



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

EVALUACIÓN DE TRICHODERMA SP. EN CONTROL DE  
PHYTOPHTHORA. SP., CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD MAZORCA  
NEGRA EN CACAO, A NIVEL INVITRO.

ORELLANA RIOFRIO GEORGE RENATO  
INGENIERO AGRÓNOMO

MACHALA  
2022



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGRÓNOMICA

EVALUACIÓN DE TRICHODERMA SP. EN CONTROL DE  
PHYTOPHTHORA. SP., CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD  
MAZORCA NEGRA EN CACAO, A NIVEL INVITRO.

ORELLANA RIOFRIO GEORGE RENATO  
INGENIERO AGRÓNOMO

MACHALA  
2022



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGRÓNOMICA

TRABAJO TITULACIÓN  
TRABAJO EXPERIMENTAL

EVALUACIÓN DE TRICHODERMA SP. EN CONTROL DE PHYTOPHTHORA. SP.,  
CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD MAZORCA NEGRA EN CACAO, A NIVEL  
INVITRO.

ORELLANA RIOFRIO GEORGE RENATO  
INGENIERO AGRÓNOMO

JARAMILLO AGUILAR EDWIN EDISON

MACHALA, 24 DE FEBRERO DE 2022

MACHALA  
2022

# GEORGE ORELLANA

---

## INFORME DE ORIGINALIDAD

---

<b>1</b> %	%	<b>1</b> %	%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

---

## FUENTES PRIMARIAS

---

<b>1</b>	Ana María Mesa Vanegas, Jaime Calle Osorno, Duber Alexander Marín Pavas. "Metabolitos secundarios en Trichoderma spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas", Actualidades Biológicas, 2020 Publicación	<b>1</b> %
----------	---	------------

---

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 50 words

Excluir bibliografía

Activo

## CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

El que suscribe, ORELLANA RIOFRIO GEORGE RENATO, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito titulado EVALUACIÓN DE TRICHODERMA SP. EN CONTROL DE PHYTOPHTHORA. SP., CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD MAZORCA NEGRA EN CACAO, A NIVEL INVITRO., otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

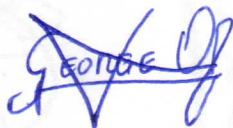
El autor declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

El autor como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 24 de febrero de 2022



ORELLANA RIOFRIO GEORGE RENATO  
0705815504

**DEDICATORIA**

Dedico este trabajo investigativo a mis padres, Lauro de Jesús Orellana Ramon e Hilda Yolanda Riofrío Calle, quienes me apoyaron de manera incondicional durante toda mi carrera universitaria.

A mi hermano Diego Iván Orellana Riofrío, quien supo darme grandes consejos y la guía necesaria para prosperar en la vida.

Y a mi novia Gloria Chamba, por brindarme su apoyo y siempre creer en mí, dándome su mano amiga en los momentos difíciles.

## **AGRADECIMIENTO**

Doy gracias infinitas a Jehová, por haber cuidado de mi camino a lo largo de mi existencia y permitirme llegar a este punto álgido de mi formación académica, en el que culmino la carrera de Ingeniería Agronómica, tan importante para la salud alimentaria y economía del país, y por poder cumplir este ciclo en mi vida, que me lleva al terreno laboral profesional.

En general al gran colectivo de docentes universitarios, que conforman la carrera de Ingeniería Agronómica, quienes me impartieron sus valiosos conocimientos científicos de laboratorio y campo sin reserva alguna.

A la Ing. Ivana Tuz y al Ing. Aldo Mora, por colaborar conmigo en la realización de esta investigación.

También agradezco a mi tutor, Ing. Edwin Jaramillo, quien me brindo su apoyo y guía a lo largo de este trabajo investigativo, dándome las pautas necesarias para trabajar de la manera correcta dentro de laboratorio.

# **EVALUACIÓN DE TRICHODERMA HARZIANUM EN EL CONTROL DE PHYTOPHTHORA SP., CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD MAZORCA NEGRA EN CACAO, A NIVEL IN VITRO.**

**Autor:** George Renato Orellana Riofrio

**Tutor:** Ing. Agr. Edison Jaramillo Mg. Sc.

## **RESUMEN**

En Ecuador, el cacao es uno de los principales productos de comercialización, tanto, en demanda interna como externa, situándose en los primeros puestos de relevancia en producción del país. Es apetecido a nivel internacional, por sus grandes características organolépticas, tanto, en sabor como aroma, gracias a las condiciones edafoclimáticas únicas del país. Se cultivan en su gran mayoría el clon CCN-51, cuya característica principal es su alta producción y resistencia media a enfermedades. y la variedad Nacional, fino y de aroma. Las enfermedades fitopatógenas más importantes son la monilla (*Moniliophthora roreri*), la mazorca negra (*Phytophthora palmivora*) y la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) La mazorca negra es una de las enfermedades más limitantes en el cultivo de cacao, ataca a la planta en general, introduciéndose por las raíces, hasta llegar al tallo y las hojas, generalmente se encuentra en suelos encharcados y con pobre drenaje, donde la humedad se mantiene constante, también produce aborto y secamiento de frutos, el órgano más afectado es el fruto, ya que, durante la infección en la mazorca se produce manchas necróticas en la corteza, dejando también la almendra blanca y vana, causando así, una baja en la calidad de sus granos, disminuyendo su valor comercial y el rendimiento productivo. En la actualidad, se ha incrementado el uso de microorganismos benéficos como agentes antagonistas para el control de enfermedades fúngicas. Trichoderma es



un fungicida biológico, que compite con los hongos causantes de las enfermedades radiculares, con el objetivo de colonizar el suelo, y a su vez es parasitario de hongos fitopatógenos impidiendo su crecimiento. El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Sanidad Vegetal – Ambiente 2, ubicado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias – Universidad Técnica de Machala y consistió en aplicar distintos tratamientos a base de (*Trichoderma harzianum*) para evaluar el control del crecimiento micelial sobre (*Phytophthora* sp.) a nivel de cultivo in vitro. Para esta investigación fueron ocho los tratamientos empleados, con cinco repeticiones cada uno, de los cuales los cuatro primeros consistieron en mezclar (*Trichoderma harzianum*) con el medio de cultivo antes del plaqueo, para que al solidificarse actúe como alimento envenenado, inoculando el patógeno sobre el mismo, se manejaron cuatro diferentes dosis; 1g/L, 2g/L, 3g/L, 4g/L respectivamente. En el quinto tratamiento se utilizó la técnica de metabolitos volátiles, en el cual se colocan cepas del antagonista y fitopatógeno en el centro de la base y tapa de la caja petri y en el sexto tratamiento por cultivo dual (enfrentamiento) se colocan cepas del antagonista y el fitopatógeno en extremos opuestos, al borde de la caja petri. Los dos últimos tratamientos actuaron como testigos, siendo el séptimo el cultivo de (*Phytophthora* sp.) y el octavo (*Trichoderma harzainum*), en los que se identificó el crecimiento micelial sin competencia, para compararlo con los demás tratamientos. El tratamiento que dio mejores resultados, fue el de metabolitos volátiles, seguido del tratamiento por cultivo dual, ya que estos lograron inhibir por completo el crecimiento micelial del fitopatógeno a los 8 días de su aplicación. Al preparar el tratamiento por alimento envenenado, se calentó el medio de cultivo hasta el punto de ebullición en microondas, después se dejó enfriar por un tiempo promedio de cinco minutos antes de agregar las cepas de *Trichoderma* para mezclarlo con el medio de cultivo, por lo cual no logro inhibir el fitopatógeno, ya que, al someterse a altas temperaturas se ocasiona inestabilidad en la

estructura del hongo, disminuyendo su probabilidad de sobrevivir. En vista de los resultados favorables obtenidos al realizar esta investigación, surge la necesidad de emplear estas metodologías a nivel de campo, ampliando así, el rango de usos de (*Trichoderma harzianum.*) en el control del crecimiento micelial de enfermedades fitopatógenas, elevando el sistema de resistencia inmune de la planta, lo que ayudaría a incrementar el rendimiento productivo del cultivo de cacao.

**Palabras clave:** *antagónico, micelial, fitopatógeno, trichoderma, phytophthora.*

**EVALUATION OF TRICHODERMA HARZIANUM IN THE CONTROL OF  
PHYTOPHTHORA SP. CAUSING BLACK POD DISEASE IN COCOA, AT IN VITRO  
LEVEL.**

**Author:** George Renato Orellana Riofrio

**Tutor:** Ing. Agr. Edison Jaramillo Mg. Sc.

**ABSTRACT**

In Ecuador, cocoa is one of the main commercialization products, both in internal and external demand, being one of the most important production products in the country. It is sought after internationally for its great organoleptic characteristics, both in flavor and aroma, thanks to the unique soil and climatic conditions of the country. The CCN-51 clone, whose main characteristic is its high production and medium resistance to diseases, and the Nacional variety, fine and aromatic, are the most widely cultivated. The most important phytopathogenic diseases are monilla (*Moniliophthora roreri*), black pod (*Phytophthora palmivora*) and witches' broom (*Moniliophthora perniciosa*). Black pod is one of the most limiting diseases in cocoa cultivation, attacking the plant in general, introduced through the roots, until reaching the stem and leaves, usually found in waterlogged soils with poor drainage, The most affected organ is the fruit, since, during the infection in the cob, necrotic spots are produced on the rind, leaving also the kernel white and vain, thus causing a decrease in the quality of the beans, reducing their commercial value and productive yield. Nowadays, the use of beneficial microorganisms as antagonistic agents for the control of fungal diseases has increased. *Trichoderma* is a biological fungicide, which competes with fungi causing root diseases, with the aim of colonizing the soil, and at the same time is parasitic on phytopathogenic fungi, preventing their growth. The present work was

carried out in the laboratory of Plant Health - Environment 2, located in the Faculty of Agricultural Sciences - Technical University of Machala and consisted of applying different treatments based on (*Trichoderma harzianum*) to evaluate the control of mycelial growth on (*Phytophthora* sp.) at the level of in vitro culture. For this investigation there were eight treatments used, with five repetitions each one, of which the first four consisted of mixing (*Trichoderma harzianum*) with the culture medium before plating, so that when solidifying it acts as poisoned food, inoculating the pathogen on it, four different doses were used; 1g/L, 2g/L, 3g/L, 4g/L respectively. In the fifth treatment, the technique of volatile metabolites was used, in which strains of the antagonist and phytopathogen were placed in the center of the base and lid of the petri dish and in the sixth treatment by dual culture (confrontation), strains of the antagonist and the phytopathogen were placed at opposite ends, at the edge of the petri dish. The last two treatments acted as controls, being the seventh the culture of (*Phytophthora* sp.) and the eighth (*Trichoderma harzainum*), in which the mycelial growth was identified without competition, to compare it with the other treatments. The treatment that gave the best results was that of volatile metabolites, followed by the dual culture treatment, since these were able to completely inhibit the mycelial growth of the phytopathogen 8 days after its application. When preparing the treatment by poisoned food, the culture medium was heated to boiling point in microwaves, then it was left to cool for an average time of five minutes before adding the *Trichoderma* strains to mix it with the culture medium, for which reason it did not manage to inhibit the phytopathogen, since, when submitted to high temperatures, instability is caused in the structure of the fungus, diminishing its probability of survival. In view of the favorable results obtained in this research, the need arises to use these methodologies at field level, thus expanding the range of uses of (*Trichoderma harzianum*.) in the control of mycelial growth of

phytopathogenic diseases, raising the immune resistance system of the plant, which would help to increase the productive yield of the cocoa crop.

**Keywords:** antagonist, mycelial, mycelial, phytopathogenic, *trichoderma*, *phytophthora*.

## Índice de contenido

Introducción .....	17
Objetivo General.....	19
Objetivo Específico.....	19
Marco Teórico.....	20
Origen del cacao. ....	20
Taxonomía. ....	20
Morfología. ....	21
Sistema radicular.....	21
Hojas. ....	21
Tronco.....	21
Flores.....	21
Fruto.....	22
Semillas.....	22
Condiciones edafoclimáticas. ....	22
Variedades de cacao.....	23
Producción. ....	27
Mazorca negra ( <i>Phytophthora</i> sp.) .....	29
Taxonomía. ....	30
Morfología. ....	30

	10
Sintomatología.....	31
Agresividad y patogenicidad.....	32
Reproducción y ciclo de vida del patógeno.....	32
Manejo Integrado de la mazorca negra.....	35
<i>Trichoderma</i> sp.....	39
Taxonomía.....	39
Morfología.....	40
Ciclo de vida.....	41
Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> .....	42
Tricho-D.....	47
Materiales y Métodos.....	48
Ubicación del experimento.....	48
Materiales y equipos.....	49
Metodología.....	50
Tratamientos.....	50
Variables de estudio.....	51
Medición de las variables.....	51
Preparación de trampa cebo para captura de <i>Phytophthora</i> sp.....	53
Preparación del PDA (papa-dextrosa-agar).....	54
Aislamiento de <i>Phytophthora</i> sp.....	54

Siembra de <i>T. harzianum</i> . .....	55
Tratamiento de alimento envenenado. ....	55
Tratamiento por metabolitos volátiles. ....	56
Tratamiento por cultivo dual.....	56
Tratamientos testigo.....	56
Procedimiento estadístico. ....	57
Resultados y Discusión.....	59
Conclusiones.....	62
Recomendaciones .....	63
Bibliografía.....	64
Anexos .....	74



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Cacao criollo.....	23
<b>Figura 2.</b> Cacao forastero.....	24
<b>Figura 3.</b> Cacao trinitario .....	25
<b>Figura 4.</b> Cacao nacional.....	26
<b>Figura 5.</b> Clon CCN-51.....	27
<b>Figura 6.</b> Distribución mundial del cultivo de cacao.....	28
<b>Figura 7.</b> Principales destinos de exportación de cacao en el 2020.....	29
<b>Figura 8.</b> Síntomas de infección por <i>Phytophthora</i> sp. en mazorcas y el tallo.....	31
<b>Figura 9.</b> Ciclo de vida de <i>Phytophthora</i> sp .....	32
<b>Figura 10.</b> Estructuras de reproducción asexual de <i>Phytophthora</i> sp. a. Esporangio; b. Liberación de las zoosporas por el esporangio; c. Detalle de las zoosporas, presencia de los dos flagelos.....	33
<b>Figura 11.</b> Estructuras de supervivencia de <i>Phytophthora</i> sp. a. Clamidospora, reproducción asexual; b. Oospora, reproducción sexual.....	34
<b>Figura 12.</b> Fases de infección de <i>Phytophthora</i> a la mazorca de cacao.....	35
<b>Figura 13.</b> Cepas del género <i>Trichoderma</i> sp.....	40

<b>Figura 14.</b> Representación de estructuras morfológicas de especies de <i>Trichoderma</i> , A) Hifa e conidióforo; B) Micelio; C) Pústulas; D) Micrografía de un clamidósporo real; E) Esquema de un clamidósporo esquemático.....	41
<b>Figura 15.</b> Representación del ciclo de vida sexual y asexual de especies de <i>Trichoderma</i> , (P!) Plamogamia; (C!) Cariogamia.....	42
<b>Figura 16.</b> A: Inhibición del crecimiento de patógenos mediante producción de una sustancia antimicrobiana, micelio inoculado como conidios en las raíces. B: competencia donde por espacio y nutrientes para alejar otros organismos. C: el micoparasitismo se divide en varias etapas sucesivas, 1- el reconocimiento del objetivo, 2- el ataque directo por secreción de enzimas líticas. D: resistencia sistémica inducida.....	45
<b>Figura 17.</b> Productos de la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos.....	46
<b>Figura 18.</b> Facultad de Ciencias Agropecuarias.....	48

**Índice de tablas**

<i>Tabla 1.</i> Principales países productores de cacao en el 2019.....	28
<i>Tabla 2.</i> Tratamientos.....	53
<i>Tabla 3.</i> Prueba de Kruskal Wallis.....	59
<i>Tabla 4.</i> Prueba de comparación de medianas.....	59

## Índice de anexos.

<i>Anexo 1.</i> Toma de datos del tratamiento por alimento envenenado.....	74
<i>Anexo 2.</i> Toma de datos del tratamiento por metabolitos volátiles.....	75
<i>Anexo 3.</i> Toma de datos del tratamiento por cultivo dual.....	76
<i>Anexo 4.</i> Toma de datos del testigo <i>Phytophthora sp.</i> .....	76
<i>Anexo 5.</i> Toma de datos del del testigo <i>T. harzianum.</i> .....	76
<i>Anexo 6.</i> Pruebas de normalidad y homocedasticidad, Shapiro-Wilks y Levene.....	77
<i>Anexo 7.</i> Planta de CCN51 con sintomatología de la amazorca negra. ....	77
<i>Anexo 8.</i> Preparación de trampa cebo para captura de <i>Phytophthora sp.</i> .....	78
<i>Anexo 9.</i> Presencia de la enfermedad de la mazorca negra.....	78
<i>Anexo 10.</i> Preparación de medio de cultivo.....	79
<i>Anexo 11.</i> Plaqueo de medio de cultivo.....	79
<i>Anexo 12.</i> Auto clavado de medio de cultivo.....	80
<i>Anexo 13.</i> Aplicación de Mertec 20-S al medio de cultivo.....	80
<i>Anexo 14.</i> Siembra de tejido infectado por <i>P. palmivora.</i> .....	81
<i>Anexo 15.</i> Siembra de <i>T. harzianum</i> en medio de cultivo. ....	81
<i>Anexo 16.</i> Resiembra de <i>T. harzianum</i> para su purificación.....	82
<i>Anexo 17.</i> Bocados de <i>T. harzianum</i> y <i>Phytophthora sp</i> para su aplicación en tratamientos.....	82
<i>Anexo 18.</i> Preparación y plaqueo de alimento envenenado. ....	83

<i>Anexo 19.</i> Siembra de cultivo dual.....	83
<i>Anexo 20.</i> Medición de las variables a evaluar.....	84
<i>Anexo 21.</i> Cultivo dual.....	84
<i>Anexo 22.</i> Metabolitos volátiles.....	85
<i>Anexo 23.</i> Siembra de <i>Phytophthora</i> sp en alimento envenenado.....	85
<i>Anexo 24.</i> Inhibición de <i>Phytophthora</i> sp por cultivo dual.....	86
<i>Anexo 25.</i> Inhibición de <i>Phytophthora</i> sp., por metabolitos volátiles .....	86

## Introducción

En el mundo, el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los principales productos de comercialización, generando grandes divisas, siendo de considerable ayuda para el desarrollo social, cultural y económico de los pueblos donde se cultiva. En Ecuador, el negocio del cacao se desarrolló desde la década de 1600, donde la recolección y explotación se establecía como uno de los rubros significativos de la antigua provincia de Guayaquil. El primer boom cacaotero se dio entre 1770 y 1842, época donde fue catalogado como la “pepa de oro” (Chiriboga, 2013). En la actualidad el país con más del 70% del volumen total lidera la producción mundial del cacao fino y de aroma.

La producción se da predominantemente en la región Litoral, en las provincias de Manabí, Los Ríos, Guayas, Esmeraldas, El Oro y Santo Domingo de los Tsáchilas, en la región Sierra en los territorios de Cotopaxi, Bolívar, Cañar, y en la región Amazónica en las zonas de Orellana, Napo y Zamora Chinchipe (López, 2017). En 2021 se vendieron 360.714 toneladas, según Francisco Miranda, dirigente de ANECACAO, donde acoto que la producción de cacao rompió un récord al llegar a las 375.000 toneladas. Sin embargo, unas 15.000 no se comercializaron por la falta de contenedores en el planeta.

Los fitopatógenos son una de las principales enfermedades que atacan al cultivo de cacao, ocasionando considerables pérdidas en la producción a nivel nacional, constituyéndose como un grave problema fitosanitario y económico, entre las principales enfermedades tenemos la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*), la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) y la mazorca negra (*Phytophthora* sp.), siendo esta última el tema de interés de esta investigación. La enfermedad de la mazorca negra es causada por pseudo hongo del género *Phytophthora* sp., que atacan a los

tejidos jóvenes de las plantas como ocasionando una coloración marrón claro en las hojas nuevas, brotes, cojinetes florales, es responsable también del cáncer del tronco y raíces, pero el principal daño lo ocasiona en los frutos, dejando manchas de color marrón oscuro en la mazorca que la recubren por completo, atacándolas en cualquier etapa de su desarrollo.

Esta enfermedad causa la pérdida del 10 % de la producción mundial de cacao (Ramírez, 2016). En el Ecuador se tiene registro de que *Phytophthora* sp. causa serios problemas en la producción, con porcentajes desde el 16 % al 80 % de afectación, datos que varían de acuerdo a las zonas donde se encuentran y al manejo preventivo (Arciniega, 2017). En los tiempos actuales, aplicar fungicidas sintéticos, es el método de control más usado y su efectividad está ligada al método de aplicación, modo de acción, dosis y época del año. Para reducir la incidencia del fitopatógeno se han aplicado compuestos de cobre, metalaxil y fosfonatos, solos o combinados con intervalos de tres y cuatro semanas, reduciendo la infestación de esta plaga. Sin embargo, teniendo en cuenta que, estos fungicidas comerciales son contaminantes del medio ambiente y tienen altos costos, proporcionan una relación costo beneficio que no siempre resulta adecuada para el productor.

En vista a la necesidad de proveer cultivos sanos, sin residuos agroquímicos que afecten la salud humana a largo plazo, en tiempos actuales se ha venido implementado usar microorganismos benéficos del suelo, que favorezcan el crecimiento de los cultivos, evitando infectar el tejido vegetal por fitopatógenos. Los hongos antagonistas del género *Trichoderma*, actúan contra una enorme diversidad de fitopatógenos, empleando diferentes mecanismos de colonización, destacándose entre ellos la competencia por el espacio y los nutrientes, el micoparasitismo, la producción de compuestos inhibidores, la inactivación de enzimas del agente patógeno y la inducción de resistencia (Harman et al. 2004).

Se ha evidenciado que *Trichoderma* sp. inhibe la propagación de *Phytophthora* sp., tanto en condiciones in vitro como in vivo, con resultados similares a los obtenidos con la aplicación de fungicidas (Hernández-Rodríguez et al. 2014). Por tal razón, este trabajo evaluará distintos tratamientos de *Trichoderma harzianum*, con el fin de inhibir el desarrollo de *Phytophthora* sp., causante de la mazorca negra en cacao, planteando los objetivos descritos a continuación.

### **Objetivo General**

Evaluar diferentes tratamientos de *Trichoderma harzianum* para el control del crecimiento micelial de *Phytophthora* sp., a nivel in vitro.

### **Objetivo Específico**

Determinar el mejor tratamiento de *Trichoderma harzianum* a nivel in vitro mediante la técnica de alimento envenenado.

Determinar el mejor tratamiento de *Trichoderma harzianum* a nivel in vitro mediante la técnica de metabolitos volátiles.

Determinar el mejor tratamiento de *Trichoderma harzianum* a nivel in vitro mediante la técnica de cultivo dual.



## Marco Teórico

### Origen del cacao.

Mediante un trabajo conjunto entre el Instituto Nacional de Patrimonio Cultural (Inpc) y el Instituto de Investigaciones Científicas para el Desarrollo (IRD, de Francia), se completó un plan de reconocimiento en el sitio Santa Ana-La Florida, Palanda, Zamora Chinchipe, en el que se descubrió una antigua cultura arqueológica denominada Mayo Chinchipe, donde se encontraron pruebas de domesticación y uso del cacao para alimentación, directamente de desechos naturales adheridos a una pieza de cerámica, aquí se encontraron gránulos de almidón de cacao, lo que dio una edad ajustada entre 5500 a 5350 años previos al presente, mostrando una antigüedad significativa. También se utilizó en bebidas, ya que había partículas de almidón de cacao en recipientes de cuello muy apretado, en forma de botella (Lanaud et al. 2016). Estos hallazgos son la evidencia más antigua y primer ejemplo arqueológico irrefutable del uso del cacao en América del Sur (Zarrillo et al. 2018)

### Taxonomía.

(Cabuya, 2018), nos detalla la siguiente clasificación taxonómica.

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Malvales

**Familia:** Malvaceae

**Género:** Theobroma

**Especie:** *Theobroma cacao* L

### **Morfología.**

A continuación, se describen las características morfológicas del cultivo de cacao.

#### ***Sistema radicular.***

Superficialmente tiene múltiples raíces superficiales bien distribuidas, a una profundidad promedio de 15 cm a ras de suelo y una raíz pivotante capaz de profundizar más de 2 m, permitiendo la fácil absorción de nutrientes (Montes, 2016).

#### **Hojas.**

Son perennes, se colocan alternadas a ambos lados de la rama, son de forma circular u ovalada, miden de 20 a 35 cm de largo por 4 hasta 15 cm de ancho, de punta larga, algo gruesa, borde liso, tono verde tenue arriba y más pálido debajo, adherida al pecíolo (Montes, 2016).

#### ***Tronco.***

De crecimiento dimórfico, con brotes ortotrópicos. Ramas plagiotrópicas o en abanico (CONABIO, 1992).

#### ***Flores.***

Son pentámeras, pequeñas y se producen en racimos sobre el cojinete floral, mayor a un año en el tronco y en las ramas, donde antes estaban dispuestas las hojas. (ANECAFE, 2004). La fecundación del cacao es estrictamente entomófila, por lo que la floración comienza su ciclo inicial con la ruptura progresiva del botón floral en horas de la tarde y en las primeras horas del día siguiente la flor está totalmente abierta, es ahí, donde las anteras cargadas de polen se abren y son viables aproximadamente durante 48 horas para su fecundación, donde actúan los principales especialistas en polinización, mosquitos del género *Forcipomya* (Zambrano, 2013).

***Fruto.***

Es una drupa, generalmente conocida como mazorca. Tanto el tamaño como su estructura difieren ampliamente dependiendo de sus cualidades hereditarias, el clima donde se desarrolla y crece, por sus formas están clasificados en: Amelonado, Calabacillo, Angoleta y Cundeamor cambiando según el tipo y especie (Zambrano, 2013).

***Semillas.***

Son del tamaño de una almendra, de color chocolate o púrpura, de 2 a 3 cm de longitud y de sabor amargo, sin albumen y recubiertas por mucilago del color blanco, dulce y ácido. Son ricas en almidón, proteínas y grasas, lo que les confiere un alto valor nutricional (CONABIO, 1992).

***Condiciones edafoclimáticas.***

(González, 2018), describe las siguientes condiciones edafoclimáticas para el cultivo de cacao.

**Altitud:** Óptima (900 msnm) - máximo y mínimo (1200 - 0 m.s.n.m.).

**Temperatura:** Óptima (24° C) - máximo y mínimo (30 - 20° C).

**Humedad relativa:** Óptimo (80%) - máximo y mínimo (85 - 77%).

**Ph del suelo:** Óptimo (6,2°) - máximo y mínimo (6.5 - 5.5°).

**Textura del suelo:** Franco, Franco-Arcillosa, Franco-Limosa, Franco-Arcillo-Limosa.

**Fotoperiodo:** 11.5 h/día (sombra).

**Precipitación:** Óptima 2500 mm (bien distribuidos) - máximo y mínimo (2.500 - 1.500 mm).

**Topografía:** 15° o 25% de pendiente máximo.

Para adaptarse adecuadamente requiere un clima tropical, suelo profundo, bien drenado, libre de acumulación de hierro, rico en materia orgánica y con elevado contenido nutricional (González, 2018).

### ***Variedades de cacao.***

Las variedades más conocidas de cacao son las siguientes:

#### **Criollo.**

Generalmente son árboles pequeños y menos robustos en contraste con las diferentes variedades, de copa redonda con hojas pequeñas, ovaladas, de color verde claro y gruesas. Los granos son de color blanco marfil. Este tipo de cacao se identifica por tener mazorcas largas, de coloración verde y rojizo en estado de inmadurez, volviéndose amarillas y anaranjadas al madurar. El chocolate obtenido de este cacao es apreciado por su sabor a nuez y a fruta, siendo es uno de los cacaos más finos (INIAP, 2009).

***Figura 1.*** Cacao criollo.



**Fuente:** (INIAP, 2009).

**Forastero.**

Se encuentran distribuidos en la cuenca del río Amazonas y sus afluentes. Las mazorcas son verdes en estado de inmadurez y amarillas cuando son maduras, con una distintiva forma de cuello de botella en la base del peciolo. Las semillas son aplanadas, pequeñas con cotiledones morados. Proporcionan el 80% de la producción mundial (INIAP, 2009).

*Figura 2.* Cacao forastero.



**Fuente:** (INIAP, 2009).

**Trinitario.**

Tiene su origen en la hibridación del cacao criollo y forastero, fueron seleccionados en la isla de Trinidad y de ahí su nombre. Tienen un sabor de medio a alto, típicamente afrutado y a nuez. Suministran entre el 10 y el 15% de la producción mundial. Además, es desarrollada ampliamente en América (INIAP, 2009).

**Figura 3.** Cacao trinitario.



**Fuente:** (INIAP, 2009).

### **Nacional.**

Actualmente son pocas las plantaciones con cacao nacional puro, predominan fincas que surgen debido al cruzamiento natural entre el nacional por trinitario, conocido como el complejo cacao nacional trinitario. Las mazorcas son amelonadas, sin embargo, con estrangulaciones en la base y en el ápice de la misma, con surcos y lomos poco profundas. El tono de la almendra es de color violeta pálido o lila, aunque a veces se aprecian semillas blancas. De este tipo de cacao se obtiene probablemente el mejor chocolate del planeta, por su sabor y aroma floral, frutal y otros sabores.

**Figura 4.** Cacao nacional.



**Fuente:** (INIAP, 2009).

### **Clones.**

Son hibridaciones que ordinariamente suelen estar relacionados con letras y números de su investigación, como en el caso de CCN-51 (Colección Castro Naranjo – Clon #51), material que actualmente cubre parte de las fincas en el Amazonas y en mayor medida propiedades en la región Costa. Sus mazorcas son de color rojizo-morado en estado de inmadurez y de color rojizo, naranja y amarillo cuando maduran. Tienen un sabor de medio a bajo, pero su potencial radica en la gran producción que estas brindan, Además, se utilizan para la creación de la manteca de cacao, para usos de cosméticos, medicinales y de confitería. (INIAP, 2009).

**Figura 5.** Clon CCN-51.



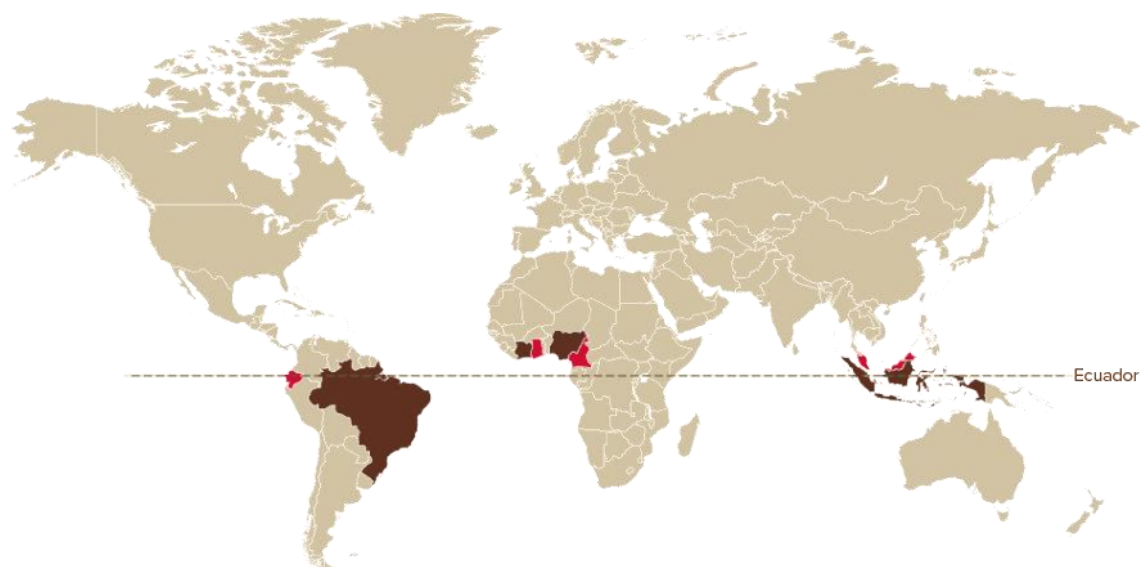
**Fuente:** (INIAP, 2009).

### ***Producción.***

El continente africano con un 73,3%, lidera la producción mundial, seguida de América, con un 16,7%, y Asia y Oceanía, con un 10%. Ecuador es uno de los principales productores de cacao en grano, ocupando el tercer lugar en el mundo, con un 7% de la producción mundial absoluta, según la ICCO (ANECACAO, 2019).



**Figura 6.** Distribución mundial del cultivo de cacao.



**Fuente:** <http://www.observatoriodelcacao.com/origen/>.

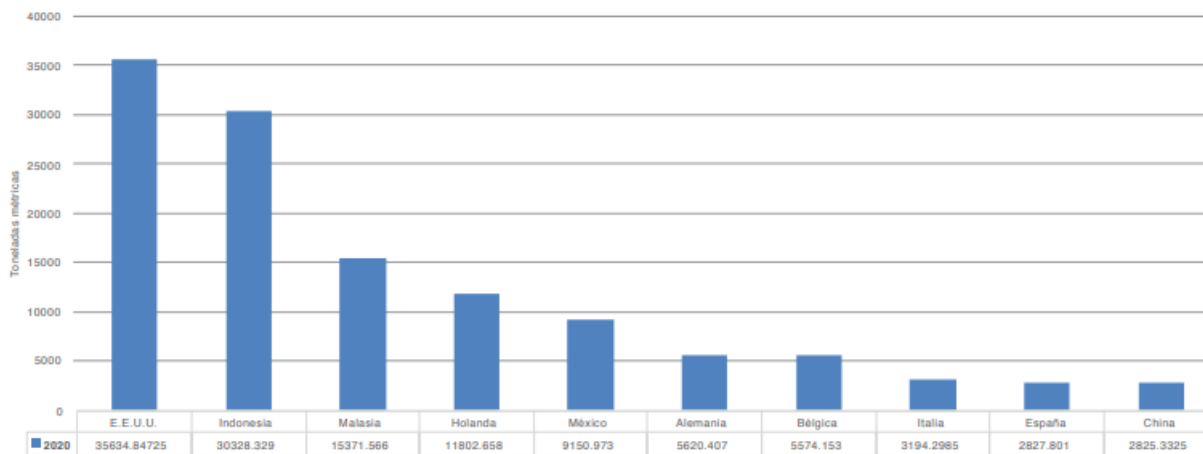
**Tabla 1.** Principales países productores de cacao en el 2019.

<b>Países</b>	<b>Producción</b>
Costa de Marfil	1,423,021.23
Ghana	632,708.77
Indonesia	615,341.88
Nigeria	350,054,27
Brasil	234,921.81
Camerún	193,267.12
Ecuador	122,891.88

**Fuente:** (FAOSTAT, 2019).

En el país, la producción está representado aproximadamente en un 70% por los pequeños productores, seguidos de un 20% por los medianos y un 10% para los grandes productores (ANECACAO, 2019).

**Figura 7.** Principales destinos de exportación de cacao en el 2020.



**Fuente:** (ANECACAO, 2020).

### **Mazorca negra (*Phytophthora* sp.).**

La mazorca negra es una enfermedad ocasionada por microorganismos del género *Phytophthora*, en donde *Phytophthora palmivora* es el más usual en Centro América (Procacaho, 2017). Produce pérdidas anuales superiores al 30 % y según de las características edafoclimáticas pueden alcanzar un 60 % (Hanada, 2020), siendo más contundentes en la época invernal, extendiéndose en el suelo infectando a distintas partes del árbol de cacao, entre ella las mazorcas más cercanas al suelo. (Hernández, 2014) El género *Phytophthora* incluyendo a la especie *palmivora* es hemibiótrofo, lo que significa que en el inicio del proceso infeccioso se alimenta de las células vivas del hospedero y continúan alimentándose del hospedero después de muerto (Thines, 2013).

***Taxonomía.***

Las especies de *Phytophthora* sp. que causan la mazorca negra en cacao se encuentran emparentadas de este modo: (Bolaños et al. 2017).

**Reino:** Chromista

**División:** Oomycota

**Subdivisión:** Mastigomicotina

**Clase:** Phycomycetes

**Subclase:** Oomycetes

**Orden:** Peronosporales

**Familia:** Pythiaceae

**Género:** Phytophthora

**Fuente:** (Bolaños et al. 2017)

***Morfología.***

Las especies que afectan al cultivo comercial se diferencian en su morfología, característica que facilita realizar su diferenciación. *Phytophthora* sp. presenta hifas completamente uniformes, pocas veces sobrepasan los 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, a menudo, produce clamidiosporas con diámetro entre 30 - 35  $\mu\text{m}$  en abundancia y en las primeras fases de desarrollo. Las características distintivas de género *Phytophthora*, asociado al reino Chromista, se denota en la morfología de las crestas mitocondriales (tubulares, similar de las plantas); la bioquímica de las paredes celulares, se forman de  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 glucanos y no de quitina (el polímero de N-acetil glucosamina, encontrado en las paredes de los hongos contemporáneos); la

lisina se sintetiza por la vía del ácido diaminopimélico (misma vía de las plantas); presencia de flagelos en las zoosporas y gametos masculinos, los núcleos de las células vegetativas son típicamente diploides (Massola & Krugner, 2011).

Se caracteriza por la presencia de micelios que están compuestos de filamentos hialinos ramificados y cenocíticos, que al pasar el tiempo carecen de protoplasma y aparecen septas, en ciertos casos el micelio puede esponjar y mostrar nudos, los que se ramifican y a veces se aprietan en su base. (Guest, 2000) El micelio es capaz de sobrevivir de forma saprófita sobre materia orgánica del suelo, pero si el contenido de esta es escaso, su movimiento por el suelo es escaso (Hernández et al. 2005).

### ***Sintomatología.***

Las distintas especies de *Phytophthora* sp., ocasionan la mazorca negra en el cultivo de cacao, demostrando similitud en los síntomas, pero con diferencias en el nivel de agresividad y propagación. (Bailey & Meinhardt, 2016). Se encuentra adaptada a climas húmedos, por lo que en época de lluvias prolifera la infección, ya que prefiere alta humedad relativa y baja temperatura. Uno de los principales indicios observados en el campo es la presencia de pequeñas manchas de color negro en la superficie de la mazorca, perceptibles alrededor de 30 horas después de la inoculación al fruto en cualquiera de sus fases de crecimiento (Chávez, 2020).

**Figura 8.** Síntomas de infección por *Phytophthora* sp. en mazorcas y tallo.



**Fuente:** (Puig et al. 2021).

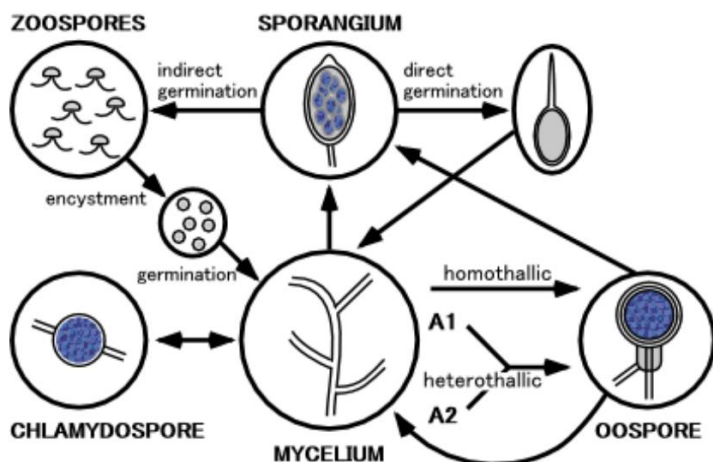
### ***Agresividad y patogenicidad.***

Se estudio cepas de *Phytophthora* recolectadas de varias regiones productoras de cacao, determino que ciertos aislamientos de *Phytophthora* sp. eran más agresivos, virulentos y producían muchas zoosporas y clamidosporas que *P. megakarya* inoculados en cacao. (Kudjordjie, 2015). Se realizaron pruebas de patogenicidad y fuerza en diferentes clones de cacao (CCN51, FB206, PS1319, VB1151 y MP01-104). Mediante pruebas filogenéticas se hallaron dos especies que contagian al cacao, *P. palmivora* y *Phytophthora* sp. De entre las cuales se determinó que *P. palmivora* mostro más contundente mientras que *Phytophthora* sp, mostró en contraste un comportamiento más variado (Decloquement, 2018).

### ***Reproducción y ciclo de vida del patógeno.***

*Phytophthora* sp. tiene reproducción asexual y sexual, produciendo cuatro clases de esporas diferentes que pueden causar infección directa o indirectamente: esporangios, zoosporas, clamidosporas (resultado de la reproducción asexual) y oosporas (resultado de la reproducción sexual) (CORPOICA, 2015).

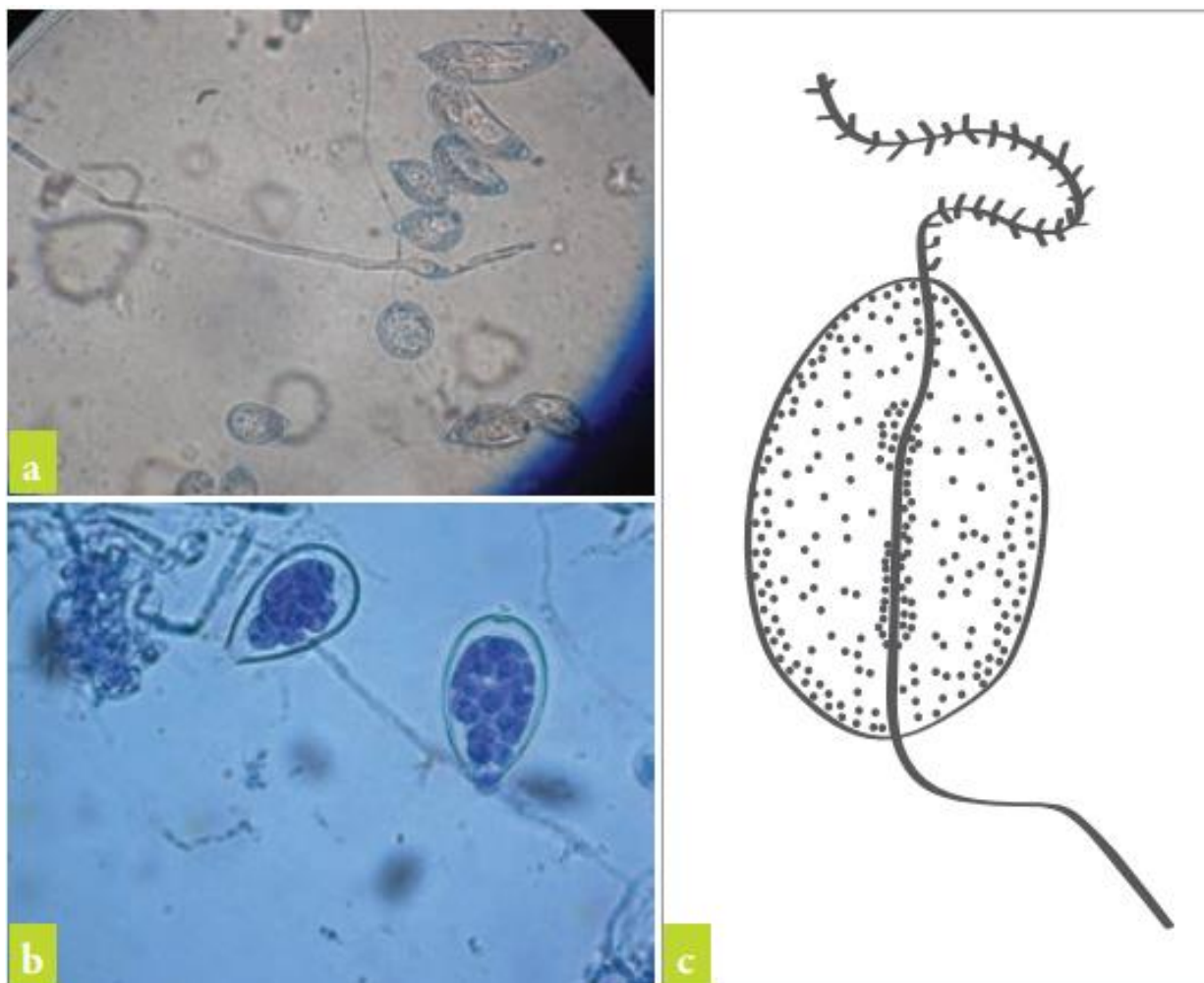
**Figura 9.** Ciclo de vida de *Phytophthora* sp.



**Fuente:** [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/56/Phytophthora\\_life\\_cycle.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/56/Phytophthora_life_cycle.png).

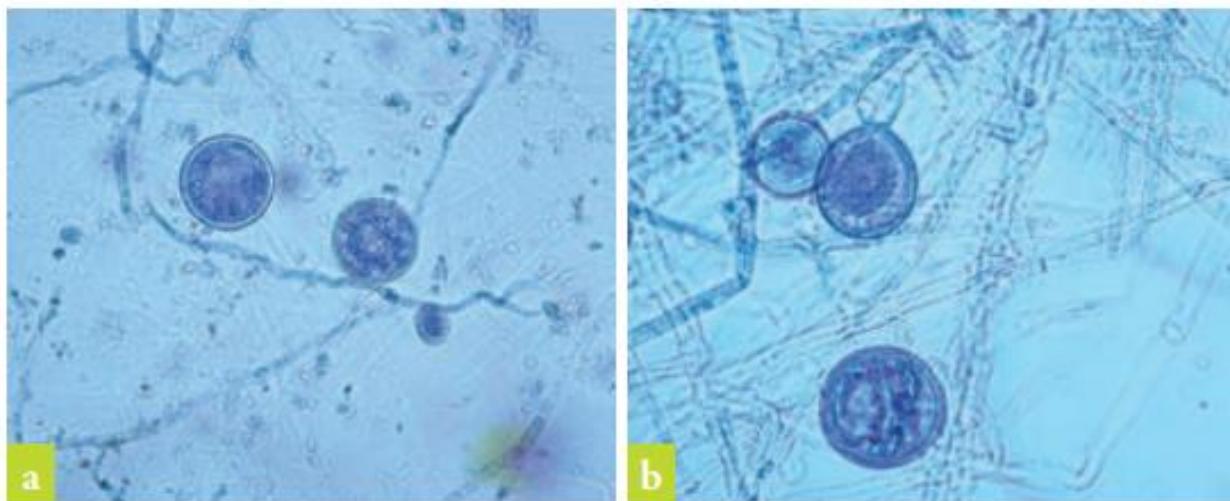
El gran parecido de las enfermedades, hace difícil su identificación a nivel patológico por las diversas especies existentes, el monitoreo y manejo del patógeno es esencial para su identificación correcta (Dos Santos et al. 2016). La técnica de PCR, ha permitido su identificación a nivel de especies por aplicación de cebadores específicos para definir (género y especie) por secuenciación al ADN/ARN (Ali et al.2016).

**Figura 10.** Estructuras de reproducción asexual de *Phytophthora* sp. a. Esporangio; b. Liberación de las zoosporas por el esporangio; c. Detalle de las zoosporas, presencia de los dos flagelos.



**Fuente:** (CORPOICA, 2015).

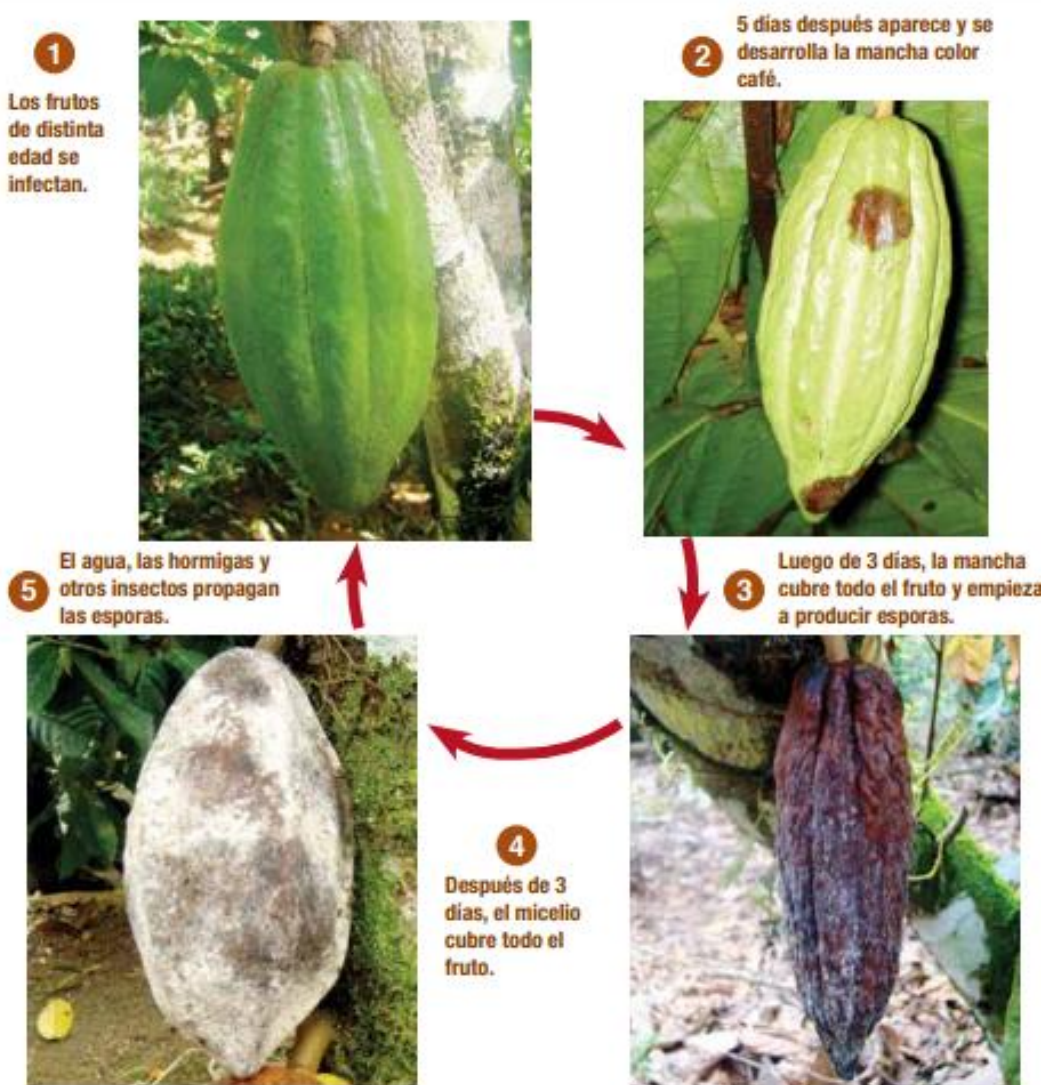
**Figura 11.** Estructuras de supervivencia de *Phytophthora* sp. a. Clamidospora, reproducción asexual; b. Oospora, reproducción sexual.



**Fuente:** (CORPOICA, 2015).

- Dos días después de haber sido trasladada por el viento, agua o insectos es inoculada en la superficie de la mazorca, en forma de manchas necróticas.
- Al tercer día de la aparición de las manchas necróticas, comienza a maximizar su tamaño y toman una coloración café.
- Tres días posteriores al crecimiento de la mancha, comienza el desarrollo del micelio (polvo blanquecino) produciendo esporas sobre el fruto afectado.
- Al tercer o cuarto día de producidas las esporas, comienzan a dispersarse por el agua, viento o insectos, contaminando frutos de diversas edades. El ciclo de vida de la mazorca negra es de 11 días (Murrieta & Palma, 2018).

**Figura 12.** Fases de infección de *Phytophthora* sp. a la mazorca de cacao.



**Fuente:** (Mora, 2011).

### ***Manejo Integrado de la mazorca negra.***

Los métodos elementales para controlar esta enfermedad son: control biológico, cultural, uso de materiales resistentes y químico, todos deben ser enfocados en erradicar la fuente de inóculo principal y los secundarios, además, de la prevención para no permitir el movimiento de inóculo en el suelo por agentes externos.



### **Control cultural.**

Consiste en modificar el cultivo evitando darle al patógeno las condiciones necesarias para su establecimiento. Ejecutar diversas prácticas culturales permite el control del inóculo y de la humedad relativa existente en el suelo, reduciendo la incidencia y severidad del patógeno.

Las prácticas culturales ampliamente recomendadas para el control de *Phytophthora* sp. son:

1. Recolección semanal de todas las mazorcas enfermas, en cualquier fase de crecimiento, además de restos de hojas y ramas infectados arrojadas al suelo, para asilarlos del cultivo.
2. Realizar cirugías, con el fin de raspar la porción enferma de la planta, hasta dejar el tejido sano, al que se le debe aplicar un producto cicatrizante cúprico o con productos sintéticos.
3. Desinfección de todas las herramientas, ropa y calzado de trabajo.
4. Promulgar el uso de microorganismos descomponedores de materia orgánica permitiendo la rápida descomposición del material enfermo.
5. Podas de formación y mantenimiento, que permitan la entrada de luz y el flujo de aire a través del cultivo, incrementando la floración y favoreciendo el desarrollo de frutos.
6. Control de hormigas u otros insectos que contribuyen en la diseminación del inóculo.
7. Instalación del sistema de drenaje, en caso de que las condiciones del suelo lo requieran.

Aplicar prácticas culturales de manera conjunta demostró ser eficaz en Ghana para el control de *P. palmivora*, único agente causal de la mazorca negra en ese país, pero resultante ineficiente en Camerún, donde están presentes las especies *P. palmivora* y *P. megakaria*, debido a severa agresividad de la segunda, en este país se aplica de manera conjunta fungicidas y prácticas culturales proporcionando un control útil de ambas especies del patógeno (Lanaud et al. 2003).

### **Control químico.**

Para el uso de químicos se requiere conocimiento de dosis, frecuencias, aditivos y su sincronización para su aplicación. El caldo bordelés es eficiente para combinar con sistémicos en el tratamiento de heridas. (Suárez, 2014). Ridomil Gold (6% de Metalaxyl M + 60% de óxido de Cupper) en dosis de (3,3 g/L), fue muy efectivo contra aislamientos de muestras de cacao de *Phytophthora* in vitro a temperaturas variadas con un 100 % de inhibición de micelios (Kudjordjie, 2015). La azoxistrobina (@Quadris) y el fosetil aluminio (@Fosetil-Al 80%) también inhiben el 100% del crecimiento micelial de *P. palmivora* (Bravo, 2019). Para el control de *Phytophthora* se emplean fungicidas a base de cobre (Liu et al. 2020).

En Machala se evaluó el efecto de productos fúngicos como él (Metalaxyl-M+Mancozeb) a nivel in vitro sobre *Phytophthora* sp, como resultado obtuvieron a los tres, nueve y quince días después de la inoculación fue del 100% de control, inhibiendo totalmente el crecimiento micelial y la germinación de oosporas del hongo *Phytophthora* sp. (Calva, 2016).

### **Materiales resistentes.**

Usar cultivares resistentes resulta eficaz para el control de plagas, sin embargo, el proceso para obtenerlos resulta extenso y pueden manifestarse subespecies más agresivas del patógeno (Adejumo, 2005). En Honduras a través del Programa de Cacao y Agroforestería de la FHIA, se han introducido diferentes materiales genéticos de tipo trinitario y forastero con niveles diversos de productividad y resistencia a enfermedades (Procacaho, 2017). El mejoramiento genético ha trabajado en la búsqueda de resistencia genética en nuevos materiales procedentes de regiones con alta presión de la enfermedad, planteándose como una estrategia para ampliar la base genética de resistencia al hongo actualmente usada en los programas de mejoramiento. Los genotipos amelonado tipo bajo y alto amazonas parecen ser menos susceptibles al hongo que los

materiales trinitarios y son empleados en los programas de mejoramiento actuales (CORPOICA, 2015).

### **Control biológico.**

Se fundamenta en la implementación de microorganismos antagonistas como instrumento de inhibición del inóculo de un patógeno. Se utilizan hongos entomopatógenos, bacterias, nematodos e inclusive ácaros que actúan parasitando, depredándolas o causando enfermedades en insectos plagas (Sarayasi, 2012). El empleo de hongos endófitos de *Aspergillus flavipes* reduce la presencia de *Phytophthora* (El-Sayed & Ali, 2020). Las rizobacterias secretan compuestos miceliales como: cianuro de hidrogeno (HCN), proteasa (PR), antibióticos pirrolnitrina (Prn) y ácido fenazina-1-carboxílico (PCA), que protegen las especies vegetales de problemas fúngicos (Keswani, Singh, García, & al., 2020). Utilizando *Pseudomonas putida* R32 y *Pseudomonas chlororaphis* R47 productoras de HCN se logra una actividad antagónica in vitro a *P. infestan* (Anand et al. 2020). Bacthon Sc es un inoculante biológico formulado con microorganismos benéficos del suelo, (*Azospirillum brasilense*, *Azotobacter chroococcum*, *Lactobacillus acidophillus*, *Saccharomyces cerevisiae*) que limpia el suelo de los agroquímicos, transformando los residuos de los cultivos hasta convertirlos en una fracción orgánica del suelo, su aplicación se la realiza al suelo y es compatible con la mayoría de los agroquímicos (ASOCIADOS, 2013).

El género *Trichoderma* es muy utilizado en el control biológico de hongos que se desarrollan en el suelo, el follaje e inhibe el desarrollo de otros hongos de las flores y los frutos como los del género *Monillia* (Villamil J. , 2012). Este se encuentra en la hojarasca por lo que controla las mazorcas infectadas que están bajo la misma. *T. martiale* causó reducción de la

enfermedad ocasionada por *P. megakarya* en frutos de cacao en condiciones in situ, con resultados similares a los obtenidos con la aplicación de fungicidas (Hanada, 2020).

### ***Trichoderma* sp.**

Son hongos saprófito, interactuando con animales y plantas (Zeilinger et al. 2016), que subsisten en el suelo con distinto contenido de materia orgánica, siendo capaz de descomponerla y ciertas condiciones ser anaerobios facultativos, mostrando mayor plasticidad ecológica, ya que, están presentes en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la ecuatorial, relacionada estrechamente con su alta capacidad enzimática para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos. Estos microorganismos benéficos presentan diferentes modos de acción los cuales les permiten ejercer un papel biorregulador. Entre las especies más estudiadas y usadas como agentes de control biológico, se encuentra el género *Trichoderma* ya que tienen capacidad reproductiva, plasticidad ecológica, efecto de promoción de crecimiento de cultivos e inducción de resistencia sistémica para la defensa de patógenos. (Vinodkumar et al. 2017) El género *Trichoderma* es un excelente modelo para ser estudiado debido a su fácil aislamiento y cultivo, rápido desarrollo en varios sustratos y por su condición de controlador biológico de una amplia gama de fitopatógenos (Fernández, 2001).

### ***Taxonomía.***

A continuación, se describe la taxonomía de *Trichoderma* sp.

Reino: Fungi.

División: Mycota

Subdivisión: Eumycota

Clase: Hyphomycetes.

Orden: Moniliales.

Familia: Moniliaceae.

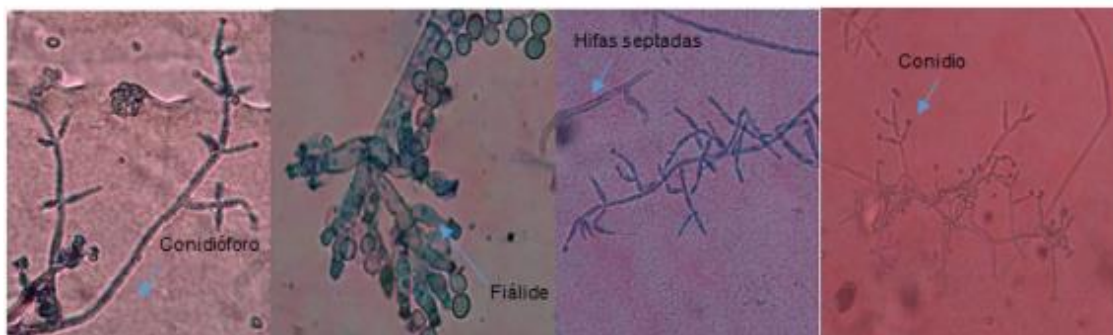
Género: *Trichoderma*.

**Fuente:** (Villegas, 2005).

### ***Morfología.***

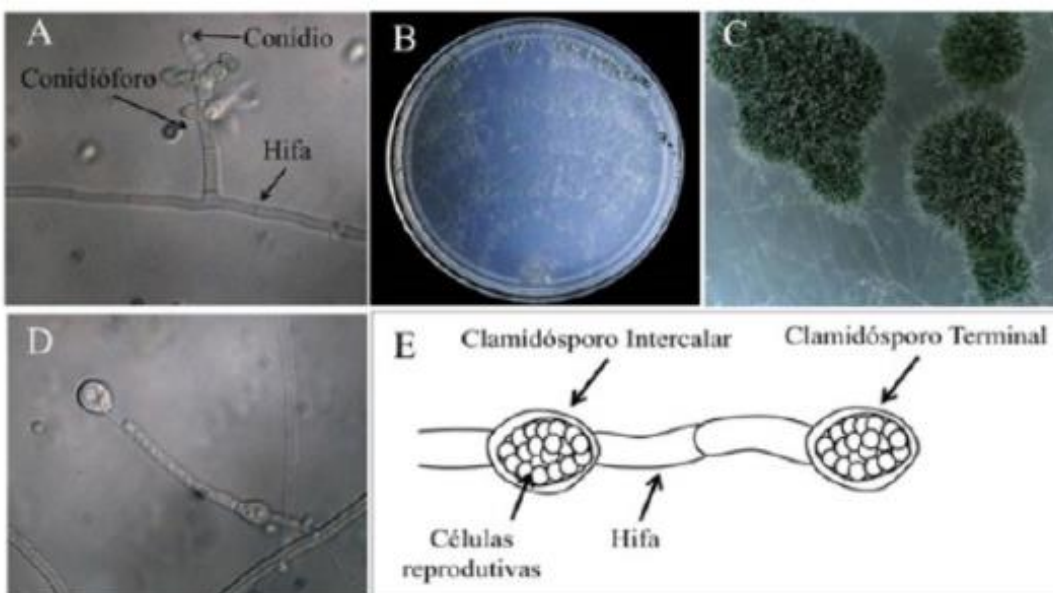
Caracterizado por presentar un ralo fino, conidióforos ramificados como el de un árbol, copete compactado a manera de anillo. con estructura de ramas irregular piramidales, terminando en fiálides en forma de esporas asexuales o conidios, pudiendo emerger directamente del micelio. Clamidosporas intercalares, terminales y propágulos de tres tipos: hifas, clamidosporas y conidios. Como método de resistencia, tienen la capacidad de producir clamidosporas, las cuales se producen en zonas intercalas, medias y terminales del micelio (Mesa-Vanegas et al. 2019). Hongo aeróbico que resistir un amplio intervalo de temperaturas, McBeath y Adelman aislaron una cepa en Alaska, con crecimiento a 4 °C y que toleró hasta 33 °C (McBeath J, 1991).

**Figura 13.** Cepas del género *Trichoderma* spp.



**Fuente:** (Mesa-Vanegas et al. 2019).

**Figura 14.** Representación de estructuras morfológicas de especies de *Trichoderma*, A) Hifa e conidióforo; B) Micelio; C) Pústulas; D) Micrografía de un clamidóspero real; E) Esquema de un clamidóspero esquemático.



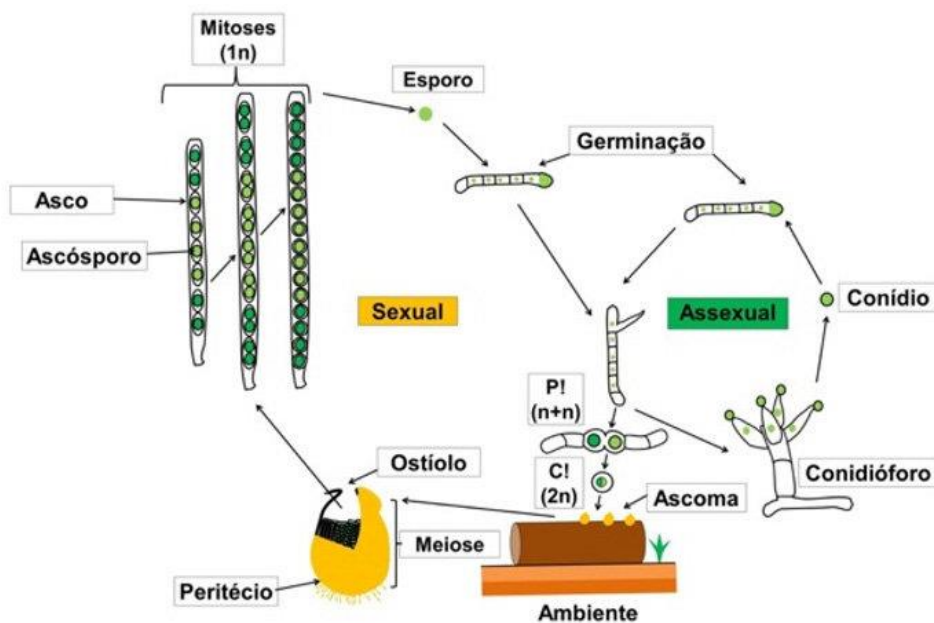
**Fuente:** (Souza et al. 2020).

### *Ciclo de vida.*

*Trichoderma*, crece y se ramifica mostrando típicas hifas fungales de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro. La esporulación asexual se da en conidios unicelulares (3 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro); normalmente son de color verde y son liberados en numerosas cantidades. También se forman clamidosporas unicelulares que pueden fusionarse entre dos o más. La mayoría de cepas están adaptadas al ciclo de vida asexual. En ausencia de la meiosis, estos organismos muestran alta plasticidad cromosómica; cada cepa llegando a tener distintos números y tamaños de cromosomas. La mayoría de las células poseen múltiples núcleos llegando a sobrepasar los 100. Factores genéticos asexuales, entre ellos la combinación parasexual, mutación y otros procesos,

dan lugar a la variación de los núcleos en un solo organismo, por ello se encuentra gran diversidad genética de cepas silvestres (Harman & Kubicek, 1998).

**Figura 15.** Representación del ciclo de vida sexual y asexual de especies de *Trichoderma*, (P!) Plasmogamia; (C!) Cariogamia.



**Fuente:** (Souza et al. 2020).

### ***Mecanismos de acción de Trichoderma.***

Existen diferentes mecanismos de acción que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos. Los principales son la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, de acción directa frente al hongo fitopatógeno (Lorenzo, 2001). *Trichoderma* tiene la habilidad para colonizar la rizosfera de las plantas, además de los mencionados, producen secreción de enzimas y producción de compuestos inhibidores (Zimand et al. 1996). Presenta otros mecanismos, de acción biorreguladora en forma indirecta, estos inducen mecanismos de

defensa fisiológicos y bioquímicos en la planta de compuestos relacionados con la resistencia (Harman, 2004).

### **Competencia.**

Interacción entre dos o más organismos, que se disputan recursos como espacio, nutrientes, agua y luz. Por ejemplo, *Trichoderma* spp. compete y secuestra iones de hierro esenciales para el fitopatógeno, mediante la liberación de compuestos conocidos como sideróforos (Vinodkumar et al. 2017). También pueden movilizarse, absorber nutrientes cercanos y usar muchas fuentes de carbono para multiplicarse y colonizar rápidamente la rizosfera (Harman, 2004).

### **Micoparasitismo.**

Es una simbiosis antagónica entre organismos, en el que están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, y que corresponden a la composición y estructura de las paredes celulares de hongos parasitados, el micoparasitismo involucra cuatro etapas (a) crecimiento quimiotrópico, que mediante estímulos químicos atrae al hongo antagónico; (b) reconocimiento específico, mediado por lectinas en la superficie celular tanto del patógeno como del antagonista; (c) ataque y enrollamiento de *Trichoderma* alrededor de las hifas del huésped; y (d) secreción de enzimas líticas que degradan la pared de la célula huésped (Vinale et al. 2008). En este proceso *Trichoderma* secreta enzimas que desintegran la pared celular del hongo patógeno, por lo tanto, la lisis de la pared celular de los fitopatógenos está mediada por glucanasas, quitinasas y proteasas (Naher et al. 2014).

### **Antibiosis.**

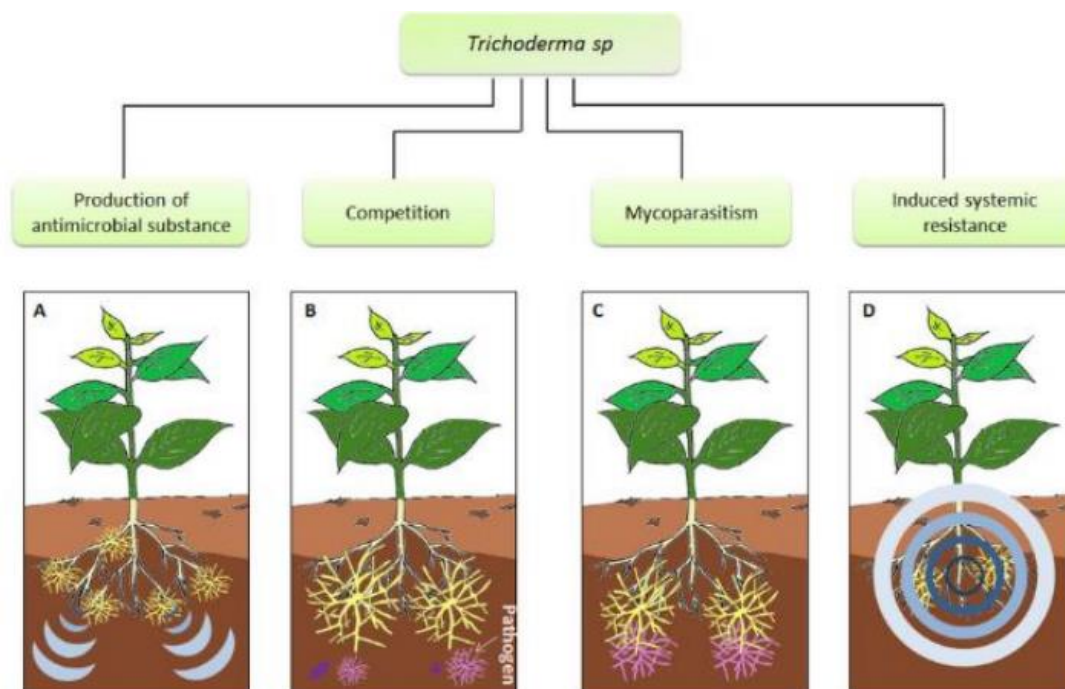
Secreción de compuestos antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por hongos antagonistas que suprimen patógenos del suelo; cepas de *Trichoderma* crean metabolitos



secundarios volátiles y no volátiles, de los cuales algunos inhiben el desarrollo de microorganismos sin hacer contacto físico, considerados antifúngicos (Roberto et al. 2019). Se identificaron compuestos de tipo alquilpironas (6- $\alpha$ -pentil-pirona), isonitrilos (isonitrina), poliquétidos (harzianolida), peptabioles (trichodermina, atroviridina, alameticina, suzucacilina y trichozianina), dicetopiperacinas (gliovirina y gliotoxina), sesquiterpenos (ácido heptelídico) y esteroides (viridina). En lo que se trata del efecto sobre nematodos, se notificó que las quitinasas y proteasas de *Trichoderma* sp. son muy parecidas a las de los hongos nematófagos y poseen ventaja para atacar estos invertebrados (Morton et al. 2004). El desarrollo parasítico y efecto de las enzimas y metabolitos de *Trichoderma* en nematodos, pueden ocurrir en el suelo, en el interior de las raíces o en la superficie de estas (Martínez et al. 2013).

La capacidad de una misma cepa de *Trichoderma* de secretar varios compuestos antifúngicos simultáneamente, limita el riesgo de aparición de microorganismos resistentes a estos metabolitos, aspecto relevante desde el punto de vista práctico. Estos resultados ejemplifican la importancia de la antibiosis como parte de la actividad antagonista de este hongo.

**Figura 16.** A: Inhibición del crecimiento de patógenos mediante producción de una sustancia antimicrobiana, micelio inoculado como conidios en las raíces. B: competencia donde por espacio y nutrientes para alejar otros organismos. C: el micoparasitismo se divide en varias etapas sucesivas, 1- el reconocimiento del objetivo, 2- el ataque directo por secreción de enzimas líticas. D: resistencia sistémica inducida.



**Fuente:** (Zaki, 2020).

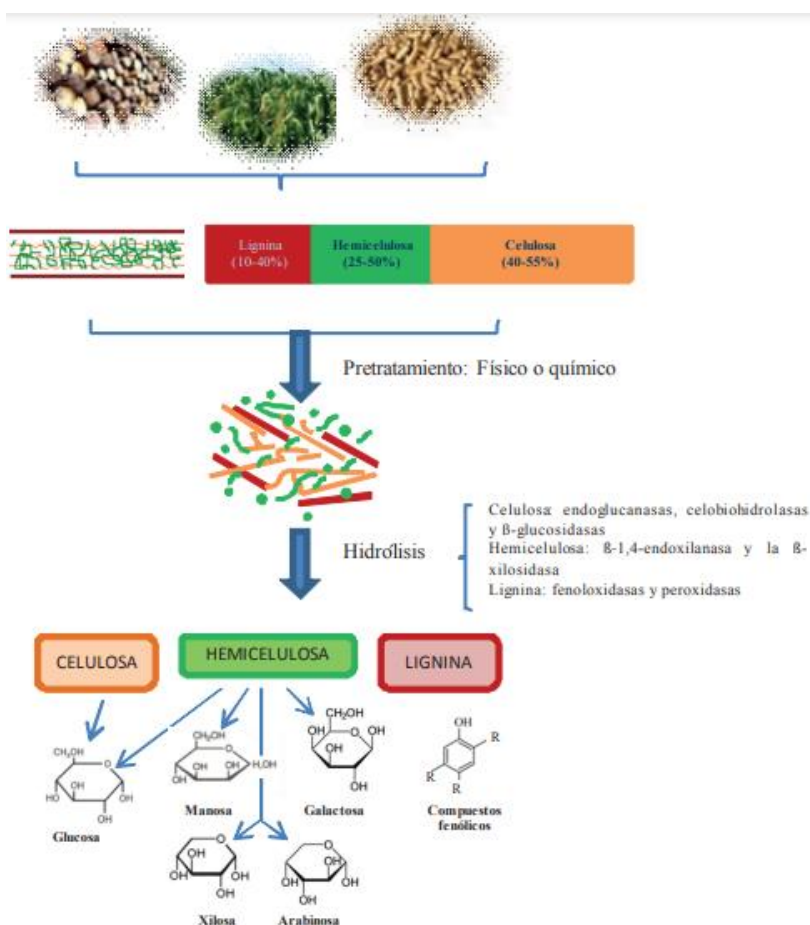
### **Inducción de resistencia.**

Diversos compuestos son liberados por *Trichoderma* en la rizosfera. La primera clase son proteínas con actividad enzimática o de otro tipo, que al ser secretadas inducen solo respuestas locales y necrosis (Brotman et al. 2008), hay otros que activan medios de defensa como los productos de los genes de avirulencia, otra clase de elicitores de defensa en las plantas incluye oligosacáridos y compuestos de bajo peso molecular, liberados por la acción de enzimas de *Trichoderma* (Woo & Lorito, 2007).

### Mineralización/biodegradación de sustratos orgánicos por *Trichoderma*.

Es metabólicamente versátil, ya que emplea un gran rango de biomasa vegetal, incluyendo oligosacáridos como sucrosa, rafinosa y polisacáridos como celulosa, inulina, quitina, pectina, y almidón. (Sandle, 2014), también se encuentran sustratos más complejos como suero de leche, hidrocarburos del petróleo e incluso plaguicidas, ayudando en gran medida a su degradación (Guoweia et al. 2011). Es capaz de usar y degradar residuos lignocelulósicos que están formados de celulosa (40-55%), hemicelulosa (25-50%), y lignina (10-40%), dependiendo si la fuente es madera dura, madera blanda, o rastrojos (la Grange, 2010).

**Figura 17.** Productos de la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos.



**Fuente:** (Hernández-Melchor, 2019).

### **Metabolitos secundarios: enzimas y otros subproductos derivados de *Trichoderma*.**

Hongo de relevancia industrial y ecológica, ya que sintetiza y libera enzimas como celulasas; además de producir diversos metabolitos secundarios como auxinas y giberelinas (Zeilinger et al. 2016). *Trichoderma* es reconocida como una fuente de enzimas, incluyendo las utilizadas en el área alimenticia, tales como celulasas, glucanasas, xilanasas, pectinasas, y laminarinasas (Sandle, 2014). Existen otros metabolitos secundarios de importancia agrícola, sintetizados por especies de *Trichoderma* que se asocian con compuestos volátiles y no volátiles con actividad antimicrobiana y defensa vegetal, sobresaliendo diterpenos tetracíclicos (por ejemplo, harziandione), sesquiterpenos (por ejemplo, tricotecenos, tricodermin, y harzianum A), y el triterpeno viridin (Zeilinger et al. 2016), que brindan sus propiedades como agente de biocontrol hacia organismos fitopatógenos. El desempeño de *Trichoderma* como biocontrolador esta relacionado en base su capacidad de sintetizar compuestos antagónicos (proteínas, enzimas y antibióticos), y sustancias promotoras de crecimiento (vitaminas y hormonas), beneficiando así a los cultivos agrícolas (Navaneetha et al. 2015).

### ***Tricho-D.***

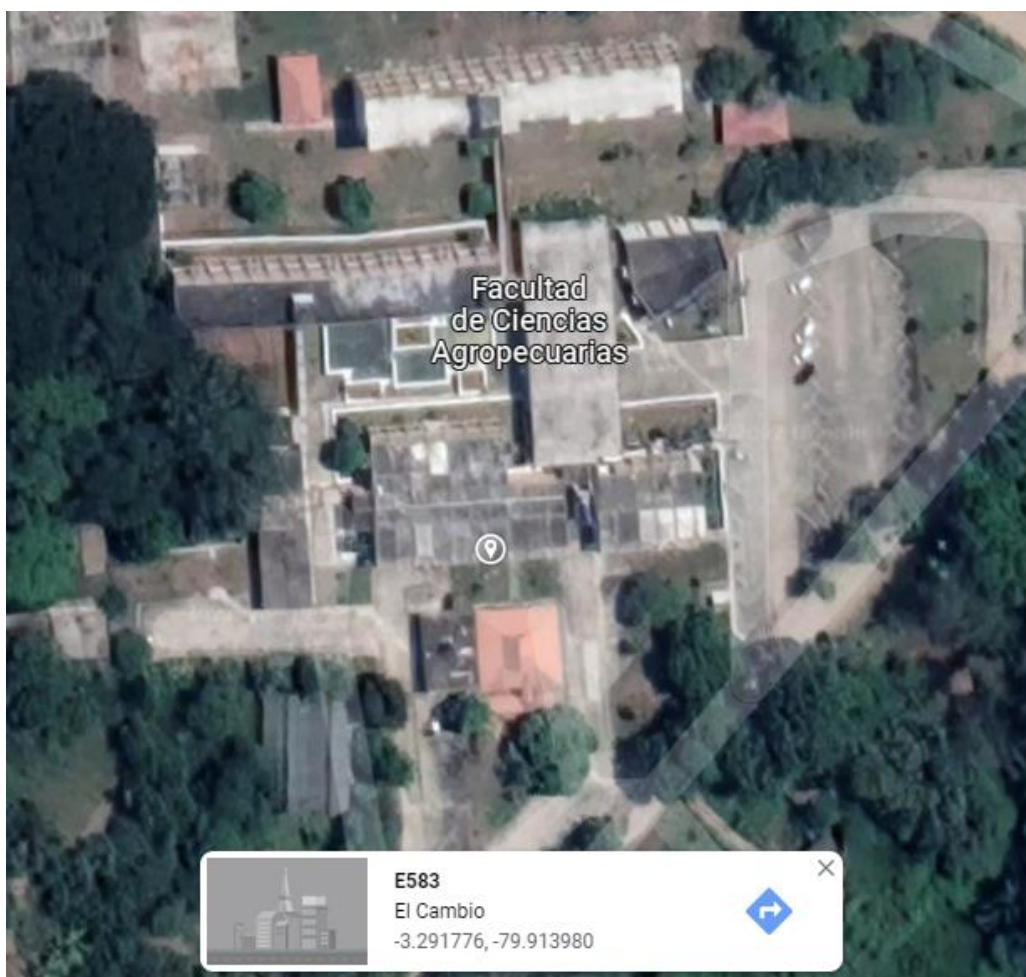
Esta formulado con nutrientes y esporas en latencia del hongo *Trichoderma harzianum*, que mejora el suelo y actuando en la biorregulación de los principales fitopatógenos que enferman los cultivo. Su aplicación se la realiza en aspersión dirigida al suelo húmedo. Este producto presenta una ligera toxicidad para el operario. (Brotman et al. 2008)

## Materiales y Métodos.

### Ubicación del experimento.

El estudio se realizó en el laboratorio de Sanidad Vegetal Ambiente 2, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, en las inmediaciones de la Universidad Técnica de Machala, situado en la Av. Panamericana, 5,5 km vía Machala-Pasaje, parroquia El Cambio en el cantón Machala, provincia de El Oro.

**Figura 18.** Facultad de Ciencias Agropecuarias.



**Fuente:** Google maps.

**Materiales y equipos.**

A continuación, se describe los instrumentos utilizados en el experimento.

**Equipos de laboratorio.**

- Cámara de flujo.
- Autoclave.
- Refrigerador.
- Microondas.
- Balanza digital.
- Estufa.

**Materiales de laboratorio.**

- Vasos de precipitación.
- Varilla de agitación.
- Erlenmeyer.
- Botellas de vidrio.
- Cajas petri.
- Mechero de alcohol.
- PDA (papa-dextrosa-agar).
- Cinta plástica.
- Cinta masking.
- Cinta de embalaje.
- Aluminio.
- Fundas plásticas.

- Alcohol.
- Agua destilada.
- Algodón.
- Gazas
- Pinzas.
- Saca bocado.
- Bandeja plástica.
- Cámara.
- Esferos.
- Cuaderno.
- Marcador.
- Regla.
- Fungicida Mertec 20-S.
- Tricho D.
- Mazorcas de cacao.
- Cloranfenicol.
- Suelo.

### **Metodología.**

A continuación, se describe la metodología de estudio aplicada.

### ***Tratamientos.***

Los 4 primeros tratamientos fueron de alimento envenenando, fundamentándose en la adición del hongo *Trichoderma* sp. en el medio cultivo para su plaqueo en cajas petri. El quinto

consistió en el control por metabolitos volátiles, debido a su actividad como antimicrobianos y el sexto trató del cultivo dual (competencia por espacio y nutrientes) contra el fitopatógeno. En cambio, el tratamiento séptimo y octavo actuaron de testigo de *Phytophthora* sp. y *T. harzianum* respectivamente.

**Tabla 2.** Tratamientos.

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>	<b>Concentración</b>
<b>T1</b>	<b>Alimento envenenado</b>	0.2 g x 200 ml
<b>T2</b>	<b>Alimento envenenado</b>	0.4 g x 200 ml
<b>T3</b>	<b>Alimento envenenado</b>	0.6 g x 200 ml
<b>T4</b>	<b>Alimento envenenado</b>	0.8 g x 200 ml
<b>T5</b>	<b>Metabolitos volátiles</b>	N/A
<b>T6</b>	<b>Cultivo dual</b>	N/A
<b>T7</b>	<b>Testigo <i>Phytophthora</i> sp</b>	N/A
<b>T8</b>	<b>Testigo <i>Trichoderma</i> sp.</b>	N/A

**Fuente:** Elaboración propia.

### ***Variables de estudio.***

Las variables evaluadas en el experimento fueron las siguientes:

- Medir el crecimiento radial del micelio al cuarto y octavo día.
- Porcentaje de control de *Trichoderma* sp. vs *Phytophthora* sp.

### ***Medición de las variables.***

A continuación, se describe las variables medidas.



### **Crecimiento micelial.**

Se hizo la toma de datos al 4to y 8vo día, después de inocular el medio de cultivo con el antagonista y fitopatógeno a evaluar. Se hizo el registro el avance del crecimiento micelial de los tratamientos T1, T2, T3, T4, T5, T7 y T8, mediante el trazado en forma de una cruz, pasando por la mitad del disco micelial, dividiendo la caja petri en 4 secciones, en la que con ayuda de una regla guiándonos por la cruz se midió el radio de la colonia desde el punto de crecimiento micelial, registrando su avance hasta el borde de la caja petri. Para el T6 se coloca el antagonista y el fitopatógeno en extremos opuestos de la caja petri, con la regla y marcador se trazó una línea que pasaba por el punto de ambos puntos de inoculación, registrando su avance el crecimiento micelial de cada uno hasta que se encontraran.

### **Porcentaje de control.**

Se registró al 4to y 8vo día después de la inoculación, del área total de la colonia se sacó el porcentaje de control del hongo, mediante la siguiente fórmula:

$$PIM = \frac{dc - dt}{dc} * 100$$

En donde:

PIM = Porcentaje de inhibición micelial.

dc = Diámetro de la colonia de control.

dt = Diámetro de los tratamientos.

### ***Preparación de trampa cebo para captura de *Phytophthora sp.****

Para realizar la trampa cebo, se utilizó la metodología de cámara húmeda empleada en el trabajo de investigación de (Calva, 2016) la cual demostró tener buenos resultados en la captura de este fitopatógeno, modificando el procedimiento realizado en función del experimento.

1. Se recolecto alrededor de 10 kg de suelo, alrededor de plantas CCN-51 que mostraban sintomatología de la enfermedad de la mazorca negra, en el sitio Rio Negro – Victoria – Santa Rosa – El Oro, de la finca Predio Batallas. Del mismo lugar se extrajeron 3 mazorcas de cacao maduras y sanas, para que sean fuente de inóculo del pseudo hongo.
2. Se traslado el suelo al laboratorio de Sanidad Vegetal Ambiente 2, donde se procedió a elaborar la trampa de cebo para capturar dicho pseudo hongo.
3. Para la elaboración de la trampa cebo, colocamos el 50 % del suelo en un recipiente plástico con un volumen de 0.015 m<sup>3</sup> o 15 L, después se realizó la esterilización de las mazorcas o material vegetal con agua destilada e hipoclorito de sodio al 1%, dejando secar alrededor de 30 minutos.
4. Con un bisturí se procedió a realizar 4 pequeños cortes en el centro de la mazorca en sentido cardinal.
5. Se coloco las mazorcas en forma vertical en el recipiente con suelo, para después colocar el 50% restante del suelo, buscando cubrir las mazorcas hasta los cortes, tratado de dejar la parte expuesta a nivel del suelo.
6. Seguidamente se procedió a saturar el suelo a capacidad de campo (teniendo cuidado de no inundarlo en exceso), ya que, se conoce que este hongo es muy móvil y se reproduce mejor en suelos húmedos. Si se coloca a sombra la propagación será más rápida.

### ***Preparación del PDA (papa-dextrosa-agar).***

Para prepara un litro de medio de cultivo, se pesan en una balanza digital, 39 g de PDA colocado sobre un pedazo cuadrado de papel aluminio. Se vierte agua destilada dentro de un vaso de precipitación de 1000 ml, se agrega 39g PDA, con ayuda de una varilla de agitación se empieza a revolver alrededor de 5 minutos, al mismo tiempo adicionamos 125 mg de cloranfenicol. Esta mezcla se lleva al microondas alrededor de 2 o 3 minutos, hasta que notemos que el medio de cultivo alcanzo el punto de ebullición (para evitar pérdidas del medio de cultivo es preferible colocar la mezcla en recipientes hasta la mitad de su capacidad). El medio de cultivo debe tomar una coloración traslucida a transparente.

Se vierte el contenido del vaso de precipitación en botellas de vidrio, a razón de 200 ml en cada una, en total se utilizaron 8, en estas se colocan pequeños pedazos de papel aluminio en la entrada de la botella a manera de tapa, seguidamente colocamos cinta masking a su alrededor, cuidando de sellar correctamente el recipiente para evitar derrames, introducimos las botellas en funda polyfan y las amaramos. Estas son colocadas dentro del autoclave para su esterilización alrededor de 1 hora. Al finalizar el procedimiento se dejó enfriar el medio de cultivo a temperatura ambiente para ser guardado en una nevera para su posterior uso. Se prepararon 2000 ml de medio de cultivo, de cual se utilizó 1600 ml para el experimento y el sobrante sirvió para realizar la siembra y purificación de *Trichoderma harzianum* y *Phytophthora* sp.

### ***Aislamiento de Phytophthora sp.***

1. Después del tercer día se pudo visualizar el avance de la enfermedad sobre la mazorca.
2. Previamente a la siembra, se esterilizo la cámara de flujo y los materiales de trabajo en el autoclave, para manejar una mejor asepsia.

3. Con un bisturí se cortó porciones de entre 1 y 3 mm<sup>2</sup> de tejido enfermo, primero se debe cortar la superficie del tejido infectado para evitar la presencia de otros hongos contaminantes y sacar tejido interno para tener mayor seguridad de obtener *Phytophthora* sp, estos se colocan en una caja petri estéril, otra con alcohol al 96% y otra con agua destilada estéril.
4. Se calienta el medio de cultivo en el microondas, se deje enfriar levemente y se lleva junto con los materiales de trabajo a la cámara de flujo laminar.
5. Se debe sumergir los tejidos cortados, dentro del alcohol durante 1 minuto, de ahí se los debe cambiar a la caja con agua estéril, posterior a eso se debe dejar reposar en unas gazas durante unos 5 minutos hasta que se sequen, se puede acelerar este proceso con la ayuda de gazas adicionales o algodón. Se colocan un tejido por cada caja petri utilizada. Posteriormente se realizó repiques de la siembra hasta obtener un cultivo puro.
6. Dentro de la cámara de flujo laminar, con una jeringuilla se afora 0.1 ml de Mertec 20-S en un frasco de 200 ml de medio de cultivo, se agitan de tal manera que el fungicida se mezcle homogéneamente, para finalmente plaquearlo.

#### ***Siembra de T. harzianum.***

1. Se descongela el medio de cultivo en microondas y se plaquea dentro de la cámara de flujo laminar.
2. En este lugar se extrae alrededor de 1 g de Tricho D (*T. harzianum*) y se realiza la siembra de este hongo. Se realizó repiques de la siembra hasta obtener un cultivo puro.

#### ***Tratamiento de alimento envenenado.***

1. Se trabajo en la cámara de flujo laminar, por lo que previamente se introdujo los medios de cultivo para siembra, juntos a los materiales de trabajo.

2. Se calientan en el microondas 4 frascos de 200 ml de medio de cultivo, se deja enfriar medianamente.
3. Dentro de la cámara de flujo laminar se dosifico 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 g de *T. harzianum* respectivamente en cada frasco, se mezcla bien para posteriormente plaquearla.
4. Después de plaqueado con ayuda del sacabocados, se perfora algunas veces el medio de cultivo con *Phytophthora* sp., se realiza la siembra colocando un pedazo en el centro en cada caja petri.
5. Posteriormente se realizaron las respectivas mediciones.

#### ***Tratamiento por metabolitos volátiles.***

1. En la cámara de flujo, se coloca el medio de cultivo en la base y tapa del mismo.
2. Con ayuda del sacabocados se extraen pequeños pedazos de *Trichoderma harzianum* y *Phytophthora* sp. y se colocan en la base y tapa de la caja petri.
3. Posteriormente se realizaron las respectivas mediciones.

#### ***Tratamiento por cultivo dual.***

1. Se deben colocar un bocado de *Trichoderma harzianum* y *Phytophthora* sp. en extremos opuestos, al filo de cada caja petri.
2. Posteriormente se realizaron las respectivas mediciones.

#### ***Tratamientos testigo.***

- En estos tratamientos se sembró directamente en cada caja petri con medio de cultivo, bocados de *Trichoderma harzianum* y *Phytophthora* sp.
- Posteriormente se realizo el respectivo registro de crecimiento.

### ***Procedimiento estadístico.***

A continuación, se describe el procedimiento estadístico utilizado para el experimento.

### **Diseño experimental.**

En el DCA, se estudia el efecto de un factor, el cual varía en diferentes tratamientos. Es muy útil en unidades experimentales homogéneas, promoviendo el máximo número de grados libertad del error, flexibilidad número de tratamientos y replicas. Se utilizó el DCA, ya que, el entorno experimental es semejante, al realizarse en condiciones de laboratorio. Se asignaron 5 repeticiones a cada tratamiento, obteniendo 40 unidades experimentales establecidas por las cajas petri, en las que se hizo cada tratamiento.

### **Modelo matemático.**

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$$

Donde:

- $Y_{ij}$  = observación de la variable respuesta en el  $i$ -ésimo tratamiento y la  $j$ -ésima observación obtenidas en la UE (VD estudiada).
- $\mu$  = media general de la población de datos generada en el experimento (gran media).
- $\alpha_i$  = indica el efecto del  $i$ -ésimo tratamiento, o sea, es el efecto de los niveles o versiones del factor en estudio.
- $e_{ij}$  = errores experimentales asociados, o sea, la desviación en el  $i$ -ésimo tratamiento y la  $j$ -ésima replicación (error aleatorio asociado a la respuesta  $Y_{ij}$ ).

### **Prueba de Kruskal-Wallis.**

La prueba de Kruskal-Wallis es el procedimiento no paramétrico análogo al modelo completamente al azar del análisis de varianzas, que es una extensión de la prueba de rangos de

Wilcoxon (1945), llegando a ser la versión no paramétrica de la prueba de comparación de medias de t. Esta prueba es aplicada en áreas como la ciencia de la salud (Gómez et al. 2003), ciencias de la comunicación (Ihom et al. 2011), mecánica aplicada y ciencia de los materiales (Ostertagová et al. 2014), entre otras. Utilizada por el mínimo de supuestos necesarios para aplicarla, siendo muy versátil (Ihom et al. 2011) adaptándose mejor a datos ordinales y en escalas que pueden ser subjetivas (Ostertagová et al. 2014). Es una alternativa no paramétrica al Anova de un factor, para datos no pareados. En Anova se comparan medias y en la prueba de Kruskal-Wallis se contrasta si las muestras están distribuidas equitativamente y pertenecen a una misma población. El uso de esta prueba, es adecuado, cuando los datos tienen un orden normal o cuando no se satisfacen las condiciones para poder aplicar un ANOVA.

### Resultados y Discusión.

En el trabajo de investigación, con los datos obtenidos se realizaron las pruebas de normalidad y homocedasticidad, Shapiro-Wilks y Levene, para ver si cumple dichos supuestos, evidenciándose que los valores resultantes no tienen una varianza homogénea ni distribución normal, entonces, se procedió a realizar un análisis no paramétrico mediante la prueba Kruskal-Wallis.

**Tabla 3.** Prueba de Kruskal Wallis.

Variable	TRAT	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
MM	T1	5	31.90	1.81	31.50	32.69	<0.0001
MM	T2	5	31.85	0.76	32.00		
MM	T3	5	30.70	6.28	33.50		
MM	T4	5	33.35	0.38	33.25		
MM	T5	5	4.20	0.99	4.00		
MM	T6	5	12.20	3.03	12.00		
MM	T7	5	33.60	0.63	33.25		
MM	T8	5	41.65	0.95	42.25		

**Fuente:** Elaboración propia.

**Tabla 4.** Prueba de comparación de medianas

Trat.	Ranks			
T5	3.00	A		
T6	8.00	A	B	
T2	17.30	A	B	C
T1	18.60		B	C
T3	24.30			C D
T4	26.60			C D
T7	28.20			C D
T8	38.00			D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)*

**Fuente:** Elaboración propia



En la prueba de Kruskal Wallis, en el cuadro 1, se demuestra que al menos tres tratamientos son estadísticamente diferentes al resto. En el cuadro 2, al observar la comparación de rangos de medianas, se muestran diferentes agrupaciones y niveles, por lo tanto, letras iguales entre tratamientos no son significativamente diferentes. En la comparación de medianas, los promedios del crecimiento micelial (mm) se observan 6 niveles de agrupamientos entre los tratamientos estudiados, esto nos indica que los tratamientos T5 (metabolitos volátiles) y T6 (cultivo dual) son estadísticamente superior a los demás tratamientos. Los antibióticos volátiles producidos por *Trichoderma*, muestran un porcentaje de inhibición más alto sobre el crecimiento de la colonia de *Phytophthora* sp., atribuido del efecto fungistático del aislamiento de *Trichoderma harzianum*. También tiene mayor capacidad de competencia por sustrato, resaltando la creación del halo de inhibición y disminución del crecimiento radial de P. en cultivo dual.

Se ha verificado mediante ensayos in vitro que *Trichoderma* presenta compuestos orgánicos volátiles que inhiben el desarrollo micelial de *P. infestans* (Elsherbinyet al. 2020). Se describe que los aislamientos de *Trichoderma* tienen potencial en la competencia por espacio y nutrientes y en la producción de metabolitos volátiles. (Castillo et al. 2019). También se demostró que *Trichoderma* produce metabolitos secundarios, que inhiben otros microorganismos con los que no se establece contacto físico. Algunas cepas producen trichodermina, dermadina, suzukacilina, viridina, alameticina, richotoxina, metabolitos que son responsables del mecanismo antagónico ante *Phytophthora* sp (Villamil et al. 2012).

Son hongos antagonistas que colonizan rápidamente las partes afectadas por *Phytophthora* debido a característica de parasitismo, deteniendo su crecimiento y empezando a competir por el espacio y nutrientes (Murrieta & Palma, 2018). Estos hongos parasitan la hifa del

patógeno por medio de enrollamientos, ganchos y cuerpos que apresan y penetran la pared celular por la acción hidrolítica de las enzimas quitinasas, glucanasas y celulasas (Martinez B, 2013). Las cepas de *Trichoderma* activan la resistencia sistémica inducida en plantas contra diferentes plagas. Por ejemplo, *T. asperellum* incito la resistencia en pepino contra *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (E. F. Smith & Bryan) Young, Dye & Wilkie. (Shoresh et al. 2010)

Como se observa en los tratamientos T1, T2, T3 y T4, el cuadro comparación de medianas, no presentaron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial del hongo *Phytophthora* sp. a nivel in vitro, es decir son estadísticamente iguales al T7 (testigo).

## Conclusiones

Al evaluar los tratamientos con *Trichoderma harzianum*, se determinó que los que presentaron mayor efecto inhibitorio sobre *Phytophthora* sp., en condiciones controladas de laboratorio a nivel in vitro, son el T5 (metabolitos volátiles) y el T6 (cultivo dual), ya que, son estadísticamente sobresalientes, comparados con los demás, por lo que considerados como el mejores.

Se evidencio que los tratamientos T1, T2, T3 Y T4, no presentaron efecto inhibitorio sobre crecimiento micelial del hongo *Phytophthora* sp., esto se puede deber, a que, al calentar el medio de cultivo en microondas, se alcanzan temperaturas mayores a 100 °C y las cepas de *Trichoderma* sp. presentan inestabilidad estructural a temperaturas mayores 40 °C.

Los antagonistas ayudan en la mitigación de daños causados por enfermedades, en los agroecosistemas que presentan condiciones favorables para su desarrollo y conservación, presentando diferentes modos de acción que les permiten ejercer su efecto biorregulador, estos atributos, en conjunto con la capacidad de multiplicarse abundantemente, se encuentran entre los de mayor importancia para su selección como agentes de control biológico bajo el contexto de una agricultura sustentable que minimice el impacto ambiental.

### **Recomendaciones**

En vista de que los resultados fueron exitosos para los tratamientos por metabolitos volátiles y cultivo dual, se recomienda probar estas metodologías en futuras investigaciones manejando diferentes concentraciones y para probar su potencial inhibitorio en otras enfermedades fitopatógenas.

Para los tratamientos T1, T2, T3 y T4, no se recomienda inocular las cepas de *Trichoderma* sp., en medio de cultivo a temperaturas mayores a 40 °C, ya que presentan inestabilidad en su estructura, se recomienda trabajar con temperaturas menores a 40 ° C y superiores a 20 °C, ya que, está dentro de su rango de adaptación natural.

### Bibliografía

- Adejumo, T. (2005). *Crop protection strategies for major diseases of cocoa, coffee and cashew in Nigeria*. Nigeria: African Journal of Biotechnology.
- Ali, S., Amoako, I., & Bailey, R. (2016). *PCR-based identification of cacao black pod causal agents and identification of biological factors possibly contributing to Phytophthora megakarya's field dominance in West Africa*. Plant Pathology 65.
- Anand, A., Chinchilla, D., & Tan, C. (2020). Contribution of hydrogen cyanide to the antagonistic activity of Pseudomonas strains against Phytophthora infestans. *Microorganisms*, 8: 1–10.
- ANECACAO. (2019). Sextor exportador de cacao. 3.
- ANECACAO. (2020). Edición N°21.
- ANECAFE. (2004). Cultivo de cacao. 3.
- Arciniega, J. (2017). *Propuesta de manejo integrado de la moniliasis (Moniliophthora roreri) del cacao (Theobroma cacao) en Santo Domingo de los Tsáchilas*. . Quito: Universidad Central Del Ecuador.
- ASOCIADOS, J. (2013). Orius biotecnología. *Disan Communications*.
- Bailey, B., & Meinhardt, L. (2016). *Cacao Diseases: A History of Old Enemies*. Springer International Publishing Switzerland.

- Bolaños, M. G. (2017). Caracterización y epifitiología de *Phytophthora* sp., en cacao (*Theobroma cacao* L.) en áreas cacaoteras de Esmeraldas. . *Investigación y saberes*, 6(2), 47-66.
- Bravo, J. (2019). *Evaluación in vitro de la actividad biocida de diferentes fungicidas sobre el crecimiento radial de Moniliophthora roreri, Moniliophthora perniciosa y Phytophthora palmivora, agentes causales de enfermedades en cacao*. Los Ríos, Ecuador.: Universidad Técnica Estatal De Quevedo. Quevedo.
- Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A., & Chet, I. (2008). *Role of Swollenin, an expansin-like protein from Trichoderma, in plant root colonization*. . *Plant Physiol*. .
- Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A., & Chet, I. (2008). *Swollenin, an expansin-like protein from Trichoderma, in plant root colonization*. *Plant Physiol*.
- Cabuya, C. (2018). Clasificación Taxonómica Del Cacao| Flores | Árboles.
- Calva, C. (2016). *Control químico in vitro de phytophthora sp agente causal de la mancha negra en el cultivo de cacao*. Machala, Ecuador: UTMACH - Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias.
- Castillo, S., Berroterán, A., & Villa, G. (2019). *Evaluación de aislamientos nativos de Trichoderma spp. obtenidos en la Zona Norte para el control de Phytophthora palmivora agente causal de la Pudrición del cogollo*. Bucaramanga, Colombia.: Cenipalma.
- Chávez, J. (2020). *Caracterización cultural, patogénica y sensibilidad in vitro de Phytophthora spp. asociado a enfermedades de mazorca de cacao (Theobroma cacao L)*. Manabí: Escuela Superior Politécnica agropecuaria de Manabí.

- Chiriboga, M. (2013). *Jornaleros, grandes propietarios y exportación cacaotera, 1790-1925*. Quito: Universidad Andina Simón Bolívar, Sede Ecuador / Corporación Editora Nacional.
- CONABIO. (1992). *Conocimiento de especies de arboles*. Mexico.
- CORPOICA. (2015). *Identificación y manejo de la pudrición parda de la mazorca (Phytophthora sp.) en cacao*. Bogota: Carvajal Soluciones de Comunicación S.A.S.
- Deberdt, P., Mfegue, C., Tondje, P., & ., e. a. (2008). *Impact of environmental factors, chemical fungicide and biological control on cacao pod production dynamics and black pod disease (Phytophthora megakarya) in Cameroon*. Biological Control.
- Decloquement, J. (2018). *Caracterizacao morfo-molecular e patogenicidade de Phytophthora spp . asociadas ao cacauero (Theobroma cacao L .)*. Brasília, Brasil.: Universidade de Brasília.
- Dos Santos, F., Tata, A., & Belaz, K. (2016). *Major phytopathogens and strains from cocoa (Theobroma cacao L.) are differentiated by MALDI-MS lipid and or peptide protein profiles*. Analytical and Bioanalytical Chemistry.
- El-Sayed, A., & Ali, G. (2020). *Aspergillus flavipes is a novel efficient biocontrol agent of Phytophthora parasitica*. Biological Control .
- Elsherbiny, E., Amin, B., & Aleem, B. (2020). *Trichoderma volatile organic compounds as a biofumigation tool against late blight pathogen Phytophthora infestans in postharvest Potato tubers*. Journal of Agricultural and Food Chemistry.
- FAOSTAT. (2019). *Principales países productores de cacao a nivel mundial*.

- Fernández, L. (2001). *Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas.*
- García, A. (2017). *Evaluación de aislamientos de Trichoderma spp. para el control de Phytophthora palmivora, agente causante de la pudrición del cogollo de la palma de aceite.* Bogota, Colombia.: Corporación Universitaria Minuto de Dios.
- Gómez, M., Danglot, B., & Vega, F. (2003). Sinopsis de pruebas estadísticas no paramétricas. Cuándo usarlas. *Revista Mexicana de Pediatría.*
- González, J. (2018). El Cultivo de cacao.
- Guest, D. (2000). Diverse Pathogens with a Global Impact on Cocoa Yield,. *Black Pod.*
- Guoweia, S., Man, H., Shikai, W., & He, C. (2011). Effect of some factors on production of cellulase by Trichoderma reesei HY07. *Procedia Environmental Sciences.*
- Hanada, R. (2020). Biocontrol potencial of trichoderma martiale against the black-pod disease (Phytophthora palmivora) of cacao. 15.
- Harman, G. (2004). *Mythos and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on Trichoderma harzianum T22.* Plant Dis.
- Harman, G., & Kubicek, C. (1998). *Trichoderma and Gliocladium, Vol. 2.* London: Taylor & Francis.
- Harman, G., Howell, C., Viterbo, A., & Chet, I. (2004). *M. Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts.* Nature Reviews Microbiology.
- Hernández, A. (2014). Antagonistas microbianos para el manejo de la pudrición negra del fruto de Theobroma cacao L. 19.



- Hernández, E., Gallo, L., & Rosa, S. (2005). Distribución de la podredumbre de raíz producida por *Phytophthora cinnamomi* Rands. En los cultivos de aguacate de Tenerife.
- Hernández-Melchor, D. J. (2019). Trichoderma: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Microbiología de Suelos*.
- Hernández-Rodríguez, A., Miguélez-Sierra, Y., & Heydrich-Pérez, M. (2014). *Antagonistas microbianos para el manejo de la pudrición negra del fruto en Theobroma cacao L. Estado actual y perspectivas de uso en Cuba*. Cuba.
- Ihom, P., Abella, A., Anbua, E., & Ogbodo, J. (2011). *Kruskal-Wallis Test as analytical tool for key components of a newly developed core mixture*. Journal of Practices and Technologies.
- INIAP. (2009). Manual del cultivo de cacao para la Amazonia ecuatoriana. *Estación experimental central de la Amazonía DENAREF*, 4.
- Keswani, C., Singh, H., García, C., & al., e. (2020). Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important bacteria as next-generation pesticides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104: 1013-1034.
- Kudjordjie, E. (2015). *Phytophthora megakarya and P. palmivora on Theobroma cacao: aspects of virulence and the effects of temperature on growth and resistance to fungicides*. Camerum: (Master's thesis). University of Cop Enhagen. .
- la Grange, D. R. (2010). Engineering cellulolytic ability into bioprocessing organisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

- Lanaud, C., Loor, R., Zarrillo, S., & Valdez, F. (2016). Origen de la domesticación del cacao y su uso temprano en Ecuador. *Nuestro Patrimonio*, 55, 12-14.
- Lanaud, C., Risterucci, A., Pieretti, I., N'Goran, J., & Fargeas, D. (2003). Characterization and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). . 13(3):. *Mol Breeding*, 211-227.
- Liu, H., Xue, X., Yu, Y., & al., e. (2020). Copper ions suppress abscisic acid biosynthesis to enhance defence against *Phytophthora infestans* in potato. *Molecular Plant Pathology*.
- López, A. (2017). Producción y Comercialización de Cacao Fino de Aroma en el Ecuador. *Superintendencia de control del poder de mercado*, 4.
- Lorenzo, N. (2001). *Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de las cepas nativas de Trichoderma spp.* La Habana: Universidad Agraria La Habana.
- Martinez B, I. D. (2013). *Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos.* Protección Vegetal.
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos.* Mayabeque, Cuba: Rev. Protección Veg.
- Massola, N., & Krugner, T. (2011). *Manual de fitopatología: principios e conceitos.* São Paulo: Agronômica Ceres.
- McBeath J, A. M. (1991). *Taxonomy of a new Trichoderma found in Alaska.* Alaska: Phytopathology.

- Mesa-Vanegas, A. M., Marín, A., & Calle-Osorno, J. (2019). *Metabolitos secundarios en Trichoderma spp. y sus aplicaciones*. Actualidades Biológicas.
- Montes, M. (2016). Efectos del fosforo y azufre sobre el rendimiento de mazorcas, en una plantación de cacao (*Theobroma cacao* l.) CCN-51, en la zona de Babahoyo. *Univerdad Tecnica de Babahoyo*, 46.
- Mora, P. (2011). *Enfermedades de cacao de Centroamerica*. Turrialba, Costa Rica: CATIE.
- Morton, C., Hirsch, P., & Kerry, B. (2004). *Infection of plant parasitic nematodes by nematophagous fungi - a review of application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control*. Nematology.
- Murrieta, E., & Palma, H. (2018). *Manejo integrado de la mazorca negra en el cultivo de cacao*. Perú: USAID.
- Naher, L., Yusuf, U. K., Ismail, A., & Hossain, K. (2014). *Trichoderma spp.: a biocontrol agent for sustainable management of plant diseases*. Pak. J. Bot.
- Ostertagová, E., Ostertag, O., & Kováč, J. (2014). *Methodology and application of the Kruskal-Wallis test*. Applied Mechanics and Materials.
- Procacaho. (2017). *Reconociendo los síntomas y signos de la mazorca* .
- Puig, A. S., Quintanilla, W., Matsumoto, T., Keith, L., Gutiérrez, O. A., & Marelli, J. P. (2021). *Phytophthora palmivora causa enfermedad en Theobroma cacao en Hawai*. Hawai: Roy Kennedy.

- Ramírez, J. (2016). *Pérdidas económicas asociadas a la pudrición de la mazorca del cacao causada por Phytophthora spp., y Moniliophthora roreri (Cif y Par)*. Colombia: Protección Vegetal.
- Roberto, N., Silva, V. N., Steindorf, A., Viera, E., Ferreira, E., & Ulhoa, C. (2019). *Trichoderma/pathogen/plant interaction* .
- Sandle, T. (2014). *Encyclopedia of Food Microbiology*. London, UK.: En C.A. Batt y M.-L. Tortorello (eds.).
- Sarayasi, S. (2012). Control biológico de plagas-Una alternativa a los insecticidas. *Leisa Revista de Agroecología*.
- Shoresh, M., Harman, G., & Mastouri, F. (2010). *Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. Annu. Rev. . Phytopathol.*
- Souza, L., Magalhães, V., Santana, D., Pereira, J., Nascimento, C., Guimaraes, H., . . . Santos, P. (2020). *Diversidad Taxonómica e Identificación de Trichoderma*. Editora UFRB.
- Suárez, C. (2014). Últimos avances en el control de mazorca negra.
- Thines, M. (2013). *Taxonomy and Phylogeny of Phytophthora and Related Oomycetes*. Londres: Cabi.: En K. Lamour, *Phytophthora A global perspective*.
- TO., A. (2005). *Crop protection strategies for major diseases of cocoa, coffee and cashew in Nigeria. African Journal of Biotechnology*. . Nigeria.
- Villamil, J. (2012). Evaluación in vitro de microorganismos nativos por su antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en cacao (*Theobroma cacao* L.).

- Villamil, J., Blanco, J., & Viteri, S. (2012). *In vitro evaluation of Native Microorganisms for their Antagonism against Moniliophthora roreri Cif & Parin Cocoa (Theobroma cacao L.)*. Medellín: Fac Nal Agr.
- Villegas, M. (2005). *Trichoderma Pers. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible*. Colombia: Orius Biotecnología.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma–plant–pathogen interactions*. Soil Biology and Biochemistry.
- Vinodkumar, S., I. T., & Nakkeeran, S. (2017). *Trichoderma asperellum (NVTa2) as a potential antagonist for the management of stem rot in carnation under protected cultivation*. Biological Control.
- Woo, S., & Lorito, M. (2007). *Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol*. In: Vurro M, Gressel J. (Eds.). *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. Springer.
- Zaki, O. W. (2020). *Limiting factors of mycopesticide development*. . Biological Control.
- Zambrano, M. (2013). Evaluación de tres métodos de propagación clonal, bajo dos tipos de cubierta, utilizando dos variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) genéticamente diferentes, en su fase de prendimiento definitivo a nivel comercial en Santo Domingo de los Tsáchilas.
- Zarrillo, S., Gaikwad, N., Lanaud, C., Powis, T., Viot, C., Lesur, I., . . . Loor, R. (2018). *The Use and Domestication of Theobroma Cacao during the mid-Holocene in the Upper Amazon*. Nature Ecology & Evolution 2.

Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., & Mukherjee, P. (2016). *Secondary metabolism in - chemistry meets genomics*. Fungal Biology Reviews.

Zimand, G., Elad, Y., & Chet, I. (1996). *Effect of Trichoderma harzianum on Botrytis cinerea pathogenicity*. Phytopathol.

## Anexos

*Anexo 1.* Toma de datos del tratamiento por alimento envenenado.

1era toma datos (mm)						2da toma datos (mm)						
	DER	IZQ	SP	INF								
Tratamiento 1 (1g/L)	1	2	3	4	PROMEDIO	Tratamiento 1 (1g/L)	1	2	3	4	PROMEDIO	PROMEDIO TOTAL
T1R1	4	5	4	4	4.25	T1R1	23	27	35	25	27.5	31.75
T1R2	4	3	4	4	3.75	T1R2	27	26	28	26	26.75	30.5
T1R3	3	3	8	4	4.5	T1R3	29	29	24	26	27	31.5
T1R4	4	4	4	3	3.75	T1R4	35	26	34	30	31.25	35
T1R5	4	4	4	3	3.75	T1R5	27	26	28	27	27	30.75

Tratamiento 2 (2g/L)						Tratamiento 2 (2g/L)						
	1	2	3	4	PROMEDIO		1	2	3	4	PROMEDIO	
T2R1	4	3	3	3	3.25	T2R1	28	29	29	29	28.75	32
T2R2	4	3	5	4	4	T2R2	28	27	30	30	28.75	32.75
T2R3	3	4	5	2	3.5	T2R3	26	27	26	30	27.25	30.75
T2R4	4	3	3	4	3.5	T2R4	30	28	28	29	28.75	32.25
T2R5	4	4	4	5	4.25	T2R5	29	27	27	26	27.25	31.5

Tratamiento 3 (3g/L)						Tratamiento 3 (3g/L)						
	1	2	3	4	PROMEDIO		1	2	3	4	PROMEDIO	
T3R1	3	5	4	3	3.75	T3R1	30	27	31	31	29.75	33.5
T3R2	3	3	4	2	3	T3R2	29	5	13	19	16.5	19.5
T3R3	3	3	3	3	3	T3R3	32	27	31	29	29.75	32.75
T3R4	5	4	6	4	4.75	T3R4	30	30	28	30	29.5	34.25
T3R5	3	3	5	5	4	T3R5	29	31	30	28	29.5	33.5

Tratamiento 4 (4g/L)	1	2	3	4	PROMEDIO	Tratamiento 4 (4g/L)	1	2	3	4	PROMEDIO	
T4R1	3	2	3	2	2.5	T4R1	29	33	27	33	30.5	33
T4R2	2	3	4	3	3	T4R2	30	31	30	30	30.25	33.25
T4R3	2	4	4	5	3.75	T4R3	35	27	28	30	30	33.75
T4R4	4	3	4	3	3.5	T4R4	29	32	28	32	30.25	33.75
T4R5	5	4	5	6	5	T4R5	25	28	32	27	28	33

*Anexo 2.* Toma de datos del tratamiento por metabolitos volátiles.

1era toma datos	DER	IZQ	SUP	INF	PROMEDIO	2da toma datos	DER	IZQ	SUP	INF	PROMEDIO	PROM TOTAL
Tratamiento 5	1	2	3	4		Tratamiento 5	1	2	3	4		
TT5R1	25	27	26	29	26.75	TT5R1	15	18	20	17	17.5	44.25
PT5R1	4	4	5	4	4.25	PT5R1	1	2	2	1	1.5	5.75
TT5R2	15	14	27	17	18.25	TT5R2	0	2	0	1	0.75	19
PT5R2	3	4	4	5	4	PT5R2	0	0	0	0	0	4
TT5R3	17	15	20	20	18	TT5R3	0	7	1	1	2.25	20.25
PT5R3	2	3	4	2	2.75	PT5R3	0	0	0	1	0.25	3
TT5R4	21	21	20	20	20.5	TT5R4	6	19	8	6	9.75	30.25
PT5R4	3	5	3	3	3.5	PT5R4	1	0	1	1	0.75	4.25
TT5R5	22	26	25	25	24.5	TT5R5	18	19	1	0	9.5	34
PT5R5	3	2	2	3	2.5	PT5R5	1	1	2	2	1.5	4



*Anexo 3.* Toma de datos del tratamiento por cultivo dual.

Primera toma datos (mm)		
Tratamiento 6	1 (T)	2 (P)
T6R1	26	5
T6R2	38	6
T6R3	25	5
T6R4	27	5
T6R5	29	5

Segunda toma datos (mm)			PROM TOTAL	
Tratamiento 6	1 (T)	2 (P)	TRICH	PHYTOP
T6R1	23	11	49	16
T6R2	11	6	49	12
T6R3	29	3	54	8
T6R4	21	9	48	14
T6R5	13	6	42	11

*Anexo 4.* Toma de datos del testigo *Phytophthora sp.*

Primera toma datos					PROM	Segunda toma datos					PROM	PROM TOTAL
Tratamiento 7	1	2	3	4		Tratamiento 7	1	2	3	4		
T7R1	4	5	5	4	4.5	T7R1	34	26	27	27	28.5	33
T7R2	6	5	4	6	5.25	T7R2	29	24	28	31	28	33.25
T7R3	7	6	6	6	6.25	T7R3	30	26	29	28	28.25	34.5
T7R4	4	7	7	4	5.5	T7R4	29	27	25	30	27.75	33.25
T7R5	2	5	4	3	3.5	T7R5	32	30	28	32	30.5	34

*Anexo 5.* Toma de datos del del testigo *T. harzianum.*

Primera toma datos					PROM	Segunda toma datos					PROM	PROM TOTAL
Tratamiento 8	1	2	3	4		Tratamiento 8	1	2	3	4		
T8R1	22	19	30	25	24	T8R1	20	18	12	16	16.5	40.5
T8R2	35	35	26	34	32.5	T8R2	9	1	17	6	8.25	40.75
T8R3	27	33	28	34	30.5	T8R3	14	11	12	10	11.75	42.25
T8R4	33	27	26	25	27.75	T8R4	7	18	13	20	14.5	42.25
T8R5	30	35	28	35	32	T8R5	13	7	13	9	10.5	42.5

**Anexo 6.** Pruebas de normalidad y homocedasticidad, Shapiro-Wilks y Levene

SHAPIRO WILK

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO MM	40	0.00	2.37	0.78	<0.0001

PRUEBA DE LEVENE

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS MM	40	0.47	0.35	114.99

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	68.64	7	9.81	4.04	0.0028
TRAT	68.64	7	9.81	4.04	0.0028
Error	77.69	32	2.43		
Total	146.33	39			

**Anexo 7.** Planta de CCN51 con sintomatología de la amazorca negra.



*Anexo 8.* Preparación de trampa cebo para captura de *Phytophthora sp.*



*Anexo 9.* Presencia del micelio de la enfermedad de la mazorca negra.



*Anexo 10.* Preparación del medio de cultivo.



*Anexo 11.* Plaqueo de medio de cultivo



**Anexo 12.** Auto clavado de medio de cultivo.



**Anexo 13.** Aplicación de Mertec 20-S al medio de cultivo.



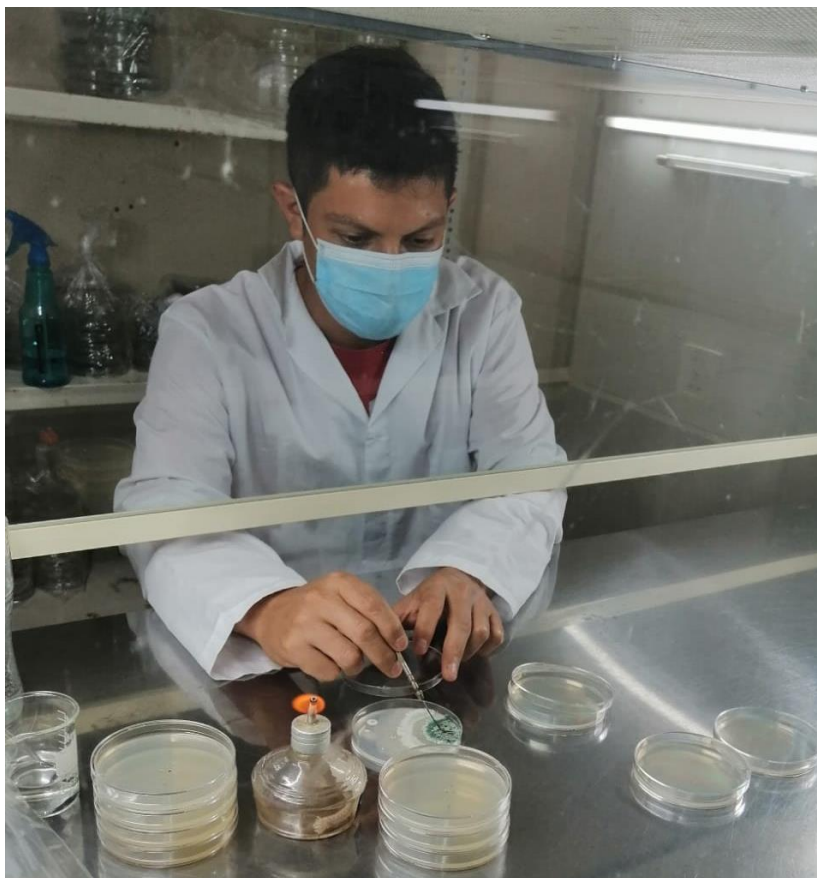
**Anexo 14.** Siembra de pequeños cortes de tejido infectado por *Phytophthora* sp.



**Anexo 15.** Siembra de *Trichoderma* sp. en medio de cultivo.



**Anexo 16.** Resiembra de *Trichoderma* sp. para su purificación.



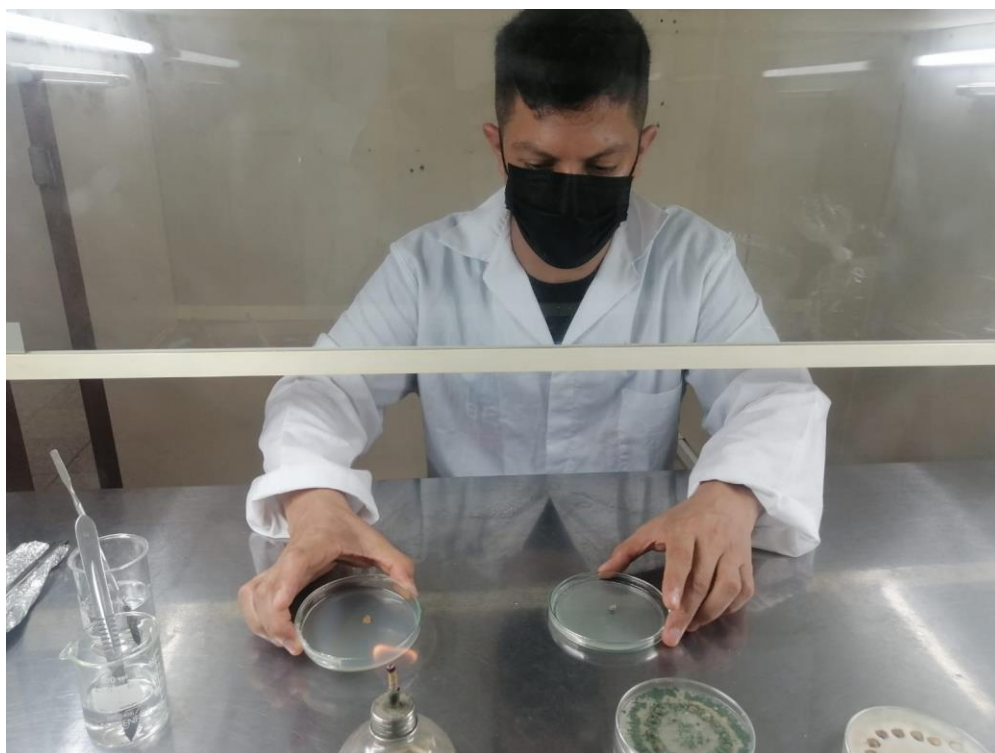
**Anexo 17.** Bocados de *Trichoderma* sp. y *Phytophthora* sp. para su aplicación en tratamientos.



**Anexo 18.** Preparación y plaqueo de alimento envenenado.



**Anexo 19.** Siembra de cultivo dual

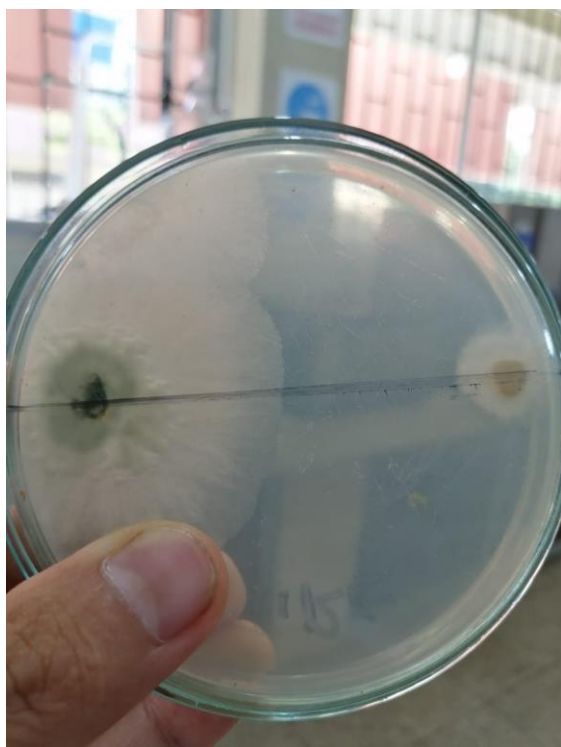




**Anexo 20.** Medición de las variables a evaluar.



**Anexo 21.** Tratamiento por cultivo dual.



**Anexo 22.** Tratamiento por metabolitos volátiles.



**Anexo 23.** Siembra de *Phytophthora* sp., en alimento envenenado.



**Anexo 24.** Inhibición de *Phytophthora* sp. por *Trichoderma harzianum* en cultivo dual.



**Anexo 25.** Inhibición de *Phytophthora* sp. por *Trichoderma harzianum* por metabolitos volátiles

