

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO  
DEPARTAMENTO DE DE CIENCIAS DE LA VIDA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
SANTO DOMINGO**

**“VALIDACIÓN DE BIOPESTICIDAS EN BASE A BACTERIAS EPÍFITAS  
PARA EL CONTROL DE LA MONILIASIS (*Moniliophthora roreri* Cif y Par.  
Evans *et al.*) EN EL CULTIVO DE CACAO HÍBRIDO CCN 51 EN SANTO  
DOMINGO, PROVINCIA SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS”**

**BYRON AURELIO ROBLES PÁRRAGA**

**INFORME DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO COMO  
REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO  
AGROPECUARIO.**

**SANTO DOMINGO – ECUADOR**

**2008**

**“VALIDACIÓN DE BIOPESTICIDAS EN BASE A BACTERIAS EPÍFITAS  
PARA EL CONTROL DE LA MONILIASIS (*Moniliophthora roreri* Cif y Par.  
Evans *et al.*) EN EL CULTIVO DE CACAO HÍBRIDO CCN 51 EN SANTO  
DOMINGO, PROVINCIA SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS”**

**BYRON AURELIO ROBLES PÁRRAGA**

**REVISADO Y APROBADO**

---

**MYO. ESP. ING. RENÉ GONZÁLEZ V.  
DIRECTOR DE CARRERA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

---

Ing. César Falconí S.  
**DIRECTOR**

---

Ing. Gustavo Núñez J.  
**CODIRECTOR**

---

Ing. Vinicio Uday  
**BIOMETRISTA**

**CERTIFICO QUE ESTE TRABAJO FUÉ PRESENTADO EN ORIGINAL  
(EN MEDIO MAGNETICO) E IMPRESO EN DOS EJEMPLARES.**

---

**SECRETARÍA ACADÉMICA**

**“VALIDACIÓN DE BIOPESTICIDAS EN BASE A BACTERIAS EPÍFITAS PARA EL CONTROL DE LA MONILIASIS (*Moniliophthora roreri* Cif y Par. Evans *et al.*) EN EL CULTIVO DE CACAO HÍBRIDO CCN 51 EN SANTO DOMINGO, PROVINCIA SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS”**

**BYRON AURELIO ROBLES PÁRRAGA**

**APROBADO POR LOS SEÑORES MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN DEL INFORME TÉCNICO**

	<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>FECHA</b>
Ing. César Falconí S. <b>DIRECTOR</b>	_____	_____
Ing. Gustavo Núñez J <b>CODIRECTOR</b>	_____	_____

**CERTIFICO QUE ESTAS CALIFICACIONES FUERON PRESENTADAS EN ESTA SECRETARÍA.**

---

**SECRETARÍA ACADÉMICA**

## DEDICATORIA

A Dios, a Jesús del Gran Poder y la Virgen María, a quienes amo y han hecho en mí grandes milagros que me han permitido seguir en este mundo.

A mis padres, **AURELIO** y **ARMANDINA** que han sabido guiar mi vida tanto personal como académica, y siempre brindarme su apoyo incondicional en las buenas y en las malas, y demostrarme que en la vida todo se puede conseguir con sacrificio, dedicación y esfuerzo.

A mis abuelitos **CELIA** y **AURELIO** que desde el cielo me han estado apoyando y guiando con su sabiduría y amor divino, a quienes le agradezco mucho por todo lo que soy en la vida.

A mi director y codirector, **CÉSAR** y **GUSTAVO** que me han guiado con toda la sabiduría y paciencia del mundo para cumplir una meta más en mi vida.

A mi gordita **KATTHY** la mujer que amo, quien me apoyó de una forma desinteresada para culminar esta etapa de mi carrera con sus consejos y su voz de aliento, Gracias **BEBÉ**, **Te amo mucho mucho.**

A mis niños consentidos **NICOLÁS** y **ROMMYNA** con quienes he pasado momentos muy alegres y gratificantes para inspirarme con su amor y ternura en el desarrollo de esta investigación.

## **AGRADECIMIENTO**

Al finalizar una etapa más en mi vida mi agradecimiento especial es a Dios por iluminar mi camino con su gracia divina.

A mis padres por brindarme su apoyo y darme ese ejemplo de superación en mi vida profesional, además de inculcarme valores de respeto, honestidad, lealtad, puntualidad y responsabilidad.

A mis hermanos KARINA y MARCOS por estar en las buenas y en las malas en todo momento en el transcurso de esta investigación, y apoyarme de una u otra forma.

A mi gordita linda que su ayuda y apoyo fue muy importante e indispensable para mí en todo este tiempo; gracias por darme todo su amor, confianza y apoyo, ¡ **¡TE AMO NENA LINDA!!**

Al Ing. César Falconí un gran investigador a quien respeto y admiro en alto grado por permitirme trabajar en el desarrollo de este proyecto investigativo.

Al Ing. Gustavo Núñez un excelente docente de la ESPE a quien le agradezco por guiarme y recomendarme de una forma acertada en el desarrollo de esta investigación.

A la Lic. Viviana Yáñez una excelente amiga quien con su paciencia inagotable supo ayudarme y transmitirme sus conocimientos.

Al personal técnico que labora en la Hacienda San Antonio, en el área de cacao que me apoyaron en el desarrollo de la parte de campo de esta investigación con el personal y materiales de una forma desinteresada.

A mi familia que de alguna u otra forma me han apoyado en mis estudios, y han sido un soporte de aliento, siendo esto fundamental en la culminación de mi carrera.

**GRACIAS MI DIOS.**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>CONTENIDO</b>	<b>Pág.</b>
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVOS	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1. El cultivo de cacao	6
2.1.1. Generalidades	6
2.1.2. Producción	12
2.1.3. Ecología del cultivo	17
2.2. Enfermedades del cultivo de cacao	21
2.2.1. Generalidades	21
2.2.2. Moniliasis	26
2.2.2.1. Historia y distribución geográfica	26
2.2.2.2. Morfología y fisiología del hongo	27
2.2.2.3. Impacto económico	28
2.2.2.4. Taxonomía	29
2.2.2.5. Hospedantes	30
2.2.2.6. Ciclo de vida y proceso infeccioso	30
2.2.2.7. Sintomatología	32
2.2.2.8. Epidemiología	34
2.3. Manejo de la moniliasis	35
2.3.1. Prácticas fitosanitarias	35
2.3.2. Control químico	37
2.3.3. Control genético y resistencia	38
2.4. Control biológico	39
2.4.1. Generalidades	39
2.4.2. Biopreparados	43
2.4.2.1. Características de <i>Bacillus subtilis</i>	43
2.4.2.2. Características de <i>Pseudomona cepacia</i>	45

2.4.2.3.	Mecanismo de acción de los biocontroladores	48
2.4.2.4.	Producción y formulación de biopreparados a base de <i>Pseudomonas cepacia</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	51
2.4.2.5.	Validación de biopreparados	60
2.4.3.	Control químico	61
2.4.3.1.	Características de cuprofix	61
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	64
3.1.	Ubicación política	64
3.2.	Ubicación geográfica	64
3.3.	Materiales	65
3.3.1.	Materiales de laboratorio	65
3.3.2.	Materiales de campo	66
3.4.	Métodos	68
1.	Características del campo experimental	68
2.	Periodo de estudio y características agroclimáticas	68
3.	Factores en estudio	69
4.	Tratamientos	69
5.	Repeticiones	70
6.	Procedimiento	70
7.	Liberación de biopreparados en el campo	74
8.	Producción de biopreparados	79
9.	Control de calidad de biopreparados	82
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
4.1.	Efecto de los biopreparados en la producción acumulada de almendra	85
4.1.1	Efecto de biopreparados para el peso total acumulado de almendra	85
4.1.2	Efecto de biopreparados para el peso dañado acumulado de almendra	86

4.2. Efecto de biopreparados sobre el porcentaje de daño interno de almendra	90
4.3. Análisis económico de los tratamientos	92
4.4. Determinación del ABCPE	95
4.5. Correlaciones entre factores medioambientales	96
5. CONCLUSIONES	99
6. RECOMENDACIONES	101
7. RESÚMEN	103
8. SUMMARY	105
9. BIBLIOGRAFÍA	107
10. ANEXOS	119

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO N°</b>	<b>Pág.</b>
Cuadro 1. Producción mundial de cacao (2000-2003).Producción de cacao por país, expresado en toneladas métricas.	14
Cuadro 2. Características agroclimáticas (fase de laboratorio)	68
Cuadro 3. Características agroclimáticas (fase de campo)	69
Cuadro 4. Tratamientos en estudio	70
Cuadro 5. Esquema del ADEVA	72
Cuadro 6. Resultado de dos evaluaciones del control de calidad del biopreparado Basubtill en base a Vermiculita	84
Cuadro 7. Resultado de dos evaluaciones del control de calidad del biopreparado Cepacide en base a Turba de Chimborazo	84
Cuadro 8. Análisis de Variancia (ANOVA) del peso total acumulado de almendra de cacao híbrido CCN – 51 por efecto de los biopreparados Basubtil, Cepacide y el tratamiento químico con Cuprofix en un lote experimental de la Hda. San Antonio, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas (Noviembre 2007 – Mayo 2008).	85

- Cuadro 9. Promedios del peso total acumulado de cacao híbrido CCN – 51 por efecto de los biopreparados Basubtil, Cepacide y el tratamiento químico Cuprofix en un lote experimental de la Hda. San Antonio, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas (Noviembre 2007 – Mayo 2008). 86
- Cuadro 10. Análisis de Variancia (ANOVA) del peso dañado acumulado de almendra de cacao híbrido CCN – 51 por efecto de los biopreparados Basubtil, Cepacide y el tratamiento químico Cuprofix en un lote experimental de la Hda. San Antonio, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas (Noviembre 2007 – Mayo 2008). 87
- Cuadro 11. Promedio del peso acumulado de almendra dañada de cacao híbrido CCN – 51 por efecto de los biopreparados Basubtil, Cepacide y el tratamiento químico Cuprofix en un lote experimental de la Hda. San Antonio, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas (Noviembre 2007 – Mayo 2008). 87
- Cuadro 12. Análisis de variancia (ANOVA) del porcentaje de daño interno de cacao CCN -51 debido a la aplicación de los biopreparados Basubtil, Cepacide y el tratamiento químico Cuprofix en un lote experimental

de la Hda. San Antonio, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas (Noviembre 2007 – Mayo 2008). 90

Cuadro 13. Promedio del porcentaje de daño interno de las almendras de cacao híbrido CCN – 51 por efecto de los biopreparados Basubtil, Cepacide y el tratamiento químico Cuprofix en un lote experimental de la Hda. San Antonio, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas (Noviembre 2007 – Mayo 2008). 91

Cuadro 14. Cálculo del presupuesto parcial. Proyección de rendimientos en base al año 2007 y reducción de costos de producción de biopreparados en un experimento en cacao híbrido CCN – 51 por efecto de los tratamientos biológicos Basubtil, Cepacide y el químico Cuprofix en el lote experimental de la Hda. San Antonio, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas (Noviembre 2007 – Mayo 2008). 93

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura N°</b>	<b>Pág.</b>
Figura 1. Ciclo de vida del hongo <i>Moniliophthora roreri</i>	31
Figura 2. Mapa de la ubicación geográfica del área experimental	65
Figura 3. Dimensiones de la parcela total	71
Figura 4. Dimensiones de la parcela útil	72
Figura 5. (A) Poda de mantenimiento y (B) Poda fitosanitaria del lote experimental de cacao híbrido CCN – 51	76
Figura 6. (A) Aplicación de biopreparados Basubtill y Cepacide y (B) Aplicación de Producto químico Cprofix	78
Figura 7. Aislados puros. (A) <i>Pseudomona cepacia</i> y (B) <i>Bacillus subtilis</i>	80
Figura 8. Inoculación de caldo bacteriano a soporte de Turba y Chimborazo	81
Figura 9. Pureza de biopreparados. (A) Basubtill y (B) Cepacide	83
Figura 10. Producción acumulada de almendra sana y dañada de cacao Híbrido CCN – 51 con los biopreparados Basubtill, Cepacide y el tratamiento químico con Cuprofix en un lote experimental de la Hda. San	

Antonio, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas  
(Noviembre 2007 – Mayo 2008). 88

Figura 11. Efecto de los biopreparados Cepacide y Basubtil y del funguicida Cuprofix en el peso total acumulado de almendra de cacao híbrido CCN - 51, desde noviembre 2007 – mayo 2008, en un lote experimental de la Hda. San Antonio, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas 89

Figura 12. Medias del porcentaje de daño interno de almendra de cacao híbrido CCN – 51 por efecto de los biopreparados Basubtil, Cepacide y el tratamiento con el químico Cuprofix en un lote experimental de la Hda. San Antonio, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas (Noviembre 2007 – Mayo 2008). 91

Figura 13. Área Bajo la Curva de Progreso de la Moniliasis/Enfermedad (ABCPE) por efecto de dos productos biológicos y un producto químico en cacao CCN-51, Hda. San Antonio, Sto. Domingo de los Tsáchilas, 2008 95

Figura 14. Reportes climatológicos de los promedios mensuales tomados de la Estación Meteorológica Puerto Ila (Luz de América, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas) durante la fase experimental noviembre 2007

– mayo 2008. En (A) niveles de precipitación, (B) registros de temperatura y (C) porcentajes de humedad. 97

Figura 15. Correlaciones del porcentaje de Incidencia de la moniliasis y los factores medioambientales durante la fase experimental noviembre 2007 – mayo 2008 en la Hda. San Antonio Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas. (A) Correlación con la Temperatura, (B) Correlación con la Precipitación y (C) Correlación con la Humedad. 98

## I. INTRODUCCIÓN

El Ecuador ha sido por historia uno de los principales productores de cacao fino y de aroma a escala mundial, en la actualidad produce aproximadamente el 70 % de la producción mundial. Este producto ha tenido importantes contribuciones para la economía nacional, debido a que genera empleo para una gran cantidad de personas del sector rural, se estima que aproximadamente 510 mil personas se encuentran vinculadas en esta actividad (Lastra, 2004). Con respecto a los ingresos al país debido a las exportaciones que se han realizado en los últimos años se han observado que han sido superiores a los años anteriores; en el 2000 se exportaron 74 millones de dólares, mientras que para el 2005 la cifra ascendió a 220 millones de dólares (Anecacao, 2006; MAG 2006).

El cacao en nuestro país es cultivado en su mayoría por pequeños y medianos agricultores, quienes son de bajos recursos y no poseen un servicio de transferencia de tecnología adecuado, por tanto los rendimientos son lejanos a 300 kg/ha. Por su parte, en fincas seleccionadas el promedio puede sobrepasar la producción de 1 000 kg/ha (Enríquez, 2004).

En el último censo nacional realizado por el INEC se aprecia que el Ecuador cuenta con una superficie total de 434 418 hectáreas del cultivo de cacao, de las cuales una de las principales causas para la pérdida de la producción es la presencia de enfermedades, con 5 498 hectáreas afectadas (Ecuador, 2002).

Actualmente se ha observado un incremento en la siembra de cacao híbrido

CCN 51, debido a la mayor productividad. Mientras el cacao nacional produce entre 300 a 400 kg/ha al año, el híbrido CCN 51 llega a producir hasta 1 088 kg/ha bajo condiciones adecuadas, lo que está llevando a que el agricultor cambie sus plantaciones de nacional por CCN 51, y en la mayoría de los casos instalarlos como cultivo inicial (Vallejo, y Quingaísa, 2005).

En el país las enfermedades como la moniliasis sola o combinada con escoba de bruja pueden causar desde el 60 al 100 % de pérdidas de producción (Suárez y Solís, 2003).

La enfermedad conocida con el nombre de moniliasis *Moniliphthora roreri* Cif y Par. Evans *et al.*, ataca a los frutos del cacao y su daño es tan severo, que constituye uno de los factores más limitantes en la producción de cacao (Enríquez 2004). De los reportes realizados por varios autores se determina la presencia de la enfermedad en 13 países de Latina América causando un gran impacto en la economía cacaotera.

El control de la enfermedad se ha realizado mediante prácticas culturales como mayor espacio entre plantas, podas fitosanitarias, reducción de sombra, que han mostrado inconsistencia en el control. Por su parte el tratamiento con productos químicos, no solo es inapropiado y en algunos casos ineficaz, y su aplicación es ineficiente debido a que el cacao es caulifloro, además, de las múltiples aplicaciones requeridas encarecen notablemente los costos de producción, mucho más en épocas lluviosas donde los productos se lavan fácilmente (Falconí, 2005).

En las últimas décadas el control biológico de enfermedades que afectan a cultivos de interés se ha incrementado notablemente. Los microorganismos benéficos pueden funcionar como eficientes supresores de enfermedades y plagas en cultivos de importancia para nuestro país (Cevallos 2003). Evaluaciones del potencial de microorganismos antagónicos han demostrado que bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, así como mezclas de hongos *Clonostachyis rosea* y *Trichoderma* sp., reducen significativamente la incidencia de moniliasis, escoba de bruja y pudrición negra en el campo. Además los resultados positivos obtenidos, por investigadores de la ESPE, con *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas cepacea* y *Pseudomonas putida* formuladas en suspensiones acuosas o portadores sólidos en la variedad nacional Tenguel – 25 y el Clon CCN – 51; refuerzan la premisa de que el control biológico de la moniliasis funciona. En el caso de esta enfermedad se ha diseñado una metodología de producción y formulación simple, económica y eficiente para obtener biopreparados a base de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas cepacea* en soporte sólidos como vermiculita y turba respectivamente (Yáñez, 2004).

En base a estos antecedentes el ensayo de campo fue instalado en la Hacienda San Antonio, provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, cantón Santo Domingo, parroquia Luz de América, km 38 Vía Santo Domingo – Quevedo, donde se realizaron actividades para la validación de biopreparados cada tres semanas. Los parámetros evaluados establecieron el efecto de los biopreparados en un ciclo de producción en la reducción de incidencia externa en la mazorca y su influencia con los factores medioambientales, la producción acumulada y el tratamiento más económico para el control de la moniliasis en el campo. En los

laboratorios de la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias IASA I, Provincia Pichincha, se elaboraron los biopreparados; mientras que el control de calidad se lo realizó en el IASA II ubicado en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.

La presente investigación tuvo como finalidad realizar la validación de los biopreparados en base a *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas cepacea* en mazorcas de cacao híbrido CCN – 51 a nivel de parcela de agricultor en el cantón Santo Domingo, utilizando esta nueva tecnología desarrollada por técnicos de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria de la ESPE, ubicado en el IASA I de esta forma se demostró que la eficiencia de los biopreparados era similar al producto químico, adaptándolos al manejo de los productores y a las condiciones agrobiológicas del área.

Para el desarrollo del estudio se plantearon los siguientes objetivos:

**OBJETIVO GENERAL:**

- Validar dos biopreparados en base a *Bacillus subtilis* y *Pseudomona cepacia* para el control de *Moniliophthora roreri* en el cultivo de cacao híbrido CCN 51 en el cantón Santo Domingo.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Evaluar a los microorganismos antagonistas formulados para la reducción del porcentaje de daño interno en las almendras de cacao.

- Relacionar el efecto de factores medio ambientales en la actividad de biopreparados para el control de la moniliasis.
- Cuantificar el efecto de los biopreparados en el control de la moniliasis, y un control químico durante un ciclo de producción de seis meses.
- Determinar cual es el tratamiento más económico para el control de moniliasis en el cultivo de cacao.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. EL CULTIVO DE CACAO

#### 2.1.1. Generalidades

En forma general el cacao (*Theobroma cacao*) se divide en tres grandes grupos genéticos: los Criollos, los Forasteros y una mezcla de ambos llamados Trinitarios (Enríquez, G. A., 2004).

Tanto los criollos como los trinitarios constituyen las variedades nobles, siendo las más buscadas por los fabricantes de chocolate para obtener los productos más finos (Montavon, 1996).

Enríquez (2004), indica que el grupo de criollos y trinitarios, por haber sido domesticados y adaptado a diferentes zonas o regiones del mundo, han sido los cacaos más delicados, y los criollos se denotan con una productividad no muy elevada, al mismo tiempo son más susceptibles a plagas y enfermedades.

El cacao tipo Trinitario o Forastero, es un grupo complejo bastante grande y no bien definido, porque dentro de este grupo se han considerado la mayoría de variedades que vienen ya sea del bajo como alto Amazonas (Enríquez, 2004). Este grupo comprende a los cacaos de Brasil y África Occidental, que proporcionan el 80 % de la producción mundial (Vera, 1993 b).

Anecacao (2006), Márquez y Aguirre (2003) indican que el cacao Trinitario o Forastero posee una calidad inferior, ya que produce almendras con un fuerte aroma a chocolate y un sabor amargo. Según Enríquez (2004), se caracterizan por ser rústicos y resistentes a enfermedades, adaptándose mejor a diversos ambientes.

El cacao Trinitario está constituido por una población híbrida que se originó en la isla de Trinidad, cuando la variedad original (Criollo de Trinidad) se cruzó con la variedad introducida de la Cuenca del Orinoco. De allí que las características genéticas, morfológicas y de calidad son intermedias entre criollos y forasteros, determinado diversos tipos de cacao (Vera, 1993 b).

De acuerdo con Anecacao (2006) y Vera (1993 b), el cacao tipo trinitario se cultiva principalmente en Trinidad, Jamaica, Colombia y Costa Rica, ocupando del 10 al 15 % de la producción mundial.

Este tipo de cacao presenta un aroma a chocolate acentuado con un sabor frutal. Tiene almendras de tamaño mediano a grande con cotiledones marrones rojizos (Anecacao 2006). Al ser una mezcla entre dos grupos, presenta una diversidad de formas, tamaños y colores en la mazorca y semilla (Márquez y Aguirre, 2003)

El cacao es una especie originaria del Bosque húmedo tropical (Bh-t) en América del Sur, según estudios de Pound, Cheesman y otros, debido al sistema de vida nómada que llevaron los primeros pobladores del Continente Americano, ha sido difícil establecer con exactitud el centro de origen del cacao. En países Alto

Amazónicos, como el Brasil, se ha encontrado la mayor variabilidad de especies (Revisado por Arévalo *et al.*, 2004)

Por mucho tiempo ha existido confusión en la ubicación taxonómica del cacao comercial debido a su variabilidad genética en cuanto a caracteres de color, forma y dimensiones de las distintas partes de la flor, el fruto y semilla. Sin embargo, como punto de partida se admite que la mayor parte del cacao comercial pertenece a una sola especie (*Theobroma cacao*), una de las más conocidas por su importancia económica y social. Otras especies son el *T. bicolor* (conocido en el Ecuador como “cacao blanco” o “patas”), y *T. angustifolia*, que se ha empleado en América Central desde la época anterior a la conquista, en la preparación de chocolate (Vera, 1993 b). El nombre botánico del cacao es *Theobroma cacao* L. Este pertenece al Subreino Embriophyta; Tipo Espermatophyta; Subtipo Angiospermas; la División Magnoliophyta; Clase Dicotiledónea; Subclase Dialipétalas; Orden Malvales; Familia Sterculiaceae (Revisado por Arévalo *et al.*, 2004).

Enríquez (2004) y Vera (1993 a), coinciden que el árbol de cacao es de tamaño mediano (5 – 8 m), aunque puede alcanzar hasta 20 m de altura cuando crece libremente bajo sombra intensa. Mientras que Quiroz (1997), explica que a medida que el árbol envejece, su tronco se va inclinando, posee poco follaje, excepto por una fila de chupones que nacen verticalmente, siendo esta una característica predominante. Enríquez (2004), señala que por lo general, el cacao tiene un fuste recto que puede desarrollarse en formas muy variadas. Además, tiene un primer molinillo a una altura de 80 a 120 cm; en este punto nace un piso de tres a seis ramas

principales que forman el esqueleto del árbol, donde se van a obtener las mazorcas a la hora de la cosecha.

La raíz que presenta el cacao es pivotante o primaria, tiende a crecer hacia abajo, en forma recta. Su longitud varía de acuerdo a las características físicas del suelo, pudiendo crecer hasta los 3 m de profundidad en el caso del cacao “Nacional”. Las raíces secundarias se encuentran en la unión de la raíz con el tallo o cuello, distribuyéndose en su mayoría en los 15 a 20 cm superiores de la capa húmica del suelo, llegando a alcanzar distancias de 5 a 6 m a partir del tronco; crecen perpendicularmente en relación al tallo, tienen raíces laterales y se dividen repetidamente, cambiando de dirección de acuerdo a los obstáculos del suelo (Ramos, G., Ramos P. y Azócar, A., \_\_\_\_).

Las hojas son simples, enteras y pigmentadas variando mucho su color, cuando son adultas son de color verde, oblongo o lanceolado-oblongo, mide de 10 a 22 cm de largo por 5 a 12 cm de ancho; estas pueden variar mucho, con una alta respuesta al ambiente; con menos luz es más grande y con más luz es más pequeña, borde liso y nerviación penninervia (Rodríguez, D., Báez, M., 2002, y Enríquez 2004). El pecíolo posee dos abultamientos: uno en la inserción con el tallo y otra con el limbo foliar, llamados pulvínulos, que permiten el movimiento de la hoja en respuesta a los estímulos de la luz (Vera, 1993 b). El pecíolo de la hoja del tronco ortotrópico, normalmente es largo con un pulvínulo menos desarrollado (Enríquez, 2004). El haz es brillante y fuertemente cutinizada y el envés posee muchos estomas (Ramos, G., Ramos P. y Azócar, A., \_\_\_\_).

Las inflorescencias se localizan en la base de las hojas alrededor de la cicatriz y de la yema axilar que deja una hoja al madurar (Enríquez, 2004). Vera (1993 b), señala que las inflorescencias se presentan en racimos a lo largo del tronco y de las ramas sostenidas por un pedicelo. Las inflorescencias después de producir flores durante varios años se convierten en tubérculos engrosados que reciben el nombre de "cojinetes florales".

La flor es hermafrodita o completa, sostenida por un pecíolo (rabillo), su longitud varía de 1 a 3 cm, con un diámetro entre 0,5 a 1 cm. La flor es de color rosa, púrpura y blanco, de pequeña talla, de 0,5 a 1 cm de diámetro y 2 a 2,5 cm de largo, en forma de estrella. Posee 5 pétalos de 6 mm de largo, blancos o teñidos de rosa, alternos con los sépalos y de forma muy singular: comienzan estrechos en la base, se ensanchan y se hacen cóncavos para formar un pequeño capuchón y terminan en una lígula; además posee 5 sépalos, que son de color rosas, son angostos, puntiagudos, ampliamente extendidos. El cáliz es de color rosa con segmentos puntiagudos (Vera, 1993 b).

Las flores son pequeñas, se abren durante las tardes y pueden ser fecundadas durante todo el día siguiente. La polinización es entomófila destacando una mosquita del género *Forcipomya*. En caso de que se afecte directamente a esta mosquita, la recuperación de la población, es muy rápida si hay sombra o un lote de bosque silvestre, con medio adecuados para su reproducción (Enríquez, 2004). Las flores son pentámeras con ovario súpero y número variado de óvulos (20 a 50). La forma de sus pétalos, tienden a encerrar las anteras haciendo complicada su polinización. Esta generalmente es entomófila y de difícil realización debido a la

disposición de sus piezas florales llegando solo a ser efectivas en el 1 % de las flores presentes en el árbol (Ramos, G., Ramos P. y Azócar, A., \_\_\_\_).

El cacao es una planta “cauliflora”, es decir significa que las flores se producen en los tejidos adultos del tronco y las ramas, las flores son pequeñas muy conspicuas y coloreadas (Vera 1993 b).

La corteza se la ha dividido en dos, debido a las diferentes características que presentan; una corteza externa, que es de un color castaño oscuro, agrietada, áspera y delgada, en donde con el tiempo surgen las inflorescencias que dan a lugar a los cojinetes florales, y una corteza interna, que es de un color castaño claro y sin sabor (Enríquez, 2004).

El fruto comúnmente denominado “mazorca”, es una baya grande, carnosa, oblonga a ovada sostenida por un pedúnculo fuerte, leñoso, que procede del engrosamiento del pecíolo floral, su forma y color varía considerablemente y ha servido de base para determinar las diferentes variedades dentro de las especies. Su tamaño es variable y va de 15 a 30 cm de largo por 7 a 10 cm de grueso, es puntiaguda y con camellones longitudinales; cada mazorca contiene en general entre treinta y cuarenta semillas dispuestas en placentación axial e incrustada en una masa de pulpa desarrollada de las capas externas de la testa. La pared del fruto es gruesa, dura o suave y de consistencia como de cuero. Los frutos se dividen interiormente en cinco celdas donde se desarrollan las almendras. La pulpa es blanca, rosada o café, de sabor ácido a dulce y aromática (Vera, 1993 b).

La semilla o almendra de cacao no tiene albumen y está cubierta por una pulpa ácida azucarada llamada mucílago, conocido como “baba”, en el Ecuador. En una mazorca se encuentran de veinte a cincuenta almendras unidas a un eje central llamado placenta o maguey. El tamaño, sabor, forma y color de la semilla varía de acuerdo al tipo de cacao, dentro de ciertos límites (Ramos, G., Ramos P. y Azócar, A., \_\_\_\_).

Los árboles de cacao trinitario pueden llegar a ser productivos por 30 años, produciendo entre 250 a 300 mazorcas/año. Las semillas de la mazorca de este cultivar son de un peso liviano con un promedio de 0,8 a 1,0 g., el número de semillas por mazorca es de 80 a 100 granos con un porcentaje de grasa de 53.05 % (Ramos, G., Ramos P. y Azócar, A., \_\_\_\_). Las semillas son aplanadas y terminan en punta lo que la hace diferenciar del criollo que posee forma oblonga, terminan en una forma redondeada y son hinchadas (Enríquez, 2004).

### **2.1.2. Producción**

Las primeras noticias que se tienen en el país sobre la producción de cacao datan de 1780, es decir muchos años antes de la instauración de la República, lo que significaría que el Ecuador tiene más de 200 años produciendo cacao (Vera, 1993 a).

Según datos del último censo nacional agropecuario, en el Ecuador se cultiva una superficie de 243 146 ha de cacao como cultivo solo, y de 191 272 ha de cacao como cultivo asociado, dando un total de 434 418 ha (INEC, 2002), de las cuales el

cacao trinitario CCN 51 posee una superficie sembrada alrededor de 147 702 ha, la cual ocupa un gran porcentaje sembrado en nuestro territorio, debido a que su producción es superior a la del cacao nacional fino y de aroma, cuyas producciones oscilan alrededor de los 50 – 60 qq/ha y 25 – 30 qq/ha respectivamente (Vallejo, S.; Quingaísa, E., 2005).

El cacao es un producto de amplio intercambio mundial. En el año 2000, y según cifras de la FAO, se comercializó el 73 % de la producción total. El cacao se cultiva casi exclusivamente en el trópico y generalmente por parte de pequeños productores. Es originario de México desde donde se trasladó a Sudamérica y posteriormente a África, continente que actualmente es el mayor productor con una superficie sembrada de 20 018 000 ha (FAO 2003). También Asia ha incrementado su participación en la producción en las últimas dos décadas con 1 012 970 ha (Enríquez, G. A., 2004).

El Ecuador es uno de los principales productores y exportadores de cacao ocupando el doceavo lugar a nivel mundial con una producción del 3 % de toda la producción de cacao en el mundo (Cuadro 1). Su participación dentro del PIB total promedia el 0,5 % y dentro del Producto Interno Bruto (PIB) agropecuario aproximadamente el 6 %. Además, es un importante generador de empleo, se estima que aproximadamente 500 000 personas se encuentran vinculadas a esta actividad, lo que representa el 4 % de la Población Económicamente Activa (PEA) nacional y el 12 % de la PEA agrícola (Lastra, 2004).

**Cuadro 1. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE CACAO (2000-2003).**  
**Producción de cacao por país, expresado en toneladas métricas.**

**Fuente: Certificados de Calidad emitidos por Anecacao.**

PAÍS	2000	2001	2002	2003
Belice	30	40	26	58
Benin	100	100	100	100
Bolivia	4 300	4 320	4 325	4 330
Brasil	196 788	185 662	174 796	170 724
Camerún	122 600	122 100	125 000	125 000
Colombia	44 544	43 694	47 930	47 000
Congo	6 300	6 018	5 747	5 747
Costa de Marfil	1 395 980	1 330 000	1 225 000	1 225 000
Costa Rica	708	708	708	708
Cuba	2 900	1 884	1 301	1 500
Dominicana, República	37 104	44 906	49 670	50 000
Ecuador	99 875	76 030	87 986	89 036
El Salvador	450	450	450	450
Filipinas	6 586	8 100	6 500	6 000
Gabón	500	600	600	600
Ghana	436 600	389 591	340 562	475 000
Granada	1 196	688	737	737
Guatemala	2 336	2 336	2 105	2 105
Guinea	3 300	1 800	2 500	2 500
Guinea Ecuatorial	4 900	4 000	4 000	4 000
Guyana	261	261	260	260
Haití	4 500	4 300	4 400	4 800
Honduras	2 000	2 000	2 000	2 000
India	6 000	7 000	6 000	6 000
Indonesia	465 700	380 900	450 000	426 000
Jamaica	1 100	1 150	1 150	1 150

Liberia	3 100	1 000	1 500	1 500
Madagascar	4 395	4 410	4 410	4 410
Malasia	70 200	58 000	47 661	47 661
México	28 046	46 738	46 194	48 405
Nicaragua	250	300	515	550
Nigeria	338 000	340 000	340 000	380 000
Panamá	593	541	650	650
Papua Nueva Guinea	46 800	37 900	42 400	42 000
Perú	25 049	23 652	25 685	26 400
Salomón, Islas	2 600	1 900	3 000	3 000
Samoa	500	500	500	500
San Vicente/Granadinas	175	175	175	175
Santo Tomé y Príncipe	3 418	3 000	3 000	3 000
Sierra Leona	10 920	10 920	11 000	11 000
Sri Lanka	3 700	3 410	2 920	2 890
Suriname	7	8	9	9
Tailandia	400	400	400	400
Tanzania	2 100	2 100	2 000	2 000
Togo	6 600	6 500	6 000	7 000
Trinidad y Tobago	1 593	611	1 643	984
Uganda	3 950	3 950	4 000	4 000
Vanuatu	1 558	799	1 411	1 411
Venezuela	16 126	15 834	16 164	16 418
<b>TOTAL</b>	<b>3 418 050</b>	<b>3 182 567</b>	<b>3 106 360</b>	<b>3 256 438</b>

Lastra (2004) explica con respecto a los montos exportados, que el volumen de exportaciones presenta importantes fluctuaciones de un año a otro, dependiendo fundamentalmente de los niveles de producción y los factores que afectan a esta. A

su vez Anecacao (2006) indica que en el año 1999 se exportaron 99 694 TM de cacao en grano e industrializado, mientras que para el 2005 se exportaron 114 613 TM, es decir que la producción se incrementó la producción en 14 919 TM en tan solo 6 años, de los cuales el 34 % está destinado a la producción del híbrido CCN 51 lo que representa 37 270,8 TM (Anecacao, 2006; MAG 2006).

La producción del cacao en el Ecuador se encuentra muy ligada a las condiciones del ecosistema y esto es determinante para que las causas que reducen el rendimiento, sean diferentes a la de otros países productores; entre estas se citan comúnmente la irregular distribución de lluvias, presencia de enfermedades difíciles de manejar, insectos defoliadores, conservadorismo en la forma de explotación, edad avanzada de los árboles, podas inadecuadas, pérdida de fertilidad de los suelos, falta de zonificación del cultivo, problemas de comercialización interna, etc. (Enríquez, G. A. 2004.).

Además se ha constituido un importante renglón para la economía nacional, en especial por su significativa contribución a la generación de divisas por concepto de exportación, actividad que se inició en la época de la Colonia. En la actualidad ocupa el tercer lugar en el monto de exportaciones del sector agrícola, después del banano y de las flores.

No menos importante es su participación en la generación de empleo, estimándose que da ocupación al 5 % de la población económicamente activa del país, tanto en la fase de producción en 60 000 Unidades de Producción Agropecuaria (UPA), como en la comercialización e industrialización.

Aproximadamente el 60 % de la producción se exporta en grano, el 35 % constituye materia prima para la fabricación de semielaborados (torta, licor, pasta, manteca y polvo) y chocolates; el 5 % se destina a industrias artesanales del país.

En el Ecuador el cacao es cultivado en su mayoría por pequeños y medianos agricultores, quienes son de bajos recursos y no poseen un servicio de transferencia de tecnología adecuado, por tanto los rendimientos son lejanos a 300 kg/ha. Por su parte, en fincas seleccionadas el promedio puede sobrepasar 1 000 kg/ha (Enríquez, 2004).

En el 2000 se exportaron 74 millones de dólares y para el 2005 la cifra ascendió a 176 millones, lo que significa un crecimiento porcentual de 138 % de las exportaciones registradas por el puerto de Guayaquil, si sumamos las salidas irregulares a Colombia y Perú, y el consumo nacional, llegamos a un monto de 220 millones de dólares de producción al año (Anecacao, 2006).

### **2.1.3. Ecología del Cultivo**

Es importante considerar el factor medio ambiental ya que está muy relacionado con el crecimiento, floración, fructificación y aparición de algunas enfermedades. En las prácticas se hace necesario cumplir con requerimientos mínimos de precipitación, humedad relativa, temperatura, luminosidad, suelo y altitud (Arévalo *et al.*, 2004).

Según Mejía (2006), dentro de los factores climáticos, la temperatura y la pluviosidad son considerados los más críticos en el crecimiento de las plantas, siendo la radiación solar un factor relativo que interfiere en los mecanismos fisiológicos de la planta, el cual puede ser controlado a través de la manipulación del sombrero. Siendo el cacao una planta típica tropical, es muy sensible a las bajas temperaturas y, por tanto, todas las explotaciones se encuentran entre los 18 y 20 grados de latitud norte y sur, respectivamente. En todas las zonas cacaoteras hay variaciones climáticas durante todo el año, que afectan el crecimiento vegetativo, la emisión foliar, la intensidad de la floración, los ciclos de floración y periodos de cosecha.

En la mayoría de las áreas cacaoteras, es común la ocurrencia de dos periodos climáticos bien marcados. El lluvioso (invierno), cuyas precipitaciones comienzan a fines de Diciembre y finalizan entre Abril y Junio, seguido por un periodo seco (verano) de 5 a 7 meses que es también otro de los factores limitantes a la productividad del país. En general, el cacao soporta condiciones ambientales extremas siempre y cuando sea por periodos cortos (Vera, 1993 c).

De acuerdo con Arévalo *et al.* (2004), el cultivo de cacao es muy sensible a la falta de humedad en el suelo, por esto es importante una buena distribución de precipitación durante el año, las condiciones óptimas de precipitación en una cacaotera son de 1 200 a 2 500 mm anuales bien distribuidos.

La disponibilidad de agua, junto con sus variaciones, durante la época del año, es el principal factor responsable de las diferencias en las producciones de cacao. En aquellas zonas donde es muy prolongada la estación seca y se concentran

las lluvias en un corto tiempo, se puede presentar un déficit hídrico ya que la evapotranspiración es superior a la precipitación, esto puede causar reducción de las cosechas por incidencia en la floración, cuajamiento de frutos y desarrollo de las mazorcas (Mejía, 2006).

La temperatura es un factor ambiental que está relacionado con la fenología del cultivo. Este cultivo no soporta temperaturas bajas, siendo su límite medio anual de temperatura los 24 °C ya que es difícil cultivar cacao satisfactoriamente con una temperatura más baja. Temperaturas muy altas pueden provocar alteraciones fisiológicas en el árbol por lo que debe estar bajo sombra para que los rayos solares no incidan directamente y se incremente la temperatura, nunca debe exceder los 30 °C, la diferencia de temperatura entre el día y la noche no debe ser inferior a 9 °C. (Moreno, M., 2004).

Alvim (1997), citado por Mejía (2006) observó que la temperatura determina la formación de flores y la reducción en el desarrollo del tejido leñoso. Cuando ésta es menor a 21 °C la floración es menor comparada con temperaturas de 25 °C, donde la floración es normal y abundante. Esto provoca que en determinadas zonas la producción de mazorcas sea estacional, y durante algunas semanas no existan cosechas.

La temperatura influye, en forma positiva, en el desarrollo de los frutos; se observa un crecimiento más rápido cuando las temperaturas son altas y se necesita un periodo más corto para la maduración del fruto entre 140 y 175 días; cuando los frutos se desarrollan en periodos fríos la maduración se prolonga hasta los 170 días (Mejía, 2006).

La luz es otro de los factores limitantes para el desarrollo del cacao, especialmente para la función fotosintética, aunque en el cacao este proceso ocurre con baja intensidad estando a plena exposición solar. Se considera que una intensidad lumínica menor del 50 % limita los rendimientos, mientras que una intensidad lumínica ligeramente superior al 50 % lo incrementa (Arévalo *et al.* 2004). De acuerdo a Vera (1993 c), entre las áreas de países cacaoteros del mundo, la zona del Litoral ecuatoriano es la que posee menor radiación solar. En la mayoría de las localidades productoras del Ecuador las horas de brillo solar oscilan entre las 800 a 1 000 horas/año, es decir casi la mitad del valor registrado en otros países.

Mejía (2006) manifiesta que cuando las plantaciones se desarrollan a plena exposición con precipitaciones adecuadas, se les proporciona nutrientes de acuerdo con las exigencias y se protegen de los vientos, producen mayores volúmenes de cacao que aquellos cultivados bajo sombra en las mismas condiciones debido a la alta intensidad de fotosíntesis, pero la planta tiende a reducir sus producciones con un rápido envejecimiento.

En general, se acepta que la humedad relativa del aire es muy importante en la regulación de la evaporación del agua en el suelo y la transpiración de la planta. El ambiente debe ser húmedo, el cacao no se comporta bien si el ambiente que rodea la planta es extremadamente seco. El valor promedio mensual de la humedad relativa varía de un modo irregular, una media de 75 a 80 % es la más conveniente, para evitar la aparición de enfermedades fungosas (Vera, 1993c).

El cacao es una planta que en las diferentes zonas cacaoteras del mundo se

cultiva desde el nivel del mar hasta los 1 400 m.snm, siendo el rango óptimo de 250 a 900 m.snm; fuera de este límite las plantas sufren alteraciones fisiológicas que afectan el potencial productivo lo que se refleja en un menor rendimiento y baja rentabilidad para el productor (Revisado por Arévalo *et al.*, 2004).

Los suelos más apropiados para el cultivo del cacao según Arévalo *et al.*, (2004) son los aluviales de textura franca (arcillo – arenosa o arena - arcillosa); sin embargo, han observado una gran adaptabilidad a suelos en laderas con pendientes mayores a 25 %. También se puede sembrar cacao en laderas con manejo de coberturas establecidas a curvas de nivel.

## **2.2. ENFERMEDADES DEL CULTIVO DE CACAO**

### **2.2.1. Generalidades**

Enríquez (2004), señala que las enfermedades del cacao causan más pérdidas al agricultor que los insectos. Para comprender dicha complejidad, es necesario tener en cuenta la síntesis histórica del cultivo, la peculiar ecología del mismo Litoral ecuatoriano y la falta de aplicación de prácticas de manejo. La consecuencia actual, es que las enfermedades se presentan con carácter endémico, es decir se encuentran siempre presentes en los cacaotales.

Sin embargo, como su intensidad depende principalmente de las condiciones ambientales, las enfermedades varían en las diferentes zonas y épocas del año, de la misma forma que varía el clima (Suárez, 1993).

En el III Censo nacional agropecuario se determina la presencia de enfermedades como una de las principales causas para la pérdida de producción en el cacao, con 5 498 ha perdidas.

Algunas de ellas pueden destruir las mazorcas de una plantación en un momento dado. Otras enfermedades pueden destruir o matar las plantas susceptibles. Habitualmente, los mayores problemas del agricultor están ligados a las enfermedades y a su combate. Las enfermedades más importantes del cultivo de cacao son las siguientes:

- ❖ La Escoba de bruja
- ❖ La Moniliasis
- ❖ El Mal de Machete
- ❖ La Mazorca negra
- ❖ Las Bubas

La **escoba de bruja** del cacao es causada por el hongo basidiomiceto *Crinipellis* perniciosa Stahel (Revisado por Enríquez, 2004). Al parecer fue observada en los años de 1700, pero la investigación científica de la enfermedad comenzó en Suriname en los años de 1890 por Gregor Stahel (Revisado por Purdy, 1999). Su efecto devastador se sintió en Ecuador en 1918 (Revisado por Enríquez, 2004). La enfermedad está presente en Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Granada, Guyana, Panamá, Perú, St. Vicent, Suriname, Trinidad y Tobago y Venezuela (Purdy, 1999).

Afecta a todos los órganos en crecimiento como brotes vegetativos, cojinetes florales; los síntomas se caracterizan por la presencia típica de escoba, o brotes hipertrofiados.

El síntoma más característico se produce en los terminales de las ramas nuevas, que al desarrollarse anormalmente presentan la forma de una escoba (Enríquez, 2004). También afecta los cojinetes florales, causando las llamadas flores estrella, que nunca llegan a producir un fruto, aunque pueden desarrollarse hasta cierto estado; cuando se secan y mueren producen los llamados frutos “chirimoyas”. Los cojinetes afectados, en general, además de las flores estrella, comienzan a producir hojas y brotes anormales o pequeñas ramas que mueren rápidamente. La mazorca también se ve afectada y entre más tierna se infecte más daño se produce. Una infección muy tardía podría salvar algunas de las semillas si la mazorca se abre a tiempo (Revisado por Enríquez, 2004).

Arévalo *et al.* (2004) explican que otra grave enfermedad del cacao es el **mal de machete** causada por el hongo *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halstead. Suárez (1993) menciona que se reportó por primera vez en el Ecuador en 1918. Posteriormente ha sido reportada en otros países de Centro y Sur América, únicamente.

Esta enfermedad destruye árboles enteros y, por lo tanto, las pérdidas pueden ser muy altas. El tiempo que tarda en morir un árbol depende de su grado de tolerancia y de las condiciones ambientales (Enríquez, 2004).

El hongo siempre infecta al cacao por medio de lesiones en los troncos y ramas principales y puede matar a un árbol rápidamente. Los primeros síntomas visibles son marchitez y amarillamiento de las hojas y en ese momento el árbol en realidad ya está muerto. En un plazo de dos a cuatro semanas la copa entera se seca, permaneciendo las hojas muertas adheridas al árbol por un tiempo Suárez (1993).

Suárez (1993) menciona que esta enfermedad está casi siempre asociada con ataques de insectos perforadores de corteza del género *Xyleborus*. Estos coleópteros no transmiten el hongo pero si ayudan a diseminarlo dentro del árbol. Además, cuando estos penetran la corteza de árboles enfermos, sacan las esporas de *C. fimbriata* mezcladas con el aserrín proveniente de las galerías, favoreciendo su diseminación por el viento e insectos. Se ha observado que estos taladradores muestran una preferencia definida por atacar árboles ya infectados, pues se alimentan de las esporas y micelio del hongo.

Hasta la fecha, el combate del Mal de Machete por medio de aplicaciones de fungicidas no ha tenido éxito; la forma más eficaz para combatir la enfermedad es usar cultivares o híbridos resistentes. Algunos de los cultivares que tienen alta resistencia son 'UF 29', 'UF 296', 'UF 613', 'CC 41', 'CC 38' y 'CC 42'. Pruebas de laboratorio han indicado que los cultivares 'IMC 67', 'PA 121', 'SPA 9', 'EET 339', 'EET 400' y 'Pound 12', y los híbridos formados por estos padres, son también resistentes (Enríquez, 2004).

Según Enríquez (2004), la **mazorca negra** es una de las enfermedades más importante del cacao en todas las áreas cacaoteras del mundo; existen probablemente

cinco o más diferentes especies de *Phytophthora* que causa esta enfermedad; *P. palmivora* es casi pandémica en cualquier lugar que se cultive cacao y tiene una amplia gama de hospederos *P. capsici* y *P. citrophthora* se restringen a América y *P. heavae* probablemente está presente en América del Sur y Malasia. Por otra parte, *P. megakarya* está presente solamente en África del Oeste. Además se han reportado infecciones en cacao por *P. nicotianae* en México.

En algunos años ciertos cultivares presentan infecciones de las mazorcas que pueden llegar al 80 % o más. Aunque el hongo puede atacar plántulas y diferentes partes del árbol de cacao, como cojines florales, chupones, brotes, hojas, ramas, tronco y raíces, el principal daño lo sufren las mazorcas (Purdy, 1999).

En el fruto la infección aparece bajo la forma de manchas pardas, oscuras, aproximadamente circulares, que rápidamente se agrandan y extienden por toda la superficie a través de la mazorca. Las almendras se infectan, resultan inservibles y en un plazo de 10 a 15 días la mazorca está totalmente podrida.

La enfermedad puede ser combatida por la combinación de tres enfoques: cultural, el uso de fungicidas y el uso de cultivares resistentes. Las prácticas culturales solas no combaten totalmente la enfermedad, aunque son importantes para reducir la cantidad de pérdidas en un cacaotal, las cuales aumentan la eficiencia de otras medidas de combate. La reducción de la cantidad de sombra de una plantación puede ser una medida eficaz para mermar la incidencia de la enfermedad (Enríquez, 2004).

**Las bubas** se caracterizan por un abultamiento y crecimiento anormal de los cojines florales; posiblemente ocasionan pérdidas significativas de cacao en Costa Rica. Aunque se han identificado cinco tipos diferentes de bubas, solamente dos son importantes: la buba de puntos verdes, causada por el hongo *Calonectria* (*Fusarium*) *rigidiuscula*, y la buba floral, cuyo agente causal se desconoce (Enríquez, 2004).

Las pérdidas ocasionadas por las bubas son difíciles de evaluar, pero pueden ser grandes debido a que los cojines florales atacados por la enfermedad no forman flores ni mazorcas. Las bubas pueden ser la causa de la lenta pero persistente declinación en la producción en muchas regiones cacaoteras.

La única forma de combate conocida es el uso de cultivares resistentes. Existen datos de por lo menos tres cultivares con alta resistencia a la buba de puntos verdes e inmunes a la buba floral: 'UF 29', 'UF 242' y 'UF 273' (Enríquez, 2004).

## **2.2.2. La Moniliasis**

### **2.2.2.1. Historia y distribución geográfica**

La enfermedad, conocida con los nombres de Monilia, Pudrición acuosa, Helada, Mancha Ceniza o Enfermedad de Quevedo, es causada por el hongo *Monilia* (*Moniliophthora roreri* Evans *et al.* (Cif. y Par.). El origen de la enfermedad ha sido estudiado por varios autores, algunos creen que su centro de origen está en Ecuador y que de ahí pasó a Colombia, Perú, Bolivia y a algunos lugares de Venezuela. En Panamá se la ha encontrado recientemente al sur del Canal (Revisado por Evans *et al.* 2003 y Enríquez, 2004).

Esta enfermedad fue reportada en Ecuador, en la Provincia de los Ríos, en el lado occidental de los Andes, por Rorer en 1914, quien denominó al patógeno *Monilia roreri*. De allí viene el nombre “moniliasis”, término genérico para designar enfermedades producidas por hongos del género *Monilia*. Sin embargo, Evans *et al.* (1973), determinaron que el agente causal es un hongo Basidiomycete, por lo tanto no corresponde a un miembro del género *Monilia*, que se encuentra ubicado dentro de los Ascomycetes. La enfermedad se diseminó posteriormente a Colombia, Venezuela, Panamá, Costa Rica y Honduras.

Actualmente la moniliasis se encuentra en Ecuador, Colombia, Venezuela (Purdy, 1999 Revisado por Evans *et al.*, 2003), Bolivia, Brasil (Revisado por Evans *et al.*, 2003), Costa Rica (Purdy, 1999 Revisado por Enríquez, 2004), Panamá (Purdy, 1999 Revisado por Arévalo *et al.*, 2004; Revisado por Phillips *et al.*, 2006), Nicaragua (Purdy, 1999 revisado por Enríquez, 2004; revisado por Evans *et al.*, 2003), Honduras (Revisado por Enríquez, 2004; revisado por Evans *et al.*, 2003), Guatemala (Revisado por Evans *et al.*, 2003; revisado por Suárez y Solís, 2003). Últimos reportes han detectado la presencia de la enfermedad en Belice (Phillips *et al.*, 2005) y en México, donde la producción es ahora amenazada por una de las más devastadoras enfermedades del cacao (Phillips *et al.*, 2006).

#### **2.2.2.2. Morfología y fisiología del hongo**

Según Castaño *M. roreri* presenta *in vitro* un crecimiento zonal en áreas concéntricas, con tonalidades diferentes dentro de la misma colonia. El centro de esta presenta una zona de color café oscuro constituida por masas de conidias pero

menos densa. En la periferia del micelio ocurre en forma abundante constituido por filamentos cortos decumbentes. Cuando se observa al microscopio es brillante y septado con hilos cortos y alargados de 3 a 4 micrómetros de ancho.

Las conidias son heteromórficas y ocurren en forma aislada o en cadena moniliforme con episporio oscuro rodeado de un halo refrigerante, y miden entre 5 y 15 micras de largo por 5 a 10 micras de ancho.

Campollo (1984), afirma que el micelio es hialino, tortuoso y profundamente ramificado, y forma un pseudo-estroma sobre la superficie de las manchas. Los conidióforos son bifurcados o trifurcados en la base, hialinos pluriseptalos, rectos o irregularmente ondulaods, de 9 a 50 micrómetros de longitud. Las conidias pueden ser redondas, elipsoidales y forman cadenas simples, ramificadas de 7,5 a 10 micrómetros de diámetro por 8 a 10,5 micras de largo.

Es muy poco lo que se sabe de este hongo de su fisiología pero Castaño (1952), señala ciertas características primordiales de este, menciona que forma abundante micelio y esporula profusamente en la superficie de las mazorcas infectadas cuando están expuestas a condiciones de alta humedad relativa del ambiente, ya sea en forma natural o artificial. Estudios realizados por el mismo autor señalan que el pH ideal para que el hongo crezca es de 3,5 y 8,0; en un periodo de 15 y 21 días forma una colonia de 2 cm de diámetro

### **2.2.2.3. Impacto económico**

La enfermedad ataca solamente los frutos del cacao y 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 del cacao (Enríquez, 2004).

De igual forma el autor menciona que las pérdidas en las cosechas van de la mano con la aplicación errónea de las labores culturales, principalmente la poda fitosanitaria, que ha demostrado Enríquez (2004), que si no se la realiza correctamente las cosechas se reducen hasta un 30 %, solo con este factor.

En Ecuador y Colombia se ha informado sobre pérdidas que van desde el 16 hasta el 80% y aún más, con promedios que fluctúan del 20 al 22 % anual. Su efecto dañino en la producción, es por lo tanto, comparable al de la Mazorca negra. En nuestro país la moniliasis sola o combinada con escoba de bruja pueden causar pérdidas desde el 60 % al 100 % en la producción (Suárez y Solís, 2003).

Los daños ocasionados por esta enfermedad varían con las condiciones ambientales, el manejo del cultivo, los genotipos (clones, híbridos) sembrados, y su ataque se ve afectado de un lugar a otro y de año a año, de acuerdo con las condiciones del clima. En plantaciones ubicadas en zonas húmedas y sin un manejo adecuado, es frecuente observar pérdidas superiores al 90 %. Sin embargo, bajo condiciones culturales óptimas, los daños son disminuidos considerablemente, posibilitándose este cultivo en áreas infestadas por la enfermedad (Enríquez, 2004).

#### **2.2.2.4. Taxonomía**

La taxonomía del agente causal de esta enfermedad es *Moniliophthora roreri*

(Cif. y Par.) Evans *et.al.*, a pesar que aun se mantiene en discusión. En 1933 este hongo se colocó en el Phylum Mitospórico; Clase Basidiomycetes; Orden Moniliales; Familia Moniliaceae; Género *Moniliophthora*; Especie *roreri* (Cif. & Par). Evans *et al.*

De acuerdo a Evans et al. (1981), *M. roreri* representa el estado asexual de un basidiomycete cuyo estado perfecto no es conocido o nunca ha sido formado; pues el micelio de este hongo presenta septas tipo doliporo, característica propia de los Basidiomycetes. De acuerdo a estudios genéticos, *M. roreri* corresponde a una especie del género *Crinipellis*, que incluye al agente causal de la escoba de bruja, *C. perniciosa*, por lo cual, el nombre correcto del agente causal de la moniliasis del cacao sería *C. roreri* (Enríquez, 2004).

#### **2.2.2.5. Hospedantes**

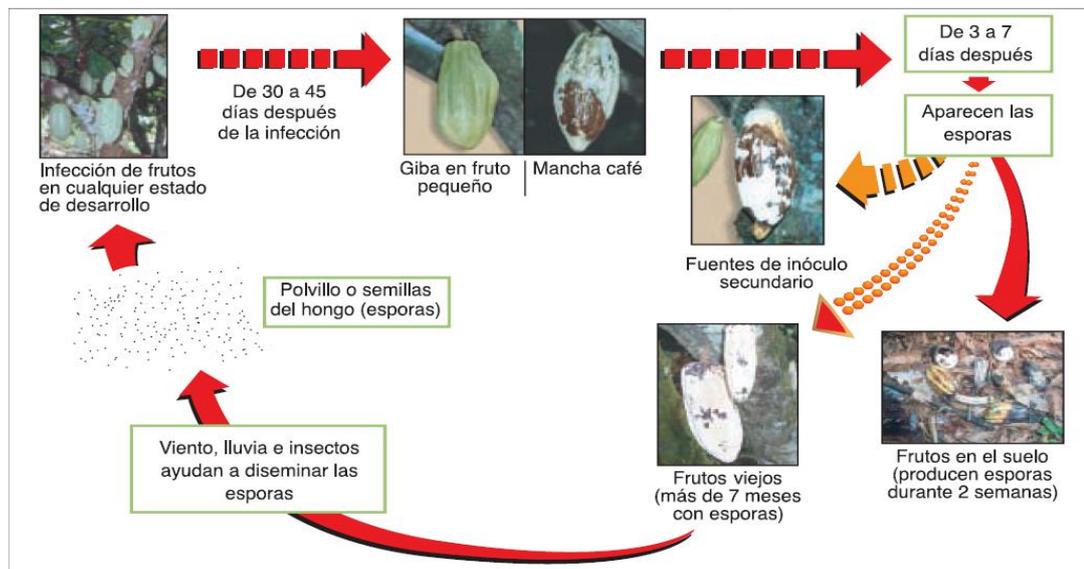
En condiciones de campo, *M. roreri* afecta solamente los frutos de plantas de los géneros *Theobroma* y *Herrania*, ambos de la familia Sterculiaceae. Mediante inoculaciones artificiales se ha logrado infectar tallos de cacao, de donde ha sido posible aislarlo posteriormente para las diferentes investigaciones tanto *in vitro* como *in situ* (Enríquez, 2004).

#### **2.2.2.6. Ciclo de vida y proceso infeccioso**

El ciclo del patógeno dura entre 50 y 60 días, desde la infección hasta completar la esporulación (Revisado por Arévalo *et al.*, 2004). Se pueden considerar dos ciclos diferentes dependiendo si el inóculo llega a las mazorcas sanas a partir de

frutos con infecciones recientes o de frutos infectados de ciclos anteriores que quedan momificados en el árbol (Revisado por Yáñez, 2004). Las conidias se producen en cadenas en las superficies de las mazorcas enfermas que siguen siendo verdes, o en las mazorcas que están momificadas y de color negruzco (Purdy, 1999). Arévalo (2004) señala que las esporas permanecen viables 8 a 9 meses después de su esporulación, por lo que se considera como fuente de inóculo primario

Las esporas de este patógeno son fácilmente transportadas por el viento, el hombre y otros agentes, hacia las mazorcas sanas donde se reinicia la enfermedad (Revisado por Arévalo *et al.*, 2004). Las mazorcas pueden ser infectadas en cualquier edad, siendo los estados iniciales de su desarrollo los más propensos al ataque del patógeno (Bejarano, 1961). Para la germinación e infección exitosa, las conidias requieren de agua y ambiente saturado mínimo de 5 a 8 horas. La penetración se realiza directamente a través del exocarpo y ocasionalmente por los estomas, avanzando intercelularmente, lo que facilita una esporulación interna de la mazorca (Revisado por Arévalo *et al.*, 2004).



**Figura 1. Ciclo de vida del hongo *Moniliophthora roreri***

Una vez infectado el fruto, 30 días después empiezan aparecer los primeros síntomas iniciales de la enfermedad, a continuación se presentan unos puntos aceitosos que se atrofian y empiezan a formarse manchas de color marrón a los 15 a 20 días, después de esta etapa empieza a formarse una capa blanquecina que envuelve gradualmente todo el fruto y 3 a 4 días se llena de esporas secas del hongo, tomando una coloración cremosa (Arévalo *et al.*, 2004).

Cuando logra entrar en las etapas iniciales del crecimiento, el hongo parece capaz de invadir el interior de la mazorca, mientras ésta continúa su crecimiento, sin que en su exterior aparezca ningún síntoma de la enfermedad. A menudo hay mazorcas con estas infecciones ocultas que casi han alcanzado su desarrollo completo, dando la impresión de estar sanas, pero repentinamente aparecen en su superficie las manchas características de la enfermedad (Enríquez, 2004).

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

#### **2.2.2.7. Sintomatología**

En condiciones naturales, el fruto es el único órgano del cacao infectado por *M. royeri*. Las investigaciones han permitido determinar que los síntomas varían con la edad del fruto al momento de la infección, pero la velocidad de desarrollo depende de las condiciones ambientales, básicamente de la temperatura y de la susceptibilidad

del clon o variedad de cacao. El síntoma más característico de la enfermedad es una mancha de color marrón oscuro y borde irregular, denominado “mancha chocolate”.

La infección en frutos recién formados, menores de 20 días, produce un chupado o marchitez, similar al denominado “Cherelle wilt” (marchitez de Cherelle) o al ocasionado por otras enfermedades. Los frutos detienen su desarrollo, adquiriendo una coloración marrón húmeda. Generalmente no se observa esporulación del hongo en la superficie del fruto.

En frutos de mayor edad, pero menores de dos meses, ocurren deformaciones a modo de una jiba o joroba. Posteriormente se desarrolla la mancha chocolate, rodeada por una zona de madurez prematura de color amarillo. La mancha puede comprometer a todo el fruto. Internamente, las semillas se convierten en una masa acuosa, por lo cual a la enfermedad se le llama también “pudrición acuosa de la mazorca”. En este caso, las mazorcas enfermas pesan más que las sanas (Arévalo *et al.*, 2004).

Las mazorcas infectadas después de los 3 meses de edad pueden, en algunos casos no mostrar síntomas externos (Enríquez, 2004). En otros casos se observan puntos necróticos marrón oscuros y manchas oscuras limitadas, ligeramente hundidas, con frecuencia rodeadas por áreas de maduración prematura. Internamente, se observa una pudrición de color marrón rojizo, que afecta a algunas o a todas las semillas, las cuales se compactan y no se separan entre ellas o de la cáscara, la cual se mantiene firme. En frutos infectados cerca a la cosecha (más de 4 meses de edad), la infección puede limitarse a la corteza del fruto, sin llegar a las almendras o afectar

solamente a algunas. Las que se mantienen sanas pueden cosecharse y aprovecharse.

Otro síntoma común de esta enfermedad es la maduración prematura. Los frutos cambian de coloración, dando la apariencia de estar maduros, cuando no tienen ni el tamaño, ni la edad de cosecha. Por lo general, en las áreas amarillentas se desarrolla posteriormente la mancha chocolate (Suárez y Solís, 2003).

Sobre las superficies necrosadas (manchas chocolate), a los pocos días se observa el desarrollo del micelio del hongo, como una felpa de color blanquecino, que luego se torna crema y finalmente marrón muy claro. Si un fruto infectado es seccionado, el patógeno desarrolla sobre la superficie interna cortada en pocos días. Posteriormente se produce la esporulación, de color crema. Al golpear suavemente los frutos en este estado, las esporas del hongo son desprendidas fácilmente en forma de un polvo muy fino, que se disemina rápidamente a manera de una nube.

Los frutos infectados permanecen adheridos a las ramas o tallos, se contraen o encogen gradualmente, se secan y momifican, manteniéndose parcialmente cubiertos con restos del seudoestroma (Enríquez, 2004).

#### **2.2.2.8. Epidemiología**

Las infecciones causadas por *M. royeri* se favorecen por varios factores como la humedad y temperatura altas. Las esporas requieren de agua libre o de una humedad relativa cercana al 100% para su germinación. El crecimiento vegetativo requiere una temperatura óptima de 24 a 26 °C. En general, la temperatura favorable

a la enfermedad se encuentra en el rango de 22 a 30 °C. Por encima o debajo de estos valores, es menos agresiva. Estos valores determinan tasas altas de infección con carácter de epidemia durante las fases de floración y fructificación del árbol (Evans, 1981).

Dentro de las plantaciones, las condiciones que favorecen una alta humedad y por lo tanto a la moniliasis son los drenajes deficientes, plantas muy altas y con exceso de sombra y la no ejecución de labores culturales, especialmente las podas y control de malezas.

Algunos estudios han establecido una correlación positiva entre la cantidad de lluvia y la cosecha de mazorcas enfermas 3 a 4 meses después lo que concuerda con relación al tiempo que tarda la expresión de síntomas. Un fruto infectado es capaz de producir entre 6 a 7 billones de conidias durante 20 períodos de esporulación en 80 días (Desrosiers *et al.*, 1955). La mayor cantidad de conidias en el aire ocurre durante el día cuando sube la temperatura y baja el porcentaje de humedad en el ambiente (Revisado por Yáñez, 2004).

## **2.3. MANEJO DE LA MONILIASIS**

### **2.3.1. Prácticas Fitosanitarias**

Estas prácticas deben realizarse con la única finalidad de reducir las fuentes y potencial de inóculo y preparar al árbol para que cada año produzca una cosecha abundante y sana (Arévalo *et al.*, 2004).

Para el combate de la enfermedad Enríquez (2004), recomienda lo siguiente:

- a) Regular la sombra definitiva del cacaotal, para que permita mayor paso de luz y aire (30-40%).
- b) Levantar la sombra con relación a la planta de cacao para reducir la humedad en su ambiente.
- c) Podar el cacao en forma moderada varias veces al año (3 a 4 veces).
- d) Cosechar las mazorcas maduras cada dos semanas para no tener infecciones en las etapas finales de la maduración.
- e) No permitir que el agua se empoce o forme charcos.
- f) Recolectar mazorcas enfermas antes de que esporulen en la misma.

De ahí que Enríquez (2004), explica que no es conveniente mover las mazorcas enfermas donde se encuentran esporulando, pues esto aumenta la dispersión de las esporas y aumenta el costo de producción.

Últimos estudios demuestran que la remoción semanal de mazorcas enfermas realizadas durante todo el año redujo la incidencia de moniliasis de un 26 a 41 % (Soberanis *et al.*, 1999). Sin embargo, estas prácticas fitosanitarias han mostrado inconsistencia debido a que la enfermedad persiste y avanza en forma preocupante en las zonas donde no se practica ningún control (Sandoval *et al.*, 1987). Además su aplicación es impracticable, porque los incrementos que se logran en la producción no alcanzan a cubrir los gastos que demanda la operación (Falconí *et al.*, 2005; Sandoval *et al.*, 1987 y Barros, 1980). Por lo tanto con la continua caída del precio

del cacao, es necesario aplicar diversos métodos de control suplementario y económicos (Soberanis *et al.*, 1999).

### **2.3.2. Control químico**

La proliferación de enfermedades infecciosas que aumentan cada vez más son típicos problemas fitopatológicos que surgen como consecuencia de los métodos de la agricultura moderna (Lima, 1994).

El control de la enfermedad con la aplicación de fungicidas es una práctica poco efectiva y, sobre todo, poco económica. Sólo se recomienda en las plantaciones con alta productividad, mayor de 800 kg de cacao seco al año y como complemento al control cultural. Hasta la fecha, en diversas investigaciones que se han realizado no se ha encontrado resultados satisfactorios que el control químico sea superior al control cultural en aquellas plantaciones con rendimientos bajos (Sánchez *et al.* 2003).

Existe respuesta económica significativa a las aplicaciones de productos protectantes, elaborados con oxiclورو de cobre, y de productos sistémicos curativos, pero su éxito depende del buen manejo de la plantación y que se realicen algunas labores complementarias, para que el cultivo produzca al máximo y la inversión en productos químicos sea rentable (Revisado por Arévalo *et al.*, 2004 y Suárez, 1993).

Si el productor decide utilizar estos productos, debe dirigir las aspersiones hacia los frutos y realizar las aplicaciones a los 60 y 90 días del inicio del

crecimiento de los cherelles, luego de la floración principal (Argüello, 2000). En todo caso, las aplicaciones químicas deben realizarse como complemento de las medidas culturales en plantaciones de alta productividad.

El uso de funguicidas es demasiado costoso para ser considerado en un plan de manejo ya que se necesita un número excesivo de aplicaciones para lograr una cobertura adecuada de las mazorcas (Jiménez *et al.*, 1987 y Purdy, 1999). Por tanto el control químico encarece notablemente los costos de producción (Falconí *et al.*, 2005).

### **2.3.3. Control genético y resistencia.**

Enríquez (2004) señala que con la siembra de genotipos de alta resistencia a la moniliasis se puede incrementar la producción y bajar la incidencia del hongo.

Suárez (1993) señala algunos clones recomendados actualmente que son tolerantes o resistentes a la moniliasis en el Perú, y que pueden ser adaptados a nuestras zonas que posean las mismas condiciones climáticas (CCN 51, ICS1, ICS 39, ICS 95, IMC 67, ICS6, etc.), siendo aún necesario evaluar su comportamiento en las diferentes regiones del país, con la finalidad de tener una zonificación de los clones e híbridos más adecuados para las zonas donde se cultiva cacao, estos clones fueron seleccionados por su adaptación, productividad y resistencia o tolerancia a las diferentes plagas y enfermedades.

En caso de instalar plantaciones nuevas, se deben evitar los cultivos monoclonales, pues constituyen un peligro por su vulnerabilidad debida a su estrecha

base genética. En ese sentido, se recomiendan las plantaciones multiclonales, con un mínimo de cinco clones, tratando de mantener la variabilidad genética existente en cada zona seleccionando y utilizando materiales propios de cada una de ellas, en una proporción no menor al 60 % del total. Ningún genotipo debería superar el 25 % del total en una plantación o en una zona (Muñoz, 2002).

En el país poco trabajo se ha realizado en busca de resistencia a *M. royeri*. Se ha determinado que ciertos clones presentan alguna resistencia a la enfermedad luego de efectuar pruebas de patogenicidad, desafortunadamente no hay muchos estudios para saber si su descendencia también presenta la resistencia. En otros estudios se ha observado que algunos cultivares escapan a la infección al producir su cosecha en periodos desfavorables para la enfermedad (Revisado por Muñoz, 2002 y Enríquez, 2004).

## **2.4. CONTROL BIOLÓGICO**

### **2.4.1. Generalidades**

El control biológico es la manipulación directa o indirecta por parte del hombre de los agentes vivos que de forma natural tienen la capacidad de control. Esta manipulación provoca un aumento de ataque sobre las enfermedades (Nighan y Mukerji, 1998; citado por Yáñez, 2004)

Falconí (1997) considera que el control biológico abarca procesos biológicos complejos donde se establece paralelismos de coexistencia de antagonistas y patógeno con su respectivo hospedero, en un sistema agrícola equilibrado. Un estado

de coexistencia es establecido por un nivel poblacional tolerable del patógeno en un hospedero sano.

El control biológico de agentes causales de desordenes bióticos o abióticos de plantas posee algunas ventajas, en relación con pesticidas que se utilizan frecuentemente en la agricultura. Los agentes de control biológico tienen la propiedad de autoreplicarse, establecerse en diferentes sustratos y ecosistemas, de colonizar semillas, espermosfera, filósfera, carpósfera, etc. En cambio la mayoría de pesticidas agrícolas convencionales, tienen un efecto temporal y usualmente necesitan ser aplicados repetitivamente para asegurar su efectividad. Ahora se conoce mucho más acerca de la ecología microbiana en relación con la fitopatología, de tal forma que existe la oportunidad de entender los componentes y función de nichos ecológicos, en los cuales los microorganismos que actúan como agentes de control biológico, pueden colonizar y ejecutar interacciones de control sobre otros microorganismos patógenos (Falconí, 1997).

El éxito en el desarrollo de Agentes de Control Biológico (ACB), depende de un entendimiento profundo de la ecología y biología de los patógenos y de sus organismos antagonistas (Oyarzum, 2004).

Las primeras investigaciones en el control biológico de la moniliasis se basaron en la evaluación de eficiencia *in vitro* de cepas de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicilium* y otros hongos y bacterias no identificados Bravo y Victoria (1979). Aún cuando los resultados obtenidos con las cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* no fueron positivos, las bacterias probablemente del género *Bacillus*

mostraron eficiencia. A partir de estos resultados en Costa Rica, Ecuador y Perú se ha intensificado la investigación que va desde la evaluación de bacterias del género *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Leuconostoc* formuladas en suspensión líquidas y sólidas para el control de *Moniliophthora roreri*; hasta mezclas de hongos microparásitos *Clonostachys rosea* y *Trichoderma* para el control incluso de *Phytophthora palmivora* y *Crinipellis perniciosus* (Yáñez, 2004).

Jiménez *et al.* (1987), demostraron la efectividad de *Pseudomonas aeruginosa*, en la reducción de la incidencia de moniliasis en un 60,5 % y 19 %, en promedio para dos épocas de un cultivar altamente susceptibles a la enfermedad. A su vez Sandoval *et al.* (1987), estudiaron bacterias antagonistas del tipo *Bacillus* bajo condiciones de campo, demostraron que su uso reduce el porcentaje de incidencia de la enfermedad en menos de 1 %. Otras investigaciones realizadas por Krauss y Soberanis (2001) evaluaron mezclas de hongos microparásitos *Clonostachys rosea* y *Trichoderma spp*, sugiriendo que las mezclas de estos hongos son altamente prometedores para el control de la moniliasis, escoba de bruja y mazorca negra. Bajo condiciones de campo la mayoría de tratamientos redujeron significativamente la moniliasis de 14,6 % a 24,9 % comparados con un control cultural. Siguiendo con estos estudios Krauss y Soberanis (2001), estudiaron el efecto de la fertilización y la frecuencia de aplicación de biocontrol para manejar estas enfermedades, teniendo como resultado que la incidencia de la moniliasis fue consistentemente baja con la fertilización. Además se recomendó tres aplicaciones adaptadas como estrategia más económica de biocontrol.

Hopen *et a.* (2003), estudiaron la abundancia natural de microparásitos en

flores y mazorcas de cacao, determinando la presencia de *Clonostachys* spp, seguido por *Fusarium* spp. Estudios realizados en Costa Rica por Krauss *et al.* (2003), evaluaron un manejo integrado de la moniliasis. Se recomendó la combinación de control biológico con tres aplicaciones mensuales comenzando en la época de floración, seguido por la remoción fitosanitaria quincenal de mazorcas enfermas. Además cuatro tratamientos biológicos redujeron la moniliasis con incrementos de rendimiento hasta el 50 %. Recientes estudios realizados por Bateman *et al.* (2005), analizan la aplicación de químicos y agentes biológicos para el control de moniliasis, determinando una interacción entre estos agentes y los métodos de aplicación. En estos ensayos, el uso de *Clonostachys byssicola*, *Trichoderma asperellum* y dos funguicidas no mejoraron significativamente en la producción.

El Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) viene trabajando en la búsqueda de materiales antagónicos con el organismo. En el año 2001 se pudo detectar algunos organismos potenciales antagónicos correspondientes a *Trichoderma koningii*, y se han desarrollado metodologías de multiplicación masiva de este antagonista y su comportamiento en el campo ha reducido casi totalmente la enfermedad, especialmente si se retiran las mazorcas enfermas de la plantación (Enríquez, 2004).

En el Centro de Investigaciones de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria ESPE se han realizado varias investigaciones a nivel de campo para evaluar la eficiencia de bacterias epifitas para el control de la moniliasis en el cultivo de cacao. Además se han realizado muestreos en 21 localidades del Ecuador, obteniendo doscientas cincuenta y seis bacterias, de las cuales se identificaron y clasificaron tres

bacterias que inhibieron la germinación de esporas y formación de micelio del hongo *M. royeri*, y estas fueron: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas cepacia* y *Pseudomonas putida* (Falconí et al., 2003).

En campo se determinó el efecto de estas tres bacterias antagonistas crecidas en medios líquidos en el control de *M. royeri* del cacao en cultivar CCN 51 y en el cultivar nacional Tenguel 25. Bajo estas condiciones *B. subtilis* y *P. cepacia* redujeron significativamente la enfermedad, en un 66 y 34 %, respectivamente, en cacao Nacional; 46 y 47 % en CCN 51, en relación con el testigo absoluto (Falconí et al., 2003). Recientes investigaciones usando biopreparados formulados en turba, demostraron que *P. cepacia* y *B. subtilis*, redujeron la incidencia de *M. royeri* en un 76 y 86 %, respectivamente en comparación con el control negativo (Falconí, C. E., Oleas, A. R., Yáñez V. R., 2004). Los datos obtenidos en estos estudios demuestran que las bacterias epifitas usadas como biopreparados y aplicados preventivamente, controlan eficientemente a *M. royeri* en campo, lo cual permitirá introducir el uso de biopreparados en el manejo integrado de cacao (Falconí et al., 2003).

## **2.4.2. Biopreparados**

### **2.4.2.1. Características de *Bacillus subtilis***

*Bacillus subtilis* pertenece al grupo de las eubacterias y a la familia Bacillaceae. Son bacterias que tienen forma de bacilos grandes Gram positivos que miden desde 0.3 a 2.3 micras de ancho y 1.2 a 7.0 micras de largo. Son aerobios y facultativamente anaerobios, forman endosporas (una por célula), además de ser

termófilos. Son cilíndricos, generalmente flagelados, crecen en cadenas y forman colonias grandes e irregulares en los medios sólidos (agar nutritivo), se encuentran en los suelos y en los vegetales en putrefacción, interviniendo activamente en la descomposición de la materia orgánica (Buchanan, 1974).

Buchanan (1974), determina que esta bacteria se encuentra dentro del reino Prokaryota, debido a que son organismos unicelulares que tienen una membrana celular o bien una membrana y una pared celular rodeada de citoplasma; este último tiene pequeños ribosomas y material genético (ADN) que no están rodeados por una membrana, es decir, no están organizados en un núcleo; Filo Firmicutes; Clase Bacilli; Orden Bacillales; Familia Bacillaceae; Género *Bacillus*; Especie *B. subtilis*.

Existen diferentes cepas de *Bacillus subtilis* que pueden ser utilizadas como agentes de control biológico bajo diversas situaciones (NYSAES, 2006). En el mercado se encuentra una diversidad de productos a base de esta bacteria que son efectivos para el control de enfermedades causadas por *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Phythium*, *Phytophthora* y *Sclerotinia fruticola* (Ball, 2002 y NYSAES, 2006).

En el Ecuador se han evaluado formulaciones líquidas, sólidas y biopreparados a base de aislados nativos de *Bacillus subtilis* y *Pseudomona cepacia* para controlar la moniliasis del cacao, demostrando que estas disminuyen la incidencia de la enfermedad entre un 60 y 80 % (Falconí *et al.*, 2003 y Yáñez, 2004).

En investigaciones a nivel agrícola se ha demostrado que *Bacillus subtilis* es

especialmente activa en la descomposición y mineralización de sustancias orgánicas, colonización de raíces y producción de antibióticos (Bochow, 1992 y Dellat, 1993). Todas estas características, junto con la posibilidad de manejarla como biopesticida estable han facilitado su uso como biocontrolador y estimulador de crecimiento en cultivos como tomate, fréjol, plátano, frutales, trigo y arroz.

En el mercado existen una diversidad de productos efectivos a base de *Bacillus subtilis*, para el control de enfermedades causadas por *Rhizotocnia*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Phytophthora*, *Phytium* y otras (Bochow, 1992 y Rodríguez, 2002).

En el cacao, para el control de la moniliasis, aislados nativos de *Bacillus subtilis* reducen la enfermedad en 62 %, cuando se liberan como suspensión en el fitoplano. Se ha diseñado una tecnología eficiente para la propagación de este microorganismo en el laboratorio, junto con *Pseudomonas cepacia* (Yáñez, 2003).

#### **2.4.2.2. Características de *Pseudomonas cepacia***

*Pseudomonas cepacia* (en la actualidad *Burkholderia*) pertenece al género *Pseudomonas* que contiene más de 140 especies. Es un organismo Gram negativo fermentante productora de catalasas de amplia versatilidad nutricional. Es fácilmente aislable, crece sin dificultad en condiciones de laboratorio y es mutacionalmente versátil puede ser caracterizada sin dificultad (Revisado por Yáñez, 2004; revisado por García, 2002).

*P. cepacia* fue descubierta por Walter Burkholder en 1949 en las catáfilas de cebolla y en su epidermis radicular, y descrita en humanos por primera vez en 1950.

La clasificación de las especies de *Pseudomonas* fueron realizadas dentro de uno de los cinco grupos basados en la homología RNA. Estas bacterias que pertenecen al reino prokaryotae, poseen membranas y paredes celulares bien definidas, pertenecen a la familia Pseudomonadaceae y al género *Pseudomonas* (Agrios, 1995).

Un mecanismo especialmente efectivo, típico de las bacterias pseudomonales, es el que les permite fijar  $Fe^{3+}$  de soluciones de concentraciones mínimas, por medio de sidéforos. Estos constituyen péptidos de bajo peso molecular, raramente aminoácidos, por consiguiente de alta estabilidad proteásica o lípida, relacionados con uno o más cromógenos, de grupos moleculares con quelatos de Fe, generalmente tienen caracteres quinódicos, que fluorescen bajo luz ultravioleta y bajo limitada presencia de Fe. El mecanismo de biocontrol se basa en su alta afinidad con  $Fe^{3+}$ , virtualmente le quitan a otros microorganismos iones vitales de Fe, dado la poca afinidad de enlaces metálicos de otros microorganismos: hongos, actinomicetes, plantas. En un sentido estricto, se pueden considerar los sidéforos, como un tipo de antibiótico, ya que en pequeñas concentraciones inhiben el crecimiento y otros procesos vitales de microorganismos (Falconí, 1997).

El género *Pseudomonas* presenta un amplio espectro nutricional y no requiere de factores de crecimiento para su desarrollo. Así se ha encontrado como un género

dominante en la rizósfera del maíz en diferentes localidades edafoclimáticas (Hebber, 1999). También aparecen poblaciones altas en la rizósfera de las plantas de trigo y plantas ornamentales (Hernández, 2000).

*Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* tiene una alta frecuencia de aparición, en la mayoría de los casos estudiados (Hernández, 1998). En los últimos años, esta especie adquiere vital importancia en estudios relacionados con la agricultura, debido fundamentalmente a la producción de una amplia gama de metabolitos activos que influyen positivamente sobre el crecimiento y desarrollo saludable de las plantas.

Se caracteriza por ser bacilos cortos Gram negativo, mótils y no formadoras de esporas, produce pigmentos no fluorescentes difusibles en el agar (piocinina) y acumula gránulos de poli- $\beta$  hidroxibutirato (PHB) (Pallerony, 1984).

Existen cepas patogénicas y saprofitas, dado fundamentalmente por su gran diversidad genética. De aquí la importancia, de trabajar con su parte activa, es decir con los metabolitos secundarios que al parecer son los responsables de los efectos benéficos en plantas por lo que al eliminar la célula se evita cualquier problema de índole ecológico. Esta especie produce diferentes tipos de sideróforos (portador de hierro) (Meyer *et al.*, 1989) y ácido indol acético.

El modo de acción de *Pseudomonas sp* incluye la inhibición del patógeno por competición por el hierro III (hipótesis de los sideróforos) o por productos volátiles o difusibles (antibiosis) y la inducción de resistencia en plantas (Meyer, 1995).

*Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* se destaca por producir diferentes tipos de sideróforos, antibióticos, alcaloides quinolisídnicos de naturaleza antibiótica (Hernández *et al.*, 1999), ácido cianhídrico y ácido salicílico. En los últimos años se ha prestado especial interés a los sideróforos, como uno de los principales metabolitos implicados en la actividad de biocontrol.

#### **2.4.2.3. Mecanismo de acción de los biocontroladores**

Enríquez (2004) señala que los biopreparados son biorreguladores de plagas y enfermedades, además de ser promotores del crecimiento vegetal, y estos evitan la entrada de agentes patógenos, mediante la acción combinada de la producción de sustancias antimicrobiales y al establecerse exitosamente en las raíces lo que imposibilita la colonización de esta por algún microorganismo dañino, produce sustancias de tipo hormonal que estimulan el desarrollo del sistema radical, la aceleración en el reciclado de nutrientes y mejoran la resistencia sistémica.

Solís (1999), señala que en general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de modos de acción es una característica a seleccionar en un antagonista. Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos sobre la fruta, los cuales se describen a continuación:

##### **a. Antibiosis.**

Se refiere a la producción por parte de un microorganismo de sustancias

tóxicas para otros microorganismos, las cuales actúan en bajas concentraciones (menores a 10 ppm.). La antibiosis es el mecanismo de antagonismo entre microorganismos más estudiado.

**b. Competencia.**

Se puede definir competencia como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es que haya "escasez" de un elemento, si hay exceso no hay competencia. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio.

**c. Interacción directa con el patógeno.**

Existen dos tipos de interacciones directas entre los antagonistas y los patógenos. Ellas son el parasitismo y la predación.

**d. Parasitismo.**

El término parasitismo se refiere al hecho de que un microorganismo parasite a otro. Puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. El parasitismo consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, b-1-3-glucanasas y proteasas que lisan o digieren las paredes de los hongos. (Melgarejo 1989, Ulhoa 1996).

**e. Predación**

En el caso de la predación el antagonista se alimenta de materia orgánica entre la cual ocasionalmente se encuentra el patógeno. No ha sido un mecanismo de acción muy importante en el desarrollo de agentes de biocontrol. Los reportes más conocidos citan la presencia de amebas en suelos supresores de enfermedades las cuales se alimentan de las hifas (cuerpos) de hongos patógenos entre otras fuentes de alimento (Campbell 1989).

Se puede inducir resistencia en productos cosechados mediante el uso de diferentes inductores como bajas dosis de luz ultravioleta, compuestos naturales de las plantas como quitosano (producto de la deacetilación de la quitina), y también mediante el uso de microorganismos antagonistas

**f. Resistencia**

Las plantas como otros seres vivos del planeta han pasado por un proceso evolutivo desde su aparición sobre la tierra lo que les llevó a desarrollar mecanismos de defensa muy poderosos contra sus invasores.

De esta forma se acostumbra a postular que la resistencia es la regla mientras que la susceptibilidad es la excepción. Si elegimos una planta cualquiera y comparamos el inmenso número de microorganismos que existe en su entorno sobre la tierra con el limitado número de microorganismos patógenos de ella debemos concluir que esto es así.

Las plantas presentan entonces mecanismos bioquímicos y físicos o estructurales de resistencia. Todos ellos gobernados genéticamente (Solís, 1999).

#### **2.4.2.4. Producción y formulación de biopreparados a base de *Pseudomonas cepacia* y *Bacillus subtilis***

Se han realizado estudios previos de caracterización taxonómica, crecimiento en medios enriquecidos, pruebas de eficiencia contra *M. royeri* en laboratorio y campo, conservación de microorganismos, selección, evaluación y acondicionamiento de soportes.

Con la información recopilada y en base a las disponibilidades tecnológicas, se ha establecido un sistema de producción artesanal en soportes sólidos. Además parámetros como temperatura de incubación, almacenamiento, esterilidad, determinación de contaminantes y concentración de biomasa se acoplaron dentro de cada una de las fases del sistema como control de calidad (Yáñez, 2003).

La metodología desarrollada por Yáñez (2003) para la producción y formulación de biopreparados se describe a continuación:

##### **a. Procesamiento de soportes**

###### **1) Selección de soportes o portadores**

Se realizaron estudios para determinar los soportes apropiados para el

desarrollo de las bacterias *P. cepacia* y *B. subtilis*. Los resultados determinaron que la Vermiculita y la turba de Chimborazo eran los mejores soportes para la sobre vivencia de las bacterias (Falconí *et al.*, 2003).

En base a estos resultados se valió la metodología de procesamientos de soportes. La selección se realizó en base a las características de los soportes y al crecimiento bacteriano, en unidades formadoras de colonia por gramo.

## **2) Secado y eliminación de impurezas**

Para el secado se pueden utilizar varios procedimientos que van desde el secado al ambiente, dentro o fuera del laboratorio hasta planchas térmicas. Las impurezas deben ser eliminadas, retirando manualmente o a través de una zaranda número 30 (equivalente a 28 mesh).

Posteriormente se almacenan en toneles plásticos debidamente etiquetados, para evitar la rehidratación y contaminación con otros materiales.

## **3) Molienda y tamizado**

Los soportes secos libres de impurezas se pulverizan para lograr el tamaño adecuado de las partículas. El mayor rendimiento se obtiene cuando se usa molino de martillo.

Luego se tamizan 100 o 200 mesh. Se colecta cada uno de estos por separado en fuentes o recipientes de plásticos limpios y secos.

#### **4) Análisis físico-químico y regulación de pH**

En los soportes secos, pulverizados y tamizados se determina el porcentaje de humedad y pH.

Para determinar el porcentaje de humedad se pesan 100 g de muestra; se colocan en la estufa entre 65 a 100 °C durante 24 horas, y luego se procede a pesar la muestra. La diferencia entre el peso inicial y el final, expresada en cien, es el porcentaje de humedad de la muestra.

El pH se determina mediante un pH digital calibrado en rango 1 – 14 o mediante bandas indicadoras de pH. De cada muestra se preparan suspensiones 1:1 y 1:2 soporte - agua destilada. El pH óptimo del soporte es 7,0 +/- 0,5 para la turba y vermiculita, la corrección de pH se hace adicionando carbonato o cal por gramo de muestra se determinan en un procedimiento similar al realizado para los soportes. La toma de muestras de cada lote de turba o vermiculita se hace por triplicado.

#### **5) Empacado y esterilizado**

El empacado de los soportes se hace en fundas de plástico de polietileno de 0,05 mm de espesor (baja densidad). Se colocan 100 g de

soporte procesado por funda y luego se sella. Adicionalmente, sobre cada paquete se coloca cinta indicadora de esterilidad y se revisa que no existan roturas.

Las fundas selladas se envuelven en papel periódico y se meten en autoclave. Los soportes se esterilizan por tres ocasiones consecutivas a 121 °C, durante 20 minutos cada vez. Este procedimiento se lo realiza para garantizar la ausencia de contaminantes.

## **b. Preparación de inóculo bacteriano**

### **1. Preparación de aislados puros en caja de petri**

El procedimiento utilizado consiste en obtener aislados puros de *Pseudomonas cepacia* y *Bacillus subtilis* en agar nutritivo (5 g de peptona, 3 g de extracto de carne, 15 g de agar en 1 litro de agua), e incubar por 24 horas, a 28 °C los aislados de las bacterias se obtiene, ya sea, del banco de microorganismos conservado en el laboratorio, a 80 °C, o de las bacterias recuperadas del campo mediante un procedimiento de liberación sobre mazorcas, colección de muestras, lavado y purificación. Los aislados se repican cada semana en tubos y cajas para mantener aislados activos y se guardan respaldos en refrigeración.

## **2. Preparación de cultivos líquidos de 36 a 48 horas (inóculos de fundas).**

A partir de los aislados puros de las bacterias en agar nutritivo, se preparan las suspensiones bacterianas en un rango de concentración de  $1,5 \times 10^9$  a  $2,1 \times 10^9$  ufc/ml, en tubos de ensayo, con 5 ml con solución salina estéril (cloruro de sodio al 1%). La concentración de la suspensión se calibra mediante la escala de turbidez de MacFarland (Somasegaran y Hoben, 1985). A continuación, la suspensión preparada se inoculara en el caldo 6B o en medios alternativos para *Pseudomonas cepacia* y *Bacillus subtilis*, a razón de 1ml por cada 100 ml de medio.

El volumen de los cultivos bacterianos depende de la cantidad de fundas que se van a procesar. Los cultivos bacterianos se incuban de 36 a 48 horas a 28 °C, en agitación continua, mediante un agitador orbital horizontal a 60 r.p.m hasta que el cultivo bacteriano alcance una población de  $10^9$  ufc/ml.

Previo a la inoculación en el soporte se realiza un control de pureza y viabilidad de los medios líquidos. Para la determinación de pureza se usa tinción de Gram y para la determinación de la concentración y viabilidad la escala de MacFarland (Somasegaran y Hoben, 1985) y la cuantificación de colonias en agar para PCA (Plate Count Agar) para conteo de microorganismos (5 g peptona de caseína, 2,5 g extracto de levadura, 1 g D (+) glucosa, 14 g agar en 1 l de agua destilada).

**c. Incorporación de inóculo bacteriano a soportes**

En cada funda de 100 gr de material procesado estéril se inoculan 70 ml (o volumen correspondiente al 50 % de la capacidad de campo de cada material de soporte) de cultivo bacteriano de 36 a 48 horas (dependiendo del medio líquido usado).

**d. Maduración y almacenamiento de biopreparados**

La fase de maduración consiste en inocular las fundas, con el material inoculado, a 28 °C, durante ocho días. Cada tres días se homogeniza el material, de forma manual, cuidando de no romper el empaque para lograr una distribución homogénea de las bacterias y detectar la posible presencia de contaminantes.

Los biopreparados se mantienen a temperatura ambiente y en cuarto oscuro. Se hacen controles de calidad, viabilidad de pH cada ocho días, durante el periodo de almacenamiento.

**e. Empacado y etiquetado**

Se utiliza fundas de plástico de polietileno de 0,05 mm de espesor (baja densidad) o frascos de plástico de 150 cm<sup>3</sup> de capacidad, con tapa rosca.

El etiquetado se realiza siguiendo las normas de presentación y manejo de productos biológicos, en los que se indican las características del

producto, concentración, modo de preparación y precauciones.

#### **f. Características de los biopreparados**

Las características del biopreparado en base a Cepacide son:

- 1) Acción fitosanitaria: Cepacide es un fungicida biológico cuyo ingrediente activo es la bacteria *Pseudomonas cepacia*. La acción está dirigida al control profiláctico del hongo *Moniliophthora roreri* causante de la moniliasis, sin efectos secundarios para el hombre, animales domésticos o silvestres, insectos benéficos y planta.
- 2) Ingrediente activo: Bacteria *Pseudomonas cepacia*.
- 3) Formulación y concentración: Polvo humectable contiene  $1 \times 10^9$  ufc/gr de soporte sólido (Turba Chimborazo) (Yáñez, 2003).
- 4) Compatibilidad y tolerancia: Cepacide es compatible con homonas, fertilizantes foliares e insecticidas químicos como Hormonagro, Megafol, Bluster H, Ruben C1, Trinador, Codamix; Lorsban, Dimepac, Basudin. Presenta alta tolerancia a los fungicidas químicos Store, Benlate y Bayleton. Es moderadamente tolerante a Daconil y Bankit. No es compatible con Cuprosan y Cobre Nordox.
- 5) Mecanismo de acción: Cepacide posee varios modo de acción que incluyen la inhibición del patógeno por competición de nutrientes

o por productos volátiles, inducción de resistencia en plantas y se destaca por producir diferentes tipos de sideróforos, antibióticos, alcaloides de naturaleza antibiótica, ácido cianhídrico y ácido salicílico que son metabolitos implicados en la actividad de biocontrol (Revisado por Sánchez, 2006).

- 6) Instrucciones de uso: la aplicación de Cepacide se realiza con bomba manual o motor sobre la superficie de las mazorcas de cacao. Se aplica en dosis de 50 g para 12 litros de agua. No se debe mezclar con otros productos. Cepacide debe prepararse y aplicarse el mismo día de la fumigación. En días soleados antes de las 11:00 y a partir de las 15:00, en días nublados durante todo el día. No aplicar contra el viento, ni en días lluviosos.
- 7) Almacenamiento: Conservar Cepacide en refrigeración entre 2 y 9 grados centígrados.
- 8) Precauciones: Para aplicación utilizar equipos de protección. Manténgase fuera del alcance de los niños y animales domésticos. No fume o consuma alimentos durante la aplicación. Evítese inhalación del rocío y el contacto con la piel. Utilice guantes para manipular el producto (Yáñez, 2003).

Las características de biopreparado en base de Basubtil son:

- 1) Acción fitosanitaria: Basubtil es un fungicida biológico cuyo

ingrediente activo es la bacteria *Bacillus subtilis*. La acción está dirigida al control profiláctico del hongo *Moniliophthora roreri* causante de la moniliasis, sin efectos secundarios para el hombre, animales domésticos o silvestres, insectos benéficos y planta.

- 2) Ingrediente activo: Bacteria *Bacillus subtilis*.
- 3) Formulación y concentración: Polvo mojable contiene  $1 \times 10^9$  ufc/gr de *Bacillus subtilis* de soporte sólido (Vermiculita) (Yáñez, 2003).
- 4) Compatibilidad y tolerancia: Basubtil es compatible con homonas, fertilizantes foliares e insecticidas químicos como Hormonagro, Bluster H, Boroplus, Lorsban, Dimepac. No es compatible con Basudin. Presenta leve tolerancia a los fungicidas químicos, Benlate y Bankit. No es compatible con los fungicidas Daconil, Bayleton, Store y Cobre Nordox (Falconí *et al.*, 2003).
- 5) Mecanismo de acción: Basubtil tiene como modo de acción la multiplicación bacteriana sobre la superficie de la mazorca, y la producción de enzimas que degradan el micelio y esporas de *M. roreri*, en desmedro de su potencial de infección (Falconí, 2007).
- 6) Instrucciones de uso: La aplicación de Basubtil se realiza con bomba manual o motor sobre la superficie de las mazorcas de cacao. Se aplica en dosis de 50 g para 12 litros de agua. No se debe mezclar con otros productos. Basubtil debe prepararse y aplicarse el mismo día de la fumigación. En días soleados antes

de las 11:00 y a partir de las 15:00, en días nublados durante todo el día. No aplicar contra el viento, ni en días lluviosos.

- 7) Almacenamiento: Conservar Basubtil en refrigeración entre 2 y 9 grados centígrados.
- 8) Precauciones: Para aplicación utilizar equipos de protección. Manténgase fuera del alcance de los niños y animales domésticos. No fume o consuma alimentos durante la aplicación. Evítese inhalación del rocío y el contacto con la piel. Utilice guantes para manipular el producto (Yáñez, 2003).

#### **2.4.2.5. Validación de biopreparados**

La validación es una prueba de ajuste que se hace a nivel de finca, a las tecnologías que han sido generadas en los centros de experimentación, con el manejo del productor y en las condiciones que se desenvuelve (Castro *et al.*, 2000).

La validación y transferencia de tecnología es la vía correcta para llegar a los productores, ya que es un proceso continuo mediante el cual se mide la eficiencia de las nuevas tecnologías, utilizando procedimientos adoptivos y de ajustes a las circunstancias socioeconómicas y agrobiológicas del área, de los sistemas de producción y de las experiencias de los propios agricultores, quienes participan activamente en su desarrollo (INIAP, 2002 y Solís *et al.*, 1989).

### **2.4.3. Control Químico**

El uso de fungicidas ha sido sugerido para controlar la moniliasis del cacao en diversos lugares, sin embargo, en la mayoría de casos se considera que son poco efectivos y costosos, lo cual determina que este método sea poco apropiado. Además, los fungicidas, como otros plaguicidas contaminan el ambiente, con efectos nocivos para los diferentes organismos, motivo por el cual, no se recomienda su aplicación (Arévalo, 1992).

Algunos fungicidas de base cúprica combaten esta enfermedad; la dificultad estriba, en mantener cubierta o protegida la mazorca durante su periodo de crecimiento, las lluvias torrenciales y en los árboles adultos donde la producción también se concentra en las ramas, aumenta la dificultad de aplicación, experiencias señaladas por Suárez (1981), utilizando sulfato de cobre más mancozeb (1 kg/ha) en aplicaciones semanales durante tres meses, a partir de los “Picos” más intensos de floración, se obtiene un control efectivo de la moniliasis y se protege el mayor porcentaje de la cosecha.

#### **2.4.3.1. Características de cuprofix**

CUPROFIX 30 WG, es un fungicida de acción polivalente, es el único en el mercado a base de Sulfato de Cobre (47%) y Mancozeb (34.5%) con una formulación especial de microgránulos dispersables de alta calidad. Es un fungicida preventivo que combina la acción del cobre (Caldo Bordelés) con Mancozeb. El efecto fungitóxico del cobre se manifiesta en los hongos

inhibiendo la germinación de las esporas. A nivel celular limita la producción de energía necesaria para el proceso de respiración. Además de su efecto fungicida el producto presenta actividad bactericida (MAG, 2006).

#### **A. Composición e información sobre los componentes**

- a) TIPO DE FORMULACIÓN: WP/PM - polvo mojable
- b) SUSTANCIA(S) ACTIVA(S): Sulfato de Cobre (47%) y Mancozeb (34.5%)
- c) DENOMINACIÓN QUÍMICA (IUPAC): Hidróxido de calcio/ Sulfato de cobre.; Manganese ethylenebis, dithiocarbamate) (polymeric)
- d) FÓRMULA QUÍMICA:  $\text{CuSO}_4 + \text{Ca}(\text{OH})_2$ ;  $[\text{C}_4 \text{H}_6 \text{N}_2 \text{S}_4 \text{Mn}]_x$

#### **B. Propiedades físicas y químicas**

- a) ESTADO FÍSICO A 20°C: Sólido, Polvo
- b) COLOR: Azul
- c) PESO ESPECÍFICO: 510 - 710 kg/m<sup>3</sup>
- d) PRESIÓN DE VAPOR: Sin importancia.
- e) TEMP. DE INFLAMACIÓN: No aplicable
- f) SOLUBILIDAD EN AGUA: Dispersable
- g) SOLUBILIDAD EN DISOLVENTES: Insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos.
- h) pH EN AGUA DESTILADA: 6.6 - 8 (dispersión al 1%)

### **C. Estabilidad y reactividad**

- a) PRODUCTOS INCOMPATIBLES: Ácidos fuertes
- b) PRODUCTOS DE DESCOMPOSICIÓN PELIGROSOS: Disulfuro de carbono, Sulfuro de hidrógeno, Óxidos de azufre, Óxido de nitrógeno, Óxido de carbono
- c) REACCIÓN PELIGROSA: Ninguna en condiciones normales (Viñas *et al.*, 2003).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1. UBICACIÓN POLÍTICA**

La fase de laboratorio para la producción y control de calidad de biopreparados se realizó en el laboratorio de Control Biológico del Departamento de Ciencias de la Vida, Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias - IASA I, de la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE), ubicado en la Hacienda El Prado, barrio San Fernando, Cantón Rumiñahui, Provincia de Pichincha, Ecuador.

La fase de campo para la validación de biopreparados se efectuó en la Hacienda San Antonio, Parroquia Luz de América, Recinto Luz de América, Cantón Santo Domingo, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador.

#### **3.2. UBICACIÓN GEOGRÁFICA**

El laboratorio de Control Biológico del Departamento de Ciencias de la Vida, Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias - IASA I, de la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE), se encuentra a una Latitud de  $0^{\circ} 23' 20''$ , y una Longitud de  $78^{\circ} 24' 44''$ ; y la Hacienda San Antonio a una Latitud de  $00^{\circ} 29'$ , y una Longitud de  $79^{\circ} 21''$  (Figura 2).

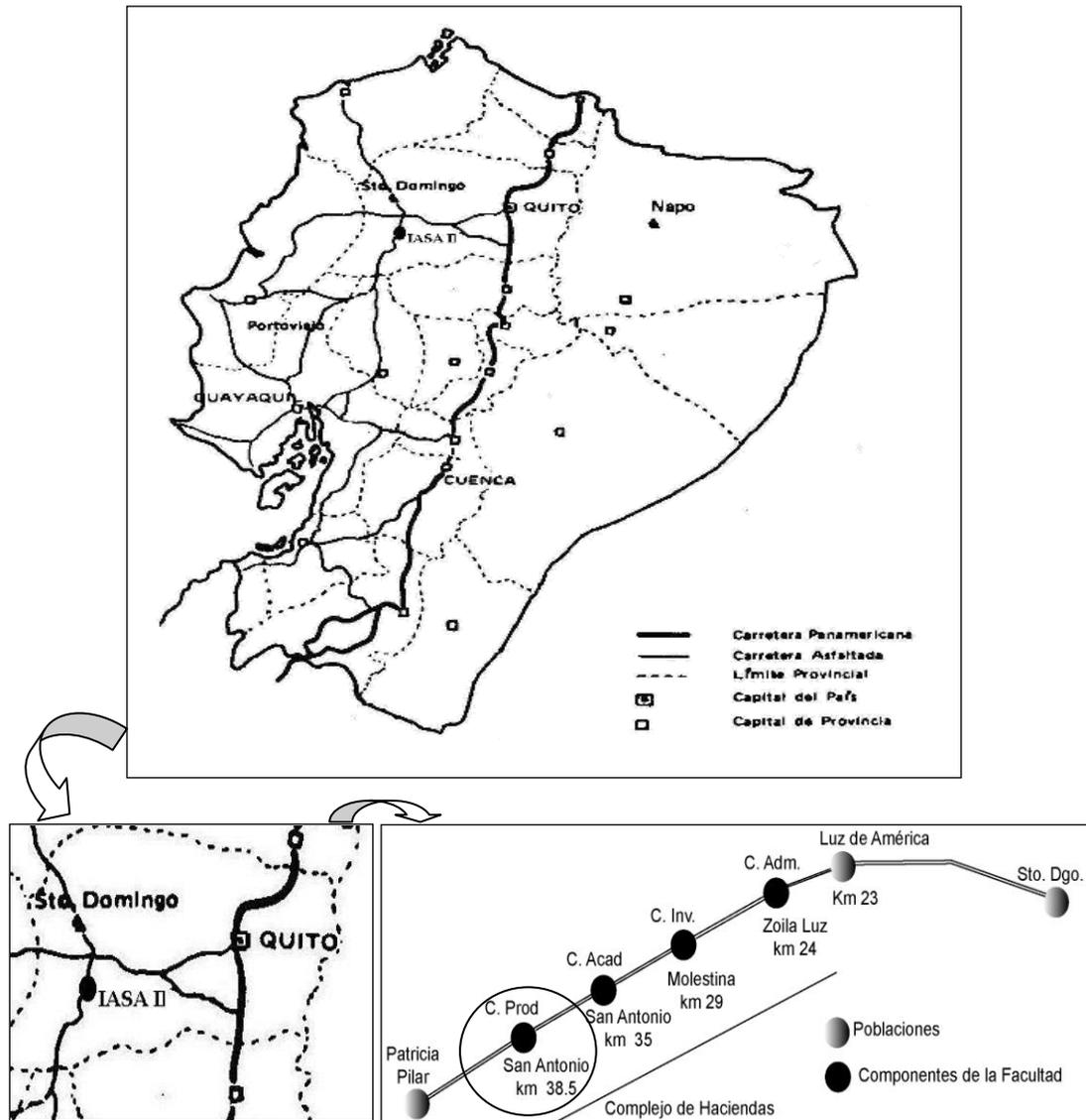


Figura 2. Mapa de la ubicación geográfica del área experimental

### 3.3. MATERIALES.

#### 3.3.1. Materiales de laboratorio

- |  |  |
|--|--|
| ✓ <i>Bacillus subtilis</i> IASA –<br>ESPE  | ✓ Turba Chimborazo   |
| ✓ <i>Pseudomona cepacia</i> IASA<br>– ESPE | ✓ Vermiculita.<br>✓ Cloruro de sodio 1%.<br>✓ Agar plate count (PCA) |

- ✓ Agar
- ✓ Agar nutritivo
- ✓ Triptona
- ✓ Cajas petri
- ✓ Mecheros
- ✓ pH metro digital.
- ✓ Fundas de plástico de polietileno (0.05mm).
- ✓ Zaranda malla # 100
- ✓ Frascos con tapa de 500 ml.
- ✓ Asas de transferencia
- ✓ Bisturí
- ✓ Parafilm
- ✓ Jeringas de 10 y 60 ml.
- ✓ Toneles plásticos etiquetados.
- ✓ Molino de martillo.
- ✓ Recipientes plásticos.
- ✓ Balanza electrónica.
- ✓ Estufa
- ✓ Agua destilada.
- ✓ Fundas plásticas de basura
- ✓ Papel periódico.
- ✓ Sellador de plástico.
- ✓ Autoclave.
- ✓ Papel aluminio
- ✓ Papel toalla
- ✓ Peptona caseína.
- ✓ Fosfato de potasio dibásico ( $K_2HPO_4$ )
- ✓ Extracto de levadura
- ✓ Glucosa.
- ✓ Aceite de vaselina
- ✓ Alcohol antiséptico
- ✓ Microondas.
- ✓ Tubos de ensayo.
- ✓ Refrigerador
- ✓ Cámara de flujo laminar
- ✓ Escala de turbidez MacFarland
- ✓ Incubador – agitador orbital horizontal

### 3.3.1. Materiales de campo

- ✓ Hojas de papel bond
- ✓ Marcadores
- ✓ Plano de campo (mapa)
- ✓ Apoya manos

- ✓ Lápiz porta minas
- ✓ Minas.
- ✓ Borradores
- ✓ Machete
- ✓ Etiquetas plásticas azules para árboles
- ✓ Etiquetas plásticas verdes para árboles
- ✓ Etiquetas plásticas rojas para árboles
- ✓ Plástico indicador de parcelas
- ✓ Tijeras.
- ✓ Masking tape
- ✓ Tijeras podadoras
- ✓ Podón.
- ✓ Baldes para preparar tratamientos (22 l).
- ✓ Baldes para agua (2 l)
- ✓ Tanque de 200 litros
- ✓ Escalera
- ✓ Fundas de plástico.
- ✓ Costales de recolección.
- ✓ Fundas de 100 g de Basubtil (Bacillus subtilis)
- ✓ Fundas de 100 g de Cepacide (Pseudomonas cepacia).
- ✓ Aceite agrícola
- ✓ Azúcar morena
- ✓ Cuprofix
- ✓ Jeringas de 10 y 60 ml
- ✓ Cucharas plásticas para medir productos.
- ✓ Grasa esterilizada.
- ✓ Guantes quirúrgicos
- ✓ Bomba de fumigación y Equipo de protección.
- ✓ Combustible (Aceite y gasolina) respectivamente.
- ✓ Savlon para desinfectar las manos.
- ✓ Alcohol antiséptico.
- ✓ Atomizadores
- ✓ Caja de bandas indicadoras de pH.
- ✓ Balanza

### 3.3. MÉTODOS

#### 1. Características del campo experimental

Para la investigación en la fase de campo se seleccionó el lote Antonio José 1 de cacao CCN 51, mantenido en condiciones normales. Los árboles tienen 12 años de edad, estos en el mes de Noviembre se encontraban en la fase de desarrollo de cherelles los cuales alcanzaron su etapa final en el mes de Mayo.

#### 2. Periodo de estudio y características agroclimáticas

La fase de laboratorio se realizó desde Octubre del 2007 a Mayo del 2008.

**Cuadro 2. Características agroclimáticas (fase de laboratorio)**

FASE DE LABORATORIO	DESCRIPCIÓN
Hacienda	El Prado
Altura	2 748 m s.n.m.
Temperatura	16,35 °C*
Precipitación	638 mm*
Humedad relativa	64.4 1%*

\*Datos tomados de la estación meteorológica IASA I (medias para el periodo noviembre mayo).

La fase de campo se condujo durante un ciclo de producción desde

Noviembre del 2007 a Mayo del 2008, Con las siguientes condiciones climáticas.

**Cuadro 3. Características agroclimáticas (fase de campo)**

<b>FASE DE LABORATORIO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
Hacienda	San Antonio
Altura	234 m s.n.m.
Temperatura	25,04 °C*
Precipitación	2281,4 mm*
Humedad relativa	87 %*

\* Datos tomados en la estación meteorológica Pto. Ila (medias para el periodo noviembre mayo).

### **3. Factores en estudio**

En la investigación se validaron dos biopreparados:

1. *Bacillus subtilis* (BASUBTIL) IASA – ESPE y
2. *Pseudomonas cepacia* (CEPACIDE) IASA – ESPE.

### **4. Tratamientos**

Los tratamientos estuvieron conformados por los biopreparados y un control químico como se indica en el cuadro 4.

**Cuadro 4. Tratamientos en estudio**

N°	TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
T1	Basubtil	<i>Bacillus subtilis</i> IASA – ESPE + Fijador Agrícola 0,05 % + Azúcar 0,05%
T2	Cepacide	<i>Pseudomonas cepacia</i> IASA – ESPE + Fijador Agrícola 0,05 % + Azúcar 0,05%
T3	Control químico	Cuprofix (Hidróxido de cobre + Mancozeb)* + Fijador Agrícola 0,05 %

\* Este funguicida se usó ya que es el más utilizado por los agricultores para el control de la enfermedad según un sondeo realizado en la zona de Santo Domingo.

## 5. Repeticiones

El número de repeticiones que se consideraron para la validación fueron cuatro por cada tratamiento, con la finalidad de tener mayor confiabilidad en los datos.

## 6. Procedimiento

### a. Análisis estadístico

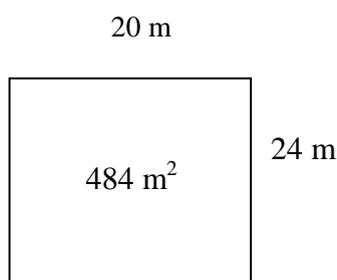
En el lote se dispusieron tres tratamientos con cuatro parcelas demostrativas (repeticiones) por parcela, 48 árboles por tratamiento, en los cuales se evaluó la producción acumulada de cada parcela por cosecha, a partir de la tercera aplicación de los biopreparados hasta la novena aplicación.

**b. Características de las unidades experimentales**

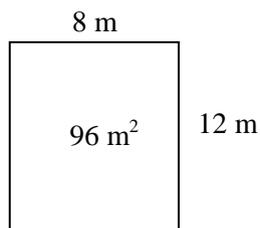
La distancia de siembra de la plantación fue de 4 m x 4 m. Se utilizó para la separación de los tratamientos dos hileras de borde o de acuerdo a la disponibilidad de árboles. El área y el número de árboles por parcela fue la siguiente:

- a) Unidades experimentales: 12
- b) Área del ensayo: 10 064 m<sup>2</sup>.
- c) Área de la parcela total: 484 m<sup>2</sup>.
- d) Área de la parcela neta: 96 m<sup>2</sup>.
- e) Forma de la parcela: Cuadrada
- f) Distancia entre parcela: 4 m.
- g) Número de plantas por parcela total: 416
- h) Número de plantas por parcela útil: 144
- i) Número de plantas por tratamiento: 48
- j) Número de plantas por parcela unitaria: 12
- k) Esquema:

A continuación se presenta las figuras 3 y 4 de la parcela total y neta respectivamente, con sus dimensiones correspondientes:



**Figura 3. Dimensiones de la parcela total.**



**Figura 4. Dimensiones de la parcela útil.**

### c. Diseño Experimental

El esquema del análisis del DBCA se indica en el siguiente cuadro:

**Cuadro 5. Esquema del ADEVA**

Fuentes de Variación	Grados de Libertad
Total	11
Repetición	3
Tratamientos	2
Error Experimental	6

$$\text{Coeficiente de variación} = \frac{\sqrt{\text{CMEE}}}{\bar{X}} * 100$$

Con los datos colectados se realizó un ADEVA las medias se compararon mediante TUKEY al 0,05 %, cuando los tratamientos fueron significativos.

### d. Datos a tomar y métodos de evaluación

La validación de los biopreparados tuvo una duración de un ciclo de

producción de seis a siete meses, con la finalidad de obtener datos de las mazorcas, que estaban en estado de cherelles hasta que llegaron a completar su formación y maduración.

### **1) Peso de mazorcas**

Se recolectaron las mazorcas a punto de madurez de cada árbol de cada parcela. Se abrieron con la ayuda de un machete y se procedió a extraer las almendras. Primero se pesó el total de las almendras y posteriormente se seleccionaron y pesaron las almendras dañadas. El pesaje de las mazorcas se realizó cada dos semanas.

### **2) Daño interno**

En los 48 árboles elegidos de los tratamientos aplicados en el ensayo, también se evaluó el daño interno en las mazorcas de cacao atacadas por *Moniliphthora roleri*, separando granos sanos de enfermos y expresando su peso en porcentajes. Las evaluaciones se efectuaron cada tres semanas, considerando todas las mazorcas existentes en los árboles del ensayo.

### **3) Datos climatológicos**

Se tomaron los datos de precipitación y humedad relativa diaria de la Estación Meteorológica Puerto Ila, y se calculó la media mensual para

correlacionar con los promedios de incidencia externa de cada tratamiento y los valores diferentes de temperatura, precipitación y humedad. Con los datos acumulados de severidad, se calculó el Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE).

#### **e. Análisis Económico**

Se utilizó el análisis del presupuesto parcial según Perrín *et al.* (1976) para lo cual se calcularon los costos variables y fijos.

Para el cálculo de los costos variables se incluyó el costo de los insumos, depreciación de equipos y aplicación utilizada en los tratamientos.

### **7. Liberación de biopreparados en el campo**

Las actividades se realizaron en el siguiente orden:

#### **a. Selección del lote experimental**

El campo experimental estuvo ubicado en el lote Antonio José 1 de la Hda San Antonio, administrado por la ESPE (Anexo 1).

#### **b. Selección de parcelas demostrativas**

Se seleccionaron cuatro parcelas demostrativas dentro del lote para realizar la validación de los biopreparados.

### **c. Delimitación de parcelas demostrativas**

Las doce parcelas (tratamientos y repeticiones) se delimitaron utilizando plástico y estacas

### **d. Análisis de suelo y foliar**

Se realizó un análisis de suelo y foliar del lote en estudio, para determinar las necesidades nutricionales del cultivo y las características edafológicas, cabe señalar que esta labor se la hizo como complemento a las otras labores de cultivo.

El número de muestras que se realizaron para el análisis de suelo fueron dos (Anexo 2), debido a que el lote se encuentra ubicado de una forma homogénea. De igual manera se hizo para el análisis foliar (Anexo 3). Estos análisis fueron realizados en el INIAP, debido a la relación que existe con esta institución.

### **e. Poda de mantenimiento**

Al inicio del ensayo se realizó una poda de mantenimiento para eliminar las ramas muertas o mal formadas, además se retiraron los chupones que crecieron en el tronco y ramas productivas. En el mes de Febrero se realizó otra poda de mantenimiento seguido de una aplicación de alquitrán en las heridas causadas por la poda (Figura 5A).

#### f. Podas fitosanitarias

Se realizaron podas fitosanitarias al inicio del ensayo, eliminando manualmente cherelles muertos, escobas de bruja, ramas muertas, plantas epifitas y mazorcas atacadas visualmente por *M. royeri*, con el propósito de no dejar en el campo altas fuentes de inóculo. Se utilizaron tijeras podadoras las cuales se desinfectaron con alcohol antiséptico al pasar de un árbol a otro con la finalidad de que una planta enferma no afecte al resto de los árboles. El material desechado se dejó sobre la superficie del terreno para su descomposición (Figura 5B).



**Figura 5. (A) Poda de mantenimiento y (B) Poda fitosanitaria del lote experimental de cacao híbrido CCN - 51**

#### g. Cosecha de mazorcas

Se recolectaron las mazorcas listas para la cosecha, se abrieron las mazorcas con la ayuda de un machete y se procedió a extraer las almendras. La cosecha se realizó cada dos semanas desde la tercera

aplicación de los biopreparados considerando todas las mazorcas de cada árbol de cacao seleccionados para el estudio (Anexo 4).

#### **h. Pesaje de mazorcas**

Primero se pesó el total de las almendras y posteriormente se pesaron solo las almendras dañadas. Esta evaluación se realizó cada dos semanas, considerando todas las mazorcas de los árboles de cacao involucrados en el ensayo.

#### **i. Preparación de los biopreparados**

En un recipiente se colocó dos litros de agua y se agregó 50 g de biopreparados. Se filtró la suspensión por una gasa esterilizada, se colocó 10 g de azúcar morena, 5 cc de Fijador agrícola (Aceite Agrícola) y se agitó hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla se colocó en la bomba nebulizadora y se aforo con agua a la capacidad de la bomba hasta 15 l.

#### **j. Aplicación de los biopreparados**

Los biopreparados se aplicaron cada tres semanas, hasta el punto de escurrimiento, sobre las mazorcas (Figura 6A).

### k. Preparación del producto químico

En un recipiente con 2 l de agua se agregó el funguicida (Cuprofix) en una dosis de 1,5 cc por litro de agua, además se adicionó 5 cc de fijador agrícola 10 g de azúcar morena y se agitó hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla se colocó en una bomba de mochila hasta completar la capacidad de la misma.

### l. Aplicación del producto químico

Se aplicó el tratamiento químico cada tres semanas, sobre las mazorcas hasta el punto de escurrimiento con la utilización de una bomba de mochila, en horas de la mañana (Figura 6B).



**Figura 6. (A) Aplicación de biopreparados Basubtil y Cepacide y (B) Aplicación de Producto químico Cprofix**

### m. Control de malezas

Se controló las malezas de forma manual con el uso de machete en

intervalos de 45 días, en la temporada seca, y para la época lluviosa cada 30 días, en el lote en estudio.

## **8. Producción de biopreparados**

Las siguientes actividades se realizaron en la fase de laboratorio utilizando la metodología desarrollada por Yáñez (2003).

Para la producción y formulación de biopreparados, el método seleccionado mediante producción artesanal en estado sólido y su formulación en Turba/Vermiculita más caldo enriquecido. La metodología se describe a continuación:

### **a. Acondicionamiento de soportes**

Se realizó el secado del soporte al ambiente y la eliminación de impurezas con una zaranda número 30 (equivalente a 28 mesh). Se procedió a la molienda del soporte con un molino de martillo para lograr el tamaño adecuado de las partículas, luego se pasó por un tamiz de 100 mesh.

Se colocó 100 g de soporte procesado en una funda de plástico de polietileno dejándola abierta 1 cm para inocular los caldos de las bacterias. El sellado completo se realizó posteriormente.

Las fundas selladas se envolvieron en papel periódico y se colocaron en un autoclave por tres ocasiones consecutivas a 121 °C, durante 20 minutos cada vez.

**b. Preparación de aislados puros de *Pseudomonas cepacia* y *Bacillus subtilis***

Se repicaron aislados puros del banco de microorganismos del proyecto Monilia – ESPE, en cajas Petri con agar nutritivo y se incubaron por 24 horas, a 28 °C (Figura 7 A y B).



**Figura 7. Aislados puros. (A) *Pseudomonas cepacia* y (B) *Bacillus subtilis***

**c. Preparación de inóculo bacteriano**

Se prepararon las suspensiones bacterianas a una concentración entre  $1,5 \times 10^9$  a  $2,1 \times 10^9$  ufc/ml, en tubos de ensayo, con 5 ml de solución salina estéril.

Se inoculó la suspensión preparada en caldo 6B a razón de 1 ml por cada 100 ml de medio.

Los cultivos bacterianos se incubaron de 36 a 48 horas a 28 °C, en agitación continua, mediante un agitador orbital horizontal a 60 r.p.m. hasta que el cultivo bacteriano alcanzó una población de  $10^9$  ufc/ml.

#### **d. Inoculación de caldos bacterianos**

En cada funda de 100 g con soporte pretratado se inocularon 70 ml de cultivo bacteriano, de cada bacteria en estudio (Figura 8).



**Figura 8. Inoculación de caldo bacteriano a soporte de Turba de Chimborazo**

#### **e. Maduración de biopreparados**

Las fundas con el material inoculado se incubaron a 28 °C, durante ocho días. Cada tres días se homogenizó el material, de forma manual.

**f. Empaque y etiquetado**

Se utilizaron fundas de plástico de polietileno de 0,05 mm de espesor (baja densidad). En la etiqueta se indicó las características del producto, concentración, modo de preparación y precauciones para su uso y aplicación.

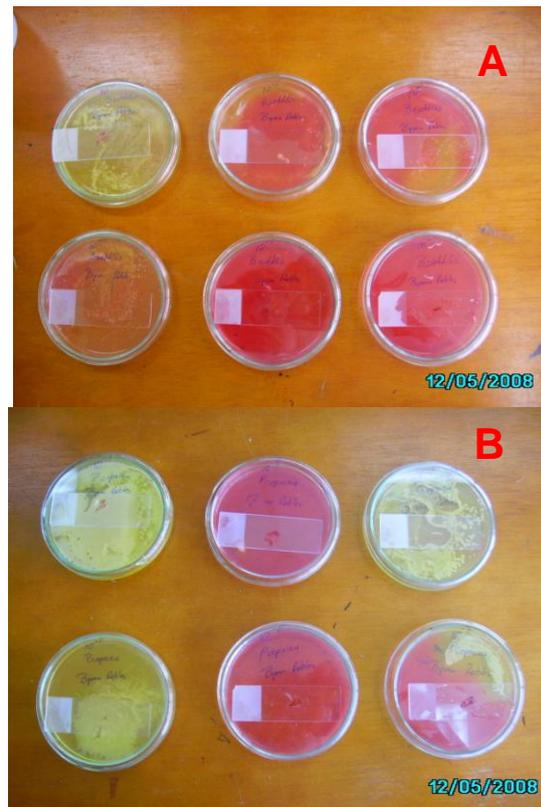
**9. Control de calidad de biopreparados****a. Cuantificación de población bacteriana.**

Se determinó la población bacteriana mediante siembra en agar, PCA y conteo de ufc/g de biopreparado. En una funda plástica estéril se colocó 5 g de biopreparado y 45 ml de solución salina estéril. A partir de esta solución madre se realizaron diluciones sucesivas desde  $1 \times 10^{-1}$  hasta  $1 \times 10^{-7}$ . Se seleccionaron las diluciones  $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ , de los que se tomaron alícuotas de 50  $\mu$ l y se inocularon en las cajas petri con agar PCA. Estas se incubaron por 24 a 48 horas a 28 °C.

Para determinar el número de ufc/g se multiplicó el promedio del número de colonias obtenidas del recuento, por el volumen empleado en la preparación de la solución madre (50 ml) y el factor de dilución; y se dividió para el peso de la muestra utilizada (5 g) por tamaño de alícuota (50  $\mu$ l)

**b. Pureza de biopreparados**

La pureza de los biopreparados se comprobó en agar PCA selectivos para bacterias de los géneros *Bacillus* Gram (+) y de los géneros *Pseudomonas* Gram (-) (Figura 9 A y B).



**Figura 9. Pureza de biopreparados. (A) Basubtil y (B) Cepacide**

**c. Determinación de pH de biopreparados.**

De una funda de 100g de biopreparado se extrajo 50 g y se colocó en Erlenmeyers de 500 ml con 450 ml de agua destilada y se midió el pH con el pHmetro.

#### d. Determinación de humedad de biopreparados.

Se pesó en la balanza una funda de biopreparado y se secó en la estufa por 24 horas a 60 °C. Se pesó nuevamente y se calculó el porcentaje de humedad. Los resultados obtenidos se pasaron a los cuadros.

En los cuadros 6 y 7 se presentan los resultados de dos evaluaciones que se realizaron para el control de calidad de los biopreparados Basubtil y Cepacide.

**Cuadro 6. Resultado de dos evaluaciones del control de calidad del biopreparado Basubtil en base a Vermiculita**

PARÁMETROS	EVAL. 1	EVAL. 2
pH	6.99	6.79
% Humedad	53.78	48.71
Concentración ufc/g	$6,1 \times 10^3$	$1,8 \times 10^4$
Pureza	+	-
Tinción de Gram	Bacilos Gram +	Bacilos Gram +

**Cuadro 7. Resultado de dos evaluaciones del control de calidad del biopreparado Cepacide en base a Turba de Chimborazo**

PARÁMETROS	EVAL. 1	EVAL. 2
pH	7.84	7.32
% Humedad	33.13	29.78
Concentración ufc/g	$8,6 \times 10^3$	$1.9 \times 10^4$
Pureza	+	-
Tinción de Gram	Bacilos Gram -	Bacilos Gram -

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

##### 4.1 EFECTO DE LOS BIOPREPARADOS EN LA PRODUCCIÓN ACUMULADA DE ALMENDRA.

##### 4.1.1 Efecto de biopreparados sobre el peso total acumulado de almendra.

Una vez realizado el análisis de variancia para el peso total acumulado de almendra de cacao CCN 51, se obtuvo un promedio general de 5.013,21 g/parcela, con un coeficiente de variación de 27,27 % (Cuadro 8), y al realizar la prueba de Tukey al 5 % podemos apreciar que no existen significancia entre los tratamientos aplicados en este estudio.

**Cuadro 8. Análisis de Variancia (ANOVA) del peso total acumulado de almendra de cacao híbrido CCN – 51 por efecto de los biopreparados Basubtil, Cepacide y el tratamiento químico con Cuprofix en un lote experimental de la Hda. San Antonio, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas (Noviembre 2007 – Mayo 2008).**

F de V	GL	SC	CM	F calculada	F 0,05	F 0,01
Total	11	13703971,43				
Repeticiones	3	1332488,30	444162,77	0,24	4,76	9,78
Tratamientos	2	298030,93	579183,60	0,31	5,14	10,92
Error Exp.	6	3656526,96	1868852,65			
Promedio general: 5.013,21 g						
Coeficiente de variación: 27,27 %						

En el cuadro 9, citan los valores promedios de la producción acumulada de almendra de cacao híbrido CCN – 51 por cada tratamiento durante el ciclo de producción noviembre 2007 – mayo 2008, sin embargo, al no diferenciarse estadísticamente, se puede indicar que matemáticamente la mayor producción se obtuvo con aplicaciones periódicas del producto químico con un peso acumulado de 5.352,5 g.

**Cuadro 9. Promedios del peso total acumulado de cacao híbrido CCN – 51 por efecto de los biopreparados Basubtil, Cepacide y el tratamiento químico Cuprofix en un lote experimental de la Hda. San Antonio, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas (Noviembre 2007 – Mayo 2008).**

TRATAMIENTOS	MEDIAS (g)
Cuprofix	5.352,5
Basubtil	5.085,36
Cepacide	4.601,79

Por su parte con la aplicación de los biopreparados Cepacide y Basubtil se obtuvieron pesos acumulados de 4.601,79 g y 5.085,36 g respectivamente. De acuerdo con estudios de Falconí *et al.*, 2007 indican que las aplicaciones de los biopreparados en dosis y frecuencias indicadas facultarán la obtención de grano sano en donde se observa un control de la moniliasis de una forma evidente.

#### **4.1.2 Efecto de biopreparados para el peso dañado acumulado de almendra.**

Realizado el ANONVA se determinó que estadísticamente no hay diferencias significativas entre los tratamientos ni entre las repeticiones para el peso dañado acumulado de almendras de cacao híbrido CCN – 51 al 1 y 5 % (Cuadro 10).

Con respecto al peso dañado de almendras se obtuvo un promedio general de 1.536,43 g/parcela, con un coeficiente de variación de 45,93 % (Cuadro 10).

**Cuadro 10. Análisis de Variancia (ANOVA) del peso dañado acumulado de almendra de cacao híbrido CCN – 51 por efecto de los biopreparados Basubtil, Cepacide y el tratamiento químico Cuprofix en un lote experimental de la Hda. San Antonio, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas (Noviembre 2007 – Mayo 2008).**

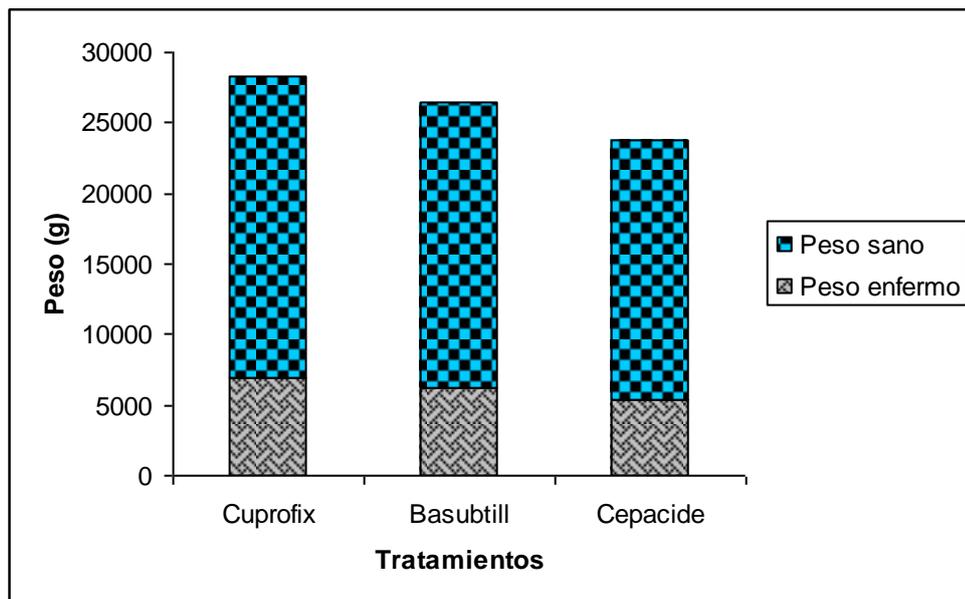
<b>F de V</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F calculado</b>	<b>F 0,05</b>	<b>F 0,01</b>
Total	11	3442442,86				
Repeticiones	3	165919,05	55306,35	0.11	4,76	9,78
Tratamientos	2	288498,98	144249,49	0.29	5,14	10,92
Error Exp.	6	2988024,83	498004,14			
Promedio general: 1 536,43 g						
Coeficiente de variación: 45,93 %						

Al revisar los valores promedio del peso dañado de almendra de cacao Híbrido CCN – 51, se estableció que a pesar de no existir diferencias estadísticas entre tratamientos con el producto químico Cuprofix se obtuvo un peso de 573,45 g. mientras que con los biopreparados Cepacide y Basubtil se obtuvieron pesos de 447,02 g y 515,95 g. respectivamente (Cuadro 11).

**Cuadro 11. Promedio del peso acumulado de almendra dañada de cacao híbrido CCN – 51 por efecto de los biopreparados Basubtil, Cepacide y el tratamiento químico Cuprofix en un lote experimental de la Hda. San Antonio, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas (Noviembre 2007 – Mayo 2008).**

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>MEDIAS (g)</b>
Cepacide	447,02
Basubtil	515,95
Cuprofix	573,45

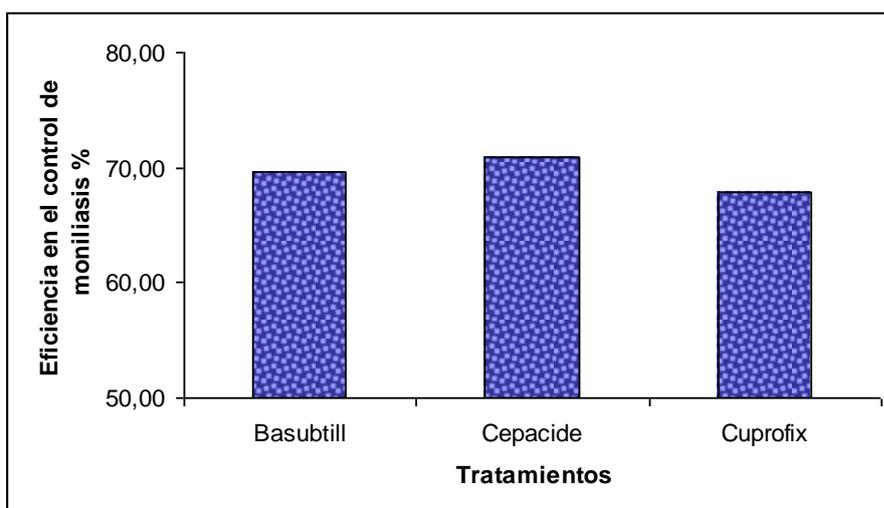
Al analizar los pesos de almendras dañadas y sanas de cacao Híbrido CCN – 51 por cada tratamiento, se determinó que el peso total por efecto del producto químico Cuprofix es el más alto con 21.410g. Los tratamientos que recibieron el biopreparado Basubtil alcanzaron pesos de 20.341,43 g y Cepacide 18.407,14 g, Sin embargo, Cuprofix tuvo también el mayor peso de grano dañado de almendras con 6.881,43 g. Por tanto los tratamientos con Cepacide y Basubtil presentan la mayor cantidad de almendras sanas (Figura 10). Estos resultados concuerdan con estudios realizados por Yáñez (2004) en cacao fino y de aroma en donde el rendimiento de almendras sanas fue mayor con aplicaciones de biopreparados a base de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas cepacia*.



**Figura 10. Producción acumulada de almendra sana y dañada de cacao Híbrido CCN – 51 con los biopreparados Basubtil, Cepacide y el tratamiento químico con Cuprofix en un lote experimental de la Hda. San Antonio, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas (Noviembre 2007 – Mayo 2008).**

En base a los datos del peso total acumulado de almendras de cacao CCN – 51 de

cada uno de los tratamientos (Anexo 5), se calculó la eficiencia de los dos biopreparados en comparación con el tratamiento químico Cuprofix durante el periodo noviembre 2007 – mayo 2008. Con aplicaciones de Cepacide y Basubtil se obtuvieron porcentajes de 70,86 % y 69,56 %, respectivamente, en relación con el tratamiento químico. Con esto se demuestra que la producción por efecto de la aplicación de biopreparados en las condiciones de la Hda. San Antonio fue muy competitiva (Figura 11), esta información es similar a lo que indica Peralvo y Saavedra (2006) en el control del patógeno con las dosis y frecuencias aplicadas en este estudio con una eficiencia entre el 60 al 80 %.



**Figura 11. Efecto de los biopreparados Cepacide y Basubtil y del funguicida Cuprofix en el peso total acumulado de almendra de cacao híbrido CCN - 51, desde noviembre 2007 – mayo 2008, en un lote experimental de la Hda. San Antonio, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas**

Al revisar estudios similares realizados por Falconí *et al.* (2004); Peralvo y Saavedra (2006); Yáñez (2004) en cacao fino y de aroma en diversas localidades de las provincias de Los Ríos y Cotopaxi y comparar con los resultados de la presente investigación se demuestra que la aplicación preventiva de los biopreparados Cepacide y Basubtil es eficiente en el control de *Moniliophthora roreri*. El efecto

positivo es manifiesto por la reducción en la incidencia del patógeno, cuantificado en un mayor peso de almendra sana. Esta estrategia es válida para establecer planes de manejo integrado de enfermedades en las diferentes plantaciones de cacao en nuestro país.

#### **4.2. EFECTO DE BIOPREPARADOS SOBRE EL PORCENTAJE DE DAÑO INTERNO DE ALMENDRA**

En el análisis de variancia para el porcentaje de daño interno no se detectaron diferencias estadísticas para repeticiones y tratamientos (Cuadro 12).

El promedio general del porcentaje de daño interno de almendras de cacao híbrido CCN – 51 fue de 30,16 %, con un coeficiente de variación de 24,65 % (Cuadro 12).

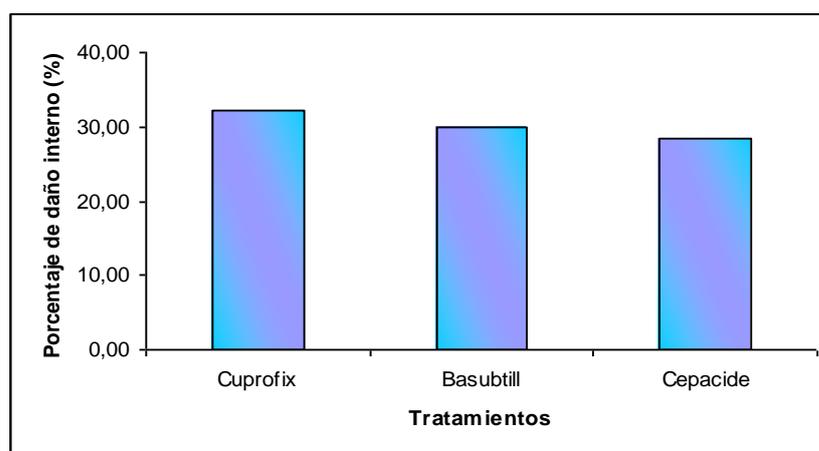
**Cuadro 12. Análisis de variancia (ANOVA) del porcentaje de daño interno de cacao CCN -51 debido a la aplicación de los biopreparados Basubtil, Cepacide y el tratamiento químico Cuprofix en un lote experimental de la Hda. San Antonio, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas (Noviembre 2007 – Mayo 2008).**

<b>F de V</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F calculado</b>	<b>F 0,05</b>	<b>F 0,01</b>
Total	11	534,06				
Repeticiones	3	171,67	57,22	1,04	4,76	9,78
Tratamientos	2	30,89	15,45	0,28	5,14	10,92
Error Exp.	6	331,49	55,25			
Promedio general: 30,16 %						
Coeficiente de variación: 24,65 %						

En el cuadro 13, se observa los valores promedios del porcentaje de daño interno de almendra por efecto de cada tratamiento durante el ciclo de producción noviembre 2007 – mayo 2008. Al no diferenciarse estadísticamente se puede indicar que el mayor porcentaje de daño interno se apreció con el tratamiento químico Cuprofix con un 32,22 %, mientras que con los biopreparados Cepacide y Basubtil se obtuvieron 28,31 % y 29,94 %, respectivamente (Figura 12), lo que concuerda con estudios de Falconí *et al.*, (2007) donde señala que las dos bacterias aplicadas en campo para el control del patógeno es evidente, en comparación con el producto químico Cuprofix.

**Cuadro 13. Promedio del porcentaje de daño interno de las almendras de cacao híbrido CCN – 51 por efecto de los biopreparados Basubtil, Cepacide y el tratamiento químico Cuprofix en un lote experimental de la Hda. San Antonio, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas (Noviembre 2007 – Mayo 2008).**

TRATAMIENTOS	MEDIAS (%)
Cepacide	28,31
Basubtil	29,94
Cuprofix	32,22



**Figura 12. Medias del porcentaje de daño interno de almendra de cacao híbrido CCN – 51 por efecto de los biopreparados Basubtil, Cepacide y el tratamiento con el químico Cuprofix en un lote experimental de la Hda. San Antonio, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas (Noviembre 2007 – Mayo 2008).**

De acuerdo con estudio realizados por Falconí *et al.*, (2005) en cacao fino y de aroma, el menor porcentaje de daño interno en almendras de cacao se obtuvo con aplicaciones del biopreparado Cepacide, seguido por el producto químico Cuprofix y por último Basubtil. Sin embargo, los porcentajes de daño interno determinados en esta investigación permiten demostrar también la bondad de Cepacide para controlar la moniliasis en cacao CCN-51, en comparación con el tratamiento químico Cuprofix.

#### **4.3. ANÁLISIS ECONÓMICO DE LOS TRATAMIENTOS.**

Siguiendo la metodología del análisis del presupuesto parcial Perrín *et al.*, (1976) se procedió a obtener el beneficio bruto que corresponde al rendimiento de las almendras por su precio en finca (\$ 0,45 / kg), por otro lado se sumaron todos los costos variables. De la diferencia del beneficio bruto con los costos variables se obtuvo el beneficio neto, siendo este valor negativo para todos los tratamientos en estudio, por tanto no se pudo realizar el análisis de dominancia y el análisis marginal respectivo (Anexo 6). Estudios realizados por Krauss *et al.* (2003), concuerdan que el uso de tratamientos biológicos para el control de la moniliasis no resulta económico debido a que muchas veces coinciden con años de muy baja producción para el cacao.

Si bien el propósito de este análisis fue determinar el tratamiento más económico para controlar la moniliasis en el campo, vale indicar que por un lado los rendimientos fueron muy reducidos provocando un beneficio bruto bajo y por otro lado los costos variables fueron muy altos resultando en pérdidas para todos los tratamientos.

Una posible causa de los muy bajos rendimientos en este ensayo fue el exceso de lluvias seguidas en el lugar. Kaiser, (1987) y Lecoeur y Sinclair, (1996) establecieron que el estrés ocasionado por exceso de lluvias causa serios cambios metabólicos que afectan fuertemente el crecimiento y desarrollo de las plantas resultando en importantes pérdidas en la producción.

Al ordenar los beneficios netos de cada tratamiento en forma decreciente de sus costos variables se procedió a realizar el análisis de dominancia donde el tratamiento dominado es aquel que a igual o menor beneficio neto, presenta un mayor costo variable. De este análisis el único tratamiento no dominado fue Basubtil, por tanto se constituyó en la única alternativa económica sin necesidad de realizar el análisis marginal (Cuadro14).

**Cuadro 14. Cálculo del presupuesto parcial. Proyección de rendimientos en base al año 2007 y reducción de costos de producción de biopreparados en un experimento en cacao híbrido CCN – 51 por efecto de los tratamientos biológicos Basubtil, Cepacide y el químico Cuprofix en el lote experimental de la Hda. San Antonio, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas (Noviembre 2007 – Mayo 2008).**

CONCEPTO	BASUBTIL	CEPACIDE	CUPROFIX
Rendimiento (kg/ha)	1938,62	1787,07	1901,63
Rendimiento ajustado (-10%)	1745,42	1608,37	1685,07
Beneficio bruto	663,26	611,18	640,33
<b>COSTOS VARIABLES</b>			
Aplicación de biopreparado	512,03	512,03	
Aplicación de funguicida			490,3
<b>TOTAL COSTOS VARIABLES</b>	512,03	512,03	490,3
<b>Beneficio neto parcial</b>	151,23	99,15	150,03

De acuerdo con estudios realizados por Falconí *et al.*, (2003), el uso del control biológico a más de ser un método sano para el agricultor y amigable con el medio ambiente es económicamente más rentable que el método tradicional. Cabe señalar que la diferencia es mínima pero en base a lo mencionado económicamente los dos tratamientos son factibles en el control del hongo *M. royeri*, por lo que Basubtil resulta ser competitivo a la hora de controlar este hongo en relación con Cepacide y el producto químico Cuprofix.

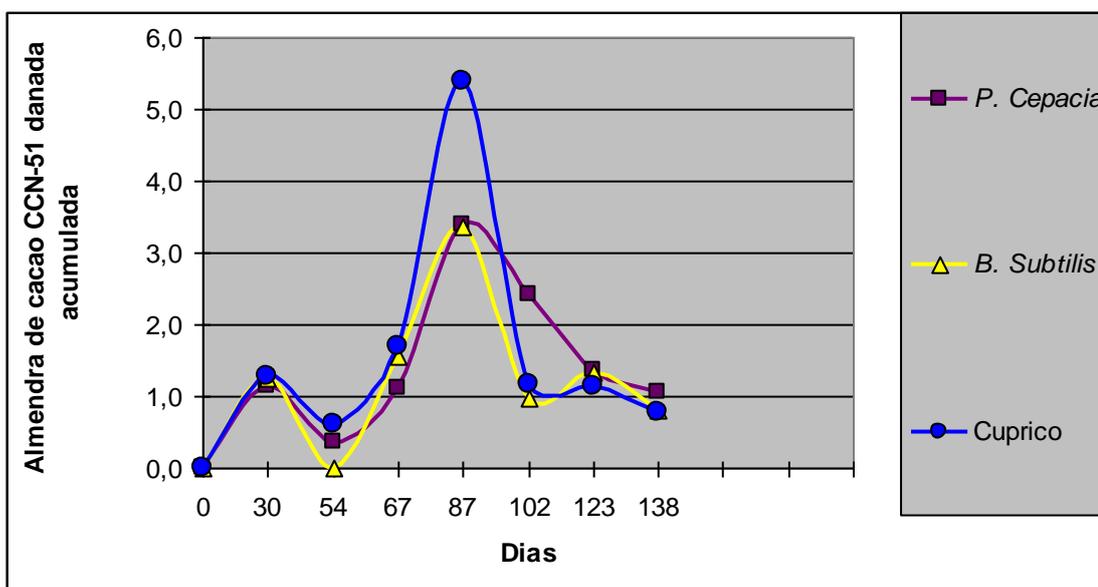
De acuerdo con estudios realizados por Rodríguez (2002), la sustitución en el uso de insumos químicos en el cacao orgánico en nuestro país, esta asociada a efectos positivos, incluyendo menores riesgos de contaminación de suelos, agua y aire. Al introducir tecnologías más acordes con la conservación de los recursos naturales, el uso de los biopreparados mantiene al ecosistema libre de químicos peligrosos y dañinos para la salud humana y de los seres vivos que se encuentra ocupando el mismo.

Es importante señalar el beneficio social que produce la aplicación de estos biopreparados debido a que se aprovecha la mano de obra de mujeres desempleadas que forman parte del sistema cacaotero del país. Según Lastra (2004), debido a una cultura que parece estar muy arraigada en las diferentes comunidades productoras de cacao, las mujeres se dedican al cuidado del hogar y los niños, mientras que los hombres son los que controlan el manejo del cultivo. Se convierte en una opción viable la integración de mujeres en la producción de biopreparados para controlar enfermedades que afectan al cultivo de cacao.

#### 4.4 DETERMINACIÓN DEL ABCPE

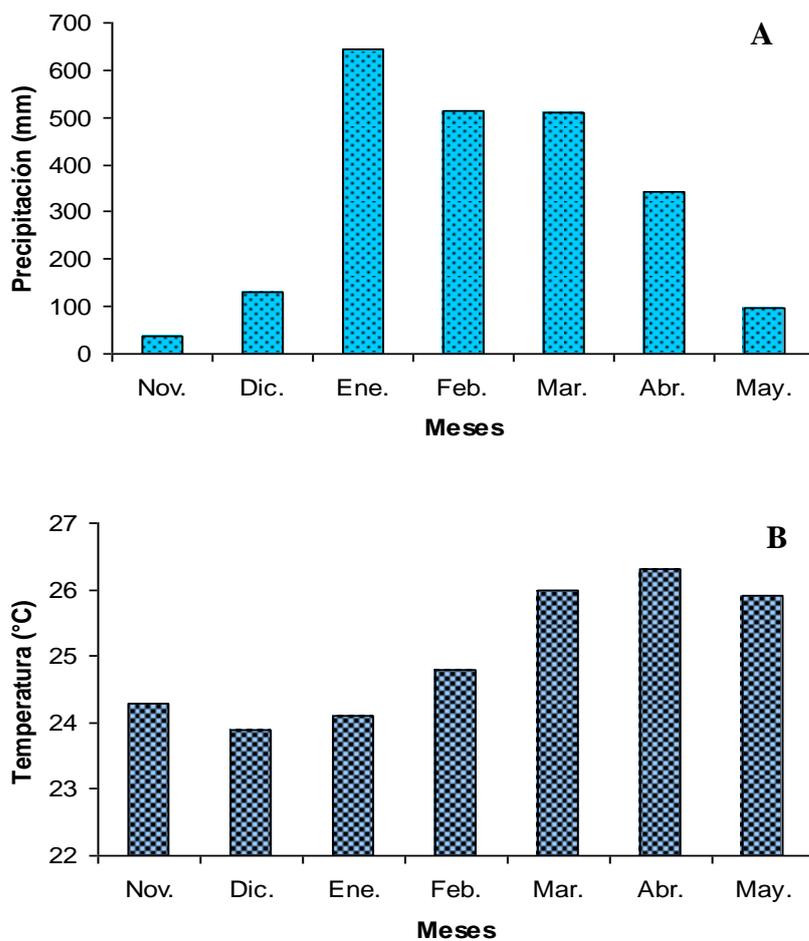
Con los datos de incidencia de las siete evaluaciones durante el periodo noviembre 2007 – mayo 2008 se calculó del Área Bajo la Curva del Progreso de la Moniliasis/Enfermedad (ABCPE). Landeo, (1998) determinó que la incidencia de la enfermedad tuvo incrementos para cada uno de los tratamientos con picos elevados que se relacionaron directamente con factores medioambientales (Figura 12). Se puede determinar que los tratamientos que recibieron los biopreparados Basubtil y Cepacide tuvieron una menor incidencia de la moniliasis con 143,6 y 144,7 respectivamente, mientras que el tratamiento químico tuvo mayor cantidad de almendras dañadas con 207,6. Basubtil presentó un mejor control al ataque de *M. royeri* en el cultivo de cacao CCN-51 bajo las condiciones ambientales de la Hda. San Antonio, ubicada en el kilómetro 40 de la vía Sto. Domingo de los Tsáchilas - Quevedo (Figura 13).

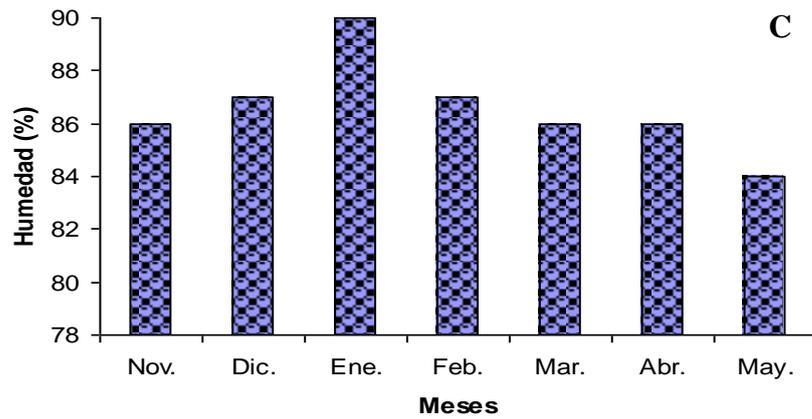
**Figura 13. Área Bajo la Curva de Progreso de la Moniliasis/Enfermedad (ABCPE) por efecto de dos productos biológicos y un producto químico en cacao CCN-51, Hda. San Antonio, Sto. Domingo de los Tsáchilas, 2008**



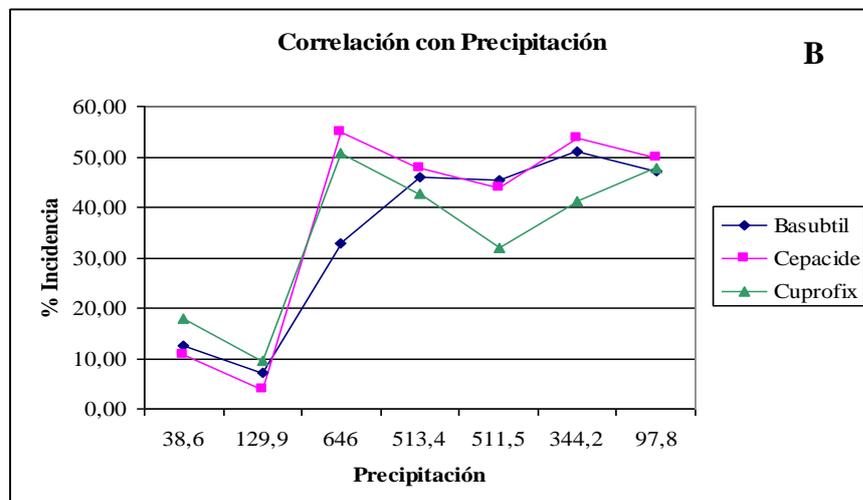
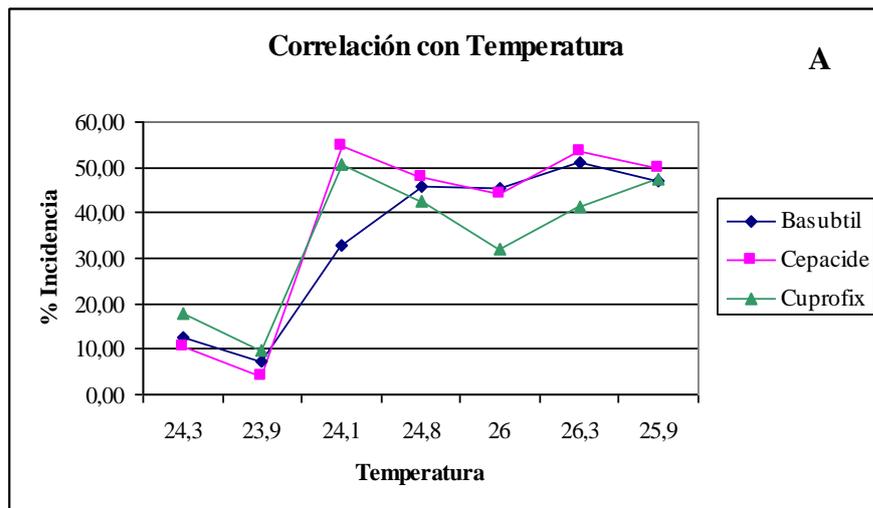
#### 4.5 CORRELACIONES ENTRE FACTORES MEDIO AMBIENTALES.

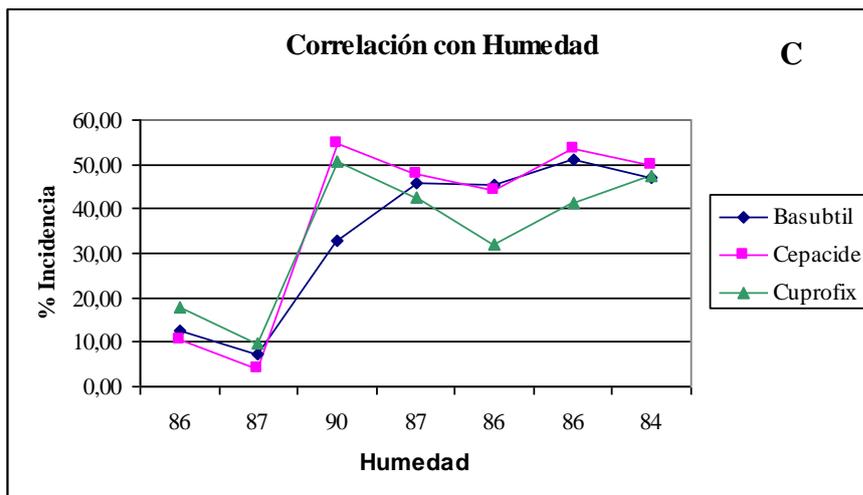
El ensayo se llevó a cabo durante un ciclo de producción, en el periodo noviembre del 2007 a mayo del 2008. Esta época se caracterizó por lluvias altas, calor moderado y alta humedad relativa. La precipitación mensual promedio fue de 325,9 mm; la temperatura mensual de 25,04 °C; y la humedad relativa con un promedio mensual de 86 % (Figura 14).





**Figura 14. Reportes climatológicos de los promedios mensuales tomados de la Estación Meteorológica Puerto Ila (Luz de América, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas) durante la fase experimental noviembre 2007 – mayo 2008. (A) niveles de precipitación, (B) registros de temperatura y (C) porcentajes de humedad.**





**Figura 15. Correlaciones del porcentaje de Incidencia de la moniliasis y los factores medioambientales durante la fase experimental noviembre 2007 – mayo 2008 en la Hda. San Antonio Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas. (A) Correlación con la Temperatura, (B) Correlación con la Precipitación y (C) Correlación con la Humedad.**

Desrosiers *et al*, (1995), Evans (1981), López (1986), Porras (1983) Suárez (1993) en sus diferentes investigaciones determinan que infecciones producidas por el hongo *M. royeri* en campo son favorecidas por la lluvia dominante y la alta humedad existente desde dos meses antes y durante el periodo de experimentación. Es decir, que el efecto de los biopesticidas se evalúa bajo condiciones medioambientales conductivas para el desarrollo de la enfermedad, en la Hda. San Antonio, durante noviembre 2007 a mayo 2008 (Figura 15 A, B y C).

## V. CONCLUSIONES

1. Los tratamientos con los productos biológicos Basubtil y Cepacide a base de bacterias epifitas influyeron en una mayor cantidad de almendras sanas en relación con el funguicida Cuprofix. La eficiencia de Cepacide y Basubtil se basa en que la producción acumulada fue de 70,86 % y 69,56 %, respectivamente, en relación al tratamiento químico que obtuvo el 67,85 %.
2. Al analizar el comportamiento de los tratamientos en la producción se determinó un mayor control por parte de *Pseudomonas cepacea* (Cepacide) en las dos primeras evaluaciones, bajando los porcentajes de daño significativamente de 10,73 % y 3,9 % comparado con los otros tratamientos, seguida del tratamiento químico Cuprofix en la cuarta, quinta y sexta evaluación con 42,72 %, 32,06 % y 41,26 % respectivamente. Por último *Bacillus subtilis* (Basubtil) controló en la tercera y séptima evaluación con 32,72 % y 47,09 % frente a los otros tratamientos.
3. Una estimación del porcentaje de daño en cosechas anteriores, en base a la producción, manifestó una disminución aceptable del hongo, bajando del 60 % en los meses evaluados hasta un 35,65 % promedio por efecto de los tratamientos aplicados en el ensayo.
4. En base a los datos climatológicos predominantes durante el periodo de estudio, el biopesticida Cepacide actuó mejor bajo condiciones de

humedad y precipitaciones altas, pero a temperaturas bajas, en esta localidad. Por su parte, el biopetecida Basubtil actuó mejor con humedad relativa y temperaturas altas, pero con precipitaciones bajas. Finalmente, Cuprofix actuó de mejor manera con precipitaciones bajas, temperaturas altas y con humedad moderada, debido a que es un funguicida protectante y solo queda adherido al sitio donde se aplicó, en este caso la mazorca.

5. Al realizar el análisis económico para el control de moniliasis resultó más económico utilizar Basubtil y Cuprofix, debido a que los rendimientos se elevaron conforme se realizaban las aplicaciones para el control de la moniliasis. Por su parte Cepacide no fue económicamente rentable debido a que no tuvo buenos rendimientos, mientras sus costos de aplicación elevaron el costo de producción de este tratamiento.
6. Cabe señalar que el periodo crítico donde actúa en mayor intensidad el hongo, corresponde a los meses de febrero, marzo, abril y mayo. Es en este periodo donde se aprecia una mejor eficiencia de los tratamientos, en especial Basubtil que mostró ser un control efectivo.
7. Al determinar el ABCPE se puede apreciar que con aplicaciones de Basubtil se obtiene mejores resultados en el control de *M. royeri* durante las diferentes evaluaciones realizadas en este estudio, debido a que se obtuvo un menor porcentaje de almendra dañada en las parcelas destinadas al ensayo.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Es necesario realizar una evaluación de los biopreparados teniendo como variable la poda de mantenimiento, para ver la eficacia de las bacterias bajo esta condición.
2. Se recomienda realizar una investigación para determinar el efecto de los biopesticidas tanto en el suelo como en plantas epífitas (musgos, líquenes) que usualmente se encuentran en plantaciones de cacao.
3. En base a los resultados mostrados en este ensayo en la Hda. San Antonio, se recomienda que para bajar la incidencia de la moniliasis se debe realizar un control integrado de la enfermedad; aplicando el biopesticida Cepacide desde los meses de noviembre – enero, y Basubtil en los meses de febrero y marzo. En los meses de abril y mayo se aplicaría Cuprofix, seguido nuevamente de Basubtil; debido a que en ese intervalo de tiempo se vio una disminución de la incidencia del hongo. Esto serviría como referencia a los productores de cacao de Santo Domingo de los Tsáchilas.
4. Es necesario seguir investigando sobre la validación de los biopreparados en diferentes condiciones ambientales así como en otras localidades y con diversos cultivares.

5. Se recomienda realizar una validación de los biopreparados en la Hacienda San Antonio, pero con bacterias nativas de la zona para comparar la eficiencia de las mismas versus las provenientes del banco de microorganismos del Laboratorio y Control Biológico de la Carrera de Ciencias Agropecuarias IASA I de la ESPE.
  
6. Debido al costo de producción de los biopreparados para la fase de liberación masiva se debe establecer un precio competitivo para el productor.

## VII. RESUMEN

Los biopreparados Basubtil y Cepacide provenientes del Laboratorio de Control Biológico del IASA I de la ESPE, fueron evaluados en mazorcas de cacao híbrido CCN 51, para validar su potencial control de la moniliasis causada por *Moniliophthora roreri* Cif y Par. Evans *et al.* La investigación se realizó en la Hacienda San Antonio, provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, cantón Santo Domingo, Ecuador durante un ciclo de producción. El experimento se dispuso en cuatro parcelas demostrativas con tres tratamientos por parcela, cuarenta y ocho árboles por cada tratamiento. Se evaluaron los biopreparados Basubtil y Cepacide y el producto químico Cuprofix. La formulación de los biopreparados se realizó sobre soportes sólidos de vermiculita y turba, respectivamente, acompañados de un control de calidad para garantizar su efecto en el campo.

Las aplicaciones de los tratamientos se realizaron cada tres semanas durante el periodo noviembre del 2007 hasta mayo del 2008. Las variables evaluadas fueron: producción acumulada de almendra, porcentaje de daño interno, incidencia de las mazorcas en desarrollo y su relación con los factores medioambientales: temperatura, humedad relativa y precipitación. El análisis de variancia determinó que no existieron diferencias estadísticas en la producción acumulada con la aplicación de los tratamientos biológicos o el químico. El tratamiento químico tuvo mayor cantidad de almendras sanas en relación a los biopreparados, mientras que con Cepacide se obtuvo la menor cantidad de almendras dañadas. La eficiencia de Cepacide fue de 70,86 % y la de Basubtil de 69,56 %, basados en la producción acumulada de almendra de cacao y en relación a Cuprofix con 67,85 %. Los

tratamientos resultaron ser no económicos para el control de la enfermedad debido a los bajos rendimientos presentados, sin embargo, una estimación con datos de producción del año 2007 estableció como la mejor alternativa económica al biopreparado Basubtil.

Al realizar un ANOVA y la Prueba de Tukey al 5 % para el porcentaje de daño interno no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. Numéricamente, con aplicaciones del biopesticida Cepacide se obtuvo un menor porcentaje de daño interno de almendras con 28,31 %, Basubtil 29,94 %, y Cuprofix 32,22 %; estos resultados demuestran la bondad de Cepacide para el control de la moniliasis en cacao CCN-51, en relación con los otros tratamientos.

Al analizar el ABCPE bajo condiciones medioambientales prevalentes durante el periodo de estudio, se determinó que mientras las lluvias y la humedad decrecían, y la temperatura aumentaba, se creaban las condiciones favorables para el desarrollo del hongo y su incidencia tuvo incrementos en cada uno de los tratamientos con picos elevados que se relacionaron directamente con estos factores; donde Basubtil y Cepacide presentaron un mejor control al ataque de *M. royeri* con 143,6 y 144,7 respectivamente, en el cultivo de cacao CCN-51 bajo las condiciones ambientales de la Hda. San Antonio, ubicada en el kilómetro 40 de la vía Sto. Domingo de los Tsáchilas – Quevedo.

## VIII. SUMMARY

The Biopesticides Basubtil and Cepacide produced at the Laboratory of Biological Control. IASA - I of the ESPE, were evaluated to control monilia pod rot *Moniliophthora roreri* Cif and par. Evans et al in cacao CCN 51. The investigation was carried out the San Antonio Farm, Province of Santo Domingo of the Tsáchilas, Santo Domingo canton, at the Ecuador throught out a production cycle. The experiment was set up in four demonstrative plots with three treatments per plot, forty and eight trees per each treatment. The biopesticides Basubtil and Cepacide were evaluated bioproducts as well as the chemical product Cuprofix. The bioproducts were formulated on the solid supports vermiculite and peat, respectively, accompanied by a quality control which guarantees its effectiveness in the field.

The treatments were applied every three weeks from November 2007 to May 2008. The variables evaluated were: beans accumulated production, internal damage percentage, pod development incidence and its relationship with environmental conditions, such as temperature, relative humidity and precipitation. The analysis of variance demonstrated that there were not statistical differences in the cumulative production due to biological or chemical applications. The chemical treatment had more healthy cocoa beans than bioproducts application, however Cepacide applications had the smaller amount of damaged cacao beans. The efficiency of Cepacide was 70.86 % and the Basubtil ones 69.56 %, based on the cumulative production and in comparison with Cuprofix 67,86 %. Neither of the treatments were economic for moniliasis' control due to low yield, nevertheless, considering

2007 yield production, Basubtil applications are considered the best economic alternative for controlling moniliasis disease in CCN 51 cocoa.

Once carried out an ANOVA and 5% Tukey's test for internal damage percentage there were not significant differences between treatments. Numerically, applications of Cepacide biopesticide resulted in smaller internal damage beans percentage 28.31%, Basubtil 29.94%, and Cuprofix 32.22%; these results demonstrate the thoughtfulness of Cepacide for controlling monilia pot rot in cacao CCN-51, in comparison with the other treatments.

When analyzing the Area Under Disease Progress Curve (AUDPC) under prevalent environmental conditions it was demonstrated that favourable conditions for pathogen development were with decreased rains and humidity and increasing temperature. The incidence steadily increased under conducive conditions. Under these environmental conditions the biopesticide Basubtil and Cepacide respectively presented a better moniliasis's control in CCN-51 cocoa variety with 143,6 and 144,7; San Antonio Farm environmental conditions, located at 40 kilometer Sto. Domingo de los Tsáchilas – Quevedo route.

**IX. BIBLIOGRAFÍA.**

AGRIOS, G. 2004; Plant pathology, Department of Plant Pathology, University of Florida, United States of America; Fifth ed.; p. 286.

ANECACAO, 2006. Exportaciones mensuales de cacao (en línea). Ecuador. Consultado 31 de Octubre del 2007. Disponible en: <http://www.anecacao.com/Español/español.htm>

ARÉVALO, E.; ZÚÑIGA, L.; ADRIAZOLA, J. 2004. Cacao. Manejo integrado del cultivo y transferencia de tecnología en la amazonía peruana. ICT. Chiclayo, Perú. 184p.

ARÉVALO, G. E. 1992. Estudio de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* (Cif. & Par.) Evans *et. al.* en la Selva Norte del Perú; Tesis Msc. Escuela de Graduados; UNA La Molina. Lima, Perú; 93 pp.

ARGÜELLO, O. 2000; Manejo integrado de la monilia en cacao (*Theobroma cacao* L.) en Santander. En: Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción de cacao. Corpoica. Regional Siete. Bucaramanga, Col.

BALL, A., 2002; Biopesticide Fac. sheet. *Bacillus subtilis*. EPA – USA (en línea) consultado el 17 de octubre del 2007; Disponible en <http://www.epa.gov/pesticides/factsheet.html>

BATEMAN, R. P.; HIDALGO, E.; GARCÍA, J.; ARROYO, C.; HOOPEN, M.; ADONIJAH, V.; KRAUSS, U. 2005. Application of chemical and biological

agents for the management of frosty pod rot (*Monilophthora roreri*) in Costa Rican cocoa (*Theobroma cacao*) *Animals of Applied Biology*. Pgs 129 – 138.

BEJARANO, G., 1961; Métodos de inoculación artificial y factores favorables para la infección de *Monilia roreri* Cif. & Par.; Tesis Ing. Agr., Universidad Central del Ecuador; Quito, Ecuador; PP 54 – 58.

BOCHOW, H., 1992; Phytosanitary effects of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. En: international Symposium on Crop Protection; Humbolt Univ. Berlín, Germany, pp 387 – 393.

BRAVO, N., VICTORIA, J., 1980; Control biológico “*in vitro*” de la moniliasis (*Moniliphthora roreri* Evans sin. *Monilia roreri* Cif & Par.) del cacao (*Theobroma cacao* L.) In: IV Congreso nacional de ASCOLFI. Resúmenes; Medellín, Colombia; pp 24 – 25.

BUCHANAN, R. E. and GIBBONS, N. E., 1974; Endospore forming rods and cocci. Part 15. Eight Edition; The Williams and Wilkins Company, Baltimore; p. 529-549.

CAMPBELL, C.L. 1 989. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley and sons, New york. 532

CAMPOLLO, H., 1984. La Moniliasis del cacao y sus efectos económicos para Guatemala (moniliasis o podredumbre acuosa del cacao); Revista cafetalera; Edit, ANACAFE; pp 26 – 28.

CASTAÑO, B. 1952. Fisiología del hongo causante de la moniliasis. Desarrollo del hongo en la mazorca; 3ra edición; La Habana, Cuba, 150 pp.

CASTRO, J.; ANZULES, A.; ZAMBRANO, C. 2000. Validación de tecnologías generadas por el INIAP, en cultivos de ciclo corto y perennes. Proyecto del núcleo de apoyo técnico y capacitación. Estación Experimental Tropical Pichilingue. Quevedo, Ecuador.

CEVALLOS, J.C. 2003. Evaluación de materiales de soporte para la formulación de la bacteria antagonista *Pseudomonas cepacia* para el control de moniliasis *Moniliophthora roreri* en cacao *Theobroma cacao*. Tesis Ing. Agr., Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA. Sangolquí, Ecuador.

CHACÓN, I, 2006; Propagación de cacao criollo mediante semilla e injerto; Diseñado y diagramado en INIA Táchira; Circuito Agro productivo del Estado Táchira; Táchira, Venezuela, 16 p.

DELLAAT, A., 1993; Microbiología; segunda edición; Editorial Interamericana; México D.F., México; 395 p.

DESROSIERS, R.; VON BUCHWALD, A., BOLAÑOS, C. W. 1995 “Effect of rainfall on the incidence on Monilia pod rot in Ecuador”. F.A.O. *Plant Protection Bullrtin* 3 (2). Pgs 161 – 164.

DURANGO, W. D. 2001. Evaluación de fungicidas y biocontroladores en el manejo de enfermedades de la mazorca de cacao. Tesis Ing. Agr., Universidad de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador.

INEC, Ecuador 2002. III Censo Nacional Agropecuario. Resultados Nacionales. INEC. Proyecto SICA. Quito, Ecuador. 257 p.

INIAP. 2002. Informe técnico anual 2002. Núcleo de apoyo técnico y capacitación.

Estación Experimental Tropical Pichilingue., Quevedo, Ecuador.

ENRÍQUEZ, G. A. 2004. Cacao orgánico, Guía para productores ecuatorianos.

Manual Nro. 54, INIAP. Quito, Ecuador. 360 p

ENRÍQUEZ, G. A. 1985. Curso sobre el cultivo del cacao. CATIE, Serie Materiales

de Enseñanza N° 22. Turrialba, Costa Rica. 239 p.

EVANS, H. C. 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora roreri* (Monilia)

*roreri*. In: Phytopathological papers N° 24. CAB. Kew. Surrey, England. Pgs  
1 – 43.

EVANS, H. C.; HOLMES, K. A.; REID, A. P.; 2003 Phylogeny of the frosty pod rot

pathogen of cocoa. Plant Pathology. 52 (4). Pp 476 – 485

EVANS, H. C, HOLMES, K. A.; REID, A. P., BENITO, J. 1973. Classical

Biological Control. Pags. 29-37. In: Kraus, U. and, H. Hebbbar, eds. Research  
methodology to in biocontrol of plant diseases with special reference to fungal  
diseases of cocoa. Workshop Manual. CATIE, Turrialba, Costa Rica.

FALCONÍ, C. 2003. Estrategias biológicas para el control de la moniliasis del cacao.

In: INIAP, GTZ, PROCIANDINO. Agricultura orgánica. Quevedo, Ecuador. 1  
disco compacto, 8mm.

FALCONÍ, C.E.; OLEAS, A.R.; YÁNEZ, V.R.; PÁEZ, T.; RODRÍGUEZ, R.;

CEVALLOS, J.; GARCÍA, M.; MUÑOZ, A.; TACO, M.; MAISINCHO, J.;

2003. Boletín Técnico del Proyecto “Estrategias biológicas para el control de la

Moniliasis del cacao”. Convenio ESPE – PROMSA, MAG, ORECAO, IQ – CV – 025. EdiEspe. Sangolquí, Ecuador. 54 p.

FALCONÍ, C.E.; OLEAS, A.R.; YÁNEZ, V.R., 2004. Biological control of monilia pod rot (*Moniliophthora roreri*) on “high flavour” cocoa’s field using biopesticidas based on *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas cepacea*. Phytopathology 94. Pp S28 – S29.

FALCONÍ, C. 1997; El control biológico de plagas y enfermedades. 1 ed. FIFAC. Alemania; p: 5-6, 18-20, 54-57.

GARCÍA, M.F., 2002. Control biológico de *Moniliophthora roreri* en campo usando microorganismos epifitos aislados de mazorcas de cacao *Theobroma cacao*. Tesis Ing. Agr., Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA. Sangolquí, Ecuador. Pp 6, 29, 31.

HEBBER, K.P., MARTEL, M.H., and HEULIN, T. (1999); Suppression of pre-and post- emergence damping off in corn by *Burkholderia cepacia*. European Journal of Plant Pathology; Vol. 104(1); 29-36.

HERNÁNDEZ, A.; FERNÁNDEZ, A.; PÉREZ, J; MIRANDA, S.; FONS, C.;  
HERNÁNDEZ, A., N. y SANTANDER J. (1999); Producción, purificación y diagnóstico de sideróforos a partir de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* J-1443; Cultivos Tropicales; Vol. 20(1); 21-25.

HERNÁNDEZ, A., (2000); Características de géneros asociados a los cultivos de gerbera y clavel. Cultivos Tropicales. Vol.21 (3); 15-18.

- HERNÁNDEZ, A., (1998); Selección de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal. Informe Final Proyecto 0300098. PNCT Biotecnología Agrícola.
- HOOPEN, M.; REES, R.; AISA, P.; STIRRUP, T.; KRAUSS, U.; U. 2003. Population dynamics of epiphytic mycoparasites of the genera *Clonostachys* and *Fusarium* for the biocontrol of black pod (*Phytophthora palmivora*). *Mycological Res.* 107 (5). Pgs 587 – 596.
- JIMÉNEZ, J.; RAMÍREZ, C., ENRÍQUEZ, G., 1987; Evaluación del combate biológico y químico de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao en Costa Rica. *In: 10<sup>a</sup> Conferencia internacional de investigación en cacao, Actas.* Santo Domingo, República Dominicana. Pp 1- 7
- KAISER, W. 1987. Effects of water déficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum.* Copenhagen, Dinamarca. Pgas 142 – 149.
- KRAUSS, U.; SOBERANIS, W. 2001; Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. *Biological control* 22. huanuco, Perú. Pp 149 – 158.
- LANDEO, J.A. 1998; Data Processing and Interpretation of Late Blight resistance parameters. Appendix 3 – SIFT Field Book. Standart International Potato Center (CIP), Phytosanitary Statement No. PSXXX – 98. 4P.
- LASTRA, A., 2004; Caracterización del circuito orgánico de la cadena de cacao en el Ecuador. GTZ, UNOCACE, IICA. Quito. Ecuador. 68p.
- LECOEUR, J.; SINCLAIR, T. 1996. Field pea transpiration and leaf growth in response to soil water déficit. *Crop Science, Madiso.* Pgs 331 – 335.

- LIMA, J. S. 1994, Cooper balances in cocoa agrarian ecosystems: effects of differential use of cupric fungicides. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 48 (1). Pgs 19 – 25.
- MAG, 2006; Ecuador reconocido mundialmente por cacao fino de aroma; (En línea), Consultado 31 Octubre del 2007, Disponible en [http://www.mag.gov.ec/docs/boletines/boletin\\_43\\_2005.pdf](http://www.mag.gov.ec/docs/boletines/boletin_43_2005.pdf)
- MARQUEZ, J. J.; AGUIRRE, M. B. 2003. Manual técnico de cosecha y beneficio del cacao. La habana, Cuba. 59p.
- MEJÍA, L. A. 2006. Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción de cacao. Aspectos ecofisiológicos relacionados con el cultivo del cacao. (En línea). Consultado 15 de marzo 2007. Disponible en: [http://www.turipana.org.co/producción\\_cacao.htm](http://www.turipana.org.co/producción_cacao.htm)
- MELGAREJO, L. 1989. Control biológico de bacterias. Aspectos generales de control biológicos en patógenos. (En línea). Consultado el 16 de octubre 2007. Disponible en: <http://www.terraia.com/revista8/pagina34.htm> - 11k
- MEYER, J. M.; TRAN, V.; STINZI, A.; BERGE, O. and WINKELMAN, G. (1995); Ornibactin production and transport properties in strains of *Burkholderia vietnamienses* and *Burkholderia cepacia* (formely *Pseudomonas cepacia*) .*Biometales*; Vol.8; 309-307.
- MEYER, I. N.; HOHNADÉL, D. and HALLÉ, F. (1989); Cepabactín from *Pseudomonas cepacia*, a new type of siderophore. I. *Gen. Microbiol.* Vol.135; 479- 1487.

MONTAVÓN, R. 1996. Nestlé y el cacao. Nestec S.A.; Departamento B – Com, Le Mont-sur-Lausanne, Suiza. 107 p.

MUÑOZ, A.L. 2002. Eficiencia de *Bacillus sp* y *Pseudomonas sp* como antagonistas de *Moniliophthora roreri* y su tolerancia a plaguicidas y productos afines “*in vitro*”. Tesis Ing. Agr., Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA. Sangolquí, Ecuador. Pp 29, 34.

NYSAES, 2006; Material fac. sheet *Bacillus subtilis* (en línea); Consultado el 17 de octubre del 2007. Disponible en <http://www.nysaes.cornell.edu/ppresourceguide/pdf/mfs01.pdf>

OYARZUM, P.J., 2004. Control biológico de patógenos del suelo en diversos cultivos agrícolas. *In*: I Seminario internacional y II Nacional de control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos. ESPE, Maestría en Ciencias del Control Biológico, FUNDACYT, PROMSA, SENACYT. Memorias. Sangolquí, Ecuador. Pp 87 – 95.

PALLERONY, N. J. (1984); Family 1. Pseudomonadacea En Bergey's manual of systematic bacteriology. N. R. Kried (ed). The William and Wilkins. Co, Baltimore. p. 140-205.

PERALVO, D.; SAAVEDRA, L., 2005. Validación de biopreparados en base a bacterias epífitas para el control de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) en el cultivo de cacao fino de aroma. Tesis Ing. Agr., Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA. Santo Domingo de los Colorados, Ecuador.

- PERRÍN, R.K.; WINKELMANN, D.; MOSCARDI, E.; ANDERSON, J. 1976. Formulación de recomendaciones a partir de datos agronómicos: Un manual metodológico de evaluación económica CIMMYT, México DF, México. 54p.
- PHILLIPS-MORA, W.; COUTIÑO, A.; ORTIZ, C. F.; LÓPEZ, A. P. 2006. First report of *Monilophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) in Mexico. (en línea). Consultado 14 de Diciembre 2007. Disponible en: <http://www.bspp.org.uk/ndr/jan2006/2006-04.asp>
- PURDY, L., 1999; Fungal disease of cacao. *In*: Research Methodology in biocontrol of plant disease with special reference to fungal diseases of cocoa. Workshop manual. CATIE; Turrialba, Costa Rica; pp 7 – 18.
- QUIROZ, J. 1997. Recolección de genotipos y establecimientos de un banco de germoplasma de cacao nacional en el Ecuador. INIAP. Boletín Técnico N° 75. Proyecto ECU-B7/3010/93/176. Quevedo, Ecuador. 12p.
- RAMOS, G., RAMOS P. y AZÓCAR, A., \_\_\_\_; Manual del Productor de Cacao; Editorial Fotoartema; 4° Edición corregida y aumentada; Mérida, Venezuela; 67 pp.
- RODRÍGUEZ, R. 2002. Evaluación de materiales de soporte para la formulación de la bacteria antagonista *Bacillus subtilis* para control de moniliasis *Monilophthora roreri* en cacao *Theobroma cacao*. Tesis Ing. Agr., Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Ingeniería Agropecuaria - IASA. Sangolquí, Ecuador. Pp 11.

RODRIGUEZ, D., BAEZ, M., 2002; Manejo Agronómico Del Cultivo De Cacao (*Theobroma cacao* L.); Escuela Técnica Agropecuaria Santa Bárbara de Zulia; Santa Bárbara de Zulia, Venezuela, pp. 55, 58.

SÁNCHEZ, L.; GAMBOA, E.; RINCÓN, J. 2003; Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao* L.) en el estado Barinas. Rev. Fac.Agron. (LUZ) 20; 188-194.

SANDOVAL, G. A. ARMBRECHT, H.; GRANADA. G. A. 1987. Posibilidad de control biológico de la moniliasis del cacao. *In*: 10ma conferencia internacional de investigación en cacao, Actas. Santo Domingo, República Dominicana. Pg 473 – 477.

SOLÍS, Z.K. 1999. Determinación de organismos antagónicos a *Moniliophthora roreri* a partir de mazorcas de cacao dejadas en el suelo: Tesis Ing. Agr., Universidad de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. 1985. Mc Parlan scale. En Methods in Legume – *Rhizobium* Tecnology. Niftal – Mircen, USA. Pp 287 – 288.

SOBERAINS, W.; RÍOS, R.; ARÉVALO, E.; ZÚÑIGA, L.; CABEZAS, O.; KRAUSS, U.; 1999. Increased frequency of phytosanitary pod renewal in cacao (*Theobroma cacao*) increases yield economically in eastern Peru. Crop. Protection 18. Pgs 677 – 685.

SUÁREZ, J., 1993; Enfermedades del cacao y su control *In*: Manual del cultivo del cacao; 2da edición; Editado por Estación Experimental Tropical Pichilingue, Publicaciones INIAP; Quito, Ecuador; pp 90 – 106.

SUÁREZ, C.; SOLIS. K. 2003. Tácticas de manejo integrado de enfermedades disponibles para producción de cacao orgánico en el Ecuador. *In*: INIAP, GTZ, PROCIANDINO. 2003. Agricultura orgánica. Quevedo, Ecuador. 1 disco compacto, 8 mm.

ULHOA, J. 1996. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. (En línea). Consultado el 16 de octubre 2007. Disponible en: <http://www.catie.ac.cr/informacion/rmip/rev62/96-100.pdf>

VALLEJO, S.; QUINGAÍSA, E., 2005; Nota de competitividad por producto 03/04 Área de políticas, comercio y agronegocios; (En línea). Consultado 31 Agosto 2007. Disponible en: [http://www.agrocadenas.gov.co/cacao/documentos/acuerdo\\_cacao.pdf](http://www.agrocadenas.gov.co/cacao/documentos/acuerdo_cacao.pdf)

VERA, J. 1993 a. Antecedentes históricos. *In*: Manual del cultivo del cacao 2da edición. Editado por Estación Experimental Tropical Pichilingue, Publicaciones INIAP. Quito, Ecuador. Pgs 5 – 7.

VERA, J. 1993 b. Botánica y clasificación del cacao. *In*: Manual del cultivo del cacao. 2da edición. Editado por Estación Experimental tropical Pichilingue, Publicaciones INIAP. Quito, Ecuador. Pgs 8 – 16.

VERA, J. 1993 c. Zonificación y ecología del cultivo. *In*: Manual del cultivo del cacao. 2da edición. Editado por Estación Experimental tropical Pichilingue, Publicaciones INIAP. Quito, Ecuador. Pgs 17 – 23.

VIÑAS, I., TEIXIDÓ N., ABADÍAS, M. TÓRRES, R. USALL, J., 2003; Información de productos nocivos para agricultura; Consultado el 16 de

Octubre del 2007; Disponible en: <http://www.agroinformacion.com/leer-articulo.aspx?not=152#>

YÁNEZ, M.V. del R. 2003; Producción y formulación de biopreparados a base de *Pseudomonas cepacia*, *Bacillus subtilis* y *Trichoderma sp.* para el control biológico de la Moniliasis del cacao. Maestría en Ciencias del Control Biológico, Departamento de Investigaciones, Carrera de Ingeniería Agropecuaria. Boletín Técnico N° 2. Sangolquí, Ecuador. 36p.

YÁNEZ, M.V del R. 2004; Control biológico de *Moniliophthora roreri* en el campo mediante el uso de biopreparados a base de *Pseudomonas cepacia*, *Bacillus subtilis* en cacao Tenguel 25 (EET 103). Tesis M.Sc., Escuela Politécnica del Ejército, Magíster en Ciencias del Control biológico. Sangolquí, Ecuador. Pp 83.