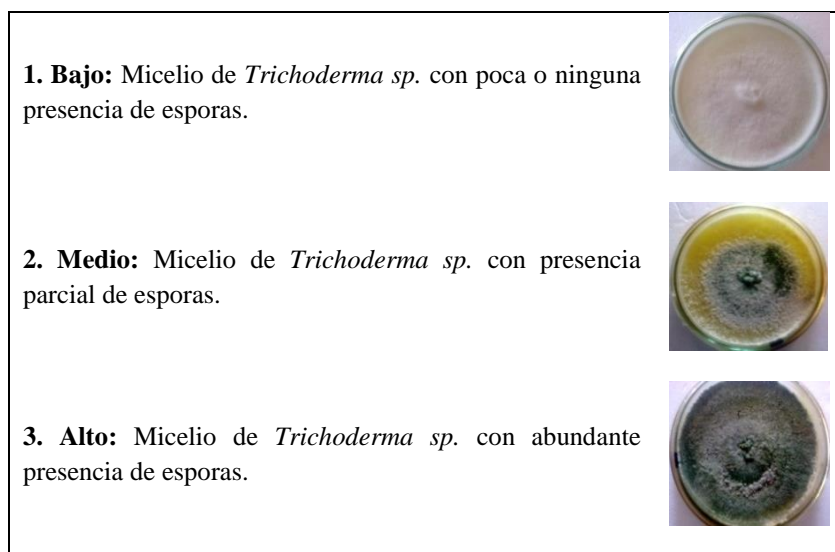


Figura 2 Cualificación del nivel de esporulación

3.1.4.2 Factores del experimento

Tipo de coadyuvante adicionado al medio de cultivo PDA.

3.1.4.3 Tratamientos a comparar

Tabla 1

Tratamientos para pruebas de compatibilidad in vitro

| Tratamiento | Descripción |
|-----------------|---|
| Surfactante | PDA + Surfactante (SPRAY AIDE® 0,3 ml.l ⁻¹) |
| Aceite agrícola | PDA + Aceite mineral agrícola (COSMO OIL® 10 ml.l ⁻¹) |
| Adherente | PDA + Adherente (ECUAFIX® 0,5 ml.l ⁻¹) |
| Ninguno | PDA |

3.1.4.4 Diseño y Unidad experimental

Se utilizó un Diseño Completamente Aleatorizado con 4 repeticiones. La unidad experimental estuvo conformada por una caja Petri con medio de cultivo PDA, a la que se le adicionó los respectivos tratamientos y sobre estos se sembró una porción de cultivo de *Trichoderma sp.*

3.1.4.5. Procedimiento experimental

En una caja Petri se dispuso 15 ml del respectivo medio de cultivo, formado por los diferentes tratamientos, sobre este se sembró un disco de 0,5 cm de diámetro de cultivo de *Trichoderma sp.* y se incubó a 26⁰C durante 12 días.

3.1.4.6 Recolección de datos

A los 12 días se midió el crecimiento fúngico de las respectivas unidades experimentales y se evaluó el nivel de esporulación alcanzado.

3.1.4.7 Análisis estadístico y Técnicas de comprobación de hipótesis

Los datos se analizaron mediante un Análisis de la Varianza y Prueba de Tukey al 0,05 de significancia.

3.2 Fase de Campo

3.2.1 Variables medidas

Las siguientes variables fueron medidas directamente en la plantación cada 15 días durante tres meses de duración del ensayo, de acuerdo a Falconí y Yáñez (2007).

Número de frutos sanos

Número de frutos sin síntomas visibles de afectación por monilia, los cuales se clasificaron de la siguiente manera:

Cherelles: menores a un mes de edad.

Pepinos: de uno a tres meses de edad.

Mazorcas: mayores a tres meses de edad.

Número de frutos con monilia

Número de frutos con síntomas visibles de moniliasis, los cuales se clasificaron de la siguiente manera:

Cherelles Wilt: menores a un mes de edad.

Chirimoyos: de uno a tres meses de edad.

Mazorcas enfermas: mayores a tres meses de edad.

Incidencia de monilia (%)

Para determinar el porcentaje de incidencia de monilia se utilizó la ecuación propuesta por Osorio (2010):

$$\%IM = (FE/FT) \times 100, \text{ donde:}$$

%IM: Porcentaje de Incidencia de monilia.

FE: Número de frutos enfermos.

FT: Número total de frutos.

Área bajo la curva del progreso de la enfermedad

A partir de los datos tomados quincenalmente del porcentaje de incidencia de la enfermedad Falconí y Yáñez (2007), se construyó un modelo de regresión lineal. El ABCPE se determinó mediante la integral de la función porcentaje de incidencia vs. tiempo (Hernández y Montoya, 1987).

Establecimiento y supervivencia de *Trichoderma* sobre las mazorcas

Se procedió a cortar cada 15 días una mazorca al azar por tratamiento, la misma que fue transportada al laboratorio, se cortaron al azar cinco porciones de epidermis de la mazorca, se sembraron en medio E selectivo para *Trichoderma* (Anexo 1.4) y se incubaron por siete días a 25 °C, luego de lo cual se determinó:

- El Porcentaje de establecimiento, en función del número de porciones de mazorca que presentaron crecimiento de *Trichoderma*.
- La Supervivencia de *Trichoderma*, para lo cual se utilizó como medida indirecta y referencial de su dinámica poblacional, el crecimiento radial de *Trichoderma* obtenido luego de incubarlo por siete días a 25 °C.

3.2.2 Ubicación del lugar de la investigación

3.2.2.1 Ubicación política

Provincia: Santo Domingo de los Tsáchilas.

Cantón: Santo Domingo.

Parroquia: Valle Hermoso.

Sector: km. 22 vía Santo Domingo- Esmeraldas.

Propiedad: Rancho San José.

3.2.2.2 Ubicación Geográfica

Coordenadas planas UTM: x: y: -0,139332; -79,240439

Coordenadas geográficas: 00 00 02,6 S; 85 29 19,5 O

3.2.2.3 Ubicación Ecológica

Zona de vida: Bosque húmedo tropical (Diagrama de zonas de vida de L. Holdridge).

Altitud: 600 m.s.n.m

Temperatura media: 23,6 0C

Precipitación anual: 2980 mm.

Humedad relativa: 88 %

Heliofanía media anual: 660 horas/luz/año

Datos meteorológicos de la Estación Meteorológica Puerto Ila (2010), citados por Castro *et al* (2013).

Suelos (textura): Franco-arenoso

pH: 6-6,5

Datos publicados por Alcívar (2015).

Vegetación: Pastizales compuestos principalmente por Zaboya, cercas vivas de Piñón y Nacedero, Especies forestales como Caraca, Leucaena, Teca, Balsa.

3.2.3 Diseño experimental

3.2.4 Descripción de los componentes del experimento

Población: Plantación de cacao variedad CCN-51 de seis años de edad en producción.

Muestra: 48 árboles de cacao.

Unidad experimental: parcela de dos árboles de cacao.

Unidad muestral: parcela de dos árboles de cacao.

3.2.5 Tratamientos a comparar

Tabla 2

Tratamientos a comparar para la fase de campo

| Simbología | Descripción |
|-------------------------|--|
| Adherente | Suspensión de <i>Trichoderma</i> en agua (1×10^8 esporas.ml ⁻¹) + Adherente (ECUAFIX® 0.5 ml.l ⁻¹) |
| Surfactante | Suspensión de <i>Trichoderma</i> en agua (1×10^8 esporas.ml ⁻¹) + Surfactante (SPRAY AIDE® 0.3 ml.l ⁻¹) |
| Aceite agrícola | Suspensión de <i>Trichoderma</i> en agua (1×10^8 esporas.ml ⁻¹) + Aceite mineral agrícola (COSMO OIL® 10 ml.l ⁻¹) |
| Sin coadyuvantes | Suspensión de <i>Trichoderma</i> en agua (1×10^8 esporas.ml ⁻¹) |
| Químico | Tratamiento químico convencionalmente usado por el agricultor (PHYTON® 0.60 ml.l ⁻¹) |
| Testigo | Testigo |

3.2.6 Descripción de los tratamientos

Para los tratamientos Adherente, Surfactante y Aceite agrícola, a partir de la cantidad necesaria de sustrato inoculado con *Trichoderma*, se procedió a preparar una suspensión de esporas en agua limpia, misma que se ajustó una concentración de 1×10^8 esporas.ml⁻¹, posteriormente se añadió la cantidad recomendada de los diferentes productos, se mezcló y se procedió a la aplicación sobre mazorcas con ayuda de una bomba de mochila, cabe indicar que para el tratamiento en el que se utilizó aceite agrícola se añadió el emulsificante Tritón X45® según la dosis recomendada.

Para el tratamiento Sin coadyuvantes solo se aplicó la suspensión de *Trichoderma* en agua limpia sin ningún coadyuvante, el tratamiento Químico consistió en la aplicación de un tratamiento químico usado convencionalmente por los productores de cacao (PHYTON®) y sobre el tratamiento Testigo no se realizó ninguna aplicación. Para todos los tratamientos se estimó un gasto de agua de 500 ml por árbol (Solís y Suárez, 2006; EDIFARM, 2017).

3.2.7 Tipo de Diseño Experimental

Diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones.

Factor: Tipo de control de *M. royeri* (seis niveles).

Tratamientos: seis tratamientos.

3.2.8 Repeticiones o Bloques

Cuatro repeticiones.

3.2.9 Características de las Unidades Experimentales

Número de unidades experimentales: 24

Área total del ensayo: 1536 m².

Largo: 48 m.

Ancho: 32 m.

Forma del ensayo: Rectangular.

3.2.10 Croquis del diseño experimental

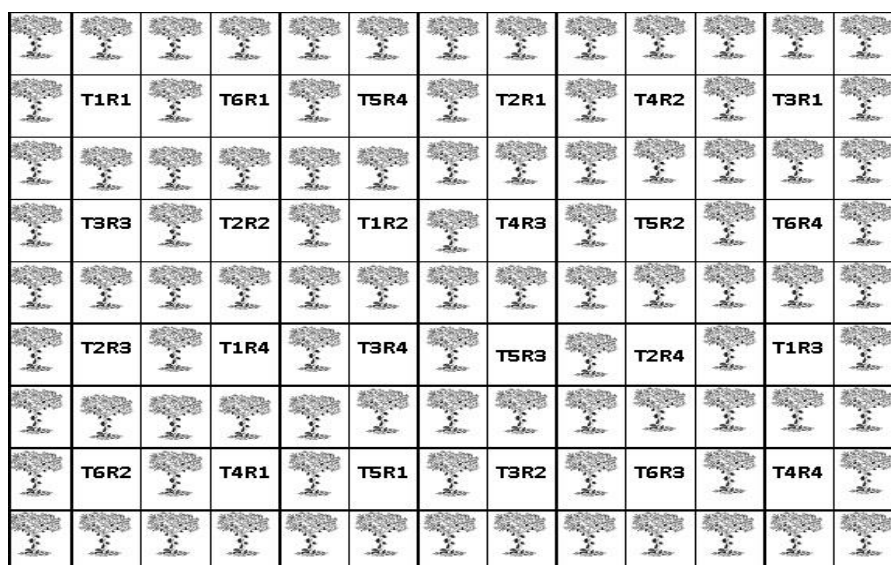


Figura 3 Croquis del diseño experimental

3.2.11 Procedimiento experimental

Al inicio del ensayo se realizó una poda, deshierba y fertilización de las plantas a evaluarse. A partir del primer día y posteriormente cada 15 días, se contó las mazorcas sanas y aquellas con síntomas de moniliasis (fueron eliminadas). De igual manera se aplicó los diferentes tratamientos y a partir de la segunda visita se recolectó una mazorca al azar por tratamiento y se la transportó al laboratorio.

3.3 Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el software estadístico *INFOSTAT Versión libre*, mediante una prueba de Análisis de la Varianza para los datos que cumplieron los supuestos de Normalidad (Shapiro & Wilks, 1965) y Homocedasticidad (Levene, 1960), y un Análisis de la Varianza no Paramétrico (Kruskall & Wallis, 1952) para los datos que no cumplieron el supuesto de normalidad.

3.3.1 Esquema de análisis de la varianza

3.3.1.1 Fase de laboratorio

- **Pruebas de antagonismo *in vitro* entre el controlador biológico *Trichoderma sp.* y el hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri*.**

Tabla 3
Análisis de la varianza para pruebas de antagonismo in vitro

| Fuente de Variación | Grados de libertad |
|----------------------------------|--------------------|
| Influencia de <i>Trichoderma</i> | 1 |
| Error | 8 |
| Total | 9 |

- **Pruebas *in vitro* de compatibilidad entre el controlador biológico *Trichoderma sp.* y diferentes coadyuvantes comerciales para aplicaciones agrícolas.**

Tabla 4
Análisis de la varianza de pruebas de compatibilidad in vitro

| Fuente de Variación | Grados de libertad |
|---------------------------------|--------------------|
| Coadyuvante adicionado al medio | 3 |
| Error | 12 |
| Total | 15 |

3.3.1.2 Fase de campo

Los datos obtenidos en la fase de campo no cumplieron con el supuesto de normalidad, por lo que fueron analizados con un Análisis de la varianza no paramétrico (Kruskall Wallis) a un nivel de significancia de 0,05.

3.3.2 Desviación estándar

Se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$DE = \sqrt{\frac{\sum_0^1 (x - \dot{X})^2}{n}}$$

DE: Desviación estándar.

X: Valor medido.

\dot{X} : Media.

n: número de datos.

3.3.3 Regresiones y correlaciones

Se realizó un análisis de correlación de Pearson entre las variables porcentaje de

establecimiento de *Trichoderma*, supervivencia de *Trichoderma* e incidencia de monilia (%) para los diferentes tratamientos.

3.3.4 Técnicas de comprobación de hipótesis

Se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey como prueba adicional al Análisis de la Varianza, y prueba de comparación de Rangos medios como prueba adicional al Análisis de la Varianza no Paramétrico (Kruskall Wallis), ambas con un nivel de significancia de 0,05.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Fase de Laboratorio

4.1.1 Aislamiento del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri*

Aplicando la metodología descrita por Páez & Ruales (2003) y César Falconí (comunicación personal, 2016), se logró aislar el hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* a partir de mazorcas infectadas, las mismas que se colectaron en la etapa de la enfermedad conocida como “mancha chocolate”, una vez aislado e identificado el hongo y siguiendo la metodología descrita por Leandro (2006) y Darwin Rueda (comunicación personal, 2016), se pudo obtener cultivos monospóricos de *M. roreri* para su posterior utilización en pruebas de antagonismo *in vitro* (Figura 3), cabe indicar la complejidad de lograr el crecimiento del hongo en condiciones de laboratorio, coincidiendo con estudios descritos por Páez & Ruales (2003), Suárez (2006), Suárez y Rangel (2014) y Carrera *et al* (2014), quienes atribuyen dicha complejidad a requerimientos nutricionales, de temperatura, luminosidad, etc., así como los altos índices de contaminación por otros microorganismos nativos de mazorcas de cacao.

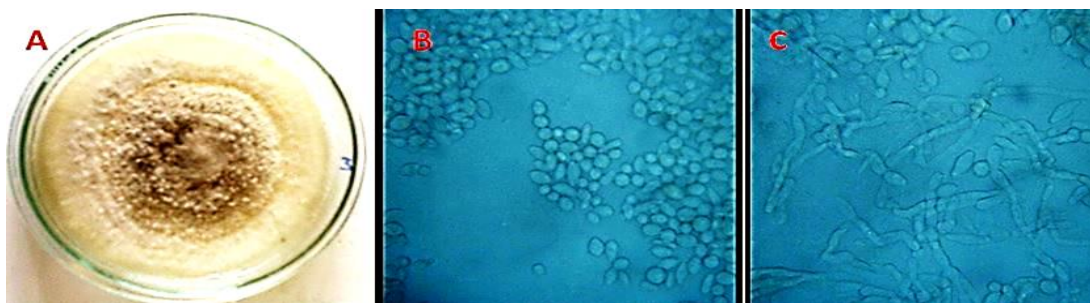


Figura 4 Resultados del aislamiento del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri*

A: Cultivo monospórico de *Moniliophthora roreri*

B, C: Conidias y micelio de *Moniliophthora roreri* vistas al microscopio (40x)

En el proceso de aislamiento de *M. royeri* se aislaron además diferentes microorganismos que corresponden a la micoflora de las mazorcas de cacao (Figura 4).

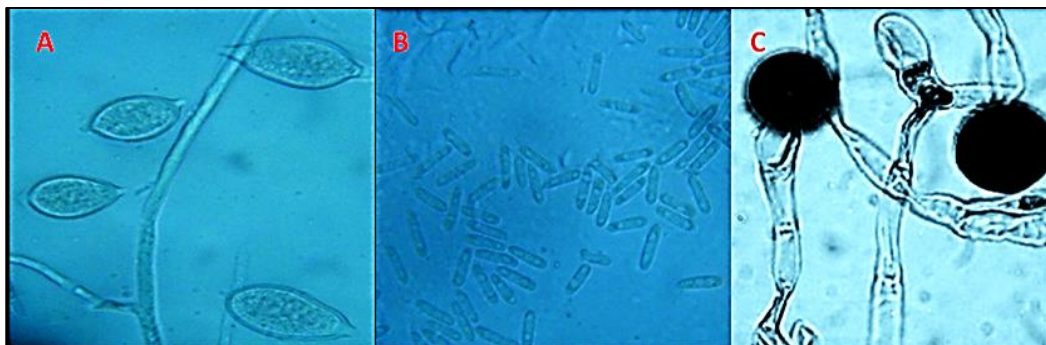


Figura 5 Micoflora presente en mazorcas de cacao

A: Hifa y esporangios de *Phytophthora palmívora* vistas al microscopio (40x)

B: Esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* vistas al microscopio (40x)

C: Micelio y esporas de *Nigrospora sp.* vistas al microscopio (40x)

4.1.2 Aislamiento de *Trichoderma sp.* de suelos cacaoteros.

Aplicando la metodología descrita por Rivas & Pavone (2010) y Jaffer Gutti (comunicación personal, 2016), se logró aislar *Trichoderma sp.* a partir de muestras de suelo comprendidas entre los 10 y 20 cm de profundidad (Tabla 6), acorde a los resultados obtenidos por Moya *et al* (2014), Arias y Piñeros (2008), Guerrero (2016) y López (2007). Quienes manifiestan que la posibilidad de aislamiento de *Trichoderma* aumenta al realizar la toma de muestras en suelos que no han sido intervenidos con algún tipo de producto fitosanitario, dichos autores también señalan la gran actividad microbiológica en los estratos superficiales del suelo, misma que disminuye a mayor profundidad de muestreo.

Tabla 5
Posibilidad de aislamiento de Trichoderma sp.
de suelos cacaoteros

| Muestreo | Muestra | Profundidad (cm.) | | |
|----------|---------|-------------------|----|----|
| | | 10 | 15 | 20 |
| 1 | 1 | + | | + |
| | 2 | | | |
| | 3 | + | + | |
| | 4 | | | |
| 2 | 1 | | | + |
| | 2 | | | |
| | 3 | + | | |
| | 4 | | + | |
| 3 | 1 | + | | + |
| | 2 | | + | |
| | 3 | | | |
| | 4 | + | + | |

+: Presencia de *Trichoderma sp.*

Posteriormente y aplicando la metodología descrita por Leandro (2006) y Darwin Rueda (comunicación personal, 2016) se logró obtener cultivos monospóricos del hongo *Trichoderma sp.* (Figura 5). El mismo autor coincide además con los resultados obtenidos en cuanto a la capacidad de *Trichoderma* para colonizar diferentes tipos de sustratos, por esta razón se realizó la multiplicación masiva de *Trichoderma sp.* sobre un sustrato sólido (arroz) de acuerdo a lo explicado por Marco Taco (comunicación personal, 2016) (Anexo 5).

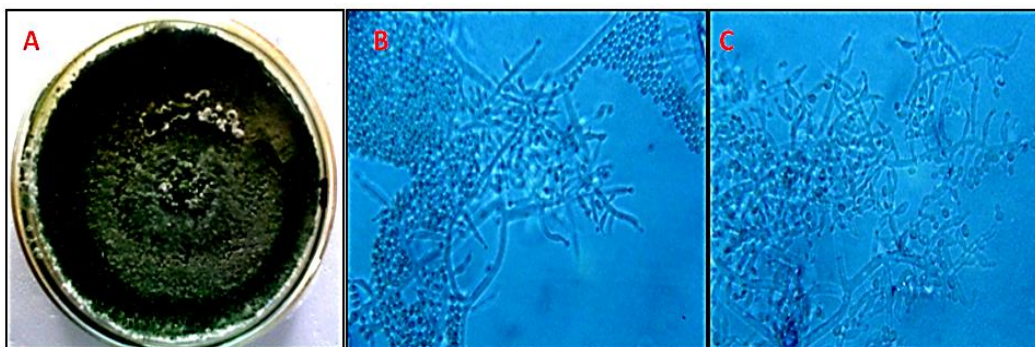


Figura 6 Resultados del aislamiento de *Trichoderma sp.* de suelos cacaoteros

A: Cultivo monospórico de *Trichoderma sp.*

B, C: Fiálides, micelio y esporas de *Trichoderma sp.* vistas al microscopio (40x)

4.1.3 Pruebas de antagonismo *in vitro* entre el controlador biológico *Trichoderma sp.* y el hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri*

Se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos según el ANAVA para la Influencia de *Trichoderma* sobre el crecimiento radial de monilia, las muestras de monilia sembradas en presencia de *Trichoderma* presentaron menor crecimiento radial que las muestras sembradas en ausencia de *Trichoderma* ($F_{1,8}$: 170,04; $p < 0,0001$; Tabla 7). Los resultados concuerdan con los obtenidos por Hoyos *et al* (2008), dichos resultados obedecen a un efecto antagonista de *Trichoderma* por medio de micoparasitismo, competencia por espacio/nutrientes y antibiosis, limitando por lo tanto el crecimiento del patógeno según lo señalado por Infante *et al* (2009), Michel (2001), Ezziyani (2004), Bernal *et al* (2001), Suarez (2009) y Fernández *et al* (2009).

Tabla 6

ANAVA y Prueba de Tukey al 5% para el crecimiento radial de *Moniliophthora roreri* bajo la influencia de *Trichoderma sp.*

| F.V. | S. C. | g.l. | C.M. | F | p | D.E. |
|----------------------------------|--------------|-------------|-------------|----------|----------|-------------|
| Influencia de <i>Trichoderma</i> | 12,61 | 1 | 12,61 | 170,04 | <0,0001 | 0,11 |
| Error | 0,59 | 8 | 0,07 | | | |
| Total | 13,20 | 9 | | | | |

| Influencia de Trichoderma | Crecimiento radial promedio (cm.) de <i>M. roreri</i> ± E.E |
|----------------------------------|--|
| Ausencia* | 3,21± 0,17 a |
| Presencia* | 0,96± 0,04 b |

Promedios con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

*Ausencia: cultivo de *M. roreri* en ausencia de *Trichoderma*

Presencia: cultivo de *M. roreri* en presencia de *Trichoderma*

Al expresar los resultados en términos de porcentaje de antibiosis de *Trichoderma sp.* sobre *Moniliophthora roreri* se determinó un 70% de antagonismo (Tabla 8), este resultado concuerda con lo expuesto por Pérez (2017) quien determinó porcentajes del 42 al 70 % de antagonismo *in vitro*.

Tabla 7

Análisis estadístico de la antibiosis de *Trichoderma sp.* sobre *Moniliophthora roreri*

| D.E: 4,87 | C.V: 6,99 | N: 5 | Antibiosis promedio (%) ± E.E |
|------------------|------------------|-------------|--------------------------------------|
| | | | 69,68± 2,18 |

A partir de las mediciones diarias del crecimiento radial, se obtuvo un modelo de regresión lineal de segundo orden (Tabla 9) que permitió determinar que el crecimiento radial de *Trichoderma* se diferencia del crecimiento radial de *Moniliophthora roreri* a los 1,9 días, luego de lo cual se reduce el crecimiento de *Moniliophthora roreri* en un 70% aproximadamente (Tablas 7 y 8; Figura 6).

Tabla 8

Modelos de regresión lineal y parámetros de validación obtenidos para el crecimiento radial de *M. roreri* bajo la influencia de *Trichoderma*

| Influencia | Modelo de regresión | R ² , p |
|------------|-------------------------|--------------------|
| 1* | $1,1E-03T^2+0.18T+0.62$ | 0,96;<0,0001 |
| 2* | $-0.01T^2+0.14T+0.71$ | 0,71;<0,0001 |

***Influencia 1:** cultivo de *M. roreri* en ausencia de *Trichoderma sp.*

***Influencia 2:** cultivo de *M. roreri* en presencia de *Trichoderma sp.*

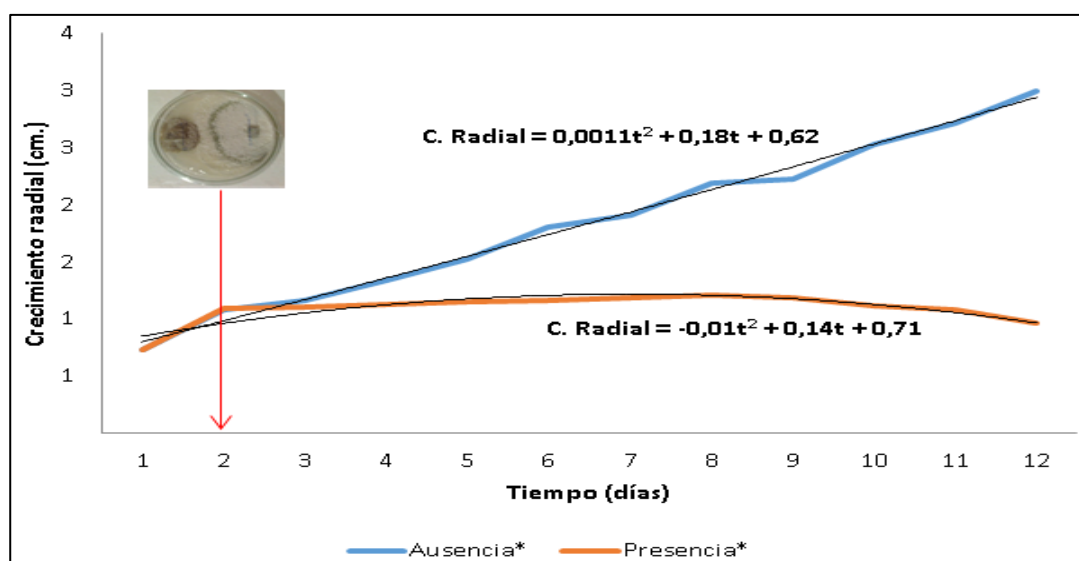


Figura 7 Crecimiento radial de *M. roreri* bajo la influencia de *Trichoderma sp.* con respecto al tiempo.

***Ausencia:** cultivo de *M. roreri* en ausencia de *Trichoderma*

***Presencia:** cultivo de *M. roreri* en presencia de *Trichoderma*

4.1.4 Pruebas *in vitro* de compatibilidad entre el controlador biológico *Trichoderma sp.* y diferentes coadyuvantes comerciales para aplicaciones agrícolas

No se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos según el ANAVA para el crecimiento radial de *Trichoderma sp.* sobre medio PDA adicionado con los diferentes coadyuvantes ($F_{3,12}$: 0,85; p :0,4929; Tabla 10). Tampoco se obtuvieron diferencias significativas

entre tratamientos según el ANAVA No Paramétrico para el nivel de esporulación de *Trichoderma sp.* sobre medio PDA adicionado con los diferentes coadyuvantes (H_3 : 0,76; p: 0,7980; Tabla 11).

Estos resultados sugieren que los coadyuvantes utilizados no afectan o modifican significativamente el crecimiento y esporulación de *Trichoderma sp.*, descartándose por lo tanto afectaciones morfológicas o fisiológicas graves a las células del hongo según lo expuesto por Corrales (1996), Ocaña (1959) y Calpouzos (1959). Falconí y Yáñez (2007), mencionan que la adición de productos tensioactivos y surfactantes a biopesticidas bacterianos mejora la adherencia de los mismos a la superficie de la planta, esto confirma que ciertos coadyuvantes químicos no limitan o afectan el desarrollo de productos de origen biológico.

Tabla 9

ANAVA y Prueba de Tukey al 5% para el crecimiento radial de *Trichoderma sp.* sobre medio PDA adicionado con los diferentes coadyuvantes

| F.V. | S. C. | g.l. | C.M. | F | p | D.E. |
|---|-------|------|--------|------|--------|-------|
| Tipo de coadyuvante adicionado al medio PDA | 0,01 | 3 | 0,0043 | 0,85 | 0,4929 | 0,062 |
| Error | 0,06 | 12 | 0,01 | | | |
| Total | 0,07 | 15 | | | | |

| Tipo de coadyuvante adicionado al medio PDA | Promedio del Crecimiento radial (cm.) de <i>Trichoderma sp.</i> ± E.E |
|---|---|
| Surfactante* | 4,47±0,03 a |
| Aceite agrícola* | 4,48±0,03 a |
| Adherente* | 4,52±0,02 a |
| Ninguno* | 4,54±0,05 a |

Promedios con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

* Adherente (ECUAFIX® 0.5 ml.l⁻¹).

* Surfactante (SPRAY AIDE® 0.3 ml.l⁻¹).

* Aceite mineral agrícola (COSMO OIL® 10 ml.l⁻¹).

*Ninguno.

Tabla 10

ANAVA no paramétrico (Kruskall Wallis) al 5% para el nivel de esporulación de *Trichoderma sp.* sobre medio PDA adicionado con los diferentes coadyuvantes

| g.l.: 3 | | H: 0,76 | p = 0,7980 | D.E: 0,855 |
|--|--|--|-----------------------|-------------------|
| Tipo de coadyuvante adicionado al medio PDA | | Nivel de Esporulaci3n de <i>Trichoderma sp.</i> | | |
| | | Mediana | Rango promedio | |
| Surfactante* | | 2,50 | 7,50 a | |
| Aceite agr3cola* | | 2,50 | 7,50 a | |
| Adherente* | | 3,00 | 9,13 a | |
| Ninguno* | | 3,00 | 9,88 a | |

Rangos promedio con una letra com3n no son significativamente diferentes (p>0,05)

* Adherente (ECUAFIX® 0.5 ml.l⁻¹).

* Surfactante (SPRAY AIDE® 0.3 ml.l⁻¹).

* Aceite mineral agr3cola (COSMO OIL® 10 ml.l⁻¹).

* Ninguno.

4.2 Fase de Campo

4.2.1 Incidencia de monilia sobre mazorcas asignadas con los diferentes tratamientos

A continuaci3n se muestran los resultados para la incidencia de monilia sobre mazorcas de diferentes edades.

Tabla 11
 ANAVA no paramétrico (Kruskall Wallis) al 5% para la incidencia de monilia en mazorcas de diferentes edades bajo los diferentes tratamientos

| Incidencia de monilia en mazorcas (%) | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|---------|-------------|--------|---------|-------------|-------|---------|-------------|-----------|-------|--------|-------|
| Tratamiento | Edad | | | | | | | | | | | |
| | < 1 mes | | | | 1 a 3 meses | | | | > 3 meses | | | |
| | g.l | H | P | D.E | g.l | H | P | D.E | g.l | H | P | D.E |
| | 5 | 21,42 | 0,0005 | 34,4 | 5 | 22,71 | 0,0003 | 31,38 | 5 | 11,75 | 0,0327 | 6,425 |
| | Mediana | Rango medio | | Mediana | Rango medio | | Mediana | Rango medio | | | | |
| Adherente* | 87,09 | 91,35 b | | 32,29 | 88,90 b | | 3,29 | 75,14 ab | | | | |
| Surfactante* | 90,19 | 83,54 b | | 44,44 | 87,85 b | | 4,63 | 84,14 abc | | | | |
| Aceite agrícola* | 25 | 44,76 a | | 0 | 48,56 a | | 1,73 | 70,09 a | | | | |
| Sin coadyuvantes* | 83,33 | 68,48 ab | | 11,11 | 57,46 a | | 3,21 | 75,25 ab | | | | |
| Químico* | 75 | 70,15 b | | 33,33 | 82,15 b | | 5,71 | 95,95 bc | | | | |
| Testigo* | 95,59 | 91,84 b | | 35,09 | 90,62 b | | 6,79 | 106,43 c | | | | |

Rangos promedio con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

***Adherente:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Adherente (ECUAFIX® 0.5 ml.l^{-1})

***Surfactante:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Surfactante (SPRAY AIDE® 0.3 ml.l^{-1})

***Aceite agrícola:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Aceite mineral agrícola (COSMO OIL® 10 ml.l^{-1})

***Sin coadyuvantes:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1})

***Químico:** Tratamiento químico convencionalmente usado por el agricultor (PHYTON® 0.60 ml.l^{-1})

***Testigo:** Testigo (ninguna aplicación)

Tabla 12
 ANAVA no paramétrico (Kruskall Wallis) al 5% para el promedio total de incidencia de monilia en mazorcas bajo los diferentes tratamientos

| Promedio total (%) | | | |
|--------------------|-------|-------------|-------|
| g.l | H | P | D.E |
| 5 | 22,59 | 0,0004 | 12,54 |
| Mediana | | Rango medio | |
| 13,51 | | 85,27 b | |
| 15,83 | | 85,63 b | |
| 6,75 | | 56,20 a | |
| 10,49 | | 73,30 ab | |
| 14,65 | | 91,61 bc | |
| 21,53 | | 115 c | |

Rangos promedio con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

***Adherente:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Adherente (ECUAFIX® 0.5 ml.l^{-1})

***Surfactante:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Surfactante (SPRAY AIDE® 0.3 ml.l^{-1})

***Aceite agrícola:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Aceite mineral agrícola (COSMO OIL® 10 ml.l^{-1})

***Sin coadyuvantes:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1})

***Químico:** Tratamiento químico convencionalmente usado por el agricultor (PHYTON® 0.60 ml.l^{-1})

***Testigo:** Testigo (ninguna aplicación)

4.2.1.1 Incidencia de monilia en mazorcas menores a un mes

Se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos según el ANAVA No Paramétrico para la incidencia de monilia en mazorcas menores a un mes ($H_5: 21,42$; $p: 0,0005$; Tabla 12). Los árboles de cacao sobre los que se aplicó el tratamiento *Aceite agrícola* mostraron la menor incidencia de monilia en mazorcas menores a un mes de edad (Cherelles Wilt). Falconí y Yáñez (2007), mencionan que el necrosamiento y caída prematura de frutos de cacao obedece, entre otras cosas, a la infección causada por *Moniliophthora roreri* y otras especies de hongos

saprófitos, lo cual indica que *Trichoderma sp.* ejerce un efecto antagonista efectivo sobre dichos hongos.

Los resultados concuerdan además con los obtenidos por Solís y Suarez (2006), quienes señalan que *Trichoderma* ejerce un efecto bioestimulante además de reducir las infecciones de monilia en frutos en estados iniciales de desarrollo, por otra parte los mismos autores mencionan que *Trichoderma* puede establecerse y sobrevivir sobre cojinetes florales, lo que se confirma en la presente investigación, al obtener una reducción en la aparición de Chermes Wilt como consecuencia de la acción antagonista de *Trichoderma sp.* al disminuir infecciones desde el cuajamiento del fruto.

4.2.1.2 Incidencia de monilia en mazorcas de uno a tres meses

Se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos según el ANAVA No Paramétrico para la incidencia de monilia en mazorcas de uno a tres meses de edad ($H_5: 22,71$; $p: 0,0003$; Tabla 12). Los árboles de cacao sobre los que se aplicó los tratamientos *Aceite agrícola* y *Sin coadyuvantes* mostraron la menor incidencia de monilia en mazorcas de uno a tres meses de edad, resultado que contrasta con la incidencia de monilia obtenida en mazorcas menores a un mes, puesto que los síntomas de infecciones en etapa de cuajamiento de frutos se observan entre 45 y 60 días después según Falconí y Yáñez (2007), Solís y Suarez (2006).

4.2.1.3 Incidencia de monilia en mazorcas mayores a tres meses

Se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos según el ANAVA No Paramétrico para la incidencia de monilia en mazorcas mayores a tres meses de edad ($H_5: 11,75$; $p=0,0327$; Tabla 12). Los árboles de cacao sobre los que se aplicó el tratamiento *Aceite agrícola* mostraron la menor incidencia de monilia en mazorcas mayores a tres meses de edad. De acuerdo a Falconí

(2007) citando a Bejarano (1961), las mazorcas mayores a tres meses de edad son mucho menos susceptibles a infecciones de monilia, sin embargo, en este estadio se observan los síntomas de infecciones en estadios tempranos de desarrollo, por lo que se evidencia la eficacia del tratamiento en la prevención de infecciones en etapas anteriores.

4.2.1.4 Incidencia total de monilia en mazorcas

Se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos según el ANAVA No Paramétrico para la incidencia de monilia en mazorcas de todas las edades (H_5 : 22,59; p: 0,0004; Tabla 12). Los árboles de cacao sobre los que se aplicó el tratamiento *Aceite agrícola* mostraron la menor incidencia de monilia en mazorcas de todas las edades. Este resultado coincide con Ocaña (1959), quien sugiere la capacidad coadyuvante del aceite agrícola al mejorar la capacidad antagonista de *Trichoderma sp.* en condiciones de campo (Figura 7).

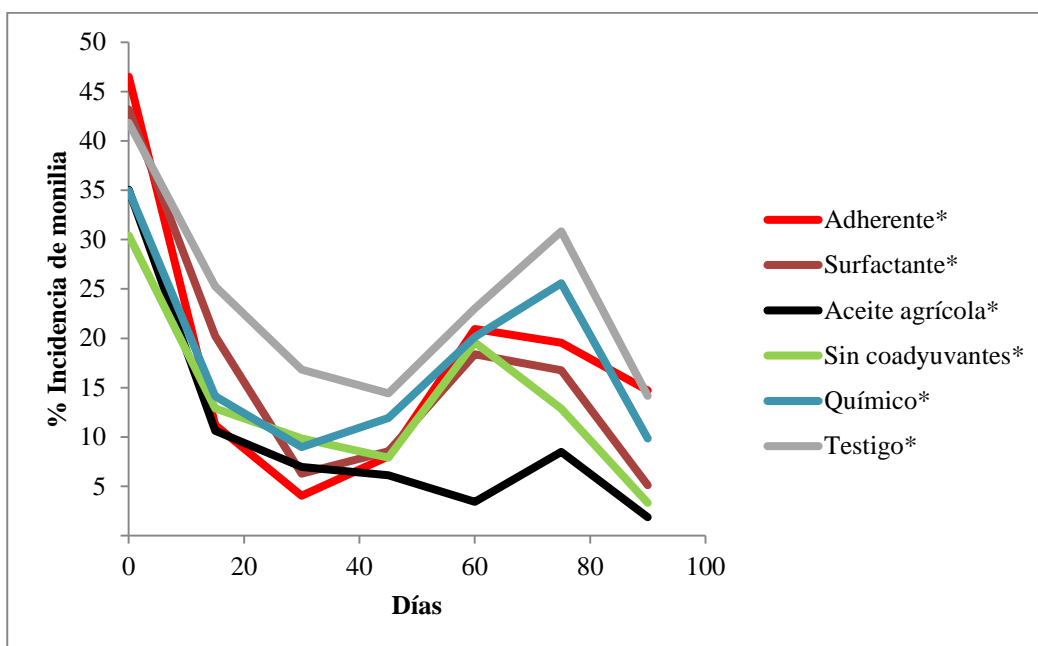


Figura 8 Incidencia total de monilia en función del tiempo para los diferentes tratamientos

***Adherente:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Adherente (ECUAFIX® 0.5 ml.l^{-1})

***Surfactante:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Surfactante (SPRAY AIDE® 0.3 ml.l^{-1})

***Aceite agrícola:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Aceite mineral agrícola (COSMO OIL® 10 ml.l^{-1})

***Sin coadyuvantes:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1})

***Químico:** Tratamiento químico convencionalmente usado por el agricultor (PHYTON® 0.60 ml.l^{-1})

***Testigo:** Testigo (ninguna aplicación)

4.2.2 Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE)

Se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos según el ANAVA No Paramétrico para el ABCPE (H_5 : 22,09; p : 0,0005; Tabla 13). El menor valor del ABCPE se obtuvo en árboles de cacao sobre los que se aplicó el tratamiento *Aceite agrícola*, la tendencia de los resultados obtenidos coincide con la descripción de Achicanoy (2000) quien menciona la utilización del ABCPE como método para cuantificar epidemias y determinar diferencias entre tratamientos.

Tabla 13

ANAVA no paramétrico (Kruskall Wallis) al 5% para el área bajo la curva del progreso de la enfermedad para los diferentes tratamientos

| g.l: 5 | H: 22,09 | p = 0,0005 | D.E: 58,42 |
|--|--|----------------|------------|
| Producto aplicado para el control de monilia | Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (% incidencia/días) | | |
| | Mediana | Rango promedio | |
| Aceite agrícola* | 462,61 | 2,50 | a |
| Sin coadyuvantes* | 657,08 | 6,50 | a b |
| Adherente* | 1120,63 | 10,50 | a b c |
| Surfactante* | 1963,24 | 14,75 | b c d |
| Químico* | 2114,69 | 18,50 | c d |
| Testigo* | 2283,96 | 22,25 | d |

Rangos promedio con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

***Adherente:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Adherente (ECUAFIX® 0.5 ml.l^{-1})

***Surfactante:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Surfactante (SPRAY AIDE® 0.3 ml.l^{-1})

***Aceite agrícola:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Aceite mineral agrícola (COSMO OIL® 10 ml.l^{-1})

***Sin coadyuvantes:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1})

***Químico:** Tratamiento químico convencionalmente usado por el agricultor (PHYTON® 0.60 ml.l^{-1})

***Testigo:** Testigo (ninguna aplicación)

4.2.3 Establecimiento y Supervivencia de *Trichoderma sp.* sobre mazorcas de cacao

A continuación se muestran los resultados para el establecimiento y supervivencia de *Trichoderma sp.* sobre mazorcas de cacao sobre las que se aplicó los distintos tratamientos.

Tabla 14

ANAVA no paramétrico (Kruskall Wallis) al 5% para el porcentaje de establecimiento y supervivencia de *Trichoderma* sp. sobre mazorcas de cacao bajo los diferentes tratamientos

| Tratamiento | Establecimiento de <i>Trichoderma</i> sobre mazorcas (%) | | | | Supervivencia de <i>Trichoderma</i> sobre mazorcas (Crecimiento radial a 7 días de incubación en medio E) | | | |
|-------------------|--|-------------|-----------|-----------|---|-------------|-----------|-------------|
| | g.l:3 | H: 11,91 | P= 0,0034 | D.E: 2,50 | g.l: 3 | H: 11,12 | P= 0,0110 | D.E: 0,0187 |
| | Mediana | Rango medio | | | Mediana | Rango medio | | |
| Adherente* | 80,00 | 10 ab | | | 1,58 | 9,50 ab | | |
| Surfactante* | 60,00 | 5,50 a | | | 1,06 | 4,13 a | | |
| Aceite agrícola* | 100,00 | 14,50 b | | | 2,82 | 14,50 b | | |
| Sin coadyuvantes* | 60,00 | 4,00 a | | | 1,20 | 5,88 a | | |

Rangos promedio con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

***Adherente:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Adherente (ECUAFIX® 0.5 ml.l^{-1})

***Surfactante:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Surfactante (SPRAY AIDE® 0.3 ml.l^{-1})

***Aceite agrícola:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Aceite mineral agrícola (COSMO OIL® 10 ml.l^{-1})

***Sin coadyuvantes:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1})

4.2.3.1 Establecimiento de *Trichoderma sp.* sobre mazorcas de cacao

Se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos según el ANAVA No Paramétrico para el establecimiento de *Trichoderma* sobre mazorcas de cacao (H_3 : 11,91; p : 0,0034; Tabla 14). Los árboles sobre los que se aplicó el tratamiento *Aceite agrícola* mostraron el mayor establecimiento de *Trichoderma* sobre mazorcas de cacao. Los resultados obtenidos superan el establecimiento de *Trichoderma* sobre mazorcas de cacao obtenido por Solís y Suarez (2006) al utilizar Tween 20 (0,05% v/v) como coadyuvante. Esto confirma lo expuesto por Ocaña (1959), quien indica que el *aceite agrícola* permite ubicar partículas de agroquímicos en los espacios intercelulares de la epidermis de las mazorcas, en este caso se aplicó el mecanismo descrito para las esporas de *Trichoderma* permitiéndoles establecerse de mejor manera al evitar pérdidas por lavado o desecamiento (Figura 8).

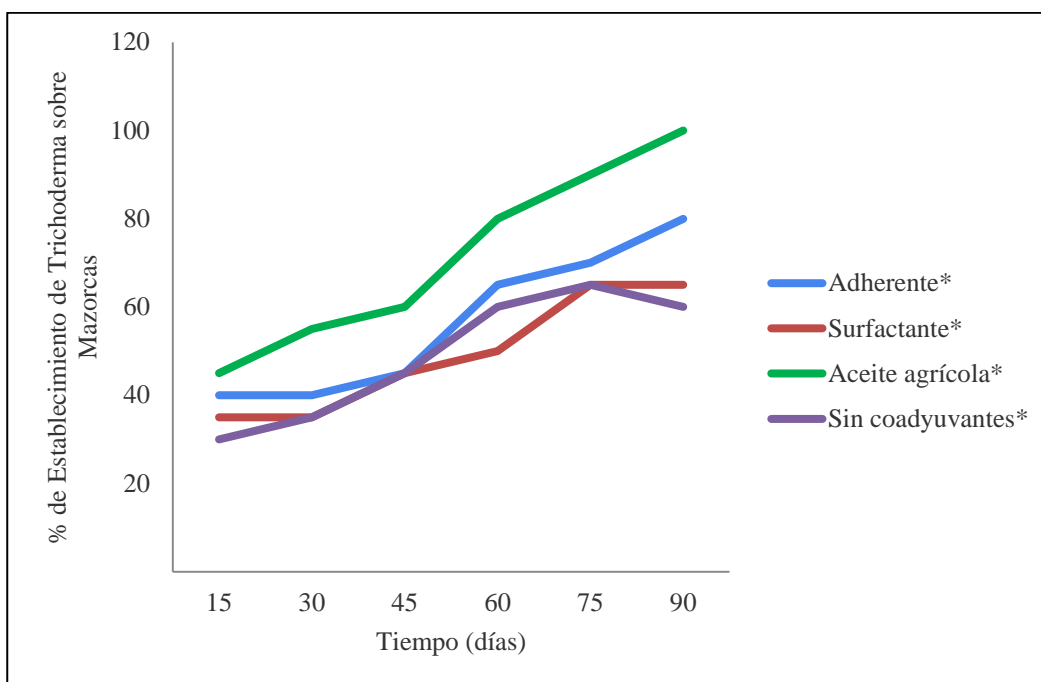


Figura 9 Establecimiento de *Trichoderma sp.* sobre mazorcas de cacao en función del tiempo

***Adherente:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Adherente (ECUAFIX® 0.5 ml.l^{-1})

***Surfactante:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Surfactante (SPRAY AIDE® 0.3 ml.l^{-1})

***Aceite agrícola:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Aceite mineral agrícola (COSMO OIL® 10 ml.l^{-1})

***Sin coadyuvantes:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1})

4.2.3.2 Supervivencia de *Trichoderma sp.* sobre mazorcas de cacao

Se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos según el ANAVA no paramétrico para la supervivencia de *Trichoderma* sobre mazorcas de cacao (H_3 : 11,12; p : 0,0110; Tabla 14). Los árboles sobre los que se aplicó el tratamiento *Aceite agrícola* mostraron mayor supervivencia de *Trichoderma* sobre mazorcas de cacao que los demás tratamientos. Esto sugiere la capacidad del aceite agrícola de posibilitar el desarrollo de *Trichoderma* al evitar las pérdidas de esporas en

la superficie de las mazorcas por lavado o desecamiento, permitiendo mantener las esporas viables durante el tiempo necesario para que estas germinen e inicien su crecimiento, se confirma además que el aceite agrícola a la dosis indicada no presenta toxicidad para *Trichoderma* (figura 9).

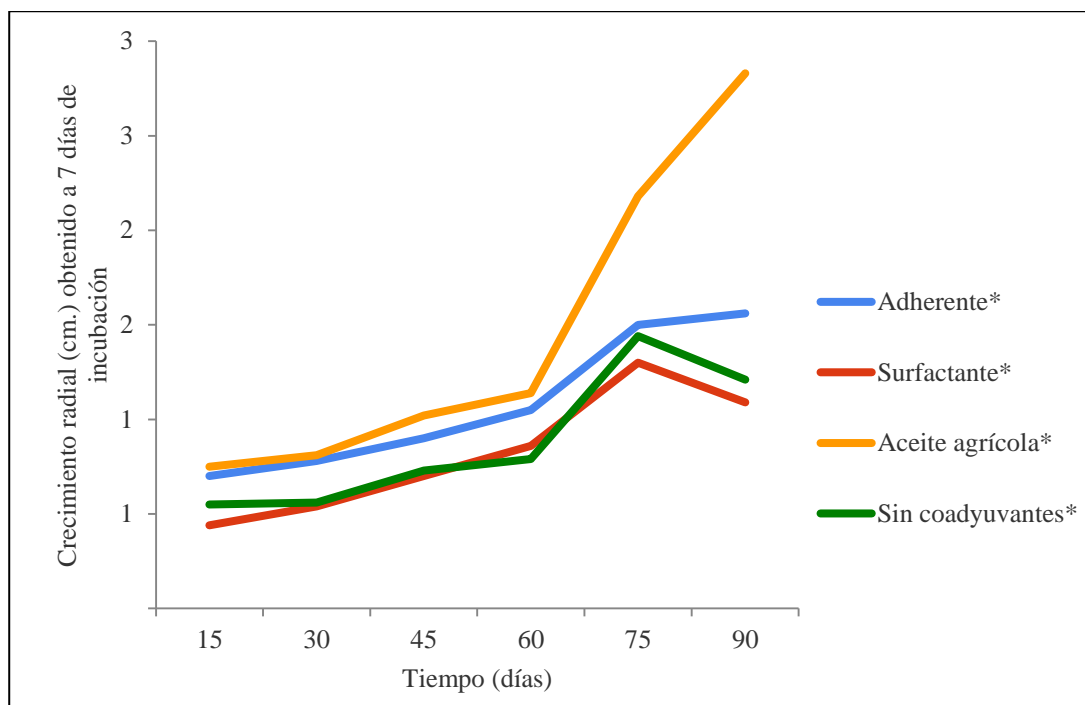


Figura 10 Supervivencia de *Trichoderma* sp. (crecimiento radial a 7 días de incubación) sobre mazorcas de cacao en función del tiempo

***Adherente:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Adherente (ECUAFIX® 0.5 ml.l^{-1})

***Surfactante:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Surfactante (SPRAY AIDE® 0.3 ml.l^{-1})

***Aceite agrícola:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) + Aceite mineral agrícola (COSMO OIL® 10 ml.l^{-1})

***Sin coadyuvantes:** Suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1})

4.2.4 Análisis de correlación de Pearson entre las variables evaluadas

Se obtuvo una correlación positiva entre el establecimiento y la supervivencia de *Trichoderma sp.* sobre mazorcas de cacao (Tabla 15). Una correlación negativa entre el establecimiento de *Trichoderma sp.* y la incidencia de monilia sobre mazorcas de cacao (Tabla 15). Una correlación negativa entre la incidencia de monilia y la supervivencia de *Trichoderma sp.* sobre mazorcas de cacao (Tabla 15). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Solís y Suarez (2006) quienes indican que el establecimiento de *Trichoderma* sobre mazorcas coincide con una reducción de la incidencia de monilia.

Tabla 15

Análisis de correlación de Pearson al 5% entre el Porcentaje de establecimiento de Trichoderma sp., Incidencia de monilia y Supervivencia de Trichoderma sp. sobre mazorcas de cacao

| | Establecimiento de <i>Trichoderma sp.</i> (%) | Incidencia de monilia (%) | Supervivencia de <i>Trichoderma sp.</i> (Crec. radial a 7 días de incubación) |
|--|--|----------------------------------|--|
| Establecimiento de <i>Trichoderma sp.</i> (%) | 1,00 | -0.06* | 0.81*** |
| Incidencia de monilia (%) | -0.06* | 1,00 | -0.12* |
| Supervivencia de <i>Trichoderma sp.</i> (Crec. radial a 7 días de incubación) | 0.81*** | -0.12 | 1,00 |

*, **, *** Significancia al 5, 1 y 0.01% respectivamente

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Al realizar pruebas de antagonismo *in vitro* entre el controlador biológico *Trichoderma sp.* y el hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* se determinó que *Trichoderma sp.* ejerce un efecto antagonista frente al hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri*, limitando su desarrollo en un 70% aproximadamente.
- Al realizar pruebas de compatibilidad *in vitro* entre el controlador biológico *Trichoderma sp.* y los coadyuvantes para aspersiones agrícolas Ecuafix®, Sprayaide® y COSMO OIL® no se encontró una influencia o afectación significativa de estos productos sobre el desarrollo y esporulación de *Trichoderma sp.*
- Al evaluar el efecto de los coadyuvantes para aspersiones agrícolas Ecuafix®, Sprayaide® y COSMO OIL® sobre el establecimiento, supervivencia y capacidad antagonista de *Trichoderma sp.* frente a *Moniliophthora roreri* sobre mazorcas de cacao, en condiciones de campo, se obtuvieron los mejores resultados al utilizar aceite agrícola COSMO OIL® (10 ml.l⁻¹).

5.2 Recomendaciones

- Se recomienda la aplicación foliar de una suspensión de *Trichoderma* en agua (1×10^8 esporas. ml^{-1}) adicionada con aceite agrícola COSMO OIL® (10 ml.l^{-1}) cada 15 días, así como realizar las respectivas labores de poda, control de sombra, remoción de mazorcas enfermas y fertilización oportunas para mantener la incidencia de monilia en alrededor del 10%.

5.3 Bibliografía

Achicanoy H. 2000. Descripción cuantitativa de las epidemias de las plantas. Revista de la Facultad Nacional de Agonomía Universidad de Medellín, 53(1), 941-968

AMERICA ECONOMÍA. (2014). Ecuador se instala como uno de los cinco mayores productores de cacao del mundo. AMERICA ECONOMIA. Recuperado de: <https://www.americaeconomia.com/negocios-industrias/produccion-de-cacao-aumenta-en-latinoamerica>

Abdallah M., Abdullah N., Shaban R., Abdurahman H., Ashraf A., Ali H. 2017. Antimicrobial activity and green synthesis of silver nanoparticles using *Trichoderma viride*. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 30(2), 1-7

Álvarez J., Martínez S., Coy J. 2014. Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia (tesis de pregrado). Universidad EAFIT, Medellín, Colombia

ANECACAO. 2016. Historia del cacao. Ecuador. Recuperado de: <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/historia-del-cacao.htm3>

Arévalo E., Zúñiga L., y Arévalo C. 2004. Manejo Integrado del Cultivo de Cacao y Transferencia de Tecnología en la amazonía peruana. Chiclayo, Perú. 184 p.

- Arias, L. Piñeros, P. 2008. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde (tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia
- Argumedo R., Ferrera C., Peña J. 2009. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 25 (4), 257-269
- Batista, L.; 2009. Guía Técnica el Cultivo de Cacao en la República Dominicana. CEDAF, 250pp. Recuperado de: <http://www.cedaf.org.do/publicaciones/guias/download/cacao.pdf>
- Biosiembra. 2017. Folleto Técnico de *Trichoderma*. Recuperado de: <http://www.biosiembra.com/>
- Bernal A et al. 2001. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium oxysporum*. *Centro Agrícola* 28(2):30-32
- Buitrón R. 2002. Evaluación de materiales de soporte para la formulación de la bacteria antagonista *Bacillus subtilis* para el control de moniliasis en cacao (tesis de pregrado). Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Carrera K., Mosquera L., Leiva M. 2014. Protocolo para el aislamiento de *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) en frutos de cacao cv. 'Nacional' de la Amazonía ecuatoriana (tesis de pregrado). Universidad Estatal Amazónica, Puyo, Ecuador.
- Chávez M. 2006. Producción de *Trichoderma* sp. y evaluación de su efecto en el cultivo de Crisantemo (tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

- Chaves M. 1995. Los Coadyuvantes: Clave del Éxito en la Aplicación Efectiva y Eficiente de Plaguicidas. Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar. San José, Costa Rica.
- Chiriboga F. 2003. Determinación del tiempo de sobrevivencia de tres bacterias antagonistas de *M. royeri* sobre mazorcas de cacao mediante técnicas serológicas (tesis de pregrado). Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Cobos, M. 2010. Evaluación de cepas nativas de *Trichoderma* spp. para el control de *Sigatoka* Negra (*Paracercospora fijiensis* M.) en el cultivo de banano (*Musa paradisiaca*) en fase de laboratorio (tesis de pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Santo Domingo, Ecuador
- Corrales M. 1996. Evaluación de microorganismos antagonistas al hongo *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet), colocados en el interior y exterior de la planta de banano. *Agronomía Colombiana*, 26(2), 256-265
- D'Arcy C., Eastburn D., Schumann G. 2001. Illustrated Glossary of Plant Pathology. The Plant Health Instructor. doi: 10.1094/PHI-I-2001-0219-01
- EDIFARM. 2017. Vademécum agrícola. Edifarm: División de publicaciones técnicas, Quito, Ecuador. Recuperado de: https://issuu.com/edifarm/docs/vademecum_agricola_edifarm_xiv_edic
- Enríquez G. 2004. Cacao orgánico, guía para productores ecuatorianos. INIAP. Manual No 54, Quito, Ecuador. Recuperado de: <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4571>

- Ezziyyani M., Pérez C., Ahmed S., Requena M., Candela M. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). *Anales de Biología*, 26: 35-45
- Falconí C., Yáñez V. 2007. Validación de biopesticidas para el control de la moniliasis y manejo sustentable del cacao fino y de aroma en el Ecuador. Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Fundación Hondureña de investigación Agrícola. 2012. Guía técnica para el Cultivo de cacao bajo sombra de maderables o frutales. Honduras. Recuperado de: http://www.fhia.org.hn/downloads/cacao_pdfs/cultivo_de_cacao_bajo_sombra_de_maderables_o_frutales.pdf
- García C. 2007. Guía de campo: Identificación de cultivares de cacao. World Cocoa Foundation, 32 p.
- González V. 2000. Evaluación de la capacidad de biocontrol de una cepa nativa de *Trichoderma* spp. contra *Botrytis cinérea* en lechugas cultivadas en mesas flotantes (tesis de pregrado). Universidad de Talca, Talca, Chile.
- Guerrero, R. 2016. Pruebas de eficiencia in vitro y bajo invernadero de cepas de *Trichoderma* spp. Para el control de *Phytophthora infestans* en el cultivo de papa *Solanum tuberosum* (tesis de pregrado). Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Guest D. 2007. Black pod: diverse pathogens with a global impact on cocoa yield. *Phytopathology*, 97(1), 1650-1653

- Hernández T., Montoya R. 1987. Epidemiología cuantitativa y su aplicación al análisis de algunas enfermedades de cultivos tropicales. Recuperado de: <http://repiica.iica.int/docs/B4116e/B4116e.pdf>
- Hoyos et al. 2008. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. *Revista colombiana de ciencias hortícolas*, 2(1), 76-86
- Infante D., Martínez B., González N., Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Protección Vegetal*, 24(1), 14-21
- Kruskal W., Wallis W. 1952. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260), 583-621
- Leandro M. 2006. Nuevas estrategias para la conservación in vitro de la diversidad genética del hongo *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et al (tesis de pregrado). Instituto Tecnológico de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Levene, H. (1960), In *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*, Stanford University Press, Stanford, California 517 p.
- M & O CONSULTING S.A.C. Empresa Consultora. 2008. Estudio de caracterización del potencial genético del cacao en el Perú. Lima, Perú. Recuperado de: http://minagri.gob.pe/portal/download/pdf/direccionesyoficinas/dgca/estudio_caracterizacion.pdf

- Mendoza C. 2013. El cultivo de cacao, opción rentable para la selva. Equipo técnico del Programa Selva Central. Lima, Perú. Recuperado de: <http://infocafes.com/descargas/biblioteca/343.pdf>
- Michel A. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp., su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum*) (tesis de pregrado). Universidad de Colima, México.
- Moya, J. et al. 2014. Aislamiento de cepas de *Trichoderma* de suelos, sustratos y raíces de plantas en invernaderos en la República Dominicana. *Revista APF*, 3(2),11-16.
- Ocaña G. 1959. Estudios Preliminares Sobre la Acción del Aceite Agrícola en el Combate de *Phytophthora palmívora* en Cacao (tesis de postgrado). IICA, Turrialba, Costa Rica.
- Osorio R. 2010. Estudio del efecto de *Trichoderma harzianum* en el control de *Moniliophthora roreri* en plantas de *Theobroma cacao* en la provincia de Esmeraldas (tesis de pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- Páez T., Ruales C. 2003. Propagación de *Moniliophthora Roreri* (tesis de pregrado). Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Paredes M. 2003. Manual de cultivo del cacao. Ministerio de agricultura, Programa para el desarrollo de la amazonia Proamazonia, Perú. Recuperado de: <http://www.infocafes.com/descargas/biblioteca/215.pdf>

- Peñaherrera S. 2013. Combinación de agentes biológicos para el control de enfermedades del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L.) (tesis de pregrado). Universidad Estatal de Quevedo, Quevedo, Ecuador.
- Pérez E., Bernal A., Milanés P., Leiva M., Sierra Y., Cupull R. 2017. Actividad antagónica de *Trichoderma harzianum* sobre el agente causal del tizón del arroz (*Pyricularia grisea*). *Centro Agrícola*, 44(3)
- PROECUADOR. 2013. Análisis del sector cacao y elaborados. Recuperado de: http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2016/06/PROEC_AS2013_CACAO.pdf
- Quiroz J., Agama J. 2006. Programa de capacitación en la cadena productiva de cacao. Quito, Ecuador. Recuperado de: <http://www.camaren.org/produccion-el-cultivo-del-cacao/>
- Rivas M., Pavone D. 2010. Diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de *Theobroma cacao* L. del estado Carabobo, Venezuela, y su capacidad biocontroladora sobre *Crinipellis perniciosa*. *INTERCIENCIA*, 35(10), 777-7783
- Romero O., Huerta M., Damián M., Domínguez F., Hernández L., Arellano D. 2009. Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *REVISTA COLOMBIANA DE BIOTECNOLOGÍA*, 11(2), 143-151
- Shapiro S., Wilk M. 1965. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, 52(4), 591-611

- Solis K., Suárez C. 2006. Uso de *Trichoderma* spp para control del complejo Moniliasis-Mazorca negra del cacao en Ecuador. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Tropical Pichilingue, Departamento Nacional de Protección Vegetal. Quevedo, Los Ríos, Ecuador.
- Suárez C., Delgado J. 1993. Moniliasis del cacao. FUNDAGRO, Quito, Ecuador.
- Suarez C. 2009. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología* 10(2), 35-43.
- Suarez L., Rangel A. (2014). Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Acta Agronomica*, 370-378.
- Tondje P., Roberts D., Bon M., Widmer T., Samuels G., Ismaiel A., Begoude A., Tchana T., Nyemb-Tshomb E., Ndoumbe-Nkeng M., Bateman R., Fontem D., Hebbbar K. 2007. Aislamiento e identificación de aislamientos de *Trichoderma asperellum* con potencial para la supresión de la monilia del cacao en Camerún. *ELSEVIER* 43(2), 202-212
- Torres L. 2012. Manual de producción de cacao fino de aroma a través de manejo ecológico (tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.