**UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM**

**Facultad de Ciencias de la Tierra y Agua**

**Carrera de Agroecología**

# Evaluación del potencial antagónico de aislados de *Trichoderma* spp. frente al fitopatógeno monilia (*Moniliophthora roreri)* mediante el método de confrontación dual

Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de:

**INGENIERA EN AGROECOLOGÍA**

**AUTOR:** JUANA LIZBETH ROBALINO CACUANGO

TUTOR: Msg. Luis Patricio Moncayo

**Tena - Ecuador**

**2024**

**Carrera de Agroecología**

**Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad**

Tena, 02 de septiembre de 2024

Yo, Juana Lizbeth Robalino Cacuango, con documento de identidad N° 1724631997, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título: Ingeniera en Agroecología, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,



Juana Lizbeth Robalino Cacuango

CI:1724631997

**Carrera de Agroecología**

**Autorización de publicación en el repositorio institucional**

Tena, 02 de septiembre de 2024

Yo, Juana Lizbeth Robalino Cacuango, con documento de 1724631997, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación del potencial antagónico de aislados de *Trichoderma* spp. frente al fitopatógeno monilia (*Moniliophthora roreri*) mediante el método de confrontación dual", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.



Juana Lizbeth Robalino Cacuango

CI: 1724631997

**Carrera de Agroecología**

**Certificado de dirección de trabajo de titulación**

Tena, 02 de septiembre de 2024

Certifico que el trabajo de titulación: “Evaluación del potencial antagónico de aislados de *Trichoderma* spp. frente al fitopatógeno monilia (*Moniliophthora roreri*) mediante el método de confrontación dual”, aprobado bajo el mecanismo de titulación de: tesis, fue realizado por Juana Lizbeth Robalino Cacuango, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.



Luis Patricio Moncayo Lema

CI:0920360898

**AGRADECIMIENTO**

El más sincero agradecimiento a la Universidad Regional Amazónica Ikiam, por darme la oportunidad de obtener una profesión con una visión más amplia desde el punto de vista de la Agroecología enmarcada en el respeto a la naturaleza y saberes ancestrales poniendo el granito de arena con la innovación para ser una ayuda para la sociedad.

A mis profesores quienes han sido pilar fundamental en mi formación especialmente al Mgs Luis Moncayo quien me ha enseñado que cada error es una sabiduría más y que nunca hay que dejarse vencer por los obstáculos.

A la asociación Kallari por permitirme el ingreso a las fincas de sus socios para realizar la recolecta de muestras.

Al director de la Estación Experimental Central de la Amazonía Carlos Caicedo por abrirme las puertas de tan prestigioso instituto de investigaciones, al Ingeniero Jimmy Pico encargado del laboratorio de Protección Vegetal por su apoyo y sabiduría compartida para el desarrollo del presente trabajo.

A mis amigos quienes me acompañaron y apoyaron en esta travesía: Daniel Torres que sin su ayuda no sería posible gran parte de esta hazaña por ser un compañero y amigo que siempre me motivó a ser mejor persona, a: Esteban Romero quien con su amistad hizo más amena esta etapa estudiantil.

## DEDICATORIA

A Dios por darme la fuerza para culminar mis estudios

A mi Madre María Juana Cacuango quien a más de darme su nombre me ha heredado el carácter y determinación que la caracteriza para nunca darme por vencida hasta lograr mis objetivos y a mi padre Milton Patricio Robalino quien me ha heredado su amor y cariño para ser bondadosa y permitirme llegar lejos con esas cualidades.

A mis hermanos Javier, Bryan y Jhon Robalino quienes han sido mi ejemplo para seguir.

A mi hermana Alicia Margoth Robalino quien me ha dado todo su amor y fortaleza en los días malos para seguir adelante además de darme su comprensión y apoyo incondicional.

A Ruth Carlosama quien con su aprecio jamás me dejó sola y siempre me ofreció su ayuda y cariño.

A quienes han sido mi inspiración a: Daniela Álvarez quien me ha dado la alegría más linda del mundo desde el momento de su existencia y ha sido el faro de luz que me guía por un buen camino, a Patrick Lapina quien es el caballerito de mi vida, a Martina Robalino quien con su llegada me ha dado felicidad y complementado el trío perfecto de amor y ternura de mi vida a ellos les dedicó gran parte de esta etapa estudiantil.

A mis maestros que formaron parte de mi vida estudiantil y que aportaron con sus conocimientos para poder cumplir una etapa de mi vida.

**TABLA DE CONTENIDO**

**PORTADA**

**DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD .....ii**

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL .....iii**

**CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN .....iv**

**AGRADECIMIENTO .....v**

**DEDICATORIA .....vi**

**ÍNDICE DE TABLAS .....xi**

**ÍNDICE DE FIGURAS .....xii**

**ÍNDICE DE ANEXOS .....xiv**

**RESUMEN .....xv**

**ABSTRACT .....xvi**

**CAPITULOS (I, II, III, IV, V)**

**1. CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....1**

**1.1. Antecedentes .....1**

**1.2. Planteamiento del problema .....3**

**1.3. Justificación de la investigación .....4**

**1.4. Objetivos de la investigación .....5**

**2.1. Área de estudio .....7**

**2.2. Materiales y métodos.....9**

**2.2.1. Recolecta en campo de muestras de tejido de "Trichoderma spp." y "Moniliophthora roreri" .....9**

**2.2.2. Aislamiento y siembra de muestras en medios de cultivo ..... 10**

**2.2.3. Determinación de la viabilidad de Trichoderma spp. ..... 11**

**2.2.4. Confrontación ..... 12**

**2.2.5. Tratamientos ..... 13**

**2.2.6. Variables para evaluar ..... 13**

**2.3. Software de análisis de datos ..... 15**

**2.4. Diseño Experimental ..... 15**

**2.5. Manejo específico del experimento ..... 16**

**3. CAPITULO III: RESULTADOS ..... 18**

**3.1. Codificación de aislados de *Trichoderma* spp. ..... 18**

**3.2 Caracterización morfológica de los aislados de Trichoderma spp. ..... 18**

**3.3 Área de crecimiento de la colonia de Trichoderma spp. en $cm^2$ ..... 20**

**3.4 Viabilidad de los aislados de Trichoderma spp. ..... 21**

**3.5 Porcentaje de inhibición de monilia debido a *Trichoderma* spp. ..... 22**

**3.6 Mico parasitismo ..... 24**

**4 CAPITULO IV: DISCUSIÓN ..... 26**

**4.1 Caracterización morfológica y crecimiento en área. ..... 26**

**4.2 Concentración de UFC/ml ..... 28**

**4.3 Inhibición y mico parasitismo ..... 28**

**5 CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES ..... 31**

**5.1 Conclusiones ..... 31**

**5.2 Recomendaciones ..... 31**

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**ANEXOS**

**ÍNDICE DE TABLAS**

**Tabla 1-2:** Puntos GPS de los sitios recolectados **.....8**

**Tabla 2-2:** Codificación de tratamientos **.....13**

**Tabla 1-3:** Codificación de aislados de *Trichoderma* spp. de acuerdo a la finca de donde se realizó la recolección de muestras **.....18**

**ÍNDICE DE FIGURAS**

**Figura 1-2:** Mapa de zonas de muestreo**.....8**

**Figura 2-2:** Ilustración de cultivo dual y cultivo control donde T1 es el disco del aislado y M es el disco de monilia**.....12**

**Figura 3-2:** Ilustración de diseño empleado dentro de una incubadora **.....16**

**Figura 1-3:** Caracterización morfológica de los aislados de*Ttrichodrma* spp. A representa a las estructuras morfológicas delos aislados visto en un lente de 40x y B representa al cultivo axénico de los aislados**.....20**

**Figura 6-3:** Área de creciemiento de los aislados de Trichoderma a lo largo de tres días. Los cuadros con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba LSD Fisher (P=0.05).Las barras de error representan el error estándar del promedio**……21**

**Figura 7-3:** Concentración de UFC/ml en base a la solución madre de los asilados de *Trichoderma* spp., Los valores con la misma letra no son significativamnte diferentes de acuerdo a la prueba LSD Fisher (P=0.05) **.....22**

**Figura 8-3:** Porcentaje de inhibición de los aislados de *Trichoderma* spp. frente a Moniliophthora. Las letras iguales no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba LSD Fisher (P=0.05). Las barras de error representan el error estándar**.....23**

**Figura 9-3:** A y B representan el desarrollo de *Trichoderma* spp. y *Moniliophthora roreri*, en cultivos de confrontación y (C) cultivo control de M. roreri. A representa al aislado T1 y b al aislado T5 **.....23**

**Figura 10-3:** Porcentaje de micoparasitismo de los aislados de *Trichoderma* spp. frente a *Moniliophthora roreri*. Las letras iguales no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba LSD Fisher (P=0.05). Las barras de error representan el error estándar**.....24**

**Figura 11-3:** Ejemplares de cultivos en confrontación en donde se evidencia el micoparasitario de los aislados T1,T4 y T5 frente a monilia**.....25**

**ÍNDICE DE ANEXOS**

**ANEXO A.** Ciclo biológico de la monilia (Moniliophthora roreri).

**ANEXO B.** Información de recolecta de muestras de Trichoderma spp. utilizadas en el trabajo de titulación.

**ANEXO C.** Principales síntomas de monilia (Moniliophthora roreri).

**ANEXO D.** Recolección y etiquetado de muestras en campo.

**ANEXO E.** Muestras de tejidos de hojas y mazorcas sembrados en medio de AAPA.

**ANEXO F.** Preparación de diluciones seriadas y siembra en cajas Petri.

**ANEXO G.** Siembra de discos de Moniliophthora rorreri en medio de cultivo.

**ANEXO H.** Procesamiento de datos en ImangeTool.

**ANEXO I.** Medición manual del crecimiento de la colonia de Trichoderma spp.

**ANEXO J.** Micoparasitismo de Trichoderma spp. frente a monilia.

## RESUMEN

La enfermedad monilia causada por *Moniliophthora roreri* es considerada como una de las principales amenazas para la producción de cacao en el Ecuador, lo que afecta a muchas familias ecuatorianas que dependen de este rubro. Frente a esto el uso de microorganismos biocontroladores como *Trichoderma* spp. representa una medida para el manejo de esta enfermedad. Con el objetivo de evaluar el potencial inhibitorio de aislados de *Trichoderma* spp., frente al hongo fitopatógeno monilia en condiciones de laboratorio se llevó a cabo un estudio de aislamiento, caracterización y evaluación de la capacidad inhibitoria y parasítica de *Trichoderma* spp. frente a *Moniliophthora roreri*. Los resultados del presente estudio revelaron que los aislados de *Trichoderma* spp. mostraron una alta viabilidad en términos de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) en la mayoría de los casos. La confrontación dual in vitro indicó que los aislados T5 como cepa comercial y T4 aislada de la localidad de Alto Tena, fueron capaces de micoparasitar efectivamente al hongo patógeno, lo que sugiere un mecanismo de acción dual: inhibición y micoparasitismo directo. La variabilidad observada entre los aislamientos sugiere que se necesita una selección cuidadosa de los biocontroladores más prometedores para su aplicación práctica. Además, se reconoce la necesidad de estudios adicionales para optimizar las condiciones de aplicación en campo y evaluar la eficacia a largo plazo de los aislamientos seleccionados, siendo que *Trichoderma* spp. muestra un gran potencial como agente biocontrolador en la producción sostenible del cacao.



**Palabras clave:** cacao**,** biocontrol, , micoparasitismo, inhibición.

**ABSTRACT**

The monilia disease caused by Moniliophthora roreri is considered one of the main threats to cocoa production in Ecuador, which affects many Ecuadorian families that depend on this crop. Faced with this, the use of biocontrol microorganisms such as *Trichoderma* spp. represent a measure for the management of this disease. With the objective of evaluating the inhibitory potential of isolates of *Trichoderma* spp., against the phytopathogenic fungus monilia under laboratory conditions, an isolation, characterization and evaluation study of the inhibitory and parasitic capacity of *Trichoderma* spp. was carried out against *Moniliophthora roreri*. The results of the present study revealed that the isolates of *Trichoderma* spp. showed high viability in terms of Colony Forming Units (CFU) in most cases. The *in vitro* dual confrontation indicated that T5 isolate as a commercial strain and T4 isolated from the town of Alto Tena were both capable of effectively mycoparasitizing the pathogenic fungus, suggesting a dual action mechanism: inhibition and direct mycoparasitism. The variability observed among isolates suggests that careful selection of the most promising biocontrollers is needed for practical application. Furthermore, the need for additional studies to optimize field application conditions and evaluate the long-term effectiveness of the selected isolates is recognized, since *Trichoderma* spp. shows great potential as a biocontrol agent in sustainable cocoa production.

**Key words:** cocoa, biocontrol, mycoparasitism, inhibition.

# 1. CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

## 1.1. Antecedentes

El cacao es un producto que tiene mercado en el sector industrial alimenticio, es exportado del Ecuador como materia prima para su procesamiento y transformación de derivados, Ecuador ocupa el primer lugar como exportador de cacao como almendra seca (Sánchez *et* al., 2019), siendo que en Ecuador existen aproximadamente 100.000 familias involucradas en la actividad cacaotera, conformada por pequeños y medianos productores, distribuidas en las provincias de la región Costa y Amazonía. Para el año 2023 la superficie plantada de cacao a nivel nacional fue de 609.750 hectáreas (ESPAC, 2023), y de acuerdo a Pozo, (2016) la región Amazónica cuenta con 11.300 hectáreas cultivadas de cacao de las cuales el 6.100 hectáreas de la superficie corresponde a cacao de tipo nacional y el 5200 hectáreas a otros tipos de cacao.

La media mundial del rendimiento promedio por productor de cacao es de 480 kg/ha , lo cual y en comparación a lo producido por el Ecuador es considerado como un rendimiento bajo con un valor de 250 a 300 kg/ha (Garcés *et* al., 2015), esto es el reflejo de diversos problemas que tiene el cultivo, como los causados por el hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri ,* este hongo causa una enfermedad fúngica grave, que hasta ahora se la encuentra distribuida por 11 países de América Latina, provocando daños alrededor del 40%, 90% y hasta la pérdida total de los cultivos de acuerdo con Anzules Toala et al., (2019). Las altas pérdidas causadas por este hongo lo convierten en una las principales amenazas para la producción de cacao en el mundo (Anzules *et* al., 2019).

De acuerdo con Pico *et* al., (2012) y Anzules *et* al., (2019) las limitaciones más importantes de la producción de cacao en el Ecuador son las plagas y enfermedades causadas

principalmente por hongos fitopatógenos del género *Moniliophthora* sp., así como también especialmente, *Moniliophthora roreri*, conocida comúnmente como monilia o moniliasis, que se caracteriza por afectar solo a los frutos o mazorcas, siendo estos más susceptibles durante los primeros estados fenológicos (Anexo A) (Pico *et* al., 2012) .

Se ha reportado que el manejo integrado de plagas ha logrado reducir significativamente la incidencia de moniliasis. Dentro de las estrategias para el manejo integrado de esta enfermedad se encuentra el uso de oxicloruro de cobre que ha mostrado la mayor efectividad en el control de la enfermedad (Ortiz *et* al., 2015). Por otro lado, Maldonado, (2015)en su estudio menciona la disminución del 40% en la incidencia de esta enfermedad luego de realizar podas y raleos fitosanitarios en cacao.

Otro componente importante dentro del manejo integrado de esta enfermedad es el uso de hongos antagonistas (Villamil *et* al., 2015) como controladores de una variedad de fitopatógenos, para ello una de las alternativas al uso de los agroquímicos son los biocontroladores, que están representados por hongos, bacterias y depredadores (Nicholls, 2008). Los biocontroladores tienen la característica de no dejar residuos, y no ser perjudiciales para la salud humana, como tampoco para el medio ambiente (Rubio & Fereres, 2005), ya que en esencia son organismos benéficos combatiendo con otros organismos que en este caso son patógenos (Nicholls, 2008). Adicionalmente, los hongos biocontroladores pueden ser usados como materia prima para la formulación de biopreparados o bioinsumos terminados más efectivos para la aplicación (Báez *et* al., 2019).

*Trichoderma* spp. es uno de los biocontroladores más prometedores. Este hongo es un habitante natural del suelo, caracterizado por tener mecanismos de biocontrol de antibiosis, es competitivo en nutrientes y micoparasitario (Pineda-Insuasti *et* al., 2017). Además, es utilizado como un agente de biocontrol por su alta capacidad de reproducción

y adaptabilidad en diversos ambientes, en parte debido a su crecimiento micelial rápido y a una abundante producción de esporas, que ayuda a la colonización de diversos sustratos y del suelo (Hernández *et* al., 2019).

*Trichoderma* spp. es de importancia en el sector agrícola debido a su alta capacidad antagónica frente a hongos patógenos que causan gran pérdida en diversos cultivos de importancia económica (Pineda-Insuasti *et* al., 2017), ya que actúa inhibiendo el crecimiento de hongos fitopatógenos mediante sus mecanismos de acción. Además, el uso de biocontroladores en el sector agropecuario, en remplazo de agentes químicos, reduce la contaminación ambiental e intoxicación en la salud humana (Villamil *et* al., 2015).

## 1.2. Planteamiento del problema

En los cultivos de cacao, la principal enfermedad que se presenta es la monilia (*Moniliophthora roreri*), enfermedad para la cual los agricultores suelen utilizar fungicidas químicos para contrarrestar sus daños, siendo los ingredientes activos de algunos fungicidas más utilizados: Miclobutanil (α-butil-α-(4-clorofenil)-1-H-1,2,4-triazol-1-propanonitrilo), Cubiet (Cupri-bisetoxi-dihidroxidimetil- amino sulfato) y Difenoconazole ( Hernández *et* al., 2011), pero el uso de estos traen consecuencias tanto para el medio ambiente así como también para la salud de los productores cacaoteros. En la ficha técnica de estos productos se puede encontrar que son nocivos para organismos acuáticos e incluso puede generar complicaciones visuales y respiratorias al ser inhalados o ponerse en contacto directo con el mismo sin una protección, lo cual genera una problemática ambiental y de interés social por la amenaza a la salud de los productores cacaoteros (Silva, 2019).

Los fungicidas químicos generan una dependencia de uso para los agricultores, lo cual hace que sea un insumo indispensable y difícil de reemplazar, además estos fungicidas

suelen venir enganchados a un paquete tecnológico que pocos agricultores están en la capacidad de adquirir, es por esto que se hace presente el abuso de insumos para el manejo de plagas y enfermedades en los cultivos. Por ello el estudio de nuevas alternativas a los insumos agrícolas convencionales se hace necesario para combatir las enfermedades en cultivos de manera sostenible, cuidando el medio ambiente, al productor y al consumidor, además de ser una opción económica frente a los insumos convencionales que cada vez son más caros.

### 1.3. Justificación de la investigación

Se busca generar alternativas biológicas que permitan sustituir el uso de agroquímicos usados en la agricultura convencional, siendo estos agroquímicos los principales causantes de resistencia a plagas y enfermedades en los cultivos. Además de la dependencia y uso excesivo e indiscriminado de estos insumos, está la contaminación ambiental y degradación de suelos debido a su uso (Enriquez C, 2004).

Adicionalmente y desde el punto de vista económico y de acuerdo con algunos estudios se ha demostrado que la compra de insumos agrícolas para el mantenimiento y cuidado del sistema cacaotero representa un gasto de alrededor de 50 % en costos ( Escobar *et* al., 2022) demostrado que gran parte de la inversión que se debe poseer para mantener el cultivo está destinada a la compra de agroquímicos.

Una de las alternativas resilientes e innovadoras con el medio ambiente y que se hace presente como una práctica dentro del campo de la agroecología y se propone como alternativa ante el uso de fungicidas químicos es el uso de biocontroladores a base de microorganismos presentes dentro del entorno o planta de los mismos cultivos, que como en el caso del *Trichoderma* spp. pueden ayudar a inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos (Báez *et* al., 2019). Desde el punto de vista del consumidor se requiere

métodos alternativos como biocontroladores, ante la nueva necesidad de alimentos certificados como orgánicos debido a la demanda de estos tipos de alimentos.

Diversos estudios *in vitro* demuestran la eficacia de *Trichoderma* spp. como inhibidor de fitopatógenos que afectan al cacao. Por ejemplo, Reyes *et* al., (2016), evaluaron cepas nativas de *Trichoderma* spp. para el control de monilia, dando prometedores resultados como biocontroladores; por otro lado, Suárez (2006), encontró que aislados de *Trichoderma* spp. pueden inhibir el crecimiento de monilia hasta en un 95% dependiendo de la cepa a la cual se enfrente. Los estudios anteriores nos demuestran el gran potencial que presenta *Trichoderma* spp. para el manejo del fitopatógeno *Moniliophthora roreri,* por ello es importante implementar metodologías desde la academia que contribuyan a la investigación, es así como se plantea en este estudio la evaluación de *Trichoderma* spp. bajo condiciones *in vitro* para el control de la monilia, enfermedad de vital importancia en el cultivo de cacao.

## 1.4. Objetivos de la investigación

### 1.4.1. Objetivo general

Evaluar el potencial inhibitorio de aislados de *Trichoderma* spp., frente al hongo fitopatógeno monilia (*Moniliophthora roreri)* en condiciones de laboratorio.

### 1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar la presencia de *Trichoderma* spp. endófito en tejido asintomático de cacao nacional y de *Moniliophthora roreri* en tejido sintomático para entender su potencial en el manejo biológico de enfermedades.

- Caracterizar los aislados de *Trichodreama* spp. mediante la caracterización morfológica y la viabilidad en unidades formadoras de colonias.

- Determinar los mejores aislados de *Trichoderma* spp. por medio del porcentaje de inhibición del desarrollo micelial de *Moniliophthora roreri* y micoparasitismo en cultivo *in vitro*.

# 2. CAPITULO II: MARCO METODOLÓGICO

## 2.1. Área de estudio

El presente estudio contó con las siguientes fases: la fase de recolección de muestras, fase de aislamiento de *Trichoderma* y *Moniliophthora roreri* y fase de confrontación. La fase de colección de muestras de *Trichoderma* spp. endófito, se realizó en la provincia de Napo cantón Tena y Archidona (Anexo B), se seleccionaron cinco fincas pertenecientes a la asociación Kallari con cultivos de cacao nacional esta asociación cuenta con sistemas de producción agroforestal, compuestas por un sistema productivo denominado chakras (zonas de diversidad de plantas) con bosques secundarios y asociaciones de cultivos.

Por otra parte la cepa de *Moniliophthora roreri* fue recolectada de la chakra comunitaria de la Universidad Regional Amazónica Ikiam, la fase de asilamiento de *Trichoderma* spp se realizó en el cantón Tena, provincia de Napo, en el laboratorio de Agroecología de la Universidad Regional Amazónica Ikiam ubicada en San Juan de Muyuna, Provincia de Napo, que se encuentra a una altitud de 510 m.s.n.m., las coordenadas 0°57’01”S 77°51’46”W,, por otro lado la fase del aislamiento de *Moniliophthora roreri* y la fase de confrontación se realizó en el laboratorio de protección vegetal de la Estación Experimental Central de la Amazonía en el catón Joya de los Sachas, coordenadas 0° 21" 31.2” S, 760 52" 40.1” W, en la Tabla 1. Se detalla los puntos GPS de las cepas utilizadas para el presente trabajo, así como en la figura 1 se muestra el mapa de las zonas de muestreo.

**Tabla 1.** Puntos GPS de los sitios recolectados

| Lugar | Puntos GPS |
|---|---|
| Alto Tena | 0°56'23"S, 77°53'5"W |
| Jatunyaku | 1°5’18” S, 77°54’14” W |
| Shandya | 1°4’3” S, 77°53’56” W |
| Ahuano | 1°3’47” S, 77°36’45” W |
| Archidona | 0°55’55” S, 77°45’56” W |
| Muyuna | 0°57'01"S 77°51'46"W |

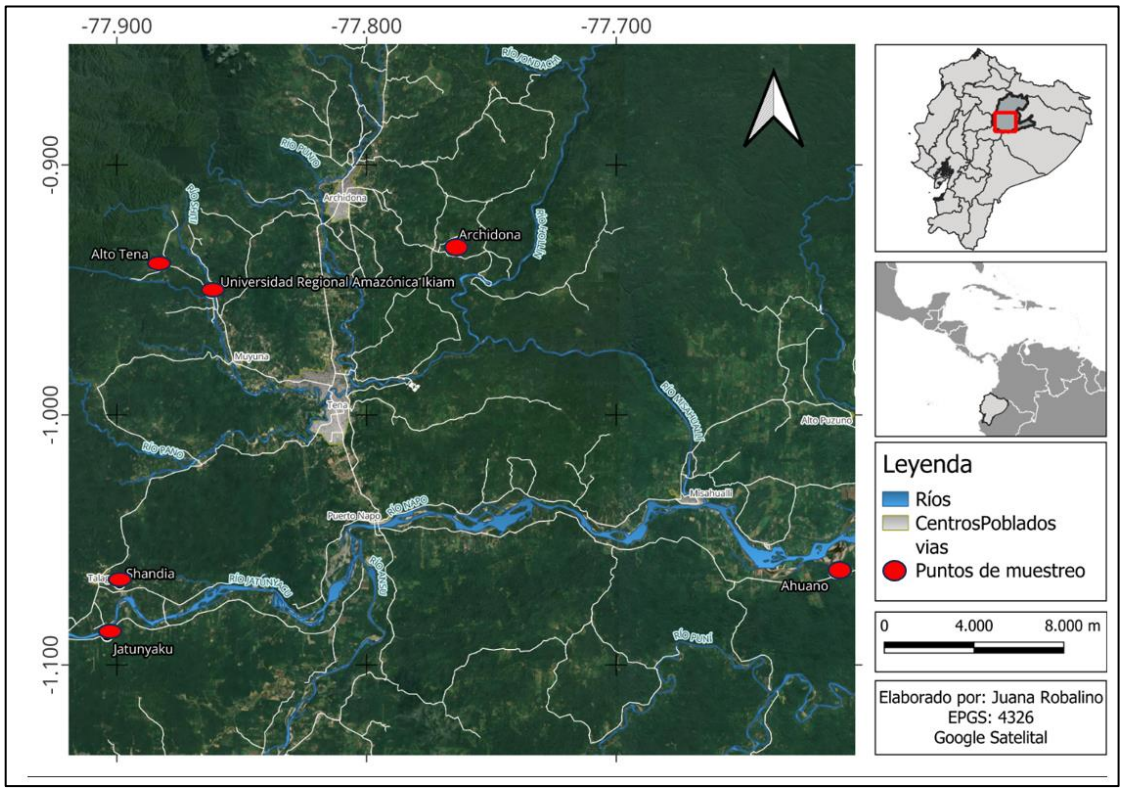



**Figura 1.** Mapa de zonas de muestreo

## 2.2. Materiales y métodos

### *2.2.1. Recolecta en campo de muestras de tejido de "Trichoderma* spp.*" y "Moniliophthora roreri"*

Para el inicio del presente estudio se realizaron aislamientos de *Trichoderma* spp. endófito a partir de tejidos sintomático de mazorcas y hojas de cacao nacional con el protocolo modificado de (Covacevich, 2014) en donde y resumiendo con la ayuda de tijeras de podar se realizaron colectas en campo cosechando mazorcas y cortando hojas de árboles de cacao asintomáticas en las cinco fincas mencionadas en la Tabla1 y Anexo B y Figura 1 realizando una colecta de 5 muestras tanto de hojas como mazorcas por finca con un total de 25 muestras. Cabe resaltar que el permiso de acceso a los recursos genéticos para el uso, movilización y trabajo con muestras biológicas se ha enviado al Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica, cuya resolución se encuentra en trámite.

Para el caso de la monilla y siguiendo el protocolo modificado de (Carrera *et* al., 2014) se seleccionaron mazorcas con tejido sintomático provenientes de la chakra comunitaria de la Universidad Amazónica Ikiam. Para identificar las mazorcas sintomáticas se observó la presencia de al menos el 80% de severidad de enfermedad con síntomas de deformación o esporulación del hongo (Anexo C). Tanto las muestras de tejido sintomático y asintomático fueron georreferenciadas, así como se mantuvieron en fundas ziplock etiquetadas y separadas con cámaras húmedas (Anexo D) y refrigeradas en el laboratorio a temperatura de 16 °C a 21°C, hasta el momento de su procesamiento, adicionalmente se obtuvo una cepa líquida de *Trichoderma* spp. considerada para el estudio, la cual proviene de la ciudad de San Isidro Provincia de Manabí con coordenadas 0°22'38" S, 80°01'3" W (tabla 2), con la finalidad de evaluar su posible potencial de biocontrol ante monilia.

### *2.2.2. Aislamiento y siembra de muestras en medios de cultivo*

Previo al aislamiento y siembra de los aislados de *Trichoderma* spp. conjuntamente con el aislado líquido se preparó el medio de cultivo con el protocolo modificado de Báez *et* al., (2019) el cual se realizó con: agar, azúcar, papa y avena (AAPA). Para esto se pesó en la balanza 152 g de papas no peladas, picadas y cocidas en 500 ml de agua corriente, luego de la cocción se licuó con 9,5 g de agar, 47,5 g de azúcar morena y 38 g de avena en hojuelas, luego se aforó hasta 1000 ml con agua corriente. El medio se esterilizó en un equipo de autoclave de BIOBASE durante 40 minutos a 121 °C y luego se dispensó en cajas Petri esterilizadas de 9cm diámetro.

Para el aislamiento de *Trichoderma* spp. las mazorcas y hojas asintomáticas fueron lavadas por separado en agua corriente, luego bajo condiciones estériles los tejidos fueron desinfectados por separado en alcohol al 70% por 30 segundos, luego lavado 3 veces con agua esterilizada y secados sobre papel absorbente estéril.

Luego y de igual manera bajo condiciones estériles, pedazos más pequeños de aproximadamente 1 $cm^2$ de cada porción de tejido fueron sembrados de acuerdo con cada muestra en medio de cultivo elaborado previamente (Anexo E).

Para el caso de monilia se siguió el protocolo modificado de Gómez et al., (2014) en el cual se lavó la mazorca en agua corriente, se hizo un lavado 100 ml de agua y cloro (97 ml de agua estéril y 3 ml de cloro), y 3 lavados más con agua estéril, se dejó en una funda para ver el crecimiento de esporas en la mazorca una vez se observó el crecimiento se procedió a cortar pedazos de mazorca las cuales se desinfectaron nuevamente con agua estéril y cloro para proceder a su siembra en medio PDA + extracto de cacao + jugo V8(PDAEXV8), el cual fue elaborado con 50% de extracto de cacao y 25% de agua destilada y 25% de jugo V8.

Para obtener cultivos axénicos tanto de *Trichoderma* spp. y *Moniliophthora roreri* se realizaron repiques sobre el medio de cultivo antes mencionado y se pudo obtener 4 aislados de *Trichoderma spp*. endófitos recolectados en finca para la evaluación del estudio.

Finalmente, los cultivos se colocaron dentro de una incubadora forrada de un plástico negro para evitar contaminación con microorganismos del exterior. Los cultivos permanecieron en un rango de temperaturas de mínimo de 16 °C y máximo de 26 °C.

### *2.2.3. Determinación de la viabilidad de Trichoderma* spp.

El estudio de la concentración de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) se realizó en base al protocolo modificado de (Báez *et* al., 2019), en el cual se cuantificó y determinó la viabilidad de *Trichoderma* spp. Para esto, bajo condiciones estériles se realizó una dilución de 1 g de cultivo de *Trichoderma* spp. más 9 ml de agua estéril (solución madre, $10^{-1}$), luego de lo cual esta solución se diluyó con el método de diluciones seriadas, el cual se realizó de la siguiente manera: con la ayuda de una micropipeta se tomó 1 ml de la dilución madre y se transfirió a un tubo de ensayo de que contenía 9 ml de agua destilada siendo esta dilución la $10^{-2}$ y se repitió el proceso hasta obtener la dilución $10^{-7}$ (Anexo F).

La dilución seriada $10^{-7}$ se cuantificó con la ayuda de la cámara Neubauer y el microscopio. Una alícuota de la dilución cuantificada proveniente del medio de cultivo se sembró por separado en medio de cultivo AAPA por triplicado e incubó en condiciones de ambiente de laboratorio durante 3 días para determinar las UFC de *Trichoderma* spp. y con esto la viabilidad, esperándose que todas las esporas formen colonias.

### *2.2.4. Confrontación*

Las confrontaciones se basaron en la metodología modificada de Villavicencio *et al*., (2018), para lo cual un disco de 0,5 mm de cultivo de monilia de 15 días de edad, se sembró a 2.5 cm de distancia de la caja Petri de 9 cm de diámetro que contenía el medio de cultivo PDAEXV8 (Anexo G).

Cuando la colonia de monilia alcanzó los 3 cm de diámetro a los 6 días de edad, se colocó un disco de 0,5 mm de cultivo de *Trichoderma spp.* de 4 días de edad, sembrado a 2,5 cm del borde la caja.

Para el caso del tratamiento control se sembraron en 15 placas Petri con un disco de *M. roreri* de 0,5 mm a 2,5 cm del borde interno de la placa, como se muestra en la Figura 2. Los cultivos se mantuvieron dentro de una incubadora transparente cubierta en su exterior por un plástico negro para generar las condiciones de oscuridad adecuadas de monilia, condiciones que son las adecuadas como se menciona en el estudio de Leandro (2017), permaneciendo en estas condiciones durante los 13 días que duró todo el ensayo.




**Figura 2.** Ilustración de cultivo dual donde T1 es el disco del aislado y M el disco de monilia y cultivo control.

### *2.2.5. Tratamientos*

A continuación, en la Tabla 2, se presenta una codificación de los aislados evaluados en el estudio:

**Tabla 2.** Codificación de tratamientos

| Código de finca | Tratamiento | Código |
|---|---|---|
| finca 2 (F2M3) | Shandia Aislado Trichoderma spp. finca 2 (F2M3) + *Moniliophthora roreri* | T1 |
| finca 4 (F4M2 TO) | Ahuano Aislado Trichoderma spp. finca 4 ( F4M2 TO) + Moniliophthora roreri. | T2 |
| finca 4 (F4M2TC2) | Ahhuano Aislado Trichoderma spp. finca 4 (F4M2TC2) + *Moniliophthora roreri* | T3 |
| finca 1 (F1M4) | Alto Tena Aislado Trichoderma spp. finca 1 (F1M4) + *Moniliophthora roreri* | T4 |
| (TK1) | Comercial Aislado(Manabí) Trichoderma spp. ( TK1) + *Moniliophthora roreri* | T5 |

### *2.2.6. Variables para evaluar*

- La concentración de UFC de la solución madre se calculó mediante la fórmula modificada de Gómez *et* al., (2014).

Viabilidad/Concentración (UFC de solución madre/ml) = P x FD

Donde:

P: Promedio del número de colonias en las tres cajas de la dilución seleccionada.

FD: Inverso del factor de dilución.

- Para el estudio de inhibición en confrontación se utilizó el porcentaje de inhibición del crecimiento de monilia como variable. El cual fue evaluado mediante la fórmula general de Ezziyyani *et* al., (2004) para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento se utilizó la formula a continuación:

% de inhibición= [(DC- DT) / DC] * 100

Donde:

DC: es el diámetro promedio de las colonias de monilia en las placas de control sin tratamiento.

DT: es el diámetro promedio de las colonias monilia en las placas tratadas con los aislados de *Trichoderma* spp.

- La variable en el estudio de micoparasitismo fue evaluada a partir del área micoparasitada mediante la siguiente formula

AM= (AMCT/ATM) *100

Donde:

AM: Área micoparasitada.

ATM: Área total de la colonia de monilia.

AMCT: Área micoparasitada de monilia con *Trichoderma* spp

## 2.3. Software de análisis de datos

Los aislados que presentaban micoparasitismo se fotografiaron, luego estas fotografías se procesaron en el software ImagenTool 3.00. desarrollado por Wilcox et al., (2002) junto con la universidad de Texas. En este software se demarcó el área total de desarrollo de monilia así como el área de monilia micoparasitada por *Trichoderma* spp, para de esta manera obtener estas áreas y luego determinar el porcentaje de micoparaitismo.

Mediante el programa estadístico InfoStat versión 2008, se realizó un análisis de varianza (ANOVVA), mientras que para la variación de medias se aplicó una prueba de LSD Fisher con un valor de significancia de p (<0.05).

Para todas las variables evaluadas se aplicó una estadística de modelo lineal, en el caso del estudio de la inhibición, viabilidad, área de crecimiento y micoparasitismo, se tomó como componente fijo al tratamiento y día; y como efectos aleatorios a la repetición.

## 2.4. Diseño Experimental

El diseño utilizado en el presente ensayo fue un Diseño Completo al Azar (DCA) con tres repeticiones cada uno compuesta de los seis tratamientos. Siendo que cada tratamiento

estaba conformado por cinco platos Petri apilados uno encima del otro, dando un total de noventa unidades experimentales por todo el ensayo. Cabe resaltar que para evitar contaminaciones se decidió mantener el ensayo dentro de una incubadora conformada por tres repisas. Las unidades experimentales se colocaron de manera aleatoria dentro de la incubadora siendo que las repisas albergaron seis unidades experiméntales cada una. Cada repisa tenía 45 cm de largo y 20 cm de ancho con 15 cm de altura de separación entre repisas.

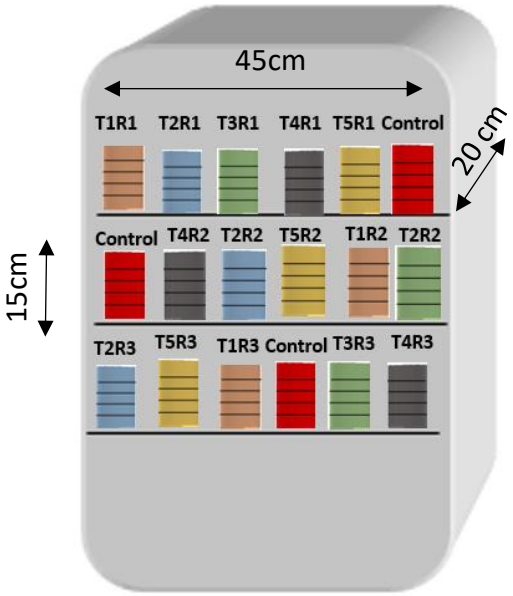



**Figura3.** Ilustración de diseño empleado dentro de la incubadora.

## 2.5. Manejo específico del experimento

En el ensayo se realizó primero la caracterización morfológica de *Trichoderma* spp. determinándose la presencia de conidios, fiálides y conidióforos, además se midió con una regla en cm el crecimiento de la colonia de cada aislado con evaluaciones diarias durante 3 días (Anexo I).

Por otro lado, la evaluación de la inhibición se realizó al tercer día de iniciada las confrontaciones, para ello se midió en centímetros manualmente con una regla el crecimiento de la colonia de monilia en confrontación y el control, con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo a la fórmula mencionada anteriormente. Estos datos se tabularon de acuerdo al aislado, el número de repetición, el diámetro de la colonia de monilia en tratamiento, el diámetro del control y el porcentaje de inhibición, estos datos fueron procesados posteriormente en el sofware InfoStat.

Mientras que, los aislados de *Trichoderma* spp. que lograron micoparasitismo frente a monilia se fotografiaron con una cámara de celular de 48 megapíxeles, colocada sobre una caja de luz para fotos, que a su vez estaba una altura de 15 cm desde la superficie del cultivo, en la base del cultivo fotografiado se colocó una regla que sirve para calibrar el área de la colonia de los hongos (Anexo H). Luego las fotografías se procesaron en el software ImangeTool, en donde de manera manual se delimita el área total de la colonia de monilia y el área micoparasitada de la misma colonia con *Trichoderma* spp. (Anexo J). Luego los resultados obtenidos de este sofware se tabularon de acuerdo al asilado, repetición, área total de la monilia y área micoparasitada, para luego procesar la información en el sofware InfoStat.

# 3. CAPITULO III: RESULTADOS

## 3.1. Codificación de aislados de *Trichoderma* spp.

Después de realizar los aislamientos se logró obtener cinco cepas de *Trichoderma* spp., las cuales se obtuvieron de diferentes tejidos y fincas, como se detalla en la Tabla 1.

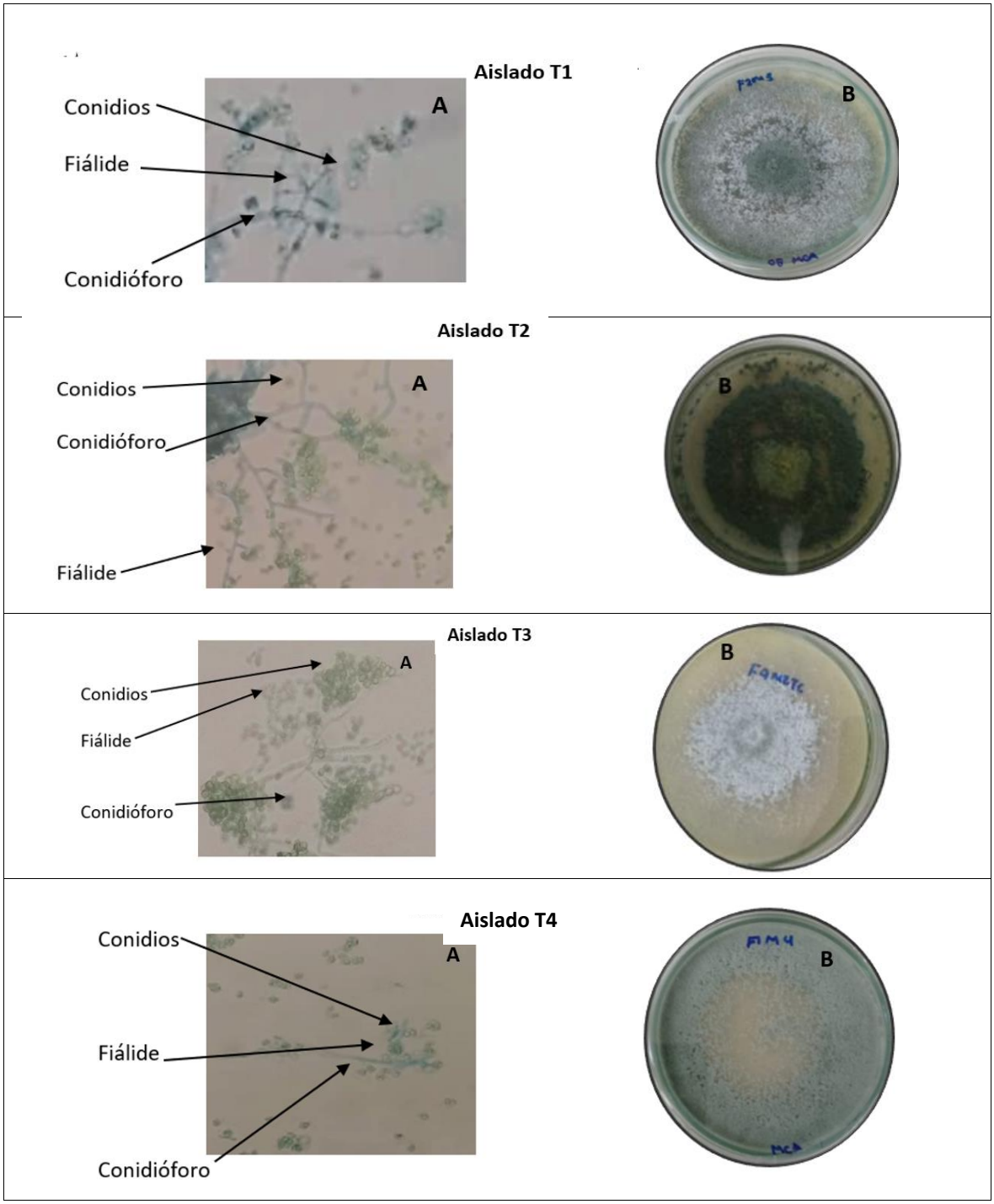
**Tabla 1.** Codificación de aislados de *Trichoderma* spp. de acuerdo a la ubicación de la finca de donde se realizó la recolección de muestras

| **Ubicación de finca** | **Tejido** | **Código** |
|---|---|---|
| Shandia | Hoja | T1 |
| Ahuano(TO) | Mazorca | T2 |
| Ahuano(TC) | Mazorca | T3 |
| Alto Tena | Hoja | T4 |

TO y TC representan a Trichoderma oscuro y Trichoderma claro respectivamente.

## *3.2 Caracterización morfológica de los aislados de Trichoderma spp.*

A continuación, se presentan características morfológicas observadas a los 7 días de siembra de los cultivos axénicos de *Trichoderma* spp. en donde se puede observar estructuras morfológicas como conidios, fiálides y conidióforos, así como la coloración característica mayormente verde de sus esporas.


Aislado T1
Conidios
Fiálide
Conidióforo
A
B
Aislado T2
Conidios
Conidióforo
Fiálide
A
B
Aislado T3
Conidios
Fiálide
Conidióforo
A
B
Aislado T4
Conidios
Fiálide
Conidióforo
A
B

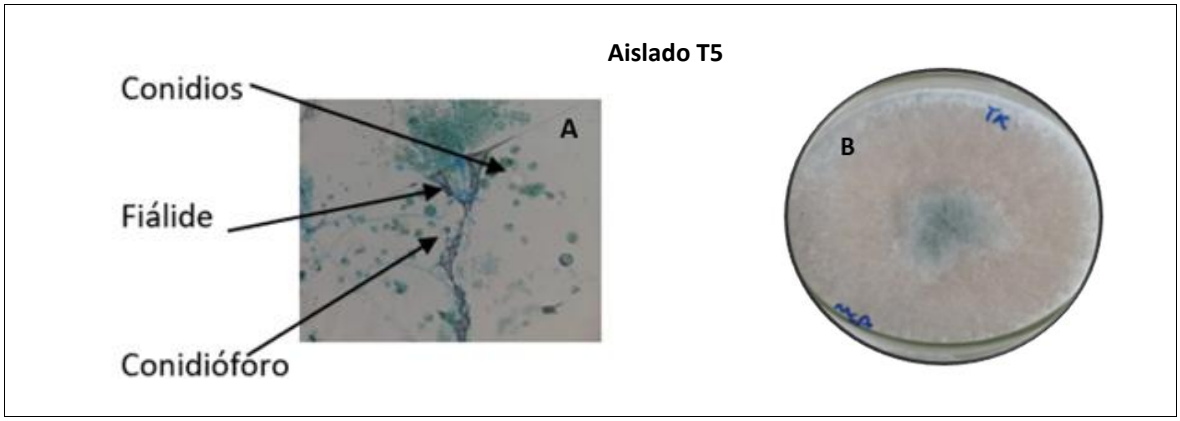



**Figura 1.** Caracterización morfológica de los aislados de *Trichoderma* spp. A representa las estructuras morfológicas de cada aislado vistas en un lente de 40 x y B representa al cultivo axénico de cada aislado.

### *3.3 Área de crecimiento de la colonia de Trichoderma spp. en cm²*

De acuerdo al ANOVA se demuestra que existe interacción entre días y asilado ($p<0,0001$). Cada asilado presentó una mayor área de crecimiento conforme transcurrió el tiempo, es así que al tercer día T1 y T2 alcanzaron un área mayor de crecimiento con un valor de 64.5 $cm^2$, cercano a la superficie total de la caja de 66.9 $cm^2$, estos dos aislados presentan estadísticamente áreas similares a lo largo de la evaluación, el aislado T3 obtuvo un valor de 58,3$cm^2$, en cuanto a T5 su crecimiento alcanzó un área de 50.8$cm^2$ y finalmente T4 fue el aislado que + estadísticamente presentó menor tamaño al tercer día con un área de crecimiento de 36,5 $cm^2$ .

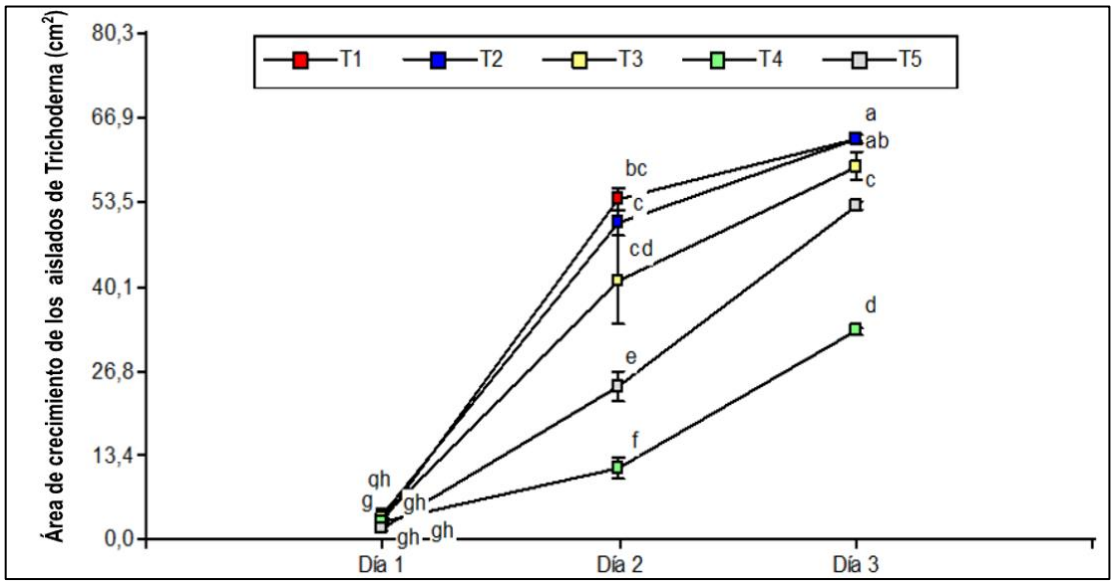



**Figura 6.** Área de crecimiento de los aislados de *Trichoderma* spp. a lo largo de tres días. Los cuadrados con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD Fisher (P= 0.05). Las barras de error representan el error estándar del promedio.

### *3.4 Viabilidad de los aislados de Trichoderma spp.*

De acuerdo al ANOVA el efecto del aislado fue significativo en la concentración de UFC ($p<0,0001$). Se determinó el número de propágulos de *Trichoderma* spp., viables, los valores calculados muestran cómo se distribuye la concentración de esporas UFC/ml de la solución madre de los aislados con un ($p >0,05$) en donde, es así que se obtuvieron los siguientes resultados:

En el estudio de la viabilidad, el aislado que presentó mayor concentración de UFC/ml fue el aislado T5 con $9,1x10^8$ UFC/ml, seguido de T4 con $5,4x10^8$ UFC/ml, para el caso del aislado T2 se obtuvo un valor de $5,2x10^8$ UFC/ml, entre los valores más bajos se encontró a T3 con $2,3x10^8$ UFC/ml y finalmente T1 mostrando el valor más bajo estadísticamente con 2,0 UFC/ml, lo que quiere decir que este aislado tiene menos proliferación de *Trichoderma* spp., en la figura 7 se puede observar la concentración de UFC por aislado.

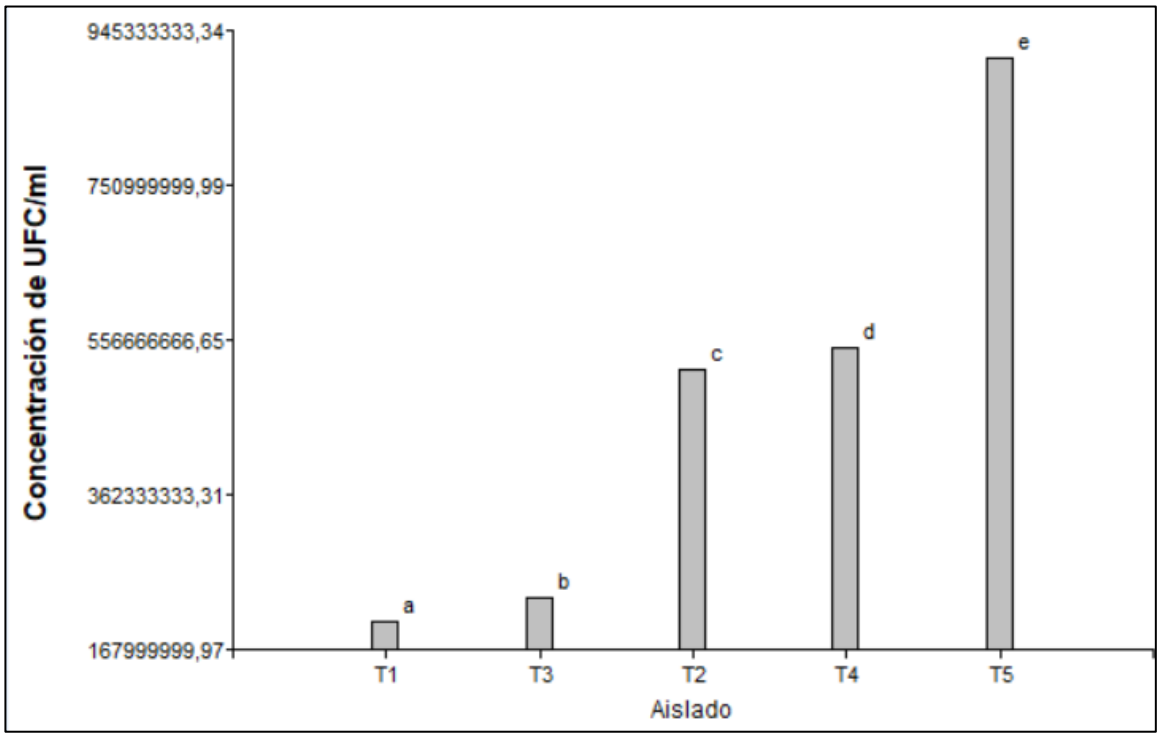



**Figura 7.** Concentración de UFC/ml en base a la solución madre de cada aislado de *Trichoderma* spp., Los valores con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba LSD Fisher (P= 0.05).

### 3.5 Porcentaje de inhibición de monilia debido a *Trichoderma* spp.

De acuerdo al ANOVA se demuestra que existe un efecto del aislado en el porcentaje de inhibición ($p<0,0003$), se observó que todos los asilados de *Trichoderma* spp. lograron inhibir en más del 7% el desarrollo de monilla como se observa en la figura 8. , Los aislados T1, T4 y T5 presentan los mayores porcentajes de inhibición de monilia, resultando en valores de 24%, 21% y 18% respectivamente.

Por otro lado, los alados T2 y T3 presentaron los menores porcentajes de inhibición de monilia que resultaron ser del 6% y 9%, respectivamente, siendo que ambos no difieren significativamente entre sí Como ejemplo del ensayo de confrontación se puede observar en la figura 9 el desarrollo diferenciado de un cultivo axénico de monilia en comparación

de un cultivo en confrontación entre monilia y un aislado de *Trichoderma* spp., en donde se puede notar el menor desarrollo de monilia cuando es confrontada con Trichoderma spp. .

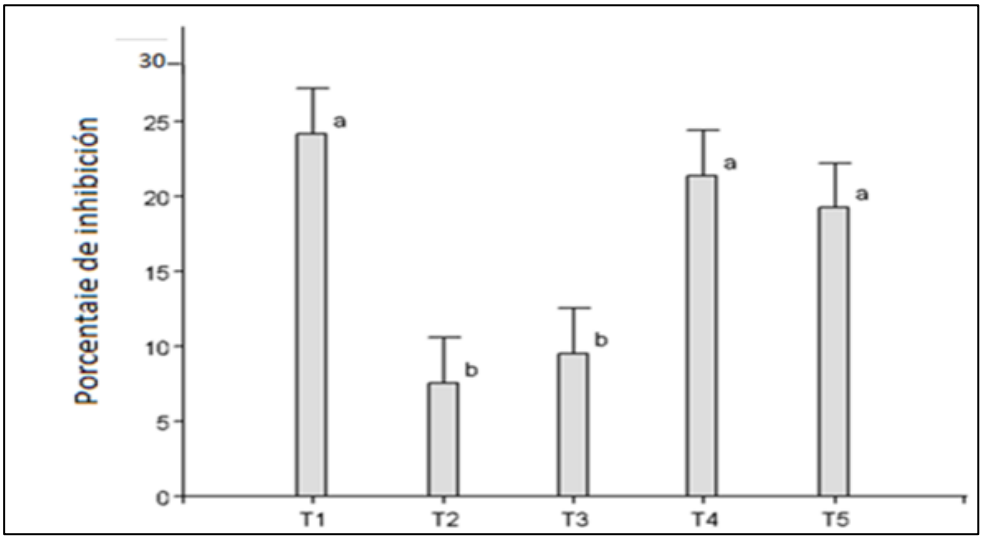



**Figura 8.** Porcentaje de inhibición de los aislados de *Trichoderma* spp. frente a *Moniliophthora roreri*. Las letras iguales no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD Fisher (P= 0.05). Las barras de error representan el error estándar.

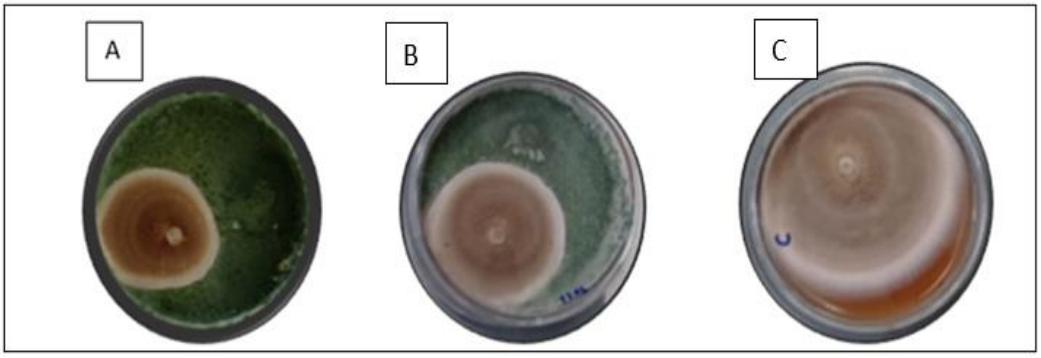



**Figura 9. Comparación del desarrollo de monilia en confrontación (A y B) y en cultivo axénico (C).** En A se encuentra el aislado T1 y en B el asilado T5, ambos de *Trichoderma* spp.

### 3.6 Mico parasitismo

De acuerdo al ANOVA se demuestra que existe efecto del asilado en el porcentaje de micoparasitismo ($p<0,0023$). Para esta variable se evaluó el área micoparasitada de *Moniliophthora roreri* debido a *Trichoderma* spp. es así que el aislado que produjo el mayor porcentaje de parasitismo fue T5 con un valor de 25%, similar a T4 el cual obtuvo un valor de 20% mostrando que no existen diferencias significativas entre estos tratamientos, por otro lado T1produjo el menor porcentaje de parasitismo, alcanzando un 6% que fue significativamente menor al resto. En la figura 11 se puede observar ejemplos de mico parasitismo de *Trichoderma* spp. frente a monilia.

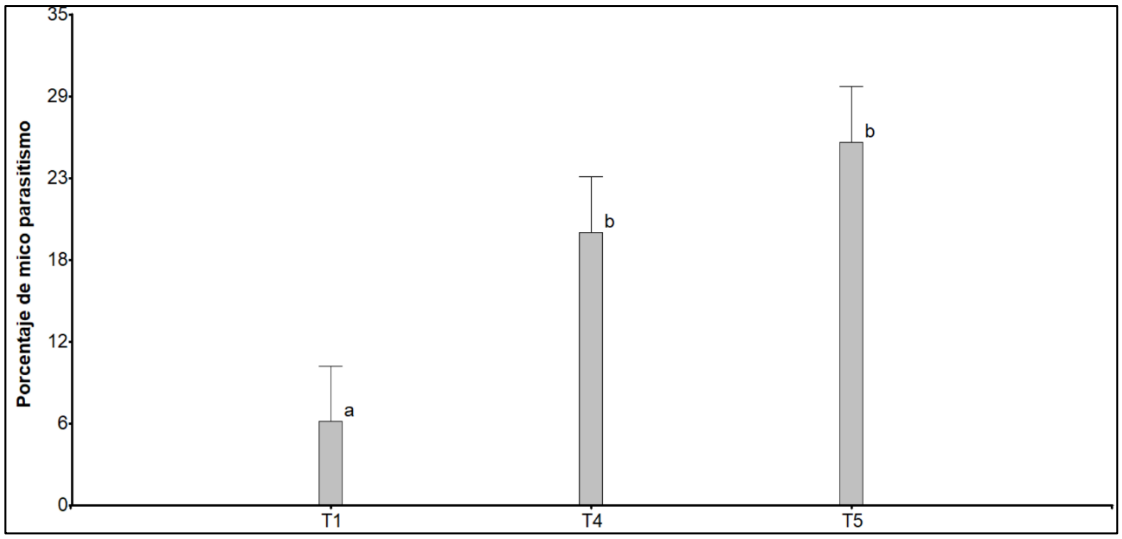



**Figura 10.** Porcentaje de micoparasitismo de los aislados de *Trichoderma* spp. frente a *Moniliophthora roreri*. Las letras iguales no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD Fisher (P= 0.05). Las barras de error representan el error estándar.

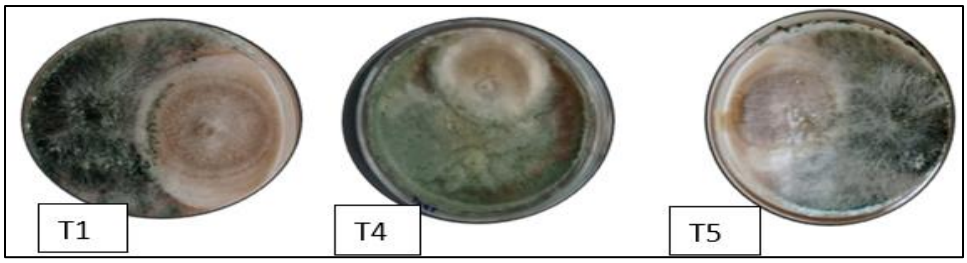



**Figura 11**. Ejemplares de cultivos en confrontación en donde se evidencia el micoparasitario de los aislados T1, T4 y T5 frente a monilia.

# 4 CAPITULO IV: DISCUSIÓN

## 4.1 Caracterización morfológica y crecimiento en área.

Los aislados presentaron un color verde claro característico e indicativo de la esporulación abundante del hongo, siendo este color un signo distintivo de *Trichoderma* spp., que se debe a la alta producción de conidios. De acuerdo con Magalhaes y Heinrich, (2022), las estructuras de *Trichoderma* spp. bajo microscopio se pueden disponer de una forma más o menos piramidal con diferentes patrones de ramificaciones asemejándose a un árbol. Por otro lado, el mismo autor señala que el color verde de los conidios es un fenotipo que permite distinguir a *Trichoderma* spp. tanto en placas Petri como en un sustrato natural.

Aislado T5 muestra un crecimiento robusto con una esporulación intensa, que es típica para muchas especies de *Trichoderma* que se desarrollan en condiciones óptimas como lo menciona Harman *et* al., (2004). El aislado T1, presenta características similares, sugiriendo que este aislado también es vigoroso en términos de crecimiento, por otro lado, los aislado T2 y T3, ambos aislados muestran un altamente patrón de crecimiento comparable, con un color verde claro que confirma la identidad del género *Trichoderma,* como lo menciona Infante *et* al., (2009) la mayoría de colonias de trichoderma en sus inicios tiende a tomar un color blanco que se va tornando verde oscuro o amarillento con esporulaciones densas.

Las descripciones morfológicas de las fuentes citadas concuerdan con las características de las cepas aisladas en este estudio, de esta manera las fincas de donde se obtuvieron las muestras representan una fuente potencial de biocontroladores, en este caso de *Trichoderma* spp.

El cuanto al área de crecimiento los aislados presentaron un aumento en el área de crecimiento a medida que transcurría el tiempo, lo que es consistente con el comportamiento esperado de *Trichoderma*, un hongo conocido por su rápido crecimiento en condiciones favorables como lo menciona Vásconez *et* all (2017). Es importante destacar que los aislado T1 y T2 mostraron el mayor crecimiento de área al tercer día de evaluacióncon una ára de 64,5 este resultado puede estar asociado con la capacidad intrínseca de T1 y T2 para utilizar los nutrientes del medio de cultivo de manera más eficiente o con una mayor tasa de crecimiento radial como se menciona en los estudios realizados por Moreno, (2000). En contraste, el aislado T4 tuvo el menor crecimiento, con un área de solo 26,8 $cm^2$, este valor podría indicar una menor capacidad competitiva de T4, posiblemente debido a factores como una menor velocidad de crecimiento radial y una baja eficiencia en la utilización de nutrientes (Ghazanfar *et* al., 2018). Finalmente, los aislados T3 y T5, con áreas de 58,3$cm^2$ y 53,5 $cm^2$, muestran un comportamiento intermedio. Sin embargo, dado que T3 y T5 tienen un crecimiento significativamente menor que T1 y T2 su uso podría ser considerado en aplicaciones donde un crecimiento moderado sea beneficioso (Zeilinger *et* al, (2007).

Un factor que incide en la presencia d microorganismos en un sistema agrícola es el uso de productos químicos y el manejo del mismo de acuerdo Traczuk *et* al., (2013)un sistema agrícola diverso y bien gestionado puede favorecer el desarrollo de ciertos aislados de biocontroladores (González *et* al., 2019), por la presencia de aislados de trichoderma que fueron recolectados dentro de un entorno agrícola natural específicamente de un chakra que su fortaleza es la biodiversidad de plantas y de acuerdo con Evans & Samson, (1982) ciertos biocontroladores pueden estar presentes tanto en bosques tropiclaes ya que es en estos en donde se albergan la mayor parte de microoorganismos (Mier *et* al., 2002), es especialmente relevante para futuros estudios de bioprospección, donde la selección de organismos con mayor capacidad de adaptación y efectividad en entornos orgánicos puede llevar al descubrimiento de nuevas estrategias de control biológico.

Además, la variabilidad en el crecimiento de los diferentes aislados subraya la necesidad de entender cómo las prácticas orgánicas pueden influir en la evolución y la eficacia de estos biocontroladores. Los aislados que muestran un crecimiento robusto en condiciones orgánicas podrían representar cepas valiosas para su uso en la agricultura sostenible, mientras que aquellos con menor crecimiento podrían necesitar condiciones específicas o tratamientos adicionales para ser efectivos.

**4.2 Concentración de UFC/ml**

De acuerdo a Debnath (2022), la concentración de UFC de Trichoderma spp. en productos comerciales y aplicaciones en el campo es un determinante clave para su efectividad., Altas concentraciones de UFC aseguran una rápida colonización del sustrato y una competencia eficiente contra patógenos (Mesa *et* al., 2019). Es así que en el presente estudio los asialdos T2, T4 y T5 se muestran prometedores al uso como biocontroladores debido a su alta concentración de esporas viables.

Estudios han demostrado que una concentración adecuada de UFC puede mejorar significativamente la salud de las plantas y aumentar los rendimientos de los cultivos como lo mencionan Harman *et* al., (2004) y Benítez *et* al.,(2004). Lo anterior nos demuestra el potencial que pueden tener los aislados del presente estudio, no solamente por la competencia frente a patógenos, sino también por el posible efecto benéfico en el desarrollo de cultivos.

**4.3 Inhibición y mico parasitismo**

Los resultados obtenidos en la evaluación en confrontación y el mico parasitismo de los aislados de *Trichoderma* spp*.* frente a *Moniliophthora roreri* nos permiten comprender mejor las capacidades inhibitorias y parasitarias de los aislados de *Trichoderma* spp.

En la evaluación de la confrontación, observamos que todos los aislados de *Trichoderma* spp. lograron inhibir el crecimiento de *Moniliophthora roreri.* En particular, el aislado T1 alcanzó un 24% de inhibición, el valor más alto observado. Este hallazgo es consistente con estudios previos que también han reportado altas capacidades inhibitorias de ciertos aislados de *Trichoderma* spp. Por ejemplo, (Suárez & Cabrales, 2008) describen que algunas cepas de *Trichoderma* spp. pueden inhibir el crecimiento de fitopatógenos mediante la producción de metabolitos secundarios y enzimas hidrolíticas y que además como menciona Jamil (2021) esta capacidad de producir o no estos metabolitos está ligada a cada especie. Lo anterior nos demuestra que T1 ha presentado el mayor potencial para inhibir monilia a través de la producción de sus metabolitos y que esta es una característica sobresaliente en este aislado en comparación del resto de aislados evaluados.

Por otro lado, los aislados T2 y T3 presentaron los menores porcentajes de inhibición (6% y 9% respectivamente), lo cual es similar a los resultados obtenidos por Verma et al., (2007) quienes encontraron que no todas las cepas de *Trichoderma* tienen la misma capacidad de inhibir patógenos debido a diferencias en la producción de compuestos bioactivos. Los aislados T4 y T5 mostraron porcentajes de inhibición intermedios, alrededor del 21% y 18% respectivamente, indicando una capacidad moderada de inhibición. Esto está alineado con los hallazgos de Benítez *et* al., (2004), quienes mencionan que la eficacia de inhibición puede variar considerablemente entre diferentes aislados de *Trichoderma*.

En la evaluación del micoparasitismo durante 9 días, el aislado T5 presentó el mayor porcentaje de inhibición en el área micoparasitada, con un 25%. Este resultado es consistente con los estudios de (Mukherjee *et* al., 2012), quienes encontraron que ciertas cepas de *Trichoderma* pueden parasitar micelio de patógenos mediante la producción de enzimas como quitinasas y glucanasas. Por su parte el aislado T4 presentó un 20% de

inhibición, siendo este porcentaje significativamente similar a T5. Estos resultados nos demuestran la eficacia de ambos aislados en el control de monilia, y su potencial uso en el manejo de esta enfermedad de importancia en el cultivo de cacao.

El aislado T1, aunque mostró la mayor capacidad de inhibición en la confrontación, tuvo el menor rendimiento en el micoparasitismo con un 6%. Esto sugiere que la capacidad inhibitoria en confrontación no necesariamente se correlaciona con la capacidad micoparasitaria, un hallazgo que coincide con los estudios de (Inbar et al., 1996), quienes indicaron que las actividades inhibitorias y micoparasitarias pueden estar mediadas por diferentes mecanismos en *Trichoderma* spp.

Finalmente, los aislados T2 y T3 no mostraron capacidad micoparasitaria en este estudio, lo que indica que estos aislados no serían efectivos en aplicaciones de biocontrol basadas en micoparasitismo. Este hallazgo es similar a lo reportado por Howell (2006), quien encontró que no todas las cepas de *Trichoderma* son igualmente efectivas en el biocontrol debido a variaciones genéticas y funcionales.

Cabe resaltar que los aislados T1-T4 provienen de fincas bajo un manejo chakra, caracterizado por ser un sistema de policultivos con manejo sostenible. Es así que los resultados del presente estudio nos demuestran el potencial encontrado en estas fincas para la obtención de biocontroladores y que las cepas aisladas han presentado diferencia en su eficacia para el control de la monilia en condiciones *in vitro*, siendo importante resaltar la presencia de micoparasitismo en los aislados T4 y T5 que es una característica de suma importancia al momento de controlar patógenos, ya que de acuerdo a Agamez *et* al., (2009) el micoparasitismo es considerado el principal mecanismo de acción de *Trichoderma* spp. Los aislados T4 y T5 nos brindan la oportunidad de ser una alternativa sostenible para el manejo de la monilia en el cultivo de cacao una vez que se valide su aplicabilidad en condiciones de campo.

# 5 CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 5.1 Conclusiones

A pesar de la presencia de monilia en mazorcas en las fincas muestreadas y su posterior aislamiento en este estudio, han sido estas mismas fincas en donde se ha podido también aislar ejemplares de biocontroladores, provenientes de tejido asintomático de cacao. Estos ejemplares han cumplido con las características morfológicas de *Trichoderma* spp., lo que nos ratifica que las fincas bajo un manejo *chakra* constituyen fuentes importantes de biocontroladores. De acuerdo con el porcentaje de inhibición los aislados más relevantes encontrados fueron T1, T4 y T5, siendo que estos mismos aislados presentaron capacidad micoparasitaria, sobresaliendo T4 y T5 que mostraron el mayor grado de parasitismo frente a *Moniliophthora roreri* en condiciones *in vitro*, lo que constituye una potencial alternativa para el manejo de monilia en el cultivo de cacao.

## 5.2 Recomendaciones

Se sugiere evaluar el potencial antagónico de los mejores aislados del presente estudio en condiciones de campo, haciendo uso además de diferentes concentraciones de aplicación. Adicionalmente se sugiere probar diferentes formulaciones de *Trichoderma* spp. como formulaciones sólidas o líquidas, así como su combinación para determinar un posible efecto sinérgico en el manejo de la moniliasis en cacao bajo condiciones de campo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Agamez Ramos, E., Barrera Violeth, Jos., & OVIEDO ZUMAQUé, L. (2009). EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO Y MULTIPLICACIÓN DE Trichodermasp. EN SUSTRATO DE PLÁTANO EN MEDIO LÍQUIDO ESTáTICO. *Acta Biológica Colombiana*, *14*(3), 61-70.

Anzules, V., Borjas Ventura, R., Alvarado Huamán, L., Castro-Cepero, V., & Julca-Otiniano, A. (2019). Control cultural, biológico y químico de Moniliophthora roreri y Phytophthora spp en Theobroma cacao 'CCN-51'. *Scientia Agropecuaria*, *10*(4), 511-520. https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.08

Báez, P., Pincay, T., Villamizar, T., & Jaronsky, V. (2019). Manual para el análisis de calidad de formulaciones de hongos beneficos. *INIAP*, *112*.

Benítez, T., Rincon, A., & Codón, A. (2004). Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. *INTERNATIONAL MICROBIOLOGY (*, *7*.

Carrera-Sánchez, K., Paredes, L. M., & Leiva-Mora, M. (2014). Protocolo para el aislamiento de Moniliophthora roreri (Cif y Par) Evans et al. En frutos de cacao cv. `Nacional' de la Amazonía ecuatoriana. *Biotecnología Vegetal*, *14*(3), Article 3. https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/67

Covacevich, F., & Consolo, V. F. (2014). *Manual de protocolos: Herramientas para el estudio y manipulación de Hongos Micorrícicos Arbusculares y Trichoderma*. Universidad Nacional de Mar del Plata. https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/108183

Debnath, R. (2022). Studies on the shelf life of Trichoderma isolate in talc, prills, vermicompost, sago and dalia based formulations. *Journal of Biological Control*, 57-63. https://doi.org/10.18311/jbc/2022/24976

Enriquez C, G. (2004). Cacao organico. Guia para productores ecuatorianos. *Manual*, *54*. https://agris.fao.org/search/en/providers/122593/records/64724208e17b74d2224f16d0

ESPAC. (2023). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua*.

Evans, H. C., & Samson, R. A. (1982). *Especies de Cordyceps* y sus anamorfos patógenos para hormigas (Formicidae) en ecosistemas de bosques tropicales I. El complejo *Cephalotes* (Myrmicinae). *Transactions of the British Mycological Society*, *79*(3), 431-453. https://doi.org/10.1016/S0007-1536(82)80037-5

Garcés-Fiallos, F. R., Nodari, R., Díaz-Coronel, G., Sánchez Mora, F., & Troya-Mera, F. (2015). Potencial sanitario y productivo de 12 clones de cacao en Ecuador. *Revista fitotecnia mexicana publ. por la Sociedad Mexicana de Fitogenética*, *38*, 265-274.

Ghazanfar, M. U., Raza, M., Raza, W., & Qamar, M. I. (2018). Trichoderma as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture: A review. *Plant Protection*, *2*(3), Article 3. https://esciencepress.net/journals/index.php/PP/article/view/3142

Gómez, H., Torres, E., Zapata, A., & Tenorio, M. (2014). *MANUAL DE PRODUCCIÓN Y USO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS*.

González Baca, G., Venegas Barrera, C. S., González Gaona, O. J., Vargas Madriz, H., Jiménez Gómez, M. A., Pérez Arriaga, E., Azuara Domínguez, A., González Baca, G., Venegas Barrera, C. S., González Gaona, O. J., Vargas Madriz, H., Jiménez Gómez, M. A., Pérez Arriaga, E., & Azuara Domínguez, A. (2019). Abundancia y distribución de hongos entomopatógenos en diferentes localidades y ambientes del sur de Tamaulipas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, *10*(3), 669-681. https://doi.org/10.29312/remexca.v10i3.1550

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). Trichoderma species—Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(1), 43-56. https://doi.org/10.1038/nrmicro797

Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). Trichoderma: IMPORTANCIA AGRÍCOLA, BIOTECNOLÓGICA, Y SISTEMAS DE FERMENTACIÓN PARA PRODUCIR BIOMASA Y ENZIMAS DE INTERÉS INDUSTRIAL. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, *35*(1), 98-112. https://doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205

Herrero-Hernández, E., Arienzo, M., Ordax, J. M., Marín-Benito, J. M., Sánchez-Martín, M. J., & Rodríguez-Cruz, M. S. (2011). *MOVILIDAD DE PESTICIDAS DE DIFERE TE ESTRUCTURA QUÍMICA E SUELOS AGRÍCOLAS E ME DADOS CO RESIDUOS ORGÁ ICOS DE DISTI TO ORIGE*.

Howell, C. R. (2006). Understanding the Mechanisms Employed by Trichoderma virens to Effect Biological Control of Cotton Diseases. *Phytopathology®*, *96*(2), 178-180. https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0178

Inbar, J., Menendez, A., & Chet, I. (1996). Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biology and Biochemistry*, *28*(6), 757-763. https://doi.org/10.1016/0038-0717(96)00010-7

Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). MECANISMOS DE ACCIÓN DE Trichoderma FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS. *Revista de Protección Vegetal*, *24*(1), 14-21.

Leandro, M. (2017). *Biology and epidemiology of Moniliophthora roreri, causal agent of Moniliophthora pod rot of cacao*.

Lugo Escobar, M., Pérez Marulanda, L., & Castro-Nuñez, A. C. (2022). *¿Cómo incrementar la rentabilidad de los sistemas sostenibles de cacao?* https://hdl.handle.net/10568/126368

Magalhaes, L., & Heinrich, L. (2022). El género Trichoderma. En *Trichoderma usos en la Agricultura* (p. 16). Embrapa.

Maldonado Fuentes, C. (2015). Efecto del manejo en la reducción de incidencia de enfermedades (Moniliasis, Escoba de Bruja y Mazorca Negra) en el cultivo de Cacao (Theobroma cacao l.) en la Estación Experimental de Sapecho. *APTHAPI*, 88.

Mesa-Vanegas, A. M., Marin, A., Calle-Osorno, J., Mesa-Vanegas, A. M., Marin, A., & Calle-Osorno, J. (2019). Metabolitos secundarios en Trichoderma spp. Y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades Biológicas*, *41*(111), 32-44. https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n111a02

Mier, T., Toriello, C., & Ulloa, M. (2002). *Hongos microscópicos saprobios y parásitos*. UNAM.

Moreno, Z. A. (2000). *Correlación de la tasa de crecimiento radial y la tasa de crecimiento específico de hongos filamentosos aislados de la planta Espeletia barclayana*.

Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., & Kenerley, C. M. (2012). Secondary metabolism in Trichoderma—A genomic perspective. *Microbiology (Reading, England)*, *158*(Pt 1), 35-45. https://doi.org/10.1099/mic.0.053629-0

Nicholls, C. I. (2008). *Control biológico de insectos: Un enfoque agroecológico*. Universidad de Antioquia.

Ortíz-García, C. F., Torres-de-la-Cruz, M., & Hernández-Mateo, S.-C. (2015). COMPARACIÓN DE DOS SISTEMAS DE MANEJO DEL CULTIVO DEL CACAO, EN PRESENCIA DE Moniliophthora roreri, EN MÉXICO. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *38*(2), 191. https://doi.org/10.35196/rfm.2015.2.191

Pico, J. T., Calderón Peña, E. D., Fernández, F., & Díaz M., A. (2012). *Guía del manejo integrado de enfermedades del cultivo de cacao (Theobroma cacao L) en la amazonía*. https://doi.org/,

Pineda-Insuasti, J. A., Benavides-Sotelo, E. N., Duarte, A. S., Burgos-Rada, C. A., Soto-Arroyave, C. P., Pineda, C. A., Fierro-Ramos, F. J., Mora-Muñoz, E. S., & Álvarez-Ramos, S. E. (2017). *Producción de biopreparados de Trichoderma spp: Una revisión*.

Pozo, C. (2016). *PLAN DE CADENA DE VALOR PARA CACAO EN LA PROVINCIA DE NAPO*.

Reyes-Figueroa, O., Ortiz-García, C. F., Torres-de la Cruz, M., Lagunes-Espinoza, L. del C., Valdovinos-Ponce, G., Reyes-Figueroa, O., Ortiz-García, C. F., Torres-de la Cruz, M., Lagunes-Espinoza, L. del C., & Valdovinos-Ponce, G. (2016). Especies de Trichoderma del agroecosistema cacao con potencial de biocontrol sobre Moniliophthora roreri. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, *22*(2), 149-163. https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2015.08.036

Rubio, V., & Fereres, A. (2005). *CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS Y ENFERMEDADES DE LOS CULTIVOS*.

Sánchez Arizo, V. H., Zambrano Mendoza, J. L., & Iglesias Paladines, C. (2019). *La cadena de valor del cacao en América Latina y el Caribe*. Quito, EC: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina 2019. http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5382

Silva Sañay, S. E. (2019). *"Diagnóstico del uso y manejo de fungicidas en la finca cacaotera La Providencia del Recinto Pretoria Cantón Montalvo"* [bachelorThesis, Babahoyo: UTB, 2019]. http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/6165

Solís Hidalgo, Z. K., & Suárez Capello, C. (2004). *Uso de Trichoderma spp para control del complejo Moniliasis Escoba de Bruja del cacao en Ecuador*. http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/3368

Suárez-Contreras, L. Y. (2006). Aislamiento e identificación de moniliophthora roreri causante de la moniliasis en municipios del nororiente colombiano y ensayos preliminares para su control biológico. *Respuestas*, *11*(1), Article 1. https://doi.org/10.22463/0122820X.623

Traczuk, C., Safaryan, A., & Miętkiewski, R. (2013). *The influence of selected fungicides and soil extracts on the growth of entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae*. *53*(4), 751-756.

van Lenteren, J. C., Bolckmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W. J., & Urbaneja, A. (2018). Biological control using invertebrates and microorganisms: Plenty of new opportunities. *BioControl*, *63*(1), 39-59. https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4

Vásconez, R. D. A., & Imbaquingo, C. K. E. (2017). AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE Trichoderma spp. COMO PROMOTOR DE CRECIMIENTO VEGETAL EN PASTURAS DE RAYGRASS (Lolium perenne) Y TRÉBOL BLANCO (Trifolium repens). *La Granja. Revista de Ciencias de la Vida*, *25*(1), 53-61.

Verma, M., Brar, S., Tyagi, R. D., Surampalli, R., & Valéro, J. R. (2007). Antagonistic fungi, Trichoderma spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, *37*, 1-20. https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012

Villamil Carvajal, J. E., Viteri Rosero, S. E., & Villegas Orozco, W. L. (2015). Aplicación de Antagonistas Microbianos para el Control Biológico de Moniliophthora roreri Cif & Par en Theobroma cacao L. Bajo Condiciones de Campo. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, *68*(1), 7441-7450. https://doi.org/10.15446/rfnam.v68n1.47830

Villavicencio-Vásquez, M., Espinoza-Lozano, R. F., Pérez-Martínez, S., & Castillo, D. S. D. (2018). FOLIAR ENDOPHYTE FUNGI AS CANDIDATE FOR BIOCONTROL AGAINST Moniliophthora spp. OF Theobroma cacao (Malvaceae) IN ECUADOR. *Acta Biológica Colombiana*, *23*(3), 235-241.

Wilcox, D., Dove, B., McDavid, D., & Greer, D. (2002). Image tool for Windows, version 3.0. *The University of Texas Health Science Center;*

Yanet Suárez, L., & Cabrales, C. P. (2008). Identificación de especies de cepas nativas de Trichoderma sp. Y Bacillus sp. Y evaluación de su potencial antagonista in vitro frente al hongo fitopatógeno nativo Moniliophthora roreri en el departamento de Norte de Santander. *Respuestas*, *13*(1), 45-56.

Zeilinger, S., & Omann, M. (2007). Trichoderma Biocontrol: Signal Transduction Pathways Involved in Host Sensing and Mycoparasitism. *Gene Regulation and Systems Biology*, *1*, 227-234.

**ANEXOS**

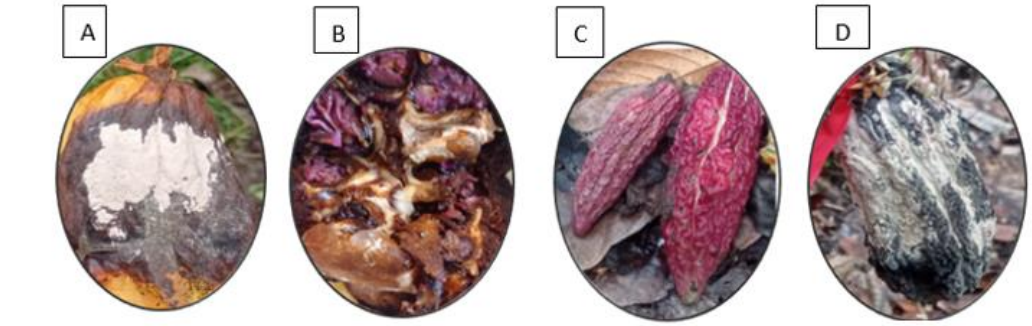
**ANEXO A.** Ciclo biológico de la monilia (Moniliophthora roreri).



**ANEXO B.** Información de recolecta de muestras de Trichoderma spp. utilizadas en el trabajo de titulación

| Ficha de datos recolectados en campo | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Fecha** | **finca #** | **Lugar de la finca** | **Dueño de la finca** | **Código de finca** | **Punto GPS** | **Tejido recolectado** | **Variedad de cacao** | **Observaciones, asociaciones de cultivos** |
| 28/06/2023 | 1 | Alto tena | Claudia Alvarado | F1M1 | 0°56´23´´S, 77°53´5´´W | Hoja | Nacional | (Cacao,guayusa, vainilla) |
| 28/06/2023 | 1 | Alto tena | Claudia Alvarado | F1M2 | 0°56´23´´S, 77°53´3´´W | Mazorca | Nacional | (Cacao,guayusa, vainilla) |
| 28/06/2023 | 1 | Alto tena | Claudia Alvarado | F1M3 | 0°56´23´´S, 77°53´4´´W | Hoja | Nacional | (Cacao,guayusa, vainilla) |
| 28/06/2023 | 1 | Alto tena | Claudia Alvarado | F1M4 | 0°56´24´´S, 77°53´4´´W | Mazorca | Nacional | (Cacao,guayusa, vainilla) |
| 28/06/2023 | 1 | Alto tena | Claudia Alvarado | F1M5 | 0°56´23´´S, 77°53´4´´W | Mazorca | Nacional | (Cacao,guayusa, vainilla) |
| 28/06/2023 | 1 | Alto tena | Claudia Alvarado | F1Monilla | 0°56´24´´S, 77°53´4´´W | Mazorca | Nacional | (Cacao,guayusa, vainilla) |
| 28/06/2023 | 2 | Shandia | Rebeca Andy | F2M1 | 1°4´3´´S, 77°53´56´´W | Hoja | Nacional | (Cacao,piña) |
| 28/06/2023 | 2 | Shandia | Rebeca Andy | F2M2 | 1°4´4´´S, 77°53´56´´W | Mazorca | Nacional | (Cacao,piña) |
| 28/06/2023 | 2 | Shandia | Rebeca Andy | F2M3 | 1°4´4´´S, 77°53´55´´W | Hoja | Nacional | (Cacao,piña) |
| 28/06/2023 | 2 | Shandia | Rebeca Andy | F2M4 | 1°4´5´´S, 77°53´55´´W | Mazorca | Nacional | (Cacao,piña) |
| 28/06/2023 | 2 | Shandia | Rebeca Andy | F2M5 | 1°4´5´´S, 77°53´55´´W | Hoja | Nacional | (Cacao,piña) |
| 28/06/2023 | 2 | Shandia | Rebeca Andy | F2Monilla | 1°4´4´´S, 77°53´56´´W | Mazorca | Nacional | (Cacao,piña) |
| 28/06/2023 | 3 | Jatunyaku | Jorge Cerda | F3M1 | 1°5´18´´S, 77°54´14´´W | Mazorca | Nacional | (Cacao, guayusa, plátano) |
| 28/06/2023 | 3 | Jatunyaku | Jorge Cerda | F3M2 | 1°5´26´´S, 77°54´17´´W | Hoja | Nacional | (Cacao, guayusa, plátano) |
| 28/06/2023 | 3 | Jatunyaku | Jorge Cerda | F3M3 | 1°5´27´´S, 77°54´17´´W | Mazorca | Nacional | (Cacao, guayusa, plátano) |
| 28/06/2023 | 3 | Jatunyaku | Jorge Cerda | F3M4 | 1°5´27´´S, 77°54´17´´W | Hoja | Nacional | (Cacao, guayusa, plátano) |
| 28/06/2023 | 3 | Jatunyaku | Jorge Cerda | F3M5 | 1°5´22´´S, 77°54´16´´W | Hoja | Nacional | (Cacao, guayusa, plátano) |
| 28/06/2023 | 3 | Jatunyaku | Jorge Cerda | F3Monilla | 1°5´27´´S, 77°54´17´´W | Mazorca | Nacional | (Cacao, guayusa, plátano) |
| 28/06/2023 | 4 | Ahuano | Marcelo Pobeda | F4M1 | 1°3´47´´S, 77°36´45´´W | Mazorca | Nacional | (Cacao, plátano,vainilla) |
| 28/06/2023 | 4 | Ahuano | Marcelo Pobeda | F4M2 | 1°3´45´´S, 77°36´45´´W | Mazorca | Nacional | (Cacao, plátano,vainilla) |
| 28/06/2023 | 4 | Ahuano | Marcelo Pobeda | F4M3 | 1°3´46´´S, 77°36´46´´W | Hoja | Nacional | (Cacao, plátano,vainilla) |
| 28/06/2023 | 4 | Ahuano | Marcelo Pobeda | F4M4 | 1°3´45´´S, 77°36´45´´W | Mazorca | Nacional | (Cacao, plátano,vainilla) |
| 28/06/2023 | 4 | Ahuano | Marcelo Pobeda | F4M5 | 1°3´45´´S, 77°36´46´´W | Mazorca | Nacional | (Cacao, plátano,vainilla) |
| 28/06/2023 | 4 | Ahuano | Marcelo Pobeda | F4Monilla | 1°3´50´´S, 77°36´44´´W | Mazorca | Nacional | (Cacao, plátano,vainilla) |
| 28/06/2023 | 5 | Ahuano | Marcelo Pobeda | F5M1 | 0°55´55´´S, 77°45´56´´W | Hoja | Nacional | (Cacao, yuca) |
| 28/06/2023 | 5 | San Pablo | José Pisango | F5M2 | 0°55´55´´S, 77°45´56´´W | Hoja | Nacional | (Cacao, yuca) |
| 28/06/2023 | 5 | San Pablo | José Pisango | F5M3 | 0°55´56´´S, 77°45´56´´W | Hoja | Nacional | (Cacao, yuca) |
| 28/06/2023 | 5 | San Pablo | José Pisango | F5M4 | 0°55´56´´S, 77°45´56´´W | Hoja | Nacional | (Cacao, yuca) |
| 28/06/2023 | 5 | San Pablo | José Pisango | F5M5 | 0°55´56´´S, 77°45´56´´W | Hoja | Nacional | (Cacao, yuca) |
| 28/06/2023 | 5 | San Pablo | José Pisango | F5Monilla | 0°55´56´´S, 77°45´56´´W | Mazorca | Nacional | (Cacao, yuca) |

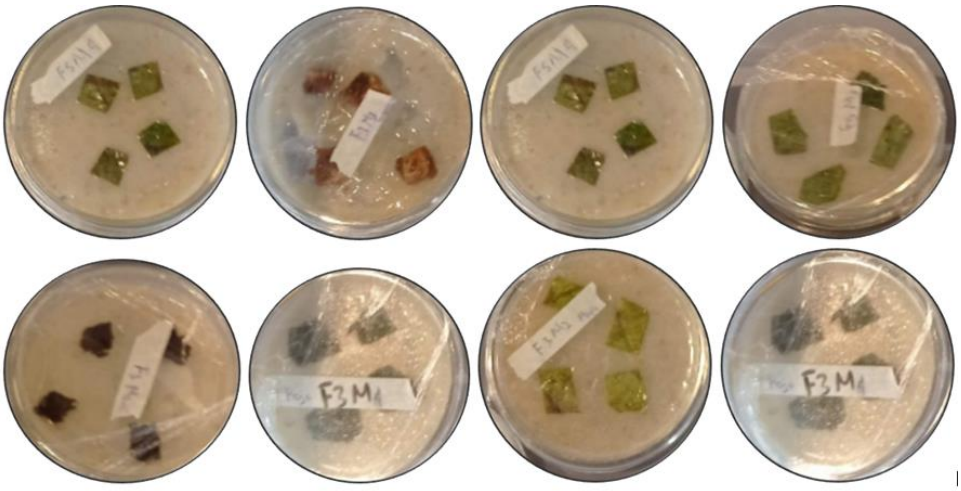
**ANEXO C.** Principales síntomas de monilia (Moniliophthora roreri).



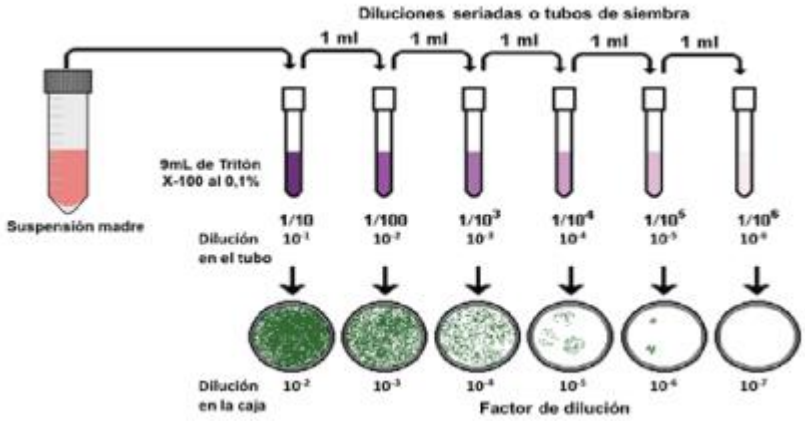

**ANEXO D.** Recolección y etiquetado de muestras en campo



**ANEXO E.** Muestras de tejidos de hojas y mazorcas sembrados en medio de AAPA



**ANEXO F.** Preparación de diluciones seriadas y siembra en cajas Petri




*Fuente Adaptado de Landa, Arrieta y García, 2009*

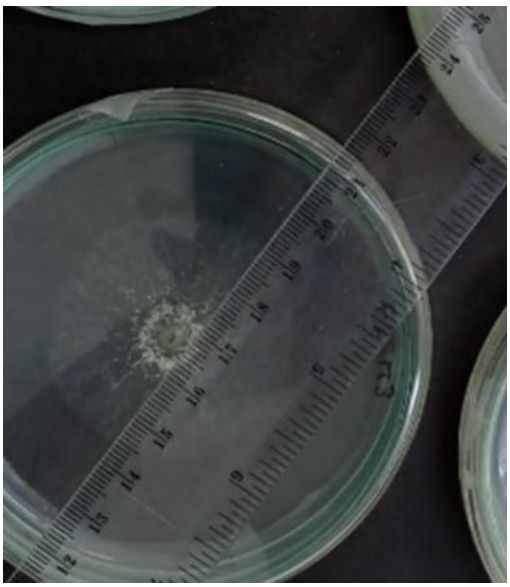
**ANEXO G.** Siembra de discos de Moniliophthora rorreri en medio de cultivo



**ANEXO H.** Procesamiento de datos en ImangeTool



**ANEXO I.** Medición manual del crecimiento de la colonia de Trichoderma spp



**ANEXO J.** MIcoparasitismo de Trichoderma spp. frente a  monilia.

