

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL
CUSCO**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA Y ZOOTECNÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA TROPICAL**



TESIS

**EVALUACIÓN IN VITRO DEL POTENCIAL DE BIOCONTROL CON CEPAS DE
(*Trichoderma spp.*) SOBRE (*Moniliophthora roreri*) DEL CACAO (*Theobroma
cacao L.*) LA CONVENCIÓN-CUSCO**

PRESENTADA POR:

Bach. EDIT HUAMANI MIRANDA.

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGRÓNOMO TROPICAL.**

Asesores:

Mgt. Luis Justino Lizárraga Valencia

PhD. Fanny Rosario Márquez Romero

CUSCO - PERÚ

2023

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, Asesor del trabajo de investigación/tesis titulada: "Evaluación in vitro del potencial de biocontrol con copas de (*Trichoderma* spp.) sobre (*Monilophthora roeri*) del cacao (*Theobroma cacao* L.) 2a Convención-Cusco" presentado por: Estef Dlumuni Ordoña con DNI Nro.: 77506830 presentado por: con DNI Nro.: para optar el título profesional/grado académico de Ingeniero Agrónomo Tropical

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 2 veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del *Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC* y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 9%.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y adjunto la primera página del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 9 de Agosto de 2023

Firma

Post firma Luis Justino Lizasoaga Valencia

Nro. de DNI 23902170

ORCID del Asesor 000.00001-5600-7998

Co asesor: Fanny Rosario Paizquez Romero

ORCID: 0000-0002-0759-3318

DNI: 24990500

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: oid: 27259: 250739924

NOMBRE DEL TRABAJO

**TESIS EDIT HUAMANI MIRANDA SUSTE
NTACION 2023 PARA EMPASTADO.docx**

AUTOR

MIRANDA HUAMINI

RECUENTO DE PALABRAS

19502 Words

RECUENTO DE CARACTERES

99245 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

117 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

11.5MB

FECHA DE ENTREGA

Aug 3, 2023 2:59 PM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Aug 3, 2023 3:01 PM GMT-5**● 8% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base c

- 7% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 5% Base de datos de trabajos entregados
- 2% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossr

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Bloques de texto excluidos manualmente
- Material citado
- Fuentes excluidas manualmente

DEDICATORIA

A DIOS

Por darme salud, ser mi guía e iluminar mi camino

A mi madre

Gregoria Miranda Huamán, por su ejemplo, apoyo incondicional, entrega y abnegación para hacer de mí, una profesional.

A mi padre Juan y hermanos

Jany, Yaneth, Katia y Sandra por brindarme cariño y ser mi soporte en todo momento.

A mis sobrinos

Angie, Itali, Natalia, Leandro Gael y André Mateo por brindarme su compañía y apoyo.

La autora

AGRADECIMIENTOS

- A la UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO, por haberme albergado en sus aulas y en especial a todos los docentes de la Escuela Profesional de Agronomía Tropical, por sus enseñanzas, paciencia y dedicación en mi formación profesional.
- A la Dra. Fanny Rosario Márquez Romero, docente de la Universidad Intercultural de Quillabamba, por haberme guiado en este proyecto en base a su experiencia y sabiduría.
- Al Mgt. Luis Justino Lizárraga Valencia, docente de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, por compartir sus conocimientos y su gran contribución como asesor en la ejecución de la presente tesis.
- Al Ing. Dilman Glicerio Paricoto Apaza, por sus indicaciones y orientaciones en el desarrollo de este trabajo.
- A la Universidad Intercultural de Quillabamba por el acceso al Laboratorio de Microbiología y Fitopatología y así poder concluir la presente tesis.
- A mi compañera Thalia Esmeralda Tinta Montes, por sus palabras de aliento y apoyo incondicional.

ÍNDICE

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	xvi
I. PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN	3
1.1 Identificación del problema objeto de investigación	3
1.2 Formulación del problema	4
1.2.1 Problema general	4
1.2.1 Problemas específicos.....	4
II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	5
2.1 Objetivo general	5
2.2 Objetivos específicos	5
2.3 Justificación	6
III. HIPÓTESIS	7
3.1 Hipótesis general:	7
3.2 Hipótesis específicas:	7
IV. MARCO TEÓRICO	8
4.1 Origen y distribución del cacao	8
4.2 Taxonomía del cacao	8
4.3 Variabilidad	9
4.4 Descripción botánica	9

4.4.1 Raíz.....	9
4.4.2. Tallo	10
4.4.3 Hoja	10
4.4.4 Flor	10
4.4.5 Fruto.....	10
4.4.6 Semilla.....	11
4.5 Principales plagas	11
4.5.1 Moniliasis (<i>Moniliophthora roreri</i> (Cif y. Par))	11
4.5.2 Pudrición parda (<i>Phytophthora palmivora</i> (Bult)).....	12
4.5.3 Escoba de Bruja (<i>Moniliophthora perniciosa</i> (Stahel) Aime).....	12
4.5.4 Perforador de la mazorca del cacao (<i>Carmenta foraseminis</i> (Busck) Eichlin).....	12
4.6 Moniliasis del cacao	13
4.6.1 Etiología.....	13
4.6.2 Síntomas de la moniliasis.....	13
4.6.3 Ciclo biológico	14
4.6.4 Método de aislamiento de <i>Moniliophthora roreri</i>	15
4.7 Del agente de biocontrol	15
4.7.1 Clasificación taxonómica del Trichoderma.....	16
4.7.2 Morfología	16
4.7.3 Mecanismos de control biológico o biocontrol	17
4.7.4 Técnicas de aislamiento de <i>Trichoderma spp</i>	18

V. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	20
5.1 Tipo de investigación	20
5.2 Ubicación espacial	20
5.2.1 Ubicación política.....	20
5.2.2 Ubicación geográfica	20
5.2.3 Ubicación hidrológica	21
5.3 Ubicación temporal	21
5.4 Materiales y métodos	21
5.4.1 Materiales	21
5.4.2 Metodología	22
5.4.2.1 Aislamiento de <i>Moniliophthora roreri</i>	22
5.4.2.2 Crecimiento micelial de <i>Moniliophthora roreri</i> en diferentes medios de cultivo en cajas petri.....	25
5.4.2.3 Aislamiento de <i>Trichoderma spp.</i>	30
5.4.2.4 Desarrollo micelial de los aislados antagonistas (<i>Trichoderma spp.</i>).....	33
5.4.2.5 Determinación del porcentaje biocontrol de los agentes antagonistas frente al patógeno (<i>Moniliophthora roreri</i>).....	34
5.5 Análisis de datos	36
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	38
6.1 Aislamiento e identificación de <i>Moniliophthora roreri</i>.....	38

6.2 Crecimiento micelial de <i>Moniliophthora roreri</i> en diferentes medios de cultivo.....	49
6.3 Aislamiento e identificación de <i>Trichoderma</i> spp.....	57
6.4 Prueba para determinar el desarrollo micelial por día de los antagonistas <i>Trichoderma</i> spp.....	63
6.5 Biocontrol de nueve cepas de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Moniliophthora roreri</i> en prueba de enfrentamiento a nivel “in Vitro”.....	67
VII. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS.....	73
7.1 Conclusiones.....	73
7.2 Sugerencias.....	74
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	75

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. 10 nuevos grupos genéticos de cacao.	9
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Moniliophthora roreri</i> (Cif y Par).....	14

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍA

Fotografía 1. Colecta de muestras de moniliasis de cacao en Pan de Azúcar-Echarate en el departamento de Cusco.....	38
Fotografía 2. Desarrollo del raspado de la superficie de muestra momificada de la mazorca de cacao en arroz precocido. A parte frontal, B parte dorsal.	39
Fotografía 3. Aislado de <i>Fusarium spp.</i> (Hongo color rosado). A morfología macroscópica, B morfología microscópica.	40
Fotografía 4. Aislado de <i>Phytophthora spp.</i> (Hongo color blanco). A morfología macroscópica, B morfología microscópica	40
Fotografía 5. Aislado de <i>Trichoderma spp.</i> (Hongo color verde). A morfología ...	41
Fotografía 6. Muestra de cacao M-1 con signos y síntomas de moniliasis. A y B morfología macroscópica (b1, b2, b3) morfología microscópica de flora acompañante, (b4) morfología microscópica de <i>Moniliophthora roreri</i>	42
Fotografía 7. Aislamiento de <i>Moniliophthora roreri</i> de M-1. (A) morfología macroscópica B y C morfología microscópica en tinción de Azul de lactofenol...	43
Fotografía 8. Crecimiento de <i>Moniliophthora roreri</i> . A crecimiento en PDA y B crecimiento en agar jugo vegetal-cacao.....	44
Fotografía 9. Cultivo puro de monilia producto del aislamiento de las mazorcas enfermas.....	44

Fotografía 10. Tipos de esporas e hifas de <i>Moniliophthora roreri</i> vistas al microscopio óptico.	45
Fotografía 11. Características macroscópicas (De la A -E) de colonias, de diferentes días de crecimiento de <i>Moniliophthora roreri</i> de M-1.	46
Fotografía 12. Características microscópicas de <i>Moniliophthora roreri</i> A (3 días), B (6 días), C (9 días), D (12 días) y E (15 días) de colonias en diferentes días de crecimiento.	47
Fotografía 13. Crecimiento micelial de <i>Moniliophthora roreri</i> en diferentes medios con cuatro repeticiones representativas a los 12 días después de la A) Avena, B) Soja, C) Malta, D) PDA, E) Saboraud, F) VMA, G) VMA H) Extracto I) Vegetal. .	52
Fotografía 14. Colecta de muestras de suelo en el Distrito de Echarate-La Convención-	57
Fotografía 15. Morfología de las 9 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. con actividad antagonista a los 7 días de crecimiento A: Th 1, B: Th 2, C: Th 3, D: Th 4., E: Th 5, F: Th 6, G: Th 7, H: Th 8, I: Th 9.....	60
Fotografía 16. Características microscópicas de las 9 Cepas de <i>Trichoderma</i> spp. con actividad antagonista a los 7 días de crecimiento A: Th-1, B: Th- 2, C: Th- 3, D: Th- 4., E: Th- 5, F: Th- 6, G: Th- 7, H: Th- 8, J: Th- 9.....	61
Fotografía 17. A: <i>Trichoderma</i> 1 Sahuayaco B: <i>Trichoderma</i> 2 Palma Real, 48 horas después de la siembra.	65
Fotografía 18. <i>Trichoderma</i> spp. 6 Alcuza Alta, 70 horas después de la siembra.	66

Fotografía 19. A) Cultivo dual de cepa de *Trichoderma spp.* vs *Moniliophthora roreri*, izquierda *Moniliophthora roreri* derecha *Trichoderma spp.* 69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Localidades y codificación de los aislado de <i>Trichoderma spp.</i> en Echarate	31
Tabla N° 2: Grado de antagonismo de agentes de control biológico respecto a la competencia por sustrato propuesta por Bell et. al. (1982).....	36
Tabla N° 3: Tratamientos in vitro utilizados para determinar el potencial de biocontrol de <i>Trichoderma spp.</i> sobre el fitopatógeno <i>Moniliophthora roreri</i>	37
Tabla N° 4: Tukey para medios de cultivo para crecimiento micelial de <i>M. roreri</i> 50	
Tabla N° 5: Tukey al 5% para medios del crecimiento micelial de <i>Moniliophthora roreri</i>	54
Tabla N° 6: prueba de significación de Tukey al 5% para concentraciones en el crecimiento micelial de <i>Moniliophthora roreri</i>	54
Tabla N° 7: Tukey al 5% para crecimiento micelial los 12 días de siembra para la interacción de medio por concentración.	55
Tabla N° 8: Localidad y procedencia de aislados de hongos antagonistas de <i>Moniliophthora roreri</i>	58
Tabla N° 9: Características morfológicas macroscópicas típicas de cepas de <i>Trichoderma spp.</i>	59
.....	60
Tabla N° 10: Prueba de Tuckey para los promedios de desarrollo micelial por día de los antagonistas <i>Trichoderma spp.</i> a 28 °C. en la prueba “in Vitro” Letras	

diferentes indican medias estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) según prueba de Tukey.....	65
Tabla N° 11: Análisis de varianza (ANOVA) para la variable de porcentaje de inhibición.....	70
Tabla N° 12: Inhibición de <i>Trichoderma spp.</i> a <i>Moniliophthora roreri</i>	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 1: Características macroscópicas y microscópicas de <i>Moniliophthora roreri</i>	39
Cuadro N° 2: Aislamiento de muestra del muestreo 1	41
Cuadro N° 3: Resultados de las características macroscópicas y microscópicas de <i>Moniliophthora roreri</i>	48
Cuadro 4. Análisis de varianza (Anova) del crecimiento micelial de <i>Moniliophthora roreri</i> en diferentes medios de cultivo	50
Cuadro N° 5: Cuadro ordenado de tres medios de cultivo en tres concentraciones.	53
Cuadro N° 6: Análisis de varianza del crecimiento micelial de <i>Moniliophthora roreri</i> en diferentes medios de cultivo y concentraciones.	53
Cuadro N° 7: Diámetro de desarrollo micelial (mm.) por día de los antagonistas <i>Trichoderma spp.</i>	64
Cuadro N° 8: Análisis de varianza en D.C.A. para datos obtenidos a las 70 horas después de la siembra de desarrollo micelial (mm) por día de los antagonistas .	65

ÍNDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1. Crecimiento micelial en mm por día de <i>Moniliophthora roreri</i> a por tipo de medio de cultivo.....	51
Gráfico 2. Crecimiento micelial de <i>Moniliophthora roreri</i> en tres medios a tres concentraciones diferentes.....	55
Gráfico 3. Desarrollo micelial (mm.) de los biocontroladores nativos (<i>Trichoderma</i> spp.1,.....	64
Gráfica 4. Grado de micoparasitismo de 9 tratamientos (TA), correspondientes a cultivos duales de los aislamientos de <i>M. roreri</i> (Mx-1) frente a los distintos aislamientos de <i>Trichoderma</i> nativos (TA-1, TA-2, TA-3, TA-4, TA-5, TA-6, TA-7, TA-8, TA-9).....	69

ANEXOS

Anexo 1 Recolección de muestras para el aislamiento del patógeno en el Distrito de Echarate-Pan de azucar.....	80
Anexo 2 Diagrama de la preparación del agar-soja para 200 placas petri.....	81
Anexo 3 Diferentes medios de cultivo usados en el experimento “crecimiento micelial de <i>Moniliophthora roreri</i> ”	82
Anexo 4 Evaluación de crecimiento micelial en diferentes medios	83
Anexo 5 Evaluación de medios en diferentes concentraciones.....	86
Anexo 6 Visita del asesor MSc. Luis Justino Lizárraga Valencia.....	88
Anexo 7 Foto con la asesora PhD. Fanny Márquez Romero en el Laboratorio de la Universidad Intercultural de Quillabamba	89
Anexo 8 Crecimiento por día de <i>Trichoderma spp.</i>	90

Anexo 9 Análisis de varianza (Anova) para desarrollo micelial de <i>Trichoderma spp.</i>	91
Anexo 10 Tukey para desarrollo micelial de <i>Trichoderma spp.</i>	91
Anexo 11 Crecimiento radial de <i>M. roreri</i> en diferentes medios	92
Anexo 12 Análisis de Varianza (ANOVA) para crecimiento radial en diferentes medios.....	93
Anexo 13 Tukey crecimiento radial en diferentes medios	93
Anexo 14 Crecimiento en diferentes concentraciones.....	94
Anexo 15 Ficha de evaluación del porcentaje de inhibición de las cepas nativas de <i>Trichoderma spp</i> sobre la <i>Moniliophthora Rorer</i>	95
Anexo 16 Análisis de Varianza (ANOVA) para porcentaje de inhibición	101
Anexo 17 Tukey para porcentaje de inhibición.	101

RESUMEN

El presente estudio titulado **“EVALUACIÓN IN VITRO DEL POTENCIAL DE BIOCONTROL CON CEPAS DE (*Trichoderma spp.*) SOBRE (*Moniliophthora roreri*) DEL CACAO (*Theobroma cacao L.*) LA CONVENCIÓN-CUSCO”**, cuyo objetivo general es Evaluar el potencial de biocontrol in vitro con cepas de *Trichoderma* sobre *Moniliophthora roreri* del cacao del distrito de Echarate- La Convención-Cusco. La investigación se desarrolló a nivel in vitro y se empleó un diseño experimental completamente al azar con 10 tratamientos y 7 repeticiones, haciendo un total de 70 unidades experimentales el cual se efectuó mediante la técnica de enfrentamiento de cultivos duales **Meza (2008) y Howell (2003)**.

Se realizó la identificación macro y microscópicamente de una cepa de *Moniliophthora roreri* procedente de Pan de azúcar-Echarate-La Convención.

El mejor medio de cultivo se obtuvo con el medio: Soja- agar en una concentración Alta de 500 gr con un índice de crecimiento de 90 mm.

Se realizó la identificación macro y microscópicamente de nueve cepas del hongo *Trichoderma spp.* procedentes de: Sahuayaco, Palma real, Yomentoato, Alta Rosalinas, Ivochote, Ichiquiato A, Alcuzama alto, Ichiquiato B y Alcuzama bajo.

Todos los *Trichodermas spp.* tuvieron un crecimiento micelial superior a *Moniliophthora roreri*.

Los aislados nativos Th-7 y Th-4 con 51.07%, y 48.57% respectivamente son antagonistas con una alta capacidad de antagonismo, competencia por espacio, micoparasitismo e inhibición del crecimiento del patógeno M-1 de *Moniliophthora roreri*.

Todas las cepas de *Trichoderma* presentaron un PICR superior al 20%, lo cual demuestra una inhibición potencial de biocontrol y agentes antagónicos eficientes contra el fitopatógeno.

Palabras clave: Biocontrol, *Trichoderma*, nativo y fitopatógeno.

INTRODUCCIÓN

En el Perú, el cultivo de cacao (*Thebroma cacao L.*) es una actividad con gran impacto social y económico.

La producción de cacao en el Perú alcanzó 15 mil toneladas, con los principales departamentos productores como: San Martín, Cusco, Amazonas, Ayacucho, Junín, Ucayali, Huánuco, Pasco y Madre de Dios que cada año aumentan su producción.

Esto indica que la producción de cacao alcanzó una extensión mayor de 1 700 000 hectáreas de cultivo y que genera ganancias por encima de los 900 millones de dólares, que se exportan anualmente.

La agricultura en la provincia de La Convención posee problemas graves en la gestión de sanidad, motivo por el cual la producción en el campo está restringida por enfermedades y plagas, la utilización de agentes de control biológico se considera una adecuada opción económica; ya que su costo es inferior que un producto químico, así mismo, cabe resaltar que el incremento en las frecuencias de uso de estos productos no producirá cuerpos resistentes, porque se dirige a objetivos específicos, de este modo su espectro de acción estrecho permite que no cause daños a insectos benignos.

La presencia de moniliasis en los frutos del cacao dificulta la producción en calidad de mazorca,

las enfermedades son un problema importante en la producción de granos de cacao, que puede provocar hasta el 90% de la pérdida de la cosecha cada año.

Como respuesta positiva y específica al movimiento global de la limpieza del planeta, las acciones de agricultura orgánica se han expandido e implementado mediante el uso de microorganismos antagónicos competitivos en los últimos años, que impiden

la incidencia de enfermedades en aquellos cultivos con gran demanda por sus características en el mercado y así cumplir con las demandas en el extranjero.

Esta investigación tiene como propósito principal la difusión del agente de biocontrol, para dar solución a los problemas ocasionados por la moniliasis en el género *Theobroma*, que es uno de los principales cultivos del área, enmarcado en una agricultura orgánica y debido a ello optimizar la calidad de vida del cacaotero convenciano.

La Autora.

I. PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN

1.1 Identificación del problema objeto de investigación

Se considera a la producción del cacao como uno de los primordiales rubros de explotación del Perú, debido a sus adecuados caracteres organolépticos que tiene como: sabor, olor, color, textura y temperatura, con una acogida grandiosa en el mercado mundial, no obstante; hay algunas enfermedades que pueden afectar seriamente estas características, en especial a los órganos directos, como la mazorca, en particular estas enfermedades se producen por hongos (*Moniliophthora roreri*), para el control de estas enfermedades fúngicas, las personas han optado por el control químico y el manejo integrado para utilizar sustancias químicas que afectarán el medioambiente, el suelo y los seres humanos a largo plazo; pero lo más importante, biocontroladores de la fauna coexistente con los hongos.

La moniliasis (*Moniliophthora roreri*), perjudica de forma directa al fruto en toda fase de su desarrollo, provocando importantes pérdidas de producción, perdidas en la calidad del cacao y en general pérdidas monetarias de los productores. Este se convierte en el mayor componente restrictivo en la producción del cacao.

En la provincia de la Convención, la producción de cacao genera un medio de obtener ingresos para estas familias, ya que se tiene, una diversidad de cualidades y características importantes de sabor y aroma.

El daño de Moniliasis genera bajos rendimientos de este cultivo, siendo así, una limitante de mayor importancia, por ello, es de mucha relevancia poseer una técnica de control, con armonía en el manejo y resguardo del medioambiente y que, además, sea de fácil acceso.

A pesar de optar por diversas acciones de manejo integral, el aumento de los fitopatógenos, la reducción de la productividad y los elevados costos de producción siguen siendo evidentes.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿Cuál es el potencial de biocontrol in vitro con cepas de *Trichoderma* sobre *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis del cacao?

1.2.1 Problemas específicos

¿Cuántas especies de hongos fitopatógenos se encontrarán en frutos de cacao en Echarate?

¿Cuál es el índice de crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en diferentes medios de cultivo?

¿Cuántas cepas de *Trichoderma* se encontrará en muestras de suelo provenientes de sistemas agroforestales de cacao en Echarate?

¿Cuál es el índice de desarrollo micelial de cepas *Trichoderma spp* encontrados en muestras de suelo?

¿Cuál será el porcentaje de biocontrol, de las nueve cepas nativas de *Trichoderma spp* sobre la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao?

II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

2.1 Objetivo general

- ✓ Evaluar el potencial de biocontrol in vitro con cepas de *Trichoderma* sobre *Moniliophthora roreri* del cacao del distrito de Echarate- La Convención-Cusco.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Aislar e identificar mediante características morfológicas a los hongos fitopatógeno encontrados en frutos de cacao de Echarate.
- ✓ Determinar el índice de crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri*, en diferentes medios de cultivo.
- ✓ Aislar e identificar mediante características morfológicas cepas del hongo antagonista *Trichoderma spp.*, a partir de muestras de suelo, provenientes de 9 sistemas agroforestales de cacao de Echarate.
- ✓ Determinar el crecimiento micelial de *Trichoderma spp.* por día a nivel "in Vitro".
- ✓ Determinar el porcentaje de biocontrol de nueve cepas nativas de *Trichoderma spp.* sobre 1 cepa nativa de moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao, proveniente de Echarate.

2.3 Justificación

La utilización de microorganismos de rizósfera es una buena alternativa para el control de enfermedades fúngicas, se enfatiza en el hongo *Trichoderma spp.*, por ser un hongo beneficioso que puede controlar otros hongos que provocan daños para las plantas. Su aplicación nos permite la interacción armoniosa con el medioambiente y nosotros mismos.

Este proyecto reveló la presencia de cepas de *Trichoderma spp.*, así mismo tienen el potencial de control biológico de *Moniliophthora roreri*. La investigación realizada servirá de guía a los mecanismos estratégicos para manejar de manera efectiva y adecuada las enfermedades en los cultivos, aumentando así la producción, la calidad y evitando importantes pérdidas económicas.

Económico: Las prácticas de biocontrol con antagonistas reducen notoriamente el costo de producción, esta técnica prevé la resistencia de plagas, y cuando se instala en el campo de control es permanente, además de prever la emergencia o reaparición de plagas secundarias, también tiene el beneficio adicional de reducir los costos de control.

Social: Esta enfermedad ha causado enormes pérdidas económicas, por lo cual el uso de biocontrol ayuda a todas familias productoras en un mejor manejo de producción sostenible.

Ambiental: La práctica de biocontrol trae un impacto ambiental positivo, para mantener un equilibrio, pérdida de especies de plantas silvestres y conservación del ecosistema.

Por tanto, la utilización de antagonistas para controlar plagas y enfermedades agrícolas brinda datos valiosos, que no solo puede reducir las altas pérdidas

económicas, sino también reducir el uso excesivo de plaguicidas que tienen consecuencias negativas en la salud y el medioambiente.

III. HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis general:

- Las cepas de *Trichoderma* sobre *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis en estudio pueden que presenten un potencial de biocontrol in vitro.

3.2 Hipótesis específicas:

- Al menos existe más de una especie de fitopatógenos en frutos de cacao.
- Es posible que *Moniliophthora roreri* presente diferencias de crecimiento cuando sea expuesto a diferentes medios de cultivos.
- Con las muestras de suelo provenientes de cada zona de Echarate agroforestales de cacao se encontrarán cepas de *Trichoderma*.
- A nivel in vitro será posible determinar el crecimiento micelial de los agentes de biocontrol.
- Todos los *Trichodermas* aislados de Echarate ejercen antagonismo sobre *Moniliophthora roreri*.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 Origen y distribución del cacao

Motamayor (2002), señala que el género *Theobroma* a través de caracterizaciones moleculares es una especie que radica en América Central, las cuales fueron descendientes de las poblaciones de Suramérica.

Se indica que el origen del cacao (*Theobroma cacao L.*) se encontraría en el norte peruano; no obstante, la presencia de especies nativas y silvestres esparcidas en las regiones central y sur del alto Amazonas apoyará la hipótesis de que los orígenes incluyen las regiones central y sureste peruano, las cuencas del río Urubamba, Ucayali y Huallaga.

4.2 Taxonomía del cacao

García, (1987), como se citó en **Silva (2015)** el género *Theobroma* está constituido por más de 20 especies; lo clasifica jerárquicamente con la siguiente categoría taxonómica:

Reino: Plantae

División: Fanerógamas

Subdivisión: Angiosperma

Clase Dicotiledóneas: Orden Malvales

Familia: Sterculiaceae

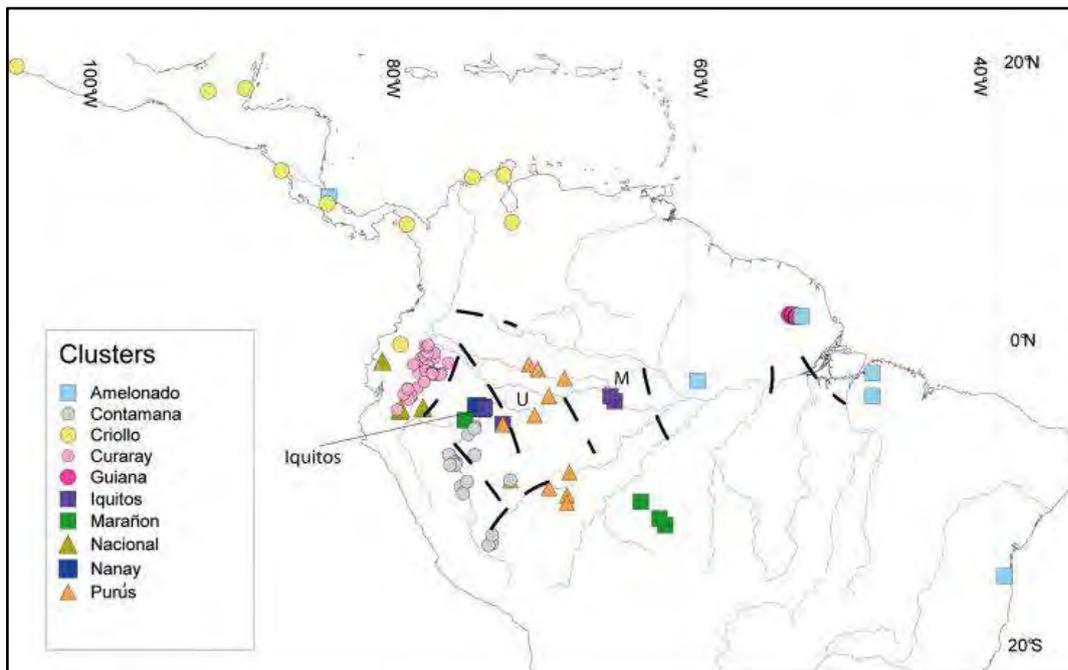
Género: *Theobroma*

Especie: *Theobroma cacao L.*

4.3 Variabilidad

Motamayor et al., (2008), lograron diferenciar 10 grupos genéticos; diferenciados por ubicación geográfica, tal como se muestra en la Figura 1, y son los siguientes: Amelonado, Contamana, Criollo, Guraray, Guiana, Iquitos, Marañón, Nacional, Nana y Purús.

Figura 1. 10 nuevos grupos genéticos de cacao.



Fuente: Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L.) Motomayor 2008.

4.4 Descripción botánica

Arvelo et al., (2017), describen las características del género del *Theobroma* como una planta perenne. De corteza oscura, gris o color café, con ramas cafés y finamente vellosas.

4.4.1 Raíz

Arvelo et al., (2017), mencionan que presenta una raíz principal, vigorosa y grande con una profundidad de hasta 3 metros, esto depende al piso

ecológico, suelo y condiciones ambientales. También presenta raíces primarias y secundarias. El tipo de reproducción influye en el sistema radicular.

4.4.2. Tallo

Arvelo et al., (2017), indican que el tallo es erecto, presenta ramificaciones que determinan la disposición de la planta. El color depende a la variedad, puede ser gris castaño, café verduzco con 3 o 4 ramas abiertas en forma de brazos que forman una horqueta la cual ayuda a sostener los frutos.

4.4.3 Hoja

Arvelo et al., (2017), las hojas tienen características sencillas, oblongas, coriáceas, brillantes, de longitud entre 25 y 35. Dependiendo de la variedad van del verde oscuro al verde claro, son muy frágiles y se dañan fácilmente con la luz solar y se afectan por las condiciones del clima. Por lo tanto, las plantas necesitan de los cuidados de sombra en el primer año.

4.4.4 Flor

Arvelo et al., (2017), las flores se insertan en el tronco de las ramas principales del árbol, por ello las flores se presentan en cojines florales. Presenta flores pentámeras y sostenidas por un pedicelo largo y delicado de uno a dos centímetros de longitud. Tiene cinco sépalos que varían de blanco a rosa claro que se extiende en forma de estrella. Los cinco pétalos están insertados en la corola.

4.4.5 Fruto

Arvelo et al., (2017), presenta fruto en forma de baya más conocida como mazorcas drupáceas, son de forma oblonga a fusiformes, el peso de la mazorca varía de 200 a 1 kilo, donde se puede encontrar de 20 a 50 almendras

o granos de forma redondeada o aplanada, cubierta en una capa de pulpa de mucilago, amarillento-blanco, con un sabor agridulce y un aroma agradable.

4.4.6 Semilla

Arvelo et al., (2017), mencionan que las semillas tienen un color púrpura o blanduzco, en forma de almendras, presentan un aroma floral intenso con un sabor amargo. Contiene gran cantidad de grasa, es la materia prima que a través de procesos sirve para la elaboración del chocolate.

4.5 Principales plagas

Arvelo et al., (2017), mencionan que la producción y productividad se ve limitada por la presencia de enfermedades, por ello es necesario tener un manejo y control adecuado. Estudios recientes en zonas principales productoras de cacao, señala la presencia de distintas enfermedades, siendo las más importantes la “Pudrición parda” “Moniliasis” y “Escoba de bruja” y también **García (2010)**, indica que la presencia de Carmenta se considera como una plaga importante.

4.5.1 Moniliasis (*Moniliophthora roreri* (Cif y. Par))

Perez-vicente (2018), indicó que la Moniliasis constituye una enfermedad con mucha relevancia del género *Theobroma* que ataca a las mazorcas en cualquiera de sus estados de desarrollo. Se evidencian los primeros síntomas en los 15 a 15 días posterior a la infección del fruto.

En frutos menores de 3 meses presentan gibas y deformaciones que causa la pérdida de todo el grano. En frutos con madurez fenológica presenta unas manchas de color marrón cubriendo parte de la mazorca, posteriormente sobre esta mancha pasada unos días se presenta una felpa pulverulenta blanca que posteriormente esta emite polvo y permite que las esporas de hongos se multipliquen, y cuando caen sobre frutos sanos y en humedad, volverán a formar todo el ciclo mencionado

y seguirán provocando daños. Todo ciclo de enfermedad dura entre sesenta y setenta días en promedio.

4.5.2 Pudrición parda (*Phytophthora palmivora* (Bult))

(Arvelo et al., 2017), mencionan que esta enfermedad se ocasiona por el hongo patógeno *Phytophthora palmivora*. Ataca principalmente a la mazorca, estos tienen manchas de color marrón oscuro que puede cubrirlo por completo, pero a partir de la parte inferior de la mazorca, y está caracterizada por un borde claro de la mancha. Los síntomas también se pueden ver en hojas, troncos e incluso raíces.

La diferencia principal con la Moniliasis es que únicamente ataca a las mazorcas, y, por otro lado, la *Phytophthora* ataca toda la planta de cacao.

4.5.3 Escoba de Bruja (*Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime)

Perez-vicente (2018), menciona que la presencia de Escoba de bruja en el género *Theobroma* es considerada como la enfermedad endémica, es considerada como la enfermedad más importante, con su origen en el valle alto del Amazonas. La enfermedad cuyo agente causal es *Moniliophthora perniciosa*, ataca al fruto, hojas, cojines florales y brotes, sin embargo, el daño más severo se da en los brotes apicales, los cuales generan un engrosamiento anormal que dan la apariencia de una “escoba de bruja”.

4.5.4 Perforador de la mazorca del cacao (*Carmenta foraseminis* (Busck)

Eichlin)

(Arvelo et al., 2017), indican que este insecto causa daños directos en el fruto, pueden ser en frutos menores o con madurez fisiológica, el insecto deposita individualmente sus huevos en los surcos de la mazorca. Una vez que el huevo eclosiona, las larvas ingresarán formando pequeñas galerías en el fruto. Las larvas

comenzarán a alimentarse de la placenta y el mesocarpio del fruto del “cacao”. Al finalizar esta fase las larvas maduran y crean una salida al exterior, cuando el adulto emerge del capullo sale al exterior, dejando un orificio que permite el ingreso de patógenos que generan un daño más significado en las semillas, los cuales afectan a las cualidades sensoriales.

4.6 Moniliasis del cacao

4.6.1 Etiología

FHIA (2012), da a conocer que *Moniliophthora roreri* presenta dos estilos de vida, una fase donde se alimenta de tejidos vivos teniendo un estilo de vida biotrófico donde posteriormente estas cambian a un estilo de vida necrotrófico.

Clasificación taxonómica de la monilia

Moreira, 2004 como se citó en **Silva (2015)** Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Basidiomycetes.

Subclase: Agaricomycetidae

Orden: Agaricales

Familia: Marasmiaceae

Género: *Moniliophthora*

Especie: *Moniliophthora roreri*

4.6.2 Síntomas de la moniliasis

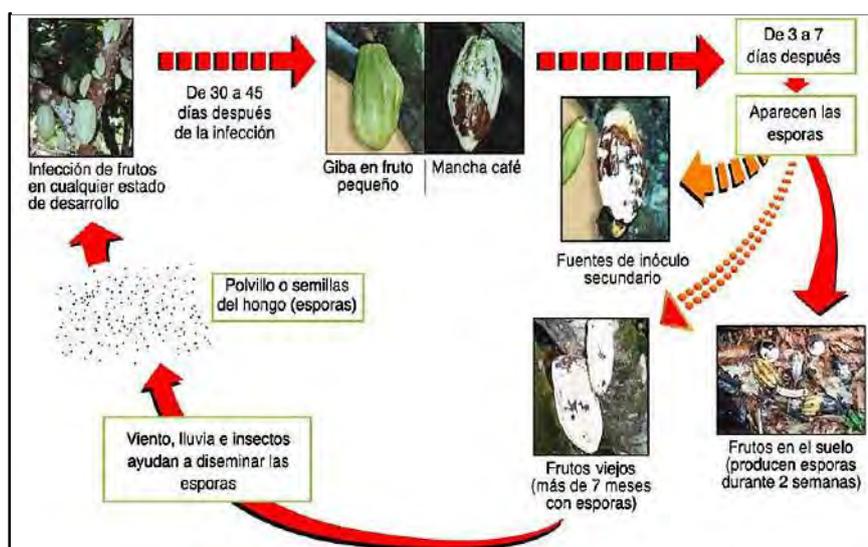
Cerrón (2012), el patógeno infecta al fruto lo cual genera una secuencia de síntomas, estas se presentan primordialmente en las primeras etapas de progreso de las mazorcas, el primer indicio de infección; son las presencias de puntos en forma de manchas de un color aceitoso.

Pérez-Vicente (2018), indica que presenta síntomas en el fruto de “cacao” como manchas aceitosas, en frutos menores se presenta gibas y tumefacciones, también presentan manchas cafés irregulares en los tejidos afectados, después del tiempo de infección aparece una capa blanca que envuelve al fruto más conocido como “momificación”.

4.6.3 Ciclo biológico

Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) (2012), reporta que el ciclo se ve influenciado por las condiciones climáticas, inicia cuando la humedad ambiental es baja, las fuentes de inóculo que pueden ser mazorcas cosechadas que fueron dejadas en las parcelas o frutos viejos en estado de momificación, los cuales se conservan su viabilidad durante 8 a 9 meses donde se generan millones de esporas que luego son diseminadas por lluvia, viento o insectos, y se depositan en la zona de las hojas y frutos en todo estado de desarrollo. De 30 a 45 días después de la infección expresa los síntomas primarios como son manchas aceitosas, gibas y tumefacciones en los frutos finalmente se momifican.

Figura 2. Ciclo biológico de *Moniliophthora roreri* (Cif y Par)



Fuente: Fundación Hondureña de Investigación Agrícola, [FHIA], (2012).

4.6.4 Método de aislamiento de *Moniliophthora roreri*

Barros y Sanchez (1979), describen el método de desinfección superficial de la mazorca con alcohol al 40% por un minuto y posteriormente, con hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto. Se frota la mazorca, y luego se lava con alcohol y flamea. Después de esta desinfección, se cortan pequeños trozos y se desinfectan con hipoclorito al 1% durante un minuto y se transfirieren a medio PDA.

Suarez (2006), describe el método de aislamiento aplicando una modificación a métodos anteriores donde los aislamientos se realizaron a partir de mazorcas infectadas por *Moniliophthora roreri* tomando trozos de 2 cm x 2cm, los cuales se lavan con agua para más tarde ser expuestos a agentes desinfectantes como hipoclorito de sodio al 2,5 y 3%, durante 2 minutos, y alcohol al 60% durante 3 minutos.

González y Roble (2014), describen el método de desinfección que consiste en realizar un raspado de frutos esporulados en condiciones de laboratorio, dispersando esporas en medio de cultivo PDA reforzado con una solución de Sulfato de Gentamicina. Procediendo a dispersar esporas con ayuda de un pincel estéril, realizando de esta manera la siembra en platos Petri con medio de cultivo PDA, pH 5.5 y suplementado con Cicloheximida 3% y Cloranfenicol 3%.

Villamil et al., (2012), describe el método de desinfección utilizando una aguja previamente esterilizada, se toma micelio de la mazorca completamente esporulada en condiciones de laboratorio y se siembra en cajas con medio de medio de cultivo PDA, con un pH 5.5 y suplementado con 800 µL de Sulfato de Gentamicina.

4.7 Del agente de biocontrol

Villegas (2004), manifiesta que por medio de estudios en su estructura y características se clasificó como gasteromiceto y se encuentra entre los hongos que

presenta un potencial como antagonista. Siguiendo estudios se han enfocado en descubrir sus cualidades en el control biológico para los cultivos agrícolas, teniendo más uso en la agricultura actual.

El género *Trichoderma spp.* se encuentra en la rizosfera y en otros medios. Por las características que presenta se ha utilizado como agente de biocontrol frente a fitopatógenos reemplazando así a los fungicidas. Su adaptabilidad hace que esté distribuido ampliamente por el mundo especialmente en suelos con abundante materia orgánica por lo que están clasificados en grupos de hongos lignícolas, hipogeos y depredadores.

Benítez et. al., (2004), estos autores describen al género *Trichoderma spp.* como un potencial de biocontrol debido a su amplia distribución por el mundo, por su habilidad de adaptabilidad a diferentes estados medioambientales y sustratos, presentar virulencia contra diferentes fitopatógenos y actuar como defensa en el desarrollo de las plantas.

4.7.1 Clasificación taxonómica del Trichoderma

El hongo se clasifica taxonómicamente de esta manera, **Argumedo (2004)**.

Reino: Myceteae

División: Eumycota

Subdivisión: Ascomycotina

Clase: Eufungi

Orden: Hyphocreales

Familia: Hypocreales

Género: *Trichoderma*

4.7.2 Morfología

Fernández-Larrea, (2003) menciona que los hongos del género *Trichoderma* son compatibles y eficientes gracias a su adaptabilidad al medio ambiente, lo que permite

el manejo como agente de biocontrol frente a patógenos que causan pérdidas significativas.

4.7.3 Mecanismos de control biológico o biocontrol

Fernández-Larrea, (2003) menciona que estos antagonistas presentan sistemas de acción que ayudan a mitigar el avance de patógenos. Entre los primordiales mecanismos se encuentra, competencia directa (territorio y nutriente), inhibición mediante antibióticos (antibiosis) y por micoparasitismo, precisar con exactitud los mecanismos que participan en el proceso antagonista-patógeno es difícil de determinar, puesto que no poseen un solo modo de acción, ya que pueden interactuar con múltiples mecanismos al mismo tiempo, siendo esta una característica importante como agente de biocontrol. Si el antagonista tiene múltiples modos de acción, puede reducir el riesgo de que los patógenos desarrollen resistencia. Al utilizar una combinación de antagonistas con diferentes modos de acción, también se reduce este riesgo de resistencia.

4.7.3.1 Micoparasitismo

Benítez et al., (2004), describen que el micoparasitismo comprende un ataque inmediato de un hongo a otro hongo, siendo un procedimiento con mucha complejidad que implica eventos continuos, incorporando la identificación, el ataque, penetración y asesinato del anfitrión. *Trichoderma* spp. podría jugar un efecto de control biológico directo parasitando varios hongos, manifestando otros hongos y creciendo hacia ellos. La teledetección se debe en parte a la expresión secuencial de CWDE, principalmente proteasas, glucanasas y quitinasas. El modo de inducción es diferente para una cepa de *Trichoderma*. Se cree que los hongos secretan exoquitinasas de forma constitutiva en niveles bajos. Cuando las quitinasas degradan paredes celulares de los hongos, liberan oligómeros que inducen exoquitinasas, y comienza el ataque.

Infante et al., (2002), tienen por definición del micoparasitismo en una simbiosis antagonista entre organismos, de forma general implica enzimas extra celulares de la quitinasas y la celulasa, e incumbe a la degradación de la estructura de la pared celular del hongo parásito. A lo largo del proceso de micoparasitismo, el Trichoderma crece hacia el huésped, a menudo se enrolla sobre él y ocasionalmente lo penetra.

Harman (2000), sostiene que el micoparasitismo que tiene Trichoderma spp. ha sido considerado durante mucho tiempo un importante mecanismo de acción del biocontrol. Este es un procedimiento complicado que implica el crecimiento tropical del biocontrol.

4.7.3.2 Antibiosis

Infante et al., (2002), se describen diversas especies de Trichoderma spp. Son producidos metabolitos volátiles y no volátiles, algunos de ellos interactúan con la membrana plasmática de los huéspedes e inhiben el desarrollo de estos microorganismos. Tales sustancias inhibidoras son calificadas como “antibióticos”.

4.7.3.3 Antagonismo

Infante et al., (2002), definen que los antagonistas mitigan daños causados por las enfermedades, en suelos con buena disponibilidad de humedad dando como resultado un incremento de población del antagonista. Para la obtención de este propósito, los microorganismos benéficos tienen diversas capacidades que les posibilitan ejercer su regulación biológica. Estos atributos, junto con la habilidad de reproducirse en grandes cantidades, son uno de los factores más importantes para su elección como agentes de control biológico.

4.7.4 Técnicas de aislamiento de *Trichoderma spp*

Suarez y Rangel (2013), describen que con muestras de suelo obtenidas de los cultivos de cacao se realizan diluciones seriadas hasta 10⁻⁴. Se siembran en

superficie 100 µl de la dilución 10⁻³ para hongos en agar PDA con antibiótico (Gentamicina 2 ml/lit), pH 5.5 y se incuban a 28 °C.

Arnold et. al., (2000), describen que con muestras de corteza se realizan cortes de 5x5 mm del parénquima del cilindro vascular. En las muestras de tejido foliar se realizan cortes de 5x5 mm en el pecíolo, así como en la parte basal, media y apical con porción de nervadura central y lámina foliar. Para las muestras de frutos se retira el epicarpio y se realizaron cortes de 5x5 mm de la parte apical, basal y media del fruto.

Obtenidos los explantes de cada tejido, se procede a realizar la desinfección tratándolos por separado, iniciando con Etanol al 70 % durante 30 segundos e Hipoclorito de Sodio al 2% durante 5 minutos, enjuagando con agua destilada estéril de dos a tres veces al final de cada desinfección.

Los explantes se secan en papel toalla estéril en cabina de flujo laminar y luego se incuban a 28°C.

V. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

5.1 Tipo de investigación: Exploratorio

5.2 Ubicación espacial

Fase campo: Sahuayaco, Yomentoato, Alto Alcuzama, Palma real, Bajo Alcuzama, Ichiquiato, Ivochote y Alta Rosalina.

Fase laboratorio: Laboratorio de fitopatología y microbiología de la Universidad Intercultural de Quillabamba.

5.2.1 Ubicación política

Región: Cusco

Provincia: La Convención

Distrito: Santa Ana

Lugar: Quillabamba-Universidad Nacional Intercultural de Quillabamba

Laboratorio: Fitopatología y microbiología.

5.2.2 Ubicación geográfica

Altitud: 990 msnm

Latitud: 12° 51' 21"

Longitud: 72° 41' 30"

Zona de vida: Bosque seco sub tropical (Bs-St)

Temperatura: 24°C

Humedad Relativa: 75%

5.2.3 Ubicación hidrológica

Cuenca: Rio Vilcanota

5.3 Ubicación temporal

La investigación se realizó entre marzo a octubre de 2021.

5.4 Materiales y métodos

5.4.1 Materiales

a. Material biológico

- Nueve aislamientos de *Trichoderma spp.*
- Una cepa de *Moniliophthora roreri*

b. Materiales y equipos de campo

Para las salidas a campo y recolección de muestras se utilizaron:

Bolsas de polipropileno, etiquetas, balde, cinta adhesiva, picos, palas, cámara fotográfica y GPS.

c. Materiales de laboratorio

Equipos

Autoclaves, refrigerador, destilador, microondas, cámara de bioseguridad, placas petri, cocinas eléctricas, vernier digital, microscopio óptico, balanza analítica.

Materiales

Vasos Baker de 50 ml, 1000 ml y 2000 ml, asa de siembra en aro, asa de drigalski, espátula, pizeta, porta objeto, lámina, hornilla eléctrica, papel toalla, cinta adhesiva, cubre objeto, lámina, matraz Erlenmeyer de 500 ml., papel crack, papel aluminio, gradillas, tubos de ensayo, algodón, hilo pabilo,

mascarillas, guantes, plumón indeleble azul, frascos de penicilina, microtubos, bisturí, saca bocado de 5 mm, probeta de 25 mililitros de plástico y probeta de 1000 mililitros de vidrio

Insumos y reactivos

Lejía 1 %, alcohol 96 %, agua destilada, ácido láctico, hipoclorito de sodio, Gentamicina, Sulfato, agua destilada estéril, cloruro de sodio, Agar Sabouraud Dextrosa, Agar papa dextrosa, azul de lacto fenol Lugol, frutas y verduras.

d. Materiales de gabinete

Laptop, calculadora, USB y juego de reglas.

5.4.2 Metodología

5.4.2.1 Aislamiento de *Moniliophthora roreri*

Para el aislamiento del patógeno se realizó en 2 fases: fase de campo y de laboratorio.

Fase campo

5.4.2.1.1 Recolección de muestras

Cepa de *Moniliophthora roreri*

En la finca de la zona cacaotera de Pan de Azucar-Echarate entre febrero a marzo se seleccionaron árboles colectando muestras de frutos de cacao chuncho e híbrido con síntomas y signos evidentes de moniliasis. Cada fruto se envolvió en papel toalla y se colocó por separado en bolsa de polipropileno debidamente marcada e identificada con fecha, lugar, número de muestra y/o número de lote. Luego se llevó las muestras al Laboratorio de Microbiología de La Universidad Nacional Intercultural de Quillabamba.

Fase laboratorio

5.4.2.1.2 Manipulación de muestras

Para el aislamiento de *Moniliophthora roreri* se utilizó la siguiente metodología.

Se utilizó la metodología de **Suarez y Rangel (2013)** con algunas modificaciones, la cual consiste en seleccionar frutos con síntomas característicos de esta enfermedad, se colocó el fruto del cacao en una mezcla de hipoclorito de sodio al 2,5 % por 3 minutos y luego se usó un cuchillo estéril para dividir la muestra por la mitad para evitar el contacto entre el cuchillo y la parte interna del cacao. Se empleó pinzas estériles para quitar 0,5 cm de porciones del endocarpio que esté enfermo. Se desinfectó con hipoclorito de sodio al 2,5 % remojándolos a lo largo de 3 minutos y luego se sumergió en agua esterilizada por 2 min. para suprimir los residuos de hipoclorito de sodio.

La parte del endocarpio esterilizado se colocó en placas de agar papa dextrosa y a cada placa con medio de cultivo se fortaleció con 2 mililitros de solución de Gentamicina Sulfato 80 mg / 2 ml y se dejó en incubación durante 12 días al 25 °C en oscuridad.

5.4.2.1.3 Identificación de *Moniliophthora roreri* mediante características morfológicas.

Para identificar se empleó la clave taxonómica de **Barnett & Hunter (1999)**, así mismo se dispusieron la evaluación de características macroscópicas mencionadas por **Phillips et al., (2006)**, tales como el borde, colores, ausencia o presencia de sectores, tipo de micelio (texturas) y tipo de esporulación. La determinación de estos parámetros se realizó en 13 días.

✓ Identificación de *Moniliophthora roreri*

Se usó los parámetros cualitativos descritos por **Phillips, et al., (2006)**.

Características macroscópicas:

Tipos de esporulación:	Uniforme, disperso, uniforme con anillos centrales, uniforme con anillos terminales, anillos en toda la colonia.
Borde de la colonia:	Entero, plumoso y ondulado.
Textura de la colonia:	Aterciopelada, algodonosa, estriada, polvosa y Afelpada.
Sectores:	Presencia y ausencia
Color:	Café claro, café oscuro- café claro-blanco, café claro blanco, Crema-café claro-blanco, café oscuro-crema-blanco, café oscuro-blanco, Crema-café oscuro-café claro-blanco.

Características microscópicas:

Forma de las esporas:	Globosas, sub globosas y elípticas
-----------------------	------------------------------------

Método de postulados de Koch.

Para la seguridad que el patógeno (*Moniliophthora roreri*) es el agente causal de esta enfermedad, se consideró los cuatro postulados de Koch; para comprobar la hipótesis de que este patógeno (*Moniliophthora roreri*) constituye el motivo de esa enfermedad (moniliasis).

Primer postulado: A partir de frutos con signos y síntomas típicos de monilia ubicado sobre plantas afectadas de cacao provenientes de la parcela de Pan de Azúcar.

Las muestras se sometieron a desinfección con hipoclorito de sodio de un 2 % a lo largo de 3 min.

Segundo postulado: Se preparó agar jugo vegetal-cacao que fue esterilizado previamente, después del plaqueado y solidificado se colocó una rodaja de agar con una monilia por placa. Se incubaron las placas sembradas a 28 °C a lo largo de 21

días, después en conformidad con características de las colonias se repicó y purificó para su conservación en tubos de ensayo en refrigeración.

Tercer postulado El patógeno (*Moniliophthora roreri*) fue cultivado en placas petri conteniendo medio jugo vegetal-cacao estéril e incubados a 28 °C por 15 días.

Para la inoculación artificial del patógeno en campo se identificó tres árboles con mazorcas de cacao (*Theobroma cacao L.*) visiblemente sanas para proceder con la desinfección. La desinfección externa se realizó sumergiendo al fruto del cacao en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % a lo largo de 4 min. y lavándolos sucesivamente dos veces con agua destilada pre esterilizada. Para el cacao se realizaron 2 orificios (60 mm de diámetro; 50 mm adentro), en los que se introdujo el inóculo de un cultivo puro de *Moniliophthora roreri* de 21 días. El diámetro de la lesión se monitorizó cada 24 horas.

Cuarto postulado: Se realizó un segundo aislamiento a partir de la mazorca enferma, y se compararon sus características (signos y síntomas) con las aisladas inicialmente, tal como se muestra en la Fotografía 9.

5.4.2.2 Crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en diferentes medios de cultivo en cajas petri.

Esta prueba se realizó para la determinación del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* para el enfrentamiento con *Trichoderma spp.* en la prueba de Potencial de biocontrol. (Anexo 3).

Preparación de los medios de cultivo:

- **PDA** (potato dextrosa agar): Para la preparación de un 1 litro de medio, se utilizó 250 gramos de papas peladas (*Solanum tuberosum*), fueron cortadas en trozos pequeños y se hirvió en 1000 mililitros de agua destilada, posteriormente se colocó el caldo en un matraz Erlenmeyer, y fue agregado 15 gramos de

dextrosa y 15 gramos de agar, se esterilizó por 30 min. a unos 121 °C/15 lb de la presión.

- **Medio de Soya:** Para la preparación de 1 litro de medio, se utilizó 250 gramos de soja (*Glycine max*) remojada, se hirvió por 15 min. Soya en 1 litro de agua destilada, posteriormente se procedió a colar el agua hervida a un matraz Erlenmeyer y se añadió 15g de agar, es mezclado correctamente y se esterilizó en autoclave a 121 °C/15 Lbs de la presión.
- **Medio de Malt Extracto Agar Base:** Suspender 50 gr de Malt Extracto Agar Base en 1000 mililitros de agua destilada, es mezclado correctamente y esterilizado en autoclave a 121 °C/15 Lbs de presión.
- **Medio de Sabouraud Dextrosa Agar:** Suspender 65 gr de Sabouraud Dextrosa Agar en 1000 mililitros de agua destilada, es mezclado correctamente y esterilizado en autoclave a 121 °C/15 Lbs de presión.
- **Medio de Avena:** Para la preparación de 1 litro de medio, se utilizó 40 gramos de Quaker, se hirvió por 15 min en 1 L. de agua destilada, después se procedió a colar el agua hervida a un matraz Erlenmeyer y se añadió 15g de agar, es mezclado correctamente y esterilizado en autoclave a 121 °C/15 Lbs de presión.
- **Medio de Vegetales:** Se utilizó 70 gramos de apio (*Apium graveolens*), 70 gr de tomate (*Solanum lycopersicum*), 70 gr de zanahoria (*Daucus carota*), 70 gr de beterraga (*Beta vulgaris*), 70 gr de lechuga (*Lactuca sativa*), 70 gr de espinaca (*Spinacia oleracea*), 70 gr perejil (*Petroselinum crispum*), se hierve por unos 30 min. en 1 litro de agua destilada, posteriormente se cuela el agua hervida a un Erlenmeyer y se agrega 15 gramos de agar, es mezclado correctamente y esterilizado en autoclave a 121 °C/15 Lbs de presión.

- **Medio de Extracto vegetal-cacao:** Se utilizó 70 gramos de apio (*Apium graveolens*), 70 gramos de tomate (*Solanum lycopersicum*), 70 gr de zanahoria (*Daucus carota*), 70 gr de beterraga (*Beta vulgaris*), 70 gr de lechuga (*Lactuca sativa*), 70 gr de espinaca (*Spinacia oleracea*), 70 gr perejil (*Petroselinum crispum*), 400 gr de cáscara de cacao (*Theobroma cacao L.*) y 200 gr de granos en baba con su pulpa (melaza) se hierve por unos 30 min. en 1 litro de agua destilada, posteriormente se cuela el agua hervida a un Erlenmeyer y se agrega 15 gramos de agar, es mezclado correctamente y esterilizado en autoclave a 121 °C/15 Lbs de presión.
- **Medio de Jugo vegetal-cacao:** Se utilizó 70 gramos de apio (*Apium graveolens*), 70 gr de tomate (*Solanum lycopersicum*), 70 gr de zanahoria (*Daucus carota*), 70 gr de beterraga (*Beta vulgaris*), 70 gr de lechuga (*Lactuca sativa*), 70 gr de espinaca (*Spinacia oleracea*), 70 gr perejil (*Petroselinum crispum*), 400 gr de cascara de cacao (*Theobroma cacao L.*) y 200 gr de granos en baba con su pulpa (melaza) se hierve por 30 minutos en un litro de agua destilada, después se procede a licuar y finalmente a colar en un Erlenmeyer y se agrega 15 gr de agar, es mezclado correctamente y esterilizado en autoclave a 121 °C/15 Lbs de presión.
- **Medio de Vegetales-Malta-Asparraguina:** Se utilizó 70 gramos de apio (*Apium graveolens*), 70 gr de tomate (*Solanum lycopersicum*), 70 gr de zanahoria (*Daucus carota*), 70 gr de beterraga (*Beta vulgaris*), 70 gr de lechuga (*Lactuca sativa*), 70 gr de espinaca (*Spinacia oleracea*), 70 gr perejil (*Petroselinum crispum*) y 50 gr de espárragos (*Asparagus officinalis*) se hierve por 30 min. en un litro de agua destilada, después se procede a colar el agua hervido a un Erlenmeyer y se agrega 50 gr Malt Extracto Agar Base y 15 gr de

agar es mezclado correctamente y esterilizado en autoclave a 121 °C/15 Lbs de presión.

Preparación de las placas

Se dividió a la placa de Petri de vidrio de borosilicato de 90 mm en 4 cuadrantes y cada línea se marcó con letras (A-B y C-D) para la identificación de las medidas del diámetro registrado en la evaluación del crecimiento micelial.

Las placas fueron esterilizadas en la autoclave vertical (RAYPA), después se vertió el medio del cultivo de la investigación y se dejó solidificar en la cabina de seguridad biológica A-II Esco. Posterior a ello, se colocó al centro de la placa una rodaja de 5 milímetros de diámetro del inóculo de *Moniliophthora roreri* crecida en medio jugo cacao agar.

Las evaluaciones culminaron cuando *Moniliophthora roreri* cubrió íntegramente en uno de los medios de cultivo.

Variable

Diámetro del crecimiento micelial

La principal variable examinada fue la medida del diámetro del crecimiento micelial, determinado a través la media de los puntos A-B y C-D de la caja Petri expresada en mm.

Se utilizó el diseño completamente al Azar (DCA), con 6 repeticiones y 9 tratamientos. Del mismo modo, los datos de crecimiento en diferentes medios fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), en el cual las medias se cotejaron mediante la prueba de Tukey con 5% de nivel de significación, utilizando el software de estadística SAS.

5.4.2.2.1 Evaluación del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri*, en diferentes concentraciones de los mejores medios de cultivo en cajas petri.

Los tres mejores medios de cultivo se llevaron a una prueba de concentraciones para tener un dato más preciso; para continuar con las pruebas, los medios de cultivo fueron:

- **Medio de soja alta:** Para la preparación de 1 litro de medio, se utilizó 500 gr de soja (*Glycine max*).
- **Medio de soja media:** Para la preparación de 1 litro de medio, se utilizó 250 gr de soja (*Glycine max*).
- **Medio de soja baja:** Para la preparación de 1 litro de medio, se utilizó 100 gr de soja (*Glycine max*).
- **Medio de avena alta:** Para la preparación de 1 litro de medio, se utilizó fue utilizado 70 gr de Avena.
- **Medio de avena media:** Para la preparación de 1 litro de medio, se utilizó 40 gr de Avena.
- **Medio de avena baja:** Para la preparación de 1 litro de medio, se utilizó 20 gr de Avena.
- **Medio de Malt Extracto Agar Base alta:** Se suspendió 70 gr de Malt Extracto Agar Base.
- **Medio de Malt Extracto Agar Base media:** Se suspendió 50 gr de Malt Extracto Agar Base.
- **Medio de Malt Extracto Agar Base baja:** Se suspendió 30 gr de Malt Extracto Agar Base.

5.4.2.3 Aislamiento de *Trichoderma spp.*

Fase campo

5.4.2.3.1 Recolección de muestras

Cepa de *Trichoderma spp.*

En las nueve fincas de las zonas cacaotera de Pan de Azúcar-Echarate entre febrero a marzo se tomó los siguientes criterios para la recolección de muestras:

- Una finca por sector.
- Finca con por lo menos ½ ha de cacao.
- Cacao con sistema agroforestal

En las nueve parcelas se utilizó la metodología descrita por **Mejía y Alvarado (2016)**, con algunas modificaciones; se colectaron muestras de suelo de árboles visiblemente sanos a una distancia de 1,5 metros de la superficie del tallo 4 muestras de suelo en puntos equidistantes para cada árbol, con 15 a 20 cm de profundidad, y sacando la hojarasca con anterioridad.

Cada muestra de suelo se guardó en bolsas de polipropileno debidamente marcada e identificada con fecha, lugar, número de muestra y/o número de lote. Luego se trasladaron al Laboratorio de Microbiología de La Universidad Nacional Intercultural de Quillabamba.

Tabla N° 1: Localidades y codificación de los aislado de *Trichoderma spp.* en Echarate

Distrito	Localidad	Trichodermas*	Tratamiento
Echarate	Sahuayaco	Th-1	T1
Echarate	Palma real	Th-2	T2
Echarate	Yomentoato	Th-3	T3
Echarate	Alta Rosalina	Th-4	T4
Echarate	Ivochote	Th-5	T5
Echarate	Alcuzama alto	Th-6	T6
Echarate	Ichiquiato	Th-7	T7
Echarate	Alcuzama Bajo	Th-8	T8
Echarate	Ichiquiato	Th-9	T9
			Total 9

Las cepas se identificarán con las abreviaturas Th-1. (Th=Trichoderma y -1=N° de aislado).

Fase laboratorio

5.4.2.3.2 Manipulación de muestras

Luego de obtener las muestras de suelo, se realizó algunas modificaciones a la metodología indicada por **Suárez (2006)**, se pesó y coló 5 kilogramos de suelo para poder quitar las impurezas, después de ello en unos 90 ml se disolvió agua destilada estéril, donde se manipularon por las diluciones seriadas. Se depositó 100 µL de diluciones 10-3 y 10-4, y con la ayuda del anillo de Drigalsky, se dispersaron alícuotas en la base del medio de cultivo PDA, lo cual se complementó con 800 µL de sulfato de gentamicina, pH 5,5, e incubaron a temperatura ambiente a lo largo de 5 días.

Para purificar las colonias detectadas como Trichoderma, se realizó transferencias directas caja petri con medio del PDA.

5.4.2.3.3 Identificación de aislamientos mediante microscopia.

Fue efectuado con azul de lactofenol a cada aislamiento obtenido y fueron observados e identificados al microscopio conidióforos, fiálides y conidios, estructura típica del género *Trichoderma*.

Pasos de tinción con azul de lactofenol:

- Poner una gota de solución salina en el portaobjetos
- Tomar de la colonia aislada con un asa estéril una colonia o fracción del extender o micro organismo
- Fijar con calor flameando
- Secar
- Añadir una gota de azul lactofenol
- Envolver con un cubreobjetos

Caracterización morfológica macroscópica y microscópica de las cepas de *Trichoderma spp.*

I. Materiales y métodos

Cuando son obtenidas las cepas puras de *Trichoderma spp.* se realizó su caracterización morfológica microscópica y macroscópica de los nueve aislamientos alcanzados.

Evaluación Morfológica a partir de los aislamientos obtenidos de *Trichoderma spp.* en 24, 48, 72 y 84 horas de crecimiento, se indican estos parámetros:

a. Caracterización macroscópica de *Trichoderma spp.*

Se identificaron las cepas de *Trichoderma* con la guía de **Barnett y Hunter (1999)**, teniendo en cuenta las características morfológicas macroscópicas como:

Tasa de crecimiento.

Se realizó las medidas del diámetro de las colonias *Trichoderma spp.* empleando vernier cada 24 horas.

Características de las colonias.

- la pigmentación de las conidias
- textura del micelio
- formación de anillos concéntricos, radiales y anillo interior
- borde

b. Caracterización microscópica de *Trichoderma spp.*

Fue realizada Tinción con azul de lactofenol, observando y detectando los microscopios.

Para *Trichoderma*, la descripción se basa en las siguientes características, utilizando las guías de identificación de **Barnett y Hunter (1999)**.

- forma de conidias
- número de conidias
- fiálides
- conidióforos

5.4.2.4 Desarrollo micelial de los aislados antagonistas (*Trichoderma spp.*)

La prueba se realizó para la determinación del desarrollo y crecimiento micelial por competencias del agente de biocontrol por los espacios y nutrientes en la rizosfera.

El aislamiento de los antagonistas (*Trichoderma spp.1*, *Trichoderma spp. 2*, *Trichoderma spp. 3*, *Trichoderma spp. 4*, *Trichoderma spp. 5*, *Trichoderma spp. 6*, *Trichoderma spp. 7*, *Trichoderma Spp. 8*, *Trichoderma spp. 9*) se desarrolló en nueve

placas petri conteniendo medio Soja - Agar estéril e incubados al 28 °C durante 5 días, y después se extrajeron rodajas de micelio de 0.5 cm.

Fueron preparadas 4 Erlenmeyer que contenían 200 mililitros de medio Soja – Agar estéril, posterior a ello se vertió en las placas Petri, cuando se solidificaron fueron colocadas en el centro de todas las placas una rodaja con 0.5 centímetros con contenidos de Soja – Agar y micelio del hongo, en una temperatura de 25 °C las placas sembradas se incubaron cada día, y con el apoyo de un vernier se midió el crecimiento de las medidas del micelio todos los días hasta cubrir completamente el micelio; se encontró información sobre el crecimiento del hongo, un modelo relacionado con su crecimiento en el tiempo. Por tratamiento se tuvo 6 placas, considerándose nueve tratamientos.

5.4.2.5 Determinación del porcentaje biocontrol de los agentes antagonistas frente al patógeno (*Moniliophthora roreri*).

Para evaluar el potencial de inhibición de las cepas de *Trichoderma spp.* sobre *Moniliophthora roreri* se empleó la técnica de enfrentamiento de cultivo dual con algunas modificaciones (Figura 3). La prueba indicada anteriormente se dispuso con un diseño completamente al azar, con 10 tratamientos (nueve de enfrentamiento y un testigo absoluto).

Todos estos tratamientos consistieron en 7 repeticiones, y la inhibición que se observó se midió en milímetros y se comparó con el crecimiento del testigo (Tabla N° 3). Para las interacciones antagonistas-patógenos, se colocó un disco de 5 milímetros con un inóculo de *Trichoderma* en puntos equidistantes del plato de Petri y se colocó otro disco de 5 milímetros con inóculo de *Moniliophthora roreri*.

Las muestras se cultivaron en condiciones de oscuridad a 25° C, estableciendo 7 réplicas para cada tratamiento y testigo, que consistieron en colonias de

Moniliophthora roreri sin confrontaciones, a su vez se rotularon las placas Petri en conformidad con todas las cepas nativa de *Trichoderma spp.* considerando las fechas; todos estos procesos se llevaron a cabo en la cámara de bioseguridad, que también cuenta con un mechero encendido. A su vez para el crecimiento radial, se registró de forma diaria con base en la tabla de evaluación que registra las variables de estudio. La evaluación cesó cuando uno de los aislamientos tuvo contacto con el micelio de *Moniliophthora roreri*.

Por esta razón, como informaron **Villamil et al., (2012)**. Debido a su lenta dinámica de crecimiento, los hongos fitopatógenos obtuvieron una ventaja competitiva de tres días.

Para evaluar el potencial de antagonismo de *Trichoderma spp.* se evaluó de diferentes maneras: En primer lugar, con la medición del nivel de micoparasitismo de los antagonistas, donde fue determinado por una escala que sostienen **Ezziyyani et al., (2004)** (Tabla 2).

En segundo lugar, por competencia de espacio y nutrientes, donde alcanzó con radios del crecimiento de *M. roreri* y antagonista en el cultivo dual, juntamente con el testigo absoluto, empleando el vernier, y en tercer lugar por el índice de inhibición de crecimiento radial (PICR) a través de la fórmula de **Ezziyyani et al., (2004)**:

Donde:

R1: es la distancia más lejana recorrida por el patógeno

R2: es la distancia recorrida por el patógeno hacia el antagonista.

$$\text{PICR (\%)} = \left(\frac{R1-R2}{R1} \right) 100$$

Figura 3. Enfrentamiento in Vitro de los hongos *Trichoderma spp.* y aislados de hongos fitopatógenos.

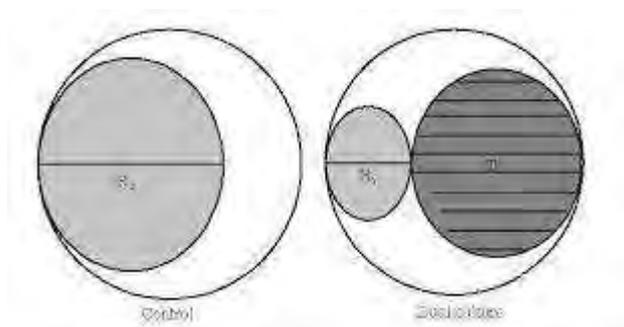


Tabla N° 2: Grado de antagonismo de agentes de control biológico respecto a la competencia por sustrato propuesta por **Bell et. al. (1982)**.

GRADO	CAPACIDAD ANTAGONICA
0	Ninguna invasión de la superficie del hongo
1	Invasión de 1/4 de la superficie de la colonia del hongo patógeno
2	Invasión de 1/2 de la superficie de la colonia del hongo patógeno
3	Invasión de total de la superficie de la colonia del hongo patógeno
4	Invasión de total de la superficie de la colonia del hongo patógeno, esporulación sobre ella.

5.5 Análisis de datos

Los datos de competencia por nutrientes ejercidos por los diferentes aislados de antagonistas, se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), con la prueba de comparación de medias, fueron diferenciadas con un test de Tukey ($p \leq 0.05$) los datos registrados de la evaluación fueron procesados en el Programa Estadístico de Excel y un programa de Software SAS.

Para el grado de micoparasitismo fue elaborada una tabla para clasificarlos según la escala de **Ezziyani et. al., (2004)**. Del mismo modo, se graficó el porcentaje de los aislados de los antagonistas.

Igualmente, los datos de inhibición, se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias fueron diferenciadas por el test de Tukey ($p \leq 0.05$) con el software estadístico SAS.

El programa Excel se empleó para realizar los análisis para crear una base de datos y también se utilizó el software estadístico para analizar estadísticamente los datos.

Tabla N° 3: Tratamientos in vitro utilizados para determinar el potencial de biocontrol de *Trichoderma spp.* sobre el fitopatógeno *Moniliophthora roreri*.

Tratamientos de prueba de enfrentamiento	Clave	Repeticiones
<i>Moniliophthora roreri</i> vs <i>Trichoderma spp.</i> 1	M-1 *Th-1	7
<i>Moniliophthora roreri</i> vs <i>Trichoderma spp.</i> 2	M-1*Th-2	7
<i>Moniliophthora roreri</i> vs <i>Trichoderma spp.</i> 3	M-1 *Th-3	7
<i>Moniliophthora roreri</i> vs <i>Trichoderma spp.</i> 4	M-1 *Th-4	7
<i>Moniliophthora roreri</i> vs <i>Trichoderma spp.</i> 5	M-1 *Th-5	7
<i>Moniliophthora roreri</i> vs <i>Trichoderma spp.</i> 6	M-1 *Th-6	7
<i>Moniliophthora roreri</i> vs <i>Trichoderma spp.</i> 7	M-1 *Th-7	7
<i>Moniliophthora roreri</i> vs <i>Trichoderma spp.</i> 8	M-1 *Th-8	7
<i>Moniliophthora roreri</i> vs <i>Trichoderma spp.</i> 9	M-1 *Th-9	7
<i>Moniliophthora roreri</i> vs <i>Moniliophthora roreri</i> (testigo)	M-1 *M-1	7

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados

6.1 Aislamiento e identificación de *Moniliophthora roreri*

Se realizó el aislamiento para identificar mediante características morfológicas al fitopatógeno.

Colecta de muestras de moniliasis

Las muestras se recolectaron en Pan de Azúcar -Echarate en la región de Cusco de febrero-mayo del 2021.

El sector de Pan de Azúcar-Echarate presenta condiciones óptimas para la proliferación de la enfermedad; humedad alta, sombras excesivas, falta de poda y manejos culturales. La parcela presenta un cultivo asociado con sombra.



Fotografía 1. Colecta de muestras de moniliasis de cacao en Pan de Azúcar- Echarate en el departamento de Cusco.

Las muestras colectadas se sometieron al método de desinfección, posteriormente se sembraron las muestras en placas, de las cuales se realizó una comparación de características típicas de para *Moniliophthora roreri*, donde se exponen en el Cuadro 1.

Cuadro N° 1: Características macroscópicas y microscópicas de *Moniliophthora roreri*

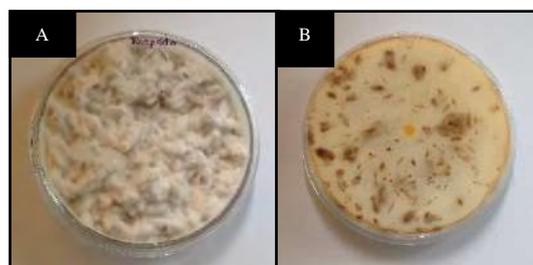
Colonia típica de <i>M. roreri</i>	Características macroscópicas	
	Centro	Puntiforme
	Formación de anillos	si
	Borde	Regular/ Irregular
	Textura	Pulverulenta/ Algodonosa
	Coloración	De Blanco a Beige
	Sectores	Presencia/ Ausencia
Esporas de <i>M. roreri</i>	Características microscópicas	
		Tamaño aproximado
	Esporas globosas	4-5 μ
	Esporas subglobosas	7-8μ
Esporas Elípticas	9-11μ	

Prueba preliminar

Las muestras de cacao con signos de momificación recolectadas en el periodo anterior, fueron sometidas al raspado de la superficie, el polvillo del raspado se colocó sobre arroz precocido y fueron incubados en la oscuridad a 25 ° C a lo largo de 7 días para validar el crecimiento de moniliasis.

Morfología Macroscópica

Fotografía 2. Desarrollo del raspado de la superficie de muestra momificada de la mazorca de cacao en arroz precocido. A parte frontal, B parte dorsal.

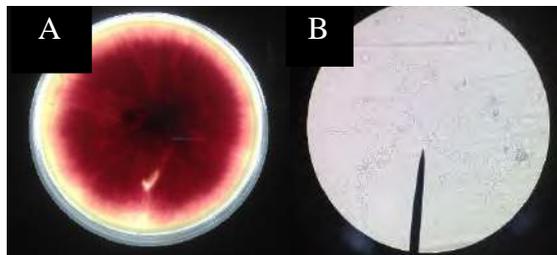


En la Fotografía 2., en el medio de arroz precocido se observó desarrollo abundante de micelio, las cuales no concordaban con las características macroscópicas típicas *Moniliophthora roreri*, a razón de esto, el crecimiento logrado conforma la flora acompañante de cacao.

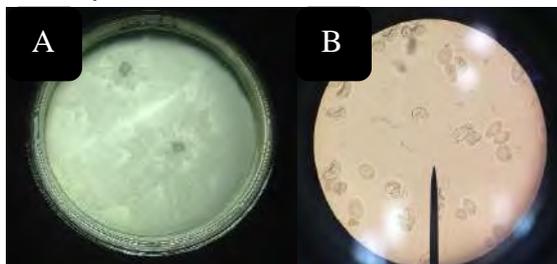
Aislamiento de flora acompañante

Posterior a la distinción de la flora acompañante, se separó y purificó diversas clases de hongos para que el crecimiento de *Moniliophthora roreri*. pueda observarse, confirmarse o excluirse bajo un microscopio. Se aisló los hongos existentes por color y textura en la oscuridad a 25 ° C por unos 5 días, después del tiempo de incubación se ocasionó el crecimiento de ***Phytophthora spp, Fusarium spp y Trichoderma spp.***

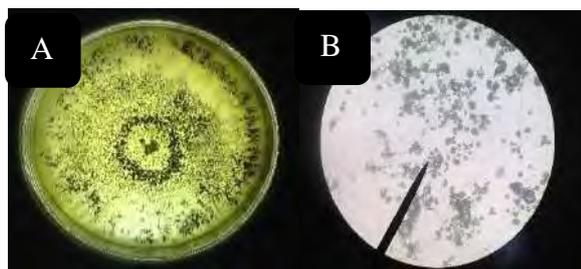
Fotografía 3. Aislado de *Fusarium spp.* (Hongo color rosado). A morfología macroscópica, B morfología microscópica.



Fotografía 4. Aislado de *Phytophthora spp.* (Hongo color blanco). A morfología macroscópica, B morfología microscópica



Fotografía 5. Aislado de *Trichoderma spp.* (Hongo color verde). A morfología macroscópica, B morfología microscópica.



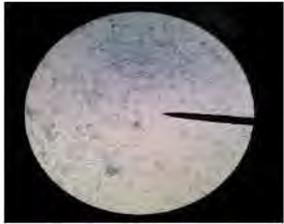
El crecimiento acelerado de la flora acompañante; perteneciente a hongos que se alimentan de materia en descomposición, dificultó el proceso de aislamiento de *Moniliophthora roreri*; se logró identificar a cepas de *Trichoderma spp.* (fotografía 5.) *Phytophthora spp.* (fotografía 4.), y *Fusarium spp.* (fotografía 3.), generando competencia por el consumo de nutrientes y espacio impidiendo su correcto aislamiento.

A partir de la muestra con signos de momificación resultó imposible su adecuado aislamiento, esto se debe a la presencia de la flora acompañante y la dificultad de una adecuada desinfección, esto contrarrestó el crecimiento de *Moniliophthora roreri*.

Muestreo 1

Se colectó una muestra de mazorca inmadura de 3-4 meses de edad en el cultivar de cacao en Pan de Azúcar- Echarate con síntomas de moniliasis, el cual se identificó, desinfecto y proceso. Se sembró en Papa dextrosa reforzada con 1 ml de Solución de Gentamicina 160mg / 2mL por litro de agar incubada a 25° C a lo largo de 12 días en la oscuridad.

Cuadro N° 2: Aislamiento de muestra del muestreo 1

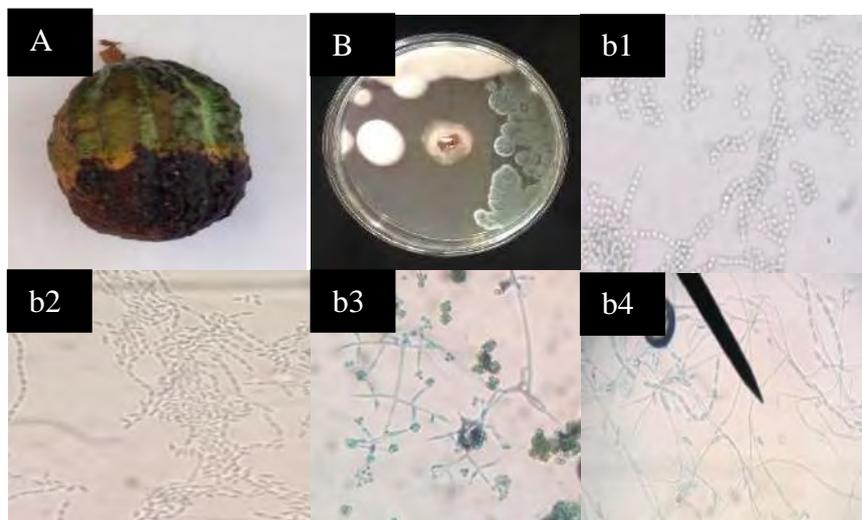
CODIGO DE MUESTRA	MUESTRA	APARIENCIA MACROSCOPICA	APARIENCIA MICROSCOPICA
M-1			

Como se puede observar en la Prueba Preliminar y el Muestreo 1, realizar un correcto aislamiento de *Moniliophthora roreri* presentó varios inconvenientes a causa del crecimiento de distintos hongos provenientes de la flora acompañante, incluso cuando la mazorca de cacao evidencie síntomas y signos de moniliasis, es de este modo el muestreo la muestra M-1 se encontró una colonia sospechosa de *Moniliophthora roreri* con características macroscópicas similares en color y textura, y formas microscópicas y tipos de esporas. (Cuadro 2)

En la muestra M-1 se observaron características tanto macro y micro de la flora acompañante del posible cacao que genero la dificultad en el crecimiento de *Moniliophthora roreri*.

Fueron evaluadas las características microscópicas y macroscópicas de las muestras Mr- A sospechosa de *Moniliophthora roreri*; características propias de la colonia típica de *Moniliophthora roreri*, procediendo a su separaron y purificaron.

Aislamiento de *Moniliophthora roreri* a partir de M-1

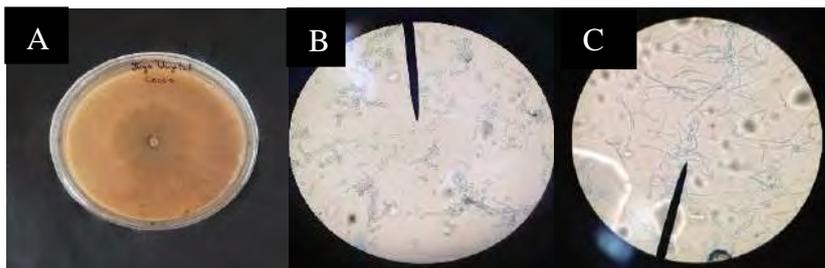


Fotografía 6. Muestra de cacao M-1 con signos y síntomas de moniliasis. A y B morfología macroscópica (b1, b2, b3) morfología microscópica de flora acompañante, (b4) morfología microscópica de *Moniliophthora roreri*.

En la fotografía 6 se observa la colonia seleccionada como posible causante de la enfermedad moniliasis muestra las características macro y microscopias típicas de

Moniliophthora roreri, como el color blanco de la colonia y la textura algodonosa / pulverulenta, etc., por lo que algunas colonias se analizan por resiembra, y algunas de las colonias se encuentran en el medio de agar vegetal sin antibióticos y se incuban durante 7 días a 25° C en la oscuridad.

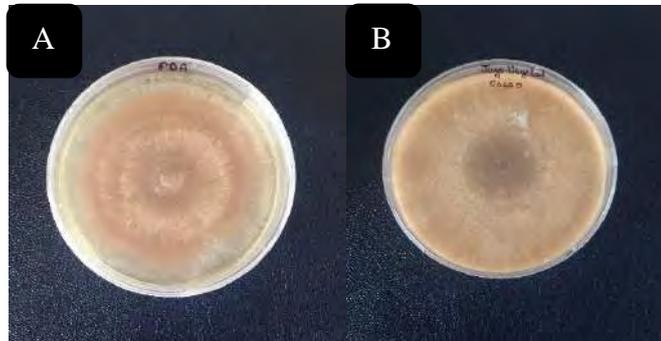
La muestra M-1 mostró las características microscópicas y macroscópicas típicas de las colonias de ***Moniliophthora roreri***. (Cuadro N ° 1), lo que demuestra que la edad, el estado del fruto, las condiciones asépticas y desinfección son características relevantes que tienen que considerarse en aislamiento; la muestra M-1 es un tipo de las mazorcas de cacao de menos de 3 meses, presenta maduración prematura, gibas, sequedad, todavía la mazorca no presentaba síntomas de moniliasis externos, a razón de esto los frutos inferiores a tres meses sin la presencia de algún síntoma externo son adecuados para el aislamiento, en vista de que la moniliasis daña al fruto en la parte interna en su etapa inicial, en consecuencia frutos menores o iguales a tres meses con presencia de algún síntoma externo podrían estar originados por otro patógeno que no es ***Moniliophthora roreri***.



Fotografía 7. Aislamiento de *Moniliophthora roreri* de M-1. (A) morfología macroscópica B y C morfología microscópica en tinción de Azul de lactofenol.

Se obtuvo un aislado purificado de ***Moniliophthora roreri***, el cual se realizó satisfactoriamente en agar jugo vegetal-cacao, debido a que se observó las esporulaciones de los hongos (ver Figura N ° 10) y un crecimiento mayor de las colonias con texturas pulverulentas (A).

En B y C, la esporulación del hongo se puede observar en el microscopio, y las esporas globosas, sub globosas y elípticas e hifas de *M. roleri*, en tinción de azul de lactofenol.



Fotografía 8. Crecimiento de *Moniliophthora roleri*. A crecimiento en PDA y B crecimiento en agar jugo vegetal-cacao.

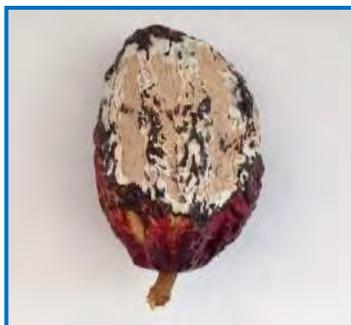
Después del aislamiento de la colonia de *Moniliophthora roleri* se sometió a:

- Pruebas de crecimiento de medio en Potato Dextrosa Agar (PDA), CMA, Malta, Sabouraud, Agar Nutriente, Agar V8 Sacarosa, Agar V8Extracto, Agar V8Jugo, Agar V8PDA Sacarosa, Agar Malta Asparraguina.
- Pruebas de concentraciones: alta, media y baja.

Postulados de Koch

Se evidencia que cumple todos los postulados de Koch

Fotografía 9. Cultivo puro de monilia producto del aislamiento de las mazorcas enfermas.

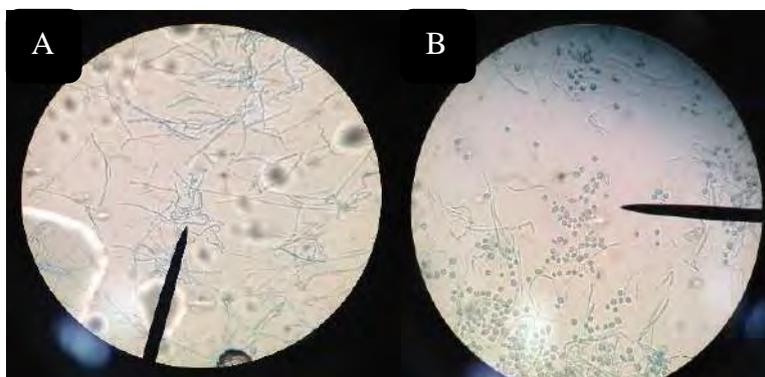




Identificación por microscopia óptica de las esporas del cultivo puro

Se realizó el montaje con una solución de azul de lactofenol, se observó e identificó hifas y esporas del hongo *Moniliophthora roreri* al microscopio, en el cual A: hifas, B: esporas sub globosas, globosas y elípticas

Fotografía 10. Tipos de esporas e hifas de *Moniliophthora roreri* vistas al microscopio óptico.



Mediante la caracterización por microscopia se pudo apreciar la morfología de las hifas y esporas de *Moniliophthora roreri* en tinción azul de lactofenol, en el cual está la disposición de esporas en hifas y tres clases de esporas: globosas, sub globosas y elípticas, características típicas de los hongos estudiados.

De la finca Pan de Azúcar muestreada se logró obtener un aislado del patógeno *Moniliophthora roreri*, obtenido con la metodología **González y Roble (2014)**.

Al aplicar la metodología de aislamiento mencionada anteriormente se confirmó que con frutos no esporulados y síntomas iniciales es factible aislar el patógeno *Moniliophthora roreri*. Es de consideración mencionar que gracias a las mejoras realizadas a la metodología indicada por **González y Roble (2014)**, donde redujo significativamente la presencia de flora acompañante y permitió el crecimiento de las colonias con caracteres macro y microscópicos propios de patógenos, ello sugiere que, en conformidad con estos autores, no se puede observar debido al alto nivel de contaminación. El aislamiento de *Moniliophthora roreri* fue complejo por el crecimiento de la flora, incluso si el fruto del cacao muestra síntomas y signos de moniliasis; en los cuales podemos encontrar *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*, y *Trichoderma spp.*

Los resultados alcanzados tienen similitud con los resultados presentados por **Mejía y Alvarado (2016)** quienes mencionan que el aislamiento resulta mejor de frutos con una edad entre los 2-4 meses.

Identificación mediante características morfológica de los aislamientos de *Moniliophthora roreri*

Evaluación Morfológica Microscópica M-1

Fotografía 11. Características macroscópicas (De la A -E) de colonias, de diferentes días de crecimiento de *Moniliophthora roreri* de M-1.

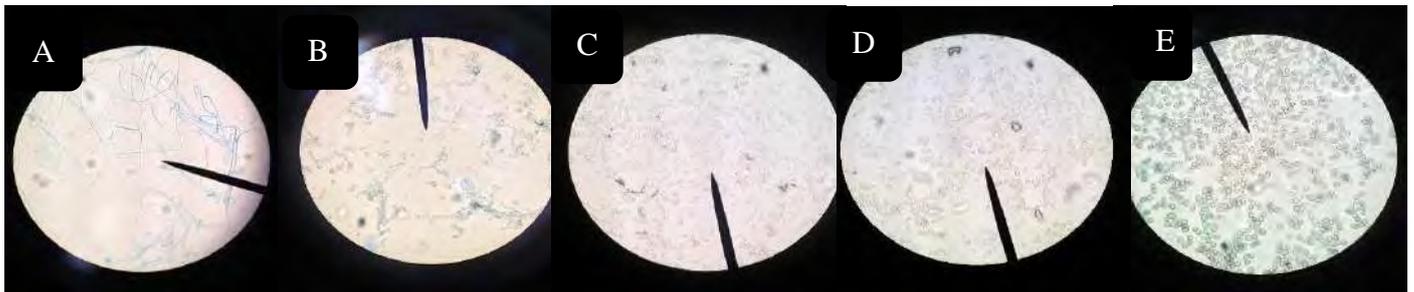


En la Fotografía 11 se puede observar las características macroscópicas de *Moniliophthora roreri* en sus diversas etapas en los diferentes días de crecimiento en donde A (3 días), B (6 días), C (9 días), D (12 días) y E (15 días) representan los días en los cuales se observó el crecimiento.

Presenta cambios a través del tiempo, desde una coloración blanca-crema hasta llegar a una coloración beige-claro. Estos cambios nos permiten distinguir el tiempo de maduración de las esporas y así determinar el ciclo de maduración de *Moniliophthora roreri*.

Evaluación Morfológica Microscópica M-1

Fotografía 12. Características microscópicas de *Moniliophthora roreri* A (3 días), B (6 días), C (9 días), D (12 días) y E (15 días) de colonias en diferentes días de crecimiento



Las características morfológicas (microscópica y macroscópica) de *Moniliophthora roreri* muestra en el tiempo los cambios en la colonia en cuanto a la coloración, tamaño y textura. Al respecto de la esporulación, ella incrementa con el número de días, solo se pueden observar las hifas al tercer día, en los días siguientes aparecen algunas esporas globulares, las esporas globulares incrementan y podrían distinguirse en formas subglobosas. A partir del noveno día se puede observar unas esporas elípticas, globosas y sub globosas juntas. Finalizó con el día 15 con todas las esporas maduras juntas.

En el cuadro 3 se ha realizado un resumen de las características microscópicas y macroscópicas del aislado del sector de Pan de Azucar-Echarate.

Evaluación morfológica M-1

Cuadro N° 3: Resultados de las características macroscópicas y microscópicas de *Moniliophthora roreri*.

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS	
Tasa de crecimiento	La placa de 90 mm fue llenada en 12 días
Tonalidad de la colonia	Beige claro al inicio y beige oscuro al final
Formación de anillos	De 4 a 7 anillos
Textura de la colonia	Pulverulenta y algodonosa
Formación de halo	Halo con tonalidad blanquecina en todo el crecimiento
Zona micelial	Filamentos cortos y entreverados
CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS	
Forma de conidias	Globosas, sub globosas y elípticas
Hifas	Hialinas septadas
Micelio	Hialino y brillante

Después de realizar las caracterizaciones morfológicas, la muestra obtenida cumplió con los cuatro postulados de Koch.

Discusiones:

Gonzales y Roble (2014), mencionan que existe diferencia entre colonias de diferentes aislados de *Moniliophthora roreri* ya sea por el color y esporulación. Esto permite justificar la diferencia encontrada en textura y color en las características macroscópicas de las colonias en los aislados encontrados.

Las tonalidades de colores de las colonias aisladas y crecidas en placas petri sobre medio Soja-agar y PDA variaron de crema-naranja, crema-café, claro -blanco, café oscuro-blanco a café oscuro-café claro y observados en placas petri, que son características típicas de *Moniliophthora roreri*, y se asemeja a lo manifestado por **Ramirez (2019)**, y **Mejía y Alvarado (2016)**, las colonias de *Moniliophthora roreri*

poseen una variabilidad considerable a nivel morfológico en el color del micelio, que va del blanco, crema al pardo (**Phillips et al., 2006**), debido a ello este parámetro no es considerado como un marcador morfológico de distinción de fenotipos entre los aislados.

Cada una de las colonias mostraron bordes regulares y una textura pulverulenta-algodonosa, que es la característica morfológica definitoria indicada por (**Phillips et a., (2006) y Pérez-Vicente (2018)**).

La forma de las colonias logradas en medio de cultivo soja-agar tiene coincidencia con las mencionadas por **Gonzales y Roble (2014)**, quienes mencionan la forma de conidias de *Moniliophthora roreri* varia desde globosas a elípticas.

En conformidad con investigaciones efectuadas en otros hongos, la variabilidad del tamaño de las conidias puede estar influenciado por las condiciones donde se lleve la investigación ya sea en campo o laboratorio.

6.2 Crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en diferentes medios de cultivo.

En el Cuadro 4 se presenta los resultados de la comparación del crecimiento micelial radial de *Moniliophthora roreri* de los nueve medios de cultivos estudiado, donde se observa que hay diferencia significativa entre ellos.

El coeficiente de varianza es de 4,344 %, que se encuentra dentro del rango permitido para esta clase de experimentos. Se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey con un nivel de significación de 5% y se presenta en la Tabla 4.

Cuadro 4. Análisis de varianza (Anova) del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en diferentes medios de cultivo

Fuentes de variabilidad	G.L.	S.C.	C.M.	F calculado	F teórico 0.05	Significancia
Entre medios	8	31100.5959	3887.57407	853.37	2.200	*
Error experimental	45	205	4.55556			
Total	53	31305.5926	C.V. = 4.344374%			

En la Tabla 4, se presenta los resultados ordenados según la longitud del diámetro de crecimiento (mm).

Los medios que favorecen el crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* son Avena, Soja, Malta y PDA con 90, 81.333, 63.5, 60.5 respectivamente.

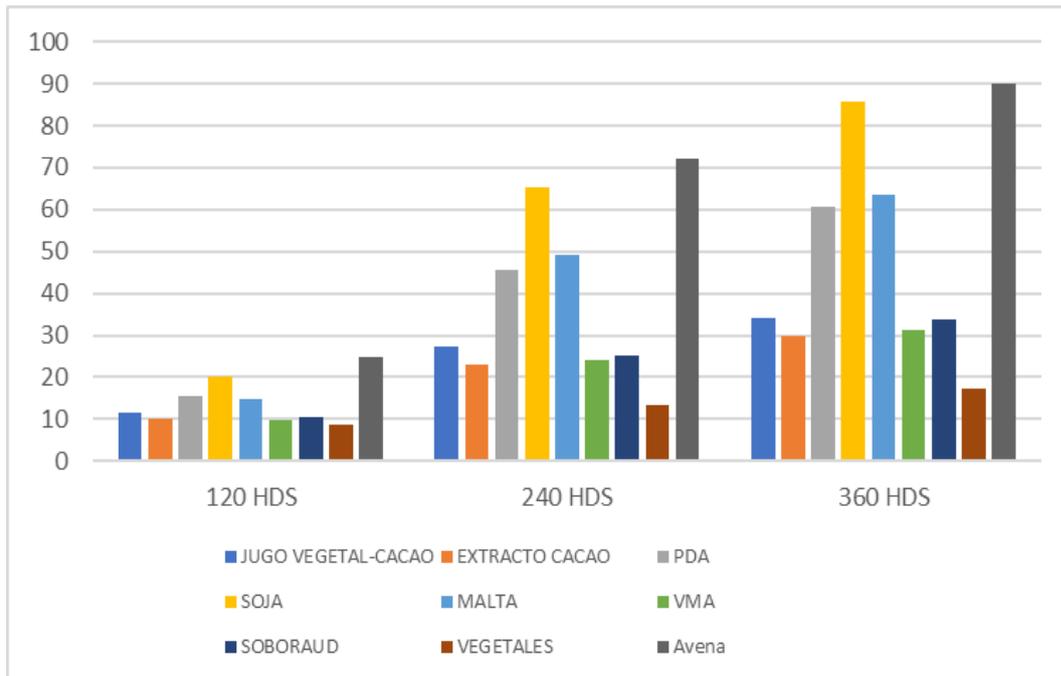
El medio vegetal y el extracto vegetal de cacao son los medios que presentaron el menor crecimiento de micelio, por tanto, no son recomendables para *Moniliophthora roreri*, cuya tasa de crecimiento es menor que el medio de papa, el cual se consideró como referencia (Cuadro 4 y Tabla 4).

Tabla N° 4: Tukey para medios de cultivo para crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri*.

OM	MEDIO	CODIGO	TRATAMIENTO	PROMEDIO mm	SIGNIFICANCIA Tukey 5%
I	Avena	A	9	90	A
II	Soja	S	4	81.3	B
II	Malta	M	5	63.5	C
IV	PDA	P	3	60.5	C
V	JUGO	J	1	34.167	D
VI	Sabouraud	S	7	33.167	d e
VII	Vegetales	V	6	31.5	d e
VII	Extracto vegetal	E	2	30	d e
IX	Vegetales	Ve	8	17.5	F

El índice de crecimiento micelial de evaluación son los datos que representan el diámetro de crecimiento del micelio de *Moniliophthora roreri* (Grafico 1), lo que indica que los medios de Avena y Soja tienen indicadores similares y podrían considerarse para estudios en patogenicidad, control biológico y químico.

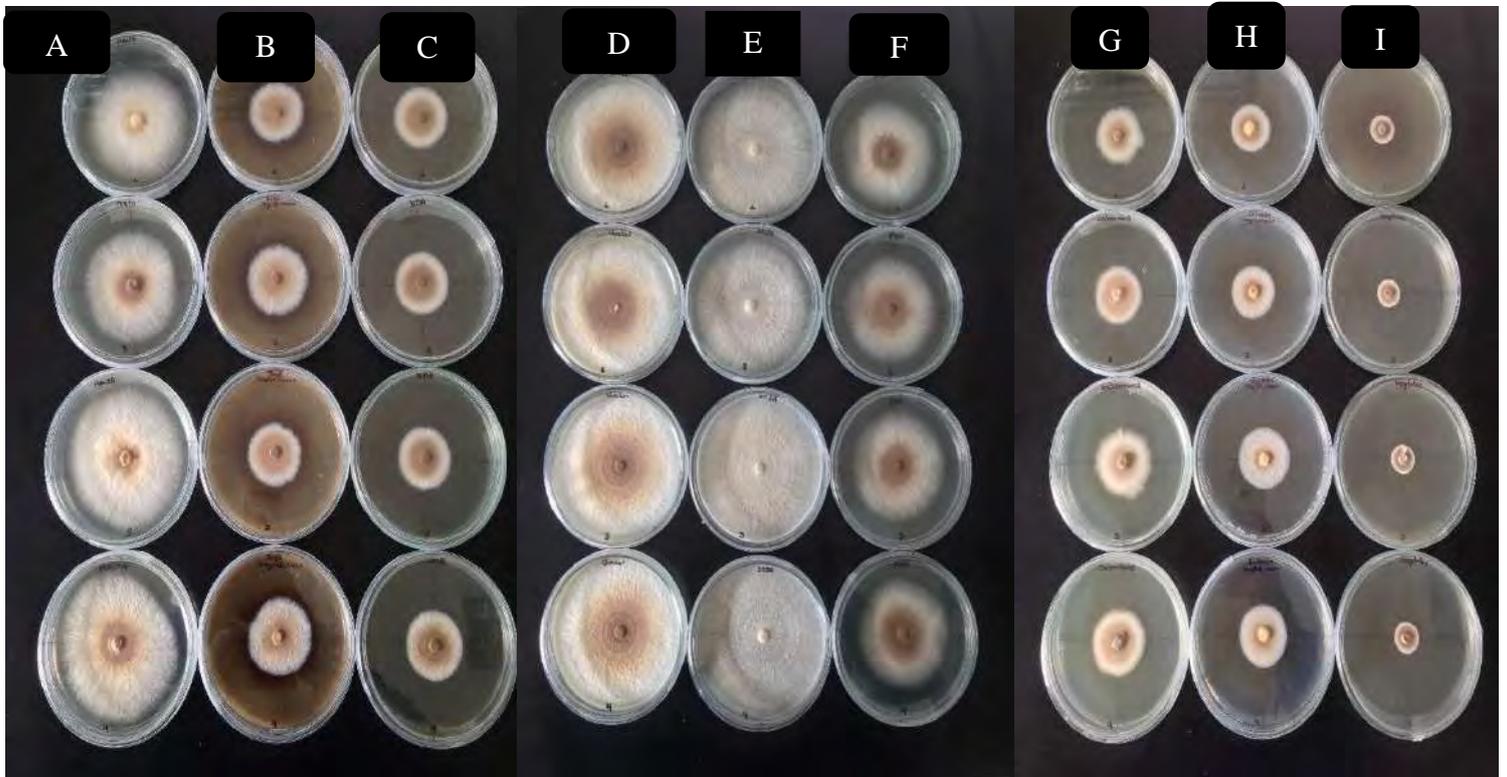
Gráfico 1. Crecimiento micelial en mm por día de *Moniliophthora roreri* a por tipo de medio de cultivo.



Nota: *HDS: horas después de la siembra

En la Fotografía 13. se observa diferentes colores de los crecimientos como efecto del tipo medio de cultivo sobre el cual han crecido, el medio vegetales tiene un desempeño bajo en comparación a los medios Avena, Soja y Malta. Los medios Vegetal, extracto vegetal de cacao y jugo vegetal cacao tuvieron un crecimiento lento, clasificándolo como inadecuados para *Moniliophthora roreri*, por el contrario, los medios Avena, Soja y Malta fueron más eficaces en proporcionar a *Moniliophthora roreri* los elementos nutricionales y permitieron una mejor velocidad de crecimiento de *Moniliophthora roreri*.

Fotografía 13. Crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en diferentes medios con cuatro repeticiones representativas a los 12 días después de la A) Avena, B) Soja, C) Malta, D) PDA, E) Saboraud, F) VMA, G) VMA H) Extracto I) Vegetal.



Considerando que varios de los medios alcanzaron crecimiento micelial cercanos a 90 mm, se decidió comparar la concentración de los tres mejores medios para determinar el efecto que causan sobre el hongo a concentraciones bajas y concentraciones altas. Se comparo así concentraciones de: alta, media y baja para Avena, Soja y Malta. Los resultados se observan en el Cuadro 5.

Cuadro N° 5: Cuadro ordenado de tres medios de cultivo en tres concentraciones.

MEDIO		Avena (T1)			Soja (T2)			Malta(T3)		
Dosis		Baja (D1)	Media (D2)	Alta (D3)	Baja (D1)	Media (D2)	Alta (D3)	Baja (D1)	Media (D2)	Alta (D3)
tratamientos		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Repeticiones	1	45.00	55.00	55.00	60.00	80.00	90.00	67.00	50.00	33.00
	2	45.00	55.00	55.00	60.00	80.00	90.00	70.00	50.00	33.00
	3	45.00	55.00	53.00	60.00	8.00	90.00	67.00	50.00	40.00
	4	45.00	55.00	60.00	52.00	80.00	90.00	65.00	45.00	40.00
	5	45.00	60.00	70.00	70.00	80.00	90.00	67.00	45.00	40.00
Total tratamientos		225.00	280.00	293.00	302.00	328.00	450.00	336.00	240.00	186.00
Total medios		798.00			1080.00			762.00		
Total dosis		1143.00	848.00	929.00						
Promedio tratamientos		45.00	56.00	58.60	60.40	65.60	90.00	67.20	48.00	37.20

Cuadro N° 6: Análisis de varianza del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en diferentes medios de cultivo y concentraciones.

FUENTE DE VARIACIÓN	G.L.	S.C.	C.M.	F CALCULADO	F TEÓRICO	
					5%	
Tratamiento	8	11290.8000	1411.35000	107.19	2.2244	*
Medios	2	6193.6000	3096.800000	235.20	3.2740	*
Concentraciones	2	170.8000	85.400000	6.49	3.2740	*
Medios*Concentraciones	4	170.8000	1231.600000	93.54	2.6480	*
Error	36	474.0000	13.116667			
Total	44	11764.8000				
CV (%)	6.020891%					
Promedio	60.27					

En el cuadro 6, donde se muestra los resultados del análisis de varianza (Anova), se puede observar que en la comparación de concentraciones de medios de cultivo para crecimiento micelial del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri*, nos proporciona como resultado diferencias significantes entre los medios estudiados. El coeficiente de varianza fue 6.02 %, que está dentro del rango permitido para esta clase de experimento. Hay diferencias estadísticas significantes en el tratamiento, medios, concentraciones y la interacción medios y concentración, se realizó la prueba de Tukey con 5 % de significación para la determinación del tratamiento utilizado en el

crecimiento micelial del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* indico un valor superior, donde los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla N° 5: Tukey al 5% para medios del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri*.

OM	MEDIO	PROMEDIO mm	NIVEL DE SIGNIFICANCIA Tukey 5%
I	T2	76.800	a
II	T1	53.200	b
III	T3	50.800	b

En la Tabla N° 5, la prueba de significación Tukey al 5% para crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri*, para medios, se observa que el medio Soja, ocupó el primer lugar con una media de 76.800 mm, con respecto a los otros medios.

Según la prueba estadística de Tukey, se muestra 2 grupos, la categoría (a) conformada por el Factor T2 (Soja-agar); y la categoría (b) conformada por el Factor T1 (Avena-agar) y T3 (Malta). La presencia de dos sub grupos nos indica que existe diferencia significativa entre el promedio de concentraciones de medios.

Tabla N° 6: prueba de significación de Tukey al 5% para concentraciones en el crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri*

OM	TRATAMIENTO	PROMEDIO mm	NIVEL DE SIGNIFICANCIA Tukey 5%
I	D3	61.933	a
II	D2	61.333	a
III	D1	57.533	b

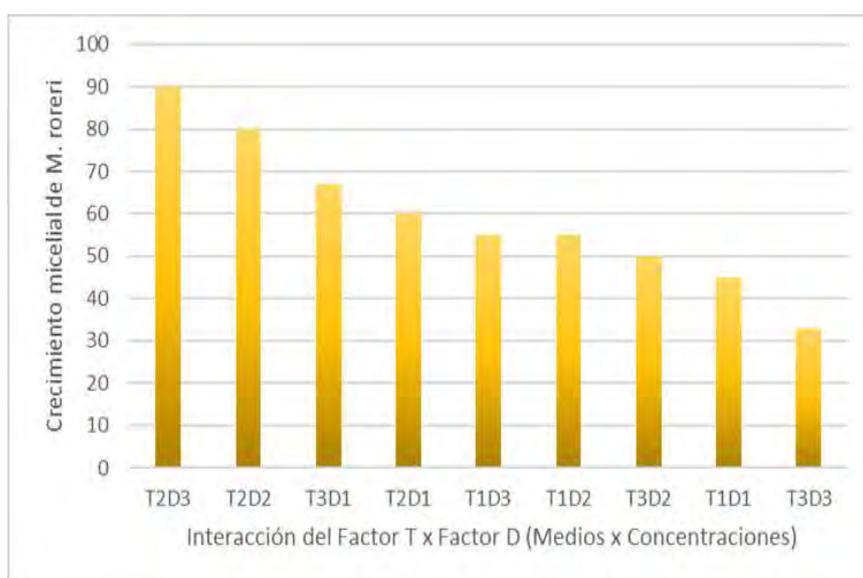
En la tabla N° 6, prueba de significación de Tukey al 5% para crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri*, Factor D (concentraciones), se observa que, el Factor D3 (Alta), ocupó el primer lugar con promedio de 61,933 mm, con respecto a los otros factores.

Según la prueba estadística de Tukey, se muestra 2 categorías, la categoría (a) conformada por el Factor D3 (Alta) y D2 (media) y la categoría (b) conformada por el Factor D1 (baja). La presencia de dos sub grupos nos indica que existe diferencia significativa entre el promedio de concentraciones de medios.

Tabla N° 7: Tukey al 5% para crecimiento micelial los 12 días de siembra para la interacción de medio por concentración.

OM	CODIGO	TRATAMIENTO	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA
			mm	Tukey 5%
I	T2D3	T6	90	a
II	T2D2	T5	80	ab
III	T3D1	T7	67	b
IV	T2D1	T4	60	b
V	T1D3	T3	55	b
VI	T1D2	T2	55	b
VII	T3D2	T8	50	b
VIII	T1D1	T1	45	b
IX	T3D3	T9	33	b

Gráfico 2. Crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en tres medios a tres concentraciones diferentes.



En la tabla N° 7 y Grafico 2, prueba de significación de Tukey al 5% para crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en la interacción del Factor T x Factor D (Medios x Concentraciones), se observa que, T2D3 (Soja-agar x concentración alta), ocupó el primer lugar con un promedio de 90 mm, seguido de T2D3 (Soja-agar x concentración media) con 80 mm. Según la prueba estadística de Tukey al 5%, se muestra 3 categorías, la categoría (a) conformada por la interacción T2D3 (Soja-agar x concentración alta); la categoría (ab) conformada por la interacción T2D2 (soja x concentración media); y la categoría (c) conformada por las interacciones T2D2 (Soja-agar x concentración media); T3D1 (Malta-agar x concentración baja); T2D1 (Soja-agar x concentración baja); T1D3 (avena x concentración alta); T1D2 (avena x concentración media); T3D2 (malta x concentración media); T3D2 (malta x concentración media) y T3D2 (malta x concentración media). La presencia de 3 categorías nos indica que, hay diferencia estadística entre los promedios de crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri*.

Discusiones:

De los 9 tratamientos evaluados por medios de cultivos a diferentes concentraciones, se registró el crecimiento micelial por diámetro de micelio cada 72 hrs incubación a 25° C en cámara de incubación, donde *Moniliophthora roreri* mostró un crecimiento micelial de 90 mm de diámetro en 12 días de incubación; en el medio nutritivo de agar-Soja a una concentración alta como el óptimo para su crecimiento y se considera para la continuidad del estudio.

Este mayor crecimiento se deriva del elevado contenido de aminoácidos y proteínas fundamentales de la Soja.

Suarez (2006), menciona que el mejor medio para el crecimiento de *M. roreri* es PDA, lo cual difiere con los resultados encontrados, donde PDA presentó un crecimiento

mínimo comparado al de agar-Soja, esto puede deberse a que las condiciones para la prueba de desarrollo se establecieron a una temperatura de 28 ° C.

6.3 Aislamiento e identificación de *Trichoderma* spp.

Colecta de muestras

Las muestras se colectaron de Alcuzama Alta, Alcuzama Baja, Ichiquiato, Alta Rosalinas, Sahuayaco, Palma Real, Ivochote y Yomentoato parcelas ubicadas en el distrito de Echarate en el periodo de noviembre-febrero (fotografía 14.)

Fotografía 14. Colecta de muestras de suelo en el Distrito de Echarate-La Convención-



En la Fotografía 14. se muestra el proceso de obtención de muestras de suelo en el cultivo de cacao para el aislamiento de antagonistas.

Se aisló nueve colonias de *Trichoderma spp*, considerando que de Ichiquiato se logró obtener dos aislados. Los aislados se sembraron en medio de cultivo soja – agar y PDA en condiciones de 12 horas luz y oscuridad a 25 °C de incubación, lográndose cultivos puros.

El aislamiento de *Trichoderma spp*. se realizó con satisfacción en el medio soja - agar debido a que se logró la esporulación y mejor desarrollo de colonias presentado conidióforo, fiálides y conidios. Las cepas utilizadas fueron seleccionadas macroscópicamente por su estructura micelial relacionada con el tipo de micelio que

producen los hongos del género *Trichoderma*. El resto de los aislamientos que no mostraron semejanza con los hongos del género *Trichoderma* se descartaron en las evaluaciones.

Tabla N° 8: Localidad y procedencia de aislados de hongos antagonistas de *Moniliophthora roreri*.

GENERO	Código	Procedencia	Localidad
Trichoderma	Th- 1	suelo	Sahuayaco
Trichoderma	Th- 2	suelo	Palma real
Trichoderma	Th- 3	suelo	Yomentoato
Trichoderma	Th- 4	suelo	Alta Rosalina
Trichoderma	Th- 5	suelo	Ivochote
Trichoderma	Th- 6	suelo	Alcuzama alto
Trichoderma	Th- 7	suelo	Ichiquiato
Trichoderma	Th- 8	suelo	Alcuzama bajo
Trichoderma	Th- 9	suelo	Ichiquiato

Identificación de *Trichoderma spp.* mediante características morfológicas

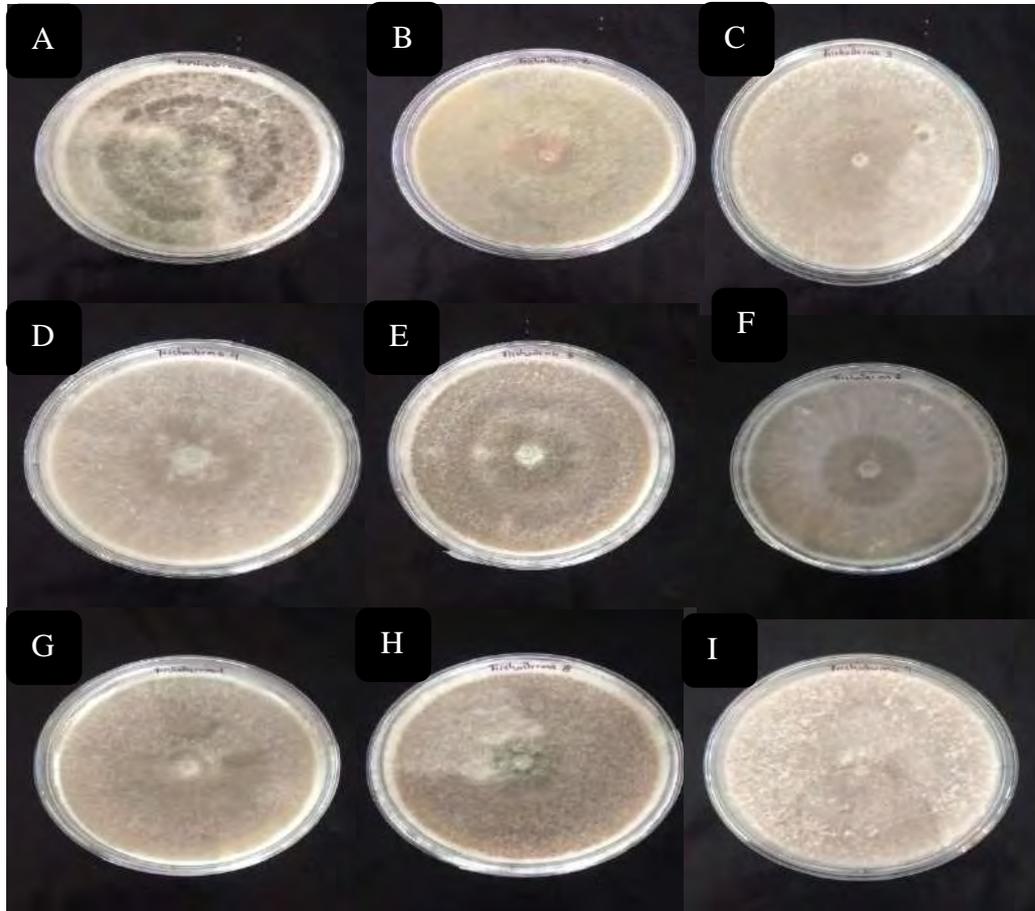
- **Características macroscópicas de *Trichoderma spp.* de Echarate.**

Las colonias de *Trichoderma* se cultivaron en medio de Soja-Agar y se observaron detalladamente las características de todas las cepas, tales como: color, borde, textura, tinción del medio, forma y presencia de anillo. (Tabla 9, Fotografía 15).

Tabla N° 9: Características morfológicas macroscópicas típicas de cepas de *Trichoderma spp.*

CEPAS DE TRICHODERMA Spp.	FORMA	TEXTURA	SUPERFICIE	COLOR REV.	COLOR ESPORA	COLO R ANV.	BOR DE
Th -1	Anillo interior	Algodonosa	Superficial	Marrón	Verde oscuro	blanco	Enter o
Th -2	Radial	Algodonosa	Invasiva	Amarillo	Verde	Verde amarill o	enter o
Th -3	Anillos concéntricos	Algodonosa	Superficial	Blanco	Verde jade	blanco	enter o
Th -4	Anillo interior	Algodonosa	Superficial	Blanco	Verde oscuro	blanco	Enter o
Th -5	Anillo interior	Algodonosa	Superficial	Blanco	Verde claro	blanco	Enter o
Th -6	Radial	Algodonosa	Superficial	Blanco	Amarrillo y verde	blanco	Enter o
Th -7	Anillos concéntricos	Algodonosa	Superficial	Blanco	Verde	blanco	Enter o
Th -8	Anillo interior	Algodonosa	Superficial	Blanco	Verde claro	amarill o	Enter o
Th -9	Radial	Algodonosa	Superficial	Blanco	Verde claro	Blanco	Enter o

Fotografía 15. Morfología de las 9 cepas de *Trichoderma* spp. con actividad antagonista a los 7 días de crecimiento A: Th 1, B: Th 2, C: Th 3, D: Th 4., E: Th 5, F: Th 6, G: Th 7, H: Th 8, I: Th 9



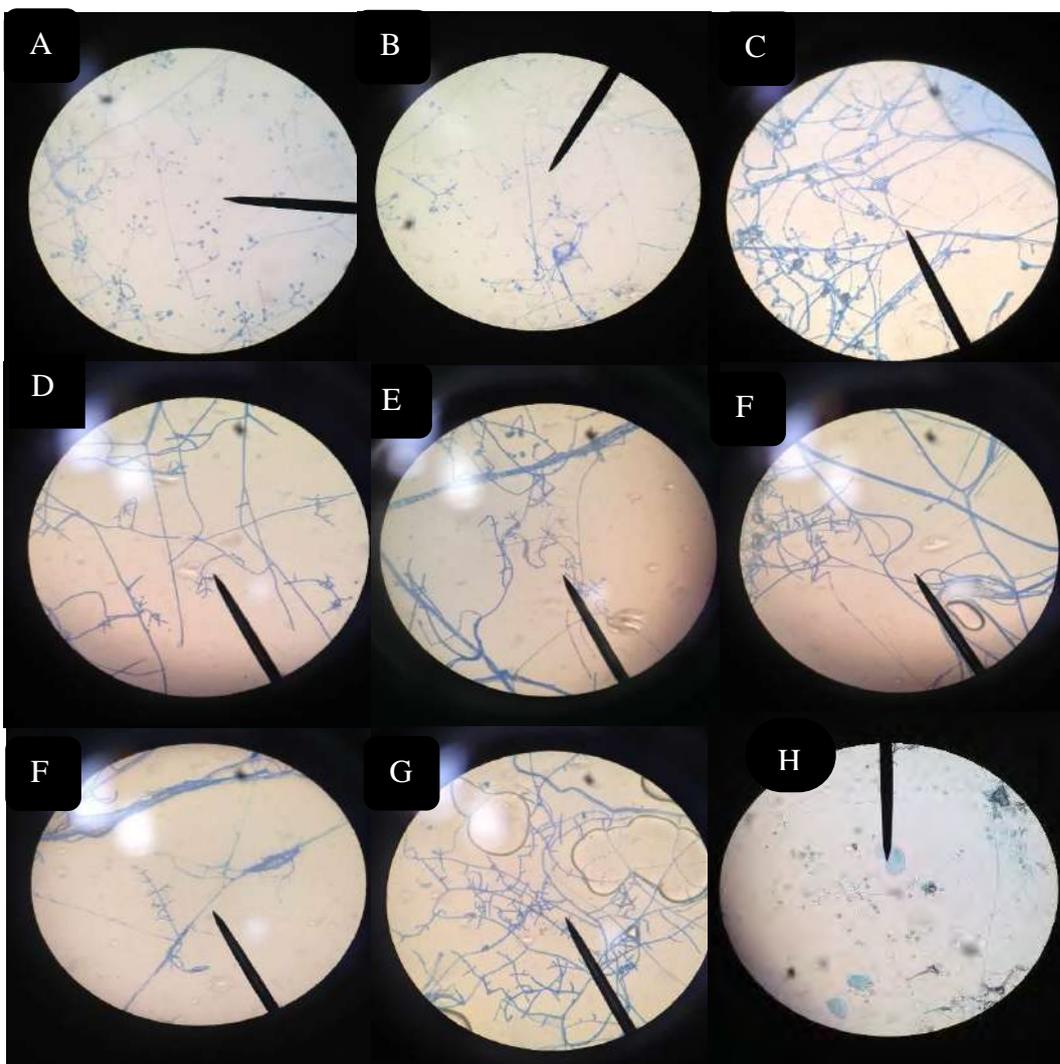
▪ **Características microscópicas de *Trichoderma* spp. de Echarate.**

Mediante observaciones microscópicas de *Trichoderma* spp. se hicieron evaluaciones, los cuales indican que las cepas Th-1, Th-2, Th-9, muestran conidias ovoides ligeramente, dispuestos en grupos en rosetas, clamidosporas globosas, fiálides apicales arregladas en verticilos cruzados en conjuntos de 3 a 4 y conidióforos ramificados. Las cepas Th-3, Th-4,

Th-5, Th-8 y Th-6 muestran conidias ovoides y fiálides en par o triadas a lo largo del conidióforo, con el centro más ancho que la base (Tabla 9). La cepa Th - 7 presenta hifas ramificadas, donde se desprenden conidióforos ramificados también, en el cual

son desarrollados fiálides con forma de botellas que generan los conidios en varias ocasiones en formación de cabezas conidiales. No obstante, dado que las características macro y microscópicas son cambiantes, no posibilitan distinguir entre especies, ello demuestra la relevancia de las características moleculares.

Fotografía 16. Características microscópicas de las 9 Cepas de *Trichoderma* spp. con actividad antagonista a los 7 días de crecimiento A: Th-1, B: Th- 2, C: Th- 3, D: Th- 4., E: Th- 5, F: Th- 6, G: Th- 7, H: Th- 8, J: Th- 9



Discusiones:

La metodología usada para el aislamiento permitió aislar nueve cepas pertenecientes al género *Trichoderma*, estos se recolectaron en fincas donde los árboles del cacao tienen más de 40 años y crecen en suelos franco-arenosos en presencia de materia orgánica, (**Papavizas, 2003**), indica que hongo *Trichoderma* spp. habita en varios tipos de suelos, especialmente aquellos ricos en materia orgánica en descomposición

Alexander (1997), manifiesta que, en la rizosfera bajo el cultivo de cacao y bosques maderables, hay amplias variedades de hongos del suelo, porque en estos agroecosistemas hay capas de materia seca, los cuales resultaron de la caída de la fitomasa de los árboles maderables introducidos y nativos empleados de forma general para el sombrío permanente.

Sobre la caracterización de los caracteres morfológicos de las cepas de *Trichoderma* spp. con el potencial de control biológico en este estudio, los aislamientos mostraron la forma típica de las colonias de *Trichoderma* spp. con la formación de anillos concéntricos verdes en el sitio de esporulación, cada cepa aislada, Th1, Th 4 y Th 9 tienen un tono verde diferente. En los primeros días, el color del micelio es blanco y después se vuelven en verde oscuro luego de la formación de las esporas, mientras que el color del micelio de las cepas Th 2, Th 5 y Th 6 es blanco en los primeros días, y luego se vuelve de un color verde claro-amarillo, y la cepa Th 3 mostró micelio blanco durante todo su proceso de crecimiento, y finalmente las cepas Th 7 y Th 8 mostraron un color verde jade después de la formación de las esporas. Cada una de las cepas de *Trichoderma* utilizadas en la investigación crecieron aceleradamente en el medio de Soja-agar a 25 ° C con pH ácido es 6,18 en 4 días Las colonias inicialmente formaron pústulas blancas parecidas al algodón, y luego se compactaron

y formaron esporas, que fueron verdes y granulares con conidióforos visibles cerca de las pústulas.

Según los estándares de identificación taxonómica de **Barnett y Hunter (1999)**, la forma y pigmentación del micelio observadas en cepas naturales pertenecen a *Trichoderma*.

Se observó a nivel microscópico los conidióforos, hifas hialinas segmentadas y conidios redondos son similares a los indicados para otras especies del género con coincidencias con las descripciones de investigación realizada por **Druzhinina et al., (2006)**. Hay diferencias entre estas características de las cepas nativas y no hay similitud entre sí, a razón de esto es complicado su agrupación y también poder definir especies con los datos (**Gupta et al., 2014**).

6.4 Prueba para determinar el desarrollo micelial por día de los antagonistas *Trichoderma spp.*

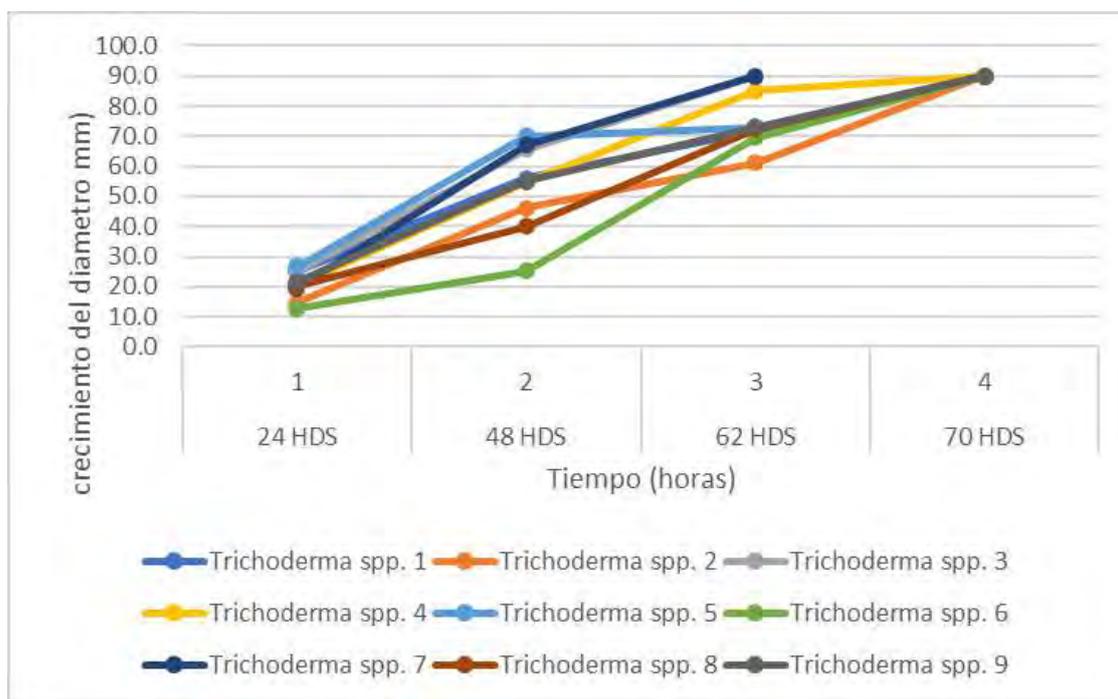
El proceso de más rápido crecimiento es *Trichoderma spp. 7* (TA7) y *Trichoderma spp. 3* (TA3), presentan los crecimientos más rápidos con 100% cubriendo a las horas 62 horas. Por otro lado, los tratamientos con *Trichoderma spp. 6* (TA6) y *Trichoderma spp. 2* (TA2) son los de crecimiento más lento, cubriendo íntegramente la placa de Petri en 70 horas (Grafico 3). Los resultados del análisis de varianza (Cuadro 8) indican que hay una diferencia significativa entre los promedios de estos tratamientos. En conformidad con la prueba de Tuckey (tabla 10), los valores promedio de estos tratamientos tienen diferencias significativas en el desarrollo micelial, a un nivel de 0.05.

Cuadro N° 7: Diámetro de desarrollo micelial (mm.) por día de los antagonistas *Trichoderma* spp. a 28 °C. en la prueba “in Vitro en medio soja-agar.

DESARROLLO MICELIAL POR DIA/mm					
TRATAMIENTO	<i>Trichoderma</i> spp.	24 HDS	48 HDS	62 HDS	70 HDS
TA1	<i>Trichoderma</i> spp. 1	25.2	56	72	90
TA2	<i>Trichoderma</i> spp. 2	14.7	46.2	61	90
TA3	<i>Trichoderma</i> spp. 3	25	65.5	90	
TA4	<i>Trichoderma</i> spp. 4	20.7	54.7	85	90
TA5	<i>Trichoderma</i> spp. 5	27	70	73	90
TA6	<i>Trichoderma</i> spp. 6	12.8	25.1	70	90
TA7	<i>Trichoderma</i> spp. 7	19.4	67	90	
TA8	<i>Trichoderma</i> spp. 8	20	40	73	90
TA9	<i>Trichoderma</i> spp. 9	21.5	55	73	90

*Hds: horas después de la siembra

Gráfico 3. Desarrollo micelial (mm.) de los biocontroladores nativos (*Trichoderma* spp.1, a 28 °C. en la prueba “in Vitro”



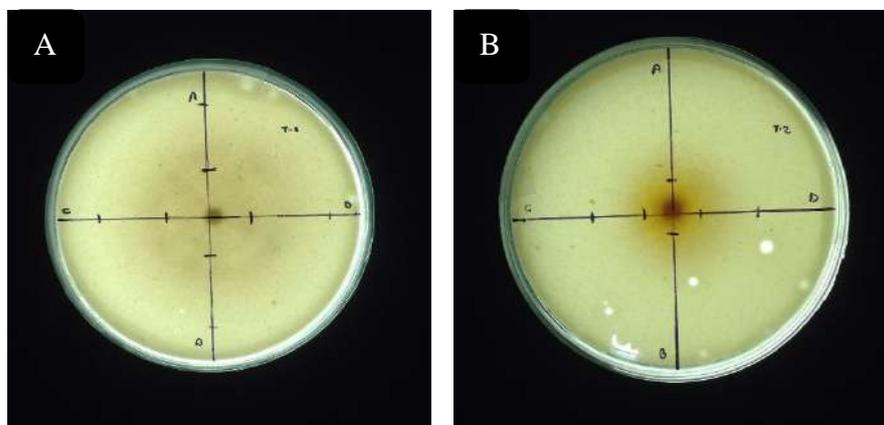
Cuadro N° 8: Análisis de varianza en D.C.A. para datos obtenidos a las 70 horas después de la siembra de desarrollo micelial (mm) por día de los antagonistas *Trichoderma spp.* a 28 °C. en la prueba “in Vitro”.

Fuentes de variabilidad	G.L.	S.C.	C.M.	F calculado	F teórico 0.05	Significancia
Entre cepas	8	4626.58333	578.32292	3762,58	2.2200075	*
Error experimental	45	6.916667	0.153704			
Total	53	4633.5	C.V. = 0.5136%			

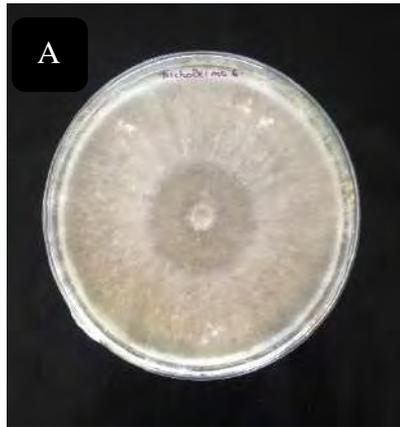
Tabla N° 10: Prueba de Tuckey para los promedios de desarrollo micelial por día de los antagonistas *Trichoderma spp.* a 28 °C. en la prueba “in Vitro” Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes (P<0.05) según prueba de Tukey.

TRATAMIENTOS	CEPAS	PROMEDIO mm	NIVEL DE SIGNIFICANCIA Tukey 5%
TA3	Th-3	90.00	a
TA7	Th-7	90.00	a
TA4	Th-4	85.00	b
TA9	Th-9	73.00	c
TA5	Th-5	73.00	c
TA8	Th-8	72.91	c
TA1	Th-1	72.00	d
TA6	Th-6	69.83	e
TA2	Th-2	61.25	f

Fotografía 17. A: Trichoderma 1 Sahuayaco B: Trichoderma 2 Palma Real, 48 horas después de la siembra.



Fotografía 18. *Trichoderma* spp. 6 Alcuzama Alto, 70 horas después de la siembra.



Discusiones:

El diámetro de *Trichoderma* spp. 3 en Soja - agar es de 25 mm día-1, de esta manera la superficie del medio queda completamente cubierta después de 62 horas, característica cuando existe alto contenido alimentario suficiente y abundante en carbohidratos. El diámetro de *Trichoderma* spp. 7 siendo superior que otros hongos en estudio, como: *Trichoderma* spp. 5 (8 mm el 1er día), *Trichoderma* 8 (11 mm el 1er día) y *Trichoderma* spp. 2 (2 mm el 1er día), el resultado puede estar relacionado con el contenido descrito en otros informes (**Biocontrol, 2003 y Humeres, 2004**). Los cuales indicaron que *Trichoderma* spp., si bien tiene actividad fúngica parasitaria y antagonista antibacteriana, la actividad antagonista provocada por la competencia nutricional es la más destacada, debido al género *Trichoderma* spp. combate por los nutrientes y el espacio en la rizosfera. Por esta razón, es necesario contar con un mejor desarrollo micelial que los patógenos vegetales. Cuando el rizoplano está completamente cubierta, puede protegerse a través de la actividad antagonista del parasitismo fúngico y la autonomía de antibióticos que impiden el crecimiento del fitopatógeno.

Harman (2000), manifiesta que las diferencias en cuanto al tiempo de desarrollo micelial pueden estar asociados a distintos factores como, a las especies de *Trichoderma*, a la localidad y sus respectivos potenciales antagonistas, incluso en cepas de la misma especie. Esto permite justificar las variantes en cuanto al tiempo de crecimiento indicado por los diversos conjuntos de aislados hallados para esta investigación.

Aunque las especies de *Trichoderma* generalmente crecen rápidamente y pueden cubrir la superficie de una placa de Petri en unas pocas horas, el hecho de que los aislados de *Trichoderma* crezcan lentamente no implica que no sea un antagonista adecuado. **Cúndom et al., (2002)**, donde confirmaron que el índice de crecimiento no es una barrera para aislamientos con buen potencial antagonista encontrados en dichos hongos.

6.5 Biocontrol de nueve cepas de *Trichoderma spp.* frente a *Moniliophthora roreri* en prueba de enfrentamiento a nivel “in Vitro”.

MICOPARASITISMO

Después de los 21 días de evaluar el enfrentamiento *Trichoderma-Moniliophthora*, se determinó un nivel de antagonismo en conformidad con la escala de **Ezziyyani et al. (2004)**. (Grafica 4).

En cuanto al micoparasitismo, solo los tratamientos Th-7, Th-4, Th 3, Th-8 y Th-9 presentaron micoparasitismo completo en grado 4, los tratamientos Th-5, Th-1 y Th 6 presentaron micoparasitismo 3, mientras que Th- 2 presento micoparasitismo grado 2 (Grafica 4).

Esto puede deberse a que *Trichoderma spp.* posee la aptitud de dirigir sus hifas a los de otros hongos y enrollarse en ellas (**Ezziyyani et al., 2011; Martínez et al., 2013**)

la cual consistente con la observación de algunas combinaciones microscópicas de entrelazamientos de hifas (fotografía N ° 20).

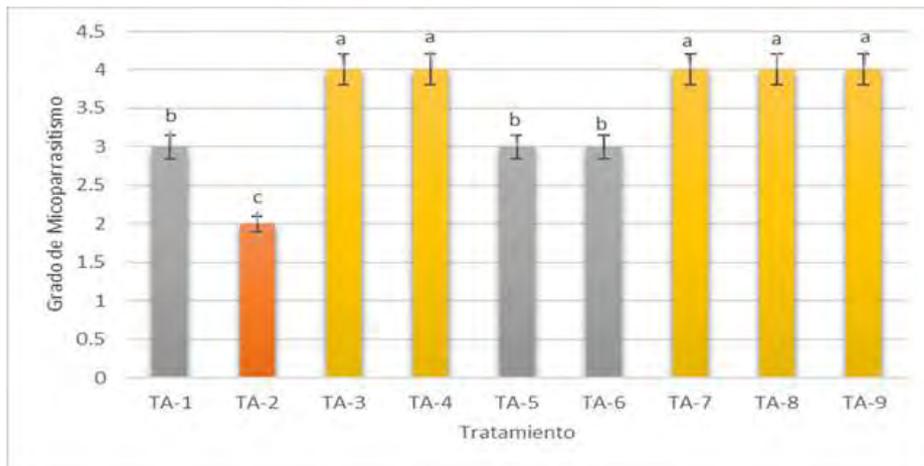
Lo que sucede en la reacción mediada por la secreción de lecitina y enzimas hidrolíticas que degradan las paredes celulares del hospedero. Este proceso restringe el crecimiento y la acción de hongos patógenos y ciertas especies de *Trichoderma spp.* se sabe que produce enzimas de alta degradación de las paredes celulares, como celulasa, quitinasa, proteasa y glucanasa que afectarán la pared celular del hongo parásitos **(Fernández-Larrea, 2001; Infante et al., 2009 y Waghunde et al., 2016)**

Por ejemplo, se halló que cepas de diversas especies de *Trichoderma* tienen actividad fúngica parasitaria contra *M. roleri*, generando que se enrollen y penetren las hifas de los antagonistas de los fitopatógenos **(Michel, 2001)**.

Por ello, es requerido seguir confirmando el micoparasitismo de las cepas que presentan micoparasitismo para especificar cual enzima exactamente interviene en el proceso.

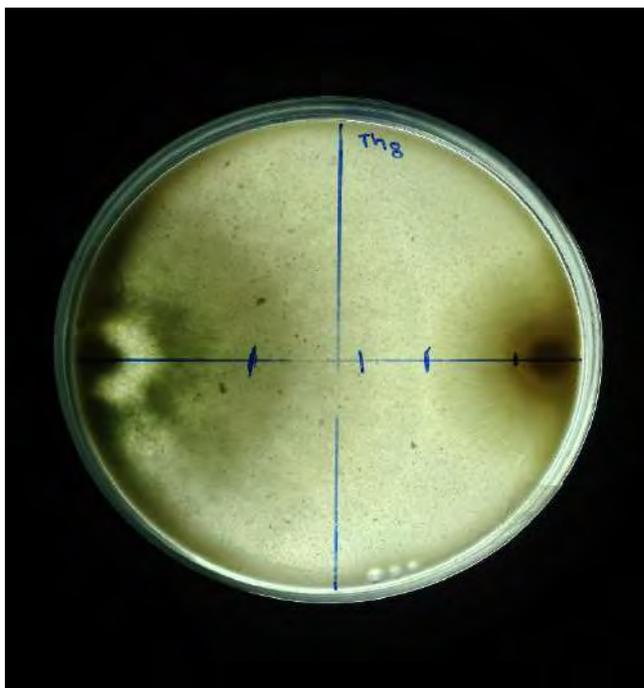
Entre los aislamientos Th-1, Th-5 y Th-2. Los resultados más óptimos de micoparasitismo *in vitro* se dieron para Th-7, Th-3, Th-4, Th-8, Th-9. (gráfica 4).

Gráfica 4. Grado de micoparasitismo de 9 tratamientos (TA), correspondientes a cultivos duales de los aislamientos de *M. roreri* (Mxx-1) frente a los distintos aislamientos de *Trichoderma* nativos (TA-1, TA-2, TA-3, TA-4, TA-5, TA-6, TA-7, TA-8, TA-9) respectivamente, al décimo día de evaluación. Letras diferentes indican diferencias significativas para Tukey = 0,05.



Fotografía 19. A) Cultivo dual de cepa de *Trichoderma* spp. vs *Moniliophthora roreri*, izquierda *Moniliophthora roreri* derecha *Trichoderma* spp.

ANVERSO



REVERSO



PORCENTAJE DE INHIBICIÓN

En la Tabla N ° 11, se presenta el análisis de varianza al 5 %, para la variable del porcentaje de inhibición de cepas nativas de *Trichoderma spp* sobre *Moniliophthora roreri*, en el cual se indica que hay diferencias existentes entre medias de los tratamientos. Un 4.098% fue en el coeficiente de variabilidad.

Tabla N° 11: Análisis de varianza (ANOVA) para la variable de porcentaje de inhibición.

Fuentes de variabilidad	G.L.	S.C.	C.M.	F calculado	F teórico 0.05	Significancia
Entre tratamientos	9	15593.27159	1732.58573	837.5	2.04	*
Error experimental	60	124.12514	2.0875			
Total	69	15717.39674	C.V. = 4.098066%			

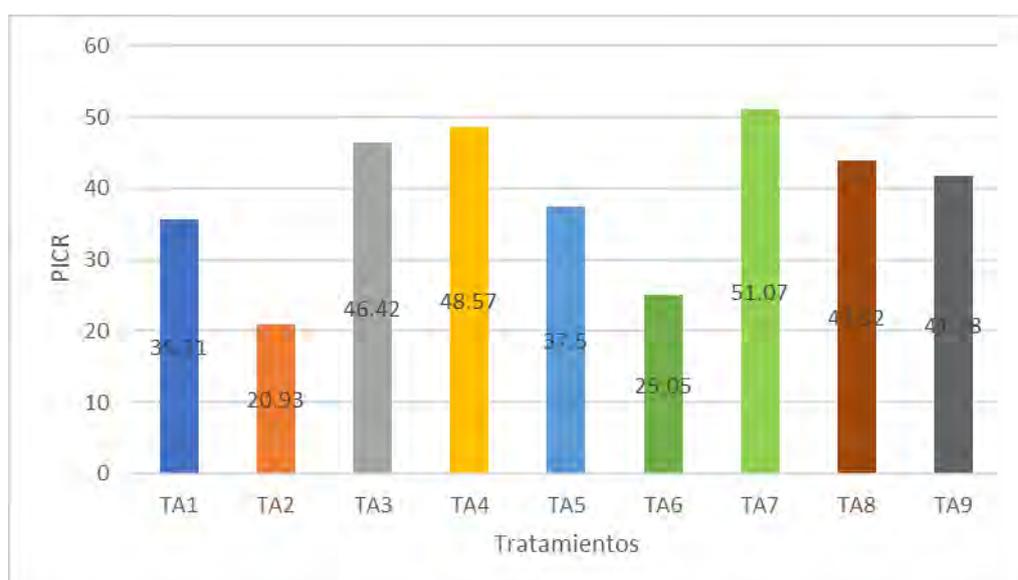
La Tabla N ° 12 muestra el porcentaje de inhibición de las cepas nativas *Trichoderma spp.* sobre *M. roreri*. Se comprobó que hay diferencia significativa, se obtienen 8 grupos estadísticos en conformidad con la prueba de (Tukey; $p < 0.05$). Entre los 10 tratamientos, formaron 7 grupos constituidos por las letras diferentes (de la A-G), y la tasa de inhibición varió de 51.07 % al 20.93 %; el octavo grupo representado por H constituye (T0 = testigo absoluto), y su porcentaje antibacteriano de 0 %.

El mayor de cada uno de los tratamientos reportados fue T7 con valores de 51.07 %, que constituye a la cepa (Th-7). Los demás tratamientos consiguen porcentajes de inhibición inferiores al 48,57 %. T2 es el más bajo, lo que corresponde a una cepa (Th-2) del 20,93%. (Grafica 5).

Tabla N° 12: Inhibición de *Trichoderma spp.* a *Moniliophthora roreri*

TRATAMIENTOS	CEPAS	Medias (%)	NIVEL DE SIGNIFICANCIA Tuckey = 0.05
T7	Th-7	51.07	A
T4	Th-4	48.57	AB
T3	Th-3	46.42	BC
T8	Th-8	43.92	CD
T9	Th-9	41.78	D
T5	Th-5	37.5	E
T1	Th-1	35.71	E
T6	Th-6	25.05	F
T2	Th-2	20.93	G
T0	Mr-A	0	H

Grafica 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de 9 tratamientos (TA), correspondientes a cultivos duales.



Discusiones:

Con respecto al valor porcentual de inhibición de *Trichoderma spp.* sobre *M. roreri*, **Ramírez (2017)**, señaló que cuando se utilizaron 11 aislamientos de *Trichoderma*, el resultado que obtuvieron fue que el porcentaje del aislado CP24-6 fue el más elevado, 57.27 %, y el más bajo, el porcentaje perteneciente a este aislado fue 33.36 % CP11-3 a su vez señaló que el aislado de *Trichoderma* tuvo contacto micelial al tercer día

posterior al enfrentamiento. Mientras, **Rojas (2013)** obtuvo el 55,63% más alto y el 1,7% más bajo del efecto antibacteriano de *Trichoderma* sobre *M. royeri* y estos resultados fueron mejores que los encontrados en esta investigación, probablemente puede deberse a que las condiciones de la prueba de desarrollo se establecieron a una temperatura de 30 °C y sin días de ventaja para el patógeno.

Mientras, **Tuquerres (2016)**, concluye que a través del cultivo dual los aislados del género de *Trichoderma* frente a *M. royeri*, las cepas indican un porcentaje superior de inhibición en el crecimiento micelial incubados al 28° C, siendo en su quinto día 29,61% en el asilado de UEA-T3, continuado de UEA-T1, 29,01 de UEA-T2 y 27,27% en cada caso, se evidencia que los resultados son menores con los resultados logrados en relación a este estudio, porque en el cuarto día de evaluación, el porcentaje máximo de cepas (Th-7) fue del 51,07%, mientras que el porcentaje más bajo de cepas (Th-2) fue del 20,93%. Ello sería por el nivel de temperatura utilizado en esta investigación, el cual fue de 25 °C de incubación.

VII. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

7.1 Conclusiones

- ✓ Se aisló e identificó mediante características morfológicas a *Moniliophthora roreri* a partir de muestras de mazorca de cultivos de cacao (*Theobroma cacao* L.) presentando características macroscópicas como: coloración beige, textura pulverulenta, formación de anillos y centro puntiforme; también presento características microscópicas como: esporas globosas, sub globosas y elípticas. Características típicas de *Moniliophthora roreri*
- ✓ El mejor medio de cultivo se obtuvo con el medio: Soja- agar en una concentración Alta de 500 gr con un índice de crecimiento de 90 mm, el segundo medio fue Soja-agar con una concentración Media de 250 gr con un promedio de 80 mm y el tercer medio fue Malt Extracto Agar Base-agar con una concentración Baja de 30 gr con un promedio de 67mm.
- ✓ Se aisló e identificó mediante características morfológicas nueve cepas nativas de *Trichoderma* spp. (Th-1, Th-2, Th-3, Th-4, Th-5, Th-6, Th-7, Th-8 y Th-9) de muestras de suelo de cultivos de cacao (*Theobroma cacao* L.) del distrito de Echarate presentando características macroscópicas como: coloración verde, textura algodonosa, formación de anillo; también presento características microscópicas como: clamidosporas, fiálides, conidias y conidióforos. Características típicas de *Trichoderma* spp.
- ✓ Todos los *Trichodermas* spp. tuvieron un crecimiento micelial superior a *Moniliophthora roreri*, por lo tanto, demuestra mejor uso de nutrientes.
- ✓ Los aislados nativos Th-7, Th-4 y Th-3 con 51.07%, 48.57% y 46.42% respectivamente son antagonistas con una alta capacidad de antagonismo, competencia por espacio, micoparasitismo e inhibición del crecimiento del

patógeno Mr-A de *Moniliophthora roreri*, consiguientemente poseen el mayor potencial de biocontrol de acuerdo con las pruebas a nivel de laboratorio.

7.2 Sugerencias

- ✓ Realizar una prospección de todas las zonas cacaoteras sobre microorganismos aislados de cultivos asociados con cacao.
- ✓ Conservar la cepa del patógeno para su estudio de patogenicidad y virulencia.
- ✓ Conservar las cepas nativas para su estudio de enzimología, para determinar que enzimas participan en la degradación de paredes celulares del fitopatógeno.
- ✓ Continuar la investigación de *Trichoderma* en otras localidades y variaciones de pisos ecológicos y de esta manera tener a disposición diferentes aislados y evaluar el comportamiento
- ✓ Capacitar y poner en práctica esta investigación con los agricultores de las distintas localidades de la provincia de La Convención, y analizar con ellos los rendimientos y el costo de producción con el uso de *Trichoderma*.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, M. (1997).** *Introducción a la microbiología del suelo. Segunda edición.* John Wiley y Sons, New York. 467 p.
- Argumedo, A. M. (2004).** *EL GÉNERO FÚNGICO Trichoderma Y SU RELACIÓN CON CONTAMINANTES ORGÁNICOS E INORGÁNICOS.*
- Arnold, A., Maynard, Z., Gilbert, G., Coley, P., & Kursar, T. (2000).** *Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? Ecology letters.* 3:267-274.
- Arvelo, M. A., González, D., Delgado, T., Maroto, S., Montoya, P., & Delgado, T. (2017).** *Estado actual sobre la producción, el comercio y cultivo del cacao en América.* . San José, C.R.: 152 p.
- Arvelo, M. A., González, D., Delgado, T., Maroto, S., Montoya, P., & Delgado, T. (2017).** *Manual del cultivo de cacao Buenas prácticas para América Latina.* . In Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).
- Barnett, H., & Hunter, B. (1999).** *Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition.* Minnesota, United States of America.: The American Phytopathological Society. 218 p.
- Barros, O., & Sanchez, J. (1979).** *Un método de aislamiento del hongo Monilia roleri, Cif y Par. Información técnica. El cacaotero Colombiano. No. 11, diciembre.*
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004).** *Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains.* International Microbiology, 7:249-260.
- Biocontrol. (2003).** *Monografía Trichoderma spp. Palmira, Colombia. 15 p.* .
- Cerrón, G. (2012).** *Asistencia técnica dirigida en el manejo del cultivo de cacao.* Satipo-Junin: Agrobanco. 38 p.
- Cúndom, M. A., Maza, S. M., Mazzanti, M. A., Gutiérrez, S. A., & Couthino, M. (2002).** *Actividad antagónica in vitro de hongos saprófitos del departamento*

Capital, provincia de Corrientes, Argentina, contra *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fitopatología* 37:133-141.

Druzhinina, I., Kopchinskiy, A., & Kubicek, C. (2006). *The first 100 Trichoderma species characterized by molecular data. Mycoscience. Viena, AT. 47:55-64.*

Ezziyyani, M., Pérez, S. C., Requena, M. E., & Rubio, L. C. (2004). *Biocontrol por Streptomyces rochei-Siyani-, de la podredumbre del pimiento (Capsicum sicum anunum ausadapor Phytophthora capsici. Anales de Biología 26: 69-78.*

Fernández-Larrea, O. (2003). *Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Biocontrol Science and Technology. Turrialba (Costa rica): CATIE 62:96-100.*

Fundación Hondureña de Investigación Agrícola, [FHIA]. (2012). *La Moniliasis del cacao: el enemigo a vencer. La Lima, Cortés, Honduras, C.A.: FHIA.*

González, A., & Roble, A. (2014). *Aislamiento y caracterización del hongo moniliophthora roreri (Monilia) en frutos de Theobroma cacao L. (cacao) del cultivar San José del Real de la Carrera, Usulután. Tesis. Lic Q.F. Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. San Salvador, SV.*

Gupta, V., Schomoll, M., Estrella, A., Upadhyaya, R., Druzhinina, I., & Tuohy, M. (2014). *Biotechnología y Biología de Trichoderma.*

Harman, G. (2000). *Trichoderma spp., Incluyendo T. harzianum, T. viride, T. koningii, T. hamatum y otra spp. Deuteromycetes, Moniliales (sistema de clasificación asexual).*

Howell. (2003). *Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases:.*

- Humeres, C. (2004).** *Evaluación de la capacidad biocontroladora de dos cepas nativas de Trichoderma spp. Sobre aislados de hongos. Tesis para optar el título de Ing. Agrónomo. Talca. .*
- Infante, D. M. (2009).** *Trichoderma mechanisms of action against phytopathogen fungi. Revista de Protección Vegetal 24(1).*
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2002).** *Mecanismos de acción Trichoderma frente a hongos fitopatógenos In Estudios De Asia Y África. Protección veg, 24(1),14-21.*
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013).** *Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Revista de Protección Vegetal, 28(1), 1-11.*
- Mejía, F. d., & Alvarado, R. (2016).** *Evaluación in vitro de hongos nativos antagonistas de Moniliophthora roreri (Cif. & Par., Evans et al.) en el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.). Managua, Nicaragua: Tesis de pre grado.*
- Meza, S. L. (2008).** *Antagonismo in vitro de Trichoderma harzianum Rifai sobre Fusarium solani (Mart.) Sacc.,.*
- Motamayor, J. (2002).** *Domesticación del cacao I: el origen del cacao cultivado por los mayas.*
- Motamayor, J., Lachenaud, P., da Silva e Mota, J., & Loor, R. (2008).** *Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (Theobroma cacao L). Plos One 3(10): e3311.*
- Papavizas, G. (2003).** *Trichoderma and Gliocladium: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. Annual Review of Phytopathology. 23. 23-54.*
- Perez-vicente, L. (2018).** *Moniliophthora roreri H.C. Evans et al. y Moniliophthora perniciosa (Stahel) Aime: impacto, síntomas, diagnóstico, epidemiología y manejo. Revista de Protección Vegetal, 33(1), 00.*

Phillips, W., Coutiño, A., Ortíz, C., López, A., Hernández, J., & Aime, M. C. (2006).

Primer reporte de Monilophthora roreri causante de la moniliasis (moniliasis disease) del cacao en México. Plant Pathology. Plant Pathology. 55(4):584.

Ramirez, J. R. (2019). *POTENCIAL DE BIOCONTROL DE CEPAS NATIVAS DE Trichoderma spp SOBRE LA MONILIASIS (Moniliophthora sp) DEL CACAO NATIVO FINO DE AROMA, DE LA PROVINCIA DE BAGUA, AMAZONAS - 2017. CHACHAPOYAS - PERÚ.*

Rojas, M. (2013). *Biocontrol de Moniliophthora roreri y Phytophthora palmirova patógenos de cacao (Theobroma cacao L.) con hongos endófitos procedentes del Alto Amazonas. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Alto Amazonas. Tarapoto, San Martín.*

Silva, E. M. (2015). *Control cultural, inductores de resistencia y compuestos antiesporulantes en el manejo de moniliasis (Moniliophthora roreri) Evans et al. en el cultivo de cacao orgánico - Morropón. Tesis de pregrado, Piura - Peru.*

Suarez, C. L. (2006). *AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE Moniliophthora roreri CAUSANTE DE LA MONILIASIS EN MUNICIPIOS DEL NORORIENTE COLOMBIANO Y ENSAYOS PRELIMINARES PARA SU CONTROL BIOLÓGICO.*

Tuquerres, H. L. (2016). *Evaluación de cepas de Trichoderma spp. en el control de monilla (Moniliophthora roreri), en cacao (Theobroma cacao) in vitro y en campo en la provincia de Napo-Ecuador. Sangolquí, Ecuador.: Tesis de pregrado. Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas.*

Villamil, J., Blanco, J., & Viteri, S. (2012). *Evaluación in vitro de microorganismos nativos por su antagonismo contra Moniliophthora roreri Cif & Par en cacao*

(Theobroma cacao L.). Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, CO. 65(1):6305-6315.

Villegas, M. A. (2004). *Trichoderma pers. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible.* Villavicencio - Colombia.

Waghunde, R., Shelake, R., & Sabalpara, A. (2016). *Trichoderma: A significant fungus for agriculture and environment. African journal of agricultural research.*

ANEXOS

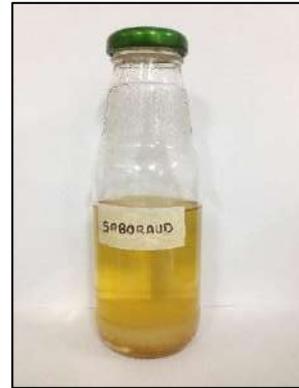
Anexo 1 Recolección de muestras para el aislamiento del patógeno en el Distrito de Echarate-Pan de azucar



Anexo 2 Diagrama de la preparación del agar-soja para 200 placas petri. A: Vertiendo agua destilada. B: Pesando el PDA. C: Disolviendo los gránulos de PDA. D: Tubos con 20 ml de PDA. E: Esterilizado. F: Vertiendo PDA a las placas petri en la cámara de flujo laminar. G: Refrigeradora y H: Conservación de las placas en la refrigeradora a 8 °C. Todo este proceso de preparación de medio de cultivo se realizó para la instalación de cada una de las variables (Inhibición).

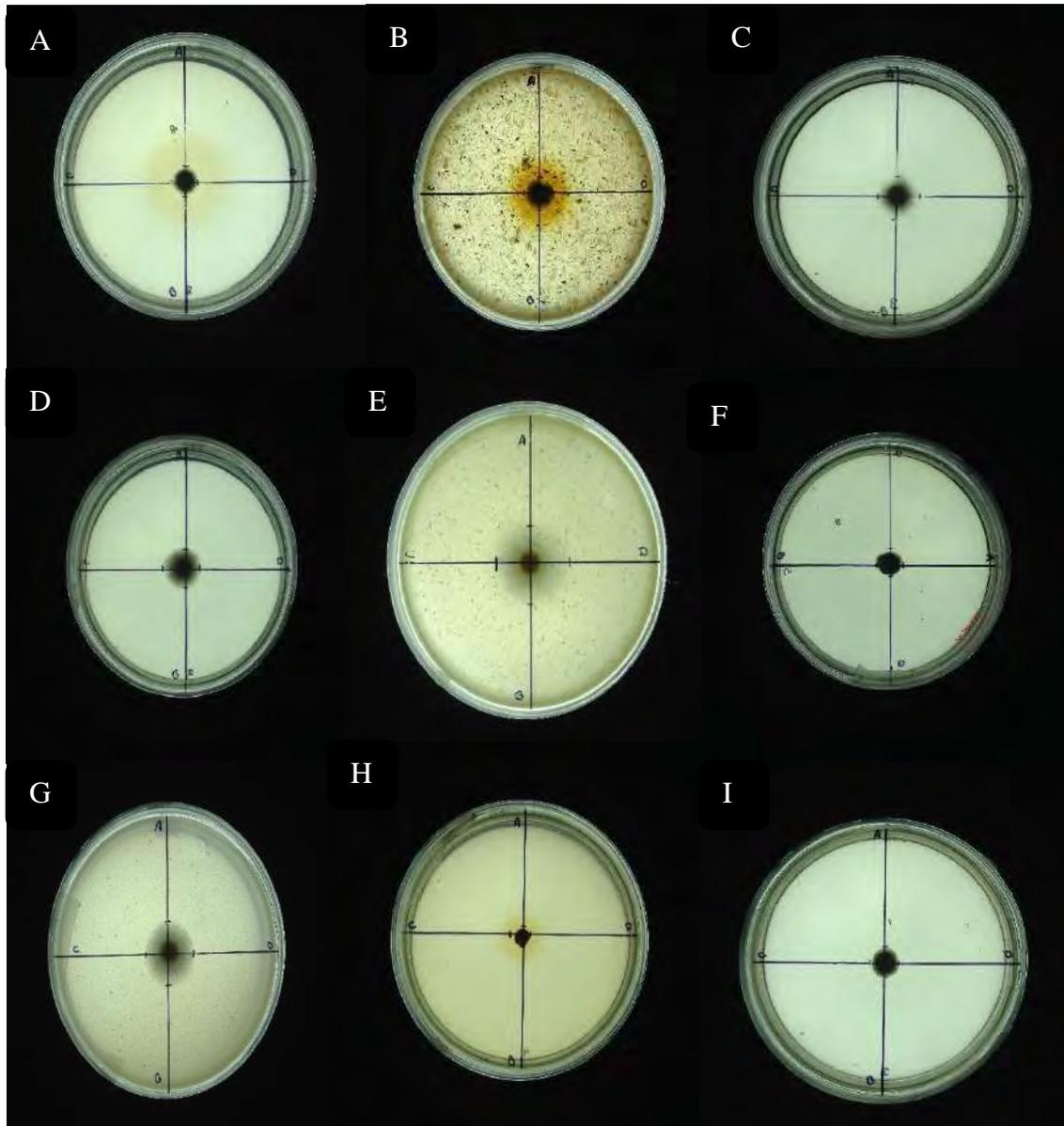


Anexo 3 Diferentes medios de cultivo usados en el experimento "crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri*"

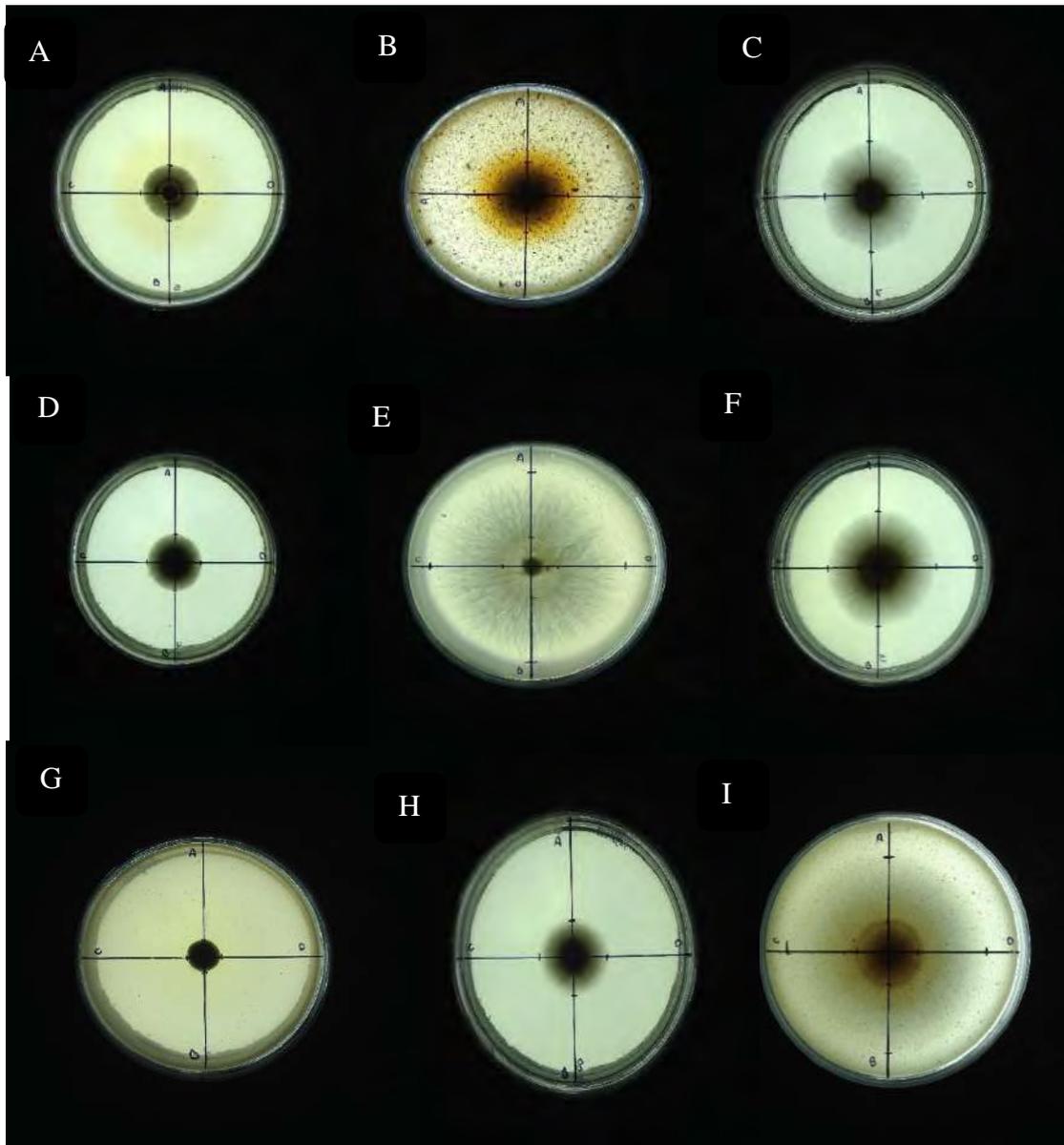


Anexo 4 Evaluación de crecimiento micelial en diferentes medios

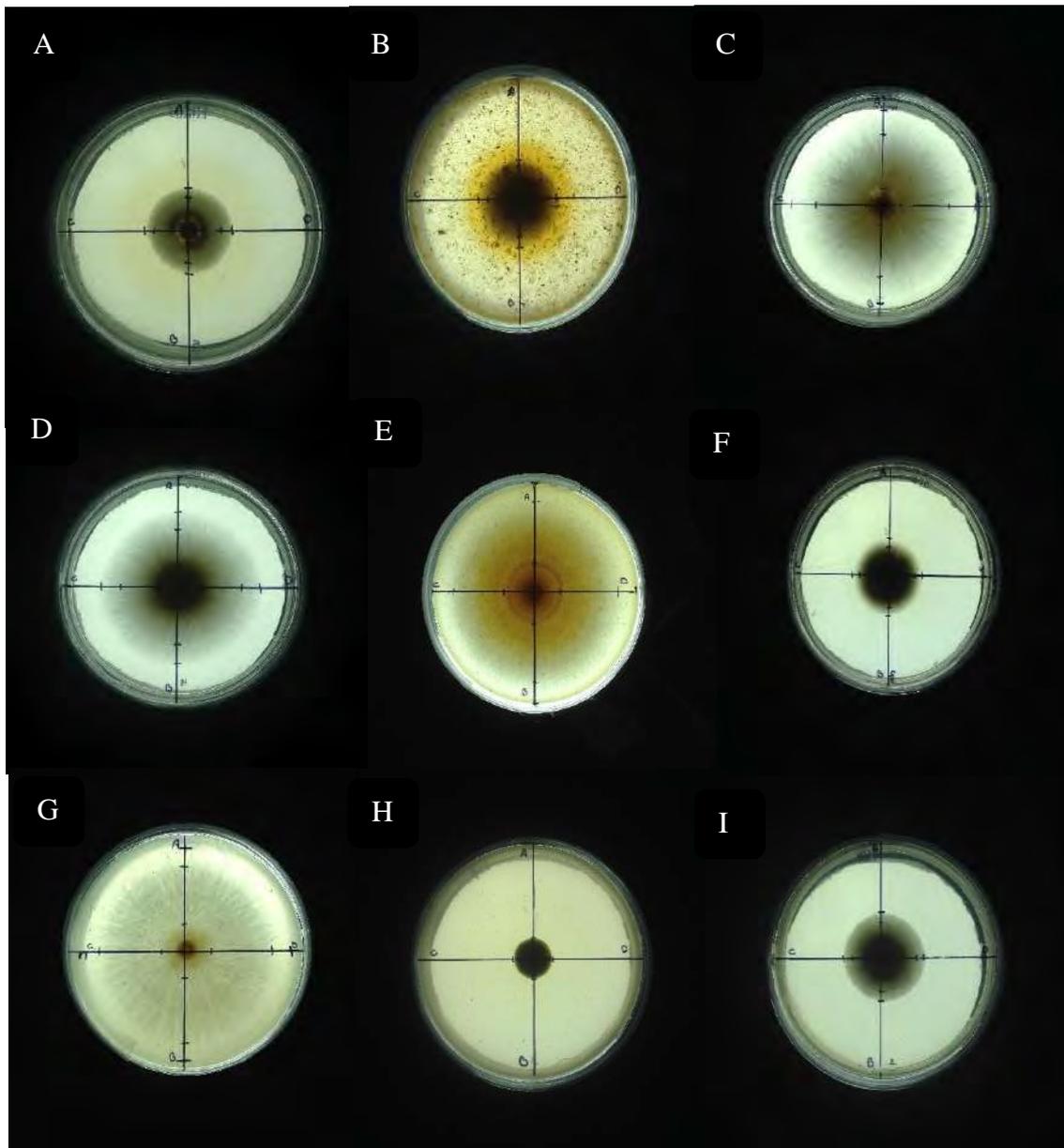
1ª Evaluación 30-06-21 Primer día de siembra.



2ª Evaluación 05-06-21 cinco días después de la siembra



3ª Evaluación 07-07-21 diez días después de la siembra.



Anexo 5 Evaluación de medios en diferentes concentraciones.
Evaluación final 24/08/21 a los 12 días después de la siembra.





Anexo 6 Visita del asesor MSc. Luis Justino Lizárraga Valencia



Anexo 7 Foto con la asesora PhD. Fanny Márquez Romero en el Laboratorio de la Universidad Intercultural de Quillabamba.



Anexo 8 Crecimiento por día de *Trichoderma spp.*

SIEMBRA: 06/09/2021	Crecimiento radial (mm.) de <i>Trichoderma spp.</i>																								
	7/09/2021						8/09/2021						9/09/2021 7am						10/09/2021						
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P1	P2	P3	P4	P5	P6
TA1	A-B	25	24	25	25	25	27	56	56	56	56	56	56	72	72	72	72	72	72						
	C-D	25	24	25	25	25	27	56	56	56	56	56	56	72	72	72	72	72	72						
TA2	A-B	15	14	15	13	15	16	45	44	48	47	45	48	61	62	60	63	60	61	90	90	90	90	90	90
	C-D	15	14	15	13	15	16	45	44	48	47	45	48	60	62	61	62	60	61	90	90	90	90	90	90
TA3	A-B	25	25	25	25	25	25	67	65	66	65	65	65	90	90	90	90	90	90						
	C-D	25	25	25	25	25	25	67	65	66	65	65	65	90	90	90	90	90	90						
TA4	A-B	23	23	19	20	20	19	60	55	53	56	51	53	85	85	85	85	85	85						
	C-D	23	23	19	20	20	19	60	55	53	56	51	53	85	85	85	85	85	85						
TA5	A-B	25	28	27	27	27	26	70	70	70	70	70	70	73	73	73	73	73	73	90	90	90	90	90	90
	C-D	25	28	27	27	27	26	70	70	70	70	70	70	73	73	73	73	73	73	90	90	90	90	90	90
TA6	A-B	14	13	13	12	12	12	30	24	25	24	23	24	69	69	69	69	69	70	90	90	90	90	90	90
	C-D	14	13	13	13	12	12	30	24	25	24	24	24	70	70	70	70	70	70	90	90	90	90	90	90
TA7	A-B	20	17	18	19	21	21	67	67	67	67	67	67	90	90	90	90	90	90						
	C-B	19	17	19	20	21	21	67	67	67	67	67	67	90	90	90	90	90	90						
TA8	A-B	20	20	20	20	20	20	40	40	40	40	40	40	72	72	72	72	72	72	90	90	90	90	90	90
	C-B	20	20	20	20	20	20	40	40	40	40	40	40	73	73	73	73	73	73	90	90	90	90	90	90
TA9	A-B	22	22	21	22	22	20	56	57	56	56	50	55	73	73	74	73	73	73	90	90	90	90	90	90
	C-D	22	22	21	22	22	20	56	57	56	56	50	55	73	73	73	73	73	73	90	90	90	90	90	90

Anexo 9 Análisis de varianza (Anova) para desarrollo micelial de *Trichoderma spp.*

The ANOVA Procedure					
Dependent Variable: Y					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	4626.583333	578.322917	3762.58	<.0001
Error	45	6.916667	0.153704		
Corrected Total	53	4633.500000			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean	
	0.998507	0.513603	0.392051	76.33333	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRÁ	8	4626.583333	578.322917	3762.58	<.0001

Anexo 10 Tukey para desarrollo micelial de *Trichoderma spp.*

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRÁ
A	90.0000	6	th3
A	90.0000	6	th7
B	85.0000	6	th4
C	73.0000	6	th9
C	73.0000	6	th5
C	72.9167	6	th8
D	72.0000	6	th1
E	69.8333	6	th6
F	61.2500	6	th2

Anexo 11 Crecimiento radial de *M. roreri* en diferentes medios

Medios de cultivo	Crecimiento radial (mm.) de <i>Moniliophthora roreri</i>																		
		30/06/2021						5/07/2021						7/07/2021					
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P1	P2	P3	P4	P5	P6
JUGO V CACAO	A-B	12	12	12	12	12	10	29	27	27	27	26	26	35	35	35	34	32	33
	C-D	13	12	12	10	10	10	28	29	28	28	26	25	33	36	35	35	32	34
EXTRACTO V CACAO	A-B	10	11	10	10	10	11	25	24	23	23	22	23	32	30	30	30	28	30
	C-D	10	10	10	10	10	10	24	23	23	23	21	24	32	30	30	30	28	30
PDA	A-B	15	15	16	15	16	16	46	44	47	45	46	45	63	60	57	60	61	61
	C-D	15	15	16	15	16	16	46	45	47	46	46	45	63	60	57	61	62	61
SOJA	A-B	18	21	21	20	21	20	55	67	68	64	65	69	86	87	86	86	85	84
	C-D	19	21	20	20	21	20	61	68	68	64	66	69	87	85	86	85	85	85
MALTA	A-B	14	14	16	15	15	15	52	49	58	47	44	44	63	63	73	62	60	60
	C-D	15	15	15	15	15	15	53	51	56	48	44	44	63	63	73	62	60	60
VMA	A-B	11	10	10	10	9	9	26	24	24	25	23	23	34	32	31	33	30	29
	C-D	11	10	10	10	10	9	26	24	24	25	23	23	33	32	31	33	30	29
SABORAUD	A-B	11	11	11	10	10	10	26	25	24	27	25	25	32	32	33	36	34	35
	C-B	11	11	11	10	10	10	26	25	24	25	26	25	32	32	33	36	32	37
V SACAROSA	A-B	8	8	8	9	9	9	13	12	13	13	13	15	17	16	16	17	18	19
	C-B	8	8	8	9	9	9	13	12	13	13	13	15	17	17	16	18	19	19
AVENA	A-B	23	24	24	25	25	25	71	72	72	73	73	73	90	90	90	90	90	90
	C-D	24	26	25	25	25	25	72	74	70	72	73	72	90	90	90	90	90	90

Anexo 12 Análisis de Varianza (ANOVA) para crecimiento radial en diferentes medios

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: Y

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	33239.59259	4154.94907	877.12	<.0001
Error	45	213.16667	4.73704		
Corrected Total	53	33452.75926			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean
0.993628	4.378896	2.176474	49.70370

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRA	8	33239.59259	4154.94907	877.12	<.0001

Anexo 13 Tukey crecimiento radial en diferentes medios

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRA
A	90.000	6	Avena
A	86.500	6	SOJA
B	63.500	6	MALTA
B	60.500	6	PDA
C	34.167	6	jugo
D	33.667	6	SOBORAUD
D	31.500	6	VMA
D	30.000	6	extracto
E	17.500	6	VEGETALE

Anexo 14 Crecimiento en diferentes concentraciones

Medios de cultivo	Crecimiento radial (mm.) de <i>Moniliophthora Roreri</i>																												
	16/08/2021							19/08/2021							22/08/2021							25/08/2021							
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
QUAKER ALTO	A-B	10	10	10	10	10			32	32	30	35	35			45	45	45	50	60			55	55	53	60	70		
	C-D	10	10	10	10	10			32	32	30	35	35			45	45	45	50	60			55	55	53	60	70		
QUAKER MEDIO	A-B	13	13	13	13	13			30	30	30	30	33			45	45	45	45	50			55	55	55	55	60		
	C-D	13	13	13	13	13			30	30	30	30	33			45	45	45	45	50			55	55	55	55	60		
QUAKER BAJO	A-B	5	5	5	5	5			15	15	15	15	15			35	35	35	35	35			45	45	45	45	45		
	C-D	5	5	5	5	5			15	15	15	15	15			35	35	35	35	35			45	45	45	45	45		
SOJA ALTO	A-B	9	9	9	9	9			30	35	30	30	30			65	65	65	65	65			90	90	90	90	90		
	C-D	9	9	9	9	9			30	35	30	30	30			65	65	65	65	65			90	90	90	90	90		
SOJA MEDIO	A-B	5	5	5	5	5			18	19	20	20	22			50	50	51	50	55			80	80	80	80	80		
	C-D	5	5	5	5	5			18	19	20	20	22			50	50	51	50	55			80	80	80	80	80		
SOJA BAJO	A-B	5	5	5	5	5			15	15	15	13	17			40	40	40	38	45			60	60	60	52	70		
	C-D	5	5	5	5	5			15	15	15	13	17			40	40	40	38	45			60	60	60	52	70		
MALTA ALTO	A-B	10	10	10	10	10			25	27	25	23	25			47	50	47	45	47			67	70	67	65	67		
	C-B	10	10	10	10	10			25	27	25	23	25			47	50	47	45	47			67	70	67	65	67		
MALTA MEDIO	A-B	9	9	9	9	9			22	22	22	20	20			40	40	40	35	35			50	50	50	45	45		
	C-B	9	9	9	9	9			22	22	22	20	20			40	40	40	35	35			50	50	50	45	45		
MALTA BAJO	A-B	5	5	5	5	5			15	15	20	20	20			26	26	30	30	30			33	33	40	40	40		
	C-D	5	5	5	5	5			15	15	20	20	20			26	26	30	30	30			33	33	40	40	40		

Anexo 15 Ficha de evaluación del porcentaje de inhibición de las cepas nativas de *Trichoderma spp* sobre la *Moniliophthora Roreri*
De la página 95 a la página 100 del texto.

FICHA DE EVALUACION DE PORCENTAJE DE INHIBICION									
EVALUADOR:	Edit Huamani Miranda								
LUGAR:	Universidad Intercultural de Quillabamba								
TRATAMIENTO	CODIGO	REPETICIONES	EVALUACIONES					% PROMEDIO DE INHIBICION POR REPETICIONES	TOTAL
			DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4 (12 hr)	DIA 5 (12hr)		
T0	Mx-1 x Mx-1	1	11.1	25	30	40	45	0	0
T0	Mx-1 x Mx-1	2	11.1	25	30	40	45	0	
T0	Mx-1 x Mx-1	3	11.1	25	30	40	45	0	
T0	Mx-1 x Mx-1	4	11.1	25	30	40	45	0	
T0	Mx-1 x Mx-1	5	11.1	25	30	40	45	0	
T0	Mx-1 x Mx-1	6	11.1	25	30	40	45	0	
T0	Mx-1 x Mx-1	7	11.1	25	30	40	45	0	
T1	Th 1 x Mx-1	1	10	18	20	26		35	35.714286

T1	Th 1 x Mx-1	2	10	18	20	26		35	
T1	Th 1 x Mx-1	3	10	18	20	26		35	
T1	Th 1 x Mx-1	4	10	18	20	26		35	
T1	Th 1 x Mx-1	5	10	18	20	26		35	
T1	Th 1 x Mx-1	6	10	18	20	25		37.5	
T1	Th 1 x Mx-1	7	10	18	20	25		37.5	
T2	Th 2 x Mx-1	1	9	17	21	24	36	20	
T2	Th 2 x Mx-1	2	8	16	21	24	35	22.2	
T2	Th 2 x Mx-1	3	9	17	21	24	37	17.7	
T2	Th 2 x Mx-1	4	8	17	22	24	35	22.2	
T2	Th 2 x Mx-1	5	8	17	21	24	35	22.2	
T2	Th 2 x Mx-1	6	8	17	22	24	36	20	
T2	Th 2 x Mx-1	7	9	18	21	24	35	22.2	
T3	Th 3 x Mx-1	1	10	13	15	21		47.5	46.4

T3	Th 3 x Mx-1	2	10	13	15	21		47.5	
T3	Th 3 x Mx-1	3	10	13	15	23		42.5	
T3	Th 3 x Mx-1	4	10	13	15	21		47.5	
T3	Th 3 x Mx-1	5	10	13	15	22		45	
T3	Th 3 x Mx-1	6	10	13	15	21		47.5	
T3	Th 3 x Mx-1	7	10	13	15	21		47.5	
Th4	Th 4 x Mx-1	1	9	13	15	20		50	
Th4	Th 4 x Mx-1	2	9	13	15	20		50	
Th4	Th 4 x Mx-1	3	9	13	15	21		47.5	
Th4	Th 4 x Mx-1	4	9	13	15	21		47.5	
Th4	Th 4 x Mx-1	5	9	13	15	20		50	
Th4	Th 4 x Mx-1	6	9	13	15	21		47.5	
Th4	Th 4 x Mx-1	7	9	13	15	21		47.5	
T5	Th 5 x Mx-1	1	10	13	15	25		37.5	37.5

T5	Th 5 x Mx-1	2	10	13	15	25		37.5	
T5	Th 5 x Mx-1	3	10	13	15	25		37.5	
T5	Th 5 x Mx-1	4	10	13	15	25		37.5	
T5	Th 5 x Mx-1	5	10	13	15	25		37.5	
T5	Th 5 x Mx-1	6	10	13	15	25		37.5	
T5	Th 5 x Mx-1	7	10	13	15	25		37.5	
T6	Th 6 x Mx-1	1	10	13	15	22	34	24.4	
T6	Th 6 x Mx-1	2	10	13	15	22	34	24.4	
T6	Th 6 x Mx-1	3	10	13	15	22	33	26.7	
T6	Th 6 x Mx-1	4	10	13	15	22	34	24.4	
T6	Th 6 x Mx-1	5	10	13	15	22	33	26.66	
T6	Th 6 x Mx-1	6	10	13	15	22	34	24.4	
T6	Th 6 x Mx-1	7	10	13	15	22	34	24.4	
T7	Th 7 x Mx-1	1	10	13	15	19		52.5	51.1

T7	Th 7 x Mx-1	2	10	13	15	20		50	
T7	Th 7 x Mx-1	3	10	13	15	20		50	
T7	Th 7 x Mx-1	4	10	13	15	19		52.5	
T7	Th 7 x Mx-1	5	10	13	15	20		50	
T7	Th 7 x Mx-1	6	10	13	15	20		50	
T7	Th 7 x Mx-1	7	10	13	15	19		52.5	
T8	Th 8 x Mx-1	1	10	13	15	22		45	
T8	Th 8 x Mx-1	2	10	13	15	23		42.5	
T8	Th 8 x Mx-1	3	10	13	15	23		42.5	
T8	Th 8 x Mx-1	4	10	13	15	21		47.5	
T8	Th 8 x Mx-1	5	10	13	15	23		42.5	
T8	Th 8 x Mx-1	6	10	13	15	23		42.5	
T8	Th 8 x Mx-1	7	10	13	15	22		45	
T9	Th 9 x Mx-1	1	11	13	15	23		42.5	41.8

T9	Th 9 x Mx-1	2	11	13	15	25		37.5	
T9	Th 9 x Mx-1	3	11	13	15	23		42.5	
T9	Th 9 x Mx-1	4	11	13	15	23		42.5	
T9	Th 9 x Mx-1	5	11	13	15	23		42.5	
T9	Th 9 x Mx-1	6	11	13	15	23		42.5	
T9	Th 9 x Mx-1	7	11	13	15	23		42.5	
T9	Th 9 x Mx-1								

Anexo 16 Análisis de Varianza (ANOVA) para porcentaje de inhibición

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: Y

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	15593.27159	1732.58573	837.50	<.0001
Error	60	124.12514	2.06875		
Corrected Total	69	15717.39674			

	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean
	0.992108	4.098066	1.438816	35.09748

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRa	9	15593.27159	1732.58573	837.50	<.0001

Anexo 17 Tukey para porcentaje de inhibición.

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRa
A	51.0714	7	T7
B	48.5714	7	T4
B	46.4286	7	T3
D	43.9286	7	T8
D	41.7857	7	T9
E	37.5000	7	T5
E	35.7143	7	T1
F	25.0457	7	T6
G	20.9286	7	T2
H	0.0000	7	T0

