

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE AGRONOMÍA

POSTGRADO



TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO

**“Evaluación de la capacidad antagonista de dos tipos de *Trichoderma*
frente al hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* en el cultivo del cacao
(*Theobroma cacao*)”**

Ing. Agr. Freddy Antonio Cadena Miranda

**LA PAZ – BOLIVIA
2021**

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE AGRONOMÍA

POSTGRADO

“Evaluación de la capacidad antagonista de dos tipos de Trichoderma frente al hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao*)”

Tesis de Maestría presentado como requisito parcial para optar el Título de Maestro en Producción Vegetal

Ing. Agr. Freddy Antonio Cadena Miranda

Asesor:

Ing. M. Sc. Estanislao Poma Loza

Tribunal Examinador:

Ing.Ph.D. David Cruz Choque

Ing.Ph.D. Bruno Condori Ali

Ing.Ph.D. Yakov Arteaga García

Ing. M.Sc. Isidro Callisaya Mamani

Aprobado

Presidente Tribunal Examinador

La Paz – Bolivia

2021

DEDICATORIA

Mi maestría la dedico con todo mi amor y cariño a mi amada esposa Patricia Quino por su sacrificio y esfuerzo, por darme una especialidad más para nuestro futuro y por creer en mi capacidad, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre ha estado brindándome su comprensión cariño y amor.

A mis amadas hijas Carla, Angeles y Tais por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más y poder luchar para que la vida nos depara un futuro mejor.

A mis compañeros y amigos presentes y pasados, quienes sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento, alegrías y tristezas y a todas aquellas personas que durante estos años estuvieron a mi lado apoyándome y lograron que este sueño se haga realidad.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Dios quien ha forjado mi camino y me ha dirigido por el sendero correcto, el que en todo momento está conmigo ayudándome a comprender de mis errores y a no cometerlos otra vez.

Agradezco a la Universidad Mayor de San Andrés por haberme aceptado para ser parte de ella y abierto las puertas de su seno científico para poder primero lograr mi licenciatura y ahora la maestría, así como también a los diferentes docentes que brindaron sus conocimientos y su apoyo para seguir adelante día a día.

Agradezco también a mi asesor de Tesis el Ing. M.Sc. Esatnislao Poma Loza, a mi Tribunal examinador compuesto por el Dr. David Cruz Choque, Dr. Bruno Condori, Dr. Yakov Arteaga y El Ing. M.Sc, Isidro Callizaya, por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como también haberme tenido toda la paciencia del mundo para guiarme durante todo el desarrollo de la investigación.

Finalmente un agradecimiento póstumo al Dr. Remberto Herbas Arce, con el cual, bajo sus enseñanzas y consejos realice mis primeras armas en el arte de la enseñanza superior, dándome la oportunidad para encaminarme en la docencia Universitaria.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
CAPITULO I.....	2
1.1. Antecedentes.....	2
1.2. Planteamiento del problema.....	3
1.3. Justificación.....	3
1.4. Objetivos.....	4
1.4.1. Objetivo general.....	4
1.4.2. Objetivos específicos.....	4
1.4.3. Hipótesis.....	4
CAPITULO 2:.....	4
2. Marco Teórico.....	4
2.1. Importancia del cacao en Bolivia.....	4
2.1.1. Parcela de cacao sin manejo.....	5
2.1.2. Parcela de cacao con manejo.....	6
2.2. Enfermedades del cacao.....	6
2.2.1. Moniliasis del cacao (<i>Moniliophthora roreri</i>).....	6
2.2.1.1. Agente causal.....	7
2.2.1.2. Epidemiología.....	8
2.2.1.3. Sintomatología.....	9
2.2.1.3. Ciclo de la enfermedad.....	10
2.2.2. Mazorca negra del cacao <i>Phytophthora</i>	
<i>palmivora</i> Butler).....	10
2.2.2.1. Epidemiología.....	11

2.2.2.2 Sintomatología.....	11
2.2.2.3 Ciclo de vida	12
2.2.3 Escoba de bruja del cacao (<i>Moniliophthora perniciosa</i> Stahel (Marin, 2000).....	13
2.2.3.1 Epidemiología.....	14
2.2.3.2 Sintomatología.....	15
2.2.3.3 Ciclo de vida.....	15
2.3 <i>Trichoderma</i> Persoon, Fries.....	16
2.3.1 Epidemiología de <i>Trichoderma</i>	17
2.3.2 Ciclo de vida.....	18
2.3.3 Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i>	19
2.3.3.1 Competencia.....	19
2.3.3.2 Micoparasitismo.....	20
2.3.3.3 Antibiosis.....	20
2.3.3.4 Actividad lítica	21
2.3.3.5 Resistencia.....	21
2.3.3.6 Competencia por Nutrientes.....	21
CAPITULO III.....	22
3.1 Localización.....	22
3.1.1 Aspectos generales.....	22
3.1.2 Ubicación geográfica.....	22
3.1.3 Características climáticas.....	22
3.1.3.1 Clima.....	22
3.1.3.2 Temperatura	22

3.1.4 Flora	22
3.1.5 Fauna	23
3.1.6 Suelos.....	24
3.2 Materiales y métodos.....	24
3.2.1 Microorganismos.....	24
3.2.2 Material vegetal.....	24
3.2.3 Elaboración del banco de trabajo de aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.....	24
3.2.4 Preparación del inóculo de aislamientos de <i>Trichoderma</i>	25
3.2.5 Preparación del inóculo de <i>Moniliophthora roreri</i>	25
3.2.6 Prueba de antagonismo in-vitro.....	25
3.2.6.1 Elaboración de la prueba de antagonismo.....	25
3.2.6.2 Medición del ritmo de crecimiento del hongo.....	25
3.2.6.3 Evaluación de la capacidad antagonista “in vitro”.....	26
3.2.7 Prueba de antagonismo in-vivo.....	27
3.2.7.1 Incubación del sustrato.....	27
3.2.8 Tratamientos.....	27
3.2.9 Aspersión foliar.....	28
3.2.10 Diseño experimental.....	28
3.2.10.1 Modelo estadístico.....	28
3.2.10.2 Unidad experimental	28
3.2.10.3 Variables de estudio.....	29
CAPITULO IV.....	30
4.1 Resultados y discusiones.....	30
4.1.2 Medición del ritmo de crecimiento de dos cepas	

de <i>Trichoderma</i> y <i>Moniliophthora roreri</i>	30
4.1.2.1 Ritmo de crecimiento a las 24 Hrs.....	30
4.1.2.2 Ritmo de crecimiento a las 96 Hrs.....	31
4.1.2.3 Ritmo de crecimiento a las 192 Hrs.....	33
4.1.3 Velocidad de crecimiento de <i>Trichodermas</i> y los patógenos.....	34
4.1.3 Prueba dual entre <i>Trichoderma harziarum</i> vs <i>Moniliophthora roreri</i>	35
4.1.3.1 Ritmo de crecimiento de la prueba dual a las 48 Hrs.....	35
4.1.3.2 Ritmo de crecimiento de la prueba dual a las 120 Hrs.....	36
4.1.3.3 Evaluación de la capacidad antagonista “in vitro” entre <i>T. harziarum</i> y <i>M. roreri</i>	38
4.1.4 Prueba dual entre <i>Trichoderma viride</i> vs <i>Moniliophthora roreri</i>	39
4.1.4.1 Ritmo de crecimiento de la prueba dual a las 48 Hrs.....	39
4.1.4.2 Ritmo de crecimiento de la prueba dual a las 144 Hrs.....	40
4.1.4.3 Evaluación de la capacidad antagonista “in vitro” entre <i>T. viride</i> y <i>M. roreri</i>	42
4.1.5 Prueba “in vivo” de <i>Trichoderma harziarum</i> para control de <i>Moniliophthora roreri</i>	42

4.1.5.1 Incidencia de la enfermedad a los 15 días después de la aplicación.....	42
4.1.5.2 Incidencia de la enfermedad a los 75 días después de la aplicación.....	44
4.1.5.3 Evaluación de la severidad de la enfermedad a los 15 días después de la aplicación.....	45
4.1.5.4 Evaluación de la severidad de la enfermedad a los 75 días después de la aplicación.....	46
4.1.6 Condiciones climáticas registradas durante la evaluación.....	48
4.1.6.1 Precipitaciones.....	48
4.1.6.2 Temperaturas.....	49
5. Conclusiones y Recomendaciones.....	50
6. Bibliografía.....	51

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Escala propuesta por Bell y colaboradores

Cuadro 2: Análisis de varianza del crecimiento de los hongos en estudio a las 24 Hrs.

Cuadro 3: Análisis de varianza del crecimiento de los hongos en estudio a las 96 Hrs.

Cuadro 4: Análisis de varianza del crecimiento de los hongos en estudio a las 192 Hrs.

Cuadro 5. Comparación gráfica de las medias de crecimiento de los microorganismos

Cuadro 6. Velocidades medias encontradas de los microorganismos

Cuadro 7: Análisis de varianza del crecimiento de los hongos en cultivo Dual a las 48 Hrs

Cuadro 8. Análisis de varianza del crecimiento de los hongos en cultivo Dual a las 120 Hrs

Cuadro 9. Análisis de varianza del crecimiento de los hongos en cultivo Dual a las 48 Hrs

Cuadro 10. Análisis de varianza del crecimiento de los hongos en cultivo Dual a las 144 Hrs

Cuadro 11. Análisis de varianza de la incidencia a los primeros 15 días después de la aplicación

Cuadro 12. Análisis de varianza de la incidencia a los 75 días después de la aplicación

Cuadro 13. Análisis de varianza de la severidad a los 15 días después de la aplicación

Cuadro 14. Análisis de varianza de la severidad a los 75 días después de la aplicación

Cuadro 15. Precipitaciones registradas durante la investigación

Cuadro 16. Temperaturas medias máximas y mínimas registradas durante la investigación

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación Geográfica

Figura 2. Fondo de una placa con las marcas realizadas para observaciones de crecimiento

Figura 3. Unidad experimental dentro el cultivo del cacao

Figura 4. Comparación de medias con la prueba DUNCAN a un nivel de 0.05 %

Figura 5. Comparación de medias con la prueba DUNCAN a un nivel de 0.05 % a los 96 días.

Figura 6. Comparación de medias con la prueba DUNCAN un nivel de 0.05 % a los 192 días

Figura 7. Comparación de crecimiento de la prueba dual con relación a los testigos

Figura 8. Comparación de crecimiento de la prueba dual con relación a los testigos a las 120 Hrs

Figura 9. Comparación de crecimiento de la prueba dual con relación a los testigos a las 48 Hrs

Figura 10. Comparación de crecimiento de la prueba dual con relación a los testigos a las 144 Hrs.

Figura 11. Comparación de medias de incidencia después de los 15 días de aplicación

Figura 12. Comparación de medias de incidencia después de los 75 días

Figura 13. Comparación de medias de incidencia después de los 15 días

Figura 14. Comparación de medias de incidencia después de los 75 días

Resumen

La producción de cacao en Bolivia está siendo amenazada por *Moniliophthora roreri*, un hongo altamente agresivo que ataca a las mazorcas del cacao acabando totalmente con la producción. A pesar de los esfuerzos por tratar de combatirla, la producción reduce en un buen porcentaje, ante esta problemática como parte del manejo integrado de la enfermedad se propuso encontrar un hongo antagonista que le haga frente en campo, proponiéndose a *Trichoderma sp.* del cual se sabe que es un excelente controlador de enfermedades de suelo principalmente. En los últimos tiempos se lo viene empleando para control de enfermedades foliares, planteándose el objetivo de verificar la capacidad antagonista de *T. harziarum* y *T. viride* en una prueba dual bajo un diseño DCA, el mejor antagonista será probado en una parcela de campo en un DBA bajo los tratamientos de 200 y 300 gr. de Trichoderma con un testigo para ver cómo se comporta en campo para el control de *M. roreri*. Habiéndose realizado la prueba dual, se ha verificado que el mejor antagonista es *T. harziarum* por tener un porcentaje de inhibición de crecimiento de micelio del (PICM) 58.60 %, así mismo en la escala de Bell lo clasifica en un nivel de 1, invadiendo el micelio de *M. roreri* ocupando así todo el espacio de la caja Petri, siendo elegido para la aplicación en campo. La prueba de campo se realizó entre los meses de diciembre a marzo en donde se aplicó Trichoderma harziarum cada 15 días, los tratamientos fueron Testigo (T1), aplicación de 300 gr de Trichoderma fresca (T2), y 200 gr de Trichoderma fresca (T3), bajo un DBA, la evaluación nos muestra que el tratamiento (T2) con 300 gr fue el que logró mejores resultados para el control de la enfermedad, reduciendo la incidencia en un 6 % con relación al testigo y la severidad en 10.87 % con relación al testigo, lo que demuestra que puede ser empleado para control de la enfermedad. Realizando la comparación entre ambas metodologías donde la prueba de laboratorio confrontación dual controla al 100 % de la enfermedad, en campo las condiciones meteorológicas hicieron que solamente pueda controlarlo parcialmente, se recomienda realizar aspersiones también al suelo para poder controlar la fuente de inóculo y alcanzar mayores niveles de control final.

Evaluación de la capacidad antagonista de dos tipos de *Trichoderma* frente al hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao*)

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Bolivia cuenta con importantes poblaciones de cacao (*Theobroma cacao*) a lo largo de la Cuenca amazónica, se establece que hasta el año 2007 se estimaba la existencia de 12.115 ha de cacao silvestre en Bolivia, 2.275 ha del cacao amazónico boliviano cultivado y 6.360 ha de cacao híbrido cultivado o convencional (Espinoza, Olivera Manuel, & Ledezma, 2014).

Un caso especial y radicalmente distinto, es el de Alto Beni del departamento de La Paz, donde, junto con la colonización (impulsado por el instituto nacional de colonización) y luego un conjunto de actores públicos y privados, de manera permanente y constante desde los años 60 desarrollaron el cultivo del cacao hasta convertirse en la región con mayor capacidad productiva de cacao en Bolivia, con mayor volumen cosechado y un record de exportacion sobresaliente. La consolidación territorial de esta especialización está muy relacionada a un actor que le dio continuidad a la gestión técnica y económica del cacao, la central de cooperativas “El Ceibo” (Bazoberry Ch, Salazar Carrasco, & Centro de Investigación y Promoción del Campesinado (Bolivia), 2008).

De la misma manera se puede decir que la región productora en las provincias Caranavi y sud Yungas es la que aporta con la mayor cantidad de grano, representando en 75% de la producción total. No obstante, en la reciente campaña se verifica un descenso de la producción nacional de cacao de 25.9 % respecto al periodo 2011 -2012. De acuerdo a la percepción de los actores, principalmente de las organizaciones de productores y las instituciones de apoyo, los factores que incidieron en el descenso de la producción fueron: en La Paz, particularmente en la provincia Caranavi, la enfermedad conocida como Moniliasis, producida por el hongo *Moniliophthora roreri*, que durante la gestión 2013 afectó un promedio de 53% de las plantaciones, con rangos de 30-70% de afectación de acuerdo al área de colonización (Espinoza et al., 2014).

Por lo mencionado una de las enfermedades más destructivas en el cultivo del cacao es la ocasionada por *Moniliophthora roreri* (moniliasis), que juntamente con la *Moniliophthora*

perniciosa (Escoba de bruja) ocasionan innumerables pérdidas en el cultivo, las especies de *Trichoderma* tienen una gran actividad antagonista sobre estos patógenos. Durante los últimos años, varios investigadores y algunas empresas han mostrado gran interés en estudiar el potencial de *Trichoderma* como controlador biológico de patógenos.

La necesidad de controlar estas enfermedades llegó a la utilización extensiva de compuestos químicos, provocando la emergencia de patógenos resistentes a fungicidas y el deterioro de la salud de productores y consumidores, lo que ha promovido la búsqueda de alternativas viables que garanticen una mayor sostenibilidad en la producción agrícola, minimizando el impacto sobre el medio ambiente.

El control de esta enfermedad debería realizarse de forma orgánica (sin la aplicación de productos químicos), debido a la fragilidad de los ecosistemas donde se encuentran estas plantaciones, ya que este tipo de producción es muy valorada en países de Europa, Asia y en los Estados Unidos (Rotz *et al.*, 2007).

CAPITULO I

1.1. Antecedentes

En la demanda de cacao se compone de alimentos y cosmética. En el mercado nacional el consumo de alimentos es el uso predominante. Además, la demanda de chocolates e insumos de cacao depende de la tecnología de elaboración y la capacidad de producción de las industrias. Las empresas con plantas de procesamiento demandan principalmente cacao en grano; mientras que las empresas artesanales demandan cobertura o licor de cacao (Espinoza *et al.*, 2014).

La Moniliasis es un hongo fitopatógeno que ataca la mazorca del cacao siendo uno de los principales factores limitantes causando pérdidas mayores al 30%, pero que en muchas localidades alcanzan el 100%. Los efectos devastadores han causado el abandono de miles de hectáreas durante un periodo de casi 200 años. La reciente aparición y agresividad mostrada por el hongo en los dos extremos longitudinales de distribución (México y Perú) indica que esta es muy intensa y expansiva (Phillips, 2012).

Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser

aisladas y cultivadas, su crecimiento rápido en un gran número de sustratos ya que no atacan a plantas superiores (Ezziyani, Sánchez, Ahmed, Requena, & Emilia, 2004).

1.2. Planteamiento del problema

La moniliasis, causada por el hongo *Moniliophthora roreri*, es la enfermedad más severa del cacao. Desde su aparición en 1978, los rendimientos y la producción han bajado en forma preocupante. Muchas fincas han sido abandonadas y los agricultores reportan pérdidas de hasta el 100%. Además de la monilia, otro hongo denominado mazorca negra (causado por *Phytophthora spp.*, Principalmente *Phytophthora palmivora*), es una enfermedad importante de este cultivo (Krauss et al., 2003).

Económicamente, la enfermedad ocasiona pérdidas en el rendimiento de acuerdo con las condiciones ambientales, el manejo del cultivo, las medidas de control que se apliquen y las variedades cultivadas. En plantaciones ubicadas en zonas húmedas, con poca tecnificación y sin control, es frecuente observar pérdidas superiores al 90%. Sin embargo, bajo condiciones culturales óptimas de manejo, control y germoplasma mejorado los daños disminuyen considerablemente, y esta situación genera una alternativa para el desarrollo del cacao en áreas infectadas con alta humedad (PRODUCE, 2006).

Los bajos rendimientos registrados en los últimos años en alto Beni, se deben principalmente a la alta incidencia de la Moniliasis, la misma que al no poderse controlar eficazmente con la utilización de agroquímicos por ser una zona de producción orgánica, la falta del tiempo de los productores hace que no se realicen los controles adecuados, por lo que la enfermedad cada año es más agresiva y los rendimientos cada vez más bajos.

1.3. Justificación

Según Uquillas (2004), señala que el convenio CABI-CATIE ha realizado trabajos sobre el control biológico de monilia utilizando principalmente microorganismos antagonistas como el hongo *Trichoderma spp.*, que ha tenido resultados prometedores además de una reducción en el gasto económico en comparación con el método químico, lo que hace necesario realizar estudios que nos permitan entender estos factores y crean la posibilidad de desarrollar nuevas formulaciones en el manejo de estos antagonistas que permitan mejorar la eficiencia en el control de esta enfermedad.

Por otra parte, las paredes celulares de los fitopatógenos *Sclerotium rolfsii* (Sacc), *Rhizoctonia solani* (Kühn) y *Pythium* sp. están en su mayoría compuestos de 1,3-glucanos y quitina, y algunos como los Oomycetes (ejemplo, *Pythium* sp.) que poseen los 1,3-glucanos, también contienen celulosa en lugar de quitina, lo que explica la importancia de estas enzimas en la capacidad antagonista de *Trichoderma* y por lo tanto en su utilidad como bioplaguicida (Cruz, 2007).

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

- Evaluar la capacidad antagonista “in vitro” de dos aislamientos de *Trichoderma* frente a los hongos fitopatógenos *Moniliophthora roreri*.

1.4.2. Objetivos específicos

- Verificar la capacidad antagonista de dos aislamientos de *Trichoderma* sobre los fitopatógenos *Moniliophthora roreri* bajo condiciones “in vitro”.
- Evaluar en condiciones de campo (in vivo) la capacidad antagonista de la *Trichoderma* más eficiente sobre el hongo patógeno *Moniliophthora roreri*.
- Comparar los resultados obtenidos en las pruebas de antagonismo “in vivo” con resultados obtenidos en condiciones “in vitro”.

1.4.3. Hipótesis

La capacidad antagonista de dos aislamientos de *Trichoderma* no tienen control sobre los agentes fitopatógenos *Moniliophthora roreri*.

CAPITULO 2

2. Marco Teórico

2.1. Importancia del cacao en Bolivia

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol perenne nativo del trópico americano; fue domesticado hace más de 2000 años por poblaciones mesoamericanas, quienes cultivaron una variedad de cacao de alta calidad aromática denominado Criollo, probablemente originario de

la parte norte de Suramérica. Después de la colonización de los españoles, para satisfacer el incremento de la demanda europea, la producción de la variedad Criollo se dispersó por Suramérica y regiones del Caribe (Jaimes Suárez & Aranzazu Hernandez, 2010).

De acuerdo con historia oficial, el cultivo del cacao en Bolivia data del siglo XVIII cuando fue introducido en las misiones jesuitas como un componente importante unas actividades económicas de la vida de las reducciones. A pesar o del existencia de condiciones agroecológicas óptimas para el cultivo del cacao en una buena parte de la Cuenca amazónica boliviana, el país nunca fue un jugador importante en el mercado mundial de este rubro (Bazoberry Ch et al., 2008).

Posteriormente en 1977, la cooperación internacional inició su apoyo a la entonces cooperativa El Ceibo en la región productora más importante de cacao como el alto Beni, igualmente se impulsó en esos años el cultivo de cacao en el trópico cochabambino. A partir de los años 90 se puede visibilizar la importante producción del departamento del Beni, en una variedad de cacao de origen silvestre. Paulatinamente se fueron conociendo iniciativas en otros departamentos como el trópico cochabambino, en Riberalta, en Urubichá y Asunción de Guarayos en Santa Cruz, El Carmén de Emero en el Norte Paceño, y Rurrenabaque, San Ignacio de Moxos en Beni, entre otros (Espinoza et al., 2014).

Es recién en la segunda mitad del siglo xx que el gobierno de Bolivia, vuelve a considerar su importancia y potencial en la economía campesina, este hecho se relaciona a la nueva atención que da el estado al desarrollo de las actividades agropecuarias y a los planes y programas de colonización de distintas regiones de Bolivia (Bazoberry Ch et al., 2008).

En el departamento de La Paz, un todo con la colonización y luego un conjunto de actores públicos y privados, de manera permanente y constante desde los años 60 desarrollaron el cultivo del cacao hasta convertirse en la región con mayor capacidad productiva de cacao en Bolivia, con mayor volumen cosechado y con un record de exportación sobresaliente (Bazoberry Ch et al., 2008).

2.1.1. Parcela de cacao sin manejo.

Cuando a una plantación de cacao no se le da el manejo agronómico adecuado, el ambiente que se desarrolla dentro del cacaotal es muy propio para la multiplicación del hongo de la Moniliasis. Las condiciones de árboles de cacao sin poda, con brotes, hijos o de chupones en abundancia y al de libre crecimiento, contribuyen a mantener la humedad y oscuridad del

ecosistema. Con árboles de sombra que rozan sus ramas y hojas con las del cacao, se impide la penetración de la luz solar y la circulación del aire, de manera que la plantación se mantiene durante la mayor parte del día en condiciones oscuras y húmedas. También habrá malezas o montes que suben por los troncos de los árboles de cacao favoreciendo las condiciones de alta humedad. Las ramas de un árbol de cacao se entrelazan con sus vecinos, así se continúa la cantidad de crecimiento vegetativo (ramillas, ramas, hojas, chupones o brotes) y no se estimulan al árbol a florecer y producir frutos, acción que se consigue al podar (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), 2003).

2.1.2. Parcela de cacao con manejo

En un cacaotal atendido regularmente con las prácticas adecuadas, los árboles de cacao pueden verse sin mayores dificultades desde cualquier parte de la plantación. Las ramas en cada árbol de cacao en grano, una distribución y equilibrio adecuado, balanceado, sin brotes o hijos en los troncos o al pie, ni en las ramas, tampoco se entrecruzan una sana con la otra, no estarán chocando o rozándose ramas de cacao con los de los árboles de sombra. Estos árboles de sombra también serán podados regularmente, para que cumplan su objetivo de proveer sombra a los árboles de cacao pero no en exceso. En la plantación podada regularmente, con sombra regulada, libre de malezas y excesos de agua en el suelo, la incidencia de enfermedades será mínima y esto llevará a una mayor cosecha de frutos maduros y sanos (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), 2003).

2.2. Enfermedades del cacao

El factor que más limita la producción de cacao es la presencia de enfermedades, entre las cuales se destacan la monilia (*Moniliophthora roreri*) y la mazorca negra (*Phytophthora sp.*). Alrededor de 40% de la producción se ve afectada por monilia, sin embargo, algunas condiciones que se relacionan con la zona Agroecológica donde se encuentre el cultivo, la severidad del inóculo y el inadecuado manejo hacen que las pérdidas lleguen hasta 100%, razón por la cual esta enfermedad es considerada como la más prevalente y severa (Jaimes Suárez & Aranzazu Hernandez, 2010).

2.2.1. Moniliasis del cacao (*Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al)

En Ecuador, la Moniliasis del cacao fue descrita por primera vez en el año de 1916 por J. B. Rorer. La región de Quevedo en Ecuador, sur América es considerada como el centro de origen de esta enfermedad (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), 2003).

Según los resultados de estudios moleculares, mediante y el polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), perfiles ISSR y datos de secuencias ITS, indican que existe gran diversidad genética de *Moniliophthora roreri* en Colombia; también evidencian que allí es donde se pudo originar la enfermedad, en vez de Ecuador (Phillips-Mora et al., 2007; Phillips y Wilkinson, 2007); mencionado por (Jaimes Suárez & Aranzazu Hernandez, 2010).

2.2.1.1. Agente causal

El agente causal de la Moniliasis del cacao fue originalmente descrito por Ciferri y Parodi (1993), la CYPICA mencionándolo como *monillia roreri*; sin embargo, Evans et al (2007) observaron características miceliales de Basidiomicetes por lo que decidieron crear un nuevo nombre para denominar la especie con el nombre de *Moniliophthora roreri*. Mediante técnicas moleculares confirmó que el hongo es un basidiomicete situándola al orden Agaricales. Posteriormente, confirmaron la ubicación de *M. roreri* dentro de la familia Tricholomateceae (Phillips-Mora 2007).

La clasificación taxonómica de *M. roreri* propuesta por (ITIS 2015a), es la siguiente:

Reino: Fungi

Filo: Basidiomycota

Clase: Agaricomycetes

Orden: Agaricales

Familia: Tricholomateceae

Género: *Moniliophthora*

Especie: *Moniliophthora roreri*

Moniliophthora roreri posee el micelio septado, con doliporos. Las esporas se producen en cadenas con maduración basipétala (Evans, 2007) y se desprenden fácilmente del micelio, su pared es gruesa y amarilla-pálido o café cuando forman masas de esporas. Las esporas principalmente son globosas y elipsoidales, las cuales presentan una proporción aproximada al 60% y 30% con un diámetro promedio de 9 um, respectivamente (Phillips-Mora 2007).

2.2.1.2. Epidemiología

Las condiciones climáticas y la cantidad de esporas libres son factores determinantes en el ciclo de vida de *M. royeri*. El ciclo comienza con estación seca, época en la que se encuentran la mayor cantidad de esporas disponibles en el ambiente. Sin embargo, para que inicie la infección es necesario que existan condiciones de humedad.

En Colombia, se presentan condiciones favorables para la infección y desarrollo de la monillia durante todo el año, debido a la distribución de las lluvias. Por tal razón, es importante considerar el periodo entre cultivos, es decir, el periodo entre la cosecha y la próxima floración.

En Ecuador, el factor crítico en el ciclo de la enfermedad es la marcada estación seca y su importancia para determinar cómo *Moniliophthora royeri* sobrevive entre cosechas y la disponibilidad de puentes de inóculo de la estación húmeda (Evans, 1981).

En investigaciones adelantadas por el ICA entre 1960 y 1980 sobre la etiología, epidemiología y control de la Moniliasis, se resalta que los conidios sólo germinaron en presencia de una película de agua, con mayor germinación cerca de los 24 °C. En condiciones de laboratorio, las esporas que provienen de micelio esporulante, conserva la viabilidad y poder efectivo hasta 22 meses después de iniciar la esporulación. Estos propágulos almacenados y conservados en seco al 4,5 °C mantienen la viabilidad superior al 50% después de diez meses (Merchan, 1981).

También se encontró que en condiciones de laboratorio, la germinación de las esporas o corren aproximadamente entre seis y ocho horas. La hifa infectiva del hongo penetra la epidermis del fruto, desde la cual se propaga inter e intracelularmente a los tejidos subepidermales y al excarpo. La infección continúa a los tejidos centrales, incluyendo las semillas, e inicia el desarrollo de la necrosis desde la parte interna hacia la epidermis.

Externamente, la infección aparece como puntos aceitosos muy pequeños y circulares, los cuales se convierten en lesiones (manchas) irregulares de color amarillo y marrón. El proceso desde la infección a la aparición de la mancha tiene una duración aproximada de 60±5 días, dependiendo de la susceptibilidad del clon de cacao. Entre 3 y 4 días, se desarrolla el micelio blanco sobre las lesiones y luego aparecen las esporas, las cuales confieren un color crema a marrón (Jaimes Suárez & Aranzazu Hernández, 2010).

2.2.1.3. Sintomatología

Una de las características del hongo *Moniliophthora roreri* es un largo periodo de incubación, este tiempo puede ser de 3 a 8 semanas. El tiempo varía según la edad del fruto, la severidad del ataque, la susceptibilidad del árbol y las condiciones de clima, principalmente la presencia de lluvias. En los frutos tiernos, en días lluviosos y calurosos, el periodo de incubación se acorta tres semanas (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA, 2003).

Podemos encontrar síntomas externos e internos en los frutos en todas las fases de su desarrollo. El daño externo es caracterizado por una necrosis, deformación y pudrición en mazorcas, aunque algunos frutos de 60 a 80 días pueden completar su desarrollo sin síntomas externos, pero con el tejido interno necrosado (Reuck, 1997). Esto conlleva a la muerte de fruto, con un color café oscuro, para luego cubrirse de una “felpa” de color crema, que son las esporas del hongo. El daño interno causado por la enfermedad puede ser más grave que el externo, pudiendo llegar a perderse casi toda las almendras sin importar la edad del fruto (Sanchez Mora & Garcés Fiallos, 2012).

Sobre los frutos jóvenes se observan áreas de crecimiento anormal, formándose protuberancias pronunciadas sobre la superficie de los frutos (gibas). Los síntomas externos suelen estar completamente ausentes hasta la formación de lesiones entre 45 y 90 días después de la penetración del hongo. Según Evans et al (1978) está fase se podría considerar como la fase biotrófica del hongo, en cuanto a que la necrótica puede ser precedida por la maduración irregular o prematura, la aparición lesiones irregulares de color chocolate o castaño oscuro, que van creciendo gradualmente hasta cubrir con rapidez toda la superficie del fruto (Jaimes Suárez & Aranzazu Hernandez, 2010).

En tejidos centrales, pulpa, semillas de algunas veces la cascara, forman una sola masa en donde los tejidos son rodeados por una sustancia acuosa debido a la descomposición de ellos, siendo también las almendras destruidas total o parcialmente, dependiendo del tiempo de infestación de los frutos (IICA, 2006).

Un síntoma adicional es la llamada madurez prematura, donde las mazorcas cambian de color dando la apariencia de madurez en frutos que todavía están inmaduros. En frutos infectados a mitad de su desarrollo, la enfermedad aparece primero en forma de unos pequeños puntos aceitosos (translúcidos), en muy corto tiempo esos puntos se unen formando una mancha café, el borde de la mancha es irregular y a veces produce un color amarillento en donde va

avanzando la enfermedad, a los pocos días sobre la mancha café aparece el micelio y luego las esporas que forman un grupo acumulado abundante de color crema, las esporas que reproducen el hongo son tan abundantes en un centímetro cuadrado, se cuentan desde 7 a 43 millones, bastando sólo una para iniciar la enfermedad (Johnson et al., 2008) y (Sanchez Mora & Garcés Fiallos, 2012).

2.2.1.3. Ciclo de la enfermedad

La sobrevivencia del patógeno empieza en los residuos de cosecha (mazorcas contaminantes). Luego, las conidias son diseminadas por el viento y la lluvia, ocurriendo también contaminación de frutos o mazorcas con moniliasis de una plantación a otra. Algo similar menciona Albuquerque et al (2005), indicando que la diseminación de las conidias es realizada por el viento, viendo el agua de lluvia tener un papel importante en las infecciones a corta distancia en la copa del cacao. Además, debido al movimiento producido por las labores de cosecha, las esporas se movilizan en el aire y bajo condiciones propicias de humedad y temperatura, infectan constantemente los frutos que recién están formándose (Amores et al., 2009a).

Las conidias se depositan sobre el fruto, que germinan con agua o mueren por la radiación/desecación, pueden germinar y penetrar directamente a la cáscara del fruto. Su penetración ocurre directamente a través de los estomas o directamente a través del tejido, creciendo entre las células del córtex, produciendo conidias dentro y en la superficie de los frutos (Albuquerque et al., 2005).

Una de las características del patógeno es un largo periodo de incubación antes de aparecer los síntomas (Johnson et al., 2008). El tiempo de infección puede ser de 3 a 8 semanas, debiendo variar según la edad del fruto, la severidad del ataque, la susceptibilidad del árbol y las condiciones de clima, principalmente presencia de lluvias, mientras que en frutos tiernos, en días lluviosos y calurosos, el periodo de incubación se acorta tres semanas (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), 2003).

2.2.2. Mazorca negra del cacao (*Phytophthora palmivora* Butler)

También llamada mancha negra de la mazorca o simplemente, mazorca negra. Esta enfermedad es causada por el Oomycete del género *Phytophthora*, dentro del cual se encuentran las siguientes especies como causantes de la enfermedad, *P. Palmivora*: para Centro América, Sur América y África; *P. megasperma*, *P. Parasitica*, *P. siringae* y *P. citri* en

sur América; *P. megakarya* en África, siendo esta especie la más virulenta (Urdaneta G. & Delgado A., 2007).

Ubicación taxonómica de *Phytophthora*

Reino: Stramenopila

Phylum: Oomycota

Clase: Oomycetes

Orden : Peronosporales

Familia : Pythiaceae

Genero : *Phytophthora*

Especie : *Palmivora*)

Nombre técnico: *Phytophthora palmivora* Butler.

2.2.2.1. Epidemiología

El inicio del proceso de infección depende en gran medida de las condiciones ambientales, la humedad relativa alta y las bajas temperaturas, características de la época de lluvias, son favorables para la liberación de las zoosporas del esporangio y su dispersión.

Los vehículos de dispersión de la enfermedad son: la salpicadura de lluvia que aprovecha el inóculo presente en el suelo para afectar a las mazorcas más cercanas; la escorrentía que transporta en la corriente del agua las zoosporas simplemente la dispersión del patógeno hasta dos metros y también el viento moviliza las zoosporas atrapadas en micro gotas de agua, las cuales pueden ser transportadas hasta doce metros de distancia, las zoosporas responden a estímulos generados por el hospedero y a los 20 y 30 minutos se enquistan en el material vegetal. El proceso de infección inicial después de esta etapa, las zoosporas pierden los flagelos y germina, dando lugar a la formación de la pipa infectiva, la cual al penetrar directamente al tejido e invade los espacios intercelulares. En condiciones ambientales favorables, esta etapa tiene una duración aproximada de 48 horas (Jaimes Suárez & Aranzazu Hernandez, 2010).

2.2.2.2 Sintomatología

Pudrición de la mazorca: la mazorca negra, causada por especies de *Phytophthora*, inicia sobre la superficie de la mazorca una mancha descolorida, sobre la que posteriormente se desarrolla una lesión de color chocolate o negra con límites y bien definidos. En dos semanas, estas empiezan a dispersar hasta alcanzar toda la superficie de la mazorca. Sobre las mazorcas mayores a los tres meses de edad, las infecciones inician principalmente en la punta, o al final del pedúnculo que une a la mazorca. Los granos o almendras de las mazorcas enfermas permanecen sin daño por varios días, después de iniciar la infección en la cascara. Esto significa que la cosecha frecuente puede prevenir muchas pérdidas en la producción (Jaimes Suárez & Aranzazu Hernandez, 2010).

Las infecciones ecuatoriales están usualmente asociadas con el daño por heridas de la superficie de la mazorca, en ella se involucra la pudrición total del tejido carnoso como también la pulpa y las semillas. Los frutos cercanos a la madures fisiológica, con semillas no muy grandes y sin contacto cercano con la cascara no presentan infección y pueden ser cosechados y fermentados (Jaimes Suárez & Aranzazu Hernandez, 2010).

El patógeno aparece sobre la superficie de la mazorca como una pelusa blanquísima, sobre la que se forma la masa de Esporangios. La mazorca finalmente se ennegrece y marchita y es colonizada por hongos secundarios (McMahon y Purwantara, 2004).

Canceres: el cáncer en el tallo se caracteriza por el desarrollo del área necrótica marrón en la corteza, alrededor del tronco. Cuando se rasca la superficie de la corteza afectada, el tejido expuesto se torna de acuoso a pegajoso y de un color opaco de gris parduzco a un color rojizo claro. La necrosis no se extiende más allá de la capa del cadmium. En el caso de un cáncer grande, éste puede rodear en círculo de tronco, causando la muerte súbita del árbol (McMahon y Purwantara, 2004).

2.2.2.3 Ciclo de vida

Phytophthora palmivora tiene cuatro tipos de esporas que pueden causar infección directa o indirectamente: esporangios, zoosporas, clamidosporas y oosporas. Los esporangios son producidos sobre frutas infectadas, hojas, tallos y raíces, son capaces de germinar directamente sobre la superficie de la planta o en el suelo, ellos también pueden germinar para producir pequeñas zoosporas que nadan en el agua entre los espacios del suelo o sobre la superficie de la planta en la película de agua líquida hasta que eventualmente entran en la

planta. Los esporangios y zoosporas pueden ser diseminados por el salpique provocado por la lluvia, en aerosoles arrastrada por el viento y el agua del suelo.

Delgadas paredes rodeando las clamidosporas son producidas por el micelio en forma aislada; ellas germinan bajo ciertas condiciones y forman esporangios. Oosporas son formadas cuando en el acoplamiento están presentes dos tipos de estructuras especializadas llamados anteridios y oogonio de compatibilidad complementaria A1 y A2, esta es la fase sexual que potencia la capacidad patogénica de este organismo, porque produce un descendiente genéticamente diferente, el cual podría ser capaz de vencer la resistencia del hospedero. El Oomicete *Phytophthora* como parásito facultativo necesita una planta hospedera para vivir mejor, por lo tanto, clamidosporas y oosporas son estructuras de supervivencia importantes, ellas son capaces de vivir en el suelo o en el rastrojo en ausencia de plantas (Cruz Choque, Poma, & Cadena, 2017).

2.2.3 Escoba de bruja del cacao (*Moniliophthora perniciosa* Stahel (Marin, 2000)

La escoba de bruja del cacao es una enfermedad endémica, originaria del valle alto del Amazonas. La enfermedad fue registrada por primera vez en 1785 con el nombre de lagarto por el brasileño Alexander Rodríguez, constituyendo posiblemente, el registro más antiguo de la enfermedad (Tovar, 1991) citado por (Cruz, 2007).

Causada por el hongo *Moniliophthora perniciosa*, cuya ubicación taxonómica es la siguiente:

Reino: Hongos

Subreino: Dikarya

División: Basidiomycota

Subdivisión: Agaricomycotina

Clase: Agaricomycetes

Orden: Agaricales

Familia: Marasmiaceae

Género: *Moniliophthora*

Especie: *perniciosa*

2.2.3.1 Epidemiología

El patosistema cacao – *Moniliophthora perniciosa* es dependiente y limitado por la humedad atmosférica (lluvia, niebla, rocío y humedad relativa). La presencia o ausencia de cualquiera de las condiciones ambientales afecta la fenología del hospedero, la producción de basidiocarpos, la liberación de basidiosporas, la dispersión, infección y la sincronía entre estos eventos.

La temperatura según da la tasa de desarrollo de la enfermedad, pero rara vez es un factor limitante de su desarrollo; esta juega un papel importante en: a) el secado de las escobas, por ende promueve la producción de basidiocarpos; b) la evapotranspiración, la cual induce estrés por humedad y asfixia de los tejidos del hospedero, por ende incrementa el número y sincronía de los sitios de infección; y c) la formación de socio sobre el hospedero susceptible proveen la humedad requerida para la germinación de las basidiosporas y la subsecuente infección (Purdy y Schmidt, 1996) mencionado por (Jaimes Suárez & Aranzazu Hernandez, 2010).

Los basidiocarpos se forman sobre tejido necrótica del dosel y tronco del cacao. La fuente más importante de estas estructuras son las escobas vegetativas necrótica en el dosel del árbol, escobas podadas o caídas descubiertas por el lecho de un mulch sobre el suelo, sobre cojines florales y mazorcas enfermas en el árbol o el suelo. Mientras que las escobas del dosel son la fuente más importante de basidiocarpos, otras fuentes pueden tener significancia epidemiológica dependiendo del edad del árbol, los factores climáticos y las prácticas fitosanitarias (Purdy y Schmidt, 1996) mencionado por (Jaimes Suárez & Aranzazu Hernandez, 2010).

Los basidiocarpos son producidos por *Moniliophthora perniciosa* en respuesta tanto a la humedad como a la sequía. Durante periodos secos prolongados los basidiocarpos son pocos, mientras que en periodos con amplia presencia de lluvias, se presentan durante todo el año. En campo, los basidiocarpos aparecen sobre las escobas a las cuatro u ocho semanas de lluvia continua, pero también pueden aparecer antes dependiendo de la edad, la localización de la escoba y el clima.

Las escobas vegetativas pueden producir docenas o cientos de basidiocarpos, y cada uno de ellos puede producir desde cientos a miles de basidiosporas durante su periodo de viabilidad, las que son dispersadas por el viento y la lluvia. Las basidiosporas son liberadas en

abundancia entre las ocho pm y siete am, cuando la humedad es alta y la temperatura baja. La temperatura óptima para la liberación de las esporas es de 20° a 25° centígrados, pero los basidiocarpos liberan Oosporas entre 10°y 30° entre 2 - 8 días. Cuando las esporas son abundantes, el inóculo es un factor limitante de la epidemia, esto durante periodos secos prolongados (Purdy y Schmidt, 1996) mencionado por (Jaimes Suárez & Aranzazu Hernandez, 2010).

2.2.3.2 Sintomatología

Primario: hipertrofia en la base del hipocotilo. El desarrollo radicular de las plantas infectadas es muy escaso en relación con las plantas sanas. Secundarios: tristeza, clorosis y secamiento foliar. Síntomas en yemas de plántulas consistentes en hipertrofia del brote principal y el desarrollo de yemas axilares, también hipertrofia dos, proliferación, agrandamiento y persistencia de las estipulas en el ápice de las yemas, base del peciolo de las hojas hipertrofiado. Síntomas en las yemas terminales de los árboles, escoba látigo, necrosis de yema y ramas atrofiadas, escoba vegetativa de cojines florales y proliferación de flores y frutos chirimoyas, y frutos zanahoria (Marín, 2000) mencionado por (Cruz Choque et al., 2017).

2.2.3.3 Ciclo de vida

Las basidiosporas que se producen en los basidiocarpos se diseminan sobre tejido susceptibles, la penetración ocurre a través de los estomas en un periodo de dos horas. La infección de brotes causa síntomas de escobas vegetativas presentándose variación en los periodos de incubación de acuerdo al periodo de la yema o el botón. La infección en inflorescencias puede afectar en flores individuales, sí avanza, puede destruir todo el cojín floral. El patógeno es un hongo hemi unbiotrópico que se presentan dos formas:

- a) Parasítico, creciendo intercelularmente caracterizado por un grueso micelio.
- b) Saprofitico, con micelio delgado (multi nuclear) donde se producen basidiocarpos, el micelio se reportan como morfológicamente variable.

Se determinó que el micelio del hongo invade a lo largo de escobas maduras (Cruz, 2007).

2.3 Trichoderma Persoon, Fries

Importancia

El género *Trichoderma* fue descrito por Persoon en 1794, posteriormente, Rifai hizo el primer agrupamiento en especies de agregadas que es utilizada hasta el presente, a pesar de las dificultades que se presentan para la identificación de especies por este método, debido a la cercanía morfológica y la evolución de las mismas. Son hongos saprófitos del suelo y la madera, de crecimiento muy rápido. Las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas por todas las latitudes y se presenta naturalmente en diferentes ambientes, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición.

La acción de *Trichoderma* como micó parásito natural se demostró por Weindling en 1932 y su utilización en experimentos de control biológico se implementó a partir de 1970, cuando se incrementaron los estudios de campo para su uso en cultivos de hortalizas y ornamentales. No obstante, la información sobre su empleo en la producción agrícola es insuficiente y dispersa (Martínez, I, & Li, 2013).

Los hongos del género *Trichoderma* son activos contra una amplia gama de patógenos foliares y del suelo económicamente importantes, y se utilizan exitosamente como bioplaguicidas en aplicaciones tanto en casas de cultivo como campo (González et al., 2011).

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* se caracterizan por ser hongos saprofitos, que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, los cuales son capaces de descomponerla y en determinadas condiciones pueden ser anaeróbicos facultativos, lo que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica. Las especies de *Trichoderma* se encuentran presentes en todas las latitudes desde las zonas Polares hasta la Ecuatorial. Esta distribución para amplia y su plasticidad ecológica están estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos (Infante, Martínez, Gonzales, & Reyes, 2002).

El control de enfermedades fúngicas y bacterianas de plantas no es el único uso que ha recibido *Trichoderma harziarum*. También se han utilizado aislados de este hongo para

controlar invertebrados patógenos de la rizósfera de la planta como los nematodos (Sahebani y Hadavi, 2008) y plagas foliares como los áfidos (Ganassi et.al., 2000). *Trichoderma harziarum* también se ha empleado como promotor de crecimiento vegetal. Algunos investigadores han sugerido que estos aislados producen compuestos que actúan como hormonas de crecimiento en la planta, mejorando de este modo la nutrición y, por tanto, el crecimiento de la planta (Bailey y Lumsden, 1998).

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. *Trichoderma* se ubica taxonómicamente según Villegas mencionado por (Infante et al., 2002) en:

Reino: Fungi

Subreino: Dikarya

División: Ascomycota

Subdivisión: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

Género: *Trichoderma* Persoon, Fries

En la actualidad se han definido 256 especies de este género (Bissett et al., 2015)

2.3.1 Epidemiología de *Trichoderma*

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, que se tornan verde oscuro a amarillo, con esporulación densa. El micelio es ralo en su mayoría y vista al microscopio es fino, los conidiosforos son ramificados, parecen un árbol pequeño. Los mismos se presentan como penachos compactados que forman agregados un sistema de ramas irregular de manera piramidal. Éstos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies. Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del periodo

vegetativo de las plantas. Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos. Además de los conidióforos, esta se pueden producir sobre fiálides que emergen directamente del micelio (Infante et al., 2002).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* presentan clamidosporas, las cuales pueden ser intercalares y en ocasiones terminales. Las clamidosporas toleran condiciones ambientales adversas, son estructuras de sobrevivencia y permiten que el hongo pueda perdurar a través del tiempo. No obstante, las conidias de esporas recién formadas presentan más del 75% de germinación, bajo condiciones óptimas de humedad (mayor a 75 %) y temperatura entre los 28 a 30 °C. Debido a esto se dice, que las especies de *Trichoderma* producen tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios (Infante et al., 2002).

2.3.2 Ciclo de vida

Las especies de *Trichoderma* se caracterizan por presentar un rápido crecimiento, poseer una gran capacidad de esporulación y de adaptación a un amplio rango de suelos agrícolas. Los aislados de *Trichoderma* son sensibles a diferentes condiciones abióticas medioambientales, temperatura, humedad y nutrientes, si bien su gran adaptabilidad les permite sobrevivir en gran cantidad de hábitats. Estos hongos compiten bien en la rizósfera de la planta, como endófitos, siendo capaces de colonizar completamente la superficie radicular. Además, penetran en el tejido de la raíz, normalmente hasta la primera o segunda capa de células y sólo los espacios intercelulares (Brotman et.al., 2010).

La relación entre la temperatura y el desarrollo de *Trichoderma*, al parecer depende de la especie y del propio aislamiento. Se conoce que *Trichoderma pseudokoningii* y *Trichoderma satumisporum* toleran de 40 a 41 °C, las especies *Trichoderma koningii* y *Trichoderma hamatum* 35 °C, *Trichoderma viride* y *Trichoderma polysporum* 31°C, mientras que *Trichoderma harziarum* hasta 38 °C (Martínez et al., 2013).

La luz y su espectro influyen en el desarrollo de *Trichoderma*, fundamentalmente sobre la esporulación. Las colonias del hongo que se desarrollaron bajo condiciones de luz alterna fueron blancas y algodonosas al inicio y después concéntricas, alternando una banda delgada hialina con otra ancha de color verde oscuro, mientras que bajo la luz continua fueron uniformemente de color verde oscuro.

2.3.3 Mecanismos de acción de Trichoderma

En la acción biocontroladora de Trichoderma se han descrito en diferentes mecanismos de acción que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos. Entre estos, los principales son la competencia por el espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, los que tiene una acción directa frente el hongo fitopatógeno (Leal et al., 2000) citado por (Infante et al., 2002).

Además, se conoce que Trichoderma presenta otros mecanismos, cuya acción bio-reguladora de forma indirecta. Entre estos se pueden mencionar los que incitan o inducen mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos como es la activación en una planta de compuestos relacionados con la resistencia, con la detoxificación de toxinas excretadas por patógenos y la desactivación de encimas durante el proceso de infección; la solubilización de elementos nutritivos, que en su forma original no son accesibles para las plantas. Tienen la capacidad además, de crear un ambiente favorable al desarrollo radical lo que aumenta la tolerancia de la planta al estrés (Infante et al., 2002).

2.3.3.1 Competencia

La competencia constituye un organismo de antagonismo muy importante. Se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo seguimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de este fue uno de los organismos que redujo la cantidad o espacio disponible para los demás. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente de control biológico como la plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento, desarrollo y resistencia a fungicidas; y por factores externos como el tipo de suelo, pH, temperatura y humedad (Ahmad y Baker, 1987; Klein y Eveleigh, 1998) mencionado por (Muñoz Gonzales, 2015).

La presencia de Trichoderma en suelos agrícolas y naturales en todo el mundo, es una evidencia de que es un excelente competidor por espacio y recursos nutricionales, y de su plasticidad ecológica. La competencia por nutrientes de Trichoderma es principalmente por carbono, nitrato y hierro. De forma General, entre las cualidades que favorecen la competencia de este antagonismo se encuentran, la alta velocidad de crecimiento que posee gran parte de sus aislamientos y la secreción de metabolitos de diferente naturaleza, que frenan o eliminan a los competidores en el microambiente. Este modo de acción influye el

bloquear el paso al patógeno y resulta importante para la diseminación del antagonista (Martínez et al., 2013).

2.3.3.2 Micoparasitismo

El micoparasitismo es definido como una simbiosis antagónica entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, célulasas, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados (Infante et al., 2002).

El primer paso del micoparasitismo, consiste en que *Trichoderma* detecta el hongo hospedero (patógeno) y crece hacia él; la teledetección es al menos parcialmente debido a la expresión secuencial de encimas degradadoras de pared celular en su mayoría quitinasas, glucanasas y proteasas (Harman et al., 2004) enseguida ocurre una difusión de estas enzimas así como la liberación de oligómeros de la pared celular del hongo hospedero y esos a sus vecinos en la expresión de endoquitinasas fungitóxicas que se difunden y comienzan el ataque contra el hongo de destino antes de que realmente se haga contacto (Muñoz Gonzales, 2015).

Diferentes interacciones hifales están involucradas en el micoparasitismo, tales como: enrollamiento, penetración, vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis. En el parasitismo a nivel microscópico no todas estas interacciones son siempre observadas, pues al parecer dependen del aislamiento de *Trichoderma*, del patógeno y de las condiciones del medio ambiente (Martínez et al., 2013).

2.3.3.3 Antibiosis

La antibiosis es la acción directa de los antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos. Algunos autores opinan que la antibiosis no debe de ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de la aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico. En la práctica uno de los antecedentes ha sido el caso de la aparición de cepas de *Agrobacterium radiobacter* Beijerinck y Van Del-den (Campbell R, 1989).

Trichoderma spp. es una fuente rica de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, generalmente los metabolitos volátiles inhiben el crecimiento de otros hongos sin hacer contacto físico, por ejemplo se ha detectado, una lactona volátil con aroma a coco, probablemente 6 pentil- α -pirona (6PAP) que inhibe el crecimiento de *Phytophthora*

nicotianae. Este metabolito volátil causo a nivel celular vacuolación, granulación, coagulación, desintegración y lisis. La 6 pentil- α -pirona (6PAP) producido por *Trichoderma* spp., inhibe el crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *F. subglutinans* y reduce su capacidad reproductiva (Hernández et al., 2011; Michel et al., 2004; Osorio et al., 2011; Stefanova et al., 2009) citado por (Muñoz Gonzales, 2015).

2.3.3.4 Actividad lítica

La lisis es el mecanismo en el cual intervienen las enzimas hidrolíticas producidas por los microorganismos antagonistas como factores biocontroladores. Se ha observado que *Trichoderma* spp, produce celulasas, glucanasas y quitinasas que degradan “in vitro” la celulosa de las paredes celulares de microorganismos oomycetes y la quitina B-1,3 glucanos de las paredes celulares de microorganismos Deuteromicetes (Elad et al., 1982) mencionado por (Tovar Castaño, 2008).

Desde un punto de vista práctico se ha encontrado que los aislamientos de *Trichoderma* eficaces en el control de patógenos vegetales son capaces de producir glucanasas, quitinasas y proteasas (Muñoz Gonzales, 2015).

2.3.3.5 Resistencia

Estudios recientes a niveles celular y molecular demostraron que algunas cepas de *Trichoderma* pueden activar un mecanismo nativo de defensa de las plantas, conocido como Inducción de Resistencia Sistémica (IRS). Esto supone que puedan controlar a patógenos distantes del lugar donde se encuentran físicamente el antagonista. Prueba de ello, fue que la colonización de las raíces de pepino con *T. asperellum*, indujo resistencia a *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans (Martinez, Barrios, Rovesti, & Santos, 2006).

2.3.3.6 Competencia por Nutrientes

La inanición es la causa más común de muerte para microorganismos, la competencia por nutrientes limitantes, resulta en un control biológico de hongos fitopatógenos, antagonistas y mico parásitos según Chet et al., 1997 mencionado por (Tovar Castaño, 2008).

Ciertas especies de *Trichoderma* se han manipulado, para hacerlas más competitivas en la rizosfera, lo que ha sido observado en mutantes – UV y por fusión de protoplasmas de *Trichoderma harziarum*. Estas cepas han mostrado una mejor capacidad de biocontrol en comparación con cepas del tipo silvestre o cepas padres (Guazzone et al., 2010).

CAPITULO III

3.1 Localización

3.1.1 Aspectos generales

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental de Sapecho (E.E.S.) y el laboratorio de Fitopatología en La Paz , dependientes de la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés, Sapecho se ubica al Norte del departamento de La Paz, en la región de Alto Beni (PDM, 2014).

3.1.2 Ubicación geográfica

La Estación Experimental se encuentra en el área II de la región de Alto Beni de la provincia Sud Yungas localidad de Sapecho a 15°33' Latitud Sur y 67° 20' Longitud Oeste, a 270 km del departamento de La Paz y a una altitud de 400 msnm (SENAMHI, 2018).

3.1.3 Características climáticas

3.1.3.1 Clima

El clima que presenta la zona, es tropical y subtropical, no obstante, es necesario mencionar que las precipitaciones pluviales y vientos, cambian el clima; las altitudes oscilan desde 1,900 m.s.n.m. como la máxima elevación y 405 m.s.n.m., como la mínima altitud en las terrazas aluviales y lugares de planicie. La precipitación pluvial anual varía desde 1000 – 2500 mm y la evaporización por transpiración real se calcula entre 800 a 1200mm (SENAMI, 2018).

3.1.3.2 Temperatura

La temperatura media anual es de aproximada 25.8 °C en promedio, en el mes de septiembre y los meses más calurosos se registran de octubre a diciembre con temperaturas máximas en promedio de 30,89 °C, mientras que los meses más fríos se registran de mayo a julio con temperaturas mínimas de 19,22°C en promedio (PDM, 2014).

3.1.4 Flora

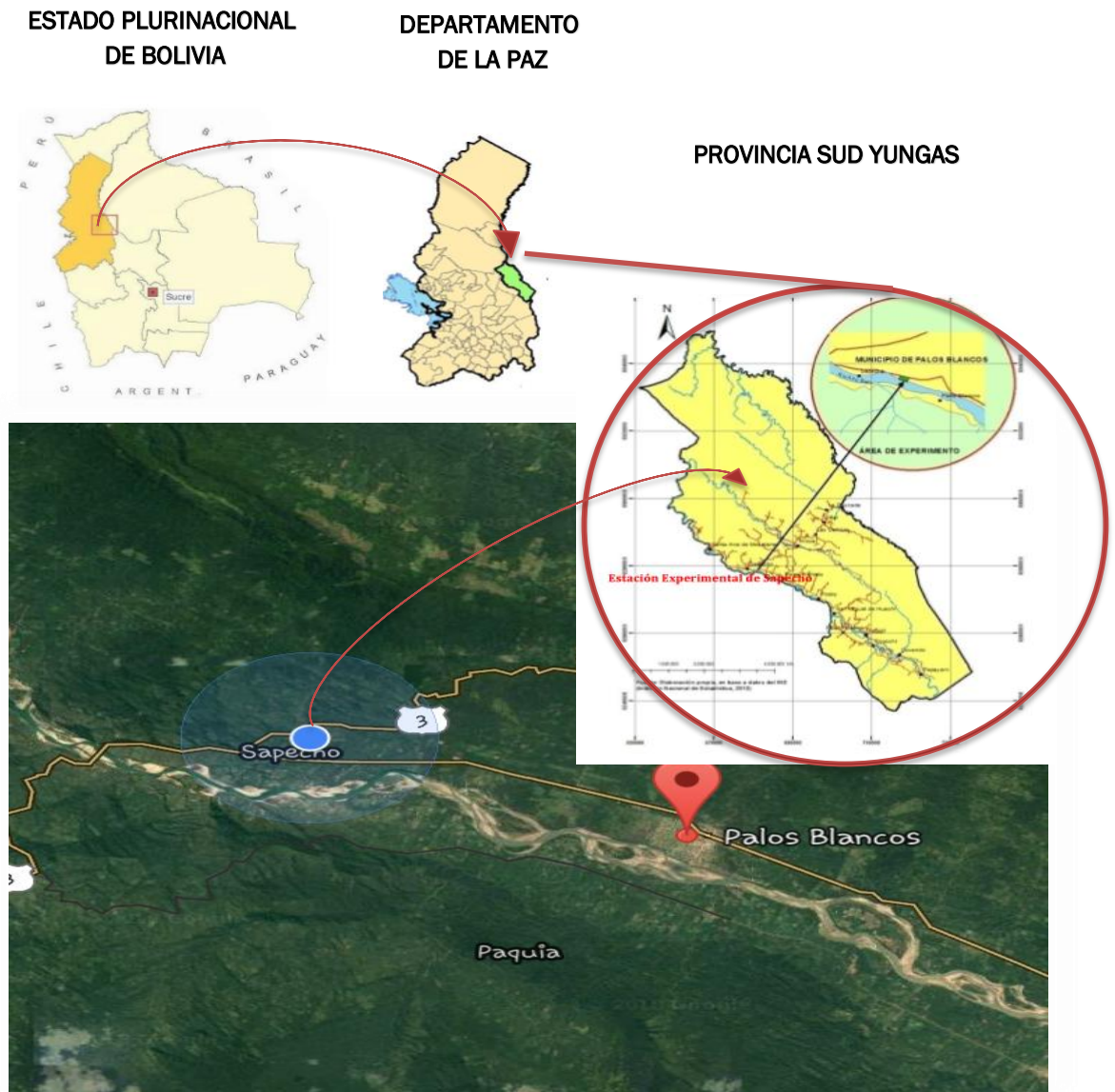
Se clasifican las zonas agroecológicas, identificando los tipos de vegetación que se presentan en las diferentes áreas, en función a los pisos altitudinales existentes, la flora es heterogénea y mixta, con especies de árboles y arbustos, que se mantienen siempre verdes, donde se han determinado dos zonas boscosas:

Bosque húmedo montañoso.

Bosque nublado perhúmedo.

En la zona se nota la existencia de plantas medicinales y aromáticas, sirviendo como una fuente de generación de recursos económicos para los pobladores de las zonas y para las personas con cualidades de medicina natural (PDM, 2014).

Figura 1. Ubicación Geográfica



3.1.5 Fauna

La fauna en la región es variada, se cuenta con algunas especies de mamíferos, entre los que destacan el jaguar (*Panthera onca*), el marimono (*Ateles paniscus*), el pejichi (*Priodontes maximus*), el manechi (*Alouatta seniculus*), el pato negro (*Cairina moschata*), la peta de río (*Podocnemis unifilis*), el caimán negro (*Melanosuchus niger*) y una rara especie del jucumari (*Tremarctus ornatus*) (PDM, 2014).

3.1.6 Suelos

Los suelos son variados y cambian bruscamente de acuerdo a la topografía, en las partes altas se encuentran suelos rocosos superficiales con poca retención de humedad; en las laderas, valles, pie de monte y llanura existen suelos diversos de textura liviana, mediana y pesada (PDM, 2014).

Así también, presentan una variación química de reacción ligeramente ácidos, neutros a ligeramente alcalina. Tienen moderada capacidad de intercambio de cationes y alta saturación de bases. La fertilidad natural es muy variable, pero se puede generalizar que tienen fertilidad moderada, con moderada presencia de potasio y fósforo y baja presencia de nitrógeno, con pH que varía de ligera a moderadamente alcalinos (PH =6,3–7,8).

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Microorganismos

Se utilizó dos aislamientos de *Trichoderma* el cual fue suministrado por el cepario del Departamento de Sanidad Vegetal de la Universidad – Estación Experimental de Sapecho, y un aislamiento procedente de aislamientos de cepas foráneas de Colombia.

Para las pruebas de antagonismo se evaluaron aislamientos del patógeno *Moniliophthora roreri* suministrados por el laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía de la Estación Experimental de Sapecho.

3.2.2 Material vegetal

Para el desarrollo de las pruebas de antagonismo “in vivo” se utilizaran cultivares de Cacao (*Theobroma cacao*) altamente susceptibles a los agentes patógenos *Moniliophthora roreri*, los cuales fueron debidamente identificados por el Ing. Casto Maldonado dentro de la Estación Experimental de Sapecho de la Universidad Mayor de San Andrés.

3.2.3 Elaboración del banco de trabajo de aislamientos de *Trichoderma spp*

Con el fin de determinar la estabilidad de las cepas durante el estudio y el mantenimiento de las condiciones iniciales, se realizó un banco de trabajo a partir de 2 aislamientos de *Trichoderma* que se encuentran conservados. A partir de los aislamientos, se realizaron repiques sobre agar papa dextrosa (PDA).

De cada uno de los aislamientos se preparó una suspensión con una concentración igual a 10⁸ esporas/ml, en un volumen final de 10ml en PBS. Esta suspensión se utilizó posteriormente como inóculo 10% para la fermentación discontinua de 24-48 horas, 100 rpm, y una temperatura de 25°C en medio papa dextrosa agar, en un volumen efectivo de trabajo de 50 ml.

La evaluación del crecimiento, viabilidad y evaluación de cada una de las cepas, se realizó mediante cultivo en placa, tinción con azul de lacto fenol y microcultivo.

3.2.4 Preparación del inóculo de aislamientos de *Trichoderma*.

Para evaluar el crecimiento libre de cada uno de los 3 aislamientos del antagonista, a partir de los aislamientos crecidos en tubos de vidrio, se realizó un repique en cajas de PDA hasta obtener un crecimiento radial de 90mm aproximadamente. Posteriormente se tomaron discos de 0.5cm de diámetro de zonas de crecimiento similares y serán sembradas sobre PDA (Cundom, et al, 2003).

Para cada cepa de *Trichoderma* en estudio se tomaron por triplicado datos sobre el crecimiento radial en mm a las 24, 48, 60 y 72h.

3.2.5 Preparación del inóculo de *Moniliophthora roreri*

Para la preparación del inóculo de *Moniliophthora roreri* se tuvieron en cuenta su crecimiento en agar papa dextrosa durante 7 días. El micelio del hongo se resuspendió en agua destilada esterilizada, hasta obtener 10³ UFC/ml en PDA.

3.2.6 Prueba de antagonismo in-vitro

Previo al enfrentamiento del patógeno y el antagonista *Trichoderma* spp, se evaluó el crecimiento libre en el centro de la caja de Petri con agar PDA del patógenos *Moniliophthora roreri* y los dos aislamientos del antagonista *Trichoderma* spp. Se inoculó por triplicado en cada caso equidistante dos partes de *Trichoderma* y otras dos de *Moniliophthora*.

3.2.6.1 Elaboración de la prueba de antagonismo

Para determinar la capacidad antagonista de los diferentes aislamientos de *Trichoderma*, sobre el patógeno *Moniliophthora roreri*, se aplicó un diseño completamente al azar, con tres repeticiones. La unidad experimental correspondió a una caja de Petri con agar PDA.

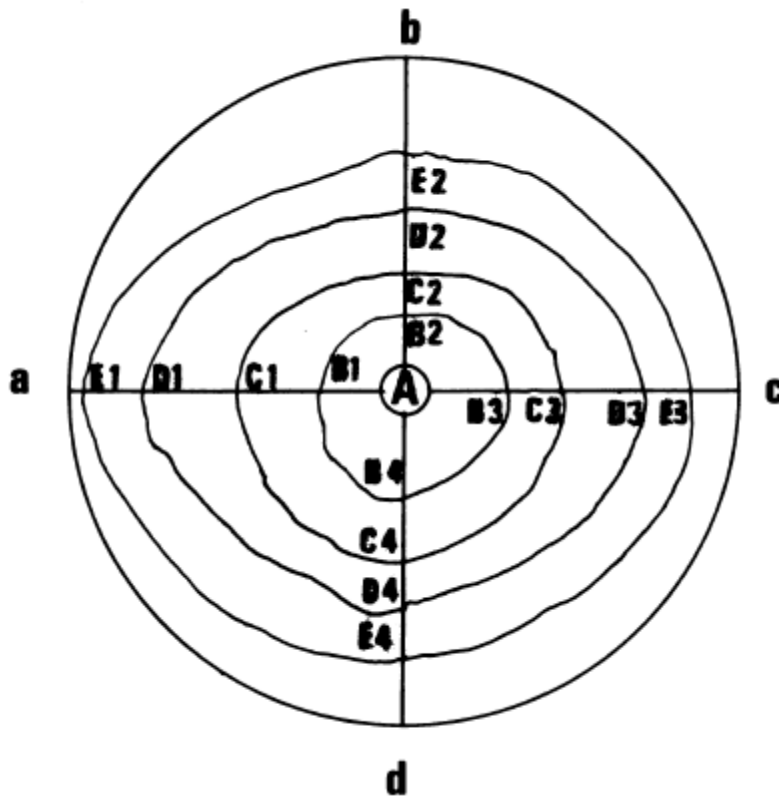
Para las pruebas de enfrentamiento se tomarán discos de 0,5cm de diámetro obtenidos a partir de propágulos del patógeno (crecimiento libre) y se sembraron en la superficie de las cajas de Petri con PDA, a un centímetro del borde de la caja (Cundom, et al., 2003).

Este procedimiento se realizó por triplicado. Después de 24 horas de incubación a una temperatura de 28°C el patógeno *Moniliophthora roreri* fue sembrado a 1cm del borde de la caja y en oposición un disco de 0,5cm de diámetro del antagonista (Cundom, et al., 2003).

3.2.6.2 Medición del ritmo de crecimiento del hongo

Primero se dibujó sobre el envés de la placa una cruz marcando el centro, luego se marca los cuatro radios con una letra. Se inocula el hongo, se incuba hasta observar avance definitivo del hongo y se marcó el punto de avance sobre los cuatro radios marcados en la placa, esto se hizo cada vez que se realizó la medición del incremento del hongo en crecimiento. El ritmo promedio de crecimiento se calcula dividiendo el incremento total por el tiempo (French, 1980).

Figura 2. Fondo de una placa con las marcas realizadas para observaciones de crecimiento



3.2.6.3 Evaluación de la capacidad antagonista “in vitro”

En la prueba cuantitativa se empleó la evaluación del potencial inhibitorio micelial. Se calcularon los valores para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM) según la fórmula:

$$\text{PICM} = \frac{\text{Mb} - \text{Ma}}{\text{Mb}} * 100$$

Dónde:

Ma = Micelio del fitopatógeno inhibido

Mb = Micelio del fitopatógeno con crecimiento libre

En la prueba cualitativa se compararon las cepas teniendo en cuenta la capacidad antagonista, de acuerdo con la escala propuesta por BELL y colaboradores citado por Pérez (2004), mencionado por (Suarez & Cabrales, 2008).

Cuadro 1: Escala propuesta por Bell y colaboradores

Nivel de antagonismo	CUALIFICACIÓN
1	El antagonista crece totalmente sobre el fitopatógeno.
2	El antagonista crece sobre las 2/3 partes de la caja de cultivo, inhibiendo el crecimiento y desarrollo del fitopatógeno.
3	El antagonista y el fitopatógeno ocupan espacios iguales en la caja de cultivo, observándose que no hay competencia entre ellos.
4	El fitopatógeno crece sobre las 2/3 partes de la caja de cultivo, inhibiendo el crecimiento y desarrollo del antagonista.
5	El fitopatógeno crece totalmente sobre el antagonista.

3.2.7 Prueba de antagonismo in-vivo

Esta prueba se llevará a cabo bajo condiciones de campo en donde se identificaran cultivares susceptibles al ataque de *Moniliophthora roreri* los cuales serán marbeteados. Se utilizará el mejor aislamiento *Trichoderma* en la prueba dual y se pondrá testigos para su evaluación.

3.2.7.1 Incubación del sustrato

Las bolsas inoculadas son llevadas a la sala de germinación la cual tiene una temperatura de 24 °C a 27 °C, incubándose en oscuridad los primeros 3 días para favorecer el desarrollo del micelio. Al segundo día de incubación, las bolsas son agitadas suavemente para favorecer la oxigenación de todo el sustrato y son dejadas de 5 a 8 días hasta completar la esporulación.

3.2.8 Tratamientos

Para la aplicación de los diferentes tratamientos, se usarán las mochilas aspersores con motor de 20 litros, para no tener ningún efecto entre los tratamientos, trabajamos con dos mochilas, para el testigo (T1), para biológico *Trichoderma* sp (T2, T3).

T1: Testigo (Aplicación con agua)

T2: Dosis de esporas 300 gr 10⁸

T3: Dosis de esporas 200 gr 10⁷

3.2.9 Aspersión foliar

Se prepararán las soluciones a aplicarse en la parcela adicionando un adherente (BIOL) para mejorar la eficiencia de la *Trichoderma*, con la motoaspersora se procedió a la aplicación en el follaje y mazorcas de cacao a los tratamientos.

Dosis: 200 gramos de *Trichoderma harzianum* por 20 litros de agua.

Dosis: 300 gramos de *Trichoderma harzianum* por 20 litros de agua.

El tiempo de intervalo de la aplicación será de 15 días, durante 3 meses.

3.2.10 Diseño experimental.

El diseño experimental empleado fue de bloques al azar propuesto por Calzada (1985), con tres tratamientos y tres repeticiones, con diez y seis plantas como unidad experimental.

3.2.10.1 Modelo estadístico

$$\gamma_{ij} = \mu + \beta_j + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

γ_{ij} = Una observación cualquiera

μ = Media poblacional

β_j = Efecto del j - ésimo bloque

α_i = Efecto del i - ésimo tratamiento

ϵ_{ij} = Error experimental

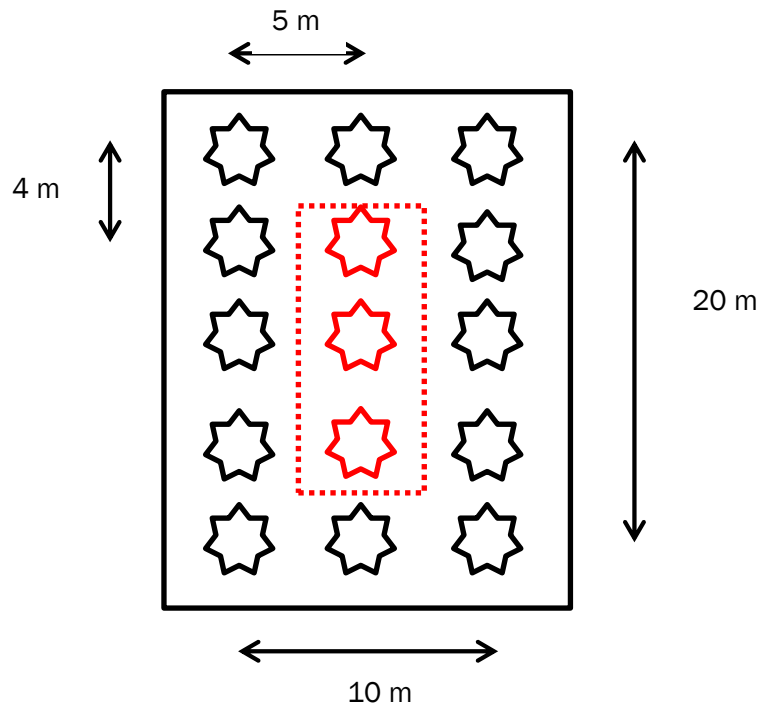
3.2.10.2 Unidad experimental

Se tendrá en total 12 unidades experimentales, con tres tratamientos y cuatro repeticiones, la parcela tendrá 2.025 m² (45 X 45 m).

Croquis del experimento

La unidad experimental estuvo constituida por una parcela bruta y una parcela neta. La parcela bruta fue de 15 árboles, de los cuales se tomaron tres centrales y en ellos realizaron las mediciones.

Figura 3. Unidad experimental dentro el cultivo del cacao



3.2.10.3 Variables de estudio

Con el fin de evaluar la capacidad antagonista del aislamiento más eficiente de *Trichoderma* en la prueba “in vitro” frente a *Moniliophthora roreri* en plantas de cacao, se tomarán cada 15 días registros de:

Incidencia de la enfermedad (% plantas vivas).

Severidad de la enfermedad (% plantas enfermas).

Síntomas: Amarilla miento, marchitamiento, necrosis de tejidos.

Los tratamientos control corresponden a:

Control de infección: Plantas con el patógeno *Moniliophthora roreri*.

Control de crecimiento: Plantas sin patógeno ni antagonista.

Control *Trichoderma*: Plantas con el aislamiento.

Con los valores obtenidos durante el estudio para las variables medibles se llevará a cabo un análisis de varianza ANOVA y la comparación entre los tratamientos mediante la prueba de tukey, tanto para los análisis “in Vitro” como para los “in vivo”.

CAPITULO IV

4.1 Resultados y discusiones

4.1.2 Medición del ritmo de crecimiento de dos cepas de *Trichoderma* y *Moniliophthora roreri*

Una vez aisladas y refrescadas las cepas de *Trichoderma harziarum*, *Trichoderma viride* y *Moniliophthora roreri*, se procedió a medir su ritmo de crecimiento bajo el método propuesto por (French, 1980), sometiendo a un DCA para realizar las comparaciones entre los ritmos de crecimiento realizándose la medición cada 24 Hrs.

4.1.2.1 Ritmo de crecimiento a las 24 Hrs

Transcurridos 24 horas después de la estabilización se tomaron los primeros datos de crecimiento obteniéndose el siguiente ANVA

Cuadro 2: Análisis de varianza del crecimiento de los hongos en estudio a las 24 Hrs.

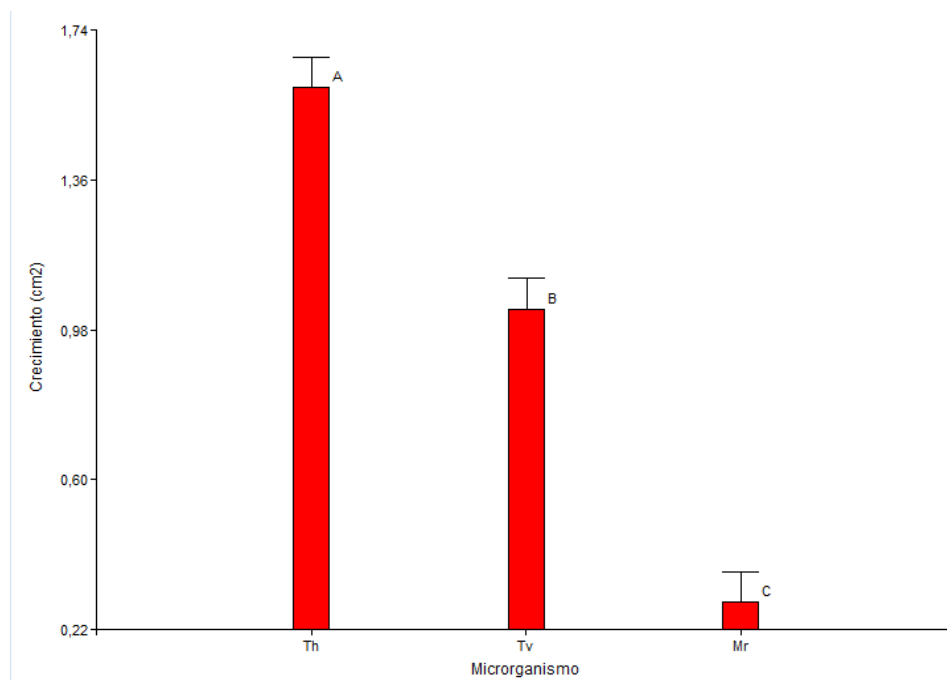
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5,12	2	2,56	71,62	<0,0001
Microorganismo	5,12	2	2,56	71,62	<0,0001
Error	0,54	15	0,04		
Total	5,65	17			

$$CV = 19,46$$

El ANVA nos muestra que existen diferencias altamente significativas entre las *Trichodermas* y *Moniliophthora*, siendo esto atribuible a que las *Trichodermas* tienen entre sus características un crecimiento rápido de su micelio, en cambio el patógeno tiene un crecimiento más lento, sin embargo tenemos un elevado CV de 19,46 para una prueba de laboratorio, esto se produjo debido a la dificultad para medir el área cubierta ya que estas eran muy pequeñas.

Al respecto Wardie et al mencionado por (Infante et al., 2002) indica que *Trichoderma* está biológicamente adaptado para una colonización agresiva de los sustratos y en condiciones adversas para sobrevivir, fundamentalmente en forma de clamidiosporas. la velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, debido a la riqueza de enzimas que posee, hacen que sea muy eficiente como saprófito y aún más como un agente de control biológico.

Figura 4. Comparación de medias con la prueba DUNCAN a un nivel de 0.05 %



La comparación de medias nos muestra que las dos *Trichodermas* tienen una velocidad de crecimiento muy rápida, siendo *Trichoderma harziarum* la más prolífica en relación a *Trichoderma viride*, dejando rezagado a *Moniliophthora roreri* precisamente por lo mencionado anteriormente, aspecto que confirma la prueba DUNCAN en donde nos muestra que estadísticamente todos los crecimientos son diferentes, variando entre 0,29 y 1,59 cm².

Al respecto Tarra, Zulia, & Se, (2006) indican que se ha determinado que el tiempo de incubación de *Moniliophthora roreri* es de 10 días a 28 °C en cámara de incubación.

4.1.2.2 Ritmo de crecimiento a las 96 Hrs

Transcurridos 4 días de la inoculación de los hongos, se realizó la toma de datos del crecimiento de micelios de los hongos dentro del medio de cultivo PDA en condiciones “in vitro”, obteniéndose el siguiente ANVA.

Cuadro 3: Análisis de varianza del crecimiento de los hongos en estudio a las 96 Hrs.

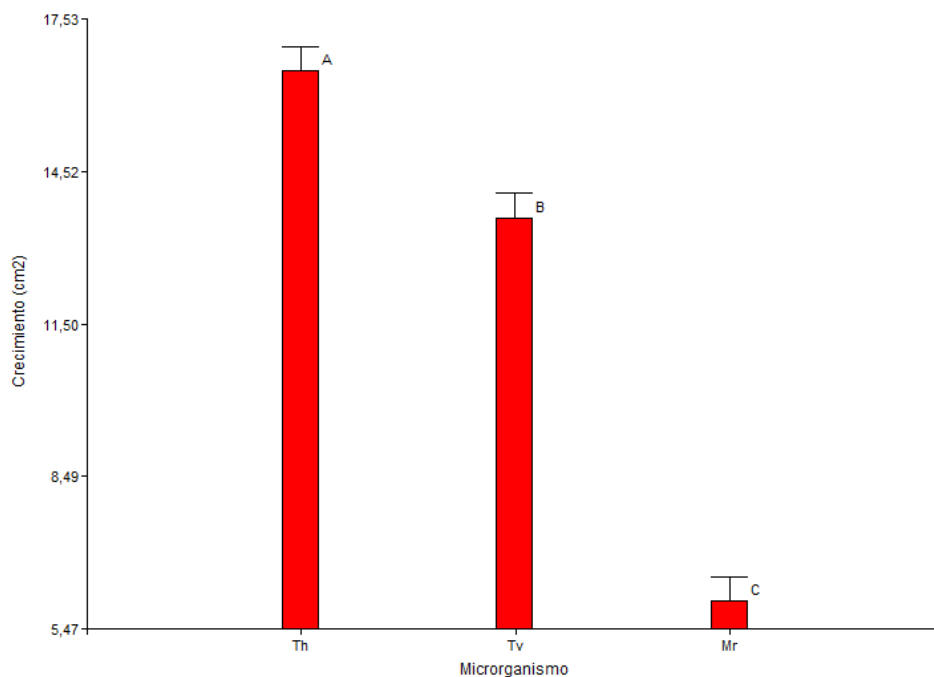
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	351,54	2	175,77	127,06	<0,0001
Microorganismo	351,54	2	175,77	127,06	<0,0001
Error	20,75	15	1,38		
Total	372,29	17			

CV = 9,77

A las 96 horas el ANVA nos muestra una alta significancia entre los microorganismos, mostrando estos un crecimiento constante y que corrobora a la primera medición, como el radio del micelio ya se encontraba más grande se pudo realizar la medición con mayor facilidad dándonos una mejor exactitud, reflejándose esto en que el CV se redujo a 9,77 estando dentro de los rangos aceptados, lo que nos demuestra que el experimento está correctamente conducido.

Al respecto (Samuels, (1996) mencionado por Mayo (2017) indica que los hongos del género *Trichoderma* crecen rápidamente a una temperatura de 25 y 30 ° C, y reducen su velocidad conforme aumenta la temperatura, deteniendo su desarrollo a partir de los 35 ° C. Las colonias cuando están en un medio papa-dextrosa-agar (PDA) el micelio es de una tonalidad blanca pasados unos días se vuelve de color amarillo o verde en sus distintas tonalidades o seguir con sus tonalidades blanquecinas.

Figura 5. Comparación de medias con la prueba DUNCAN a un nivel de 0.05 % a los 96 días



La comparación de medias realizada la prueba DUNCAN nos indica que estadísticamente existen diferencias significativas entre todos los microorganismos evaluados, quedándose rezagado *Moniliophthora* con 6.02 cm², que se puede justificar que no es un hongo muy agresivo en condiciones in vitro, sin embargo, para fines de nuestra investigación se ha

adaptado y logrado desarrollar en el medio PDA, si bien teniendo un crecimiento lento este tiene un buen desarrollo dentro de la caja Petri.

Según Enrique, Orlando, & Edgar, (2012), el crecimiento de *M. roreri* en medio PDA fue muy lento, característica que resulta una gran ventaja para la conservación de las cepas, bajo condiciones de laboratorio. La velocidad de crecimiento de los aislamientos fue de 2,8 mm cada tres días de incubación.

4.1.2.3 Ritmo de crecimiento a las 192 Hrs

Transcurridos 192 Hrs (8 días) de la inoculación de los hongos se realiza la última medición puesto que *Trichoderma harziarum* casi ha invadido toda la caja Petri, haciendo imposible realizar más comparaciones estadísticas, obteniéndose el siguiente ANVA.

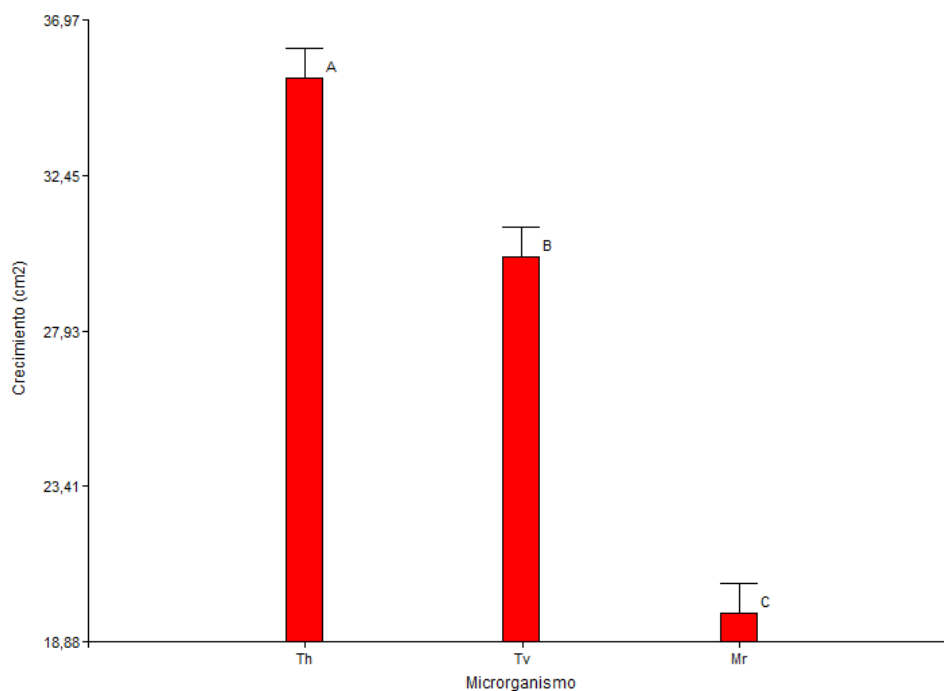
Cuadro 4: Análisis de varianza del crecimiento de los hongos en estudio a las 192 Hrs.

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	754,25	2	377,12	83,76	<0,0001
Microorganismo	754,25	2	377,12	83,76	<0,0001
Error	67,54	15	4,50		
<u>Total</u>	<u>821,78</u>	<u>17</u>			

CV = 7,48

El cuadro de ANVA a las 192 horas nos indica que existe una alta significancia entre microorganismos y el modelo, siendo estos relacionados con los anteriores análisis de varianza, siendo en este caso el coeficiente de variación de 7,48 que nos indica que el ensayo ha sido conducido eficientemente.

Figura 6. Comparación de medias con la prueba DUNCAN a un nivel de 0.05 % a los 192 días



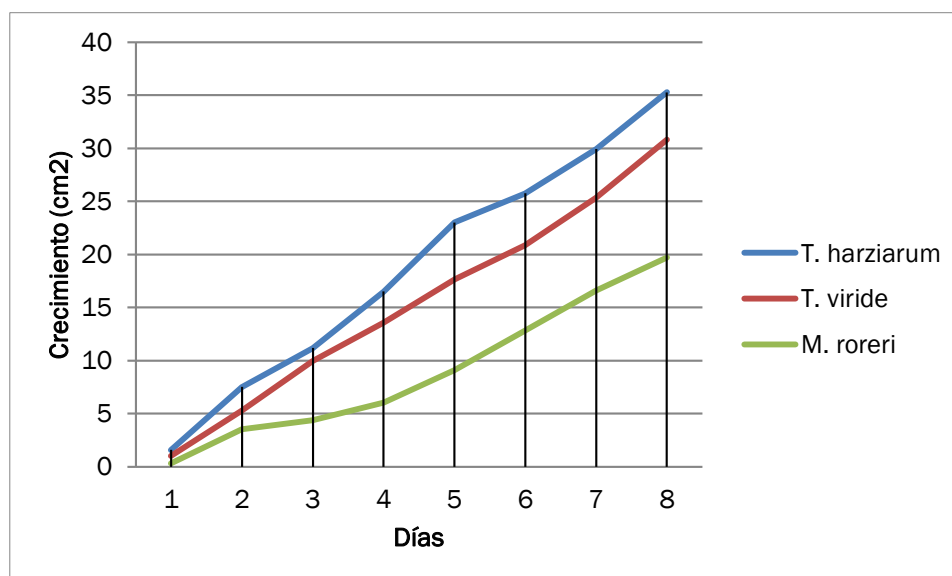
Al octavo día de evaluación de crecimiento *Trichoderma harziarum* ha alcanzado casi a cubrir la caja Petri alcanzando un valor de 35 cm², seguido por *Trichoderma viride* el cual alcanzó un promedio de crecimiento de 30 cm², quedando *Moniliophthora* con un crecimiento de 19 cm², así mismo la prueba DUNCAN nos indica que todos los microorganismos son estadísticamente diferentes.

Al respecto Howell, (2003) mencionado por Mayo, (2017) indica que la competencia por nutrientes con el fitipatógeno es otra interacción habitual. *Trichoderma* es un excelente competidor por espacio y recursos naturales ya que al encontrarse en una gran cantidad de habitats posee mejores mecanismos de adaptación al medio siendo así un excelente agente de biocontrol.

4.1.3 Velocidad de crecimiento de *Trichodermas* y los patógenos

Uno de los factores importantes es el conocer la velocidad de crecimiento que presentaron *T. harziarum*, *T. viride* y *M. roreri*, la cual se obtuvo del crecimiento medio de las diferentes repeticiones de donde se pudo extraer la siguiente gráfica.

Cuadro 5. Comparación gráfica de las medias de crecimiento de los microorganismos



La gráfica nos muestra que en el transcurso de los días las dos Trichodermas presentan crecimientos similares, sin embargo la cepa de Trichoderma harzianum al final de los ocho días tiene 5 cm² más de crecimiento, en contraposición Moniliophthora roreri por su crecimiento lento se queda rezagado con 15 cm² con relación al primero, lo que nos hace notar que su avance dentro del cultivo dual también será paulatino. Bajo estos parámetros se calculó la velocidad de crecimiento de los microorganismos analizados.

Cuadro 6. Velocidades medias encontradas de los microorganismos

Micoorganismo	Velocidad	Unidad
<i>T. harzianum</i>	5,00	mm/día
<i>T. viride</i>	4,38	mm/día
<i>M. roreri</i>	3,5	mm/día

Fuente propia

4.1.3 Prueba dual entre *Trichoderma harzianum* vs *Moniliophthora roreri*

4.1.3.1 Ritmo de crecimiento de la prueba dual a las 48 Hrs.

A las 48 Hrs de iniciada la prueba dual se realizó una lectura de crecimiento de los hongos, la cual nos arrojó el siguiente ANVA.

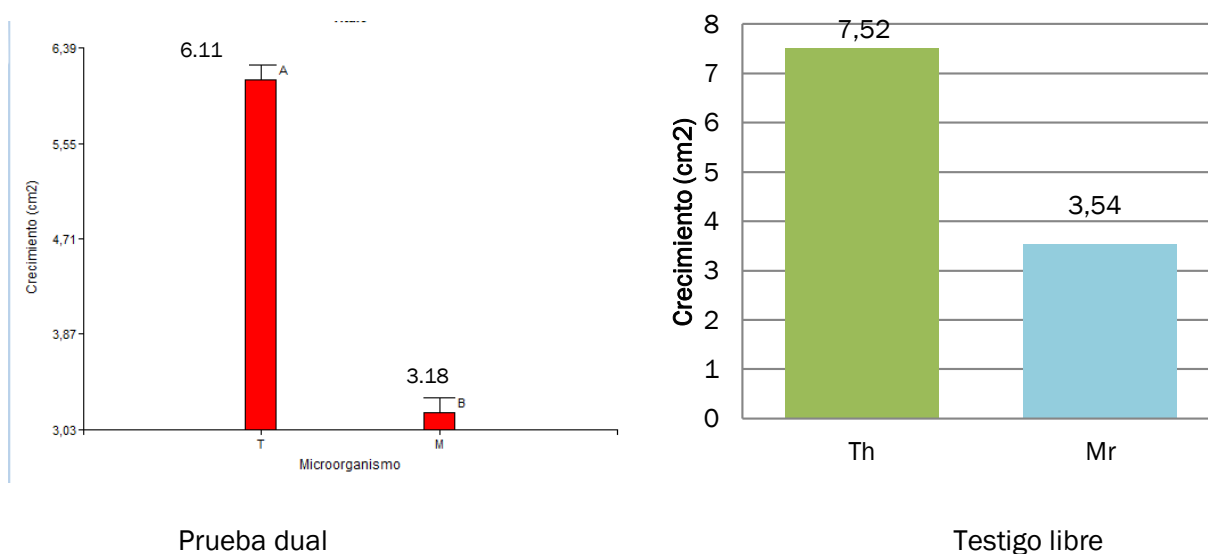
Cuadro 7: Análisis de varianza del crecimiento de los hongos en cultivo Dual a las 48 Hrs

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	21,43	1	21,43	268,16	<0,0001
Microorganismo	21,43	1	21,43	268,16	<0,0001
Error	0,64	8	0,08		
Total	22,07	9			

CV = 6.08

El ANVA nos muestra que el crecimiento tiene un ritmo regular evaluado en un principio, mostrando una alta significancia entre los microorganismos y el modelo, con un coeficiente de variación de 6.08 adecuado para condiciones controladas de laboratorio.

Figura 7. Comparación de crecimiento de la prueba dual con relación a los testigos



Realizada la prueba DUNCAN nos muestra que ambos hongos tienen una diferencia significativa en cuanto a sus crecimientos, la comparación del crecimiento con el testigo nos muestra que *Moniliophthera* tiene un crecimiento regular, mientras que *T. harziarum* con relación al testigo bajo su crecimiento un poco mas de 1 cm², lo que puede deberse al nuevo preparado de PDA en donde el hongo patógeno se adoptó con mayor rapidez, sin embargo esta diferencia tambien puede deberse a la medición de áreas dentro de las cajas Petri, no siendo significativa la misma.

4.1.3.2 Ritmo de crecimiento de la prueba dual a las 120 Hrs.

A las 120 Hrs, de la prueba dual se han registrado los datos de crecimiento de los hongos en cultivo dual evaluados con un DCA, en donde los datos nos muestran el siguiente ANVA.

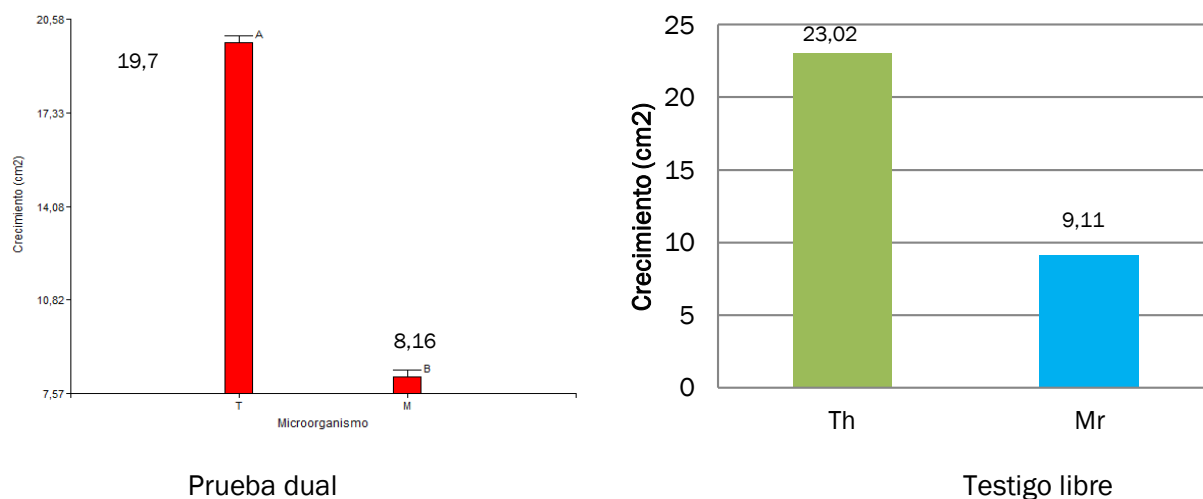
Cuadro 8. Análisis de varianza del crecimiento de los hongos en cultivo Dual a las 120 Hrs

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	336,98	1	336,98	1372,63	<0,0001
Microorganismo	336,98	1	336,98	1372,63	<0,0001
Error	1,96	8	0,25		
Total	338,94	9			

CV = 3.55

El ANVA a los 120 Hrs muestra una diferencia altamente significativa entre los microorganismos evaluados aspecto que se repite durante todo el ensayo por las velocidades de crecimiento de ambos hongos, el coeficiente de variación es 3,55 que nos muestra que el experimento tiene una alta confiabilidad.

Figura 8. Comparación de crecimiento de la prueba dual con relación a los testigos a las 120 Hrs



En principio la gráfica nos muestra que ambos hongos muestran ser diferentes estadísticamente a la prueba DUNCAN, la comparación con el testigo libre que *T. harziarum* bajo el cultivo dual muestra un retraso considerable casi en 4 cm² aspecto que puede justificarse indicando que en este punto ya se han encontrado ambos hongos y están compitiendo por el espacio y nutrientes, Trichoderma también está emitiendo en este punto encinas que están impidiendo el avance de Moniliophthora el que ha rebajado su crecimiento con relación al testigo libre en 1 cm², porque ya Trichoderma lo está rodeando paulatinamente, cabe mencionar también que en este punto Moniliophthora detuvo completamente su crecimiento.

Al respecto (Suarez, 2006) mencionado por (Enrique et al., 2012) indica que en condiciones in vitro, ha sido posible identificar microorganismos con potencial para el biocontrol de las enfermedades en el cultivo del cacao, lo anterior permite inferir que existe la posibilidad de encontrar agentes que efectivamente controlen *M. royeri* bajo condiciones de campo.

4.1.3.3 Evaluación de la capacidad antagonista “in vitro” entre *T. harziarum* y *M. royeri*

Entonces con los datos que se cuentan se aplicó la fórmula para evaluar la capacidad antagonista en donde se tiene que:

En cultivo dual *M. royeri* ha crecido 8,16 cm², comparado con un crecimiento libre donde ha alcanzado 19.71 cm², entonces para fines de cálculo se estima que no pudo crecer 11,55 cm², con estos datos se aplica la fórmula:

$$\text{PICM} = \frac{\text{Mb} - \text{Ma}}{\text{Mb}} * 100$$

Dónde:

Ma = Micelio del fitopatógeno inhibido

Mb = Micelio del fitopatógeno con crecimiento libre

Entonces:

$$\text{PICM} = \frac{19.71 - 11.55}{19.71} * 100$$

$$\text{PICM} = 58.60 \%$$

Entonces el porcentaje de inhibición de crecimiento de micelio es 58.60 % lo que equivale a 11.55 cm², el cual fue inhibido por la presencia de *Trichoderma* que por su mayor virulencia y rápido crecimiento evita que el patógeno pueda seguir avanzando dentro del medio de cultivo, este fenómeno también debería ocurrir en condiciones naturales evitando el avance y esporulación de *M. royeri*, deteniendo de esta manera el ciclo patogénico de la enfermedad.

Por otra parte, se confirmó en posteriores días que *T. harziarum* logra invadir totalmente el micelio de *M. roreri* ocupando todo el espacio dentro de la caja Petri, de esta manera según la escala de Bell se lo clasifica en un nivel de antagonismo de 1.

Al respecto (Corrêa et al., 2007) indica que los resultados de la actividad antagónica de las cepas de *Trichoderma* por el método de cultivo dual todas las cepas inhibieron el crecimiento del hongo patógeno, en la proporción de 18.97 hasta 44.12 % comparado con el crecimiento del testigo, presentaron actividad antagónica y parasítica más elevada, al mostrar una colonización total sobre *S. rolfsii* a las 120 hrs.

4.1.4 Prueba dual entre *Trichoderma viride* vs *Moniliophthora roreri*

4.1.4.1 Ritmo de crecimiento de la prueba dual a las 48 Hrs.

Establecido el cultivo dual con *Trichoderma viride* y *M. roreri*, se ha realizado la medición del crecimiento micelial de ambos hongos a las 48 Hrs y realizado un ANVA que se presenta a continuación.

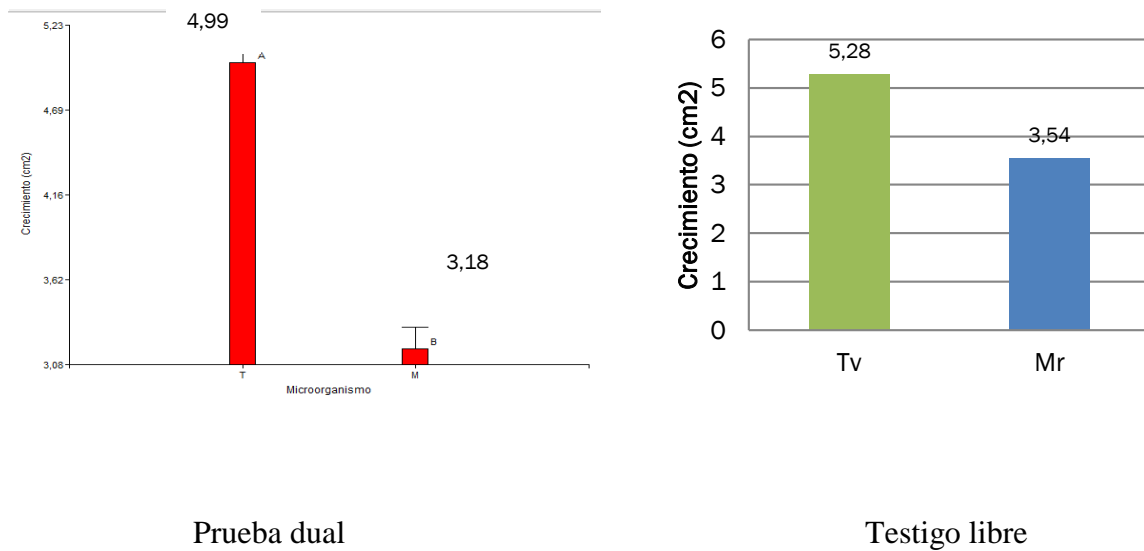
Cuadro 9. Análisis de varianza del crecimiento de los hongos en cultivo Dual a las 48 Hrs

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8,17	1	8,17	83,38	<0,0001
Microorganismo	8,17	1	8,17	83,38	<0,0001
Error	0,78	8	0,10		
<u>Total</u>	<u>8,96</u>	<u>9</u>			

CV = 7.66

El ANVA nos muestra que existe una diferencia altamente significativa entre microorganismos y el modelo, el coeficiente de variación tiene un valor de 7.66 que nos muestra que el experimento fue correctamente conducido.

Figura 9. Comparación de crecimiento de la prueba dual con relación a los testigos a las 48 Hrs



La prueba DUNCAN nos muestra que existen diferencias significativas entre los dos hongos, realizada la comparación con los testigos libres se puede apreciar que ambos crecimientos están correlacionados estando muy cerca uno del otro lo que nos indica que están creciendo a un ritmo similar a su crecimiento libre.

4.1.4.2 Ritmo de crecimiento de la prueba dual a las 144 Hrs.

A los seis días de la prueba dual se realizó la última medición del área de crecimiento de los hongos, sometiéndolos luego a un DCA en donde nos muestra los siguientes resultados.

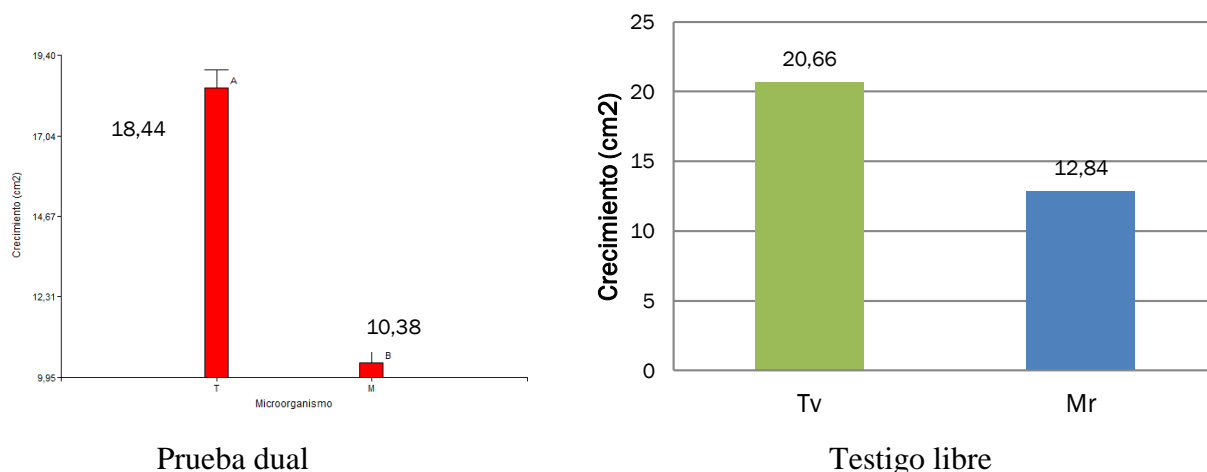
Cuadro 10. Análisis de varianza del crecimiento de los hongos en cultivo Dual a las 144 Hrs

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	162,49	1	162,49	114,14	<0,0001
Microorganismo	162,49	1	162,49	114,14	<0,0001
Error	11,39	8	1,42		
Total	173,88	9			

CV= 8.28

El ANVA nos refleja como en los anteriores casos diferencias altamente significativas en el crecimiento de ambos hongos evaluados, así mismo el coeficiente de variación está en el rango de 8.28 que nos indica que los datos son confiables.

Figura 10. Comparación de crecimiento de la prueba dual con relación a los testigos a las 144 Hrs.



La prueba DUNCAN nos muestra diferencia significativa entre tratamientos lo que se expresa en la gráfica, realizando la comparación con el testigo libre encontramos en este punto que ambos han rebajado su nivel de crecimiento a los seis días aproximadamente en 2 cm², lo cual pudo deberse a que ambos micelios se encontraron en este punto, rodeándose uno al otro demostrando que *Trichoderma viride* inhibe el crecimiento del micelio evitando su avance dentro de la caja Petri.

4.1.4.3 Evaluación de la capacidad antagonista “in vitro” entre *T. viride* y *M. roleri*

Entonces con los datos que se cuentan se aplicó la fórmula para evaluar la capacidad antagonista en donde se tiene que:

En cultivo dual *M. roleri* ha crecido 9.37 cm², comparado con un crecimiento libre donde ha alcanzado 19.71 cm², entonces para fines de cálculo se estima que no pudo crecer 10.34 cm², con estos datos se aplica la fórmula:

$$\text{PICM} = \frac{\text{Mb} - \text{Ma}}{\text{Mb}} * 100$$

Dónde:

Ma = Micelio del fitopatógeno inhibido

Mb = Micelio del fitopatógeno con crecimiento libre

Entonces:

$$\text{PICM} = \frac{19.71 - 10.34}{19.71} * 100$$

$$\text{PICM} = 52.46 \%$$

Entonces el porcentaje de inhibición de crecimiento de micelio es 52.46 % lo que equivale a 10.34 cm², el cual fue inhibido por la presencia de *Trichoderma* que por su mayor virulencia y rápido crecimiento evita que el patógeno pueda seguir avanzando dentro del medio de cultivo.

Por otra parte, se verificó en posteriores días que *T. viride* no logra invadir el micelio de *M. royeri* evitando su avance, pero no pudiendo ocupar el espacio ganado por *M. royeri* dentro de la caja Petri, de esta manera según la escala de Bell se lo clasifica en un nivel de antagonismo de 2.

Al respecto (Infante et al., 2002), indica que la competencia constituye un mecanismo de antagonismo importante. Se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente de control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado los factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros.

4.1.5 Prueba “in vivo” de *Trichoderma harziarum* para control de *Moniliophthora royeri*

4.1.5.1 Incidencia de la enfermedad a los 15 días después de la aplicación

Para fines de evaluación se ha tomado una incidencia después de los primeros 15 días posterior de la primera aplicación, puesto que cuando se aplicó el producto la parcela había tenido una poda sanitaria la cual eliminó todas las fuentes de inóculo de la enfermedad de las plantas, los resultados fueron sometidos a un DBA posteriormente analizados con el programa INFOSTAT el cual no dio el siguiente ANVA.

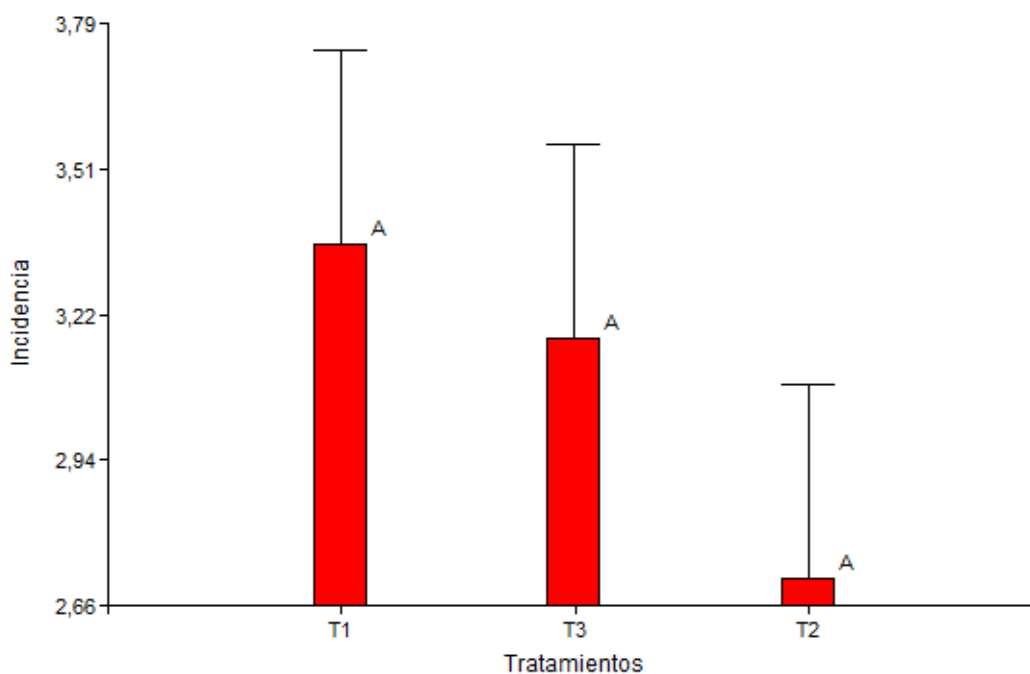
Cuadro 11. Análisis de varianza de la incidencia a los primeros 15 días después de la aplicación

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,70	4	0,17	0,40	0,7989
Bloques	0,02	2	0,01	0,03	0,9747
Tratamientos	0,67	2	0,34	0,78	0,5164
Error	1,72	4	0,43		
<u>Total</u>	<u>2,42</u>	<u>8</u>			

CV = 21.28

El cuadro de ANVA nos indica que no existen diferencias significativas entre las incidencias iniciales, esto debido a que la enfermedad después de la poda se está comenzando a establecer nuevamente dentro de la parcela.

Figura 11. Comparación de medias de incidencia después de los 15 días de aplicación



La prueba DUNCAN nos muestra que estadísticamente no existen diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo hay que considerar que la época de lluvias se retrasó y recién llovió la última semana después de la aplicación, lo que cumpliendo las condiciones para el desarrollo de patógenos aceleró la presencia y activo al mismo tiempo su ingreso a las mazorcas, debido a esto podemos apreciar que en el Testigo (T1) se puede apreciar una mayor incidencia de la enfermedad, diferenciándose de los tratamientos donde se ha asperjado *Trichoderma*.

4.1.5.2 Incidencia de la enfermedad a los 75 días después de la aplicación

Después de transcurridos 15 días a la última aplicación, esto es a los 75 días se realiza la evaluación de la incidencia final dentro de nuestras unidades experimentales siendo luego sometidas al programa INFOSTAT en donde nos muestra el siguiente ANVA.

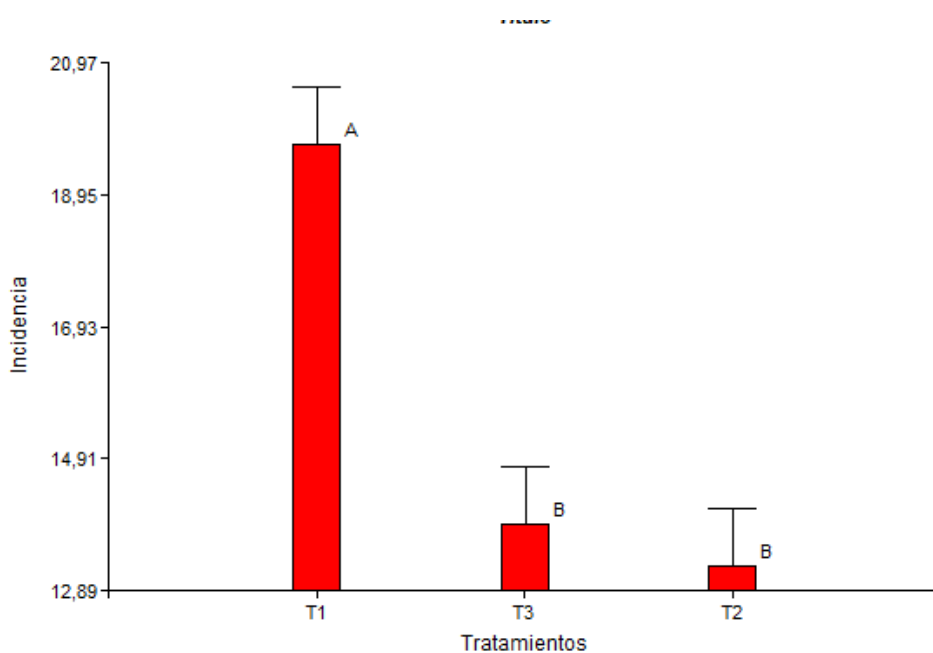
Cuadro 12. Análisis de varianza de la incidencia a los 75 días después de la aplicación

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	85,58	4	21,39	9,17	0,0271
Tratamientos	75,91	2	37,96	16,27	0,0120
Bloques	9,67	2	4,83	2,07	0,2412
Error	9,33	4	2,33		
Total	94,91	8			

CV = 9.77

El resultado del ANVA nos indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, así mismo el coeficiente de variación muestra que el experimento ha sido conducido adecuadamente.

Figura 12. Comparación de medias de incidencia después de los 75 días



La prueba DUNCAN nos muestra que existen diferencias entre el Testigo (T1) y los tratamientos con Trichoderma, siendo estos aproximadamente de un orden del 6 % logrando

entonces reducir la presencia de *Moniliophthora* en las mazorcas en el mencionado porcentaje, cabe hacer notar que durante el mes de enero hubo una concentración de lluvias siendo que en solo dos días llovió como 2000 mm, situación que aportó para el avance de la enfermedad dentro de las mazorcas, así mismo la poca lluvia entre diciembre y enero como posterior a las lluvias de febrero provocaron que la incidencia en general en esta gestión agrícola no sea muy grande.

Tomando en cuenta estas consideraciones podemos decir en cuanto a la incidencia que el T2 (300 gr de Trichoderma) fue el que mejor resultados tuvo, aunque son estadísticamente similares con el T3 (200 gr de Trichoderma).

4.1.5.3 Evaluación de la severidad de la enfermedad a los 15 días después de la aplicación

La severidad de la enfermedad dentro de las mazorcas se la fue midiendo por la presencia de sintomatología típica de la enfermedad, en donde se tomaron en cuenta la presencia de jivas o protuberancias, amarillamientos de la cáscara, presencia de manchas negras o ya presencia de las estructuras reproductivas del hongo, según estos síntomas posteriormente se la somete al programa INFOSTAT para el análisis de los datos encontrándose el siguiente ANVA.

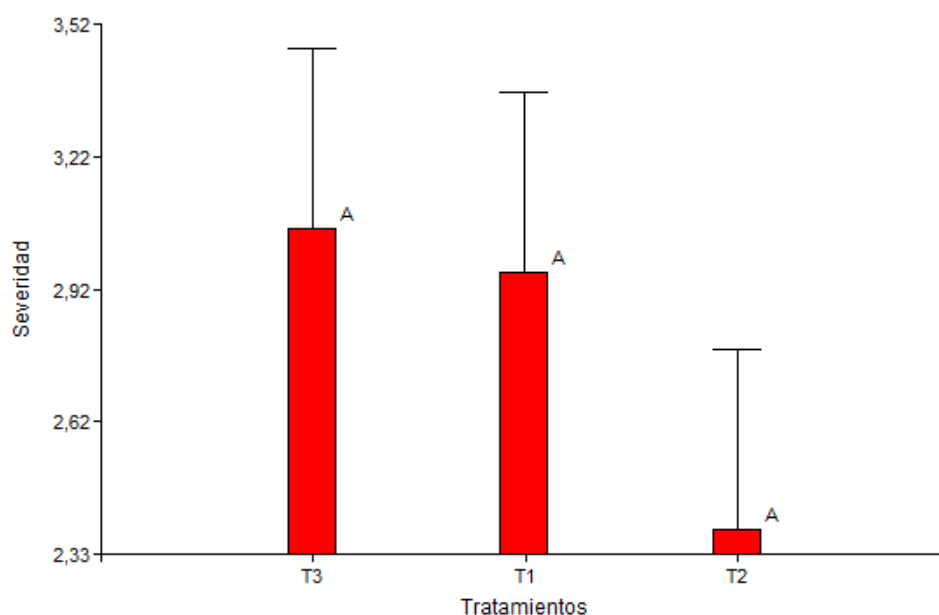
Cuadro 13. Análisis de varianza de la severidad a los 15 días después de la aplicación

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,08	4	0,52	1,05	0,4824
Bloques	1,27	2	0,63	1,28	0,3718
Tratamientos	0,81	2	0,40	0,82	0,5044
Error	1,98	4	0,50		
<u>Total</u>	<u>4,06</u>	<u>8</u>			

CV = 25.14

El análisis del ANVA nos indica que no hay diferencia estadística entre los tratamientos ni los bloques, siendo que en estos primeros días la enfermedad se encontraba colonizando a las mazorcas, así mismo el coeficiente de variación se encuentra en un rango de 25.14 que nos indica que los datos obtenidos son confiables.

Figura 13. Comparación de medias de incidencia después de los 15 días



El prueba de DUNCAN nos presenta que las muestras no tienen diferencias estadísticas entre sí, lo que puede explicarse por la reciente colonización de las mazorcas en donde el patógeno al haber invadido a este primero se desarrolla internamente dentro del fruto, para posteriormente recién manifestar los síntomas externos, así también este retraso en la infección fue contribuida por la falta de lluvia entre los meses de diciembre a enero.

4.1.5.4 Evaluación de la severidad de la enfermedad a los 75 días después de la aplicación

Al finalizar la evaluación de la severidad dentro de las unidades experimentales se determinó mediante un DBA aplicado el programa INFOSTAT el cual nos muestra el siguiente ANVA.

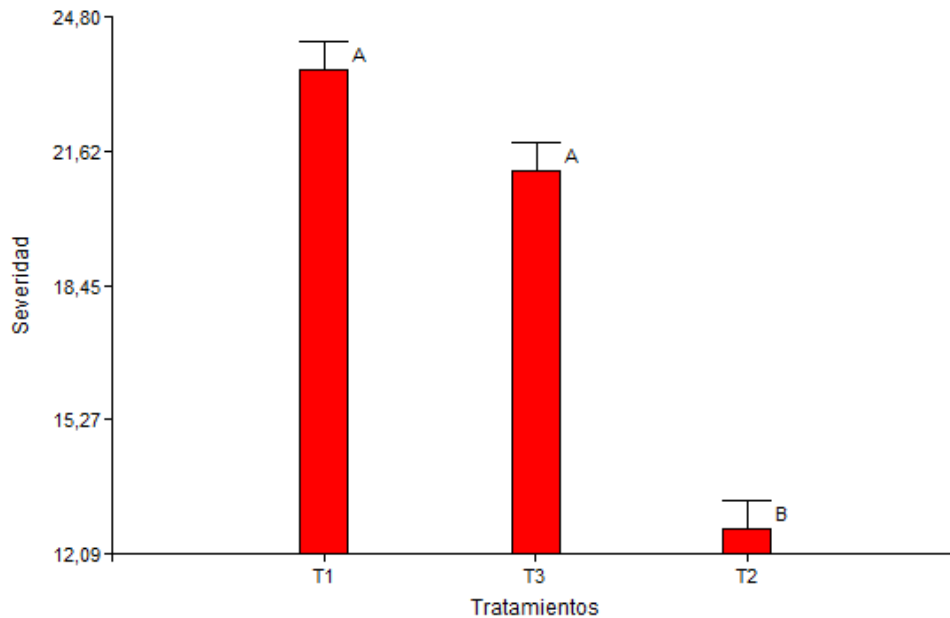
Cuadro 14. Análisis de varianza de la severidad a los 75 días después de la aplicación

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	195,60	4	48,90	34,93	0,0023
Bloques	0,02	2	0,01	0,01	0,9928
Tratamientos	195,58	2	97,79	69,85	0,0008
Error	5,60	4	1,40		
Total	201,20	8			

CV = 6.19

El cuadro de análisis de varianza nos muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos y el coeficiente de variación esta en 9.77 indicándonos que la conducción del experimento fue eficientemente llevada.

Figura 14. Comparación de medias de incidencia después de los 75 días



Realizada la prueba DUNCAN nos muestra que hay diferencia entre los tratamientos evaluados, mostrándonos que el Testigo (T1) y la aplicación de 200 gr de Trichoderma (T3) muestran una severidad similar, lo que nos demuestra que la resistencia de Trichoderma para evitar el progreso de la enfermedad en este caso no fue eficiente, sin embargo la aplicación de 300 gr de Trichoderma (T2) sobre el cacao tubo un eficiente control sobre el avance de la enfermedad de la mazorca, consecuentemente evito la esporulación del hongo para que pueda realizar nuevas infestaciones a frutos sanos, alcanzando con relación al testigo un descenso de la severidad del 10.87 %.

4.1.6 Condiciones climáticas registradas durante la evaluación

4.1.6.1 Precipitaciones

Cuadro 15. Precipitaciones registradas durante la investigación

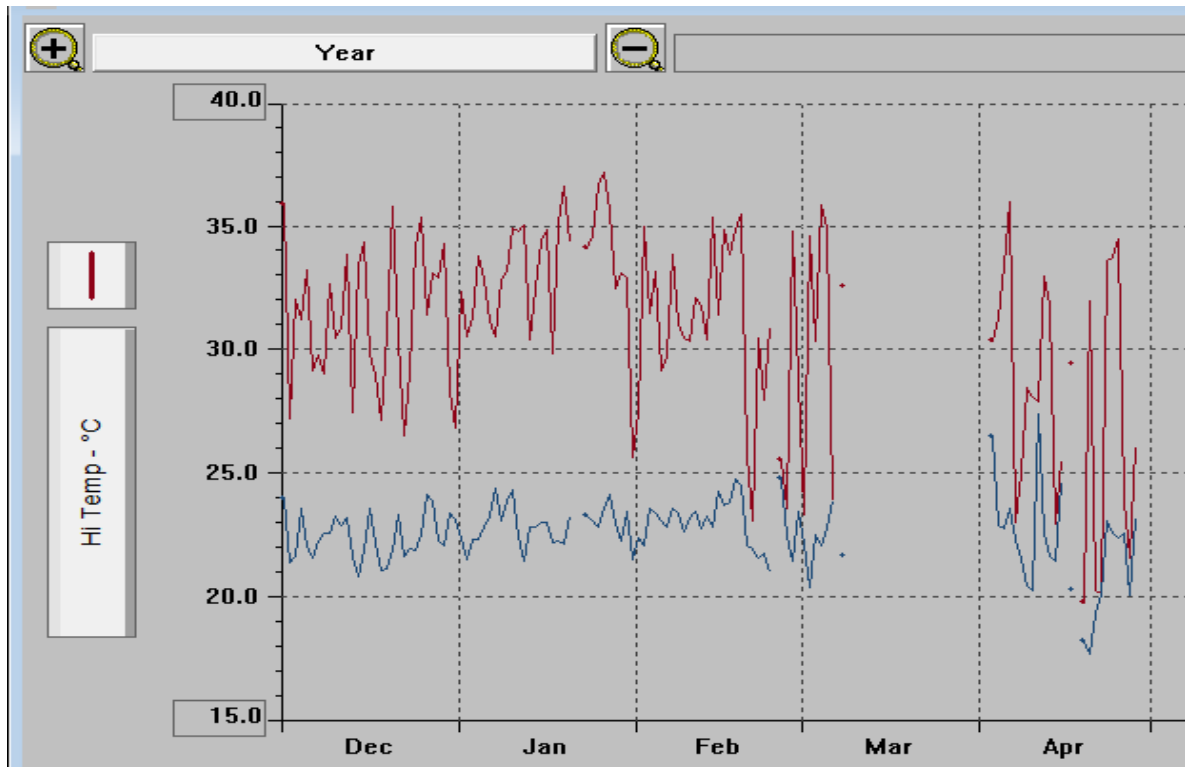
Yearly Rainfall (mm)													
	JAN	FEB	MAR	APR	MAY	JUN	JUL	AUG	SEP	OCT	NOV	DEC	TOT
2018	---	---	---	---	---	---	---	---	---	65.4	109.6	169.8	344.8
2019	255.4	350.6	139.2	97.4	15.2	1.4	39.8	12.4	79.4	108.0	149.6	201.8	1450.2
2020	104.4	2043.8	0.0	0.0	0.0	---	---	---	---	---	---	---	2148.2

Fuente: Estación climática de la Estación Experimental de Sapecho

La relación de precipitaciones fue medida mediante la estación climática de la Estación experimental de Sapecho, en donde podemos ver que entre diciembre del 2019 y enero de 2020 se ha producido 305 mm de precipitación, no siendo un aspecto normal ya que habitualmente son meses lluviosos, asimismo podemos ver que en febrero del 2020 ha habido una acumulación de precipitaciones en el orden de 2043 mm, lo interesante de esta precipitación es que casi 2000 mm se acumularon en dos días lo cual provocó inundaciones y problemas en la zona, y por supuesto en los cultivos siendo afectado el cacao y estimulando la aparición de la monilia durante las semanas posteriores a la lluvia.

4.1.6.2 Temperaturas

Cuadro 16. Temperaturas medias máximas y mínimas registradas durante la investigación



Fuente: Estación climática de la Estación Experimental de Sapecho

La temperatura mínima dentro de la parcela donde se realizó el experimento fue superior a los 20 ° C, está se produjo en horas de la noche y madrugadas, las temperaturas máximas estuvieron en el orden del 35 °C estas produciéndose principalmente a medio día, con estos datos las condiciones de temperatura estaban dadas para que el patógeno pueda desarrollarse dentro del cultivo, así también hay que considerar que estas condiciones de temperatura y humedad fueron afectando también al desarrollo de Trichoderma puesto que el hongo desarrolla mejor en el suelo, siendo principalmente afectado por la falta de humedad.

5. Conclusiones y Recomendaciones

La prueba dual mostró que *Trichoderma harzianum* tiene un porcentaje de inhibición de crecimiento de micelio del (PICM) 58.60 %, así mismo en la escala de Bell lo clasifica en un nivel de 1, invadiendo el micelio de *M. roleri* ocupando así todo el espacio de la caja Petri, por estas características se la elige como el antagonista más eficiente.

En contraposición *Trichoderma viride* con un PICM de 52.35%, es calificado en la escala de Bell en nivel 2 es decir solo inhibe el crecimiento de *M. roleri*, no lo invade dentro de la caja Petri, como también su velocidad de crecimiento es inferior al de *T. harzianum*.

La prueba en campo (in vivo) con *T. harzianum* muestran que la incidencia en ambos niveles de aplicación rebajo está en un 6 % con respecto al testigo, que muestra que *T. harzianum* reduce la incidencia eficientemente.

La severidad en campo fue medida en base a sintomatología externa siendo el T2 con 300 gr fue el más eficiente, reduciendo la severidad en 10.87 % con relación al testigo, por lo que se recomienda trabajar con este nivel de *Trichoderma*.

Las pruebas “in vitro” e “in vivo” mostraron amplias diferencias siendo en la primera puede controlar en un 100 % a *M. roleri* y en el segundo solo el 10.87 %, demostrando de esta manera que en campo los microorganismos dependen en gran medida del clima reinante, como de los ciclos biológicos de cada uno.

En la prueba de campo fue preponderante las condiciones ambientales, en donde falta de lluvias al inicio y concentradas en un solo mes afectaron la expresión de ambos hongos estudiados.

Se recomienda realizar la prueba de campo con 300 gr., empezando en octubre con aplicaciones al suelo y follaje para cortar el ciclo de *M. roleri* desde el suelo antes que empiece su infección.

6. Bibliografía

- Bazoberry Ch, O., Salazar Carrasco, C., & Centro de Investigación y Promoción del Campesinado (Bolivia). (2008). El cacao en Bolivia : una alternativa económica de base campesina indígena. *Cuadernos de Investigación*, (72), 282 p.
- Corrêa, S., Mello, M., Ávila, Z. R., Braúna, L. M., Pádua, R. R., Gomes, D., ... Sacc, R. (2007). Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 11, 3–9.
- Cruz Choque, D., Poma, E., & Cadena, F. (2017). *ENFERMEDADES FITOPATOLÓGICAS DE IMPORTANCIA EN LOS ANDES TROPICALES DE BOLIVIA*. (N. Michel Romero, Ed.) (Primera Ed). La Paz - Bolivia.
- Cruz, G. C. J. (2007). *IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS QUE AFECTAN EL CULTIVO DE CACAO (Theobroma cacao L.) EN LA FINCA BULBUXYA, SAN MIGUEL PANAN SUCHITEPÉQUEZ*. Universidad de San Carlos de Guatemala; Facultad de Agronomía; Instituto de Investigaciones Agronómicas.
- Enrique, V. C. J., Orlando, B. V. J., & Edgar, V. R. S. (2012). Evaluación in vitro de Microorganismos Nativos por su Antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en Cacao (*Theobroma cacao* L.). 2012, 65(1), 6305–6315. Retrieved from <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/30756>
- Espinoza, S., Olivera Manuel, & Ledezma, J. C. (2014). Producción del cacao y del chocolate en Bolivia - Datos 2010 - 2013 en base a encuestas a productores y empresarios chocolateros. *Conservación Internacional Bolivia y Conservation Strategy Fund.*, 1, 58.
- Ezziyyani, M., Sánchez, C. P., Ahmed, A. S., Requena, M. E., & Emilia, M. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L .). *Anales de Biología*, 35–45.
- French, E. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica*. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas.
- Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA). (2003). *Identificación y control de la moniliasis del cacao*.
- González, I., Infante, D., Peteira, B., Martínez, B., Arias, Y., González, N., & Miranda, I.

(2011). Caracterización bioquímica de aislamientos de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico. II Expresión de actividad glucanasa. *Rev. Protección Veg*, 26(1), 23–29.

Infante, D., Martínez, B., Gonzales, N., & Reyes, Y. (2002). MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Trichoderma* FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS. *ESTUDIOS DE ASIA Y ÁFRICA*, 37(2), 14–21.

Jaimes Suárez, Y., & Aranzazu Hernandez, F. (2010). *Manejo de las enfermedades del cacao*. Director.

Krauss, U., Hoopen, M., Hidalgo, E., Martínez, A., Arroyo, C., García, J., ... Sánchez, V. (2003). Manejo integrado de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*) en Talamanca , Costa Rica, 10, 52–58.

Martínez, B. I., I, D. I., & Ii, Y. R. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos, 28(1), 1–11.

Martinez, Barrios, Rovesti, & Santos. (2006). Efecto de enmiendas orgánicas y *Trichoderma* spp. en el manejo de *Meloidogyne* spp., 5, 224–233.

Mayo, S. (2017). *Evaluación de Trichoderma spp. en el control biológico de Rhizoctonia solani y la respuesta defensiva en plantas de alubia pertenecientes a la IGP “Alubia La Bañeza-León.”* Universidad de León. Retrieved from <http://buleria.unileon.es/handle/10612/6776%0Ahttps://www.educacion.gob.es/teseo/mostrarseleccion.do>

Muñoz Gonzales, Y. L. (2015). *MICROENCAPSULACIÓN DE EXTRACTOS DE Trichoderma asperellum, Y SU EFECTO SOBRE Phytophthora capsici EN EL DESARROLLO DE PLANTAS DE CHILE PIMIENTO (Capsicum annum)*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro - Mexico.

Phillips, W. (2012). *La moniliasis del cacao en Bolivia Conociendo al Enemigo*.

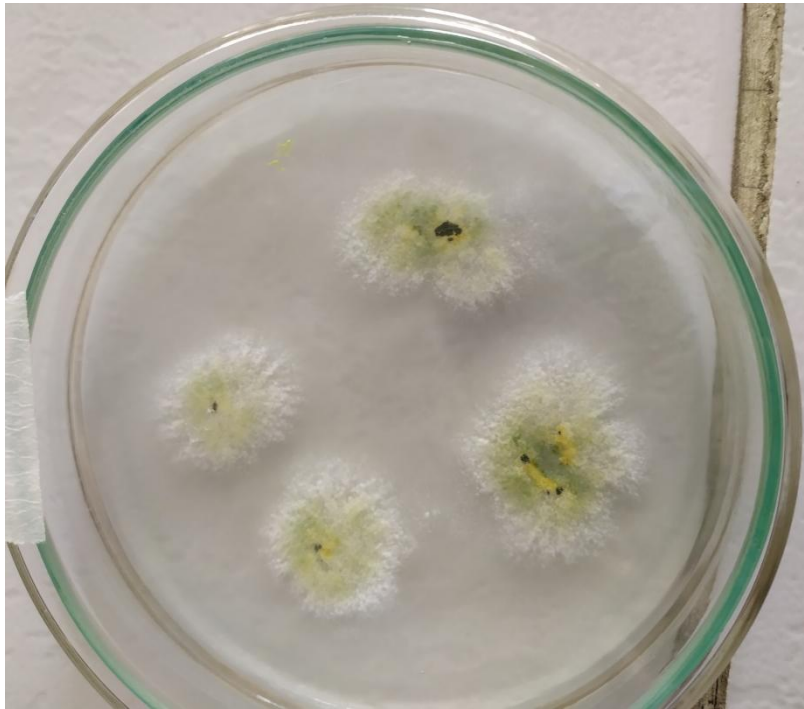
PRODUCE, F. (2006). *Diagnostico y tecnicas de manejo de la Moniliasis del cacao*.

Sanchez Mora, F. D., & Garcés Fiallos, F. R. (2012). *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al . en el cultivo de cacao *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al . in the crop of cocoa. *Scientia Agropecuaria*, 3, 249–258.

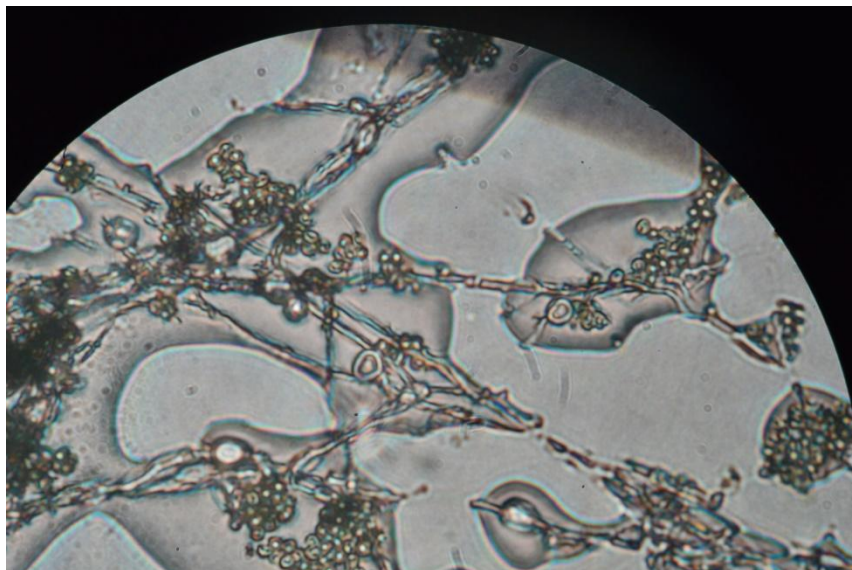
- Suarez, L. Y., & Cabrales, C. P. (2008). Identificación de especies de cepas nativas de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. y evaluación de su potencial antagonista in vitro frente al hongo fitopatógeno nativo *Moniliophthora roreri* en el departamento de Norte de Santander. *Respuestas*, 1(13), 45–55.
- Tarra, E., Zulia, E., & Se, C. (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), 3–8.
<https://doi.org/10.22463/0122820X.623>
- Tovar Castaño, J. C. (2008). *Evaluación de la capacidad antagonista “in vivo” de aislamientos de Trichoderma spp frente al hongo fitopatógeno Rhizoctonia solani. Pontificia Universidad Javeriana. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA FACULTAD DE CIENCIAS CARRERA DE MICROBIOLOGÍA AGRICOLA Y VETERINARIA.*
- Urdaneta G., L. M., & Delgado A., A. E. (2007). *Identificación de la micobiota del filoplano del cacao (Theobroma cacao L .), en el estado Mérida , Venezuela. Revista Facultad de agronomía (LUZ) (Vol. 24).*

ANEXOS

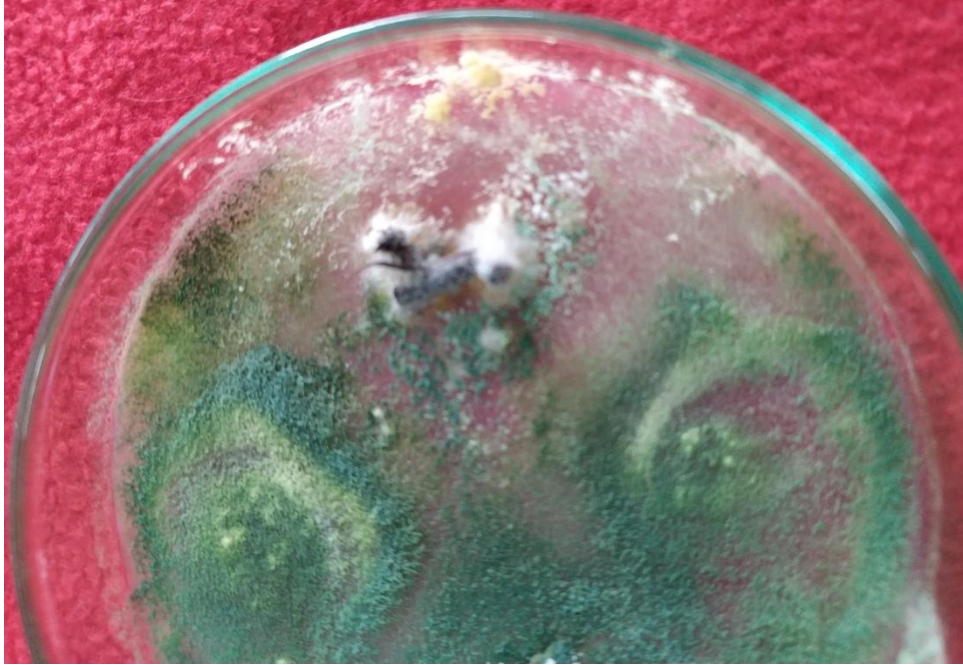
ANEXO FOTOGRÁFICO



Crecimiento inicial de Trichoderma como testigo libre



Avance de *T. harzianum* sobre *M. royeri* (foto microscopio)



Crecimiento de *Trichoderma harzianum* sobre *M. roreri*



Crecimiento de *T. viride* sobre *M. roreri* (Ambos detienen su crecimiento)



Establecimiento de la parcela de investigación



Mazorca del cacao en fase de esporulación de *M. royeri*



Daño interno ocasionado por *M. roreri*



Evaluación de incidencia y severidad en campo

Anexo

Datos estadísticos

Crecimiento en prueba libre (día 1)

Nueva tabla : 25/11/2020 - 16:50:08 - [Versión : 01/11/2014]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
Crecimiento (cm2)	18	0,91	0,89	19,46	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5,12	2	2,56	71,62	<0,0001
Microrganismo	5,12	2	2,56	71,62	<0,0001
Error	0,54	15	0,04		
Total	5,65	17			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0357 gl: 15

Microrganismo	Medias	n	E.E.	
Th	1,59	6	0,08	A
Tv	1,03	6	0,08	B
Mr	0,29	6	0,08	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Crecimiento en prueba libre (día 2)

Nueva tabla : 25/11/2020 - 16:40:22 - [Versión : 01/11/2014]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
Crecimiento (cm2)	18	0,87	0,85	12,85	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	47,72	2	23,86	48,80	<0,0001
Microrganismo	47,72	2	23,86	48,80	<0,0001
Error	7,34	15	0,49		
Total	55,06	17			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,4890 gl: 15

Microrganismo	Medias	n	E.E.	
Th	7,52	6	0,29	A
Tv	5,28	6	0,29	B
Mr	3,54	6	0,29	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Crecimiento en prueba libre (día 3)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Crecimiento (cm2)	18	0,84	0,82	16,56

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	157,90	2	78,95	39,76	<0,0001
Microrganismo	157,90	2	78,95	39,76	<0,0001
Error	29,79	15	1,99		
Total	187,69	17			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 1,9859 gl: 15

Microrganismo	Medias	n	E.E.	
Th	11,17	6	0,58	A
Tv	9,98	6	0,58	A
Mr	4,38	6	0,58	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Crecimiento en prueba libre (día 4)

Nueva tabla : 25/11/2020 - 16:17:08 - [Versión : 01/11/2014]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Crecimiento (cm2)	18	0,94	0,94	9,77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	351,54	2	175,77	127,06	<0,0001
Microrganismo	351,54	2	175,77	127,06	<0,0001
Error	20,75	15	1,38		
Total	372,29	17			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 1,3834 gl: 15

Microrganismo	Medias	n	E.E.	
Th	16,50	6	0,48	A
Tv	13,60	6	0,48	B
Mr	6,02	6	0,48	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Crecimiento en prueba libre (día 5)

Nueva tabla : 25/11/2020 - 16:06:58 - [Versión : 01/11/2014]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
Crecimiento (cm2)	18	0,96	0,95	8,04	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	591,05	2	295,52	165,84	<0,0001
Microrganismo	591,05	2	295,52	165,84	<0,0001
Error	26,73	15	1,78		
Total	617,78	17			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 1,7819 gl: 15

Microrganismo	Medias	n	E.E.	
Th	23,02	6	0,54	A
Tv	17,66	6	0,54	B
Mr	9,11	6	0,54	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Crecimiento en prueba libre (día 6)

Nueva tabla : 25/11/2020 - 15:48:34 - [Versión : 01/11/2014]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
Crecimiento (cm2)	18	0,92	0,91	8,73	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	511,19	2	255,60	85,45	<0,0001
Microrganismo	511,19	2	255,60	85,45	<0,0001
Error	44,87	15	2,99		
Total	556,06	17			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 2,9911 gl: 15

Microrganismo	Medias	n	E.E.	
Th	25,76	6	0,71	A
Tv	20,86	6	0,71	B
Mr	12,84	6	0,71	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Crecimiento en prueba libre (día 7)

Nueva tabla : 25/11/2020 - 13:17:57 - [Versión : 01/11/2014]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Crecimiento (cm2)	18	0,90	0,88	8,62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	550,18	2	275,09	64,56	<0,0001
Microrganismo	550,18	2	275,09	64,56	<0,0001
Error	63,92	15	4,26		
Total	614,10	17			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 4,2611 gl: 15

Microrganismo	Medias	n	E.E.
Th	29,91	6	0,84 A
Tv	25,34	6	0,84 B
Mr	16,58	6	0,84 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Crecimiento en prueba libre (día 8)

Nueva tabla : 25/11/2020 - 17:04:24 - [Versión : 01/11/2014]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Crecimiento (cm2)	18	0,92	0,91	7,48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	754,25	2	377,12	83,76	<0,0001
Microrganismo	754,25	2	377,12	83,76	<0,0001
Error	67,54	15	4,50		
Total	821,78	17			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 4,5024 gl: 15

Microrganismo	Medias	n	E.E.
Th	35,28	6	0,87 A
Tv	30,08	6	0,87 B
Mr	19,71	6	0,87 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Prueba dual *T. harziarum* vs *M. roreri* (día 1)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Crecimiento	10	0,98	0,98	10,92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,58	1	4,58	402,40	<0,0001
Microorganismo	4,58	1	4,58	402,40	<0,0001
Error	0,09	8	0,01		
Total	4,67	9			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0114 gl: 8

Microorganismo	Medias	n	E.E.
T	1,65	5	0,05 A
M	0,30	5	0,05 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Prueba dual *T. harziarum* vs *M. roreri* (día 2)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Crecimiento (cm ²)	10	0,97	0,97	6,08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	21,43	1	21,43	268,16	<0,0001
Microorganismo	21,43	1	21,43	268,16	<0,0001
Error	0,64	8	0,08		
Total	22,07	9			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0799 gl: 8

Microorganismo	Medias	n	E.E.
T	6,11	5	0,13 A
M	3,18	5	0,13 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Prueba dual T. harziarum vs M. roreri (día 3)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Crecimiento (cm2)	10	0,98	0,98	5,54

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	64,01	1	64,01	434,92	<0,0001
Microorganismo	64,01	1	64,01	434,92	<0,0001
Error	1,18	8	0,15		
Total	65,19	9			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,1472 gl: 8

Microorganismo Medias n E.E.

T	9,45	5	0,17	A
M	4,39	5	0,17	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Prueba dual T. harziarum vs M. roreri (día 4)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Crecimiento (cm2)	10	0,99	0,99	3,78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	220,24	1	220,24	1555,11	<0,0001
Microorganismo	220,24	1	220,24	1555,11	<0,0001
Error	1,13	8	0,14		
Total	221,38	9			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,1416 gl: 8

Microorganismo Medias n E.E.

T	14,64	5	0,17	A
M	5,26	5	0,17	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Prueba dual *T. harziarum* vs *M. roreri* (día 5)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Crecimiento (cm2)	10	0,99	0,99	3,55

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	336,98	1	336,98	1372,63	<0,0001
Microorganismo	336,98	1	336,98	1372,63	<0,0001
Error	1,96	8	0,25		
Total	338,94	9			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,2455 gl: 8

Microorganismo	Medias	n	E.E.
T	19,77	5	0,22 A
M	8,16	5	0,22 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Prueba dual T. viride vs M. roreri (día 1)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Crecimiento (cm2)	10	0,97	0,97	9,72

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,80	1	0,80	270,49	<0,0001
Microorganismo	0,80	1	0,80	270,49	<0,0001
Error	0,02	8	2,9E-03		
Total	0,82	9			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0029 gl: 8

Microorganismo	Medias	n	E.E.
T	0,84	5	0,02 A
M	0,28	5	0,02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Prueba dual T. viride vs M. roreri (día 2)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Crecimiento (cm2)	10	0,91	0,90	7,66

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8,17	1	8,17	83,38	<0,0001
Microorganismo	8,17	1	8,17	83,38	<0,0001
Error	0,78	8	0,10		
Total	8,96	9			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0980 gl: 8

Microorganismo	Medias	n	E.E.
T	4,99	5	0,14 A
M	3,18	5	0,14 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Prueba dual T. viride vs M. roreri (día 3)

Nueva tabla : 28/11/2020 - 12:25:24 - [Versión : 01/11/2014]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Crecimiento (cm2)	10	0,92	0,91	11,04

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	49,46	1	49,46	91,40	<0,0001
Microorganismo	49,46	1	49,46	91,40	<0,0001
Error	4,33	8	0,54		
Total	53,79	9			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,5412 gl: 8

Microorganismo	Medias	n	E.E.	
T	8,89	5	0,33	A
M	4,44	5	0,33	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Prueba dual T. viride vs M. roreri (día 4)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Crecimiento (cm2)	10	0,94	0,94	8,29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	75,30	1	75,30	135,29	<0,0001
Microorganismo	75,30	1	75,30	135,29	<0,0001
Error	4,45	8	0,56		
Total	79,75	9			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,5566 gl: 8

Microorganismo	Medias	n	E.E.	
T	11,75	5	0,33	A
M	6,26	5	0,33	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Prueba dual *T. viride* vs *M. roleri* (día 5)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Crecimiento (cm ²)	10	0,93	0,92	8,45

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	126,52	1	126,52	106,11	<0,0001
Microorganismo	126,52	1	126,52	106,11	<0,0001
Error	9,54	8	1,19		
Total	136,06	9			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 1,1924 gl: 8

Microorganismo	Medias	n	E.E.	
T	16,48	5	0,49	A
M	9,37	5	0,49	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)