

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
CARRERA INGENIERIA AGRONOMICA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS**



**TESIS DE GRADO**

**EVALUACIÓN DE HONGOS ANTAGÓNICOS A FITOPATÓGENOS  
DEL CACAO (*Theobroma cacao* L.), COMO ALTERNATIVA DE  
BIOCONTROL EN CONDICIONES *in Vitro***

**Kenny Porfirio Vicente Yujra**

**La Paz – Bolivia  
2007**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
CARRERA INGENIERIA AGRONOMICA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS**

**EVALUACIÓN DE HONGOS ANTAGÓNICOS A FITOPATÓGENOS  
DEL CACAO (*Theobroma cacao L.*), COMO ALTERNATIVA DE  
BIOCONTROL EN CONDICIONES *in Vitro***

*Tesis de Grado presentada como requisito  
Parcial a optar el título de  
Ingeniero Agrónomo*

*Presentada por:*

**Kenny Porfirio Vicente Yujra**

**Tutores:**

Ph. D Alberto Giménez Turba .....

Ph. D Maria Teresa Alvarez Aliaga .....

**Asesores:**

Ph. D Enrique Terrazas Siles .....

Ph. D David Cruz Choque .....

**Comite Revisor:**

M Sc. Jorge Guzman Calla .....

Ph. D Felix Marza Mamani .....

M Sc. Teresa Ruiz Diaz Luna Pizarro .....

**APROBADA**

**Presidente:**

.....

## **DEDICATORIA**

*A Dios, por sobre todas las cosas, que nos da el valor para seguir hacia adelante.*

*A mis padres Martiniano, Adela por su apoyo constante.*

*A mis hermanas Delma y Gabriela*

*A mis sobrinas pedacitos de cielo Vania y Katherin*

*A Ruth por todo el apoyo y las palabras de aliento*

*A la señora Wilma Linke y su familia.*

*A todos los que han llegado a conocerme y me han tratado con mucho cariño y confianza.*

*"El camino hacia el éxito se encuentra siempre en construcción."*

*Anónimo*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Todos los Docentes que fueron parte en mi formación académica, profesores que hacen un trabajo inmenso en la formación de profesionales.

Al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímica, por haberme abierto las puertas del laboratorio de biotecnología microbiana y que este trabajo sea una realidad, al Dr. Enrique Terrazas, a la Dra. Teresa Álvarez, al Dr. Alberto Giménez, a la M Sc. Laura Mendoza, a la Lic. Paola Astorga y a todos aquellos que participan en el instituto, desarrollando investigación científica para el desarrollo de la ciencia en nuestro país.

Al Dr. David Cruz por su dedicación como asesor en el presente trabajo.

A mi tribunal, al Ing. Jorge Guzmán, al Dr. Félix Marza, a la Ing. Teresa Ruiz que con su paciencia, su experiencia y su profesionalismo, dedicando parte de su tiempo en este trabajo.

Al Instituto de Investigación y Desarrollo de Procesos Químicos, al Ing. Cristhian Carrasco por hacerme participe en la caravana de recolección de hongos y a todo el equipo de investigadores.

Agradecimiento especial a USDA - Agricultural Research Service, a la Dra M. C. Aime, Systematic Botany and Mycology Lab, por haberme enviado los documentos de investigación y caracterización taxonómica de enfermedades en el cultivo de Cacao.

Al Licenciado Juan Calle por el asesoramiento continuo en la realización de pruebas en laboratorio demostrando su profesionalismo y experiencia.

A mis compañeros de trabajo: Pamela Usnayo, Karen Cabero, Oscar Cárdenas, Guido Valverde, Nelson Ramos, Silvia Martínez, Luis Apaza, Rosa Vargas, Reynaldo Tenorio, que en forma conjunta pero con fines

diferentes llegamos a trabajar con la flora fúngica y bacteriana en una forma mancomunada y de apoyo mutuo dentro de esta área.

Al Ing. Nicolás Herrera encargado de la estación experimental de Sapecho Alto Beni, por su acogida en dicho predio,

Al Sr. Francisco Colque Flores, técnico en la estación experimental de Sapecho Alto Beni, por su apoyo, su explicación y la facilitación de material para realizar el presente trabajo.

A mis compañeros, Elvis Veliz, Windsor Echeverria, Alvaro Ramirez, Virginia Vargas, German Fernández, Teresa Toro, Boris Chacon, Eduardo Palma, Felipe Alvis y Romina Villegas por su gran apoyo, facilitación de material y demostrar que existe una verdadera amistad.

A Freundeskrais La Paz e. V. en Alemania, a todo el pueblo de Lindenberg / Allgäu. Por su apoyo Beca Estudio durante mi carrera y la entera confianza puesta en mi.

A la Fundación la Paz a su director Dr. Jorge Domic, a la Sra. Beatriz Paz, al Sr. Adolfo Fabiáni, la Señora Eugenia Cusicanqui, a la Sra. Maria Fernández por su apoyo y sus palabras de aliento a lo largo de mi formación académica y la realización de este proyecto de vida.

A la Señora Tina Orias, por su confianza y por el aliento que me dieron en esta ultima parte del proceso de formación dentro de mi vida.

A Marisol Larrea, por su amistad y compañerismo

A mis amigos de la organización (NACER - *Qhana Aru*) por el apoyo moral brindado durante estos años.

## CONTENIDO

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
CONTENIDO.....	iv
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE ANEXOS .....	xiii
RESUMEN .....	xiv
ABSTRACT .....	xvi
1. INTRODUCCION.....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1 Objetivo General .....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	4
3.1 Concepto de enfermedad de una planta .....	4
3.2 Importancia económica de las enfermedades de cacao.....	4
3.2.1 Principales enfermedades del Cacao .....	5
3.2.1.1 Escoba de bruja.....	5
3.2.1.2 Mazorca negra.....	11
3.3 Control biológico de enfermedades .....	15
3.3.1 Los hongos como agentes de biocontrol.....	16
3.4 Metabolitos secundarios .....	17
3.4.1 Relación entre organismos.....	17
3.4.2 Definición de metabolitos secundarios .....	18
3.4.3 Origen y evolución de los metabolitos secundarios.....	19
3.4.4 Función de los metabolitos secundarios .....	20
3.4.4.1 Regulación del metabolismo secundario.....	20
3.4.4.2 Producción de metabolitos secundarios.....	21
3.4.4.2.1 Tipos y procesos de fermentación .....	21
a. Cultivos por lotes (Batch).....	22
b. Cultivos por lotes realimentados (Fed-Batch) .....	22
c. Cultivos continuos .....	23
4 LOCALIZACION.....	24

4.2	Localización de la recolección de muestras.....	24
4.2.1	Ubicación Geográfica de la recolección de muestras .....	24
4.3	Localización del laboratorio del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas .....	24
4.4	Materiales .....	25
4.4.1	Material Biológico .....	25
4.5	Método .....	26
4.5.1	Procedimiento experimental .....	26
4.5.1.1	Recolección de muestra .....	26
4.5.1.2	Tratamiento del material para el aislamiento .....	27
4.5.1.3	Medios de cultivo.....	27
4.5.1.4	Aislamiento de hongos fitopatógenos (Escoba de bruja y Mazorca negra).....	27
4.5.1.5	Tratamiento presiembra de hongos fitopatógenos. ....	28
4.5.1.6	<i>Siembra en medio de cultivo sólido</i> .....	29
4.5.1.7	<i>Preparación en cámara húmeda</i> .....	29
4.5.1.8	<i>Identificación de hongos fitopatógenos</i> .....	29
4.5.1.8.1	<i>Raspadura directa para observar en el microscopio a (10x y 40x)</i> .....	29
4.5.1.8.2	<i>Examen macroscópico en placas</i> .....	30
4.5.1.9	<i>Examen microscópico en cultivos sobre cubreobjetos</i> .....	30
4.5.1.10	<i>Examen microscópico por tinción</i> .....	31
4.5.1.11	<i>Mecanismos de purificación de hongos</i> .....	31
	a. <i>Cultivo de punta de hifa</i> .....	32
	b. <i>Cultivo monosporico</i> .....	32
4.5.1.12	<i>Crioconservación</i> .....	33
4.5.1.13	Prueba de patogenidad.....	34
4.5.1.14	Conteo de esporas.....	34
4.5.1.15	Cinética de crecimiento.....	35
-	<i>Cinética de crecimiento en medio de sólido</i> .....	35
-	Cinética de crecimiento en medio liquido.....	36
	a. <i>Toma de muestra</i> .....	36

c.	<i>Determinación de consumo de Glucosa</i> .....	36
4.5.2	Evaluación de la actividad inhibitoria.....	37
4.5.2.1	<i>Enfrentamientos duales entre cepas</i> .....	37
4.5.2.2	<i>Selección (Screening) en cultivos en batch estanco por el método de dilución en placa</i> .....	38
4.5.3	Cultivos en lotes (batch) para la obtención de metabolitos secundarios.....	40
4.5.3.1	Obtención del filtrado del cultivo de la cepa seleccionada .....	40
4.5.3.2	Evaluación de la cepa IB - 17 por el método de dilución en placa	41
4.6	Análisis estadístico.....	42
4.6.1	<i>Selección del mejor fungicida para el control de enfermedades de cacao, selección del control positivo</i> .....	42
4.6.2	Selección de cultivos en lotes (batch) a diferentes tiempos.....	43
4.6.3	<i>Comparación del control químico versus control biológico frente a un control de crecimiento para fitopatógenos del Cacao</i> .....	44
4.6.4	Comparación de medias pruebas Tukey .....	44
4.6.5	Comparación de medias, pruebas Dunnet.....	45
5	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	46
5.1	Enfermedades identificadas .....	46
5.1.1	Escoba de bruja ( <i>Moniliophthora perniciosa</i> ) .....	47
5.1.1.1	Identificación de la Escoba de bruja ( <i>Moniliophthora perniciosa</i> )	47
5.1.1.2	Cinética de crecimiento de la cepa <i>Moniliophthora perniciosa</i> en medio sólido.....	48
5.1.2	Mazorca negra ( <i>Phytophthora palmivora</i> ).....	49
5.1.2.1	Identificación de la Mazorca negra ( <i>Phytophthora palmivora</i> ) ...	49
5.1.2.2	Cinética de crecimiento de la cepa <i>Phytophthora palmivora</i> en medio sólido.....	50
5.2	Selección de biocontroladores (screening).....	53
5.2.1	Screening o selección con el método de dilución en placa .....	54
5.3	Selección de fungicidas químicos, como control positivo para fitopatógenos del Cacao ( <i>Theobroma cacao L.</i> ) .....	58



5.4	Selección de la cepa con actividad biocontroladora.....	65
5.4.1	Identificación de la cepa Biocontroladora .....	68
5.4.1.1	Origen de la recolección de la cepa IB-17 .....	68
5.4.2	Cinética de crecimiento en condiciones liquidas.....	69
5.4.2.1	Consumo de glucosa y cambio de pH del la cepa IB - 17 en sistemas de cultivo de batch agitado y no agitado. ....	71
5.5	Actividad biocontroladora de la cepa IB – 17 en sistemas de cultivos en batch en condiciones agitadas y no agitadas .....	73
5.5.1	Actividad biológica inhibitoria del fermento de cultivos en batch en condiciones agitadas y no agitadas de la cepa IB - 17 en el crecimiento hifal de la cepa <i>Moniliophthora perniciosa</i> .....	73
5.5.2	Actividad biológica inhibitoria del fermento de cultivos en batch en condiciones agitadas y no agitadas de la cepa IB - 17 en el crecimiento hifal de la cepa <i>Phytophthora palmivora</i> .....	75
5.6	Comparación control biológico vs. control químico .....	79
5.6.1	Comparación de la actividad biológica inhibitoria de la cepa IB – 17 a través de fermento estéril, frente a control químico (positivo) y al control de crecimiento en la cepa <i>Moniliophthora perniciosa</i> (Escoba de bruja) .....	79
5.6.2	Comparación de la actividad biológica inhibitoria de la cepa IB – 17 a través de fermento estéril, frente al control químico (positivo) y al control de crecimiento en la cepa <i>Phytophthora palmivora</i> (Mazorca negra) .....	82
6	<b>CONCLUSIONES</b> .....	85
7	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	87
8	<b>LITERATURA CITADA</b> .....	88

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Enfermedades más importantes del Cacao y las regiones donde tienen incidencia.....	5
Tabla 2. Screening o selección en enfrentamientos duales para el control biológico de las cepas <i>Moniliophthora perniciosa</i> y <i>Phytophthora palmivora</i> .....	53
Tabla 3. ANVA para la comparación de fungicidas sintéticos en la selección del control positivo de la cepa <i>Moniliophthora perniciosa</i> causante de la enfermedad de Escoba de bruja.....	58
Tabla 4. Comparación de medias a partir de prueba de Tukey en el control químico en la cepa <i>Moniliophthora perniciosa</i> causante de la enfermedad (Escoba de bruja) .....	59
Tabla 5. Velocidad de crecimiento de la cepa <i>Moniliophthora perniciosa</i> frente diferentes fungicidas químicos desarrollada en condiciones <i>in vitro</i> .....	60
Tabla 6. ANVA para la comparación de fungicidas sintéticos en la selección del control positivo de la cepa <i>Phytophthora palmivora</i> causante de la enfermedad de Mazorca negra .....	61
Tabla 7. Comparación de medias a partir de prueba Tukey en el control químico en la cepa <i>Phytophthora palmivora</i> causante de la enfermedad (Mazorca negra) .....	62
Tabla 8. Velocidad de crecimiento de la cepa <i>Phytophthora palmivora</i> frente diferentes fungicidas químicos desarrollada en condiciones <i>in vitro</i> .....	63
Tabla 9. Velocidad de crecimiento de la cepa <i>Moniliophthora perniciosa</i> con el uso de fermento de la cepa IB – 17 frente al control químico y al control de crecimiento desarrollada en condiciones <i>in vitro</i> .....	66
Tabla 10. Velocidad de crecimiento de la cepa <i>Phytophthora palmivora</i> con el uso de fermento de la cepa IB – 17 frente al control químicos y al control de crecimiento desarrollada en condiciones <i>in vitro</i> ..	67

Tabla 11. Ficha de la cepa IB – 17 .....	68
Tabla 12. Velocidad de crecimiento en base al consumo de glucosa en sistemas agitado y no agitado a diferentes tiempos.....	70
Tabla 13. Velocidad de crecimiento en base al Consumo de glucosa a del inicio hasta el final del experimento.....	70
Tabla 14. Determinación de Qs (consumo específico de substrato) .....	71
Tabla 15. ANVA para la comparación en sistemas de cultivo en batch de la cepa IB – 17 a cada tiempo de toma de muestras en el crecimiento hifal de la cepa <i>Moniliophthora perniciosa</i> (Escoba de bruja) .....	74
Tabla 16. Comparación de medias a partir de prueba de Tukey en sistemas de cultivo en batch de la cepa IB – 17 en el control biológico de la Escoba de bruja ( <i>Moniliophthora perniciosa</i> ) ....	74
Tabla 17. ANVA para la comparación en sistemas de cultivo en batch de la cepa IB – 17 a cada tiempo de toma de muestras en el crecimiento hifal de la cepa <i>Phytophthora palmivora</i> (Mazorca negra).....	76
Tabla 18. Comparación de medias a partir de prueba de Tukey en sistemas de cultivo en batch de la cepa IB – 17 en el control biológico de la Mazorca negra ( <i>Phytophthora palmivora</i> ).....	76
Tabla 19. ANVA para la comparación en sistemas de control biológico a través del fermento de la cepa IB – 17 frente a control químico y al control de crecimiento en la cepa <i>Moniliophthora perniciosa</i> (Escoba de bruja).....	80
Tabla 20. Prueba <i>Dunnet</i> en comparación de medias para sistemas de control biológico a través del fermento de la cepa IB – 17, frente a control químico y al control de crecimiento en la cepa <i>Moniliophthora perniciosa</i> (Escoba de bruja).....	80
Tabla 21. ANVA para la comparación en sistemas de control biológico a través del fermento de la cepa IB – 17 frente al control químico y al control de crecimiento en la cepa <i>Phytophthora palmivora</i> (Mazorca negra) .....	82

Tabla 22. Prueba *Dunnet* en comparación de medias para sistemas de control biológico a través del fermento de la cepa IB – 17, frente al control químico y al control de crecimiento en la cepa *Phytophthora palmivora* (Mazorca negra) ..... 83

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relación entre organismos.....	18
Figura 2. Cinética de crecimiento.....	21
Figura 3. Hematocimetro para el conteo de esporas .....	35
Figura 4. Enfrentamiento dual el desarrollo simultáneo del antagonista y el patógeno en medio PDA. ....	38
Figura 5. Características morfológicas de <i>Moniliophthora perniciosa</i> .....	47
Figura 6. Características <i>microscópicas</i> de la cepa <i>Moniliophthora perniciosa</i> .....	48
Figura 7. <i>Cinética de crecimiento de la cepa Moniliophthora perniciosa en medio PDA</i> .....	48
Figura 8. Características morfológicas de <i>Phytophthora palmivora</i> .....	49
Figura 9. Características <i>microscópicas</i> de la cepa <i>Phytophthora palmivora</i> .....	50
Figura 10. <i>Cinética de crecimiento de la cepa Phytophthora palmivora en medio PDA</i> .....	50
Figura 11. Screening o selección de la cepa fúngica con actividad biológica inhibitoria del crecimiento miceliar del <i>Moniliophthora perniciosa</i> (Escoba de bruja) con el método de dilución en placa.....	55
Figura 12. Screening o selección de la cepa fúngica con actividad biológica inhibitoria del crecimiento miceliar del <i>Phytophthora palmivora</i> (Mazorca negra) con el método de dilución en placa.....	55
Figura 13. Cinética de crecimiento de la cepa <i>Moniliophthora perniciosa</i> frente diferentes fungicidas químicos desarrollada en condiciones <i>in vitro</i> .....	60
Figura 14. Cinética de crecimiento de la cepa <i>Phytophthora palmivora</i> frente diferentes fungicidas químicos desarrollada en condiciones <i>in vitro</i> .....	62
Figura 15. Comparación preliminar en la selección del antifúngico (metabolito secundario) de origen biológico de la cepa IB-17	

para la enfermedad escoba de bruja ( <i>Moniliophthora perniciosa</i> ) .....	65
Figura 16. Comparación preliminar en la selección del antifúngico (metabolito secundario) de origen biológico de la cepa IB-17 para la enfermedad Mazorca negra ( <i>Phytophthora palmivora</i> ). 67	67
Figura 17. Características <i>macroscópicas</i> de la Cepa IB-17 .....	68
Figura 18. Características <i>microscópicas</i> de la Cepa IB-17 .....	69
Figura 19. Consumo de glucosa y cambio de pH de la cepa IB - 17 en medio basal en sistema de cultivos batch en estanco (no agitado).....	72
Figura 20. Consumo de glucosa y cambio de pH de la cepa IB - 17 en medio basal en sistema de cultivos batch en agitado .....	72
Figura 21. Comparación de la actividad biocontroladora del fermento IB – 17 en sistemas agitado y estanco para en el desarrollo hifal en la cepa <i>Moniliophthora perniciosa</i> (Escoba de bruja).....	75
Figura 22. Comparación de la actividad biocontroladora del fermento IB – 17 en sistemas agitado y estanco para en el desarrollo hifal en la cepa <i>Phytophthora palmivora</i> (Mazorca negra) .....	77
Figura 23. Comparación esquemática de crecimiento en la cepa <i>Moniliophthora perniciosa</i> (Escoba de bruja) en sistemas de control biológico a través del fermento de la cepa IB – 17 frente a control químico y al control de crecimiento. ....	81
Figura 24. Comparación esquemática de crecimiento en la cepa <i>Phytophthora palmivora</i> (Mazorca negra) en sistemas de control biológico a través del fermento de la cepa IB – 17 frente a control químico.....	84

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Funguicidas químicos aplicados en el control de las enfermedades Escoba de bruja y Mazorca negra en condiciones <i>in vitro</i> .....	97
Anexo 2. Consumo de glucosa Y pH Cepa IB - 17 .....	98
Anexo 3. Resultados de la selección de funguicidas químicos, como control positivo para fitopatógenos del cacao ( <i>Theobroma cacao L.</i> )... ..	99
Anexo 4. Resultados de la actividad biocontroladora de la cepa IB – 17 en sistemas de cultivos batch en condiciones agitadas y no agitadas .....	100
Anexo 5. Resultados de la comparación control biológico vs. control químico .....	103
Anexo 6. Preparación de Papa Dextrosa Agar (PDA).....	106
Anexo 7. Medio Basal .....	107
Anexo 8. Medio Mínimo .....	107

**Vicente, K., 2007. Evaluación de hongos antagónicos a fitopatógenos del cacao (*Theobroma cacao L.*), como alternativa de biocontrol en condiciones *in vitro*.**

**Palabras clave:** *Theobroma cacao L.*, Metabolitos secundarios, control biológico, escoba de bruja, mazorca negra.

---

## RESUMEN

Las enfermedades: Escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) y Mazorca Negra (*Phytophthora palmivora*) son las causas principales en la reducción del rendimiento de cacao en Bolivia.

La presente investigación tiene el propósito de emplear alternativas al uso de plaguicidas y buscar mecanismos de biocontrol para reducir la incidencia de estas enfermedades a través de metabolitos secundarios de hongos.

La recolección de muestras, consistentes en fitopatógenos del cacao, se realizó en la zona tropical productora de cacao de Alto Beni en el departamento de La Paz – Bolivia. Lográndose aislar en laboratorio 5 cepas de hongos diferentes, de las cuales dos fueron identificadas morfológicamente como: *Moniliophthora perniciosa* y *Phytophthora palmivora* además de otros hongos posiblemente saprofitos.

Se estudiaron 23 cepas fúngicas como posibles biocontroladores del desarrollo hifal de *Moniliophthora perniciosa* y *Phytophthora palmivora*. En la que se determinó que la cepa IB – 17 que es originaria del Altiplano Boliviano presentaba mejor actividad biológica inhibitoria frente a estos fitopatógenos.

Para determinar la efectividad de los fungicidas sintéticos frente a los fitopatógenos identificados del cacao, se realizó un experimento con cuatro fungicidas comerciales que son: Sisthane, Benlate, Fitorraz y Mancozeb. El



Fitorraz (2.5gr/lit) mostró ser mejor controlador químico para la *Moniliophthora perniciosa* y el Benlate (1gr/lit) para el control de *Phytophthora palmivora*.

Cultivos líquidos batch agitado y no agitados de la cepa IB – 17 fueron probados como posibles controladores, los cultivos líquidos agitado y no agitado mostraran actividad sobre la *Moniliophthora perniciosa*, sobre el *Phytophthora palmivora* solo el cultivo liquido no agitado mostró actividad.

Para comparar la efectividad del controlador biológico en relación al controlador sintético sobre *Moniliophthora perniciosa* y *Phytophthora palmivora* se realizó un experimento de dilución en placas siguiendo el grado de inhibición del crecimiento hifal durante siete días. El crecimiento de *Moniliophthora perniciosa* fue inhibida por el controlador sintético hasta un 60%, mientras que el metabolito secundario de la cepa IB – 17, controlador biológico tiene un efecto solo del 28%. En el caso de la cepa *Phytophthora palmivora*, el controlador sintético inhibe hasta un 81% aproximadamente, mientras que el controlador biológico inhibe hasta un 54%.

**Vicente, K., 2007. Evaluation of antagonistic fungi for phytopathogen of the *Theobroma cacao* L., as alternative of biological control under laboratory conditions**

**Key words:** *Theobroma cacao* L., secondary metabolites, biological control, witch's broom, black ear.

---

**ABSTRACT**

The illnesses witch's broom (*Moniliophthora perniciosa*) and Black Ear (*Phytophthora palmivora*) are the main cause on the reduction of the cocoa production in Bolivia.

The present investigation has the principal goal to employ fungal secondary metabolites as a biological treatment, as an alternative instead of the use of pesticides an alternative for the use pesticides.

The infected plants of *Theobroma cacao* (the plants of *Theobroma cacao* showing diseases) were collected at the producer area of cocoa in Alto Beni (La Paz - Bolivia). Five different fungal strains were isolated on laboratory, and two of them were identified as *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora palmivora* and the as other saprophytes fungi

Twenty three fungal strains were tested as biological controllers of *Moniliophthora perniciosa* and *Phytophthora palmivora*. It was determined that the fungal strain IB - 17 (isolated from the altiplano) shows the best biological activity against the two phytopathogens.

In order to determine the affectivity of synthetic fungicides against the phytopathogens of the cocoa, four commercial fungicides were used: Sisthane, Benlate, Fitorraz and Mancozeb the chemical fungicide Fitorraz was selected for the control of *Moniliophthora perniciosa* and Benlate for the control of *Phytophthora palmivora*.

Liquid cultures of the strain IB – 17, static and shacked conditions were tested as possible controllers against the two identified phytopathogens, the static and shacked liquid cultures show activity against *Moniliophthora perniciosa*, batch of them showing no significant differences. Mean white only the static liquid culture shows effect on *Phytophthora palmivora*

In order to compare the biological control against synthetic controls on the *Moniliophthora perniciosa* and *Phytophthora palmivora* a dilution tests in plates was performed following the inhibition grade of the mycelial growth during seven days. The growth of *Moniliophthora perniciosa* was inhibited approximately on 60% by Fitorraz, mean white just 28% by the biological control (secondary metabolites of the strain IB - 17) grow of *Phytophthora palmivora* was inhibited approximately until 81% by Benlate, mean white just 54% by the biological control.

## 1. INTRODUCCION

En muchos países, el empleo de productos químicos se desarrolla en forma indiscriminada trayendo consigo una contaminación sistémica del hombre y la naturaleza. Actualmente el principal método para el manejo de las enfermedades en los cultivos agrícolas causadas por hongos es mediante el uso de fungicidas químicos los cuales traen como consecuencia intoxicación crónica en el hombre y problemas de contaminación ambiental.

Debido a la falta de control fitosanitario y en pos de mejorar la producción se introdujeron clones e híbridos con capacidad de producción muy buena pero a la vez también se introdujeron organismos fitopatógenos que causan daños a la producción. Entre los principales problemas fitosanitarios del cacao en Bolivia se encuentra la “Escoba de bruja”, (*Crinipellis perniciosa* (Stahel Singer), “Mazorca negra” (*Phytophthora palmivora*), “Mal de Machete” (*Ceratocystis fimbriata*) y otros. La “Escoba de bruja” es una enfermedad fúngica de gran importancia del cacao en América latina. En Bolivia se tiene Cacao criollo y cacao híbrido donde se observa una pérdida en los cultivos de casi el 70% y de los clones resistentes hasta un 50% siendo considerables estos datos en cuanto a la producción y el daño que causa esta enfermedad (Cerdeira, 2002)

Todo esto ha conducido a la búsqueda y el desarrollo de alternativas utilizando medios biológicos en este caso el uso de hongos

biocontroladores, los cuales deberán tener la capacidad de inhibir a otros hongos fitopatógenos para poder obtener resultados productivos y desarrollar una buena estrategia para que los hongos biocontroladores se conviertan en una alternativa al uso de fungicidas químicos (Astorga, 2004).

El primer cultivo de cacao ecológico que se certificó y llegó a los mercados internacionales a finales de los años 80, provenía de Bolivia. En el curso de los años 90 se sumaron otros productores entre los que se encuentran la República Dominicana, Brasil, México, Ghana y Costa de Marfil (Augstburger, et al, 2001).

La producción ecológica y orgánica en nuestro medio, es un hecho que empieza a tomar mucha mayor importancia ya que la mayoría de los países importadores ven con buenas expectativas a la producción agrícola en nuestro país, por las alternativas de manejo y el cuidado que se tiene con el medio ambiente y la salud de los consumidores. Si bien es una iniciativa novedosa en nuestro medio la producción de metabolitos secundarios para el control de fitopatógenos es una alternativa más para el control biológico de fitopatógenos que harán mejorar la producción agrícola y por ende la calidad de vida del productor.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

- Evaluar hongos antagónicos a fitopatógenos del cacao (*Theobroma cacao L.*), como alternativa de biocontrol en condiciones *in vitro*

### **2.2 Objetivos específicos**

- Aislar, identificar y verificar a los fitopatógenos del cacao: *Moniliophthora perniciosa* y *Phytophthora palmivora*.
- Determinar la cinética de crecimiento de los fitopatógenos del cacao
- Seleccionar posibles cepas de hongos biocontroladores del crecimiento de los fitopatógeno del cacao, a través del enfrentamiento dual fitopatógeno – biocontrolador.
- Evaluar la actividad biológica inhibitoria de filtrados de cultivo de hongos seleccionados
- Evaluar la actividad inhibitoria de fungicidas sintéticos como controles positivos de la actividad del biocontrolador.

### **3 REVISIÓN BIBLIOGRAFICA**

#### **3.1 Concepto de enfermedad de una planta**

Existen varias opiniones sobre el concepto de enfermedad de una planta, como ser:

Según Horsfall y Cowling citado por Scattolini, (2004), cualquier desvío de un crecimiento normal suficientemente pronunciado y permanente para producir síntomas visibles o para afectar la calidad y el valor económico de la especie vegetal en cuestión.

Según Cruz, (2001) Una enfermedad es un proceso fisiológico anormal y perjudicial causado por la continua acción de un agente causal primario, exhibido por una actividad celular anormal y expresada por condiciones patológicas anormales (síntomas)

Las plantas se encuentran enfermas cuando unas o varias de sus funciones son alteradas por los microbios patógenos o por determinadas condiciones del medio ambiente. (Agrios, 1991)

#### **3.2 Importancia económica de las enfermedades de cacao**

Según Enríquez, (1985) la descripción de una plantación saludable es un problema bastante complicado, pues depende del sistema empleado, este debe y puede cambiar con el tipo o variedad de cacao utilizado y con la ecología del lugar donde se establezca. Sin embargo para efectos de esta publicación podríamos considerar que una hectárea de cacao en una plantación saludable rinda alrededor de 1000 Kg. o más de grano seco de acuerdo con la FAO citado por Quiroz y citado por Cerda 2002 el rendimiento medio de cacao para África es de 400 kg/ha/año, en América Latina es de 300 kg/ha/año, donde la mayoría de los países productores de cacao reportan pérdidas en la producción por ataque de enfermedades en un 50% y por plagas 21%.

### 3.2.1 Principales enfermedades del Cacao

Según Enríquez, (1985) señala que las enfermedades del cacao generalmente causan más pérdidas que las plagas de insectos, debido a que pueden destruir las mazorcas y hasta pueden llegar a matar la planta. El desplazamiento del cacao entre diferentes zonas ecológicas y el cultivo intensivo, en el pasado, ha favorecido a la aparición y establecimiento de varias y diversas enfermedades y plagas.

Entre las principales enfermedades citadas por muchos autores están: Mazorca negra, Escoba de bruja y Moniliasis.

**Tabla 1. Enfermedades más importantes del Cacao y las regiones donde tienen incidencia**

<b>Escoba de bruja</b> ( <i>Crinipellis perniciosa</i> )	<b>Mazorca negra</b> ( <i>Phytophthora palmivora</i> , <i>P. capsici</i> , <i>P. citrophthora</i> )	<b>Muerte descendente</b> ( <i>Ceratocystis fimbriata</i> )	<b>Monilia</b> ( <i>Moniliophthora roreri</i> )	<b>Swollen shoot</b> Cocoa <i>Swollen shoot</i> (CSSV)
América del Sur, Trinidad, Tobago, Granadina.	En todo el mundo (poco menos en malasia)	América del Sur, Trinidad, Costa Rica, Republica Dominicana, Guatemala, Hawai, Filipinas, todavía un poco en África occidental	Ecuador, Colombia, Panamá, Venezuela.	Solo en África

Fuente: Augstburger et al, 2001

#### 3.2.1.1 Escoba de bruja

##### Importancia económica

Según Purdy y Schmidt citado por Guimarães, (2004). El *Crinipellis perniciosa* es un hongo agente causal de la escoba de bruja, produce grandes pérdidas en la producción de cacao en América Latina y en varias islas de Caribe. De acuerdo con (Gómez et al., 1989) “es una de las enfermedades que mayor impacto económico ha causado a los cultivadores



de cacao, en cacaotales mal manejados las pérdidas pueden alcanzar hasta el 80% de la producción.

El hongo no mata a la planta, pero la debilita y puede ocasionar la pérdida total de la cosecha. En Alto Beni hasta 1972 la incidencia de Escoba de bruja fue mínima, pero a partir de 1978 los niveles comenzaron a ser alarmantes. Hasta 1980 los rendimientos eran buenos y se cosechaba hasta 40 qq/ha, pero luego bajó hasta 3 a 5 qq/ha, inclusive a cero, por el ataque de Escoba de bruja y Mazorca negra, debido a la falta de asistencia técnica. Por esas razones varios agricultores talaron sus plantaciones de cacao y las sustituyeron por otros cultivos como; los cítricos que les proporcionarían mayores ingresos económicos (Quiroz, citado por Cerda 2002).

### **Etiología**

Según Aime y Phillips-Mora, (2005) La enfermedad de la Escoba de bruja del cacao es causada por el hongo *Moniliophthora perniciosa* donde, hasta hace muy poco fue conocida como: *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer (anterior a esto conocido como *Marasmius perniciosus*), todo esto según a la caracterización molecular llevada en el Laboratorio Botánica Sistemática y Micología de USDA – Agricultural Research Service.

Según Cruz, (2001) pertenece a la División Eumycota, Sub División Basidiomycotina, Clase Hymenomycetes (Heterobasidiomycetes), orden Agaricales, Familia Trichomalataceae.

Se informó primero en 1895 de Surinam y se encuentra actualmente en varios países de América del Sur y las islas caribeñas. La enfermedad comienza por basidiosporas produciendo los champiñones rosados llamado basidiocarpos, los mismos que se dispersan por efecto del viento y lluvia hacia las hojas, flores, y frutas (las vainas) de las plantas de cacao. Se estima que un solo basidiocarpo puede soltar 80 a 90 millones de

basidiosporas. En la presencia de humedad libre (la lluvia y rocío) y la humedad relativa alta, las basidiosporas germinan y penetran los tejidos del meristemáticos jóvenes, en los brotes vegetativos y florales a través del estoma, epidermis, o tricomas. Los tejidos colonizados sufren varios cambios fisiológicos y hormonales que llevan a inflar y forman numerosas ramas vegetativas suculentas conocidas como las escobas, dentro de los cojines de la flor y en el apical vegetativo o los brotes axilares. Las escobas normalmente se forman dentro de 5 a 6 semanas. El hongo también infecta vainas que causan lesiones necróticas, con una maduración con varias deformaciones (Bowers, 2001).

### **Sintomatología**

Según Tovar, (1991) El cuadro sintomatológico de la escoba de bruja representa un interés práctico en el diagnóstico de la enfermedad. Los síntomas han sido descritos por varios investigadores a partir de estudios sobre el proceso de infección en yemas vegetativas, cojines florales y frutos. (Mejía y Palencia citado por Cerda, 2002) indica ataca a todas las partes de la planta en activo crecimiento, menos a la raíz.

Según Porras y Sánchez, (1991) el síntoma más característico es la proliferación de yemas axilares que producen brotes vegetativos hipertrofiados con forma de abanico, por lo que se denomina Escoba de bruja, cuando empiezan a formarse se llaman escobas verdes, después de seis a siete semanas se marchitan y se secan, entonces se conocen como escobas secas.

Los Síntomas en yemas de plántulas según (Tovar, 1991) son clasificadas en:

Escoba típica: Consiste en la hipertrofia del brote principal y el desarrollo de yemas axilares también hipertrofiadas; proliferación, agrandamiento y persistencia de las estipulas en el ápice de las yemas; base del pecíolo

de las hojas hipertrofiado. En inoculaciones artificiales se pueden presentar la formación de un cáncer en el sitio de la inoculación. Las hojas de la escoba presentan generalmente clorosis.

Escoba látigo: El eje del brote aparece hipertrofiado, siendo más ancho en la base, adelgazándose hacia el ápice; las yemas axilares no se desarrollan o lo hacen brevemente; hay abscisión de las hojas, quedando las cicatrices sobre el brote; el ápice presenta un grupo denso de estípulas, generalmente más grandes de lo normal y persistentes. En algunos casos las estípulas se presentan acompañadas de hojas pequeñas y cloróticas. Las plántulas con escobas látigo pueden recuperarse y presentar un crecimiento aparentemente normal.

Según Suárez y Delgado, (1993) En los cojines florales infectados se desarrollan escobas de tamaños variables y generalmente también se desarrollan pequeños frutos partenocárpicos que adquieren la forma de “fresa” ó “chirimoya”, los cuales se secan rápidamente. Las flores individuales que son infectadas desarrollan un pedúnculo grueso, también se secan y reciben el nombre de flores estrella... (Tovar, 1991) Indica que La penetración del hongo a nivel de cojines pueden realizarse a través de la flor, la cual se necrosa sin hipertrofiarse, permaneciendo adherida al cojín, o a través del ovario fecundado.

En los frutos en desarrollo infectados se produce un abultamiento o hinchazón que se torna de color oscuro y de consistencia dura, el fruto no llega a madurar y presentan almendras acuosas sin ningún valor (Gómez et. al., 1989).

## **Epidemiología**

En climas donde el cacao se cultiva se distinguen principalmente una distribución anual de lluvias y la presencia o ausencia de períodos secos de gran magnitud. En los extremos, abunda, la distribución de lluvias a lo largo

del año, o en períodos de 4 a 6 meses con poca o sin lluvia. El sistema que controla el patógeno de la enfermedad de la escoba de bruja es manejado principalmente y se encuentra obligado a una atmósfera húmeda (lluvia, neblina, rocío y humedad relativa), la presencia o ausencia de cualquiera de estas condiciones de epidemia puede hacer que varíen los efectos de la fenología del hospedero, producción, liberación y dispersión de basidiosporas, infección y la sincronización de estos eventos. La temperatura regula la tasa de desarrollo de la enfermedad, pero es raro que exista un factor limitante en el desarrollo de la misma. La temperatura puede jugar un papel importante en estas afecciones cuando el cacao se encuentra en crecimiento como por ejemplo en: a) Secamiento de escobas (se relaciona con la producción de basidiosporas); b) evapotranspiración, que induce estrés de humedad y vaciado de tejidos del hospedero y en relación al incremento en número, sincronización e infección de plazas, y c) formación de rocío en tejidos susceptibles del hospedero, relacionándose de esta manera con el abastecimiento de humedad para la germinación de esporas y su subsiguiente infección. (Purdy y Schmidt, citado por Guimarães, 2004)

Según Suárez y Delgado, (1993) los basidiocarpos se forman sobre tejidos muertos por acción del hongo, especialmente sobre escobas y frutos secos, bajo condiciones favorables de precipitación (1000 a 2000 mm de promedio anual), humedad por encima del 80% y temperatura entre 22 y 28°C. Las esporas son liberadas por la noche y dispersadas por el viento, para germinar requieren de una temperatura de 27°C y una película de agua libre.

Según Mierelles, (2002) las basidiosporas son muy sensibles a la luz ultravioleta y fácilmente pueden ser desecados, pueden perder la capacidad de germinación rápidamente. (Purdy y Schmidt, citado por Guimarães, 2004) menciona que si las basidiosporas caen sobre superficies secas pierden inmediatamente su viabilidad, germinan cuando

se posan sobre superficies mojadas de estructuras suaves del cacao, como brotes, cojines florales ó frutos.

Sin embargo, la liberación nocturna garantiza la supervivencia durante más tiempo.

Según Quiroz, citado por Cerda, (2002) en la región cacaotera de Alto Beni, la mayor liberación de esporas ocurre entre los meses de enero hasta agosto (Humedad mayor a 80%), que entre agosto y diciembre existe la mayor mortandad de esporas por insolación (Humedad relativa menor 80%).

En el trópico húmedo, el sistema patógeno de la enfermedad de la escoba de bruja es único en su etiología y en su epidemiología, especialmente al compararlo con el sistema continuo del patógeno en las regiones templadas. El patógeno es un Hymenomycete, es un biotrofo en la fase de infección y empieza a ser saprofito en estados tardíos de colonización, esporula únicamente sobre tejidos muertos del hospedero. Muchos Hymenomycetes son saprofitos; algunos son parásitos facultativos, pero usualmente estos no invaden los tejidos en crecimiento. Ni infectan a tejidos vegetativos y reproductivos. Lo más importante, es que el sistema patógeno de la escoba de bruja es continuo, especialmente en lugares con alta precipitación durante el año. Es decir, no hay una separación temporal del tejido susceptible del hospedero y el inóculo del patógeno, esto desde que no exista un periodo prolongado de dormancia para ninguno de los dos. En la incidencia de la enfermedad se presenta un pico y una calma, especialmente en áreas con prolongados periodos secos, con el final de algún ciclo de la enfermedad durante la época seca y el comienzo de otro ciclo con la venida de la época lluviosa (Purdy y Schmidt, citado por Guimarães, 2004).

Según Mierelles, (2002) la penetración de basidiosporas es a través del estomas, heridas o directamente En ese estadio de la enfermedad, el

patógeno se comporta como biotrófico, creciente intercelularmente, con hifas entumecidas, (Evans y Bastos, 1979 citados por el mismo autor) el desarrollo del patógeno causa desorden fisiológico en la planta, probablemente interfiriendo en el balanceo hormonal, produciendo la hipertrofia e hiperplasia de células. En las ramas, la hipertrofia se acompaña de intensos brotes de yemas laterales, dando la característica de escoba.

### **3.2.1.2 Mazorca negra**

#### **Importancia económica**

La enfermedad negra de la vaina del cacao es un problema económicamente serio en todas las áreas del mundo donde crece el cacao. Las pérdidas anuales debido a la vaina negra pueden extenderse a partir del 30 - 90% de la cosecha. Esta enfermedad es especialmente severa en África del oeste y central que contribuye 60 - 70% de la producción del mundo de los granos de cacao. Este hongo patógeno como microorganismos está distribuido mundialmente. Las especies de *Phytophthora* son patógenos en las cosechas mas importantes del mundo y el daño económico que puede causa esto, tal el caso del *Phytophthora infestans* causante del último destroz de la patata. (Bowers, 2001).

Según OARDC, (2006) la pérdida económica mayor en el cacao es la infección de la vaina pueden infectarse las vainas a cualquier edad, pero la pérdida económica más significativa se levanta de la infección durante los meses a madurar. Vainas infectadas en esta fase pueden ser una pérdida total porque el hongo puede pasar fácilmente de la cáscara de la vaina a la semilla o en una vaina verde en vías de desarrollo.

Según Franco, (2002) esta es la enfermedad más importante en todas las áreas cacaoteras del mundo, porque provoca las mayores pérdidas en la cosecha. Ataca todas las partes de la planta: raíz, tallo, flores y frutos; pero

el mayor daño o sufren las mazorcas que pueden podrirse, en un plazo de 10 a 15 días, hasta el 100% de ellas.

Según Enríquez, (1985) la severidad del daño parece asociada o varia, directamente de acuerdo con la presencia de diferentes tipos de compatibilidad del organismo causal. Debido a la reproducción sexual de este patógeno, con la siguiente recombinación de factores genéticos, se hace muy difícil el mejoramiento de tipos de cacao resistentes como sucede en Nigeria y en Camerún.

### **Etiología**

Según Lannamico y Rossini, (2007) Existen unas setenta especies de *Phytophthora* que atacan diversos cultivos con efectos muy nocivos. Precisamente el nombre del género proviene del griego, significando “destructor de plantas” (*phyto* = *planta*, *phthora* = *destrucción*).

Según Enríquez, (1985). Esta enfermedad es causada por hongos Phycomicetos del genero *Phytophthora*, Hasta la fecha se han identificado las siguientes especies: *P. palmivora*, *P. paracitica*, *P. siringae* *P citrici*, debido a su amplia distribución en todos los países cacaoteros, ya que ataca mas de 40 familias botánicas, es difícil saber exactamente cual se observe por primera vez en el cacao. Aunque este patógeno es ampliamente conocido como un hongo, de la clase Oomycete, recientemente este grupo ha sido reclasificado dentro de los Chromistas (algas), gracias a estudios de DNA (O’Gara, 2003 citado por Cerda 2002). Según Wikimedia 2006 se caracteriza de la siguiente manera: Clase: *Oomycetes*; Orden: *Peronosporales*; Familia: *Pythiaceae*; Género: *Phytophthora*; Especie: *P. palmivora*.

*Phytophthora* se reproduce más de forma asexual en el campo, ésta se caracteriza por producir esporangios que contienen esporangiosporas y zoosporas que se diseminan por el salpique del agua de lluvia. Los

esporangios también tienen la capacidad de germinar (Porras y Sánchez, 1991).

### **Sintomatología**

El hongo puede atacar a diversas partes del árbol (cojines florales, chupones, brotes, hojas, ranas, tronco y raíces), el daño más grave ocurre en las mazorcas. Estas pueden ser atacadas en cualquier etapa de desarrollo. La primera indicación de la infección es una mancha circular que progresa con céntricamente, hasta cubrir toda la mazorca. La decoloración progresa internamente a medida que el fruto se pudre. Un fruto así atacado será completamente destruido en un máximo de dos semanas. Además de las pudriciones de la mazorca, el hongo causa lesiones cancerosas, principalmente en el tronco y las ramas (Enríquez, 1985)

Cuando *Phytophthora* infecta el tronco la planta se marchita y se observa un amarillamiento, en el lugar dañado se produce una secreción gomosa y cuando se quita la corteza se puede observar una coloración rojiza en el tronco (Mejía y Palencia, 2000 citado por Cerda 2002). A medida que la enfermedad avanza en la corteza, ésta se agrieta, si se oprime la zona afectada brota un líquido, y al hacer un raspado se observa coloraciones de violeta, azul vinotinto o rojizo (Manrique et. al., 1988 citado por Cerda, 2002).

Según Lannamico y Rossini, (2007). Los síntomas de la parte aérea comienzan con un decaimiento de la planta, follaje amarillento y caída prematura de hojas, principalmente de las terminales del brote. Paralelamente hay un menor vigor y una detención en el crecimiento del año. Estos síntomas pueden desarrollarse en una o varias temporadas, pudiendo haber ataques muy severos que matan al árbol en pocas semanas a ataques más leves que debilitan a la planta durante tres o cuatro años, terminando luego con su muerte.



## **Epidemiología**

Según Lannamico y Rossini, (2007) "*Phytophthora*" se encuentra presente en muchos suelos, sobre todo en las capas superficiales, y en ese medio puede subsistir durante muchos años, aun sin tener plantas hospedantes que atacar. Cuando las condiciones sean favorables (altas temperaturas y exceso de agua en el suelo) producirá infección si existen árboles en el medio. Según (Wikimedia, 2006). Durante períodos lluviosos, las clamidiospóoras en suelo pueden germinar en agua para producir los esporangios y para lanzar zoosporas. El impacto de las gotas descendentes de la lluvia puede salpicar zoosporas en el aire en gotitas. Las gotitas de zoosporas que contienen pueden ser dispersadas más a fondo por el viento y convertirse en el inoculo para infectar la fruta. El patógeno produce los esporangios abundantes en la superficie de la fruta infectada que son dispersados más a fondo por la lluvia viento - soplada y causan brotes de putrefacción de la fruta de *Phytophthora* en el mismo y las huertas próximas.

Manrique et. al., 1988 citado por Cerda, (2002) indica que la germinación del patógeno requiere de agua, por esa razón la infección casi siempre empieza en el ápice de la mazorca, donde hay retención de agua, y en el enganche con el pedúnculo o en la unión de dos mazorcas, donde puede germinar. En frutos infectados después de 4 a 6 días sobre los primeros síntomas aparece un micelio blanco y se forman las esporas, la reproducción es mejor con una alta humedad relativa y con temperaturas entre 18 y 20°C (Enríquez, 1985).

El daño por *Phytophthora* es más grave en durante los meses lluviosos, en cacaotales muy sombreados y con mal drenaje. El proceso de la enfermedad ocurre en dos formas:

Diseminación vertical dentro del árbol, resultado del contacto entre mazorcas sanas y enfermas, movimiento de agua y actividad de insectos,

especialmente hormigas, y; Diseminación horizontal entre árboles y parcelas vecinas, por acción del viento, insectos y otros animales (Porrás y Sánchez, 1991). Cuando hay exceso de sombra, el ambiente se vuelve húmedo y la temperatura baja favoreciéndose el ataque de enfermedades como la denominada mazorca negra causada por el hongo *Phytophthora* que favorece el ataque de algunos insectos dañinos (Moreno y Sánchez, 1991)

Las principales fuentes de inóculos identificadas han sido: el suelo, los cascarones de cacao apilados, las mazorcas momificadas, los cojines florales, la corteza del cacao que crecen cerca del suelo y algunos árboles de sombra. (Enríquez, 1985)

La severidad y frecuencia del ataque de ésta enfermedad dependen sobre todo de la duración de la época lluviosa y de la presencia de agua líquida, ya sea por lluvias, por mal drenaje o por inundación, en esas condiciones los zoosporas germinan y son la principal fuente de contaminación (Capriles de Reyes, 1996 citado por Cerda, 2002).

### **3.3 Control biológico de enfermedades**

Baker y Cook, citados por Agrios, (1998) definen el control biológico como la reducción de la densidad del inóculo o actividad productora de enfermedad de un patógeno o parásito en su estado activo o latente, por uno o más organismos antagónicos, en forma natural o por manejo del habitante hospedero o de los propios microorganismos.

Según Ciancas, (2006) El control biológico involucraría todas aquellas prácticas tendientes a disminuir las incidencias de plagas indeseables excluyendo el control químico. El control biológico en un sentido más restringido de hongos, implica el uso de microorganismos antagonistas que interfieren en la supervivencia de patógenos o en el desarrollo de

actividades determinantes de enfermedad o en el control de plantas o malezas indeseables

El control biológico fue concebido a inicios del siglo XIX cuando algunos naturistas de diferentes países reseñaron el importante papel de los organismos entomófagos en la naturaleza. Con el empleo de la lucha biológica se intenta restablecer el perturbado equilibrio ecológico, mediante la utilización de organismos vivos o sus metabolitos, para eliminar o reducir los daños causados por organismos perjudiciales (Webcolombia, 2005).

La diversidad biológica constituye, en la actualidad, la mayor riqueza potencial de los países del Tercer Mundo. Las perspectivas de su explotación adecuada y racional deberían estar relacionadas con el conocimiento sobre su uso, lo que es, a su vez, otra riqueza potencial conservada por las culturas locales. Sin embargo, todo este caudal de recursos (alimentos medicamentos. pigmentos, fibras, ornamentos, aromas, insecticidas, aditivos, resinas, biopolímeros, etc.), no es objeto de explotación local, porque las formas dominantes de generación de riqueza giran en torno al monocultivo extensivo e intensivo, esto, según las inclinaciones del mercado (Astorga, 2004). El control biológico utilizando micoparásitos especialmente hongos filamentosos, que son productores de metabolitos biológicamente activos, que constituye hoy en día una alternativa que podría sustituir el control químico que además de su elevado costó, trae como consecuencia el desarrollo de mecanismos de resistencia en el hongo patógeno, y problemas de contaminación y toxicidad (Escande et al., 1999 citado por Ciancas, 2006).

### **3.3.1 Los hongos como agentes de biocontrol**

En el control biológico se utiliza las esporas o los filtrados de cultivos que actúan por medio de productos metabólicos que ejercen acción sobre la pared celular, membrana y ácidos nucleicos de sus hospederos o por micoparásitos matando las estructura invadidas directamente,

reduciendo de esta manera la concentración de espora o la densidad poblacional, y por ende el ataque de muchos hongos fitopatógenos de importancia económica. (Elad y Katan, 1980).

### **3.4 Metabolitos secundarios**

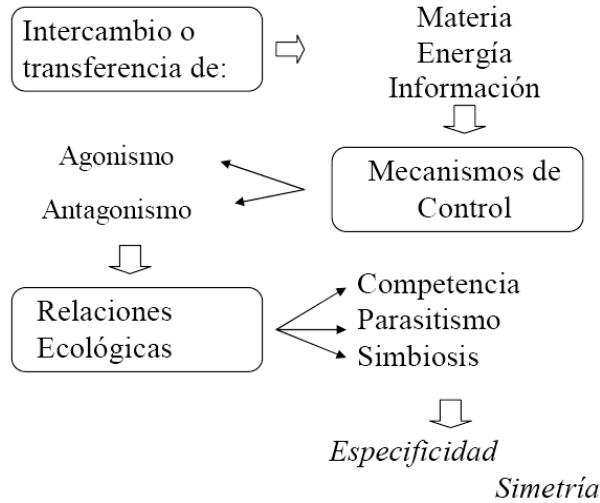
#### **3.4.1 Relación entre organismos**

Los seres vivos están diferenciados en gran número de tipos de organización.

Para realizar el estudio de las formas vivientes se han de reunir en grupos según sus afinidades anatómicas y fisiológicas. Los caracteres de los individuos no tienen todos la misma categoría, sino que hay unos subordinados a otros, siendo el principio de la clasificación natural de los seres vivos (Haro, 1988).

Según Kalam, (1999) clasifica al ecosistema como la unidad fundamental (básica) de la biosfera y estaría compuesta de los componentes: las comunidades animales, comunidades vegetales, biotopos y nichos, cadenas energéticas sostenidas por ciclos biogeoquímicos, iniciados por la energía solar. Básicamente un ecosistema dado, representa a una o más zonas de vida.

Según Forchiassin et al. (1999) en un esquema hipotético del suelo, puede verse la coexistencia de una inmensa variedad de microorganismos: raíces de plantas, lombrices, artrópodos, bacterias, hongos, protozoos... Todos estos organismos están interrelacionados en el ambiente que los contiene. Las relaciones entre ellos significan intercambios o transferencias de materia, energía o información. Por ejemplo: materia y energía transferida por la presa al predador, información a través de las señales químicas de atracción o rechazo.



**Figura 1. Relación entre organismos**

Los mecanismos a través de los cuales los suelos inhiben el desarrollo de los diferentes patógenos no siempre son claros, pero pueden involucrar factores bióticos y/o abióticos e incluso variar de acuerdo al patógeno. Sin embargo en la mayoría de los casos al parecer principalmente gracias a la presencia, en los suelos, de uno o varios microorganismos antagónicos al patógeno, dichos antagonistas, gracias a los antimicrobianos que producen, por competencia de nutrientes o al parasitar directamente al patógeno; evitan que este último alcance poblaciones suficientemente altas para causar enfermedades severas (Agrios, 1996).

### **3.4.2 Definición de metabolitos secundarios**

Los metabolitos secundarios son el efecto del metabolismo secundario, en este caso de microorganismos donde muchos autores lo definen de la siguiente manera:

Según Martin y Demain, citado por Forchiassin et al. (1999) “Los metabolitos secundarios son aquellos que frecuentemente son producidos en la fase siguiente a la del crecimiento; no tienen función para el crecimiento (aunque pueden tener una función de supervivencia); son

producidos por ciertos grupos restringidos de organismos; tienen estructuras químicas inusuales...’

Según Bennett y Bentley, citado por Lagunas y Trigos (2006) han sugerido que el término “metabolismo especial o específico” debe ser preferido al del “metabolismo secundario”, evitándose así la implicación de que pierda importancia, pues tradicionalmente asociamos el término “secundario” a algo que está en segundo plano y carece de importancia. “Un metabolito secundario es un producto o un intermediario, hallado como resultado de la diferenciación en grupos taxonómicos restringidos, no esenciales para el crecimiento o la vida del organismo productor, biosintetizado a partir de uno o más metabolitos primarios por una gran variedad de caminos metabólicos, disponibles en cualquier célula...”

La definición exacta del concepto metabolismo secundario es muy compleja. En términos generales se puede considerar que el metabolismo secundario incluye todos aquellos procesos por medio de los cuales los microorganismos producen sustancias que por su naturaleza química no pueden considerarse necesarias en su ciclo vital ni para el crecimiento celular. (Calvo, 1993)

### **3.4.3 Origen y evolución de los metabolitos secundarios**

Los metabolitos secundarios fueron seleccionados en el curso de la evolución, pues aumentan la capacidad de supervivencia del organismo productor.

El estudio de las sustancias antagonistas elaboradas por los microorganismos en su metabolismo secundario fue iniciado por Pasteur en el año 1877. Desde los estudios de Pasteur han sido numerosos investigadores que han centrado su interés en el estudio del metabolismo secundario de los microorganismos, culminando estas investigaciones en el descubrimiento de los agentes antimicrobianos, algunos de los cuales han

podido ser utilizados con fines terapéuticos, iniciándose con ello la era de los antibióticos. (Calvo, 1993)

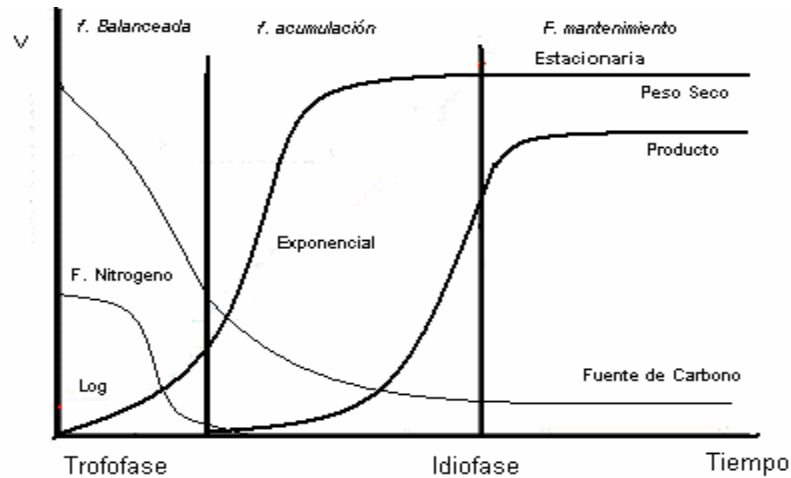
### **3.4.4 Función de los metabolitos secundarios**

#### **3.4.4.1 Regulación del metabolismo secundario**

La regulación del metabolismo secundario de los microorganismos incluye un control nutricional y un control de la tasa de crecimiento y se halla íntimamente relacionada con la regulación del metabolismo primario (Drew y Demain, 1977 citado por Calvo, 1993).

En la naturaleza, la biosíntesis de metabolitos secundarios esta frecuentemente correlacionada con al aparición de estructuras especiales (esporas, esclerocios, cuerpos fructíferos). En el Laboratorio, el metabolismo secundario suele estar asociado con el final de la fase logarítmica de crecimiento (fase logarítmica trofofase) y el inicio de la fase estacionaria (idiofase). Según (Forchiassin et al 1999), es un hecho que el metabolismo secundario se activa cuando el ritmo de crecimiento disminuye, esto es al final de la trofofase, o al comienzo de la idiofase. En el metabolismo secundario las fases de crecimiento se denominan trofofase, fase de crecimiento logarítmico donde normalmente no se producen los metabolitos secundarios, e idiofase, fase estacionaria donde normalmente se producen los metabolitos secundarios. (Mateos, 2006)

**Figura 2. Cinética de crecimiento**



Fuente: Forchiassin et al 1999

Más allá de la estructura química o el origen biológico, todos los metabolitos secundarios comparten la propiedad enigmática de su supuesta inutilidad para las células productoras los organismos productores pueden vivir felices sin hacer uso jamás de los caminos biosintéticos que resultan en la producción de metabolitos son amputados o inactivados por tratamientos genéticos, el efecto no es letal o al menos en el curso de una experiencia de laboratorio. Esta clase de especulaciones llevo a Demain a definir a un metabolito secundario como aquel, al que si se elimina el camino metabólico de biosíntesis por mutación artificial, el organismo sigue creciendo (Yo agrego: vivirá incomunicado, sin consecuencia de si mismo ni de otros organismos). Forchiassin et al 1999

### **3.4.4.2 Producción de metabolitos secundarios**

#### **3.4.4.2.1 Tipos y procesos de fermentación**

Higgs et. al., citado por Ciancas, (2006) describe un rápido método para estimar la presencia de metabolitos secundarios en extractos microbianos. Según Forchiassin, et. al. (1999) existen tres tipos básicos de procesos de fermentación:



**a. Cultivos por lotes (Batch)**

Estos cultivos implican un sistema cerrado, una cinética univoca.

Se parte de:

- Biomasa inicial
- Medio de cultivo definido e inalterado hasta la cosecha,

El desarrollo del cultivo (su cinética) implica: el crecimiento de la biomasa a expensas del substrato: aumenta la masa célula, disminuye el substrato, aumenta la producción de un dado producto.

El punto final del cultivo es la cosecha: se recupera la biomasa, el producto en sobre nadante o ambos.

El concepto cinético del sistema implica necesariamente el punto final del sistema (lote, batch).

[Producción tradicional de penicilinas]

**b. Cultivos por lotes realimentados (Fed-Batch)**

Estos cultivos implican un sistema semicerrado, y una cinética univoca.

Se parte de:

- Una biomasa inicial (inóculo)
- Un medio de cultivo definido, dosificado desde la inoculación hasta la cosecha.

El desarrollo del cultivo (su cinética) implica: el crecimiento de la biomasa a expensas del substrato que le es provisto por pasos: aumenta la masa celular, aumenta la producción de un dado producto.

El punto final del cultivo es la cosecha: se recupera la biomasa, el producto en sobre nadante o ambos.

El concepto cinético del sistema implica necesariamente el punto final del sistema (Batch).

[Producción de Levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*)]

### **c. Cultivos continuos**

Estos cultivos implican un sistema abierto, y una cinética independiente del tiempo en tanto se mantenga el equilibrio.

- Existe (en el equilibrio):
- Una biomasa una concentración de substrato, invariantes.
- Una provisión continúa de substrato.
- Una salida continua de substrato, biomasa y producto.

Los parámetros cinéticos de un sistema continuo son muy diferentes de un cultivo en batch, Las diferencias se fundamentan en la geometría del sistema. Los vectores velocidad, producción, se corresponden con la dinámica de fluidos mas que con la actividad de las células.

Esta característica, es de importancia fundamental en sistemas de producción, pues hace a la geometría del reactor, independiente del sistema biológico, en el marco de parámetros biológicos definidos.

## **4 LOCALIZACION**

### **4.2 Localización de la recolección de muestras**

#### **4.2.1 Ubicación Geográfica de la recolección de muestras**

La recolección de muestras fitopatógenas para el presente trabajo se desarrolló en la Provincia Sud Yungas cuarta sección de Palos Blancos, Localidad de Sapecho, Alto Beni, situada a 270 Km. del centro de la ciudad de La Paz, que se encuentra localizada a 15° 33' 675" latitud Sur y 67°19' 550" longitud Oeste, a una altitud de 450 m.s.n.m. a una temperatura promedio de 25 °C y una precipitación pluvial de 1500 mm.

### **4.3 Localización del laboratorio del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas**

Este trabajo es parte del proyecto Biodiversidad microbiana Programa UMSA – Asdi/Sarec, la Universidad Mayor de San Andrés con el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas y la Universidad de Lund (Prof. Bo Mattiasson) Departamento de Biotecnología Ambiental,

#### **4.3.1 Características del laboratorio de Biotecnología Ambiental del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas**

La Unidad de Biotecnología ambiental desarrolla temas de investigación con microorganismos, como ser: Bacterias y Hongos; el ambiente esta distribuida en cuatro áreas que son: Área 1 de recepción, Oficina; Área 2, la preparación de medios donde se encuentran los esterilizadores (Autoclaves horno esterilizador) las cocinillas y los refrigeradores; Área 3, es el área de manipuleo de microorganismos, donde se encuentran las cabinas de seguridad biológica, refrigerador, etc., el área tiene una temperatura promedio de 22+/-5°C; área 4, área de incubación, esta área se encuentra a una temperatura de 27+/-2°C en esta área se encuentra el Shaker orbital en esta área se deja desarrollar las cepas que están estudio.

## **4.4 Materiales**

### **4.4.1 Material Biológico**

- Cepas de hongos fitopatógenos del cacao
- Cepas de hongos antagónicos del laboratorio de IIFB
- Cepas recolectadas del Altiplano Boliviano con el IIDEPROQ

### **4.4.2 Material de Laboratorio**

- |   |                                 |
|---|---------------------------------|
| - Frascos de vidrio                               | - Propipeta                     |
| - Matraces de 250ml y 125ml                       | - Portaobjetos                  |
| - Probetas de 500 ml                              | - Cubreobjetos                  |
| - Cajas petri grandes                             | - Gradillas                     |
| - Cajas petri medianas                            | - Pinzas                        |
| - Cajas petri pequeñas                            | - Parafilm                      |
| - Tubos de ensayo grandes                         | - Algodón y Gasa                |
| - Tubos de ensayo medianos                        | - Cinta Masquin                 |
| - Tubos de ensayo pequeñas                        | - Scotch grueso y delgado       |
| - Pipetas de 10, 5, 1 ml                          | - Pizeta                        |
| - Viales de 10 y 150 ml                           | - Mechero                       |
| - Pipetas pasteur y chupón                        | - Tijeras                       |
| - Tips de 1 ml y 200 $\mu$ l                      | - Jeringas de 5, 10 ml          |
| - Micropipetas de 1 ml, 500 $\mu$ l y 200 $\mu$ l | - Asas y agujas bacteriológicas |

### **4.4.3 Medios**

- |                      |                        |
|----------------------|------------------------|
| - Agar agar          | - Extracto de levadura |
| - Glucosa            | - Agar Mc Conkey       |
| - Agar nutritivo     | - Medio mínimo         |
| - Malta agar         | - Medio Basal          |
| - Papa dextrosa agar | - Agar Saboraud        |
| - Caldo papa         | - Caldo Saboraud       |

#### **4.4.4 Reactivo**

- Alcohol al 70 %
- Hipoclorito de sodio
- Agua destilada
- Ácido dinitrosalicílico
- Mancozeb
- Fitorraz
- Benlate
- Sisthane
- Hidróxido de sodio
- Ácido clorhídrico
- Aceite de inmersión
- Azul de metileno

#### **4.4.5 Equipos**

- Microscopio
- Balanza
- Espectrofotómetro
- Campana de Flujo laminar
- Estufa
- Baño Maria
- Refrigerador
- Shaker
- Centrifugadora
- Autoclave
- Cámara Neubauer
- Bortex
- Esterilizador de calor seco
- pHmetro

### **4.5 Método**

#### **4.5.1 Procedimiento experimental**

##### **4.5.1.1 Recolección de muestra**

La mayoría de las especies fúngicas tienen una vida muy efímera y en pocas horas envejecen o pueden cambiar de aspecto, para ello se recogió ejemplares de diferentes partes afectadas de la planta como ser, Hojas, tallos, frutos todos en estado enfermo.

Al momento de recoger las muestras se anotaron todas sus características más percederas ya que, con la manipulación o el transporte, pueden desaparecer parcialmente estas características o modificarse.

#### **4.5.1.2 Tratamiento del material para el aislamiento**

El lavado del material para el aislamiento e identificación de los hongos, para esto se utilizó detergente líquido para el lavado y un enjuague de 5 veces, una final con alcohol donde posteriormente se esteriliza en autoclave a 15 atmósferas, 121°C por 15 min.

La Asepsia es muy importante en el laboratorio de esta unidad puesto que se trabajan con organismos microscópicos, para evitar contaminantes se hizo la desinfección de superficie de la campana de flujo laminar con solución de hipoclorito de sodio al 2 % antes y después de iniciar el trabajo. Las herramientas que se utilizaron para cortar los tejidos afectados, en recipientes que contengan alcohol al 70 % para luego flamear en el mechero.

#### **4.5.1.3 Medios de cultivo**

La mayoría de los medios de cultivo contienen extracto de una fuente natural de carbono y otros nutrientes, tal como: papa, y otros a los que se añaden agar para solidificar el medio y formar un gel en el que el patógeno se desarrollara y podrá ser observado.

El medio de cultivo mas utilizado para este trabajo por su efectividad y su costo fue: Agar Papa Dextrosa que se lo puede conseguir en forma preparada y cuyas características se hallan detalladas en el Anexo 6.

#### **4.5.1.4 Aislamiento de hongos fitopatógenos (Escoba de bruja y Mazorca negra)**

En cuanto se refiere al aislamiento de hongos fitopatógenos del interior de los tejidos enfermos de una planta no es necesario esperar la esporulación o la formación de otra estructura de fructificación en cámara húmeda en este caso después de desinfectar la superficie de los tejidos la enfermedad suele subsistir intracelularmente. En las enfermedades del cacao existe

muchas referencias sobre la Escoba de bruja y Mazorca negra la extracción de las muestras fueron directas sobre los tejidos enfermos como ser hojas, tallos, frutos, y ramas de poda en el piso.

#### **4.5.1.5 Tratamiento presiembra de hongos fitopatógenos.**

Este tratamiento tiene como objetivo eliminar a microorganismos saprofitos que por el estado de la muestra, el cuidado que se tuvo al momento de la recolección pueden darnos malas referencias con referente a la recolección del material deseado, además esta otro factor muy importante la distancia entre el lugar de recolección y el sitio de estudio, donde el tiempo será un factor muy importante para aislar la muestra deseada.

Para desarrollar el aislamiento de hongos patógenos del cacao se basó en la siguiente metodología planteada por Agrios (1996), con algunas modificaciones utilizadas en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas:

- Planta infectada (Muestra)
- Se hacen cortes del borde de la lesión y se colocan a una solución de cloro al 2% durante diferentes tiempos.
- Se realizó el enjuague con agua destilada estéril
- Se coloca en una solución de alcohol al 70%
- Se realizó nuevamente un enjuague con agua destilada estéril
- Para todo el trabajo se utilizan pinzas estériles para trasladar los cortes.
- Los cortes de tejido se ponen a secar en papel filtro estéril para eliminar el exceso de agua
- Se colocaron los cortes en caja petri que contiene el medio de cultivo

#### **4.5.1.6 Siembra en medio de cultivo sólido**

- Se sembró el material lavado y/o desinfectado directamente en el medio de cultivo, ubicándolo con una pinza estéril sobre el medio escogido,
- Posteriormente Incubamos a 28 °C hasta la observación de micelio desarrollado sobre la superficie de tejido.
- Incubamos las placas selladas con parafilm en presencia de luz porque la mayoría desarrolla mejor en estas condiciones.
- Se obtuvo un cultivo puro del patógeno mediante el resembrado de una porción de él en otra caja que contenga medio de cultivo.

#### **4.5.1.7 Preparación en cámara húmeda**

Para la preparación en cámara húmeda colocamos la muestra enferma en recipientes de vidrio con un trozo de algodón embebido en agua. Es necesario mantener el recipiente cerrado a temperatura ambiente, hasta que se visualice el signo del hongo. La muestra a colocar en el recipiente limpio para que los resultados no se vean alterados por posibles contaminantes.

#### **4.5.1.8 Identificación de hongos fitopatógenos**

El estudio de hongos fitopatógenos es muy importante en la agricultura estos hongos rara vez viven solos en su hábitat natural ya que frecuentemente están con otros microorganismos por lo que es necesario aislarlos en cultivos puros por lo que es necesario identificar las estructuras primaria y secundaria que cuenta el hongo a ser analizado para lo cual se realizó.

##### **4.5.1.8.1 Raspadura directa para observar en el microscopio a (10x y 40x)**

- Realizamos raspados superficiales en las zonas afectadas de las plantas enfermas con la ayuda de una aguja de disección.



- Coloramos los raspados en un portaobjetos que contengan una gota de azul de lactofenol.
- Cubriendo con cubreobjetos y observamos al microscopio con aumentos de 10X y 40X.

#### **4.5.1.8.2 Examen macroscópico en placas**

Una vez que el hongo es inoculado en placa y este tenga 2 cm de su punto de origen, o este por hacer contacto los hongos de las otras siembras en la placa es el momento de transplantarlo individualmente a placas con el mismo medio de cultivo fresco y finalmente cuando se observó que la cepa crece sin contaminación de otros, se transplantó en tubos en pico de flauta.

Se Tomó la caja petri o el tubo donde desarrolló el micelio y observo con la ayuda de una lupa las siguientes características:

##### **Anverso**

- Aspecto del frente hifal: vellosos, seco, algodonoso, etc.
- Formación de macro estructuras sexuales
- Color de la especie fúngica

##### **Reverso**

- Aspecto del frente hifal: rugoso, liso
- Pigmento: Presente, no presente

#### **4.5.1.9 Examen microscópico en cultivos sobre cubreobjetos**

- Se esterilizó una caja Petri que contenía un disco de papel filtro, una vara de vidrio en forma de Z o unas varillas paralelas que soporten el portaobjeto y cubreobjeto y preparando agar en placa del medio con bajo nivel nutritivo.
- Una vez fría la caja se añadió 2 ml de agua destilada estéril o 2ml de una solución de glicerina al 5% en agua, sobre el papel filtro

solamente, para conservar la humedad relativa durante la incubación.

- Se Cortó un cilindro del medio de cultivo preparado, con la ayuda de un sacabocado de tamaño menor al del cubreobjeto, y se colocó en el centro del portaobjeto.
- Se Inoculó el cilindro de agar con esporas y trozos de micelio del hongo (dependiendo del fitopatógeno estudiado) ubicando el inóculo a distintas distancias del borde del cilindro.
- Se cubrió la preparación con el cubreobjeto y se incubó a 28°C
- Luego de un periodo de incubación adecuado (5 - 7 días), levantando el cubreobjetos y se colocó sobre un portaobjetos que contenga una gota de azul de lactofenol o tina azul Parker.
- Se observó al microscopio para detectar la forma y el ordenamiento de las esporas y el micelio.

#### **4.5.1.10 Examen microscópico por tinción**

- Se Colocó una gota de azul de metileno o tinta azul sobre un portaobjetos. Apoyando el lado engomado de un trozo de cinta adhesiva transparente sobre la superficie de la colonia.
- Una vez adherido el micelio a la cinta adhesiva, se colocó sobre la gota de azul de metileno en un portaobjetos.
- Luego se observó en el microscopio utilizando el aumento 10 X para detectar la forma y ordenamiento característico de las esporas, posteriormente se observó con un aumento de 40 X para una observación más detallada.

#### **4.5.1.11 Mecanismos de purificación de hongos**

Para tener un cultivo puro sin ningún contaminante es necesario realizar algunos tratamientos o técnicas que hacen que lleguemos a nuestros objetivos.

**a. Cultivo de punta de hifa**

- Se sembró una porción del hongo en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo agar agua. Con la adición de 40 - 100 µg/ml de Gentamicina como antibiótico.
- Cuando se desarrollaron las hifas separadas en el medio se ubicó una punta con el estéreo microscopio a 80 -120x, o con el objetivo de 10 x de un microscopio compuesto.
- Se cortó la hifa detrás de la célula terminal con un bisturí desinfectado en alcohol
- Se cortó un trozo de agar que contenga la hifa para luego transferirlo a una placa con medio fresco. Se incubó hasta el desarrollo de la colonia fúngica.

**b. Cultivo monosporico**

Se colocó 5 gotas de agua estéril en puntos equidistantes del plato petri. Con la ayuda de un asa o una aguja de transferencia esterilizada seleccionamos una lesión cubierta de esporas y transferirla a una de las gotas.

Diluir la suspensión de esporas original transfiriendo con una asa una gota de la suspensión a la otra gota sucesivamente hasta llegar a la quinta, examinando las gotas que contengan diluciones de esporas en el microscopio y separar la gota que contenga un número regular de esporas al centro de una placa petri esterilizado vacías agar fundido previamente enfriada sobre la placa petri con la gota de esporas dejando solidificar, luego en el microscopio será la espora mas alejada de las demás y sepárala en otra placa petri con agar en 6 puntos equidistantes examinar en el microscopio que sean esporas solitarias

#### **4.5.1.12 Crioconservación**

Para evitar la práctica periódica de la transferencia de los hongos aislados en cultivos puros se recomiendan, métodos como ser:

##### **a. Glicerol**

- Se lavó las esporas con 3.75 ml de caldo sabouraud. Colocamos esta suspensión en un frasco que contiene 1.25 ml de glicerol estéril (esterilizado en autoclave), homogenizando por vortexeado y alícuotamos a razón de 1.5 ml en tubos eppendorf estériles (por triplicado).
- Se rotuló los tubos con la identificación de la cepa correspondiente.
- Criopreservar los tubos a -20° C.

##### **b. Cobertura con aceite**

- Se estableció el cultivo del hongo hasta que cubrió gran parte del medio en un pico de flauta.
- Agregamos aceite mineral de grado medicinal esterilizado 1 cm. arriba del margen superior del inclinado, evitando que éste haga contacto con la parte superior.

##### **c. Leche liofilizado**

- Con 3 ml de leche preparada al 30% y previamente pasteurizada se lavó las esporas del tubo y trasladar 3 alícuotas de 1 ml a tres tubos de hemólisis para posterior congelación a -20°C.
- Finalmente llevamos a liofilización por 4 días y conservar los liofilizados en desecadores apropiados

#### **4.5.1.13 Prueba de patogenicidad**

El microorganismo patógeno del cultivo puro después de inocularse en un hospedante susceptible debe reproducir los síntomas característicos de la enfermedad y el patógeno de los tejidos enfermos incluidos experimentalmente y debe ser idéntico al aislado inicialmente.

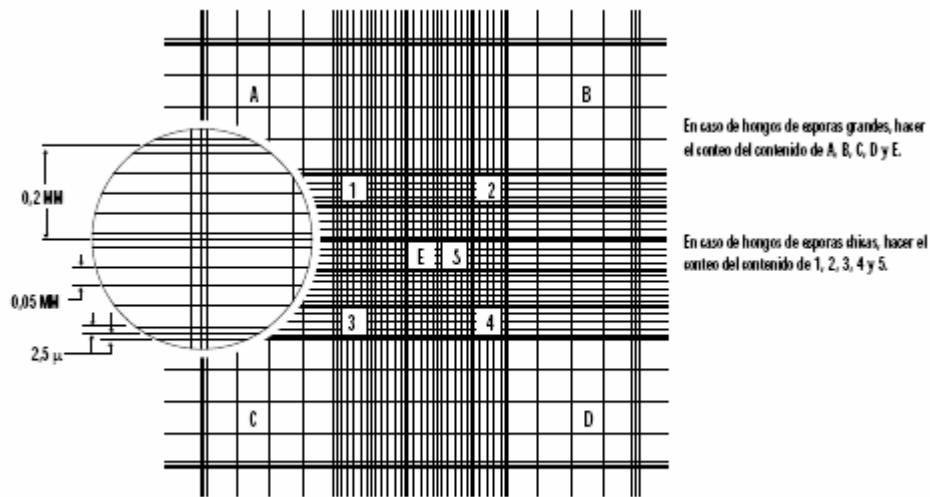
#### **4.5.1.14 Conteo de esporas**

Según Gilchrist et al, (2005). El Procedimiento para el uso de la cámara Neubauer:

Raspar los cultivos del hongo en las cajas y mezclar este raspado con un volumen conocido de agua destilada. Una vez homogeneizada, la suspensión se filtra a través de una malla o gasa para eliminar el agar o restos de micelio que podrían obstruir el paso de la suspensión a través del aspersor durante la inoculación, y se lleva a un volumen conocido.

Tomar una gota con una pipeta Pasteur y colocarla en el centro del hemacitómetro, o bien colocar una gota en cada extremo, según el tipo de hemacitómetro con el que se esté trabajando; enseguida colocar el cubreobjetos cuidando que no queden burbujas y que la gota no se derrame ni se salga de los campos de conteo. Esto daría un dato erróneo, ya que el excedente arrastraría las esporas.

El hemacitómetro consta de dos campos de conteo, cada uno con nueve cuadros que, a su vez, están divididos en cuadros más pequeños (Figura 3). Tanto los cuadros grandes como los pequeños tienen dimensiones conocidas, de tal modo que por medio de fórmulas se puede obtener el número de esporas por ml.



O. Rayado del hematómetro que muestra los campos de conteo (A, B, C, D, E).

Fuente: Gilchrist et al 2005

### Figura 3. Hematocimetro para el conteo de esporas

#### 4.5.1.15 Cinética de crecimiento

##### - **Cinética de crecimiento en medio de sólido**

Para observar la cinética de crecimiento en un medio sólido del micelio desarrollado sobre agar, se cortó 1 trozo con la ayuda de un sacabocados, Inocular el trozo en un medio de cultivo fresco en caja petri en la parte central.

Se dejó incubar las placas petri a 28 °C hasta que el micelio detenga su crecimiento por contacto con los bordes de la caja petri.

Con la ayuda de una regla milimetrada, medir cada día a la misma hora el crecimiento del frente hifal en las 4 orientaciones, de esta manera se determinó el área de crecimiento miceliar, las mediciones fueron desde el borde del inoculo a la punta del micelio. En el caso de ser irregular el crecimiento se determinó área con papel milimetrado.

- **Cinética de crecimiento en medio líquido**

**a. Toma de muestra**

Existen dos métodos utilizados de inoculación o siembra en medio líquido es por taco con un área exacta y por el método de lavado de esporas, para el presente estudio se utilizó la inoculación por taco.

**b. Determinación de pH**

Para la determinación del pH en cada estadio de crecimiento de la colonia fúngica se realizó en forma directa con un pHmetro.

**c. Determinación de consumo de Glucosa**

La determinación de glucosa fue realizado por el Método colorimétrico del DNS (Ácido dinitrosalicílico).

- Se utilizó como Blanco de reactivo 500 µl de buffer citrato a pH 4.6 y 750 µl de DNS (ácido dinitrosalicílico) que nos permite llevar a cero el equipo,
- Muestras muy concentradas se realizaron diluciones, (la técnica solo soporta un gramo de glucosa por litro).
- En una serie de tubos se colocó 450 µl de buffer citrato a pH 4.6, al cual añadimos 50 µl de la muestra (los filtrados obtenidos) y finalmente se añade 750 µl de DNS (ácido dinitrosalicílico)
- Se llevó a incubar a 89 °C por 5 minutos (se logra observar un leve cambio de coloración).
- Se procedió a hacer la lectura en el espectrofotómetro.
- Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm.
- Con los datos obtenidos se procedimos a realizar la grafica de consumo de glucosa, basada en una curva de calibración de

glucosa con la siguiente formula:  $[c]\mu\text{g/ml} = (\text{Abs} + 0.15959) / 0.0086$

### **Velocidad de crecimiento**

Según Forchiassin et al. (1999) Para una variable  $x$ , corresponde a la diferencia de los valores medidos (registrados) en un intervalo:

$$V = \Delta x / \Delta t$$

$$\Delta x = x_1 - x_0 \quad \text{y} \quad \Delta t = t_1 - t_0$$

**Donde:**  $\Delta$  = diferencial       $x$  = área       $t$  = tiempo

De esta manera se logra determinar el diferencial de la velocidad de crecimiento en forma aritmética cuyas unidades de medida son:  $\text{cm}^2/\text{día}$

### **4.5.2 Evaluación de la actividad inhibitoria**

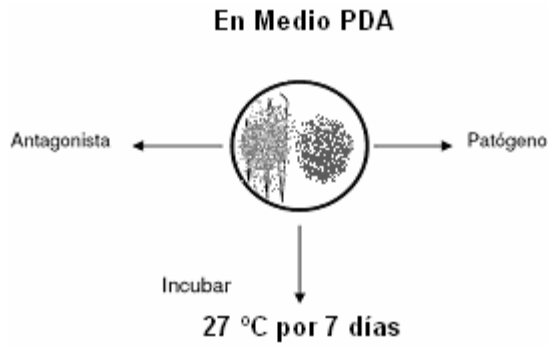
Antagonismo en cultivo y selección de posibles cepas biocontroladoras de fitopatógenos del cacao

#### **4.5.2.1 Enfrentamientos duales entre cepas**

De acuerdo a Bell y Warkham, (1982), consiste en el desarrollo simultaneo de los microorganismos antagonicos y patógenos en medios que le permitan su crecimiento en placas de Petri, bajo las mismas condiciones.

Para esto se desarrolló en una caja petri con PDA se colocó dos hongos, un fitopatógeno y un posible biocontrolador del cepario escogidos al azar así como sigue en la Figura 4.





**Figura 4. Enfrentamiento dual el desarrollo simultáneo del antagonista y el patógeno en medio PDA.**

Con el fin de realizar, los ensayos de producción de metabolitos secundarios de la cepa seleccionada como mejor biocontrolador, se realizó:

#### ***4.5.2.2 Selección (Screening) en cultivos en batch estanco por el método de dilución en placa***

Las cepas que mencionamos pertenecen al instituto de investigaciones fármaco Bioquímicas (IIFB) y el Instituto de Investigación de Desarrollo y Procesos Químicos (IIDEPROQ).

##### **4.5.2.2.1 Evaluación de la actividad controladora de fungicidas sintéticos en fitopatógenos del Cacao**

Para ello se realizó 5 tratamientos que fueron:

T1 = Testigo o control de crecimiento

T2 = Fitorraz (Curathane 720 PM) Cymoxamil 2-ciano-n(etilamina carbonil-2-(Metoximino) acetamida 8%; Mancozeb-ion Zinc etilen bislitio carbamato de magnesio 64%, Solución sugerida 50gr/ 20lt de agua

T3 = Mancozeb (Dithane\* 80 NT) Etileno bis de manganeso (ditiocarbato) 800 gr./Kg. (\*), Solución sugerida 80gr/ 20lt de agua

T4 = Benlate Benomil (metil-1-butilcarbomoil-2bencimidazol carbamato) 50gr, Solución sugerida 20gr/ 20lt de agua

T5 = Systhane\* E Alfa butil alfa (clorofenil)-1-H-1,2,4 triazol, -1 propanonitrilo  
261gr/lt, Solución aplicada 20ml/ 20lt de agua

La metodología de trabajo fue la siguiente:

- En viales estériles que contenía 6 ml del PDA se colocó 1 ml del fungicida preparado bajo las recomendaciones ya mencionadas, ósea a una concentración 1 en 7 o del 14.2 %.
- Después que este gelificado el medio se colocó una muestra de 0.12 cm<sup>2</sup> del hongo fitopatógeno
- Se incubó a 29 °C por 1 semana.
- Pasado este tiempo se procedió a medir el área de crecimiento del frente hifal.
- Con los datos obtenidos se procedió a realizar una grafica de la actividad inhibitoria de fungicida.

#### **4.5.2.2.2 Obtención del filtrado del cultivo**

Una vez obtenido los hongos puros en las cajas petri se procedió a:

- Sacar con un sacabocados las muestras de los hongos, que luego son transferidas a matraces erlenmeyer de 250 ml el cual contiene 100 ml de caldo papa dextrosa (CPD)
- Incubamos en fase estacionaria a 29 °C por 85 días
- Se tomo 5 ml de cada muestra en un tubo de ensayo.
- Centrifugamos por 15 minutos a 4500 rpm.
- El sobrenadante se llevó a un vial estéril con la ayuda de una pipeta pasteur.
- Cada sobrenadante se mantuvo en refrigeración debidamente rotulada con la identificación de la cepa y el tiempo,
- En viales estériles que contenía 6 ml del PDA se colocó 1 ml del filtrado obtenido de cada muestra ósea a una concentración 1 en 7 o del 14.2 %.

- Se utilizó como control positivo a un fungicida químico y un control negativo que se observa el control de crecimiento.
- Después que este gelificado el medio, se colocó una muestra de 0.12 cm<sup>2</sup> del hongo fitopatógeno
- Se incubó a 29 °C por 1 semana.
- Pasado este tiempo se procedió a medir el área de crecimiento del frente hifal.
- Con los datos obtenidos se procedió a realizar una grafica de la actividad inhibitoria de cada cepa.

### **4.5.3 Cultivos en lotes (batch) para la obtención de metabolitos secundarios**

#### **4.5.3.1 Obtención del filtrado del cultivo de la cepa seleccionada**

Una vez obtenido los hongos puros en las cajas petri, se procedió a:

- Extraer con un sacabocados 4 muestras de la cepa IB - 17 que luego son transferidas a matraces erlenmeyer de 1000 ml en el cual contenía 400 ml de caldo papa dextrosa (CPD)
- Incubamos los 4 matraces con Caldo Papa Dextrosa, 2 en fase estacionaria (no agitadas) a 29 °C por 85 días y 2 en continuo movimiento (agitado) a 29 °C por 85 días.
- A partir del día 3 se comienza a tomar las muestras cada 3 días
- Se tomó 5 ml de cada muestra en tubos de ensayo.
- Centrifugamos por 15 minutos a 4500 rpm.
- El sobrenadante es filtrado con filtros miliporo de 0.2µ
- Luego es trasladada en un vial estéril
- Cada muestra es refrigerada y debidamente rotulada, hasta la evaluación por el método por dilución en placa.

#### 4.5.3.2 Evaluación de la cepa IB - 17 por el método de dilución en placa

- Para cada muestra de los filtrados de la cepa IB –17 obtenidos a diferente condición (agitada y no agitada), en Caldo papa dextrosa a diferentes tiempos.
- En viales estériles que contenía 6 ml del PDA se colocó 1 ml del filtrado obtenido de cada muestra, catalogándolas como **A1 A2 E1 E2** (**A** = Agitado y **E** = Estanco (no agitadas); repetición 1; repetición 2)
- Se utilizó como control positivo a un fungicida químico para este caso se utilizó *Fitorraz, Benlate (específico para cada enfermedad)*, y como control negativo solamente el medio.
- Después que este gelificado el medio se coloca una muestra de 0.12 cm<sup>2</sup> del hongo fitopatógeno
- Se incubó a 29 °C por 1 semana.
- Pasado este tiempo se procedió a medir el área del crecimiento del frente hifal.
- Comparar el área de crecimiento miceliar del control positivo, negativo y el extracto en estudio.
- Con los datos obtenidos se procedió a realizar una grafica de la actividad inhibitoria de cada fitopatógeno.

## **4.6 Análisis estadístico**

Para la evaluación del siguiente trabajo de investigación se empleo el diseño completamente al azar en la selección del funguicida como control positivo para fitopatógenos del cacao, el diseño completamente al azar con arreglo factorial fue seleccionada determinar el mejor sistema de cultivos en batch en la cepa seleccionada con posible actividad biológica inhibitoria. Una vez obtenidos estos datos se realizó un diseño de bloques al azar con la selección del mejor funguicida para cada fitopatógeno y desarrollar una comparación entre un control negativo (control de crecimiento) y un la cepa seleccionada. El mismo tratamiento es aplicado para ambos fitopatógenos

### ***4.6.1 Selección del mejor funguicida para el control de enfermedades de cacao, selección del control positivo***

Un funguicida es seleccionado de acuerdo a la efectividad sobre cada hongo fitopatógeno del cacao, para lo cual se desarrolla el trabajo de investigación con los siguientes tratamientos:

T0= Control de crecimiento

T1= Fitorraz

T2= Benlate

T3= Mancozeb

T4= Systhane

Para realizar la comparación de tratamientos de control químico de hongos fitopatógenos del cacao, se realizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones, bajo el siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{i(j)}$$

En donde:

- $Y_{ij}$  = Observación del control químico para fitopatógenos del cacao
- $\mu$  = Media general
- $\alpha_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo Tratamiento de control químico para fitopatógenos
- $\varepsilon_{ij}$  = Error experimental

#### 4.6.2 Selección de cultivos en lotes (batch) a diferentes tiempos

Para la selección del mejor sistema de producción de metabolitos en cultivos en batch (lotes) se desarrolló los siguientes tratamientos:

- A1= Sistema Agitado
- A2= Sistema No agitado

Para lo cual se realizó con dos peticiones y la toma de muestras cada tres días durante 27 veces, siendo el modelo lineal aditivo siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

En donde:

- $Y_{ij}$  = Observación de sistemas de cultivos en batch del tiempo de toma de muestras
- $\mu$  = Media general
- $\alpha_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo sistema de cultivos en batch
- $\beta_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo tiempo de toma de muestras
- $(\alpha\beta)_{ij}$  = Interacción del  $i$ -ésimo tipo de cultivos en batch con el  $j$ -ésimo tiempo de toma de muestras. Interacción tipo de cultivos en batch x tiempo de toma de muestras.
- $\varepsilon_{ij}$  = Error experimental

#### **4.6.3 Comparación del control químico versus control biológico frente a un control de crecimiento para fitopatógenos del Cacao**

Una vez seleccionada un fungicida como control químico (Positivo) se realiza una comparación con los metabolitos secundarios de la cepa seleccionada o control biológico, teniendo para ello un control de crecimiento o también denominado control negativo, siendo los tratamientos:

C1= Control de crecimiento

C2= Control biológico con la cepa seleccionada

C3= Control químico fungicida seleccionada

Para lo cual se realizó un diseño de bloques al azar bajo el siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

En donde:

$Y_{ij}$  = Observación del tratamiento químico frente al control biológico en comparación con el control de crecimiento, esto a diferentes tiempos

$\mu$  = Media general

$\beta_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo Bloque (tiempo de toma de muestras)

$\alpha_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo Tratamiento de control de fitopatógenos

$\varepsilon_{ij}$  = Error experimental

#### **4.6.4 Comparación de medias pruebas Tukey**

Para la comparación de medias se utilizó las pruebas Tukey, Según (Reyes, 1990) Tukey es mas estricto en su clasificación; 5% de Tukey es casi a 1% de Duncan.

$$W = q\alpha S_x$$

En donde:  $S_x$  = Error estándar de la media =  $\sqrt{S^2/n}$ ;

$S_2$  = CM o varianza del error experimental;

$n$  = Numero de observaciones, repeticiones o valores para calcular las medias,

$q_\alpha$  = Valor tabular, que es un valor de  $t$  modificado

#### 4.6.5 Comparación de medias, pruebas Dunnet

En algunos casos el objetivo principal es determinar si hay diferencias significativas de nuevos tratamientos sobre un testigo o control, sin interesar por el momento las comparaciones entre los nuevos tratamientos, (Calzada, 1970) donde el autor también menciona si las diferencias entre pares de medias resultasen negativas, se considerara el valor absoluto de las diferencias (sin tomar en cuenta el signo), pero se debe tener cuidado al emitir conclusiones respecto de que media es mayor.

$$VR_{DUNNET} = t_{\alpha} Sx$$

Donde:

$t_{\alpha}$  = valor tabular en función de;  $GL_{Error}$ , Nivel de significancia 5%, 1%  
numero de medias sin incluir el testigo

$Sx$  = error estándar de la media =  $\sqrt{2CME/r}$ ;



## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

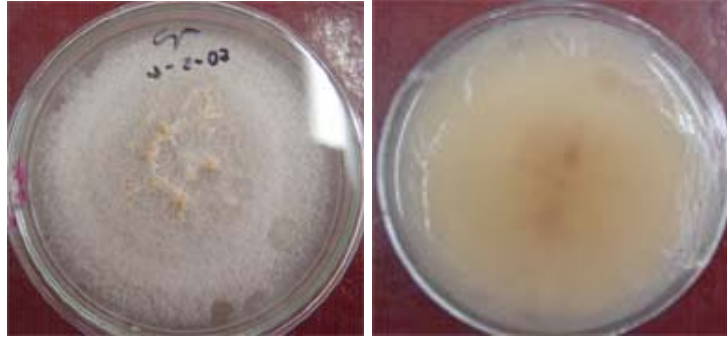
### 5.1 Enfermedades identificadas

La recolección de muestras fitopatógenas fue realizado en campo, en la localidad de Alto Beni donde, observando la característica de la enfermedad se recolectaron muestras de diferentes partes de la planta del cacao y su entorno, como ser: suelo, escobas verdes, escobas secas, frutos, setas de *Moniliophthora* en hojas y sobre ramas.

Para el aislamiento de los fitopatógenos del cacao en condiciones de laboratorio se tomaron 12 muestras traídas de diferentes partes de la planta con síntomas de enfermedad, para ello se desarrollo 2 tratamientos de siembra: directo e indirecto haciendo un total de 24 muestras, De ambos tratamientos el 75% de las muestras nos lograron dar como resultados similares en cuanto a crecimiento, forma de crecimiento, estructura hifal característica de escoba de bruja, tomando en cuenta que la mayor parte de la recolección fue en setas de *Moniliophthora*, en tallos, hojas y en las mismas escobas verdes y secas. El 17 % de las muestras tratadas y aisladas en laboratorio nos dieron como resultado el aislamiento de la cepa *Phytophthora palmivora* causante de la enfermedad Mazorca negra cuyas estructuras de *Phytophthora* fueron identificadas en muestras recolectadas del fruto en base a la caracterización microscópica. El 8 % de ambos tratamientos fueron hongos desconocidos, posiblemente saprofitos, que van descomponiendo totalmente la materia orgánica, siendo estas muestras de tierra como de frutos secos. De la presente recolección de muestras se logro aislar 5 cepas de hongos.

### 5.1.1 Escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*)

#### 5.1.1.1 Identificación de la Escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*)



**Figura 5. Características morfológicas de *Moniliophthora perniciosa***

#### ***Características macroscópicas observadas en laboratorio***

##### **Anverso**

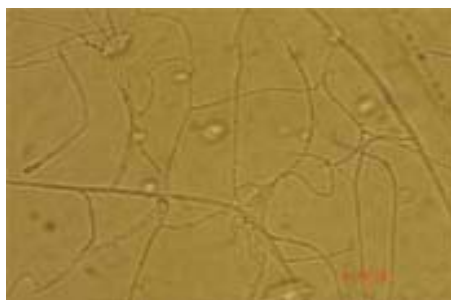
- Aspecto del frente hifal: velloso
- No se observan estructuras de cuerpos fructificantes, esporas etc.  
Solamente micelio
- Color: de la especie fúngica es de color Blanco

##### **Reverso**

- Aspecto del frente hifal: liso
- Pigmento: no presente

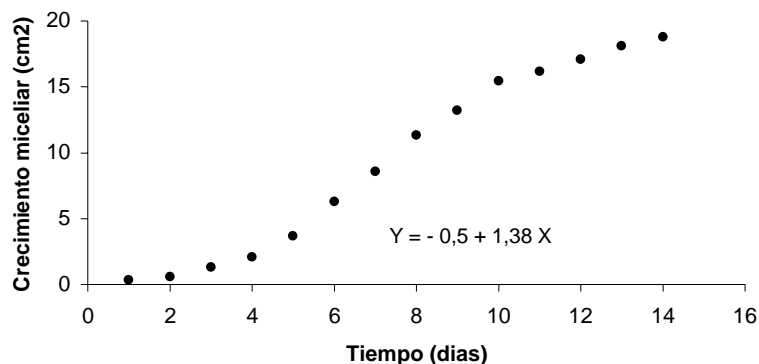
#### ***Características microscópicas observadas en laboratorio***

Hongo miceliar con la presencia de tabiques de hifas bastante delgada, no presenta cuerpos fructificantes siendo una característica de los Basidiomicetes.



**Figura 6. Características *microscópicas* de la cepa *Moniliophthora perniciosa***

**5.1.1.2 Cinética de crecimiento de la cepa *Moniliophthora perniciosa* en medio sólido**



**Figura 7. Cinética de crecimiento de la cepa *Moniliophthora perniciosa* en medio PDA**

La biomasa micelial de la cepa *Moniliophthora perniciosa* en medio sólido PDA alcanzó un máximo de área en crecimiento de 15.47 cm<sup>2</sup>, durante 14 días, esto en la fase de crecimiento,  $r^2 = 93.6\%$  de la variación total en Y (área de crecimiento hifal), es explicada por el tiempo en crecimiento (X). Desprendiendo del anterior resultado  $r = 0.97$ , existe alta asociación entre los tiempo en crecimiento hifal (X) y el área de crecimiento hifal (Y) Los puntos tienden a una recta,  $b = 1.38 \text{ cm}^2$ , por cada día de crecimiento hifal, se espera un incremento promedio de 1.38 cm<sup>2</sup>. En el área de crecimiento hifal (Y).este parámetro nos indica sobre el control de crecimiento en determinados tiempos.

## 5.1.2 Mazorca negra (*Phytophthora palmivora*)

### 5.1.2.1 Identificación de la Mazorca negra (*Phytophthora palmivora*)



Figura 8. Características morfológicas de *Phytophthora palmivora*

#### **Características macroscópicas observadas en laboratorio**

##### **Anverso**

Aspecto del frente hifal: algodonoso.

Formación de macro estructuras sexuales a partir del 6 día formación de zoosporangios

Color de la colonia fúngica es blanco

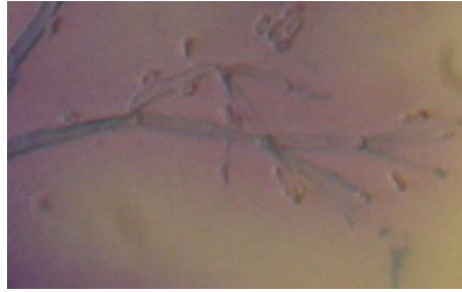
##### **Reverso**

Aspecto del frente hifal: liso

Pigmento: no presente a medida que pasa el tiempo tiende a tener un color amarillo

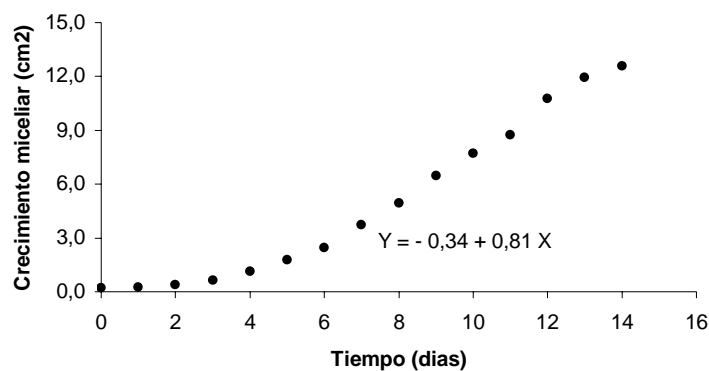
#### **Características microscópicas observadas en laboratorio**

En la figura 9, en el micelio produce esporangioforos ramificados donde observamos esporangios desprendiéndose, siendo característica por descripción de la especie *Phytophthora*.



**Figura 9. Características *microscópicas* de la cepa *Phytophthora palmivora***

**5.1.2.2 Cinética de crecimiento de la cepa *Phytophthora palmivora* en medio sólido**



**Figura 10. *Cinética de crecimiento de la cepa Phytophthora palmivora en medio PDA***

La biomasa micelial de la cepa *Phytophthora palmivora* en medio sólido PDA alcanzó un máximo de área en crecimiento de 13.40 cm<sup>2</sup>, durante 14 días, esto en la fase de crecimiento,  $r^2 = 94.6 \%$  de la variación total en Y (área de crecimiento hifal), es explicada por el tiempo en crecimiento (X). Desprendiendo del anterior resultado  $r = 0.97$ , existe alta asociación entre los tiempo en crecimiento hifal (X) y el área de crecimiento hifal (Y) Los puntos tienden a una recta,  $b = 0.81 \text{ cm}^2.$ , por cada día de crecimiento hifal, se espera un incremento promedio de

0.81 cm<sup>2</sup>. En el área de crecimiento hifal (Y).este parámetro nos indica sobre el control de crecimiento en determinados tiempos.

El aislamiento se realizó a partir de muestras con síntomas características de la Escoba de bruja. Según Cerda 2002, existen hongos que son parásitos obligados y no pueden desarrollarse en cámara húmeda ni en medio de cultivo, tal es el caso del *M. pernicioso* y otros, para identificar estos hongos se consideran principalmente los signos y síntomas que son muy evidentes.

La experiencia de trabajo con microorganismos en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, muestra que los basidiomicetos no pueden desarrollar cuerpos fructificantes, pero si es posible propagar una cepa a partir de micelio, en este caso se logro aislar la cepa a partir de brotes laterales de las ramas con la sintomatología de la enfermedad, donde no se logro observar el desarrollo de cuerpos fructificantes por lo que se puede tener un cierto grado de seguridad del aislamiento de la cepa esperada.

Según Guimarães 2004.en el campo se expone todas las partes de la planta al basidiocarpo del *Moniliophthora (Crinipellis) pernicioso*, pero los síntomas de la escoba de bruja sólo se observan en el meristemáticos de tejidos, es decir, en los meristemas terminales y los brotes laterales. Este hecho posiblemente es debido a la presencia de barreras físicas impuesta por las cutículas de hojas maduras y gran número de composiciones secundarias en los tejidos maduros que tiene el papel en la defensa de la planta tiende en vista que *M. pernicioso* se aisló de tejido maduro y saludable, nosotros podemos sugerir que este hongo penetró en los tejidos de la verdura como éste todavía es joven, éstos aislaron presentan la capacidad para romper las barreras de la defensa y establecer abajo en tejido maduro del árbol de cacao.

Por otro lado la escoba de bruja puede ser considerada como un hongo endophyto.

En el aislamiento de la cepa *Phytophthora palmivora* fue aislada a partir de fruto infectado característico con la sintomatología de la Mazorca negra según agrios 1996 son hongos que tienen micelio alargado que carece de septas y que producen oosporas (esporas de reposo) y zoosporangios o zoosporas (esporas asexuales), la cepa aislada cuenta con estas características, por lo que tenemos una certeza en cuanto al desarrollo microscópico de la cepa.

Con referente al crecimiento miceliar de la cepa *Moniliophthora perniciosa* y la cepa *Phytophthora palmivora* en medio sólido, no se encontró datos para realizar una comparación, el fin del trabajo fue el de tener parámetros cualitativos para los experimentos realizados.

## 5.2 Selección de biocontroladores (screening)

### Screening o selección con el método de enfrentamientos duales

En la primera fase de selección o screening se tomaron las cepas que figuran en la tabla 2. Para lo cual se utilizó el método de enfrentamientos duales entre fitopatógeno y posible biocontrolador, si bien este método muestra resultados cualitativos, son referencia o base principal para la selección de cepas que tienen actividad biocontroladora, como el caso del mico parasitismo o la producción de halos de inhibición, produciendo metabolitos de defensa ante un posible invasión del patógeno que esta en estudio.

**Tabla 2. Screening o selección en enfrentamientos duales para el control biológico de las cepas *Moniliophthora perniciosa* y *Phytophthora palmivora***

Cepa fúngica	Efecto biocontrolador en la cepa <i>Moniliophthora perniciosa</i>	Efecto biocontrolador en la cepa <i>Phytophthora palmivora</i>
5QD		
SAK2	*	*
IB - 22C	*	*
PB+AS CAFÉ	*	*
67QD		
IB - 24B		
IB - 25		*
64*	*	*
11QD		*
18QD		
77QD		*
8QD		*
83QD		
IB - 1A		
2QD		
SAK1	*	*
23 QD		
66*		
IB - 7A		
IB - 18EA	*	*
IB - 18EB		*
IB - 17	*	*
IB - 5	*	*

ningún efecto

\* actividad biológica inhibitoria



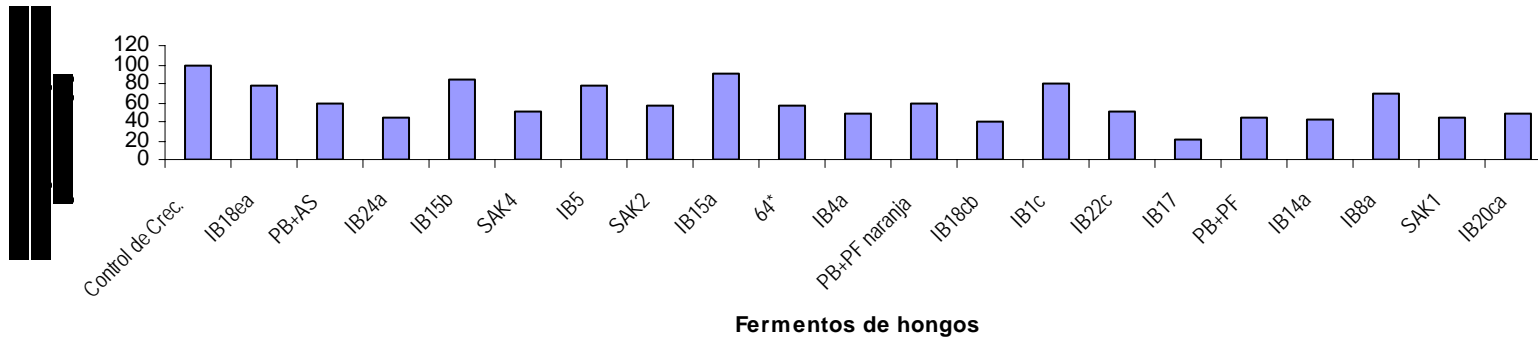
### 5.2.1 Screening o selección con el método de dilución en placa

La segunda fase en la selección del biocontrolador consiste en la aplicación de fermentos fúngicos (sobrenadante de cultivos en batch) con posible actividad biológica. Los hongos cultivados en batch fueron seleccionados a partir del screening previamente detallado, además de la inclusión de otras cepas fúngicas productoras de metabolitos secundarios con posible actividad biológica. En la figura 11 se detalla el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Moniliophthora perniciosa* enfrentada con fermentos fúngicos con posible actividad biológica, tomando como parámetro menor al 50 %

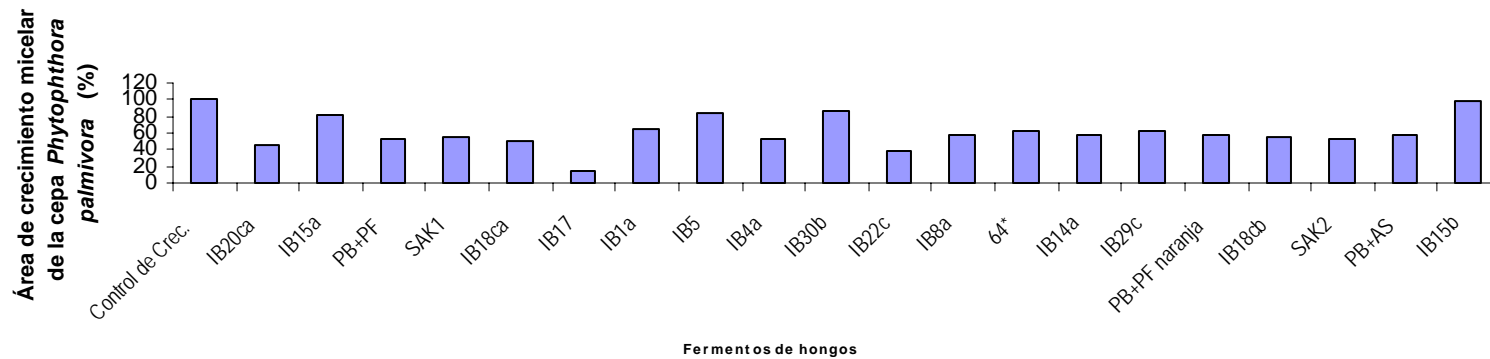
Como fase preliminar en la selección de la cepa con actividad biocontroladora para el control de la cepa *Moniliophthora perniciosa*, observamos las cepas IB – 22c; SAK – 1 y IB -17 muestran una buena actividad biocontroladora frente a este fitopatógeno tomando como base el método de enfrentamiento dual, cuyo criterio de selección se basó: en la conservación de la cepa siendo el caso de la cepa SAK – 1 una cepa que no tolera la manipulación en condiciones *in vitro* ya que al cuarto repique la cepa tendió a desaparecer, el criterio de definición del trabajo tendía a ser elegida entre las cepas IB – 22c y la IB – 17 que por el porcentaje de inhibición de crecimiento en el halo del fitopatógeno fue seleccionada la cepa IB – 17

Como fase preliminar en la selección de la cepa con actividad biocontroladora para el control de *Phytophthora palmivora*, en la figura 12 observamos que la cepa IB - 17 como mejor biocontrolador, y posteriormente a las cepas IB – 22c; Sak 1, siendo estos los resultados los mas representativos.

La cepa IB – 17 en la fase preliminar muestra ser mejor biocontrolador en ambos fitopatógenos, con estos datos procedimos a realizar los estudios necesarios para la extracción de fermentos estériles o metabolitos secundarios.



**Figura 11. Screening o selección de la cepa fúngica con actividad biológica inhibitoria del crecimiento micelial del *Moniliophthora perniciosa* (Escoba de bruja) con el método de dilución en placa**



**Figura 12. Screening o selección de la cepa fúngica con actividad biológica inhibitoria del crecimiento micelial del *Phytophthora palmivora* (Mazorca negra) con el método de dilución en placa**

El mecanismo por el que los microorganismos antagónicos afectan a las poblaciones de patógenos no siempre es claro, pero en general se atribuyen a uno de los cuatro efectos (Ciancas, 2006):

- Parasitismo directo y muerte del patógeno
- Competencia con el patógeno por el alimento
- Efectos tóxicos directos sobre el patógeno por medio de sustancias antibióticas liberadas por el antagonista
- Efectos tóxicos indirectos sobre el patógeno por sustancias volátiles como el etileno, liberadas por las actividades metabólicas del organismo antagonista.

La estabilidad en el medio ambiente, puede ser, incluso más importante que la patogenicidad de la cepa en condiciones de laboratorio, por lo cual se llegan a soluciones de campo.

Según Sonogo et al (2002), las características de crecimiento del hongo *Trichoderma stromaticum*, un micoparásito en el micelio y fructificando cuerpos de *M. (Crinipellis) perniciososa*, el agente causal de enfermedad de la escoba bruja de cacao, se evaluaron bajo las condiciones medioambientales controladas. La habilidad de *T. stromaticum* de producir el conidia y germinar en las escobas secas se evaluó a tres temperaturas constantes (20, 25, y 30°C). Los resultados sugieren que aplicando el *T. stromaticum* bajo la alto-humedad condiciona que cuando la temperatura aérea está debajo de 30°C

La temperatura en el área de incubación tiene un promedio de 27 +/-3°C por lo que los parámetros de temperatura es aceptable al trabajo mencionado, el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas desarrolla un sistema de producción de Metabolitos secundarios o fermentos estériles de hongos y no así directamente en un enfrentamiento dual lo que conllevaría a una alteración en un ecosistema

Estudios realizados por Alipi y Monaco (citados por Ciancas, 2006), *in vitro* deducen que el antagonismo en placa es una prueba inicial muy importante,

el cual nos da una aproximación para estudios subsiguientes de sistemas biológicos de control de enfermedades. La forma e intensidad de antagonismo *in vitro* por el método de dilución en placa, es una prueba inicial para poder determinar el tipo de interferencia por las características que presenta dicha prueba, desarrollada con cada una de las pruebas anteriormente citadas (ejemplo: método indirecto de dilución en placa). De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio se observa diferentes tipos de interferencia según cada combinación patógeno – antagonista, tales como alteraciones en la morfología de las conidias del fitopatógeno que corrobora a los trabajos de Simón et al., 1987 (citado por Ciancas 2006). De esta manera se selecciona la cepa IB – 17 que forma un pigmento de color marrón que tiene un excelente actividad biológica controladora del desarrollo micelial de las cepas *Moniliophthora perniciosa* y *Phytophthora palmivora*. Lo cual es corroborado por Astorga, (2004) relacionando el grado de pigmentación de color amarillo con la intensidad de la actividad inhibitoria. Estas observaciones nos inducen a pensar que los pigmentos producidos, posiblemente serían los responsables de conferir la actividad inhibitoria

### 5.3 Selección de fungicidas químicos, como control positivo para fitopatógenos del Cacao (*Theobroma cacao L.*)

La evaluación *in Vitro* de la resistencia o sensibilidad de *Moniliophthora perniciosa* y *Phytophthora palmivora* frente a diferentes fungicidas como ser: Fitorraz (*Curathane 720 PM*) y Benlate, Mancozeb (*Dithane\* 80 NT*), *Systhane\* E.* (ver anexo 1) nos muestran los siguientes resultados:

#### 5.3.1 Control químico de la cepa *Moniliophthora perniciosa* causante de la enfermedad Escoba de bruja en el Cacao

De acuerdo al siguiente análisis de varianza en la tabla 3, realizado para el control químico de la enfermedad escoba de bruja en condiciones *in vitro*, los resultados obtenidos nos demuestran que existen diferencias significativas en cuanto a tratamientos o fungicidas

El coeficiente de variación nos demuestra que el experimento ha sido bien manejado

**Tabla 3. ANVA para la comparación de fungicidas sintéticos en la selección del control positivo de la cepa *Moniliophthora perniciosa* causante de la enfermedad de Escoba de bruja**

FV	GL	SC	CM	Fcalc.	Ftab
Tratamiento	4	323,32	80,830	61,10	3,48 *
Error	10	13,2286	1,32286		
Total	14				

CV = 8,63 %

NS No significativo

\* Significativo

En el Tabla 4 observamos que el tratamiento testigo y el tratamiento con el fungicida Sistine no existen diferencias significativas esto en cuanto al control de la enfermedad; entre el tratamiento aplicado con Mancozeb y Benlate las diferencias no son significativas pero son mejores comparando

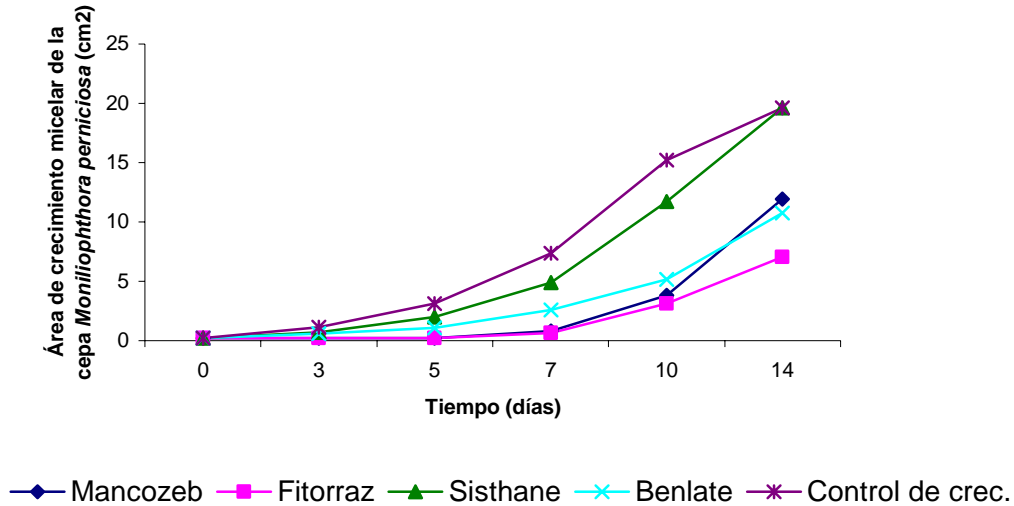
con el Sisthane. El tratamiento con Fitorraz es significativa entre los grupo el anteriores, por lo que indicamos que el Fitorraz es el mejor controlador sintético que inhibe el desarrollo hifal de la especie *Moniliophthora perniciosa* en condiciones de laboratorio.

**Tabla 4. Comparación de medias a partir de prueba de Tukey en el control químico en la cepa *Moniliophthora perniciosa* causante de la enfermedad (Escoba de bruja)**

<b>Tratamiento</b>	<b>Promedio</b>	<b>Tukey</b>
Control de crecimiento	18.62	A
Sisthane	18.11	A
Mancozeb	12.78	B
Benlate	11.0	B
Fitorraz	6.2	C

Considerando que el control de crecimiento esta al 100 % de desarrollo del fitopatógeno hacemos la diferencia en cuanto al crecimiento frente a los tratamientos fungicidas obteniendo los siguientes resultados:

Con la medición del frente hifal en cajas petri a los 14 días, El Sisthane tiene un 0 % de control; el Mancozeb tiene un 39.2 % de control; el Benlate tiene un 45.2 % de control; el mejor control químico de la cepa *Moniliophthora perniciosa* en condiciones de laboratorio es el Fitorraz que controla hasta un 64 %.



**Figura 13. Cinética de crecimiento de la cepa *Moniliophthora perniciosa* frente diferentes fungicidas químicos desarrollada en condiciones *in vitro***

Realizando una comparación en base a la velocidad de crecimiento de la cepa *Moniliophthora perniciosa* a diferentes tratamientos fungicidas, observamos en la tabla 5, que las  $\mu$  de los tratamientos difieren en cuanto a la velocidad de crecimiento esto en la fase exponencial mostrando mayor efectividad al tratamiento con fitorraz cuya velocidad de crecimiento se halla desacelerada en comparación con el control de crecimiento, mostrando que existe actividad controladora sobre el crecimiento micelial del fitopatógeno

**Tabla 5. Velocidad de crecimiento de la cepa *Moniliophthora perniciosa* frente diferentes fungicidas químicos desarrollada en condiciones *in vitro***

Tratamientos	$\mu$	cm <sup>2</sup> /día
Control de crec.	=	1.83
Sisthane	=	1.96
Mancozeb	=	1.59
Benlate	=	1.17
Fitorraz	=	0.92

### 5.3.2 Control químico de la cepa *Phytophthora palmivora* causante de la enfermedad Mazorca negra

De acuerdo al análisis de varianza que detalla en la tabla 6 realizado para el control químico de la enfermedad Mazorca negra en condiciones *in vitro*, obtenemos resultados con diferencias significativas en cuanto a tratamientos fungicidas para el control de la enfermedad *Phytophthora palmivora*. El coeficiente de variación se encuentra en los parámetros aceptables lo cual indica que el experimento ha sido bien desarrollado.

**Tabla 6. ANVA para la comparación de fungicidas sintéticos en la selección del control positivo de la cepa *Phytophthora palmivora* causante de la enfermedad de Mazorca negra**

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>Fcalc.</i>	<i>Ftab</i>
Tratamiento	4	259,45	64,862	46,84	3,48 *
Error	10	13,85	1,38		
<b>Total</b>	<b>14</b>				

CV = 14,79 %

NS No significativo

\* Significativo

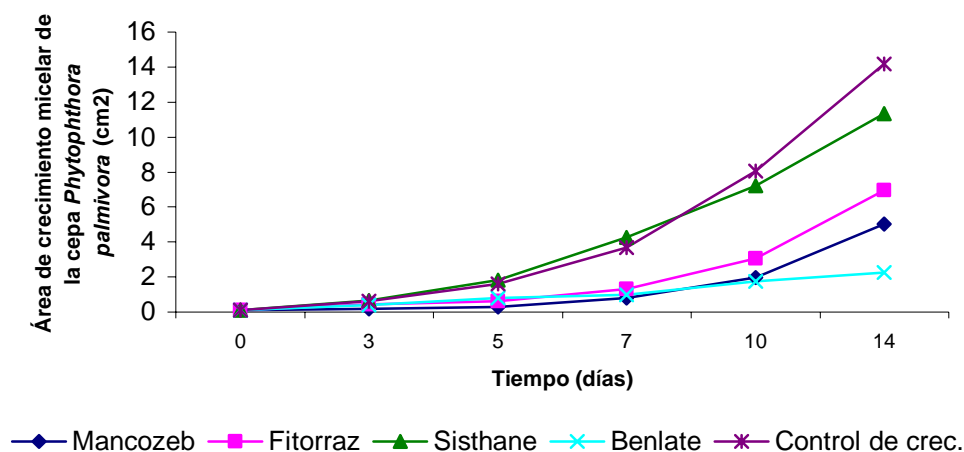
Realizando la comparación de medias obtenemos el siguiente resultado: En la Tabla 7, observamos que el tratamiento testigo y el tratamiento con el fungicida Sistine no existen diferencias significativas en cuanto al control de la enfermedad; entre el tratamiento aplicado con Fitorraz y Mancozeb las diferencias no son significativas, pero si son significativas entre el anterior grupo. El tratamiento con Benlate que de acuerdo con la pruebas Tukey son las que mayor capacidad de inhibición tienen frente al crecimiento del fitopatógeno.



**Tabla 7. Comparación de medias a partir de prueba Tukey en el control químico en la cepa *Phytophthora palmivora* causante de la enfermedad (Mazorca negra)**

Tratamiento	Promedio	Tukey
Control de crecimiento	13.21	A
Sisthane	12.22	A
Fitorraz	6.95	B
Mancozeb	5.05	B C
Benlate	2.36	C

Considerando al testigo o control de crecimiento con el 100 % del desarrollo en el crecimiento micelar del fitopatógeno, hacemos la diferencia en cuanto al crecimiento frente a los diferentes tratamientos fungicidas y se obtuvo los siguientes resultados: el tratamiento con sisthane tiene un 20 % de inhibición con respecto al control; el Fitorraz tiene un 50.8 % de inhibición; el Mancozeb tiene un 64.6 % de inhibición. Siendo el mejor controlador químico en el desarrollo micelar de la cepa *Phytophthora palmivora*, el Benlate que inhibe hasta un 84 %. En condiciones de laboratorio.



**Figura 14. Cinética de crecimiento de la cepa *Phytophthora palmivora* frente diferentes fungicidas químicos desarrollada en condiciones *in vitro***

Realizando una comparación en base a la velocidad de crecimiento observamos en la tabla 8 las  $\mu$  de todos los tratamientos mostrando que el Benlate desacelera el crecimiento hifal de la cepa *Phytophthora palmivora*, mostrando que también tiene una buena efectividad el tratamiento con Mancozeb que se usa bastante en el control convencional de *Phytophthora infestans*

**Tabla 8. Velocidad de crecimiento de la cepa *Phytophthora palmivora* frente diferentes fungicidas químicos desarrollada en condiciones *in vitro***

Tratamientos		cm <sup>2</sup> /día
$\mu$ Control de crec.	=	1.40
$\mu$ Sisthane	=	1.06
$\mu$ Fitorraz	=	0.81
$\mu$ Mancozeb	=	0.60
$\mu$ Benlate	=	0.19

Este estudio se realizó para determinar el grado de efectividad de fungicidas químicos que controlen las enfermedades del cultivo de cacao, como parámetro para la comparación frente al control biológico planteado, donde podemos buscar alternativas a estos productos que son nocivos para la salud de los productores, consumidores y evitar alteraciones para el medio ambiente.

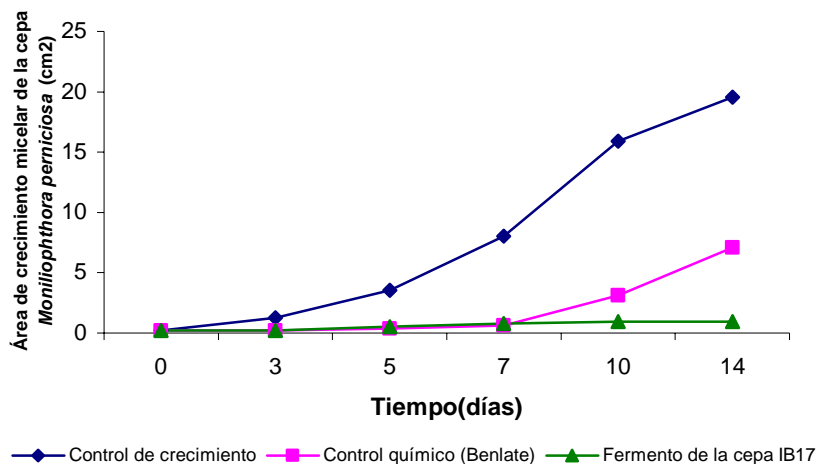
De 4 fungicidas comerciales fueron seleccionadas 2, una para cada fitopatógeno, en el caso de la *Moniliophthora perniciosa* resulta ser mejor el Fitorraz cuyo ingrediente activo Cymoxamil 2-ciano-n (etilamina carbonil-2-(Metoximino) acetamida 8%; Mancozeb-ion Zinc etilen bislitio carbamato de magnesio 64%,

Según Guimarães, (2004) los fungicidas, benomil, óxido cuproso y mancozeb eran escogidos que porque ellos se usan en campo en la producción de cacao lo que obliga a refugiarse en un árbol con el objetivo de controlar a la Escoba de

bruja. Por lo que podemos indicar que dentro de la estructura del Fitorraz se encuentran varios componentes que hacen que tengan actividad inhibitoria frente a este fitopatógeno. En el caso del *Phytophthora palmivora* resulta mucho mejor el fungicida Benlate cuyo ingrediente activo es el Benomil (metil-1-butilcarbomoiil-2 bencimidazol carbamato) fungicida sistémico de amplio espectro.

#### 5.4 Selección de la cepa con actividad biocontroladora

Observando las figuras 11 y 12, se aprecia que la cepa IB – 17 tiene una buena actividad antifúngica frente a fitopatógenos del cacao (*Theobroma cacao L.*), para lo cual, realizamos una comparación preliminar tomando como parámetro el control químico específico frente al control de crecimiento, obteniendo los siguientes resultados: en la figura 15 observamos el desarrollo de la cepa *Moniliophthora perniciosa* por el método de dilución en placa con lectura a los 14 días con tres tratamientos diferentes que son: testigo (control de crecimiento); fitorraz (control químico) y el fermento estéril de la cepa IB - 17; donde podemos indicar que el control químico *fitorraz* tiene actividad inhibitoria a este patógeno hasta un 63 %, en cuanto al fermento de la cepa IB – 17 tiende a llegar hasta un 95 % de inhibición del fitopatógeno.



**Figura 15. Comparación preliminar en la selección del antifúngico (metabolito secundario) de origen biológico de la cepa IB-17 para la enfermedad escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*)**

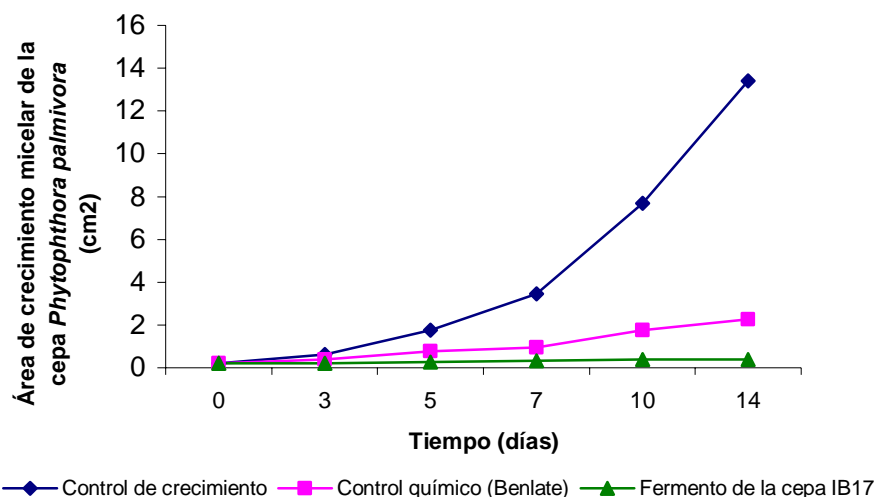
Realizando una comparación a la velocidad de crecimiento de la cepa *Moniliophthora perniciosa* frente a los tratamientos químico y biológico,

observamos en la tabla 9 que el crecimiento es bastante reducido con la aplicación del fermento de la cepa IB – 17. Esta característica corrobora el porcentaje de inhibición calculado. El crecimiento hifal cuando se tiene como controlador el agente químico desacelera la velocidad de crecimiento, pero aun mas desacelerada es la velocidad de crecimiento cuando el fermento de la cepa IB - 17 es aplicado. En este último caso el crecimiento puede ser considerado casi nulo.

**Tabla 9. Velocidad de crecimiento de la cepa *Moniliophthora perniciosa* con el uso de fermento de la cepa IB – 17 frente al control químico y al control de crecimiento desarrollada en condiciones *in vitro***

<b>Tratamientos</b>		<b>cm<sup>2</sup>/día</b>
μ Control de crecimiento	=	1.78
μ Fermento de La Cepa IB - 17	=	0.07
μ Control Químico (Fitorraz)	=	0.92

En la figura 16 de manera preliminar observamos el desarrollo de la cepa *Phytophthora palmivora* a diferentes tiempos, durante 14 días con tres tratamientos diferentes que son: testigo (control de crecimiento); Benlate (control químico) y el fermento estéril de la cepa IB - 17; indicamos que el control químico *Benlate* tiene actividad biocontroladora a esta cepa patógena hasta un 83 %, en cuanto al fermento de la cepa IB – 17 tiende a inhibir el crecimiento del fitopatógeno hasta un 97 %



**Figura 16. Comparación preliminar en la selección del antifúngico (metabolito secundario) de origen biológico de la cepa IB-17 para la enfermedad Mazorca negra (*Phytophthora palmivora*)**

Realizando una comparación de acuerdo a la velocidad de crecimiento de la cepa *Phytophthora palmivora* frente a los tratamientos químico y biológico, observamos en la tabla 10, que el crecimiento es bastante reducido con la aplicación del fermento de la cepa IB – 17 característica que corrobora el porcentaje de inhibición calculado. El crecimiento hifal cuando se tiene como controlador el agente químico desacelera la velocidad de crecimiento, pero aun mas desacelerada es la velocidad de crecimiento cuando el fermento de la cepa IB - 17. En este último caso el crecimiento puede ser considerado casi nulo.

**Tabla 10. Velocidad de crecimiento de la cepa *Phytophthora palmivora* con el uso de fermento de la cepa IB – 17 frente al control químicos y al control de crecimiento desarrollada en condiciones *in vitro***

Tratamientos	$\mu$	$\text{cm}^2/\text{día}$
$\mu$ Control de crecimiento.	=	1.42
$\mu$ Fermento de La Cepa IB - 17	=	0.01
$\mu$ Control Químico (Benlate)	=	0.19

## 5.4.1 Identificación de la cepa Biocontroladora

### 5.4.1.1 Origen de la recolección de la cepa IB-17

Tabla 11. Ficha de la cepa IB – 17

<b>Nº Muestra</b>	<b>17</b>	<b>IB</b>
<b>Ubicación Geográfica</b>	L.S. 17° 38,061' NO 67° 30,500'	
<b>Lugar de Recolección:</b>	Orillas del río Desaguadero departamento de Oruro – Bolivia	
<b>Altura</b>	3750 m.s.n.m.	
<b>Lugar de desarrollo de la cepa:</b>	Paja brava: <i>Festuca Dolichophylla</i>	
<b>Descripción General del Hábitat:</b>	Vegetación Abundante paja brava, kikuyo, plantaciones de thola, diversidad de musgos en forma de islas, posiblemente suelo salino	
<b>Apariencia general:</b>	El hongo se encuentra en la parte baja de la planta, cerca al nudo vital posible hongo saprofito	
<b>Forma de Aislamiento</b>	Método Directo	
<b>Recolector.(es)</b>	Cabero, K. Usnayo, P. Vicente K.	
<b>Fecha de recolección:</b>	12 de marzo de 2006	

### Características macroscópicas observadas en laboratorio

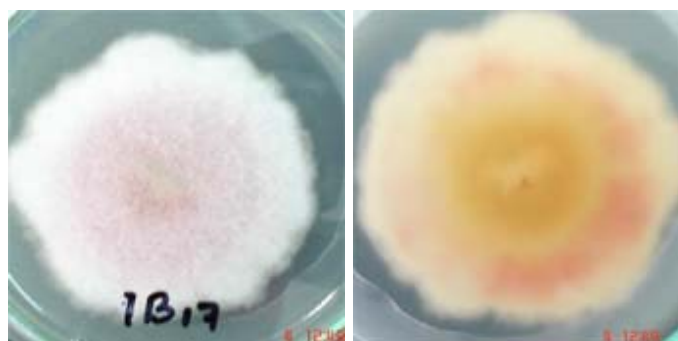


Figura 17. Características *macroscópicas* de la Cepa IB-17

#### Anverso

- Aspecto del frente hifal: algodonoso.
- Formación de estructuras sexuales a partir del día 18 con la maduración de esporas

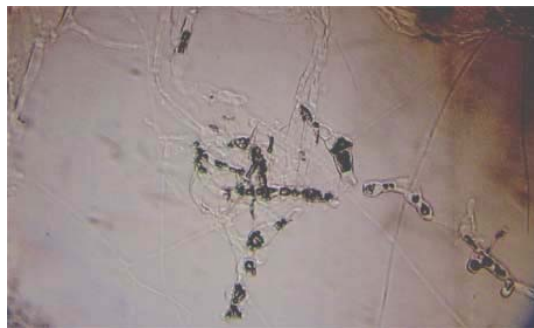
- Color: blanca posterior a los 7 días con cambio de color a rosado y posterior rojo

### **Reverso**

- Aspecto del frente hifal: liso
- Pigmento: presente de color amarillo

### **Características microscópicas observadas en laboratorio**

Hongo miceliar con la formación de cuerpos fructificantes amorfas, esporas diminutas.



**Figura 18. Características microscópicas de la Cepa IB-17**

#### **5.4.2 Cinética de crecimiento en condiciones líquidas**

En esta fase se observa el desarrollo de la cepa IB – 17 en un medio basal que describimos en el anexo 7. Con una fuente carbono y nitrógeno definido, donde se desarrolla dos sistemas de fermentación que son: agitado y no agitado. Observamos en las Tablas 12 y 13 La velocidad de consumo de sustrato del hongo no es continua obteniendo diferentes picos que mencionamos en los siguientes resultados:



**Tabla 12. Velocidad de crecimiento en base al consumo de glucosa en sistemas agitado y no agitado a diferentes tiempos**

Días	Agitado Consumo de glucosa (g.)	Estanco Consumo de glucosa (g.)
1	--	--
4	9,94	9,80
7	7,54	9,76
11	7,39	8,78
13	6,04	7,70
15	5,85	7,62
19	2,84	6,61
21	1,19	4,54
27	0,58	4,00
29	0,53	0,50
36	0,50	0,48
38	0,47	0,47
41	0,44	0,43
44	0,40	0,38

El mayor consumo de glucosa en el sistema agitado se observa en el día 7 con un alto consumo de la fuente de carbono, cuando empieza la fase exponencial de crecimiento de la colonia fúngica de la cepa IB – 17; en comparación con el sistema de cultivos en batch no agitado demora un poco mas hasta el día 11 pero paralelamente entran a una fase estacionaria al día 28.

**Tabla 13. Velocidad de crecimiento en base al Consumo de glucosa a del inicio hasta el final del experimento**

Días	Agitado Consumo de glucosa (g. /día)	Estanco Consumo de glucosa (g. /día)
1		
44	0,22325581	0,22372093

Haciendo un promedio de consumo de glucosa durante los 44 días podemos indicar que tiene un promedio de consumo 0.223 g/día en ambos sistemas de cultivos en batch, en la tabla 12 observamos el consumo específico de substrato (Qs) el Qs de un sistema agitado puede ser mayor por las condiciones de oxigenación que conlleva a

consumir rápidamente el sustrato, lo que es algo diferente en cuanto al sistema no agitado o estanco su consumo de sustrato es lenta pero a la final pueden llegar a las mismas condiciones como se observa en la Tabla 14.

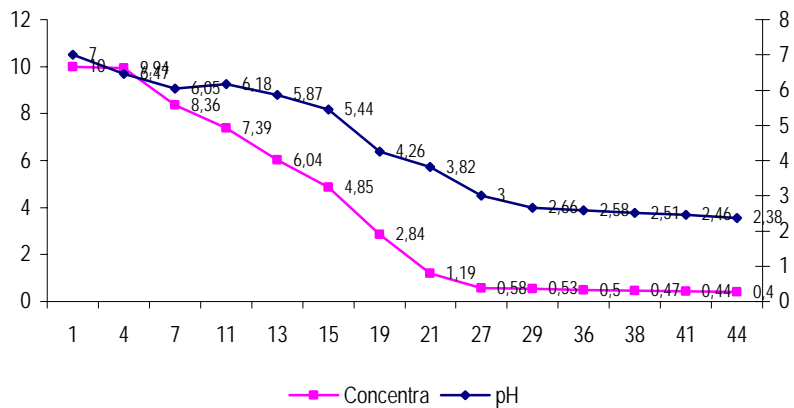
**Tabla 14. Determinación de Qs (consumo específico de sustrato)**

<b>Qs Agitado</b>	<b>Qs No agitado</b>
<b>0.51</b>	<b>0.39</b>

En la figura 19. observamos que el sistema de cultivos de batch en estanco tiende a estar en la fase balanceada o trofofase de Turner mencionado por (Forchiassin et al. 1999) aunque la literatura actual indican a esta fase como “logarítmica” durante 7 días, a comparación del cultivo en lotes (batch) en agitado que tiende a estar aproximadamente 4 días, posteriormente entramos a la fase de mantenimiento o también denominado “exponencial” que en el caso del sistema de cultivo en agitado llega a los 29 días en el caso del sistema de cultivo en estanco a los 27 días, llegando a la fase de mantenimiento o idiofase de Turner que también es denominada estacionaria.

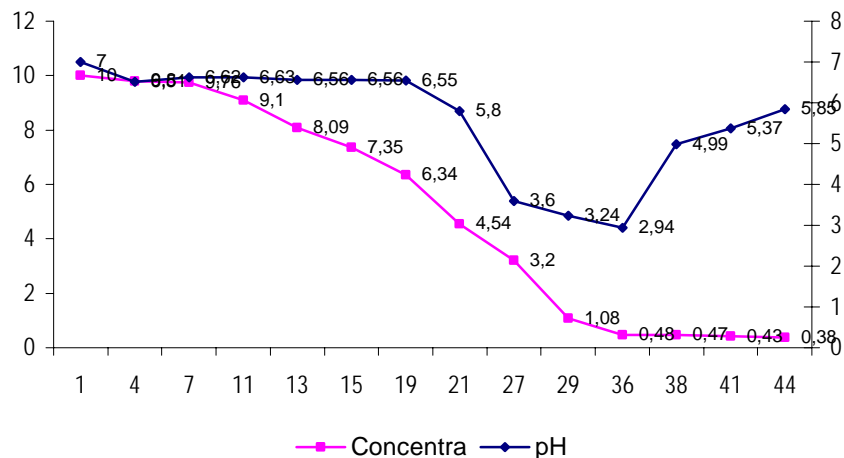
#### **5.4.2.1 Consumo de glucosa y cambio de pH del la cepa IB - 17 en sistemas de cultivo de batch agitado y no agitado.**

La concentración del consumo de glucosa en el sistema no agitado de la cepa IB - 17 desciende de la misma forma que desciende el pH, en el sistema estanco cuenta con descensos bruscos de consumo de glucosa siendo en el día 4, hasta el día 21 que aparentemente ya es consumido casi el total de glucosa del medio. El cambio de pH desciende relativamente de 7 hasta 2,38 tomando como un parámetro de 44 días



**Figura 19. Consumo de glucosa y cambio de pH de la cepa IB - 17 en medio basal en sistema de cultivos batch en estanco (no agitado)**

La concentración del consumo de glucosa y pH es diferente en relación al sistema de cultivos en batch no agitado, en el sistema agitado cuenta con el descenso desde el día 7 hasta el día 29, que aparentemente ya es consumido casi el total de glucosa en el medio. El cambio de pH con leve descenso hasta el día 23 sufriendo un descenso brusco hasta el día 27, posteriormente del día 36 sube llegando hasta el día 44 con un pH 5,85.



**Figura 20. Consumo de glucosa y cambio de pH de la cepa IB - 17 en medio basal en sistema de cultivos batch en agitado**

## **5.5 Actividad biocontroladora de la cepa IB – 17 en sistemas de cultivos en batch en condiciones agitadas y no agitadas**

Cuando la cepa IB – 17 fue inoculada en sistemas de cultivos en batch agitadas y no agitadas, se observó el desarrollo fúngico y la producción de metabolitos secundarios con posible actividad biocontroladora para la Escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) y para Mazorca negra (*Phytophthora palmivora*) ambos fitopatógenos de cultivo de Cacao (*Theobroma cacao* L.).

### **5.5.1 Actividad biológica inhibitoria del fermento de cultivos en batch en condiciones agitadas y no agitadas de la cepa IB - 17 en el crecimiento hifal de la cepa *Moniliophthora perniciosa***

De acuerdo al análisis de varianza descrito en la tabla 15, donde se realiza la comparación o influencia del sistema cultivo ya sea batch agitado o batch no agitado con el tiempo de toma de muestras. Se observa que no existe una diferencia significativa en cuanto al sistema de cultivo, pero si en el tiempo de toma de muestras. Este análisis corrobora el hecho de que la producción de metabolitos con actividad biológica se halla relacionada a la fase estacionaria de la cinética de crecimiento de IB - 17, la misma que puede ser alcanzada indistintamente en ambos e sistemas de cultivo.

En la interacción sistemas de cultivos en batch y tiempos de toma de muestras no existen diferencias significativas.

Siendo el coeficiente de variación de 4.6 % resultado que nos demuestra que el experimento ha sido bien manejado

**Tabla 15. ANVA para la comparación en sistemas de cultivo en batch de la cepa IB – 17 a cada tiempo de toma de muestras en el crecimiento hifal de la cepa *Moniliophthora perniciosa* (Escoba de bruja)**

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>FC</i>	<i>Ft(5%)</i>
A Sistemas de cultivo en Batch	1	0,01	0,01	0,03	4,02 NS
B tiempos de ext. de muestra	26	16,83	0,65	3,31	1,724 *
AB	26	2,32	0,09	0,46	1,724NS
Error	54	10,57	0,20		
Total	107				

CV = 4,6 %

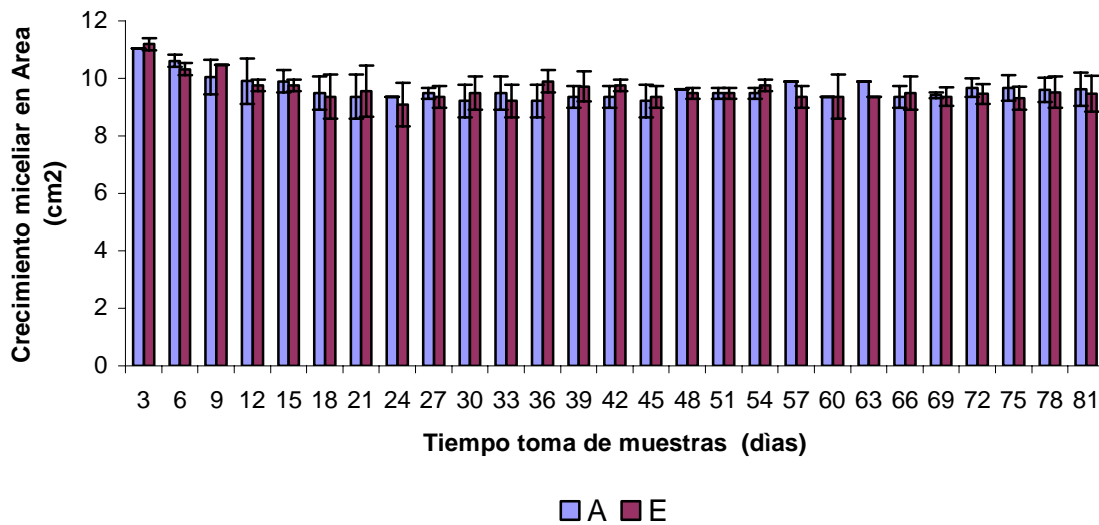
NS No significativo      \* Significativo

En la Tabla 16 observamos que el tratamiento A = agitado y E = no agitado (estanco), no se diferencian en cuanto a la efectividad de la actividad biocontroladora en la en la cepa *Moniliophthora perniciosa*,

**Tabla 16. Comparación de medias a partir de prueba de Tukey en sistemas de cultivo en batch de la cepa IB – 17 en el control biológico de la Escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*)**

Tratamiento	Promedio	Tukey
Sistema Agitado	9,63	A
Sistema No agitado	9,62	A

De acuerdo a la figura 21 la actividad biocontroladora de la cepa IB – 17 del sistema de batch agitado y estanco es casi similar en los diferentes tiempos no existiendo diferencias significativas, en los desvíos estándar nos muestran que tienen grados de similitud en cuanto al desarrollo hifal de la cepa *Moniliophthora perniciosa* en condiciones agitadas y no agitadas.



**Figura 21. Comparación de la actividad biocontroladora del fermento IB – 17 en sistemas agitado y estanco para en el desarrollo hifal en la cepa *Moniliophthora perniciosa* (Escoba de bruja)**

### **5.5.2 Actividad biológica inhibitoria del fermento de cultivos en batch en condiciones agitadas y no agitadas de la cepa IB - 17 en el crecimiento hifal de la cepa *Phytophthora palmivora***

Para determinar el sistema de cultivos en batch que pueden desarrollar metabolitos secundarios con actividad biológica inhibitoria en el control de la cepa *Phytophthora palmivora*, recurrimos la siguiente forma estadística:

De acuerdo al siguiente análisis de varianza en la tabla 17, en el control de la cepa *Phytophthora palmivora* en condiciones *in vitro*, los resultados obtenidos nos muestran que existen diferencias significativas en cuanto a sistemas de cultivos en batch estanco y agitado; también existen diferencias significativas en cuanto al tiempo de extracción de muestras con referente a actividad biológica biocontroladora.

En la interacción sistemas de cultivos en batch y tiempos de toma de muestras no existen diferencias significativas

El coeficiente de variación es de 6.63 %, demostrando que el experimento ha sido bien manejado.

**Tabla 17. ANVA para la comparación en sistemas de cultivo en batch de la cepa IB – 17 a cada tiempo de toma de muestras en el crecimiento hifal de la cepa *Phytophthora palmivora* (Mazorca negra)**

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>FC</i>	<i>Ft</i>
A Sistemas de cultivo Batch	1	2,25	2,25	15,04	4,02 *
B tiempos de ext. De muestra	26	144,64	5,56	37,27	1,724 *
AB	26	4,25	0,16	1,09	1,724NS
Error	54	8,06	0,15		
Total	107				

CV = 6,63 %

NS No significativo

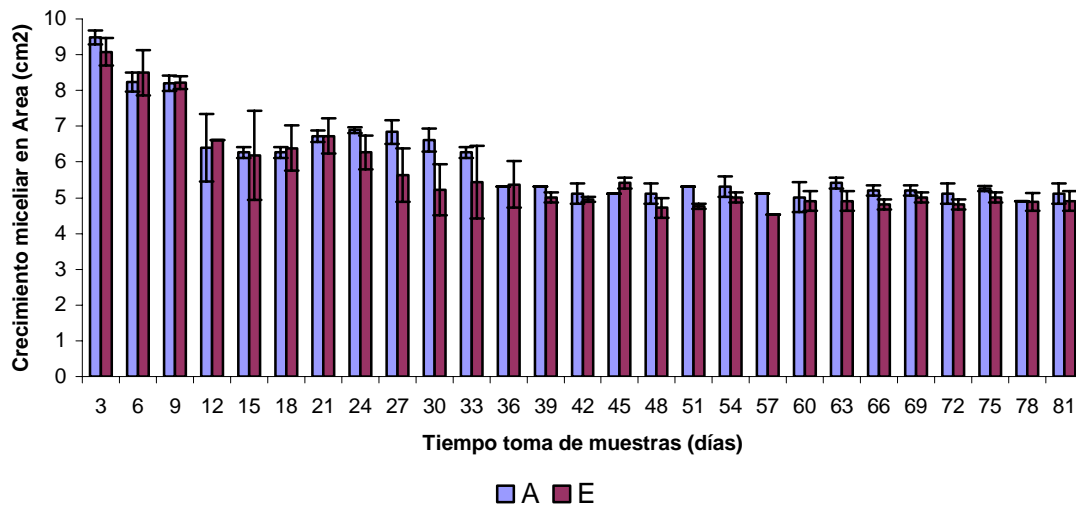
\* Significativo

En esta Tabla 18 observamos que el tratamiento A = agitado y E = estanco o no agitado se diferencian en cuanto a la efectividad de la actividad biocontroladora en la enfermedad Mazorca negra,

**Tabla 18. Comparación de medias a partir de prueba de Tukey en sistemas de cultivo en batch de la cepa IB – 17 en el control biológico de la Mazorca negra (*Phytophthora palmivora*)**

Tratamiento	Promedio	Tukey
Sistema Agitado	5.97	A
Sistema No agitado	5.68	B

La actividad biocontroladora de la cepa IB – 17 del sistema de cultivos en batch agitado y no agitado, no es similar en los diferentes tiempos, teniendo una relativa mayor efectividad el sistema de cultivos en estanco (no agitadas) de acuerdo a los desvíos estándar en la figura 22 observamos que los resultados pueden ser muy variables, pero existe un grado de mayor efectividad en condiciones no agitadas.



**Figura 22. Comparación de la actividad biocontroladora del fermento IB – 17 en sistemas agitado y estanco para en el desarrollo hifal en la cepa *Phytophthora palmivora* (Mazorca negra)**

Según Ciancas, (2006) casi todos los biocontroladores se producen en biorreactores normales de tanque agitado o sin agitar, o en sistemas sólidos con el uso de un soporte. El diseño del sistema de crecimiento puede ser crítico para alcanzar la productividad, además de las condiciones como la temperatura, pH, aireación, la agitación.

En relación a los medios de cultivo utilizados para la producción de metabolitos secundarios, se utilizó un medio de cultivo casero y económico caldo papa dextrosa (CDA) muy rico en fuentes de carbono. Así mismo para la producción de metabolitos secundarios de *Penicillium sp 28* se utilizó medio papa glucosa suplementado con sulfato de amonio, este medio de cultivo es similar al utilizado en nuestro estudio.

Se logró observar indistintamente la reacción sobre la actividad biológica inhibitoria frente a cada fitopatógeno, puesto que en el caso de la *Moniliophthora pernicioso* no existen diferencias significativas en el sistema



de cultivos en batch, En el caso del *Phytophthora palmivora* si existe diferencias significativas en cuanto al sistema de cultivos en batch resultando mejor en condiciones no agitadas esto representa un menor costo en el uso de equipos en la producción del fermento.

## **5.6 Comparación control biológico vs. control químico**

Como fase final del presente experimento se desarrollo una comparación entre el control biológico seleccionado a partir de la cepa IB – 17 que tiene actividad biológica inhibitoria versus control químico, además se utiliza un control negativo denominado también como control de crecimiento.

### **5.6.1 Comparación de la actividad biológica inhibitoria de la cepa IB – 17 a través de fermento estéril, frente a control químico (positivo) y al control de crecimiento en la cepa *Moniliophthora perniciosa* (Escoba de bruja)**

Como control químico se utilizó El fungicida comercial Fitorraz este como control positivo y el control negativo o testigo, el control biológico metabolito secundario o fermento estéril de la cepa IB – 17 fue seleccionado de los tratamientos realizados en estanco siendo indiferente cualquier método de extracción en actividad biológica inhibitoria de esta enfermedad.

Para demostrar los resultados se realizó el análisis estadístico ANVA, diseño de bloques al azar, tomando el tiempo como bloque. Donde observamos en el Tabla 19 no existen deferencias significativas en cuanto al tratamiento bloque, en este caso en tiempos de toma de muestras, pero si hubo diferencias significativas en cuanto al efecto tratamiento, además observamos que el coeficiente de variación es de 5.3 % siendo bastante aceptable, indicando que el experimento ha sido bien desarrollado.

**Tabla 19. ANVA para la comparación en sistemas de control biológico a través del fermento de la cepa IB – 17 frente a control químico y al control de crecimiento en la cepa *Moniliophthora perniciosa* (Escoba de bruja)**

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>FC</b>	<b>Ft</b>
Bloque (tiempo)	26	2,81	0,11	0,51	1,73 NS
Tratamiento	2	710,84	355,42	1689,61	3,174 *
Error	52	10,94	0,21		
Total	80				

CV = 5,3 %

NS No significativo

\* Significativo

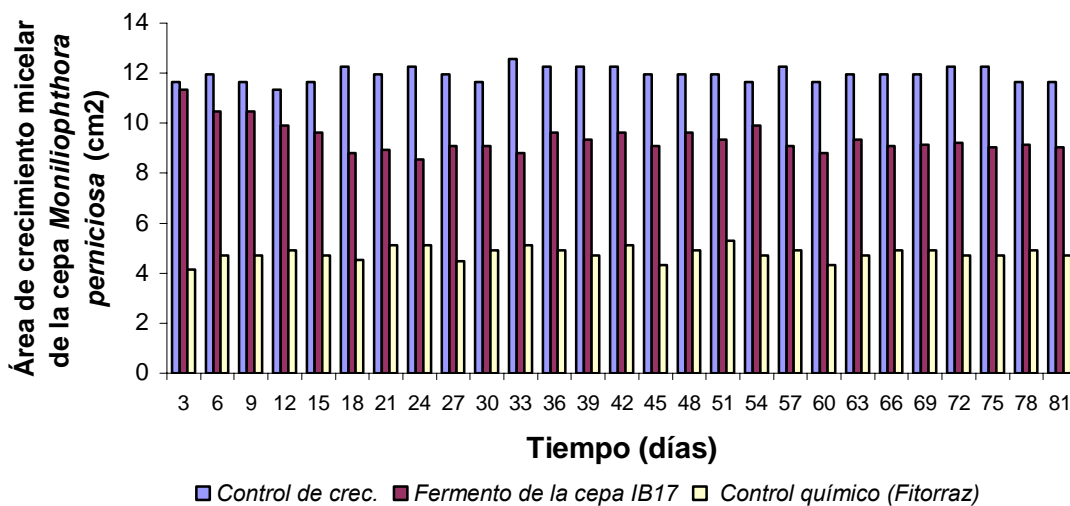
Para realizar la comparación de medias, en la Tabla 20, las pruebas *Dunnet* nos indican que existen diferencias significativas en cuanto al tratamiento de control químico Fitorraz frente al testigo o control de crecimiento y también existe diferencias significativas en cuanto al tratamiento de control biológico, con el fermento estéril de la cepa IB - 17.

**Tabla 20. Prueba *Dunnet* en comparación de medias para sistemas de control biológico a través del fermento de la cepa IB – 17, frente a control químico y al control de crecimiento en la cepa *Moniliophthora perniciosa* (Escoba de bruja)**

<b>Tratamientos</b>	<b>Promedio</b>	<b>Dunnet</b>
IB17 – testigo =	69,15	> 0,85 *
Fitorraz – testigo =	193,33	> 0,85 *

NS No significativo

\* Significativo



**Figura 23. Comparación esquemática de crecimiento en la cepa *Moniliophthora perniciosa* (Escoba de bruja) en sistemas de control biológico a través del fermento de la cepa IB – 17 frente a control químico y al control de crecimiento.**

En figura 23. observamos de manera más detallada el crecimiento del hongo fitopatógeno frente a la acción de los fungicidas de diferente origen ya mencionado anteriormente, observamos que el control de crecimiento o testigo en un lapso de 7 días, tiende a desarrollar el micelio en las placas petri en forma circular hasta un área promedio de 12 cm<sup>2</sup>, en caso del control positivo o control químico tiende a desarrollar a un promedio de 4.8cm<sup>2</sup> realizando una proporción el control químico inhibe hasta un 60% aproximadamente, en el caso del control biológico utilizando el fermento estéril de la cepa IB – 17 tiene un control del 28% en la cepa *Moniliophthora perniciosa*, esto transcurrido 24 días después de la siembra de las cepa para la obtención de metabolito, donde indicamos que el efecto tiempo puede ser un factor muy importante para el cultivo de microorganismos con el fin de extracción de metabolitos secundarios.

### 5.6.2 Comparación de la actividad biológica inhibitoria de la cepa IB – 17 a través de fermento estéril, frente al control químico (positivo) y al control de crecimiento en la cepa *Phytophthora palmivora* (Mazorca negra)

Para esta enfermedad se utilizó como control químico o control positivo el fungicida comercial Benlate y utilizamos un control de crecimiento o testigo, el control biológico fermento estéril de la cepa IB – 17 fue seleccionado de los tratamientos realizados en condiciones en no agitada de cultivos en batch ya que mostró mejores condiciones en cuanto a su extracción y actividad biológica inhibitoria.

Para demostrar los resultados se realizó el análisis estadístico ANVA, diseño de bloques al azar, observando en el Tabla 21, podemos observar que no existen deferencias significativas en cuanto al tratamiento bloque, en este caso en tiempos de toma de muestras, pero si hubo diferencias significativas en cuanto al efecto tratamiento, además observamos que el coeficiente de variación es de 14.3 % siendo bastante aceptable,

**Tabla 21. ANVA para la comparación en sistemas de control biológico a través del fermento de la cepa IB – 17 frente al control químico y al control de crecimiento en la cepa *Phytophthora palmivora* (Mazorca negra)**

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>FC</b>	<b>Ft</b>
<b>Bloque (tiempo)</b>	26	11,44	0,44	0,66	1,73 NS
<b>Tratamiento</b>	2	844,00	422,00	636,86	3,174 *
<b>Error</b>	52	34,46	0,66		
<b>Total</b>	80				

**CV = 14,3 %**

NS No significativo

\* Significativo

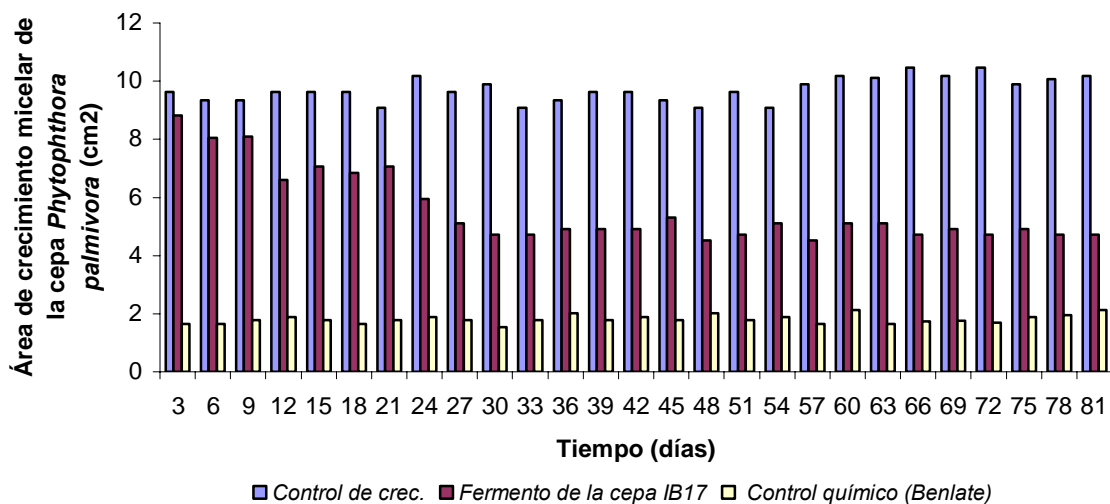
Para realizar la comparación de medias recurrimos a las pruebas Dunnet en la tabla 22, nos indican que existen diferencias significativas en cuanto al tratamiento de control químico *Benlate* frente al testigo o control de

crecimiento y también existen diferencias significativas en cuanto al tratamiento de control biológico.

**Tabla 22. Prueba *Dunnet* en comparación de medias para sistemas de control biológico a través del fermento de la cepa IB – 17, frente al control químico y al control de crecimiento en la cepa *Phytophthora palmivora* (Mazorca negra)**

Tratamientos	Promedio	<i>Dunnet</i>
IB17 – testigo =	111,41	> 1.51 *
Benlate – testigo =	213,42	> 1.51 *
NS No significativo		* Significativo

En la figura 24 observamos de manera más detallada el crecimiento de la cepa *Phytophthora palmivora* frente a la acción de los fungicidas de diferente origen ya mencionado anteriormente, donde observamos que el control de crecimiento o testigo en un lapso de 7 días, tiende a desarrollar el micelio en las placas petri en un área promedio de 9.8 cm<sup>2</sup>. en caso del control positivo o control químico tiende a desarrollar a un promedio de 1.8 cm<sup>2</sup> realizando una proporción el control químico inhibe hasta un 81% aproximadamente, en el caso del control biológico utilizando el fermento estéril de la cepa IB – 17 tiene un control del 54% máximo, transcurrido de 33 a 36 días después de la siembra de las cepa IB -17 para la obtención de metabolito, donde indicamos que el efecto tiempo puede ser un factor muy importante para el cultivo de microorganismos con el fin de extracción de metabolitos secundarios.



**Figura 24. Comparación esquemática de crecimiento en la cepa *Phytophthora palmivora* (Mazorca negra) en sistemas de control biológico a través del fermento de la cepa IB – 17 frente a control químico.**

Realizando una comparación del estudio final y el estudio preliminar, existe una diferencia en cuanto a la efectividad del fermento de la cepa IB – 17 que se reduce la actividad biocontroladora, en el caso de la cepa *Moniliophthora perniciosa* de 95 % hasta 28%, en el caso de *Phytophthora palmivora* de 97% hasta 54%. La cepa IB – 17 pierde actividad biocontroladora frente a estos fitopatógenos, desde la evaluación inicial del estudio hasta el momento de la evaluación final, existen varias hipótesis sobre este problema, una de las causas posibles puede ser el echo de la adaptabilidad al medio ambiente y el medio de cultivo que posiblemente no tenga la necesidad de producir metabolitos ya que tiene todas las condiciones favorables para desarrollar sin problemas. Otra hipótesis planteada viene a ser sobre la posible función de la cepa con otros microorganismos en este caso en forma de consorcios, puesto que para el presente trabajo se había purificado el hongo ya que el trabajo realizado fue en condiciones estériles pero existía un cierto grado de contaminación bacteriana.

## 6 CONCLUSIONES

Se recolecto muestras de diferentes partes de la planta del cacao con síntomas de enfermedad como ser: escobas verdes, escobas negras, frutos, macromicetos en hojas, sobre ramas suelo. Para ello se desarrollo 2 tratamientos de siembra: directo e indirecto de las cuales el 75% de las muestras con estructura hifal característica de la cepa *Moniliophthora perniciosa*. El 17 % de las muestras resultaron ser similares a las estructuras de la especie *Phytophthora*. En muestras de tierra y frutos secos, el 8 % presentó el desarrollo de otros hongos que posiblemente puedan ser saprofitos. De la presente recolección de muestras se logro aislar 5 cepas de hongos.

Se espera un incremento en la velocidad de  $1.38 \text{ cm}^2/\text{d}$  del crecimiento miceliar de la cepa *Moniliophthora perniciosa*. En el caso de la cepa *Phytophthora palmivora* la velocidad de crecimiento es de  $0.81 \text{ cm}^2/\text{d}$ .

Se observó que las cepas IB – 22c; SAK – 1 y IB -17 muestran una buena actividad biocontroladora tomando como base el método de enfrentamiento dual, donde la cepa SAK – 1 no tolera la manipulación en condiciones *in Vitro*, y la definición se basó entre las cepas IB – 22c y la IB – 17, donde el porcentaje de inhibición del crecimiento hifal de los fitopatógenos hizo que se seleccionara a la cepa IB – 17

Actividad biocontroladora de la cepa IB – 17 en sistemas de cultivos en batch en sistemas agitado y estanco en el control de la cepa *Moniliophthora perniciosa* no existen diferencias significativas en el método de cultivos en batch, en el caso del *Phytophthora palmivora* resultan mejores en condiciones de no agitadas o estanco

Para el control químico de la cepa *Moniliophthora perniciosa*, en condiciones de laboratorio resulta mejor el Fitorraz que controla hasta un



64 %. En el control químico de la cepa *Phytophthora palmivora*, el Benlate controla hasta un 84 %.

En el experimento de comparación control biológico frente a control positivo (químicos) y control de crecimiento (testigo) de la cepa *Moniliophthora perniciosa* con la lectura a los siete días, realizando una proporción el control químico inhibe hasta un 60% aproximadamente, en el caso del control biológico utilizando el fermento estéril de la cepa IB – 17 tiene un control del 28%. En el caso de la cepa *Phytophthora palmivora* el control químico inhibe hasta un 81% aproximadamente, en el caso del control biológico utilizando el fermento estéril de la cepa IB – 17 tiene un control del 54%.

## 7 RECOMENDACIONES

Realizar un estudio detallado sobre el proceso de adaptabilidad en la cepa IB - 17 en condiciones *in vitro*, para mejorar las condiciones de manipulación y la extracción de metabolitos secundarios biológicamente activos.

Realizar un proceso de investigación sobre posibles consorcios de microorganismos con la cepa IB - 17 que puedan producir metabolitos biológicamente activos

Realizar la identificación y determinar el árbol genealógico en la cepa IB – 17

Realizar pruebas de validación de resultados en campo con la aplicación de estos metabolitos secundarios para determinar su actividad biológica inhibitoria frente a los fitopatógenos.

Desarrollar una interacción entre facultades para el apoyo y el desarrollo trabajos de investigación.

## 8 LITERATURA CITADA

**Agrios, G. 1991.** Fitopatología, Edición 1., Limusa. MX. 465 p.

**Aime, M y Phillips-Mora W, 2005,** The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae, Cathie@nt.ars-grin.gov, US. The Mycological Society of America, USDA-Agricultural Research Service, Systematic Botany and Mycology Lab, Cacao Breeding Program, CATIE

**Astorga, P. 2004.** Estudio de Posibles biocontroladores de fitopatógenos de la Haba (*Vicia faba*) y la Papa (*Solanum tuberosum*). Tesina de Grado, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, BO. 70 p.

**Augstburger, F.; Berger, J.; Censkowsky, U.; Heid, P.; Milz, J.; Streit, C. 2000** Agricultura Orgánica en el Trópico y Subtrópico Guías de 18 cultivos, Asociación Naturland - 1ª edición (GTZ, Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit mbH), (BMZ, Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit), DE. (En línea). Consultado el 1 de febrero de 2006, Disponible: [www.naturland.de](http://www.naturland.de)

**Bell, y Warkham. 1982.** *in Vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology US. 72:379-382.

**Bowers, J., 2001.** The Impact of Plant Diseases on World Chocolate Production. US. (En línea). Consultado el 13 de febrero 2006. Disponible en <http://www.plantmanagementnetwork.org/>

**Calvo, M., 1993.** Estudio del metabolismo secundario en cepas del género *Arthrrium*: actividad antibiótica. Tesis de doctorado, Universidad Complutense de Madrid, ES. (En línea). Consultado el 13 de febrero 2006. Disponible en: <http://www.im.microbios.org/04december98/05%20Demain.pdf>

**Calzada, B., 1970.** Métodos estadísticos para la investigación. Editorial Jurídica S.A. Tercera Edición, PE. 644p.

**Centro agrícola de investigación y del desarrollo de la universidad de estado de Ohio, 2005,** US. (En línea), Consultado el 14 de febrero de 2006 Disponible en [http://www.dropdata.net/cocoa/cocoa\\_prob.htm](http://www.dropdata.net/cocoa/cocoa_prob.htm)

**Cerda, R. 2002.** Diagnostico de enfermedades fungosas en genotipos cultivos de cacao en floración y fructificación en localidades productoras de Alto Beni. Tesis de licenciatura, Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz BO.125 p.

**Ciancas, J. 2006.** Efecto biocontrolador de la cepa *Trichoderma inhamatum*. Bol 12 QD-1 sobre el fitopatógeno *Botrytis cinerea* causante de la “Mancha chocolate” en cultivos en haba de la comunidad de Chirapaca. Tesis de Maestría, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz BO.143 p.

**Cruz, D. 2001.** Apuntes de Fitopatología. Facultad de Agronomía Universidad Mayor de San Andrés, La Paz BO. 161 p.

**Elad, Y.; Katan, J. 1980.** *Trichoderma harzianum*: A biocontrol effective against *Sclerotium roldsii* and *Rhizoctonia solani*. Phytopatology. US. 422p

**Enríquez, G. 1985.** Curso sobre el cultivo del cacao. Centro agronómico Tropical de investigación y enseñanza (CATIE) Turrialba, CR. 238p

**Franco, J. 2002** Cacao, cultivos tropicales. ES. (En línea). Consultado el 13 de febrero 2006. Disponible en: <http://www.infoagro.com/herbaceos/industriales/caco.asp>

**Forchiassin, F.; Mangelli, P.; Diorio, L. y Mercuri, O. 1999.** Guía de Micología experimental Metabolismo secundario, Universidad de Buenos Aires. AR. 86 p

**Gilchrist, L.; Fuentes, G.; Martínez, C.; López, R.; Duveiller, E.; Singh, R.; Henry, M. y García; I. 2005.** Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada, segunda edición, MX. 75 p

**Gómez, M.; Mujica, J.; Ardilla O.; Nuñez R.; Manrique, C; Cadena, H. 1989.** La escoba de bruja, conozca y controle. Santander, Federación Nacional de cacaoteros, CO. 17 p.

**Griffith, G.; Nicholson, J.; Nenninger, A. y Birch, R., 2003.** Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao, school of life sciences, university of westminster, london england. publicado por: new zealand journal of Botany, US. Vol. 41: 423–435

**Guimarães, T. 2004.** Caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis pernicioso*, Tese Doutor, escola superior de agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, BR., 86 p.

**Haro, A. 1988.** Atlas de biología, ediciones jover, Barcelona ES., 86 p.

**Herbas R, 1983** Introducción a la investigación fitopatología, BO., 205 p.

**Iáñez E. 1998.** Quimioterápicos de síntesis y antibióticos. Curso de Microbiología General. AR., (En línea). Consultado el 18 de enero 2007. Disponible en <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/20micro.htm>

**Kalam. A., 1999** Apuntes de ecología .Editorial: MSDAK, tercera edición, Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía, BO., 120 p.

**Lagunas y Trigos A., 2006.** Hongos en los alimentos ¿estamos realmente informados?, MX., (En línea). Consultado el 18 de enero 2007. Disponible en <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol19num2/articulos/hongos/index.html>

**Lannamico, L y Rossini, Mirta 2007,** *Phytophthora*, un enemigo peligroso, liannamico@correo.inta.gov.ar, IINTA AR.

**Mateos, P. 2006** producción industrial de metabolitos secundarios, ES. (En línea). Consultado el 18 de enero 2007. Disponible en <http://coli.usal.es/Web/SEFIN/MI/programa.htm>

**Mierelles S. 2002** Epidemiologia da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer em cacauerios enxertados en uruçuca, Br, Tese Mestre em Agronomia, escola superior de agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, BR., 70 p.

**Montgomery D. 2002** Diseño y análisis de experimentos, Universidad estatal de Arizona, segunda edición, ediciones limusa, MX., 680 p

**Moreno, L. y Sánchez, J., 1991** Poda y regulación de sombra en cacao, HO., Fundación Hondureña de investigación agrícola 19 p.

**Norbey y Rodríguez, 2006** Escoba de bruja del cacao. Explotaciones agrícolas amazónicas. *Crinipellis pernicioso*. Hongos endémicos del Amazonas. Fitosanitarios. Enfermedades de las plantas. Sintomatología. Basidiocarpos. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. (En línea). CO. Consultada el 1 de febrero de 2006 disponible: <http://apuntes.rincondelvago.com/escoba-de-bruja-del-cacao.html>

**O’Gara, E. 2005** *Phytophthora*. University of Melboure. US., Consultado el 21 de sep. 2005, Disponible: <http://www.botany.unimelb.edu.au/botanyunimelb/1pages/rese-arch/labs/mycology/duriansit/Phytophthora.html>

**OARDC, 2006.** Bibliography of Black Pod Diseases; *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora megakarya*, *Phytophthora capsica*. US., (En línea). Consultado el 13 de enero 2007. Disponible en: <http://www.oardc.ohio-state.edu/cocoa/blackpod.htm>

**Peláez, D. 2001.** Manual de aislamiento de hongos fitopatógenos - I.I.F.B. Guia de laboratorio, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, 31 p.

\_\_\_\_\_. **2002.** Evaluación de la capacidad biocontroladora frente a fitopatógenos que afectan cultivos de *Solanum Tuberosum* y *Vicia faba* en el Altiplano Boliviano. Tesis de Maestría, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz BO., 105 p.

**Porras, H.; Sánchez, J. 1991** Enfermedades del cacao. HO, Fundación hondureña de investigación agrícola (FHIA), 32p.

**Reyes, P. 1990** Bioestadística aplicada: agronomía, biología, química 2da edición, ediciones trillas, MX., 216p.

**Rosas y Astorga, P. 2003.** Biotecnología y biodiversidad microbiana hongos con actividad biológica inhibitoria contra (*alternaria solani*), recolectadas de la región de río abajo (valencia) de la ciudad de La Paz. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, BO. 27 p.

**Sanogo, S., Pomella, A., Hebbar, P. K., Bailey, B., Costa, J. C. B., Samuels, G. J., and Lumsden, R. D. 2002.** Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis pernicioso* on cacao. MX. Phytopathology 92:1032-1037.

**Scattolini A. 2004.** La enfermedad; Apuntes de fitopatología Presentación *Power Point*, Sao Paulo BR.

**Suárez, G. y Delgado, J. 1993.** La Escoba de bruja del cacao. Quito EC INIAP. 21 p.

**Tovar, G. 1991** La Investigación sobre la Epidemiología de la Escoba de Bruja del Cacao *Crinipellis pernicioso* (*Stahel*) *Singer*) en el Piedemonte Llanero de Colombia. Consideraciones generales. Agronomía, CO., p 31-40.

**Webcolombia, 2005.** Plantas alelopáticas, (en línea), CO., Consultado el 25 de octubre de 2005 Disponible en [http:// www.webcolombia.com](http://www.webcolombia.com)



**Wikimedia Foundation, 2006.** *Crinipellis perniciosa* From Wikipedia, the free encyclopedia. US., (En línea). Consultado el 22 de enero 2006. Disponible en: [http://en.wikipedia.org/wiki/Crinipellis\\_perniciosa](http://en.wikipedia.org/wiki/Crinipellis_perniciosa)

\_\_\_\_\_, **2006.** *Palmivora de Phytophthora* From Wikipedia, the free encyclopedia. (En línea). Consultado el 13 de enero 2007. Disponible en: [http://en.wikipedia.org/wiki/Phytophthora\\_palmivora](http://en.wikipedia.org/wiki/Phytophthora_palmivora)

## Abreviaturas

IIFB	Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas
IIDEPROQ	Instituto de Investigación y Desarrollo en Procesos Químicos
DNS	ácido dinitrosalicílico
μl	Microlitros
ml	Mililitros
Abs	Absorbancia
°C	Grados Centígrados
nm	Nanómetros
μg	Microgramos
cm	Centímetros
PDC	Caldo Papa Dextrosa
PDA	Agar Papa Dextrosa
rpm	Revoluciones por minuto
ANVA	Análisis de Varianza

# Anexos

## **Anexo 1. Funguicidas químicos aplicados en el control de las enfermedades Escoba de bruja y Mazorca negra en condiciones *in vitro***

### ***Fitorraz***

#### ***Curathane 720 PM***

##### *Ingrediente activo*

Cymoxamil 2-ciano-n(etilamina carbonil-2-(Metoximino) acetamida 8%

Mancozeb-ion Zinc etilen bislito carbamato de magnesio 64%

Ingrediente inerte 28%

*Solución aplicada 50gr/ 20lt de agua*

### ***Benlate***

##### *Ingrediente activo*

Benomil(metil-1-butilcarbomoil-2bencimidazol carbamato) 50gr

Ingrediente inerte 100gr

*Solución aplicada 20gr/ 20lt de agua*

### **Mancozeb**

#### **Dithane\* 80 NT**

##### *Ingrediente activo*

Etileno bis de manganeso (ditiocarbanoato) 800 gr./Kg. (\*)

Ingredientes inertes y coadyuvantes csp200g/Kg.

(\*) Equivalente a 160gr/ Kg. de magnesio metálico y 20gr/Kg. de Zinc Metálico

*Solución aplicada 80gr/ 20lt de agua*

### ***Systhane\* E***

##### *Ingrediente activo*

Alfa butil alfa(clorofenil)-1-H-1,2,4triazol, -1 propanonitrilo 261gr/lt

Ingrediente inerte 739gr/lt

*Solución aplicada 20ml/ 20lt de agua*

**Anexo 2. Consumo de glucosa Y pH Cepa IB - 17**

CONSUMO DE GLUCOSA Y pH CEPA IB -17									
CULTIVO EN ESTANCO					CULTIVO EN AGITADO				
MUESTRA	Tiempo	Abs	pH	Concentra	MUESTRA	Tiempo	Abs	pH	Concentra
	1	3,28041	7	10		1	3,28041	7	10
<b>1</b>	4	3,25977	6,47	9,94	<b>1</b>	4	3,21161	6,51	9,8
<b>2</b>	7	2,43417	6,05	7,54	<b>2</b>	7	3,19785	6,62	9,76
<b>3</b>	11	2,38257	6,18	7,39	<b>3</b>	11	2,86073	6,63	8,78
<b>4</b>	13	1,91817	5,87	6,04	<b>4</b>	13	2,48921	6,56	7,7
<b>5</b>	15	1,85281	5,44	5,85	<b>5</b>	15	2,46169	6,56	7,62
<b>6</b>	19	0,81737	4,26	2,84	<b>6</b>	19	2,11425	6,55	6,61
<b>7</b>	21	0,24977	3,82	1,19	<b>7</b>	21	1,40217	6,37	4,54
<b>8</b>	27	0,03993	3	0,58	<b>8</b>	27	1,21641	3,37	4
<b>9</b>	29	0,02273	2,66	0,53	<b>9</b>	29	0,01241	3,54	0,5
<b>10</b>	36	0,01241	2,58	0,5	<b>10</b>	36	0,00553	2,94	0,48
<b>11</b>	38	0,00209	2,51	0,47	<b>11</b>	38	0,00209	5,33	0,47
<b>12</b>	41	-0,00823	2,46	0,44	<b>12</b>	41	-0,01167	5,37	0,43
<b>13</b>	44	-0,02199	2,38	0,4	<b>13</b>	44	-0,02887	5,85	0,38

**Anexo 3. Resultados de la selección de fungicidas químicos, como control positivo para fitopatógenos del cacao (*Theobroma cacao L.*)**

**Comparación de Fungicidas sintéticos en el control de la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) en condiciones *in vitro***

Tratamiento	Repeticiones		
	I	II	III
Testigo	19,64	17,35	18,86
Mancozeb	11,95	13,20	13,20
Sisthane	17,35	17,35	19,64
Benlate	9,62	12,57	10,75
Fitorraz	6,16	7,07	5,31

**Comparación de Fungicidas sintéticos en el control de la Mazorca negra (*Phytophthora palmivora*) en condiciones *in vitro***

Tratamiento	Repeticiones		
	I	II	III
Testigo	13,2	13,85	12,57
Mancozeb	5,73	4,52	4,91
Sisthane	14,52	10,18	11,95
Benlate	2,27	2,27	2,54
Fitorraz	7,07	5,73	8,04

**Anexo 4. Resultados de la actividad biocontroladora de la cepa IB – 17 en sistemas de cultivos batch en condiciones agitadas y no agitadas**

**Comparación de Sistemas en cultivos en batch a diferentes tiempos en el control biológico de la Escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) en condiciones *in vitro***

Tiempo de toma de Muestras	Agitado		Estanco	
	R1	R2	R1	R2
t1	11,04	11,04	11,34	11,04
t2	10,75	10,46	10,46	10,18
t3	10,46	9,62	10,46	10,46
t4	10,46	9,35	9,90	9,62
t5	10,18	9,62	9,62	9,90
t6	9,08	9,90	8,81	9,90
t7	8,81	9,90	8,92	10,18
t8	9,35	9,35	8,55	9,62
t9	9,62	9,35	9,08	9,62
t10	9,62	8,81	9,08	9,90
t11	9,90	9,08	8,81	9,62
t12	9,62	8,81	9,62	10,18
t13	9,62	9,08	9,35	10,09
t14	9,62	9,08	9,62	9,90
t15	9,62	8,81	9,08	9,62
t16	9,62	9,62	9,62	9,35
t17	9,62	9,35	9,35	9,62
t18	9,62	9,35	9,90	9,62
t19	9,90	9,90	9,08	9,62
t20	9,35	9,35	8,81	9,90
t21	9,90	9,90	9,35	9,35
t22	9,62	9,08	9,08	9,90
t23	9,48	9,35	9,13	9,59
t24	9,90	9,46	9,21	9,70
t25	9,98	9,35	9,03	9,59
t26	9,90	9,29	9,13	9,90
t27	10,04	9,21	9,03	9,90

**Comparación de medias a partir de prueba de Tukey en sistemas de cultivo batch de la Cepa IB – 17 en el control biológico de la Escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*)**

Sistema Batch	Total	Media
A	520,17	9,63
E	519,31	9,62

$$Sx = 0,06021096$$

Valor tabular de Tuquey = 3,412

VR Tukey =	0,21
------------	------

		A	E
		9,63	9,62
E	9,62	0,02 NS	
A	9,63		

**Comparación de Sistemas en cultivos batch a diferentes tiempos en el control biológico de la Mazorca negra (*Phytophthora palmivora*) en condiciones *in vitro***

Tiempo de toma de Muestras	Agitado		Estanco	
	R1	R2	R1	R2
t1	9,35	9,62	9,35	8,81
t2	8,04	8,42	8,95	8,04
t3	8,04	8,35	8,35	8,09
t4	7,07	5,73	6,61	6,61
t5	6,38	6,16	5,31	7,07
t6	6,38	6,16	5,94	6,83
t7	6,61	6,83	6,38	7,07
t8	6,95	6,83	6,61	5,94
t9	6,61	7,07	6,16	5,11
t10	6,83	6,38	5,73	4,71
t11	6,38	6,16	6,16	4,71
t12	5,31	5,31	5,83	4,91
t13	5,31	5,31	5,11	4,91
t14	5,31	4,91	5,01	4,91
t15	5,11	5,11	5,52	5,31
t16	4,91	5,31	4,91	4,52
t17	5,31	5,31	4,81	4,71
t18	5,52	5,11	4,91	5,11
t19	5,11	5,11	4,52	4,52
t20	4,71	5,31	4,71	5,11
t21	5,31	5,52	4,71	5,11
t22	5,11	5,31	4,91	4,71
t23	5,11	5,31	5,11	4,91
t24	4,91	5,31	4,91	4,71
t25	5,31	5,21	5,11	4,91
t26	4,91	4,91	5,07	4,71
t27	4,91	5,31	5,11	4,71



**Comparación de medias a partir de prueba de Tukey en sistemas de cultivo en batch de la cepa IB – 17 en el control biológico de la Mazorca negra (*Phytophthora palmivora*)**

Sistema Batch	Total	Media
A	322,14	5,97
E	306,57	5,68

Sx = 0,05257761

Valor tabular de Tuquey = 3,412

VR Tukey =	0,18
------------	------

		A	E
		5,97	5,68
E	5,68	0,29 *	
A	5,97		

## Anexo 5. Resultados de la comparación control biológico vs. control químico

Comparación de Sistemas control químico y biológico a diferentes tiempos frente al control de crecimiento en la Escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) en condiciones *in vitro*

Tiempos	Testigo	IB17	Fitoraz
t1	11,64	11,34	4,15
t2	11,95	10,46	4,71
t3	11,64	10,46	4,71
t4	11,34	9,90	4,91
t5	11,64	9,62	4,71
t6	12,25	8,81	4,52
t7	11,95	8,92	5,11
t8	12,25	8,55	5,11
t9	11,95	9,08	4,47
t10	11,64	9,08	4,91
t11	12,57	8,81	5,11
t12	12,25	9,62	4,91
t13	12,25	9,35	4,71
t14	12,25	9,62	5,11
t15	11,95	9,08	4,34
t16	11,95	9,62	4,91
t17	11,95	9,35	5,31
t18	11,64	9,90	4,71
t19	12,25	9,08	4,91
t20	11,64	8,81	4,34
t21	11,95	9,35	4,71
t22	11,95	9,08	4,91
t23	11,95	9,13	4,91
t24	12,25	9,21	4,71
t25	12,25	9,03	4,71
t26	11,64	9,13	4,91
t27	11,64	9,03	4,71

**Prueba Dunnet en comparación de medias para sistemas de control biológico a través de fermentos de la cepa IB – 17, frente a control químico y al control de crecimiento en la cepa *Moniliophthora perniciosa* (Escoba de bruja)**

Prueba de Dunnet			
	Sx =	0,3745	
$t_c$ medias sin incluir el testigo =	2,278		
	$VR_{DUNNET} =$	0,85	
Las diferencias con el testigo son:			
IB17 – testigo =	-69,15	69,15	> 0,85 *
Fitorraz – testigo =	-193,33	193,33	> 0,85 *

**Comparación de Sistemas control químico y biológico a diferentes tiempos frente al control de crecimiento en la Mazorca negra (*Phytophthora palmivora*) en condiciones *in vitro***

Tiempos	Testigo	IB17	Benlate
t1	9,62	8,81	1,65
t2	9,35	8,04	1,65
t3	9,35	8,09	1,77
t4	9,62	6,61	1,89
t5	9,62	7,07	1,77
t6	9,62	6,83	1,65
t7	9,08	7,07	1,77
t8	10,18	5,94	1,89
t9	9,62	5,11	1,77
t10	9,90	4,71	1,54
t11	9,08	4,71	1,77
t12	9,35	4,91	2,01
t13	9,62	4,91	1,77
t14	9,62	4,91	1,89
t15	9,35	5,31	1,77
t16	9,08	4,52	2,01
t17	9,62	4,71	1,77
t18	9,08	5,11	1,89
t19	9,90	4,52	1,65
t20	10,18	5,11	2,14
t21	10,12	5,11	1,65
t22	10,46	4,71	1,73
t23	10,18	4,91	1,76
t24	10,46	4,71	1,69
t25	9,90	4,91	1,89
t26	10,07	4,71	1,95
t27	10,18	4,71	2,14

**Prueba Dunnet en comparación de medias para sistemas de control biológico a través de fermentos de la cepa IB – 17, frente a control químico y al control de crecimiento en la cepa *Phytophthora palmivora* (Mazorca negra)**

---

Prueba de Dunnet	Sx =	0,6646	
$t_{\alpha}$ medias sin incluir el testigo =	2,278		
	$VR_{DUNNET} =$	1,51	
Las diferencias con el testigo son:			
IB17 – testigo =	-111,41	111,41	> 1.51 *
Benlate – testigo =	-213,42	213,42	> 1.51 *

---

## **Anexo 6. Preparación de Papa Dextrosa Agar (PDA)**

Este medio es generalmente usado para cultivar la mayoría de hongos fitopatógenos

### ***Formula:***

Papas peladas y picadas	250 gr.
Agar	18 gr.
Dextrosa (glucosa)	10 gr.
Agua destilada	1000 ml.

### ***Procedimiento:***

Hacer hervir las papas picadas en el agua por 30 min. Posteriormente filtrar el jugo de las papas a través de varias gasas, mezclar el agar y retribuir el agua completando hasta 1000 ml. Finalmente colocar la dextrosa (glucosa) y hacer hervir durante 3 minutos toda la mezcla. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 atm. 121 °C.

### Anexo 7. Medio Basal

Mg SO <sub>4</sub>	7 H <sub>2</sub> O	0.5 gr.
HK <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0.6 gr.
H <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub>		0.5 gr.
CuSO <sub>4</sub>	5 H <sub>2</sub> O	0.4 mg.
MnCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	0.09 mg.
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		0.07 mg.
NaMoO <sub>4</sub>	2 H <sub>2</sub> O	0.02 mg.
Fe Cl <sub>3</sub>		1 mg.
Zn Cl <sub>2</sub>		2.5 mg.
biotina		5 µg.
Hidrocloruro de tiamina		0.1 mg.
Agua destilada		1000 ml.

Mezclar y esterilizar a 15 atm, 121 °C por 15 min.

### Anexo 8. Medio Mínimo

NaNO <sub>3</sub>	6g
KCl	0,5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5g
ZnSO <sub>4</sub>	0,01g
FeSO <sub>4</sub>	0,01g
Ágar	15,0g
Água	1000mL

pH 6,8