

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

**Evaluación *in vitro* del efecto supresivo de *Trichoderma*
spp. para el control de moniliasis (*Moniliophthora roreri*)
del Cacao (*Theobroma cacao*)**

Trabajo de investigación

Steven Alejandro Benítez Reascos

Ingeniería en Agroempresas

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de Ingeniero en Agroempresas

Quito, 13 de mayo de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS E INGENIERÍAS

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

Evaluación *in vitro* del efecto supresivo de *Trichoderma* para el control de moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del Cacao (*Theobroma cacao*)

Steven Alejandro Benítez Reascos

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Carlos Ruales, Msc.

Firma del profesor

Quito, 13 de mayo de 2019

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

Nombres y apellidos:

Steven Alejandro Benítez Reascos

Código:

00116697

Cédula de Identidad:

1719183491

Lugar y fecha:

Quito, 13 de mayo de 2019

RESUMEN

Moniliophthora roreri es un hongo que causa una enfermedad llamada moniliasis, es uno de los principales marcos limítrofes en lo que respecta a la producción del cultivo de Cacao en Ecuador y otros países de Latinoamérica. Como objetivo se busca distintas opciones para contrarrestar este hongo usando biocontroladores como es el hongo *Trichoderma*. Se identificaron seis cepas del hongo *Trichoderma* spp. procedentes de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas en tres diferentes fincas cacaoteras establecidas hace más de 30 años, las cuales se evaluaron para determinar su poder antagónico contra *M. roreri*. Se desarrollaron 2 pruebas de antagonismo; la prueba dual y metabolitos difusibles. La evaluación fue realizada en cajas Petri con medio V8 modificado y discos de 5 mm de diámetro previamente colonizado por el fitopatógeno. En la primera prueba, se emplea una modalidad de experimentos totalmente aleatoria con tríos de repeticiones por cada tratamiento, mientras que, en la segunda prueba, también se realizó un modelo de experimentación aleatorio al cien por ciento, con un comportamiento factorial de 8x4 y tres repeticiones por tratamiento. En la prueba dual se pudo establecer que durante las 120 horas de evaluación si existió un efecto antagónico estadísticamente significativo ($p=0,05$) en 5 de las 6 cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Moniliophthora roreri* y 3 de ellas obtuvieron un alto efecto antagonista en forma micelial como metabólica. En la prueba de metabolitos difusibles a las 360 horas se observó que a concentraciones más altas de metabolitos mejor es el efecto inhibitorio sobre *Moniliophthora roreri*.

Palabras Clave: *Moniliophthora roreri*, biocontroladores, antagonismo, *Trichoderma*, aislamiento de hongos, Moniliasis.

ABSTRACT

Moniliasis disease caused by the fungus *Moniliophthora roreri*, is one of the main constraints in the production of Cocoa in Ecuador and other countries. As an objective, the search was alternatives to neutralize this disease with biocontrollers. Six fungus strains were identified of *Trichoderma* spp. from the province of Esmeraldas of 3 different farms of cacao established more than 30 years ago, which were evaluated to determine their antagonistic power against *M. roreri*. Two trials of antagonism were developed; Dual-plate test and diffuse metabolites. The evaluation was carried out in Petri dishes with modified V8 medium and 5 mm diameter discs previously colonized by the phytopathogen. In the first experiment, a completely randomized experimental design was used with three replicates per treatment, while in the second test a completely randomized experimental design was performed with 8x4 factorial arrangement and three replicates per treatment. In the dual plate experiment was established during the 120 hours that the antagonist effect had a statistically significant antagonistic effect ($P = 0,05$) in 5 of the 6 strains of *Trichoderma* spp. against *Moniliophthora roreri*. And, 3 obtained a high antagonistic effect in mycelial form as metabolic. In the experiment of diffused metabolites at 360 hours it could be observed that higher concentrations of metabolites better are the inhibitory effect on *Moniliophthora roreri*.

Keywords: *Moniliophthora roreri*, Biocontrollers, antagonism, *Trichoderma*, isolation of fungi, Moniliasis.

TABLA DE CONTENIDO

<i>Derechos de Autor</i>	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
TABLA DE CONTENIDO	6
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
Introducción	10
1.1 Cultivo de cacao en el Ecuador	10
1.2 Cultivo de cacao a nivel mundial	12
1.3 Moniliasis (<i>Moniliophthora roreri</i>) en el cultivo de cacao (<i>Theobroma cacao</i>)	12
1.3.1 Problema de Moniliasis.....	12
1.3.1 Ocurrencia de la enfermedad	13
1.3.2 Sintomatología	14
1.3.3 Taxonomía	15
1.3.4 Ciclo de la enfermedad	16
1.4 El hongo antagonista <i>Trichoderma</i> spp.	17
<i>justificación</i>	19
<i>objetivos</i>	20
3.1 Objetivo general	20
3.2 Objetivos específicos	20
3.3 Hipótesis	20
Material y métodos	21
4.1 Fase de campo	21
4.2 Fase de laboratorio	23
4.2.1 Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp.....	23
4.2.2 Cepas comerciales de <i>Trichoderma</i>	25
4.2.3 Aislamiento de <i>Moniliophthora roreri</i>	25
4.2.4 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antagónico de las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>Moniliophthora roreri</i>	26
Análisis Estadístico primer experimento	27
4.2.5 Evaluación de filtrados fúngicos de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el crecimiento <i>Moniliophthora roreri</i>	28
Obtención de filtrado fúngico	28
Análisis Estadístico segundo experimento.....	29
Resultados	31
5.1 Aislamiento e identificación morfológica de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. a partir de muestras de suelo y de mazorcas de cacao	31
5.2 Aislamiento de <i>Moniliophthora roreri</i>	36

5.3 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antagónico de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el crecimiento de <i>Moniliophthora roreri</i> .	37
5.4 Cinética de crecimiento de <i>Moniliophthora roreri</i> . bajo influencia de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	40
5.5 Evaluación de filtrados fúngicos de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el crecimiento <i>Moniliophthora roreri</i> .	42
5.6 Cinética de crecimiento de <i>Moniliophthora roreri</i> por efecto de filtrados fúngicos de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	45
<i>Discusión</i>	50
6.1 Aislamiento e identificación morfológica de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. a partir de muestras de suelo y mazorcas.	50
6.2 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antagónico de las Cepas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el crecimiento de <i>Moniliophthora roreri</i> .	51
6.3 Evaluación de filtrados fúngicos de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el crecimiento <i>Moniliophthora roreri</i> .	53
CONCLUSIONES	54
<i>Referencias bibliográficas</i>	55
<i>Anexos</i>	64
Anexo A: Estadísticas de cultivo de cacao en Ecuador	64
Anexo B: Participación porcentual de los principales productos de exportación FOB	65
Anexo C: Metodología de aislamiento de <i>Trichoderma</i> de muestras obtenidas de suelos.	66
Anexo D: Medio Selectivo <i>Trichoderma</i> (TSM)	67
Anexo E: Protocolo de desinfección de material vegetal	68
Anexo F: Anova de la Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antagónico de las Cepas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el crecimiento de <i>Moniliophthora roreri</i> .	69
Anexo G: Anova de Evaluación de filtrados fúngicos de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el crecimiento <i>Moniliophthora roreri</i> .	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sitios de recolección de muestras	21
Tabla 2. Medio de cultivo V8 modificado	25
Tabla 3. Cepas de <i>Trichoderma</i> aisladas e identificadas en medio selectivo TSM	31
Tabla 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Monilophthora roreri</i> por acción de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	39
Tabla 5. Cinética de crecimiento de <i>Monilophthora roreri</i> bajo la influencia de ocho cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	40
Tabla 6. Efecto fungistático de cuatro concentraciones de <i>Trichoderma</i> spp.	43
Tabla 7. Efecto antagónico de los mejores filtrados fúngicos de <i>Trichoderma</i> a diferentes concentraciones	44
Tabla 8. Cinética de crecimiento de <i>Monilophthora roreri</i> con cepas A, B, C y D	45
Tabla 9. Cinética de crecimiento de <i>Monilophthora roreri</i> cepas E, F, G, H	46
Tabla 10. Determinación de Micoparasitismo, Antibiosis y competencia de cepas de <i>Trichoderma</i> vs <i>Monilophthora roreri</i>	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 1 Síntomas externos e internos de moniliasis.....	15
Figura. 2 Ciclo de la moniliasis causada por <i>Moniliophthora roreri</i> Fuente: FHIA. 2003	17
Figura. 3 Cepa <i>Trichoderma</i> A. Izquierda: Macroscópica, observese micelio. Derecha: Microscópica a 100X	33
Figura. 4 Fotografías macroscópicas y microscopias (100X) de cepas de <i>Trichoderma</i> : A, B, C, D, E, F, G y H en medio PDA	36
Figura. 5 A) <i>Moniliophthora roreri</i> en medio V8 modificado macroscópica B) Hifas de <i>Moniliophthora roreri</i> a nivel microscópico 100X.....	37
Figura. 6 A) Cultivo dual de cepa de <i>Trichoderma</i> G vs <i>Moniliophthora roreri</i> izquierda <i>Moniliophthora roreri</i> derecha <i>Trichoderma</i> G.....	38
Figura. 7 Efecto de filtrado fúngico. Izquierda: Caja control de <i>Moniliophthora roreri</i> Derecha: Cepa B vs <i>Moniliophthora roreri</i>	42

INTRODUCCIÓN

1.1 Cultivo de cacao en el Ecuador

El cacao (*Theobroma cacao* L) es un árbol de hoja perenne cultivada generalmente en la franja geográfica tropical húmeda. Estudios recientes demuestran que el cacao tiene un origen de hace 5 000 años en la Alta Amazonía en países actualmente conocidos como Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela (Anecacao, 2015). En Ecuador se cultiva dos tipos de cacao, el nacional reconocido mundialmente por su aroma floral y de producción exclusiva, por otra parte, el cultivar CCN-51 de características de rendimiento para extraer semielaborados, que son importantes para producir a gran escala chocolates, depende de variedades y tipos de cacao, las mazorcas de estos pueden ser de color blanco, verde, amarillo o rojo. (ProEcuador, 2016).

En 2017 se registran 560.000 hectáreas de cacao, distribuidas básicamente en las provincias costeras y en las regiones occidentales de la Región Andina (FAOSTAT, 2017). Para el año 2016 las provincias de Los Ríos, Manabí, Guayas y Esmeraldas fueron, en ese orden, las zonas con mayor área sembrada en el Ecuador. Siendo la provincia de Guayas la de mayor productividad y rendimiento de cacao representando un 28% del porcentaje nacional (Anexo. A) (INEC-ESPAC, 2016)

En el Ecuador las exportaciones de productos agrícolas en enero del 2019 alcanzaron una participación del 61,1% de los ingresos no petroleros tradicionales dentro de la balanza comercial. Entre los exponentes de esta actividad se encuentran el banano, camarón, café, cacao y atún (Anexo. B) (BCE, 2019).

El cacao es importante en la economía ecuatoriana al ser uno de los principales productos agrícolas de exportación, además de generar empleos para los habitantes de sectores rurales y urbanos (Sánchez & Garcés, 2012), se estima que aproximadamente 600.000 personas participan directamente en toda la cadena cacaotera (Anecacao, 2014). Actualmente el cacao y elaborados entre enero del 2017 y enero del 2019 representa un 5,7% de las exportaciones totales, con un total de 24 mil toneladas métricas y 58.185 miles de dólares americanos (\$) (Anexo. B) (BCE, 2019).

1.2 Cultivo de cacao a nivel mundial

La producción mundial de cacao para el año 2017 fue liderada por el continente africano con el 70,4% seguido por el continente americano con un 15,4% y finalmente Asia y Oceanía con el 14,2%. El mayor productor de cacao a nivel mundial es Costa de Marfil con una producción de 1581 mil toneladas de granos de cacao en el periodo 2015/2016 y se estimó que para el periodo 2017/2018 se produzcan 1960 miles de toneladas. Por su parte, Ecuador posee una producción de 232 mil toneladas de granos de cacao en el periodo 2015/2016 y se estimó que para el periodo 2017/2018 se produzcan 280 mil toneladas (ICCO, 2018).

1.3 Moniliasis (*Moniliophthora roreri*) en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao*)

1.3.1 Problema de Moniliasis

El cacao (*Theobroma cacao*) presenta varias enfermedades que pueden afectar el cultivo, sin embargo, una de las más importantes y con una capacidad de afectar la producción entre un 40 y 50% es la enfermedad conocida en Latinoamérica como moniliasis, vaina helada, enfermedad de Quevedo o podredumbre-acuosa cuyo agente causal es el hongo *Moniliophthora roreri* (Evans, 2002). La moniliasis se encuentra distribuida en 11 países de Latinoamérica y es capaz de afectar a especies silvestres y cultivadas de *Theobroma* (*T. cacao* y *T. grandiflorum*) (Aime y Phillips-Mora, 2005; Phillips-Mora, 2007).

En el Ecuador la enfermedad afecta a mazorcas en cualquier estado fisiológico y se han presentado pérdidas de la producción que van en un rango entre 16 - 80% aproximadamente, con medias anuales que oscilan entre el 20 - 22% anual (Enríquez, 2004). En Belice la enfermedad fue descubierta en el 2004 con una incidencia de la enfermedad del 60% en mazorcas. (Phillips-Mora, 2006). Por otra parte, en Honduras la enfermedad impactó fuertemente a los agricultores, en 1997; producían 5.500 TM de grano de cacao, mientras que en 1998 su producción fue de 2.200 TM de grano como consecuencia de la llegada de la moniliasis, es decir, un 60% menos de producción. Ya para 2011 reportan una producción de 1.000 TM (FHIA, 2012). En Colombia en el 2010 la enfermedad reportó pérdidas de mazorca del 70% y en casos extremos por continuas lluvias de hasta el 80% (FEDECACAO, 2011).

1.3.1 Ocurrencia de la enfermedad

El hongo *Moniliophthora roreri* fue reportado por primera vez en Ecuador en 1915 en la región de Quevedo, provincia de Los Ríos, por Rorer (1918). Por otra parte, un estudio realizado por Phillips-Mora, Aime y Wilkinson (2007) explica que en el noroeste colombiano fue la primera detección del patógeno, comprobando que el agente causal posee una alta diversidad genética y es en donde la enfermedad ha sido conocida aproximadamente hace 200 años. A partir de Colombia se dispersó a varios países del continente, principalmente ha América Central ingresando a Belice en el año 2004 (Phillips-Mora et al., 2006) y a México en 2005 (Phillips-Mora et al., 2005).

1.3.2 Sintomatología

La moniliasis puede expresar síntomas internos y externos en las mazorcas o frutas en todas sus etapas de desarrollo (Figura 1). El daño en el interior del fruto causado por la enfermedad generalmente es más grave que el daño en el exterior, causando la pérdida de casi todas las almendras. Tejidos como almendras, pulpa y exocarpo, al descomponerse se tornan en una masa de una sustancia acuosa debido a su descomposición, en algunos casos siendo las almendras destruidas, dependiendo del tiempo de infección algunas almendras pueden o no ser afectadas. En frutos menores a dos meses, la infección muestra pequeñas protuberancias en la superficie del fruto, luego presenta una mancha café que se extiende a lo largo del fruto, por último, aparece una felpa blanca conocida como el micelio del hongo y después de siete días emergen esporas de color crema (FHIA, 2003). Hasta las 10 semana de edad los frutos pequeños presentan mayor susceptibilidad a la enfermedad (Amores et al., 2009). En frutos a la mitad del desarrollo, la enfermedad forma puntos traslucidos, los cuales forman manchas cafés, el borde es irregular y origina un color amarillo que avanza en la epidermis de la mazorca, días después en la mancha café aparece micelio el cual luego forma esporas, que se encuentran por millones. En frutos que superan los tres meses de edad, la podredumbre no sobrepasa el exocarpo pudiendo aprovecharse las almendras del interior de la mazorca (Johnson et al., 2008).



Figura. 1 Síntomas externos e internos de moniliasis.

En cuanto al daño externo se caracteriza por pudrición, necrosis y deformación de los frutos, aunque frutos de dos meses y medio en adelante no presentarían síntomas externos; mientras que el tejido interno estaría en descomposición (Reuck, 1997), lo cual mata al fruto, convirtiéndose en una tonalidad café, formando una pelusa de color crema y posteriormente aparición de esporas del hongo (Johnson et al, 2008).

1.3.3 Taxonomía

Moniliophthora roreri ha tenido varios cambios taxonómicos desde su primera identificación (Evans, 2002). Fue nombrado por R. Ciferri y Parodi en 1933 como: clase: Deuteromiceto, orden: Hifales, género: *Monilia* y especie *M. roreri* (Phillips-Mora 2003). Evans, Samson y Benny (1978) al examinar caracteres ultraestructurales de *Monilia roreri* encontraron una estructura interna de micelio típica de basidiomicetos describiendo de esta manera un nuevo género *Moniliophthora* identificado como basidiomiceto en estado asexual, por otra parte, consideraron que toda la estructura de la superficie de la mazorca era un

basidiocarpo enormemente modificado, basado en eventos meióticos durante la esporogénesis (Evans, 2013). En el año 2005 se dio una nueva clasificación taxonómica: Phylum: Basidiomycota, clase: Agaricomyceto, orden: Agaricales, familia: Marasmiaceae, género: *Moniliophthora*, especie: *M. roreri* (Aime y Phillips-Mora).

1.3.4 Ciclo de la enfermedad

El ciclo de *Moniliophthora roreri* (Figura 2) inicia con los despojos de la cosecha (frutos contaminados), después, las conidias se dispersan por factores abióticos como la lluvia y el viento (Navarro y Mendoza, 2006). Por otra parte, debido al movimiento generado en labores de cosechas las esporas son movilizadas en el aire, las cuales, bajo condiciones propicias de humedad y temperatura, llegan a infectar los frutos recién formados (Amores et al., 2009). En un estudio acerca de microambientes, Phillips-Mora (2006) concluye que la mayor concentración de esporas de *Moniliophthora roreri* se encuentra a 1 metro de altura de los árboles de cacao, las conidias depositadas en la mazorca mueren si existe radiación/desecación o viven en presencia de agua; al germinar penetran directamente la cascara del fruto. La penetración de las conidias pasa a través de las estomas, reproduciéndose entre las células del córtex, de esta manera se producen conidias dentro y fuera de los frutos (Albuquerque et al., 2005).

Moniliophthora roreri presenta un periodo de incubación largo antes de que se presenten los síntomas. (Johnson et al., 2008). Este periodo puede ser de 4 a 8 semanas, y depende de la susceptibilidad de árbol, condiciones climáticas, severidad del ataque y edad de

las mazorcas (FHIA, 2003), no obstante, hay estudios que relatan que el período de incubación varía entre 30 a 70 días (Cruz, 1993).

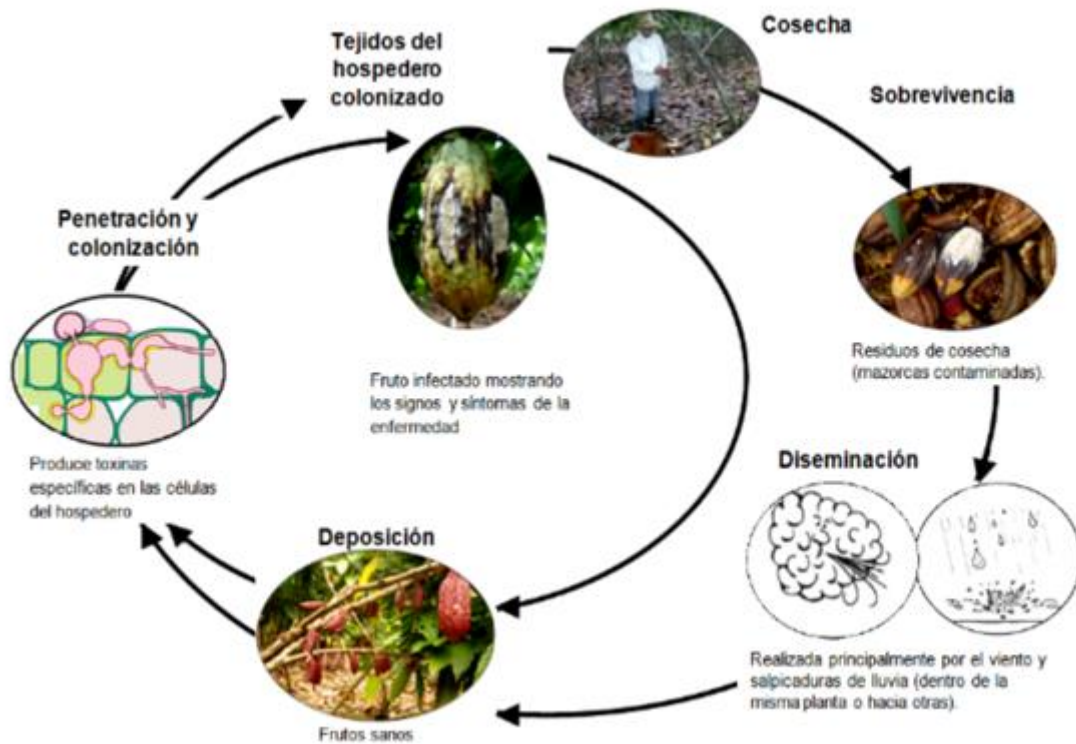


Figura. 2 Ciclo de la moniliasis causada por *Moniliophthora roreri* Fuente: FHIA. 2003

1.4 El hongo antagonista *Trichoderma* spp.

Trichoderma es un hongo filamentoso perteneciente al grupo de los ascomicetos, el cual habita naturalmente en los suelos (forestales y agrícolas) altos en materia orgánica, por lo general son encontrados en tejidos vegetales en descomposición y madera. El crecimiento de este hongo aumenta en mayor concentración de raíces, las cuales llegan a ser colonizadas por microorganismos (Esparza, 2009).

Actualmente se desarrollan numerosas investigaciones con *Trichoderma* spp. debido a que este microorganismo es de gran interés biotecnológico, por sus importantes características sirven para varias industrias como: alimenticia, textil, farmacéutica y agrícola (Harman et al., 1998).

Trichoderma generalmente es cultivada en laboratorio sobre medio PDA (Potato Dextrosa Agar), en este medio forman colonias morfológicamente distintas, comenzando con una forma lisa, generalmente al quinto día forma micelio algodonoso color blanco verdoso, la esporulación presenta fotosensibilidad. La formación de un micelio compacto por lo general toma 7 días. La temperatura óptima de crecimiento fluctúa entre 25 - 30 °C (Harman *et al.*, 1998).

JUSTIFICACIÓN

En la presente investigación busca encontrar alternativas biológicas para el control de la moniliasis del cacao. El control de moniliasis por lo general se basa en el uso de fungicidas, labores culturales, inducción de resistencia y control biológico, la mayor cantidad de estudios encontrados se refiere a métodos de control químico, los cuales presentan varios aspectos negativos entre ellos afectación a la salud del agricultor, contaminación del suelo, pudiendo ser inaccesible para agricultores con escasos recursos económicos (INIAP, 2015).

El control biológico es una alternativa viable y sustentable que permite el uso de microorganismos y subproductos de microorganismos para contrarrestar el crecimiento y establecimiento de fitopatógenos, por ejemplo, el hongo *M. roleri*. El control biológico mediante aplicación de antagonistas microbianos está clasificado como uno de los elementos más importantes en el manejo integrado de plagas (MIP) y enfermedades de plantas como una alternativa sustentable al uso de pesticidas químicos (Arguello, 2000).

En estudios realizados se ha comprobado que, mediante el uso de microorganismos antagonistas más métodos de control cultural frente a *M. roleri*, la producción de mazorcas infectadas llega a un 100% en terrenos abandonados, 78% en terrenos que tienen un manejo cultural mejorado y un 36% en terrenos tratados con antagonistas. En cuanto a los rendimientos aumentaron exponencialmente en un 300% y también se llegó a conocer que mediante el control biológico no solo se protege los frutos de nuevas infecciones, sino que también se

previene el desarrollo y la reproducción de este patógeno (Krauss, 1998).

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *Moniliophthora roreri* en pruebas *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Obtener cepas de *Trichoderma* spp. de muestras de suelo y mazorca.
- Evaluar el efecto *in vitro*, tanto parasitismo como antibiosis, de ocho cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Moniliophthora roreri*
- Determinar el efecto inhibitorio *in vitro* de filtrados fúngicos de ocho cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Moniliophthora roreri*.

3.3 Hipótesis

El efecto de *Trichoderma* spp. *in vitro* incide en el desarrollo del hongo *Moniliophthora roreri*.


MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Fase de campo

En la Provincia de Santo Domingo de los Tsachilas, cantón La Concordia, parroquia Monterrey en tres fincas cacaoteras descritas en la Tabla 1. se tomaron muestras tanto de suelo como de mazorcas de cultivos de cacao mayores a 30 años de edad. En cada finca se tomaron siete muestras de suelo rizosférico, diez mazorcas infectadas por moniliasis y cinco mazorcas sanas. La parroquia de Monterrey se encuentra ubicada a 217 msnm presentando un clima tropical y una temperatura promedio de 25,8 °C (Uve, 2015).

Tabla 1. Sitios de recolección de muestras

Nombre de Finca	Provincia	Localización	Coordenadas Geográficas
El Cisne (A)	Santo Domingo	Monterrey	-0.032300, - 79.497125
La Virgencita (B)	Santo Domingo	Monterrey	-0.022552, - 79.478488
Labrador (C)	Santo Domingo	Monterrey	0.119660, - 79.558536



En el campo se consideraron lotes de 100 m² de cacao en cada finca, luego en dicho lote se seleccionaron plantas con las mejores características fenotípicas, después en la rizosfera de las plantas anteriormente seleccionados las muestras fueron extraídas profundizando de 20-30 cm bajo el suelo. Cada una de las muestras estaban formadas por 4 diferentes submuestras con un peso aproximado de 200 gramos obteniendo un total de 21 muestras, las cuales posteriormente fueron homogenizadas de acuerdo a la metodología de Ferraris (2000). Estas muestras fueron selladas herméticamente en fundas con cierre plástico para luego ser procesadas en el laboratorio de biotecnología agrícola y de alimentos.

En cuanto a la selección de mazorcas sanas de cacao se tomó en consideración que se encuentran próximas a mazorcas que presenten la infección, y que se estén en un estado fisiológico para ser cosechado; se tomaron 15 muestras y su recolección fue en fundas con cierre plástico grandes y no permitiendo su contacto con el suelo.

Para el aislamiento de *Moniliophthora roreri* se procedió a tomar muestras de mazorcas de cacao infectados por el hongo, seleccionando frutos con mayores signos externos de la presencia de este, se los recolectó con el uso de guantes y su posterior traslado en fundas con cierre plástico al laboratorio de Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito ubicada en Cumbayá.

4.2 Fase de laboratorio

Se realizó el aislamiento de cepas de *Trichoderma* spp. obtenidas de suelo y mazorcas en las diferentes fincas. Por otra parte, de mazorcas infectadas se aisló *Moniliophthora roreri* para posteriores pruebas de antagonismo. Ambos procesos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito ubicada en Cumbayá.

4.2.1 Aislamiento de *Trichoderma* spp.

Las muestras de tierra fueron sometidas al protocolo para cultivos de tierra mediante diluciones seriadas, establecido en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos I y II de La Universidad San Francisco de Quito (Anexo C). Frascos con 90 ml de agua, junto con tubos con 9 ml de agua, y otros materiales de laboratorio se sometieron a esterilización por autoclave por 20 minutos a 121°C y 20 lb. Una vez enfriados los materiales en los frascos que contienen 90 ml de agua se agrega 10 gr de tierra y se agita durante 2 minutos. Se toma 1000 µl de la mezcla y se agrega en un contenedor tubular que contiene 9 ml de H₂O destilada, se mezcla bien y se realiza diluciones seriadas hasta alcanzar la concentración de 10⁻⁹. De las diluciones 10⁻⁵, 10⁻⁷ y 10⁻⁹, se extrajeron 100 µl de cada una y fueron sembradas

individualmente en cajas Petri en las cuales contenían *Medio Selectivo Trichoderma* (TSM) (Anexo D) (Elad, 1981).

Las mazorcas sanas fueron manipuladas de dos maneras para obtención de *Trichoderma*, primero se hizo lavado de mazorcas para obtención de *Trichoderma* superficial, y luego se realizó siembra de tejido del exocarpo para obtener *Trichoderma* endófito.

El protocolo para las muestras de cacao sano para la obtención de *Trichoderma* superficial se estableció de la siguiente manera: en primer lugar, se colocó una bandeja plástica, e hisopos en luz UV de la cámara de siembra durante media hora, después se procedió a sacar los cacaos de su funda con cierre plástico y con 10 ml de H₂O destilada esterilizada y una jeringa se comenzó a regar el cacao dejando caer el agua en la bandeja plástica, con los hisopos se fregaba a la mazorca para obtener mayor cantidad de residuos. Con una pipeta se tomó 100 µl de agua con residuos y se sembró en las cajas Petri con TSM (*Medio Selectivo Trichoderma*).

La metodología para encontrar *Trichoderma* endófito fue cortar las mazorcas sanas previamente sometidas al protocolo de lavado, con un cuchillo esterilizado, y obtener muestras del exocarpo, posteriormente sometidas a un protocolo de desinfección (Anexo E) para ser sembradas en cajas Petri en medio TSM (*Medio Selectivo Trichoderma*).

La dilución de suelo y partes de exocarpo sembradas en cajas Petri con *Trichoderma* en medio TSM fueron incubadas 15 días a 28 °C.

4.2.2 Cepas comerciales de *Trichoderma*

Se obtuvieron dos cepas de colección con el fin de ser integrados en las pruebas de antagonismo. Dichas cepas fueron codificadas con las letras G y H respectivamente.

4.2.3 Aislamiento de *Moniliophthora roreri*.

Las mazorcas infectadas fueron cortadas por la mitad con un cuchillo esterilizado y se extrajeron las semillas del fruto, después pasaron por un protocolo de desinfección (Anexo E). donde el carácter de selección de siembra fue aquellas que poseían micelio blanquecino en la superficie, el medio utilizado para su crecimiento fue Medio V8 Modificado (Tabla 2).

Tabla 2. Medio de cultivo V8 modificado

Reactivos	MEDIO 1 LITRO
Jugo V8	200 ml
Maltosa	20 gr.
Asparagina	1 gr.
Extracto de Malta	10 gr.
CaCO ₃	3 gr.
Agar – Agar	15 gr.

Fuente: Rechcigl, 1978

4.2.4 Evaluación *in vitro* del efecto antagónico de las cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *Moniliophthora roreri*.

Para evaluar el efecto antagonista de *Trichoderma* sobre *Moniliophthora roreri* se utiliza la técnica de prueba dual la cual se describe a continuación.

El método requiere sembrar en cada extremo de una caja Petri, la cual contiene cultivo V8 modificado, un cilindro de cinco milímetros de diámetro del hongo antagonista y del patógeno. Las cajas Petri fueron incubadas con el disco patógeno por 360 horas a una temperatura de 28°C, en ese momento se colocaron los discos del hongo antagonista en el extremo correspondiente. Los datos que reflejan el crecimiento del patógeno fueron registrados cada 24 horas. Se realizó un control con tres repeticiones el cual se sembró en cajas Petri cilindros de 5mm del patógeno y fueron incubadas a las mismas condiciones (Magdama, 2010). En este experimento se realizaron 3 repeticiones y los valores se calcularon mediante la proporción porcentual de inhibición del ascenso micelial (PICM) según la ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición del crecimiento radial} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

Tomando a R1 como el radio promediado del patógeno control (*Moniliophthora roreri*) (cm) y considerando a R2 como el radio promediado del patógeno (cm) en el régimen con cepas de *Trichoderma*.

Análisis Estadístico primer experimento

Factor en estudio

El factor en estudio que se consideró en este trabajo de investigación son cepas de *Trichoderma* spp. extraídas tanto de suelo rizosférico como de mazorcas sanas de cacao.

Tratamientos

Los tratamientos estarán constituidos por ocho cepas de *Trichoderma*.

Diseño experimental

El diseño experimental empleado para el primer experimento fue de diseño completamente al azar (DCA) con un solo factor en estudio. Cuyo modelo matemático fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

i: tratamientos

j: repeticiones

μ : media general

τ_i : efecto del tratamiento

ε_{ij} : efecto del error experimental

El primer ensayo consta de 9 tratamientos con 3 repeticiones incluyendo un control y un total de 27 unidades experimentales, para determinar las discrepancias en los datos estadísticos entre cada tratamiento se ha empleado el test de DUNCAN.

4.2.5 Evaluación de filtrados fúngicos de cepas de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento *Moniliophthora roreri*.

Trichoderma spp. se caracteriza por presentar propiedades antagonistas frente a fitopatógenos como lo es la producción de metabolitos con actividad fungistática y antibiótica. Por ese motivo es de interés evaluar la consecuencia fungistática que presentan las soluciones de las cepas a distintas concentraciones (1%, 5%, 10%, 30%) en este caso sobre *Moniliophthora roreri* (Magdama, 2010).

Obtención de filtrado fúngico

Para la obtención de filtrado fúngico se sembró discos de cinco milímetros de diámetro con el sacabocado No.5 de *Trichoderma* en frascos de vidrio Pyrex de 50 ml con medio PDB (Potato Dextrose Broth). Estos frascos con *Trichoderma* se incubaron a una temperatura de 27°C durante siete días en una cámara con agitación a 150 rpm.

Luego de los siete días, se filtró tres veces con papel filtro previamente esterilizado en autoclave y después con milipore de 22 µm. El extracto se adicionó en medios V8 modificado a diferentes concentraciones (1%, 5%, 10%, 30%) en cajas Petri. Ya en el medio solidificado,

se inoculó en el centro de la caja Petri un cilindro micelial de 5 mm de *Moniliophthora roreri*. Las cajas Petri se incubaron durante 15 días a una temperatura de 28°C. Se tomaron medidas del crecimiento radial del fitopatógeno cada 24 horas.

Para el control de este experimento se inoculó un disco micelial de *M. roreri* solo en medio V8 modificado y fue incubado a las mismas condiciones (Magdama, 2010). Este experimento se realizó con 3 repeticiones y el parámetro a evaluar fue la proporcionalidad porcentual de inhibición del ascenso radial.

Análisis Estadístico segundo experimento

Tratamientos

En el segundo experimento se tomarán 8 metabolitos extraídos de las cepas purificadas en el experimento anterior, combinándolas con el medio de crecimiento para moniliasis, medio V8 modificado en cuatro diferentes concentraciones.

Diseño Experimental

El diseño experimental empleado para el segundo experimento fue de modelado totalmente aleatorio, cuyo factorial fue de 8x4. Cuyo modelo matemático es:

$$Y_{ij} = \mu + a_i + b_k + ab_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

i: Factor a (Metabolitos de ocho cepas de *Trichoderma*)

j: repeticiones u observaciones

k: Factor b (Diferentes concentraciones de metabolitos)

μ : *media general*

a_i : efecto del Factor A

b_k : efecto del Factor B

ab_{ik} : Efecto de la interacción A x B

ε_{ijk} : efecto del error experimental

El segundo ensayo consta de 8 tratamientos, 4 concentraciones, 3 repeticiones, con un total de 96 unidades experimentales, para determinar las diferencias en los datos estadísticos entre cada tratamiento se ha empleado el test de DUNCAN.

RESULTADOS

5.1 Aislamiento e identificación morfológica de cepas de *Trichoderma* spp. a partir de muestras de suelo y de mazorcas de cacao

A partir de las muestras recolectadas se aislaron 6 cepas de *Trichoderma*, a través de la metodología TSM (*Medio selectivo Trichoderma*). De las cuales, tres cepas fueron extraídas de las mazorcas sanas de cacao mediante el protocolo de lavado: una cepa de la mazorca de la finca “Labrador” y dos cepas de la finca “El Cisne”; otra cepa extraída del exocarpo de la mazorca de cacao sano (endófito) proveniente de la finca “El Cisne” y dos cepas extraídas de suelo rizosférico que presenten un mayor poder antagónico en contra de *M. roreri* de las fincas “La virgencita” y “El cisne” presentadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Cepas de *Trichoderma* aisladas e identificadas en medio selectivo TSM

Muestra	Localidad	Origen de la muestra	Código
1	Finca “La Virgencita”	Cultivos de tierra mediante disoluciones seriadas. Tierra Repetición 4.	A
2	Finca “El Cisne”	Cultivos de tierra mediante disoluciones seriadas. Tierra Repetición 3.	B
3	Finca “El Cisne”	Lavado de mazorcas sanas. Repetición 20 <i>Trichoderma</i> 1.	C

4	Finca “Labrador”	Lavado de mazorcas sanas. Repetición 11	D
5	Finca “Labrador”	Lavado de mazorcas infectadas. Repetición 26	E
6	Finca “El Cisne”	Siembra de epidermis de mazorca de cacao sano	F
7	MicroTech Ecuador	<i>Trichoderma</i> Comercial 1	G
8	MicroTech Ecuador	<i>Trichoderma</i> Comercial 2	H

Una vez establecido el material fúngico obtenido en medio TSM se procedió a repicar en medio PDA (Potato Dextrosa Agar) para su posterior incubación durante 7 días a 28 °C.

Las ocho cepas de *Trichoderma* spp. se incubaron en medio PDA para su observación macro y microscópica. A nivel macroscópico se observaron colonias de rápida formación a partir de las 48 horas en incubación. Por otro lado, se presenció una formación de penachos blancos miceliales que constituían una red espesa dentro de la caja Petri. El micelio compactado cambio de coloración de blanquecino a varias tonalidades de verde debido a la esporulación del hongo. Finalmente, se pudo determinar que las hifas septadas forman una conglomeración micelial aplanada, sólida y con una forma anillada (Figura 3A) (Harman, 1998).

A nivel microscópico se pudo observar conidióforos en patrones de distribución en disposición de pirámide o cono, ahorquillados, no tabicados y verticilados (Figura 3B) (Guigón, 2010). En la Figura 4 se presentan las seis cepas completamente aisladas mostrando su morfología descrita con anterioridad.

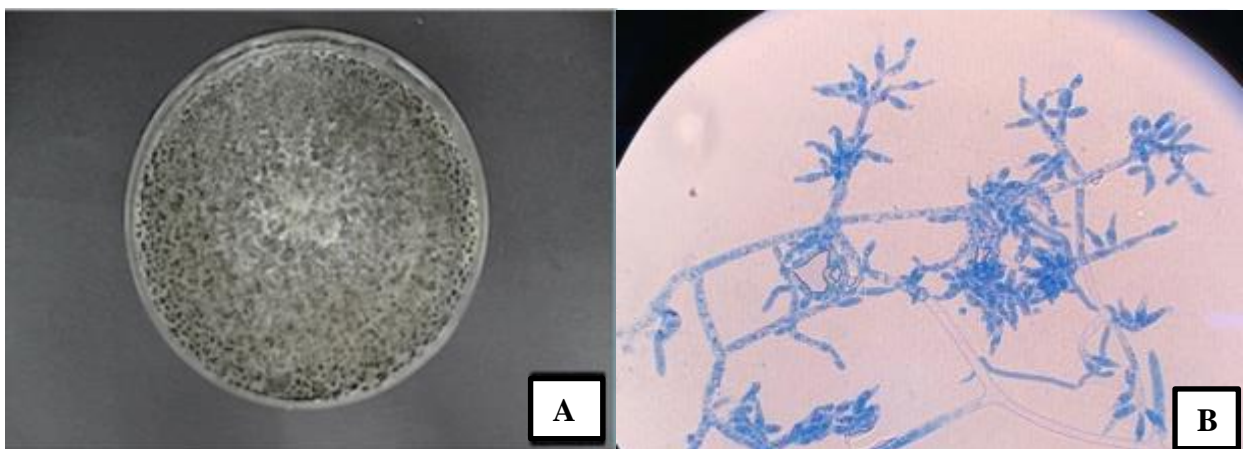
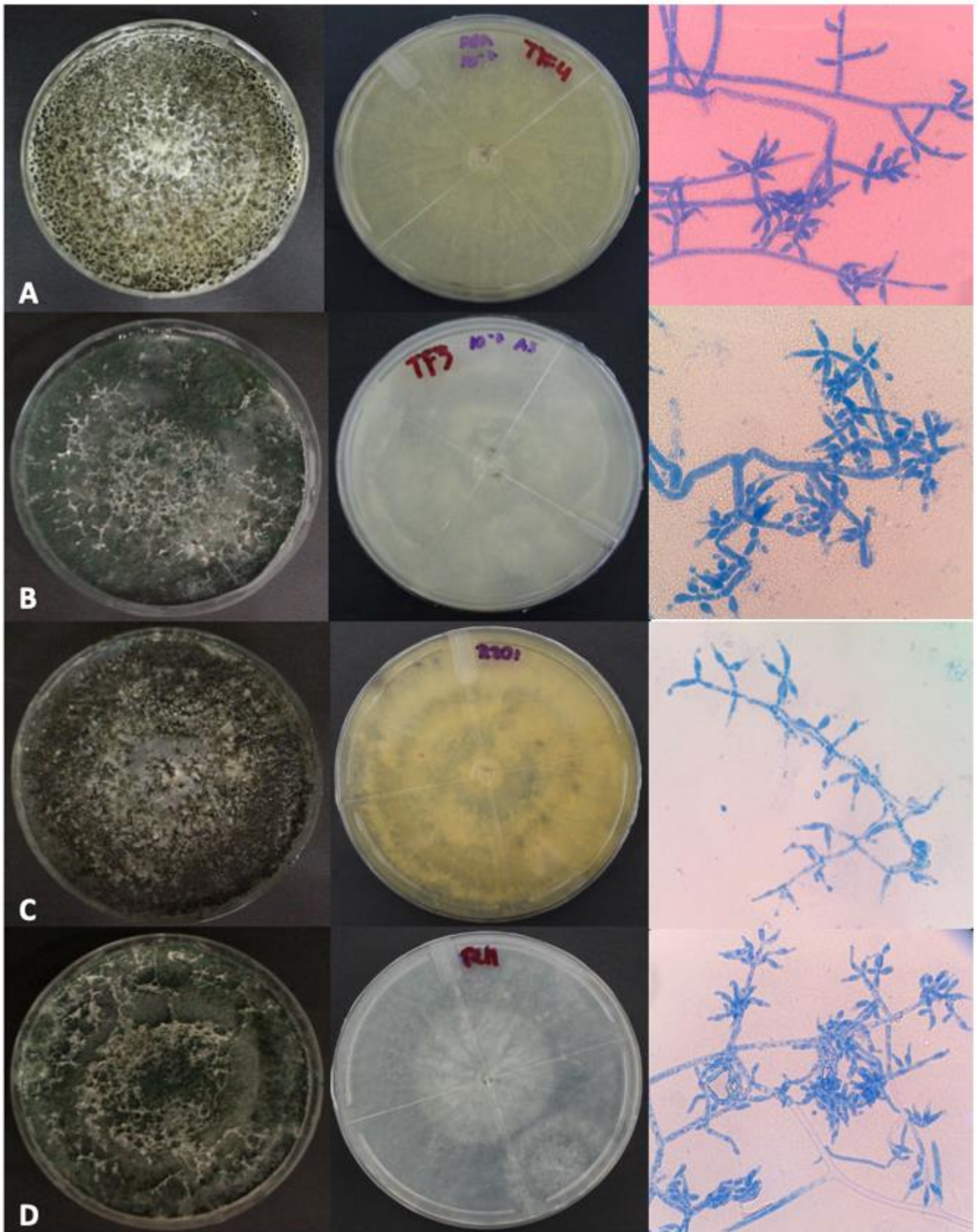


Figura. 3 Ceba Trichoderma A. Izquierda: Macroscópica, observese micelio. Derecha: Microscópica a 100X



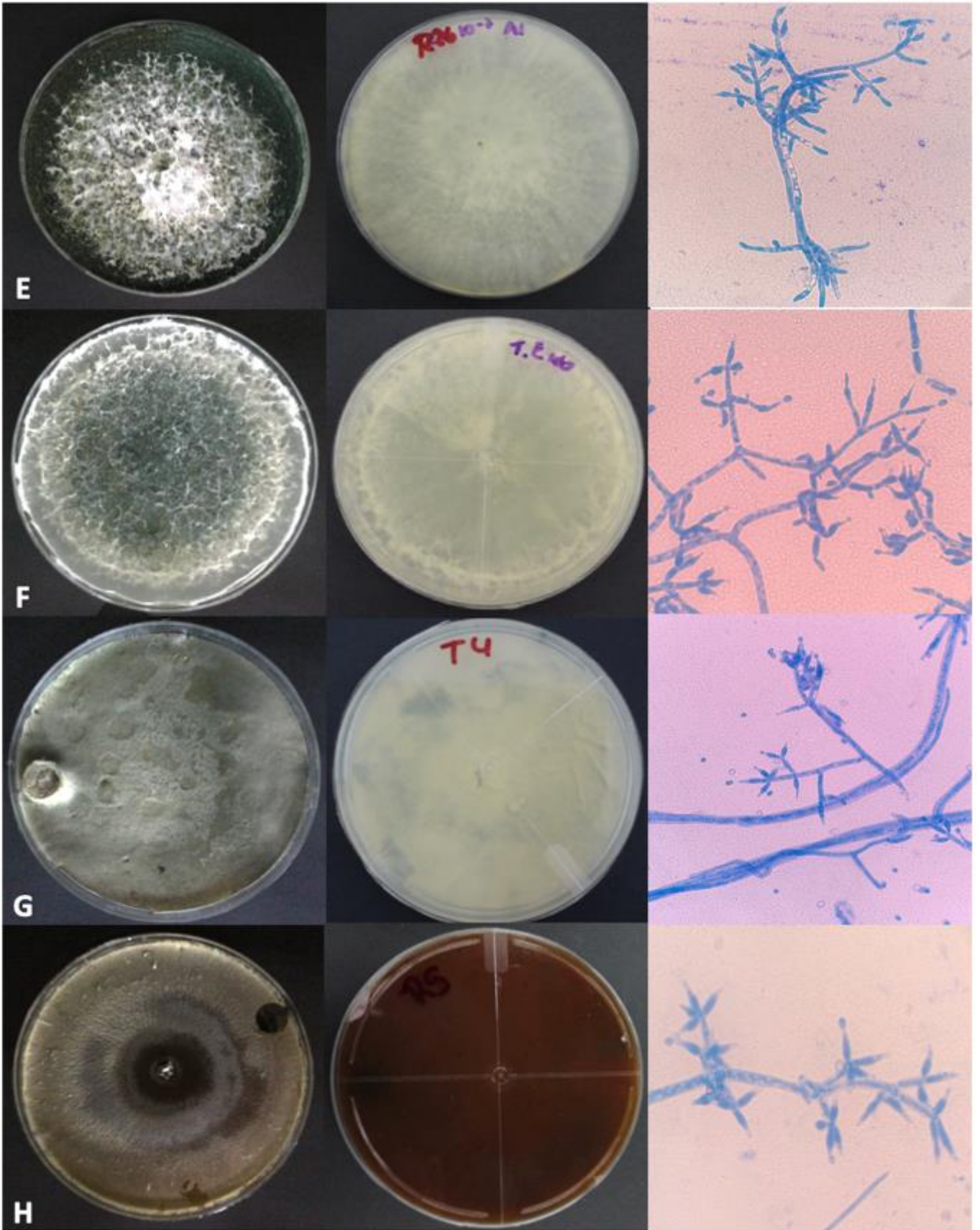


Figura. 4 Fotografías macroscópicas y microscopias (100X) de cepas de *Trichoderma* : A, B, C, D, E, F, G y H en medio PDA

5.2 Aislamiento de *Moniliophthora roreri*.

A los 15 días de sembradas las semillas de mazorcas infectadas de cacao en medio V8 modificado se obtuvo el crecimiento de *M. roreri*. En la Figura 5A es posible apreciar que a nivel macroscópico el micelio puede alcanzar un espesor de 3mm. El micelio presenta una forma afelpada y lanuda con una coloración rosa en los primeros días de crecimiento para luego convertirse en un color arcilloso y crema. *M. roreri* se caracteriza por crecer de manera eficiente en medio V8 con una tasa de crecimiento diaria de 1.3 a 6 mm cuya esporulación inicia a partir del sexto día. Mientras que en medio agar crece de 8 a 12 mm después de dos semanas de incubación (Evans, 2002).

A nivel microscópico se puede observar hifas alargadas con paredes delgadas e irregulares. Las hifas están formadas por conidióforos de manera ramificada, y conidios separables de color amarillento y marrón en masa Figura 5B (Evans, 1978).

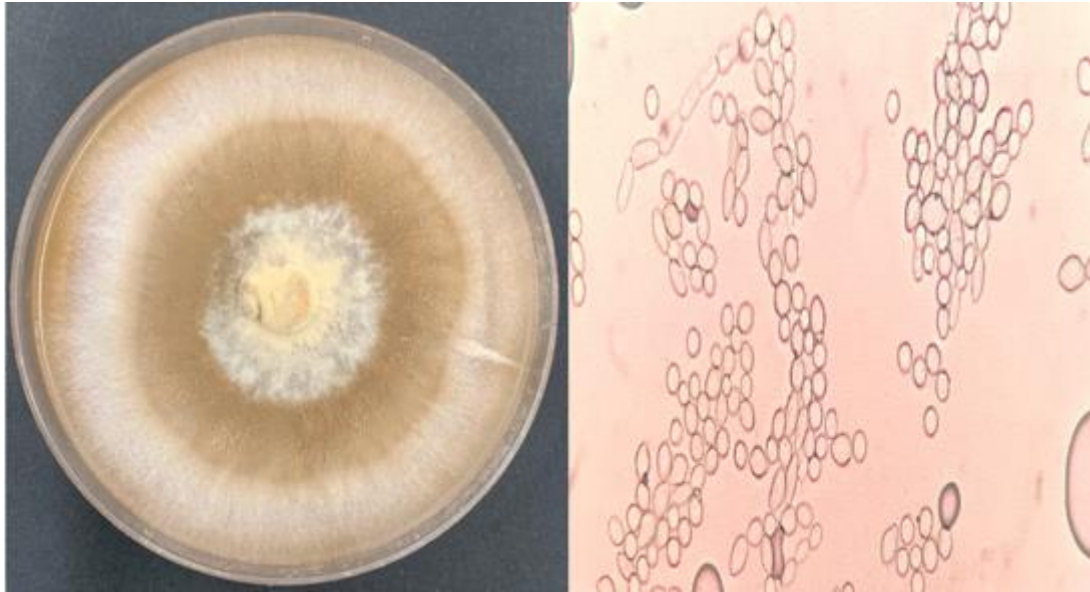


Figura. 5 A) *Moniliophthora roreri* en medio V8 modificado macroscópica B) Hifas de *Moniliophthora roreri* a nivel microscópico 100X.

5.3 Evaluación *in vitro* del efecto antagónico de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de *Moniliophthora roreri*.

Al evaluar *in vitro* el efecto antagonista de las seis cepas de *Trichoderma* frente a *Moniliophthora roreri* más dos cepas reactivadas comerciales. Se pudo determinar que siete de estas cepas de *Trichoderma* influyen sobre el ascenso *in vitro* de *Moniliophthora roreri* como se puede observar en la Figura 6. El desarrollo del fitopatógeno redujo su crecimiento en un intervalo del 40 al 70% en contraste con el control (Tabla 4), datos los cuales se consiguieron a raíz de la ecuación de la proporción porcentual de crecimiento radial.

A los 15 días de crecimiento de *M. roreri* se agregaron los discos con *Trichoderma* como se puede observar en la Figura 6A. Al cabo de cinco días se observa como *Trichoderma* influye sobre el crecimiento de *M. roreri* rodeándolo completamente como se puede apreciar en la Figura 6B.

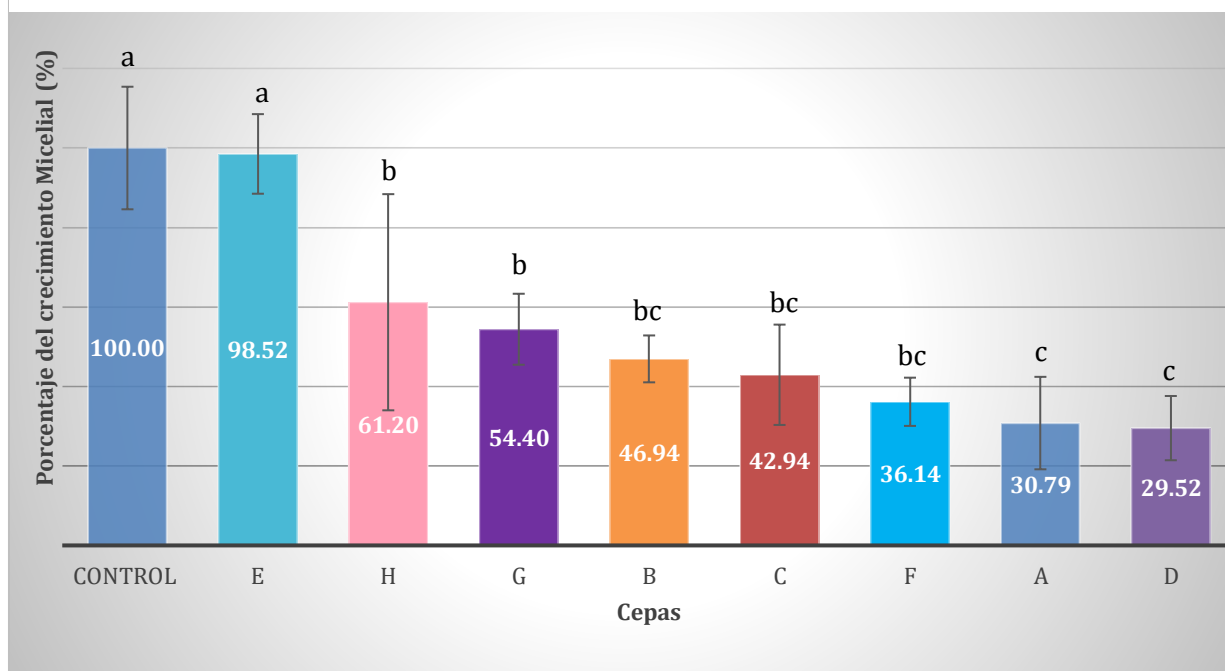
Primer día de siembra de *Trichoderma* 360 horas después de la siembra



Figura. 6 A) Cultivo dual de cepa de *Trichoderma* G vs *Moniliophthora roreri* izquierda *Moniliophthora roreri* derecha *Trichoderma* G

Una vez realizado el estudio de las estadísticas a las 120 horas de crecimientos correspondientes a las 8 cepas de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de *Moniliophthora roreri*. Se determinó la formación de 3 rangos estadísticos, las cepas C, F, A, D disminuyeron su crecimiento entre un 42,94% al 29,52%, comparado con el control que refleja un 100% de crecimiento.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Moniliphthora roreri* por acción de cepas de *Trichoderma* spp.

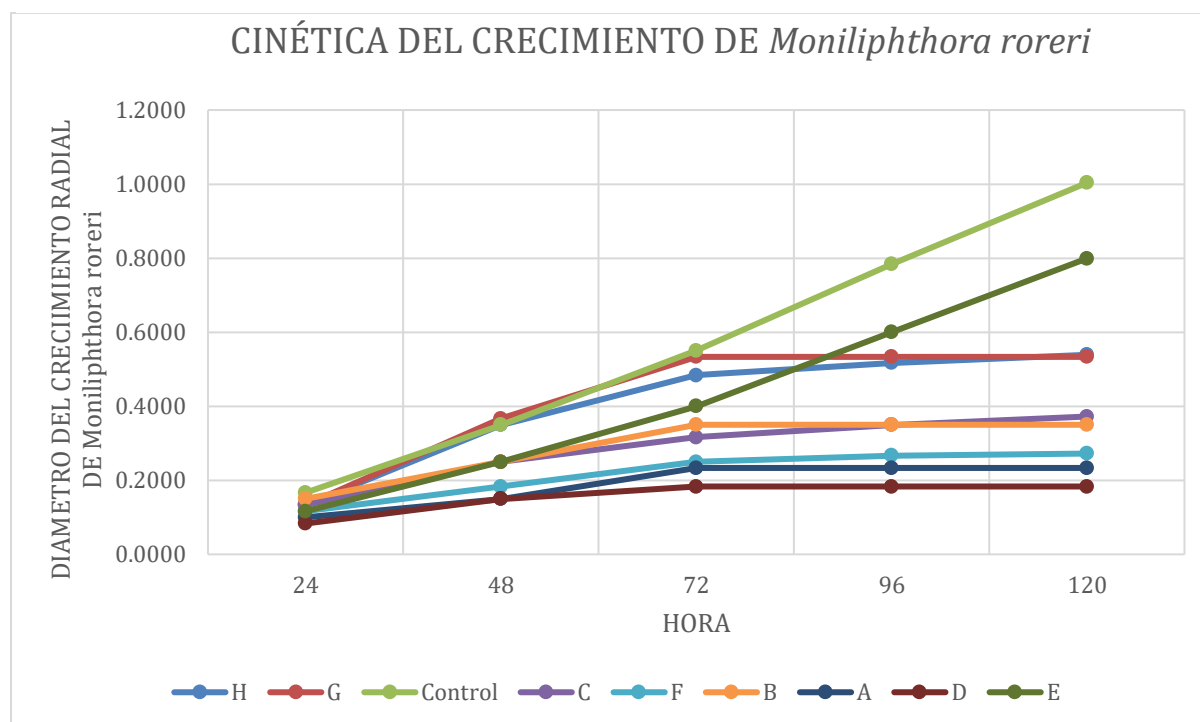


Por otra parte, la cepa de *Trichoderma* E no reveló un efecto antagónico estadísticamente significativo frente al fitopatógeno, esta cepa inhibió el crecimiento radial en un 1,48% (Tabla 4). En el ANOVA (Anexo. G) se pudo determinar que si existe diferencia significativa entre cada uno de los tratamientos. La constante de variación (CV) fue arrojado con un valor porcentual del 23,9% demostrando que existe un efecto del componente genético de las diferentes cepas de *Trichoderma* que se refleja en este coeficiente.

5.4 Cinética de crecimiento de *Moniliophthora roreri*. bajo influencia de cepas de *Trichoderma* spp.

La cinética de crecimiento de cepas de *M. roreri* es influenciada directamente debido a la acción de las cepas de *Trichoderma* spp. El fitopatógeno en presencia de *Trichoderma* spp. presentó una tasa de crecimiento radial de 0,094 cm/día, considerada baja en comparada con el tratamiento control que refleja una tasa de ascenso radial de 0,196 cm/día. Las curvas de crecimiento micelial en (cm) se muestran en la Tabla 5, donde se puede apreciar la cinética de crecimiento de *M. roreri*. frente la influencia de cepas de *Trichoderma* spp.

Tabla 5. Cinética de crecimiento de *Moniliophthora roreri* bajo la influencia de ocho cepas de *Trichoderma* spp.



Cuando las cepas de *Trichoderma* spp. interactúan frente a *M. royeri* se observaron distintos mecanismos de acción que actuaron de forma directa en el crecimiento del fitopatógeno. Se considera que algunas especies de *Trichoderma* spp. tienen la posibilidad de crecer sobre colonias del fitopatógeno. *Trichoderma* spp. al entrar en contacto con el fitopatógeno, se enreda por medio de las hifas atrapado por las relaciones existentes entre las uniones de átomos de la capa celular del antagonista y patógeno, en algunos casos posteriormente expulsa enzimas y uniones de átomos (antibióticos) las cuales degeneran a la capa celular para de esta manera entrar a las hifas del antagonista (Harman, 2004). Este efecto descrito con anterioridad es conocido como Micoparasitismo y se pudo visualizar macroscópicamente en 6 cepas de *Trichoderma* spp. de las 8 cepas estudiadas.

En algunas cepas de *Trichoderma* spp. es característica la producción de metabolitos que actúan con un efecto antibiótico, que es liberada al medio, cuyo objetivo es el detener el crecimiento de los fitopatógenos. A nivel macroscópico se observó que en las áreas de relación de seis cepas de *Trichoderma* spp. con *M. royeri*, se encontraban franjas libres de esporulación. Se observó que en esta región del medio de cultivo V8 modificado existía una coloración mas oscura característica del fenómeno de antibiosis (Sánchez, 2009). Es por ese motivo, que se analizó la consecuencia fungistática *in vitro* correspondiente a las 8 cepas de *Trichoderma* spp. en un posterior experimento.

5.5 Evaluación de filtrados fúngicos de cepas de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento *Moniliophthora roreri*.

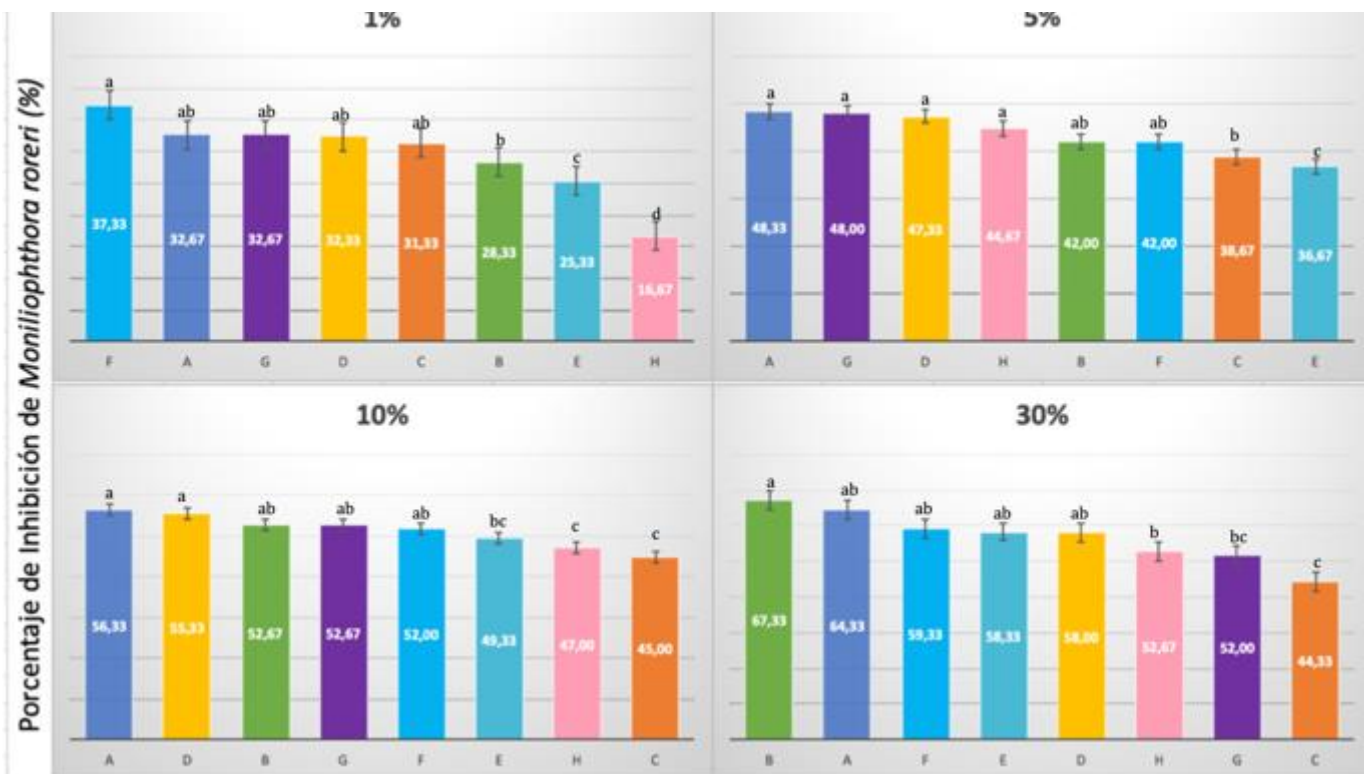
Al evaluar el crecimiento radial de *Moniliophthora roreri*. *in vitro* con contenido de filtrados fúngicos obtenidos de las 8 cepas de *Trichoderma*, a concentraciones del 30, 10, 5 y 1% en medio V8 modificado, se pudo determinar que 5 de las 8 cepas evaluadas presentaron un porcentaje de inhibición mayor al 50% a una concentración del 10% y 4 de las 8 cepas presentaron un porcentaje de inhibición mayor al 50% a una concentración del 30%. El mejor efecto inhibitorio se observa en la cepa B con un 67,33% de inhibición. (Figura 7).



Figura. 7 Efecto de filtrado fúngico. Izquierda: Caja control de *Moniliophthora roreri*
Derecha: Ceba B vs *Moniliophthora roreri*

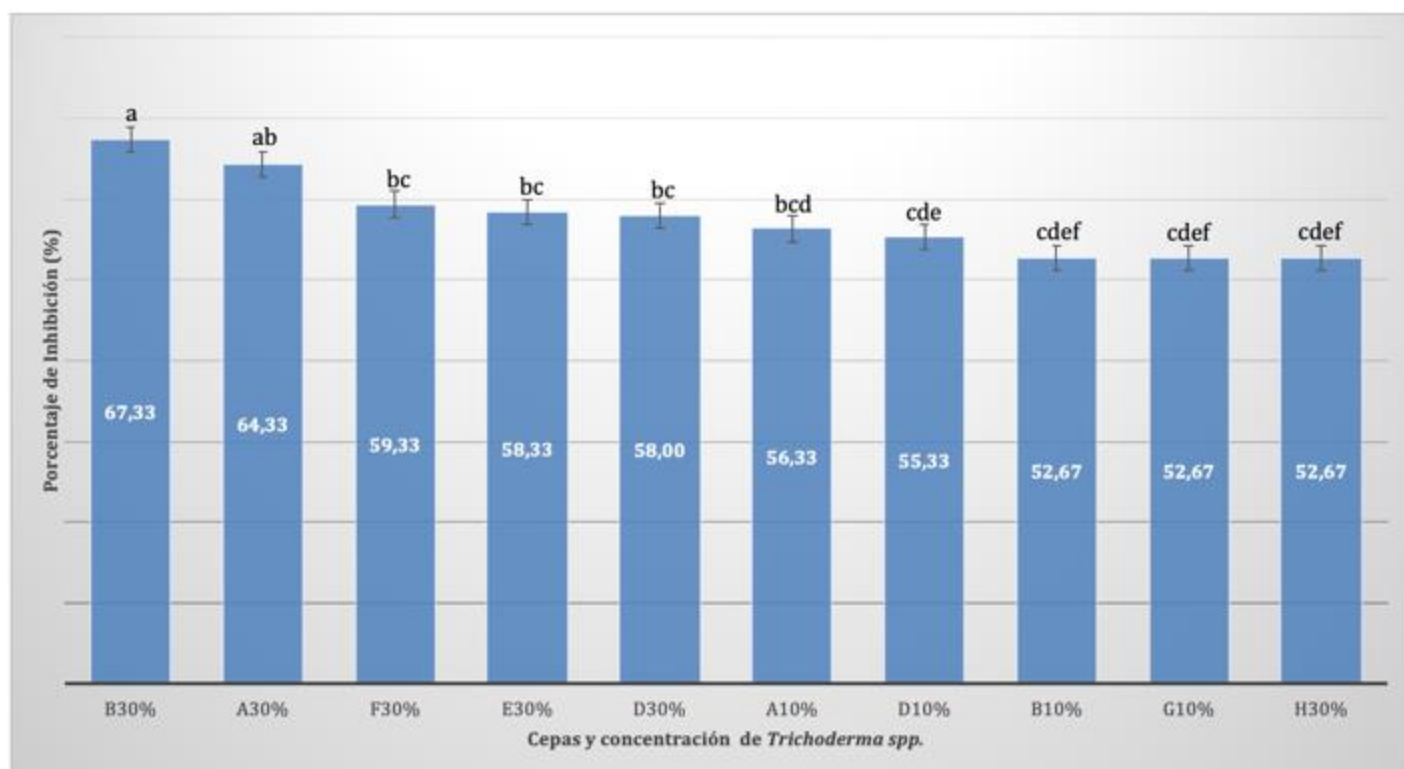
Se evaluó las concentraciones de metabolito (30, 10, 5, 1%) por cepa para ver si el efecto es estadísticamente significativo frente al control. Se pudo observar que al 1% de preparado fúngico la cepa de mayor acción inhibitoria fue la cepa de *Trichoderma* F, siendo estadísticamente significativa comparada con el resto, al 5% de preparado fúngico la mayor acción inhibitoria se encuentra la cepa de *Trichoderma* A, sin embargo, no se presentan discrepancias de alto nivel en la mayoría de los tratamientos, al 10% de preparado fúngico las cepas de mayor acción inhibitoria fueron *Trichoderma* A y *Trichoderma* D, siendo estadísticamente significativas comparadas con el resto. Al 30% de preparado fúngico la mayor acción inhibitoria se encuentra la cepa de *Trichoderma* B, sin embargo, no existe diferencia significativa entre la mayoría de tratamientos (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto fungistático de cuatro concentraciones de *Trichoderma* spp.



Finalmente, al efectuar la evaluación de la información estadística correspondiente a los 15 días de aumento de *M. royeri*. Sometido a influencia de filtrados fúngicos, se logró determinar la formación de 9 rangos de significación estadística, de los cuales, los 10 mejores resultados de inhibición se muestran en la Tabla 7. Cuando *M. royeri* se desarrolla dentro del rango de acción de las cepas *Trichoderma* B, A y F, ese crecimiento disminuye significativamente a una concentración del 30% en cada una de las cepas. La inhibición del patógeno va desde un 59.33% a un 67,33% contrastado con un control que refleja un 0% de inhibición.

Tabla 7. Efecto antagónico de los mejores filtrados fúngicos de *Trichoderma* a diferentes concentraciones



5.6 Cinética de crecimiento de *Moniliophthora roreri* por efecto de filtrados fúngicos de cepas de *Trichoderma* spp.

La acción de los metabolitos de *Trichoderma* spp. actúa directamente sobre la cinética de crecimiento de las cepas de *Moniliophthora roreri*. El fitopatógeno en presencia de metabolitos presentó una tasa de crecimiento radial promedio de 0,20 cm/día en concentraciones del 1%, 0,17 cm/día en concentraciones del 5%, 0,14 cm/día en concentraciones del 10% y 0,12 cm/día en concentraciones del 30%, consideradas menores en contraste con el tratamiento control que presentó una tasa de crecimiento radial del 0,22 cm/día. Las curvas de crecimiento micelial en (cm) se muestran en las Tablas 8 y 9, donde se puede apreciar la cinética de crecimiento de *Moniliophthora roreri* frente la influencia de metabolitos de *Trichoderma* spp.

Tabla 8. Cinética de crecimiento de *Moniliophthora roreri* con cepas A, B, C y D

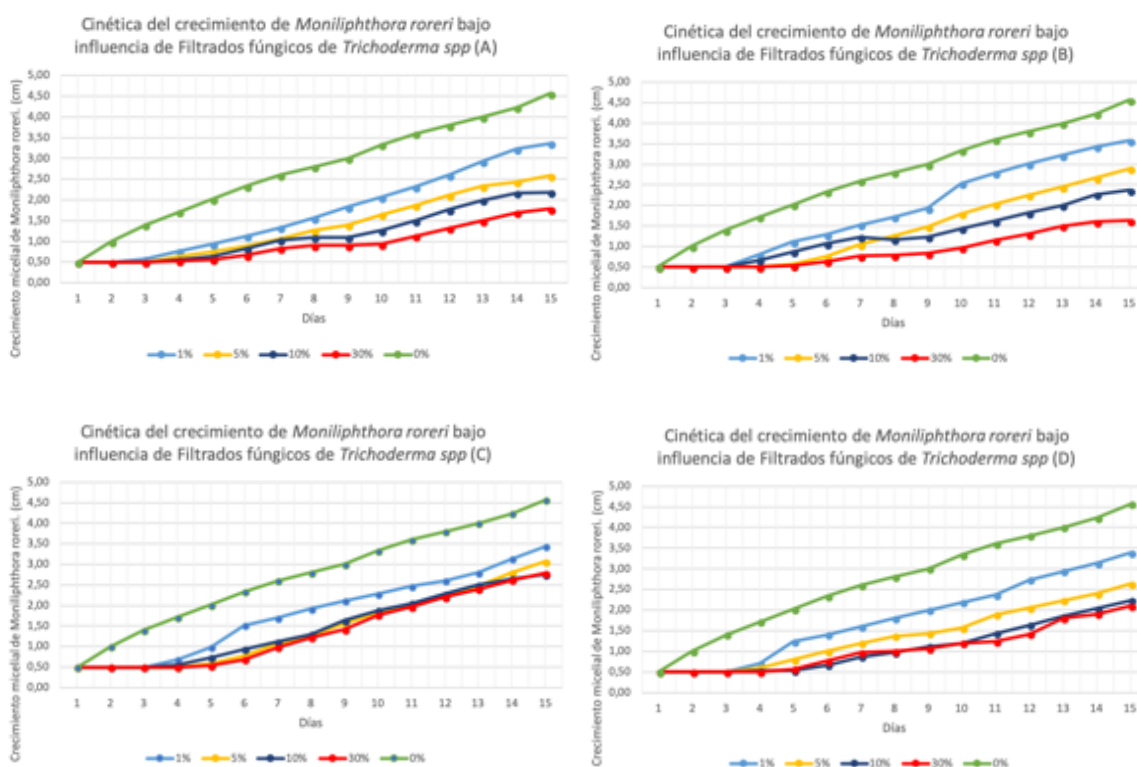
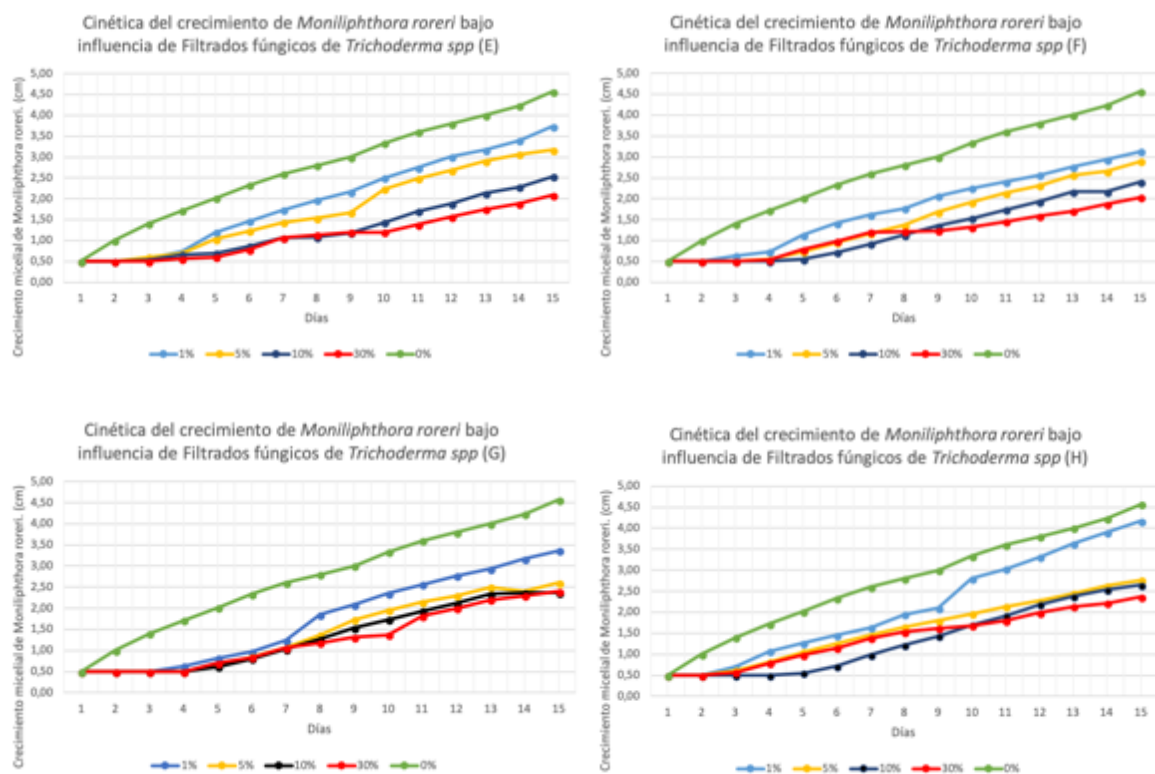


Tabla 9. Cinética de crecimiento de *Monilophthora roreri* cepas E, F, G, H



En la Tabla 10 se puede observar el o los mecanismos de acción que poseen las 8 cepas de *Trichoderma spp.* evaluadas frente al fitopatógeno *Monilophthora roreri*.

Tabla 10. Determinación de Micoparasitismo, Antibiosis y competencia de cepas de *Trichoderma* vs *Moniliophthora roreri*

Cepa	Imagen	Antibiosis	Competencia	Micoparasitismo
A	 A petri dish showing two distinct fungal colonies. On the left is a yellowish, circular colony of <i>Trichoderma</i> . On the right is a larger, more diffuse, greenish-grey colony of <i>Moniliophthora roreri</i> . The two colonies are separated by a clear zone, indicating antibiosis.	X		X
B	 A petri dish showing two distinct fungal colonies. On the left is a yellowish, circular colony of <i>Trichoderma</i> . On the right is a larger, more diffuse, greenish-grey colony of <i>Moniliophthora roreri</i> . The two colonies are separated by a clear zone, indicating antibiosis.	X		X

C		X	X	
D			X	X
E		X		

F		X	X	X
G			X	X
H		X	X	X

DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento e identificación morfológica de cepas de *Trichoderma* spp. a partir de muestras de suelo y mazorcas.

Las metodologías usadas para aislar cepas de *Trichoderma* spp. permitió la separación de 6 cepas de *Trichoderma* de 21 especímenes de suelo, 40 mazorcas infectadas con *Moniliophthora roreri* y 12 mazorcas sanas, las cuales fueron recolectadas en fincas con árboles de cacao mayores a 40 años. El hongo *Trichoderma* spp. habita naturalmente en diversos tipos de suelos, sobre todo en los que poseen abundante materia orgánica (Papavizas, 1985). Por ese motivo, las fincas productivas que poseen una buena fertilización y antigüedad en su establecimiento se convierten en fuente de varias especies de *Trichoderma* spp. cuya probabilidad de aislamiento es mayor que en otros escenarios (Benítez, 2004).

Los aislamientos que se obtuvieron en esta investigación presentaron características morfológicas exclusivas del género *Trichoderma* spp. descritas por Harman, et al., (1998). Estos autores afirman que, en medios de cultivo enriquecidos con nutrientes, el crecimiento de estas cepas es veloz en forma de argollas. La coloración de los micelios es generalmente amarillo verdoso, debido a la esporulación del hongo. Los conidióforos poseen una distribución en forma cónica o piramidal, levantados y fuertemente ramificados. En cuanto a los conidios son agrupados en el conidióforo tomando formas redondas, elipsoidales y ovoides de color verde brillante.

En un estudio realizado por Sosa, D., et al., (2010) afirman que existe una alta diversidad de especies de *Trichoderma* spp. en suelos asociados a los agroecosistemas de cacao en Venezuela, con 10 diferentes especies de 79 cepas aisladas, sin embargo, la diversidad baja considerablemente cuando se aislaron cepas endófitas extraídas de tronco, fruto y flor, con 2 diferentes especies de 10 cepas aisladas. En esta investigación se confirma ese estudio debido a que se consiguió aislar una *Trichoderma* endófito.

Por otro lado, en una investigación realizada por Villamil, J (2012) logró extraer 10 diferentes microorganismos endófitos, de aislados de mazorcas de cacao, de los cuales solo 2 disminuyeron el crecimiento de *M. roleri* pertenecientes al género *Trichoderma* siendo los más efectivos, en este estudio la cepa *Trichoderma* endófito F presentó características interesantes tanto en la evaluación del efecto antagonista como en su filtrado fúngico ubicándose entre las mejores tres en ambos casos.

6.2 Evaluación *in vitro* del efecto antagónico de las Cepas de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de *Moniliophthora roleri*.

En cuanto al análisis *in vitro* de la respuesta negativa de cepas de *Trichoderma* spp. Acerca del crecimiento de *M. roleri* se puede comentar que categorías de *Trichoderma* spp. poseen un alto nivel de efectos negativos sobre los patógenos como *Botrytis*, *Rhizoctonia*, y otros patógenos de interés comercial (Hadar, 1992) por lo cual se es de interés probar su actividad antagonista frente a *M. roleri*. Por otra parte, *Trichoderma* spp. posee una alta capacidad reproductiva, adaptabilidad a condiciones adversas, a diferentes sustratos, y

eficiencia en nutrientes ideal para futuros ensayos en campo sobre cacao (Benítez, 2004)

En una investigación llevada a cabo por Hoyos, et. al., (2015) determinaron que el antagonismo *ex vitro* de aislamientos de *Trichoderma* frente a *M. roreri* presentaron un menor porcentaje de daño en el fruto, tanto interna como externamente de un 100% que es el control a un 75,5%. Estos datos se confirman con los altos valores que presentan las cepas de esta investigación en condiciones *in vitro* que al 30% presentan una inhibición del crecimiento de hasta el 67% con una media de inhibición del 51%.

En el caso de la cepa de *Trichoderma* spp. E se pudo observar en el primer experimento que no presenta capacidad antagonista frente al patógeno *Moniliophthora roreri*. Es probablemente debido a la variabilidad genética del género *Trichoderma* entre especies y subespecies. Así mismo, En un estudio realizado por Tovar (2008) obtuvo que 5 de las 6 cepas de *Trichoderma* aisladas, produjeron un efecto antagonista positivo frente al patógeno *Rhizoctonia solani*, motivo por el cual para utilizar *Trichoderma* como controlador biológico es necesario tomar en cuenta selección y especificidad de esta (Acevedo, 1988).

6.3 Evaluación de filtrados fúngicos de cepas de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento *Moniliophthora roreri*.

Al evaluar filtrados fúngicos de cepas de *Trichoderma* spp. se pudo determinar que la inhibición del patógeno esta entre 59.33% y 67,33% comparado con el control que refleja un 0% de inhibición. Estos valores de inhibición son semejantes a los presentados en un estudio realizado por Magdama (2010).

Al evaluar el efecto de filtrados fúngicos que existe a concentraciones menores del 30%, se determinó que las concentraciones de filtrados están estrechamente relacionadas con la proporción porcentual de inhibición del aumento radial de *Moniliophthora roreri*. Esto quiere decir que a mayor concentración de filtrados fúngicos existirá una reducción en el crecimiento de patógenos (Michel, 2011).

Magdama (2010) afirma que existe una tendencia cambiante sobre el efecto antagónico de filtrados fúngicos. Así mismo, la producción de metabolitos y enzimas por cepas *Trichoderma* son variables según un estudio, elaborado por Conney et. Al en 1997, el cual afirma también que las cepas de *Trichoderma* dependiendo del estado de desarrollo producen metabolitos. Esto indica que, a más de las ocho cepas evaluadas en esta investigación, existen más cepas que contengan un efecto inhibitorio sobre patógenos mediante preparados fúngicos.

CONCLUSIONES

Se aisló e identificó funcionalmente seis cepas de *Trichoderma* spp. de 21 muestras de suelo, 30 mazorcas de cacao infectadas con el hongo *Moniliophthora roreri*, y 15 mazorcas sanas recolectadas en fincas productoras de cacao, en sembríos mayores a tres décadas en la región costera de la República de Ecuador.

En el primer experimento siete de ocho cepas aisladas de *Trichoderma* spp. presentaron la capacidad antagonista *in vitro* frente a *Moniliophthora roreri*. Las cepas de *Trichoderma* spp. A y D presentaron un bajo porcentaje de crecimiento micelial que fue entre 29% al 30%, el resto presentó una media mayor de crecimiento que fue del 48%, a excepción de la cepa E la cual no presentó efecto inhibitorio del crecimiento.

En el segundo experimento se pudo determinar que el mecanismo de antibiosis es importante para control de *Moniliophthora roreri*. Sin embargo, existen otros mecanismos de acción que podrían tener aquellas cepas que no actuaron de manera eficiente en antibiosis; resaltando los distintos mecanismos de acción del género *Trichoderma*.

Se evaluó la capacidad antagonista *in vitro* de filtrados fúngicos de ocho cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Moniliophthora roreri*. Se determinó que las cepas *Trichoderma* spp. B, A y F, inhiben su crecimiento significativamente a una concentración del 30%. Por otra parte, siete de las ocho cepas aisladas a una concentración del 30% presentan el mismo nivel significativo de inhibición del crecimiento del patógeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, R. y Arcia, A . 1988. Control Biológico de *Sclerotium* con *Trichoderma* sp. *in vitro*. (Resumen). *Fitopatol. Venez.* 1:34.
- Aime MC, Phillips-Mora W, 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cocoa (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97, 1012–22.
- Albuquerque, P.S.B.; Bastos, C.N.; Luz, E.D.M.N.; Silva, S.D.V.M. 2005. Doenças do cacauero (*Theobroma cacao*). Em: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A; Camargo, L.E.A. (Eds.) Manual de Fitopatologia. p. 151-163. Vol. 2 (4ta Ed.). Livroceres, Piracicaba, Brasil.
- Amores, F.; Agama, J.; Suárez, C.; Quiroz, J.; Motato, N. 2009. EET 575 y EET 576 nuevos clones de cacao nacional para la zona central de Manabí. Boletín divulgativo N 346. Estación Experimental Tropical “Pichilingue”. Quevedo, Ecuador. 28 p
- ANECACAO (Asociación Nacional de Exportadores de Cacao – Ecuador). 2015. Recuperado el 12 de enero de 2019. Disponible en web; link: <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/historia-del-cacao.html>
- Arguello, O. 2000. Manejo Integrado de la monilia del cacao (*Theobroma cacao* L.). En: Tecnología para el Mejoramiento del Sistema de Producción de cacao. Bucaramanga. Colombia. Corpoica, Regional Siete. p. 74-84.

Asociación Nacional de Exportadores de Cacao ANECACAO. (2014). Reporte ejecutivo estadística.

Recuperado el 22 de marzo de 2019. Disponible en web;

link:http://issuu.com/anecacao_ecuador/docs/

Banco Central del Ecuador (2018). Información Estadística Mensual. Boletín No. 2004, 3.1.2b.

Recuperado el 12 de marzo de 2019, de Recuperado el 12 de marzo de 2019. Disponible en

web; link: <https://www.bce.fin.ec/index.php/component/k2/item/776>.

Benítez T., Rincon A., Codon A., Limón M., (2004). Biocontrol Mechanism of *Trichoderma* strains.

International Microbiology 7: 249-260.

Ciferri, R. and Parodi, E. (1933) Descrizione del fungo che causa la “Moniliasi” del cacao.

Phytopath.Z. 6, 539–542.

Cooney, J. M., Lauren, D. R., Jensen, D. J., & Perry-Meyer, L. J. (1997). Effect of Harvest Time,

Temperature, Light, and Spore Inoculum Concentration on 6-n-Pentyl-2 H-pyran-2-one

Production by *Trichoderma* spp. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(7), 2802-2806.

CORPORACION COLOMBIANA DE INVESTIGACION AGROPECUARIA. CORPOICA, Centro

de Investigación – TIBAITATA. Capacitación sobre el uso de metodologías y protocolos para

realizar investigaciones con microorganismos patógenos y potenciales antagonistas en el

cultivo de cacao. Laboratorio de Fitopatología, CORPOICA. C.I- TIBAITATA. 10 de Octubre

– 17 de Noviembre de 2006.

Cruz, B.S. 1993. Determinación de fuentes de resistencia de cacao de origen nacional al ataque de *Monilia roleri* (Cif. & Par.). Tesis Ing. Agr. Guayaquil, Ecuador. Universidad de Guayaquil. 101 p

Elad, Y., Chet, I., & Henis, Y. (1981). A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica*, 9(1), 59-67.

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

Esparza L., (2009). Efectividad *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en aislados de *Phytophthora parasítica* obtenidas de plantas de Jamaica. Investigación de Ciencias Agrícolas. Campus Montecillo. Fitosanidad y Fitopatología.

Evans, H. C. (2002). Invasive neotropical pathogens of tree crops. In R. Watling, J. C. Frankland, A. M. Ainsworth, S. Isaac, & C. H. Robinson (Eds.), Tropical mycology. *Micromycetes* (Vol. 2, pp. 83–112). Wallingford: CAB International.

Evans, H. C., Bezerra, J. L., & Barreto, R. W. (2013). Of mushrooms and chocolate trees: Aetiology and phenology of witches' broom and frosty pod diseases of cacao. *Plant Pathology*, 62, 728–740.

Evans, H.C.; Stalpers, J.A.; Samson, R.A.; Benny, G.L. (1978). On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Canadian Journal of Botany*. 56(20):2528-2532

Faostat, F. A. O. (2017). Statistical databases. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado el 12 de febrero de 2019. Disponible en web; link: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

FEDECACAO. Federación Nacional de Cacaoteros.(2004). Revista Cacaotera. No.4. Recuperado el 12 de marzo de 2019. Disponible en web; link: https://www.fedecacao.com.co/portal/images/recourses/pub_revcolcacaotera/fedecacao-colombia-cacaotera-009.pdf

Ferraris G., (2000). Muestreo y Análisis de Suelo. Punto de Partida hacia un Diagnóstico de Fertilidad. Desarrollo Rural INTA Pergamino.

FHIA (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola). 2003. Identificación y control de la moniliasis del cacao. Cortés, Honduras. 24 p.

FHIA (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola). 2012. La moniliasis del cacao: el enemigo a vencer. Primera Edición. La Lima - Cortés, Honduras. 1– 3 p. Recuperado el 12 de marzo de 2019. Disponible en web; link: http://www.fhia.org.hn/downloads/cacao_pdfs/la_moniliasis_del_cacao_el_enemigo_a_vencer.pdf

- Guigón C., Guerrero V., Vargas F., Carvajal E., Ávila G. (2010). Molecular Identification of *Trichoderma* spp. Strains, *in vitro* Growth Rate and Antagonism against Plant Pathogen Fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28: 87-96.
- Hadar Y, Harman GE, Taylor AG (1984). Evaluation of *Trichoderma koningii* y *T. harzianum* for New York soils for biological control of seed root caused by *Phytophthora* spp. *Phytopathology* 74:106–110
- Harman G., Howell C., Viterbo A., Chet I. Lorito M. (2004). *Trichoderma* especie-- symbionts avirulent opportunistic of the plant Microbiology. 2: 43–56. *Revista*
- Harman G., Kubicek C. (1998) *Trichoderma* and *Gliocadium*. Enzymes, biological control and commercial applications. Volume 2. Taylor & Francis UK 393p.
- Hoyos-Carvajal, L., Cardona, A., Osorio, W., & Orduz, S. (2015). Efecto de diversos aislamientos de *Trichoderma* spp. en la absorción de nutrientes en fríjol (*Phaseolus vulgaris*) en dos tipos de suelo. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(2), 268-278.
- ICCO (International Cocoa Organization), *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics*, Vol. XLIV, No. 4, *Cocoa year 2017/18*, Recuperado el 12 de enero de 2019. Disponible en web; link: <https://www.icco.org/statistics/production-and-grindings/production.html>

- INEC, E. (2016). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua (ESPAC 2016). Recuperado el 12 de marzo de 2019. Disponible en web; link: <https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/2018/04/Ficha-Sectorial-Cacao.pdf>
- Johnson, J.; Bonilla, J.; Agüero L. 2008. Manual de manejo y producción del cacaotero. Leon, Nicaragua. 40 p
- Krauss, U., M. Ten, E. Hidalgo, A. Martínez, C. Arroyo, J. García, A. Portuéguez y V. Sánchez. 2003b. Manejo integrado de monilia (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao L.*) en Talamanca, Costa Rica. *Agroforestería en las Américas* 10: 37-38.
- Magdama F. (2010). Estudio del efecto de Bioles y cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de zonas cacaoteras, como alternativas de control de *Moniliophthora roreri*, en condiciones *in vitro*. Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción. Escuela Politécnica Superior del Litoral.
- Michel AAC, Reyes De la CA, Otero SMA, Rebolledo DO, Lezama GR (2011). Potential antagonism of *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* Schlechtend., Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Zinder and Hansen and *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) under greenhouse conditions. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 23: 286-293.
- Navarro, M.; Mendoza, I. 2006. Cultivo del cacao en sistemas agroforestales. Guía técnica para promotores. Río San Juan, NI. 67 p. Recuperado el 12 de marzo de 2019. Disponible en web; link: <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A5288e/A5288e.pdf>

Papavizas G., Roberts S., Kim K., (1990). Development of mutants of *Gliocladium virens* tolerant to benomyl. *Canadian Journal Microbiology* 36: 484 – 489.

Phillips-Mora W.; Ortiz, C.F.; Aime, M.C. 2006. Fifty years of frosty pod rot in Central America: Chronology of its spread and impact from Panamá to Mexico. In Proceedings 15th International Cocoa Research Conference [San José, Costa Rica, 9-14 October 2006]. Cocoa Producers'

Phillips-Mora, W., Aime, M. C., & Wilkinson, M. J. (2007). Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology*, 56, 911–922.

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

PROEcuador (Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones). 2016. Cacao y elaborados. Recuperado el 14 de febrero de 2019. Disponible en web; link: <http://www.proecuador.gob.ec/compradores/oferta-exportable/cacao-y-elaborados/>

Rechcigl, Jr. (Ed.), 1978, CRC Handbook Series in Nutrition and Food, Vol. III, CRC Press Inc.

Reuck, D. 1997. Monilia del cacao. ¿Una amenaza semejante a la escoba de bruja? *Revista Café & Cacao: Noticias*. 2(1): 1-2

Rorer, J.B. 1918. Enfermedades y plagas del cacao en el Ecuador y métodos apropiados al cultivo de cacao. Asociación de Agricultores, Guayaquil, Ecuador. 80 p.


- Sánchez M., (2009), Aislamiento y caracterización molecular y agronómica de *Trichoderma* spp. nativos del norte de Tamaulipas, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica.
- Sánchez Mora, F. D., & Garcés Fiallos, F. R. (2012). *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. en el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria*, 3(3).
- Sosa, D., Perez-Martinez, S., Gómez, K., Molina, S., Rumbos, R., Parra, D., Dominguez, D., Istúriz, M., Demey, J., (2010). Diversidad de especies de *Trichoderma* en agroecosistemas de cacao en Venezuela. Lab. de Fitopatología, Área de Agricultura, Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Baruta, Venezuela
- Tovar J. (2008). Evaluación de la capacidad antagonista in vivo de aislamientos de *Trichoderma* spp. Frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Pontificia Universidad Javeriana. Microbiología Agrícola y Veterinaria.
- Uve, E. C., Luna, L. M. G., & Ruenes, A. R. (2015). Análisis de los problemas ambientales en el cantón la Concordia, provincia Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador. *Investigación y Saberes*, 4(1), 1-16.
- Villamil Carvajal, J. E., Blanco Valbuena, J. O., & Viteri Rosero, S. E. (2012). *In vitro* evaluation of Native Microorganisms for their Antagonism against *Moniliophthora roreri* Cif & Parin Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 65(1), 6305-6315.

ANEXOS

Anexo A: Estadísticas de cultivo de cacao en Ecuador

Año	Provincia	Superficie Cosechada (ha)	Producción (Tm.)	Rendimiento (Tm/ha)	Porcentaje Nacional
2016	Guayas	89.607	49.233	0,5	28%
	Manabí	94.904	22.309	0,2	13%
	Los Ríos	96.200	41.187	0,4	23%
	Esmeraldas	61.824	18.083	0,3	10%
	Resto de Provincias	111.722	46.739	0,4	26%
	Total general		454.257	177.551	

Anexo B: Participación porcentual de los principales productos de exportación FOB

 BANCO CENTRAL DEL ECUADOR													
3.1.2.b PARTICIPACIÓN PORCENTUAL DE LOS PRINCIPALES PRODUCTOS DE EXPORTACIÓN FOB (1) Miles de TM; miles de USD FOB; valor unitario USD FOB; porcentaje de participación; tasa de variación, porcentaje													
	Enero 2017				Enero 2018				Enero 2019				
	a	b	b/a	Porcentaje de participación	a	b	b/a	Porcentaje de participación	a	b	b/a	Porcentaje de participación	
	Miles de TM	Miles de USD	Valor unitario USD		Miles de TM	Miles de USD	Valor unitario USD		Miles de TM	Miles de USD	Valor unitario USD		
Exportaciones Totales	2.735	1.559.240			2.772	1.806.315			2.727	1.656.962			
Petroleras	1.785	568.145	44,3	100,0%	1.838	780.906	59,0	100,0%	1.821	639.212	48,8	100,0%	
Crudo	1.646	526.949	44,8	92,7%	1.644	709.265	60,3	90,8%	1.650	575.993	48,8	90,1%	
EP Petroecuador (2)	1.454	467.196	44,9	82,2%	1.425	616.572	60,5	79,0%	1.374	483.896	49,2	75,7%	
Crudo Oriente	900	300.510	46,7	52,9%	766	344.511	62,9	44,1%	763	284.530	52,2	44,5%	
Crudo Napo	554	166.687	42,0	29,3%	659	272.061	57,7	34,8%	611	199.366	45,6	31,2%	
NOTAS: - Tercer Clas. Priv. Prod. Servicio (3)	192	59.753	43,5	10,5%	218	92.693	59,3	11,9%	276	92.097	46,7	14,4%	
Compañías privadas Ctto. Participación	0	0	0,0	0,0%	0	0	0,0	0,0%	0	0	0,0	0,0%	
Derivados	139	41.196	38,9	7,3%	194	71.640	48,3	9,2%	171	63.219	48,4	9,9%	
No Petroleras	950	991.094		100,0%	934	1.025.410		100,0%	906	1.017.750		100,0%	
Tradicionales	732	590.407		59,6%	697	624.829		60,9%	689	621.439		61,1%	
Camarón	27	181.306	6.801,8	18,3%	35	239.142	6.813,1	23,3%	41	236.450	5.769,8	23,2%	
Banano y Plátano	668	305.556	457,3	30,8%	631	302.050	478,8	29,5%	617	298.710	483,8	29,4%	
Cacao y elaborados	29	72.690	2.492,3	7,3%	20	42.679	2.140,8	4,2%	23	56.188	2.404,4	5,5%	
Altón y pescado	6	20.751	3.519,5	2,1%	10	31.488	3.313,6	3,1%	7	26.544	3.777,8	2,6%	
Café y elaborados	2	10.104	6.340,1	1,0%	1	9.471	6.578,5	0,9%	1	3.547	5.600,7	0,3%	
No Tradicionales	218	400.688		40,4%	237	400.580		39,1%	216	396.311		38,9%	
Enlatados de pescado	25	91.407	3.718,4	9,2%	20	89.349	4.427,7	8,7%	21	87.725	4.104,9	8,6%	
Flores Naturales	12	71.001	6.004,8	7,2%	12	67.093	5.369,0	6,5%	11	68.817	6.314,1	6,8%	
Otras Manufacturas de metal	11	24.674	2.339,0	2,5%	10	24.749	2.575,1	2,4%	13	25.604	1.940,0	2,5%	
Extractos y aceites vegetales	26	23.299	910,4	2,4%	55	38.285	692,1	3,7%	38	23.309	620,0	2,3%	
Productos mineros	13	19.488	1.464,5	2,0%	8	20.271	2.539,1	2,0%	9	19.794	2.261,7	1,9%	
Madera	32	16.648	516,0	1,7%	46	17.219	378,1	1,7%	32	15.407	474,8	1,5%	
Elaborados de banano	12	10.591	905,8	1,1%	14	13.210	975,4	1,3%	12	11.894	1.027,7	1,2%	
Químicos y fármacos	6	10.316	1.824,7	1,0%	7	13.055	1.965,4	1,3%	6	10.165	1.571,6	1,0%	
Manuf.de cuero, plástico y caucho	3	9.975	2.899,8	1,0%	4	10.619	2.733,8	1,0%	4	11.350	2.807,8	1,1%	
Vehículos	0	4.691	32.929,8	0,5%	0	2.478	24.929,9	0,2%	0	5.541	22.914,2	0,5%	
Jugos y conservas de frutas	4	9.273	2.127,4	0,9%	3	8.041	2.405,8	0,8%	3	6.347	2.475,8	0,6%	
Fruta	7	5.057	707,7	0,5%	8	8.153	984,8	0,8%	7	7.174	1.004,0	0,7%	
Harina de pescado	15	18.531	1.228,0	1,9%	6	9.629	1.589,5	0,9%	2	2.333	1.493,2	0,2%	
Maderas terciadas y prensadas	5	4.835	943,9	0,5%	6	4.865	802,4	0,5%	6	5.461	849,1	0,5%	
Manuf. de papel y cartón	6	5.598	955,1	0,6%	5	4.928	1.078,1	0,5%	4	5.613	1.249,8	0,6%	
Tabaco en rama	1	6.408	6.419,8	0,6%	2	9.709	6.043,3	0,9%	1	11.637	8.486,5	1,1%	
Otras manif.textiles	1	2.540	2.903,1	0,3%	1	2.489	3.174,4	0,2%	1	3.431	3.446,3	0,3%	
Otros elaborados del mar	3	4.533	1.501,1	0,5%	2	3.922	1.635,3	0,4%	1	1.217	1.867,5	0,1%	
Abacá	1	2.203	2.595,8	0,2%	1	1.326	2.114,5	0,1%	1	2.122	2.582,5	0,2%	
Prendas de vestir de fibras textiles	0	1.114	21.509,6	0,1%	0	1.539	14.831,6	0,2%	0	1.951	15.964,8	0,2%	
Otros	36	58.507		5,9%	28	49.651		4,8%	44	69.421		6,8%	

Anexo C: Metodología de aislamiento de *Trichoderma* de muestras obtenidas de suelos.

1. Se deshidrato las muestras de tierra por un tiempo de 72 horas a una temperatura aproximada a los 25°C sobre papel de diario.
2. Se empleó la metodología de diluciones en sucesión o en serie. Se determino la masa de 1g de muestra de suelo, cuyo propósito fue posteriormente diluirse en 9 ml. de H₂O destilada y esterilizada en un contenedor tubular de ensayo esterilizado (10^{-1}) y homogenizándose mediante una serie de movimientos intensos, haciendo uso de un Vórtex por un periodo de varios minutos. Posteriormente se extrajo 1 ml de la mezcla y se introdujo en un cilindro con 9 ml. de H₂O destilada y esterilizada (10^{-2}). Repitiéndose el algoritmo hasta el punto de conseguir una disolución de 10^{-9} . Se continuó con el movimiento constantemente por un tiempo de 60 segundos empleando un Vórtex en cada una de las fases.
3. Se extrajo 0.1 ml de las mezclas escogidas (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9}), y se posicionó en la zona central del área del punto intermedio electivo para *Trichoderma* (TSM).
4. El espécimen se desplegó por el área de la caja Petri con un instrumento triangular de material polímero estéril. Se garantizó una expansión homogenizada por a través del área central.
5. Se sello la caja Petri con material Parafilm, incubándose a una temperatura de 28°C en un periodo de 360 horas.

Anexo D: Medio Selectivo *Trichoderma* (TSM)

Componente	Cantidad (g/L)
Nitrato de Calcio tetra-hidratado	1,4
Nitrato de Potasio	0,26
Sulfato de Magnesio hepta-hidratado	0,26
Fosfato de Potasio	0,12
Cloruro de Calcio di-hidratado	1
Ácido Cítrico	0,05
Sacarosa	2
Agar	20
Tween 20	1mL
Gentamicina	1 ampolleta
Captan 80	0,05
Rovral 50	0,05

Tomar en cuenta pH 6.5 – 7

Fuente: (Elad, 1981)

Anexo E: Protocolo de desinfección de material vegetal

Producto	Tiempo
Hipoclorito de sodio (1%)	1 minuto
Alcohol al 70%	1 minuto
Agua destilada estéril	1 minuto/repetido

Anexo F: Anova de la Evaluación *in vitro* del efecto antagónico de las Cepas de *Trichoderma spp.* sobre el crecimiento de *Moniliophthora roreri*.

Fuentes de variación	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	0,5	0,1
Total	26	20445,1716				
Tratamientos	8	17267,0544	2158,3818	12,2245	2,66	4,03
Error Exp.	18	3178,1172	176,56207			

SY= 7,6716

Sd= 6,2639

CV= 23,8967%

Numero	Tratamientos	Repeticiones			Y_i	\bar{Y}_i
		1	2	3		
1	RS	34,850	59,567	89,171	183,588	61,196
2	T4	59,764	59,359	44,095	163,218176	54,406
3	R201	57,161	38,583	33,072	128,815681	42,939
4	T.Endo	41,712	29,680	37,040	108,431557	36,144
5	TF3	40,261	51,445	49,106	140,811839	46,937
6	TE4	17,808	34,296	40,261	92,365163	30,788
7	R11	20,578	31,658	36,314	88,5499152	29,517
8	R26	102,889	87,060	105,597	295,546185	98,515
9	Control	112,243	82,679	105,078	300	100,000
	TOTAL				1501,32621	55,6047
	MEDIA GENERAL				55,6047	

Anexo G: Anova de Evaluación de filtrados fúngicos de cepas de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento *Moniliophthora roreri*.

Fuentes	GL	SC	CM	F. Cal	0,05
Total	95	14141,66			
Tratamientos	31	12853,66	414,63	20,6029353	1,63 *
Factor Cep	7	1325,41	189,34	9,40838509	2,75 *
Factor Con	3	10179,95	3393,32	168,611974	2,15 **
AxB	21	1348,30	64,20	3,19030366	1,73 *
EE	64	1288,00	20,13		

(%) CV= 9,89
 SY = 2,59
 SD = 3,66

Numero	Tratamientos	Repeticiones			Y_i	\bar{Y}_i
		1	2	3		
1	RS	34,850	59,567	89,171	183,588	61,196
2	T4	59,764	59,359	44,095	163,218176	54,406
3	R201	57,161	38,583	33,072	128,815681	42,939
4	T.Endo	41,712	29,680	37,040	108,431557	36,144
5	TF3	40,261	51,445	49,106	140,811839	46,937
6	TE4	17,808	34,296	40,261	92,365163	30,788
7	R11	20,578	31,658	36,314	88,5499152	29,517
8	R26	102,889	87,060	105,597	295,546185	98,515
9	Control	112,243	82,679	105,078	300	100,000
	TOTAL				1501,32621	55,6047
	MEDIA GENERAL				55,6047	