ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción

‘‘Estudio del efecto de Bioles y cepas de *Trichoderma* sp. aisladas de zonas cacaoteras, como alternativas de control de *Moniliophthora roreri*, en condiciones *in vitro*’’.

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRÍCOLA Y BIOLÓGICO

Presentada por:

Freddy Arturo Magdama Tobar

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2010

AGRADECIMIENTO

A Dios por haber sido mi luz y fortaleza y por haberme dado la salud y la esperanza para terminar esta labor, a todas las personas que colaboraron en la realización de este trabajo, en particular al personal del CIBE quienes me brindaron su apoyo incondicional. Agradezco de manera especial a la Dra. Esther Lilia Peralta, a la Dra. María Isabel Jiménez y la Ing. Gabriela Maridueña por la orientación que me ofrecieron durante todo este tiempo.

DEDICATORIA

El esfuerzo y dedicación que he puesto en esta tesis va con mucho cariño a las personas que más amo: Mis padres Ing. Freddy Magdama y Lcda. Nery Tobar, a mis hermanos Raysa y Javier Magdama quienes han sido fuente de mi inspiración y motivación para poder superarme cada día más, y a mi querida Brigette por la paciencia y cuyo apoyo ha sido parte de este esfuerzo.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ing. Francisco Andrade S.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE

Ing. Gabriela Maridueña Z.
DIRECTOR DE TESIS

Dr. Paúl Herrera S.
VOCAL PRINCIPAL

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL ''.

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).

Freddy Arturo Magdama Tobar

RESUMEN

La producción del cacao (*Theobroma cacao L.*), y en particular del cacao arriba o fino y de aroma, es de fundamental importancia para la economía del Ecuador; su exportación alcanzó durante el 2008, ventas de un promedio de 95 mil toneladas, registrando un ingreso de 260 millones de dólares[1]. Estas estadísticas ubican al cacao en el tercer rubro de exportación agrícola del país, constituyendo fuente de ingresos para más de 100.000 pequeños productores de las tierras bajas de la Costa, Sierra y Amazonía[2] .Sin embargo, cada año la moniliasis del cacao (*Moniliophthora roreri*) ocasiona hasta 60% de pérdidas de la producción por infección y daño de la mazorcas, tornándose en una enfermedad que justifica ser considerada como una de las de mayor importancia en el Ecuador y en los países productores de cacao.

Los esfuerzos para buscar alternativas de control sostenibles que permitan reducir esta enfermedad son cada vez mayores, ya que el manejo de fungicidas constituye una limitante para los agricultores por el alto costo y los perjuicios ambientales que representan.

Un factor predominante para un cultivo rentable de cacao es que se pueda alcanzar productividades aceptables bajo la presión de las enfermedades.

En la actualidad existe una tendencia al uso de nuevas metodologías de control, entre las que se encuentran el uso de productos orgánicos y biocontroladores.

[1] Banco Central del Ecuador, 2009.
[2] Censo Agropecuario, 2000.

Con estos antecedentes, la hipótesis de este trabajo ha sido la siguiente: “Las cepas nativas de *Trichoderma* sp. y los bioles de producción local son capaces de controlar el desarrollo de *M. roreri in vitro* y pueden constituir la base para el desarrollo de alternativas biológicas sostenibles y amigables con el ambiente y la salud humana en el manejo de la moniliasis del cacao”.

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Litoral (CIBE), ubicado en la Escuela Superior Politécnica del Litoral, Campus ‘‘Gustavo Galindo”. El objetivo principal de estudio fue evaluar el efecto de bioles y cepas de *Trichoderma* sp. aisladas de zonas cacaoteras, como alternativas de control de *Moniliophthora roreri*, en condiciones *in vitro*. Los objetivos específicos de trabajo han sido los siguientes: (i) Evaluar el efecto de bioles y cepas de *Trichoderma* sp. aisladas de zonas cacaoteras, como alternativas de control de *Moniliophthora roreri*, en condiciones *in vitro*. (ii) Determinar si los bioles y los filtrados de *Trichoderma sp.* poseen un efecto fungicida o fungistático.

El efecto de los bioles sobre el patógeno se evaluó por el método de dilución en agar; asimismo se evaluó el efecto antagónico de las cepas de *Trichoderma* por el método de cultivo dual y se analizó la acción antifúngica de los filtrados de cada una de las cepas en concentraciones al 1%, 5%,10%,30%,50% y 70% .Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de *M. roreri* para ambos ensayos. Se aplicó un diseño completamente al azar y para determinar la existencia de diferencias estadísticas entre los promedios se realizó un análisis de varianza (ANOVA), luego de la determinación de supuestos de homogeneidad (Levene) y normalidad (Kolmogorov-Smirnov). Adicionalmente se utilizó Tukey y Tamhane para determinar subgrupos.

El estudio reveló que los bioles locales producidos en las cinco provincias tuvieron un efecto fungicida sobre los aislados patogénicos de *M. roreri* del mismo lugar, a partir de concentraciones al 5%. Por otro lado, *Trichoderma sp*. inhibió el crecimiento del patógeno en un rango de 89,5 a 100% en cultivo dual, mientras que los filtrados de las distintas cepas presentaron valores de inhibición entre 25,83% y 100 % .

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 3

CAPITULO 4

APÉNDICES

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

°C	Grado centígrado
cm	Centímetros
CMD	Cornmeal dextrose agar
E.M.	Efficient microorganism

g	Gramos
Kg.	Kilogramo
L	Litro
lbs	Libras
m	Metro
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
m^2	Metro cuadrado
ml	Mililitro
mm	Milímetros
PDA	Potato dextrose agar
PDB	Potato dextrose agar
pH	Potencial hidrógeno
PICR	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial
r.p.m.	Revoluciones por minuto
v/v	Volumen/volumen
Vs	Versus

SIMBOLOGÍA

%	Porcentaje
µm	Micras
$pulg^2$	Pulgadas cuadradas
T	Temperatura

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L., familia *Sterculiaceae),* es una especie que crece principalmente en América Central y América del Sur, donde las lluvias son frecuentes y las temperaturas se mantienen constantes durante prácticamente todo el año.

La mazorca del cacao , usada en la manufactura de chocolate, cacao en polvo, manteca, pasta y licor de cacao, constituye un producto de importancia económica para el país el cual ha generado divisas por concepto de ventas al exterior en alrededor de 260,2 millones de dólares habiendo exportado 95,751.92 toneladas en el 2008[13].

Ecuador es el mayor proveedor de cacao fino y de aroma en el mundo; sin embargo, el cacao como cualquier especie vegetal, es susceptible a la acción de microorganismos patógenos que alteran su desarrollo y que son una de las principales causas de la baja productividad en nuestro País.
Una de las enfermedades de mayor importancia es la moniliasis, causada por el hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* (Cif & Par), también conocida como pudrición acuosa, helada, mancha ceniza o enfermedad de Quevedo, cuya infección se produce en la mazorca ocasionando hasta 60% de pérdidas en las cosechas [39].

Los esfuerzos para buscar alternativas de control que permitan reducir esta enfermedad son cada vez mayores; el manejo de fungicidas como clorotalonil ayuda a combatir la infección, sin embargo el costo de las aspersiones no resulta económicamente factible, además del daño ambiental que implica..

Un factor predominante para un cultivo rentable de cacao es que pueda alcanzar una productividad aceptable bajo la presión de las enfermedades.

En la actualidad existe una tendencia al uso de *Trichoderma* sp. con resultados positivos como antagonista sobre una gran diversidad de hongos patógenos. También se incrementa el uso de enmiendas orgánicas líquidas, como los fermentados anaeróbicos denominados bioles, con reconocido efecto sobre la nutrición vegetal, el fortalecimiento de los tejidos de las plantas y su efecto directo para el control de enfermedades como la Sigatoka negra [10]. Por tal razón, las prácticas orgánicas para disminuir la incidencia de enfermedades fungosas como la moniliasis, constituyen alternativas viables que deben ser convenientemente evaluadas.

HIPÓTESIS

''Las cepas nativas de *Trichoderma* sp. y los bioles de producción local son capaces de controlar el desarrollo de *M. roreri in vitro* y pueden constituir la base para el desarrollo de alternativas biológicas sostenibles y amigables con el ambiente y la salud humana en el manejo de la moniliasis del cacao.''

OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar el efecto de bioles y cepas de *Trichoderma* sp. aisladas de zonas cacaoteras, como alternativas de control de *Moniliophthora roreri*, en condiciones *in vitro*.

Objetivos específicos

- Determinar la capacidad antagónica de cepas de *Trichoderma sp.* y establecer el efecto directo de filtrados de estas especies y de diversas concentraciones de bioles de producción local sobre el desarrollo de *M. roreri.*

- Determinar si los bioles y los filtrados de *Trichoderma sp.* poseen un efecto fungicida o fungistático.

.

CAPÍTULO 1

1. ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DE LA MONILIASIS EN CACAO.

1.1. Enmiendas orgánicas

Las enmiendas orgánicas son materiales derivados de los residuos de naturaleza orgánica (vegetales y animales), que incorporan nitrógeno orgánico y humus al suelo, enriqueciéndolo con carbono orgánico y mejorando sus características físicas, químicas y biológicas [1]. Además promueven el desarrollo de las plantas, las cuales pueden obtener grandes cantidades de nutrimentos [55].

Los abonos orgánicos son muy variables en sus características físicas y composición química, principalmente en el contenido de nutrimentos; sin embargo pueden ser clasificados en dos grandes grupos, explicados a continuación [55].

1.1.1 Enmiendas sólidas: Preparación, aplicaciones y mecanismos de acción.

Son obtenidas a partir de la descomposición de residuos orgánicos; esto se produce cuando materiales de origen vegetal o animal se biodegradan por acción bacteriana, de hongos, insectos, artrópodos y otros organismos.

La elaboración de enmiendas orgánicas sólidas se puede describir como el proceso por el cual la materia orgánica prima es descompuesta de forma controlada, imitando los ciclos naturales de fermentación. Este proceso de descomposición es realizado principalmente por medio de bacterias aeróbicas termófilas y las temperaturas alcanzadas son superiores a los 60°C [26].

Métodos usados para su elaboración

COMPOSTAJE

El compost es el producto estabilizado e higienizado que se obtiene de la descomposición biológica oxidativa (aeróbica) de materiales orgánicos frescos de desechos animales y vegetales, en la cual la principal transformación la sufren los carbohidratos y las proteínas [27].

Para la elaboración del compost se requieren los siguientes materiales:

- Fuente de materia carbonada (rica en: celulosa, lignina, azúcares).
- Fuente de materia nitrogenada (estiércoles, sangre, hierba tierna).
- Fuente de materia mineral (cal agrícola, roca fosfórica, ceniza vegetal, tierra común, agua).

VERMICOMPOST

El vermicompostaje es un proceso de bio-oxidación, degradación y estabilización de la materia orgánica mediada por la acción combinada de lombrices y microorganismos, mediante el cual se obtiene un producto final estabilizado, homogéneo y de granulometría fina denominado vermicompost, lombricompost, compost de lombriz o humus de lombriz [47].

La biotransformación que ocurre en este proceso, ocurre por la actividad de algunas especies de lombrices como *Eisenia foétida* y *Eisenia andrei* las cuales aceleran la descomposición y humificación de la materia orgánica, ya sea de un modo directo (alimentación detritívora y desplazamiento a través de galerías) o indirecto (estimulación de la actividad microbiana) [47].

Para la obtención de un lombricompuesto de buenas características agronómicas se deben tener en cuenta parámetros como: un residuo orgánico sólido, idóneo y disponible, humedad adecuada, aireación y ausencia de enemigos naturales, el producto final debe tener un pH cercano a 7.

Fuente: Ramón y Rodas, 2007

FIGURA 1.1 Módulos utilizados en proceso de vermicompostaje

BOKASHI

El bokashi es una palabra japonesa que significa abono fermentado. El bokashi es un abono orgánico resultado de la fermentación aeróbica de la materia orgánica por parte de microorganismos del suelo. La principal ventaja del bokashi es que se puede preparar en muy corto tiempo en comparación a otros abonos. Una propiedad importante del bokashi es su alto contenido nutricional y microbiológico. Por el corto tiempo de descomposición la materia orgánica conserva mayor contenido de energía comparado con abonos convencionales [56].

Fuente: Ramón y Rodas, 2007

FIGURA 1.2 Mezclado de materiales en la preparación de bokashi.

Beneficio de las enmiendas orgánicas sólidas

- Mejora cualidades físicas como textura y estructura
- Mejora la biodiversidad
- Fuente de nutrientes
- Supresor de enfermedades de plantas

Las propiedades descritas anteriormente resumen las ventajas de usar el compost, no obstante, el compost no sólo ejerce efectos positivos sobra las tierras donde se apliquen sino que su aporte de oligoelementos disminuye y evita la aparición de enfermedades carenciales en los cultivos. También ayuda a combatir un buen número de enfermedades fúngicas en los cultivos gracias a su elevado poder antibiótico [57].

1.1.2 Enmiendas líquidas: Preparación, aplicaciones y mecanismo de acción

Son aquellos productos en solución o en suspensión obtenidos por tratamiento o procesamiento de un material de origen animal o vegetal. Pueden ser aerobios o anaerobios y pueden diluirse para su aplicación [49].

Los abonos orgánicos líquidos son ricos en nitrógeno amoniacal, hormonas, vitaminas, aminoácidos y una gran cantidad de microorganismos benéficos que permiten regular el metabolismo vegetal y además pueden ser un complemento a la fertilización integral aplicada al suelo [2].

Existen varios tipos de biofertilizantes líquidos de acuerdo al método de elaboración y los materiales utilizados. Sin embargo investigadores coinciden en que el éxito de estos productos radica principalmente en la forma de preparación, calidad de los materias primas, clases de microorganismos presentes durante la fermentación, forma de almacenamiento del producto final y finalmente el método de aplicación [37].

TÉ DE ESTIÉRCOL

Es una preparación que convierte el estiércol sólido en un abono líquido, en la cual se liberan los nutrientes del estiércol al agua y así se hacen disponibles para las plantas [59].

Preparación

La forma más sencilla de elaborarlos, es agregando dentro de un saco dos o tres kilos de cualquier tipo de estiércol animal; colocarlo en un tanque sellado herméticamente y dejarlo fermentar durante cierto tiempo [18].

Fuente: Ramón y Rodas, 2007

FIGURA 1.3 Preparación de Té de estiércol.

Aplicación

Se debe diluir una parte del té de estiércol en una parte de agua fresca y limpia. La aplicación de este abono puede realizarse a través del sistema de riego por goteo, con el uso de regaderas alrededor de las matas y en aspersiones foliares [18].

Mecanismos de acción

La aplicación de este abono foliar posee efectos favorables sobre el crecimiento y la sanidad de los cultivos. Los microorganismos y sustancias presentes en el preparado afecta a varios patógenos, disminuyendo la intensidad de ataque de enfermedades foliares [65].

BIOL

Es una fuente de compuestos, que se obtienen como producto del proceso de descomposición anaeróbica de los desechos orgánicos. También se lo denomina como el residuo líquido sobrenadante que se descarga de un digestor de desechos orgánicos [59].

Preparación

Por lo general, el proceso de elaboración consta de las siguientes partes: recolección del estiércol, adición de agua, melaza y microorganismos eficientes, seguido por la mezcla homogénea de todos los ingredientes. Luego se procede a tapar herméticamente el envase durante el tiempo en que la fermentación va a tener lugar [26].

Fuente: Ramón y Rodas, 2007

FIGURA 1.4 Preparación de Biol. Materiales utilizados (A), Proceso de fermentación (B).

Aplicación

El biol puede ser utilizado para realizar aplicaciones foliares y aplicaciones al suelo. Dependiendo del tipo de cultivo, el biol puede ser utilizado puro o en diluciones.

Mecanismos de acción

El biol es capaz de estimular el desarrollo de las plantas. Aumenta y fortalece la base radical, actúa sobre el follaje incrementando su área, mejora la floración y activa el poder germinativo de las semillas.

Su contenido nutricional ayuda al desarrollo de microorganismos los cuales protegen a las plantas y mejoran la estructura de los suelos [57].

Además los bioles son considerados como potenciales alternativas como fungicidas, aplicados directamente al suelo y follaje de las plantas estos proveen microorganismos y nutrientes para reducir enfermedades [43].

PURINES

Se denomina purín a la suspensión compuesta principalmente por orina fermentada (descomposición microbiana), mezclada con partículas de excrementos, jugos que fluyen del estiércol y agua lluvia.

Otro tipo de purín es el que contiene un macerado de algún material vegetal especial, como ortiga, cola de caballo o leguminosas además del estiércol y orina animal [58].

Preparación

Por lo general se debe colocar una proporción de un kilogramo del ingrediente sólido por cada 10 litros de agua en un recipiente de plástico preferentemente; cerrado el envase se debe tener en cuenta la necesidad de mover la solución todos los días para que exista una buena oxigenación. El purín estará listo cuando el material inicial se haya disuelto por completo, quedando solo las partes más duras [58].

Aplicaciones

La forma de aplicar el purín es diluído en agua (sin cloro, para no eliminar las bacterias), en proporciones que van entre 10 y 20 partes de agua. Puede pulverizarse en forma concentrada para combatir problemas de plagas [59].

Mecanismos de acción

Los purines aportan al suelo del cultivo una gran cantidad de sustancias beneficiosas que se traducen en el aumento de la disponibilidad de nutrientes, disminución de las plagas, mayor fijación de nitrógeno, mayor desarrollo de raíces en las plantas. Además facilita la propagación y el mantenimiento de los microorganismos en el suelo [59].

LIXIVIADOS

Los lixiviados de desechos en descomposición han sido considerados, tradicionalmente, como un fertilizante líquido orgánico. Los lixiviados tienen una gran abundancia y diversidad de microorganismos benéficos, por lo que no son considerados pesticidas, cuyo objetivo, es el de competir con otros microorganismos por espacio, alimentación y su sitio de infección en caso de patógenos [43].

Otros, contienen metabolitos antimicrobianos que producen la inhibición de hongos. Dada la gran variedad de lixiviados, es muy difícil determinar el número de microorganismos benéficos presentes. Una vez aplicado el lixiviado a la superficie de la hoja, los microorganismos benéficos ocupan los nichos esenciales interfiriendo directamente el desarrollo de los microorganismos patogénicos [33].

1.2 *Trichoderma* sp. COMO AGENTE DE BIOCONTROL

1.2.1 Características del género *Trichoderma.*

El género *Trichoderma* está formado por un grupo de hongos aislados comúnmente del suelo; hasta la actualidad se han descrito 25 especies aproximadamente. *Trichoderma* es un hongo filamentoso anamórfico, aerobio facultativo, heterótrofo, con una pared celular compuesta de quitina, de rápido crecimiento y que puede utilizar una gran variedad de sustratos como celulosa, quitina, pectina y almidón como fuente de carbono [29].

El crecimiento de *Trichoderma* está en un rango de temperatura que va de 25°C hasta 30°C. Las cepas de este hongo crecen eficientemente en medios líquidos y sólidos, además son relativamente tolerantes a la baja humedad y tienden a crecer en suelos ácidos [28].

- **Aspecto macroscópico**

Las colonias tienen un crecimiento rápido con un color transparente inicialmente sobre medios de cultivo como CMD (Cornmeal dextrose agar) o de color blanco en medios más ricos como PDA (Potato dextrose agar). La escasa formación de micelio aéreo hace que la superficie sea levemente hirsuta. Con el tiempo, el centro de las colonias se torna algodonosa [61].

La esporulación se observa en la zona periférica de la colonia en forma de pústulas conidiógenas de color blanco, que luego se tornan de color verde o amarillo. Se produce pigmento difusible al medio de color amarillo, especialmente en medio PDA. Otra característica típica de ciertas especies de este género es el olor dulce o a coco que liberan [63].

FIGURA 1.5 Aspecto macroscópico del hongo *Trichoderma harzianum.*

- **Aspecto microscópico**

Las especies del género *Trichoderma* poseen hifas hialinas septadas y ramificadas a ambos lados. El tamaño de los conidióforos es de 62,5 – 69 x 3 – 4,7 µm. Los conidióforos son de color verde, tienen ramificaciones perpendiculares y en algunos casos se observa la formación de ramas laterales en grupos de dos a tres. El sistema de ramificación tiene una apariencia piramidal. Fiálides largas y delgadas, con verticilos terminales de hasta cuatro fiálides. Ocasionalmente surgen solitarias a lo largo del eje, asimétricas, con un tamaño de 6,3-15,6 x 2,7 -3,4 µm. Los conidios tienen un tamaño aproximado de 3,8 – 4 x 3,1 – 3,7 µm, con forma citriforme y subglobosos. Las clamidosporas son intercalares, formadas por el micelio sumergido, subglobosas, de pared dentada, color suave y con un tamaño de 12,5-10 µm [19].

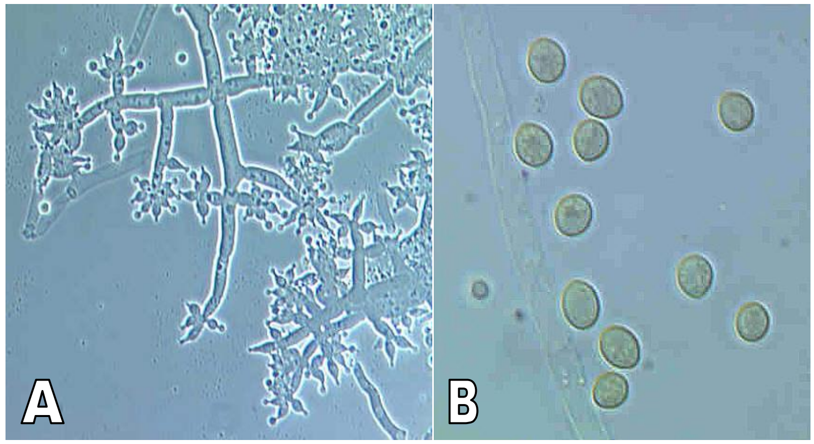


FIGURA 1.6 Conidióforos de *T. harzianum* (a). Conidios subglobosos a ligeramente ovoides (b).

- **Condiciones de crecimiento**

  Existen factores que intervienen en el crecimiento de *Trichoderma,* los cuales se mencionan a continuación:

Fototrofía

La mayoría de especies del género *Trichoderma, son* fotosensibles, presentando una mayor esporulación al ser expuestas a la luz. Sin embargo, cuando se someten a períodos alternados de luz y oscuridad, se favorece la colonización del hongo sobre diferentes sustratos sólidos [3].

Esporulación

Trichoderma esporula fácilmente sobre muchos sustratos naturales y artificiales en un patrón concéntrico circular en respuesta a la alternación de luz diurna y oscuridad, donde los conidios se producen durante el período de luz [3].

Germinación

Para germinar en los diferentes medios de cultivo, *Trichoderma* emplea enzimas como amilasas,α-glucosidasas y endo y exocelulasas que realizan la hidrólisis de los azúcares simples para dar inicio a la germinación [46].

Salinidad

El crecimiento de *Trichoderma* se ve inhibido por altas concentraciones de cloruro de sodio (80 g/l aproximadamente), aunque tolera hasta una concentración de 60 g/l. Estas condiciones pueden ocasionar mutaciones perjudicando el proceso de conidiogénesis, al disminuir notablemente la producción de esporas [46].

pH

Trichoderma tiene un rango de pH relativamente amplio para su crecimiento. Presenta crecimiento a valores comprendidos entre 2.0 y 9.0, con un pH óptimo que se encuentra entre 4.0 y 7.0. Los procesos como la germinación, se ven afectados por la escasez de nutrientes y por niveles de pH por encima de 9.0 [15].

1.2.2 Mecanismos de acción

El género *Trichoderma* está compuesto por un gran número de especies que actúan como agentes de control biológico debido a sus propiedades antagonistas, las cuales se basan en la activación de diferentes mecanismos que desplazan al fitopatógeno [6].

Estos mecanismos son fundamentalmente de tres tipos: competición directa por el espacio o por los nutrientes [4], producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil y parasitismo directo sobre los hongos fitopatógenos [22].

Se ha observado que *Trichoderma* produce enzimas hidrolíticas (celulasas) como factores biocontroladores, las cuales degradan *in vitro* la celulosa de las paredes celulares de microorganismos Oomicetos; además, producen glucanasas y quitinasas que catalizan la hidrólisis de la quitina y de los β-1,3 glucanos de la pared celular de microorganismos Deuteromicetos [14]

También se menciona que los géneros *Trichoderma y Gliocadium* sp., producen en común compuestos que actúan sobre la pared y la membrana celular de otros hongos, como son Alameticina, Trichotoxina, Suzukacilina, Gliovirina, Gliodeliquesina y principalmente Gliotoxina [11].

1.2.3 Aplicaciones y uso de *Trichoderma* como agente de control de patógenos en plantas.

El control biológico sobre hongos fitopatógenos ha tomado importancia en los últimos años, basándose principalmente en la selección de organismos del suelo con propiedades antagónicas sobre organismos que generan enfermedades en las plantas [62].

El uso de *Trichoderma* como agente de control biológico se da por los efectos sinérgicos de sus mecanismos de biocontrol y además, porque presenta otras características como facilidad para su aislamiento y cultivo, rápido crecimiento en un gran número de sustratos y porque no afecta a plantas superiores [6].

Investigaciones realizadas demostraron la eficacia de la cepa *Trichoderma koningii* Th003 al aumentar el porcentaje de protección de las semillas tratadas hasta en un 96.94% respecto al control [53].

Posteriormente, Betancourt (1997) realizó un estudio similar empleando la misma cepa de *Trichoderma* frente al patógeno *Fusarium oxysporum*; en este trabajo se observó que el porcentaje de protección en preemergencia de las semillas de tomate fue equivalente al 66.94% [8].

Otras investigaciones aseveran la actividad controladora de *Trichoderma,* en plantas de pimiento, demostrándose que *P.capsici* se vio afectado directamente por la mayor actividad enzimática (altos niveles de enzimas hidrolíticas β-1,3 glucanasa) que este genera, observándose una significativa reducción y destrucción de la colonia del patógeno [22].

Posteriores ensayos *in vivo* realizados por el mismo autor alegan que los tratamientos con *T. harzianum* han reducido hasta un 65 % la enfermedad causada por el patógeno *P.capsici* en plantas de pimiento.

Porcentajes similares han sido observados en otros estudios, donde se evaluó el antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. Se utilizó la técnica de cultivo dual para evaluar la competencia por nutrientes, micoparisitismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). Todos los resultados demostraron que hubo antagonismo *in vitro* al utilizar aislamientos de *T. harzianum* sobre *F. solani,* con porcentajes de inhibición desde 65 hasta 70% [57].

En trabajos afines en donde se evaluó cuatro cepas de *Trichoderma sp.* y sus combinaciones para el control de *Fusarium sp.* en sandía (*Citrullus lanatus),* se evidenció la capacidad antagónica de estas cepas al disminuir la incidencia y mortalidad de las plantas ocasionadas por *Fusarium sp.* en invernadero [52].

Igualmente otros autores sugieren la utilización de *Trichoderma hamatum* como potencial agente de control biológico sobre fitopatógenos procedentes del suelo, al haber comprobado que metabolitos volátiles de esta especie tenían un efecto inhibidor sobre el desarrollo de *Alternaria citri, Bipolaris sorokiniana, Curvularia brachyspora, Curvularia lunata, Drechslera tritici-repentis, Rhizoctonia solani, Sclerotinia minor y Sclerotium rolfsii* [16].

Además existen trabajos que manifiestan las propiedades inhibitorias de filtrados de cepas de *Trichoderma sp.* sobre hongos patógenos como *Fusarium culmarum, F. oxysporum, F. moniliforme, Rhizoctonia solani, Sclerotium rolfsii, Gaeumannomyces graminis var. tritici y Drechslera sorokiniana* [35].

También ha comprobado la capacidad de dos especies de *Trichoderma* identificadas como *Trichoderma theobromicola* y *T. paucisporum* para inhibir el desarrollo de *M. roreri in vitro* por la producción de antibióticos difusibles [54].

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material Biológico

2.1.1 Colonias de *Moniliophthora roreri*

Las colonias de *Moniliophthora roreri* utilizadas para el desarrollo de esta investigación fueron obtenidas del laboratorio de fitopatología del CIBE - ESPOL.

Las muestras de las cuales se obtuvieron procedían de haciendas cacaoteras de las provincias de Esmeraldas (Quininde), Manabí (Calceta), Guayas (Balao), Los Ríos (Vinces) y El Oro (Santa Rosa) (Tabla 1) y han sido obtenidas como parte de las investigaciones incluidas en el Proyecto PL480[1].

TABLA 1. Datos geográficos y climatológicos de las haciendas cacaoteras por provincia.

Provincias	Latitud Sur	Longitud Oeste	Altitud (msnm)	Temperatura (°C)	Precipitación (mm)	H.R (%)
Esmeraldas	0°28'01"	79°33'23"	15	30 +/- 2	2000	87
Manabí	0º5'55"	80º6'42"	6	30 +/- 1	1300	82
Guayas	3° 0'	80° 0'	10	26 +/- 2	1000	76
Los Ríos	1º 33'	79º 45'	6	31 +/- 3	1867	85
El Oro	3°30'39"	80°0'4"	13	30.5 +/- 1	1500	76

2.1.2 Colonias de *Trichoderma* sp.

Muestras de suelos fueron tomadas a 30 cm de profundidad y llevadas a laboratorio, donde se las mezcló y tamizó hasta obtener una muestra limpia y homogénea.

Se realizó una solución con agua destilada estéril (90 ml) y 3 gramos de suelo de la cual se hicieron diluciones seriadas de 10^{-1} – 10^{-3}, tal como recomienda Monzón (2001). Se sembraron por triplicado alícuotas de 0,1 ml de cada dilución en cajas Petri conteniendo Agar Papa Dextrosa (PDA), y se incubaron a 25±1 ºC durante12 horas continuas en presencia de luz, seguido de 12 horas de oscuridad continua por 5 días, con monitoreo constante.

Los aislamientos de *Trichoderma* sp. fueron purificados, para lo cual se trasladó un disco de agar de 7 mm de diámetro con micelio del hongo a cajas con medio de cultivo y se las incubó a las mismas condiciones anteriormente mencionadas.

2.1.3 Biofertilizantes

Los bioles evaluados se recolectaron a los cuatro meses de fermentación en cinco haciendas ubicadas en las provincias de Esmeraldas, Manabí, Guayas, Los Ríos y El Oro.

Los bioles empleados en este estudio fueron elaborados como parte del Proyecto PL480[3] mediante fermentación anaeróbica de estiércol vacuno fresco, melaza de caña, microorganismos benéficos colectados localmente, bacterias ácido lácticas, ceniza de tamo de arroz, sulfomag, roca fosfórica y agua, en un tanque plástico de 600 L de capacidad. La solución fue dejada fermentar por 120 días antes de ser cosechada[4].

Metodología

2.2 Efecto de diferentes concentraciones de bioles sobre *M. roreri.*

[3] Distribución e implementación de tecnologías innovativas y ambientalmente amigables para la recuperación de plantaciones de cacao fino de aroma y bananos no tradicionales", CIBE, 2008-2010

[4] Metodología estandarizada por el CIBE (Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador).

Los ensayos *in vitro* fueron realizados siguiendo la metodología de Jiménez (2008).

Esterilización al calor

Los bioles fueron filtrados a través de gasa estéril para separar residuos y sólidos presentes; luego se esterilizaron en el autoclave a 121°C, 15 lb/$pulg^2$ por un período de 25 minutos.

Bio – ensayos *in vitro*

Los ensayos consistieron en la evaluación del crecimiento radial y micelial de *Moniliophthora roreri* en medio sólido y líquido respectivamente. En la tabla 2 se detalla los tratamientos empleados para cada uno de los bio-ensayos.

TABLA 2.

Descripción de los Tratamientos para la evaluación de Bioles.

TRATAMIENTO	BIOL (%)
T1	1
T2	5
T3	10
T4	30
T5	50
T6	70
Control	0

2.2.1 Evaluación en medio nutritivo sólido

El medio nutritivo usado fue el medio PDA® (papa dextrosa agar) en dosis de 39 g/L; adicionalmente se añadió cierta cantidad de Bacto agar (7g/L) para asegurar la solidificación del medio.

Después de mezclar de manera homogénea el medio PDA con las diferentes concentraciones de bioles se dispensaron 10 ml de la solución en cajas petri. Solidificado el medio se sembró en el centro de las cajas petri discos de 7 mm de diámetro con micelio de *M. roreri* con siete días de crecimiento. Las cajas se sellaron e incubaron a 27 °C durante el período de evaluación.

2.2.2 Evaluación en medio nutritivo líquido

El medio nutritivo líquido fue preparado con 20 gramos de maltosa, un gramo de asparagina, 200 ml de jugo comercial V8 previamente filtrado y 800 ml de agua destilada tal como lo recomienda Villavicencio (2010).

El biol fue mezclado con el medio líquido de acuerdo a las proporciones antes mencionadas para cada tratamiento y dispensado en frascos de vidrio donde se sembró discos del patógeno de 7 mm de diámetro.

Todos los frascos fueron sellados y colocados en una zaranda en agitación rotatoria constante a 120 rpm durante un período de 21 días, hasta su evaluación.

2.2.3 Recuperación de micelio de *M. roreri* luego del efecto directo de bioles

Para evidenciar la eficacia de los fermentados orgánicos, discos con micelio de *M. roreri* que se encontraban en los tratamientos donde no se observó desarrollo, fueron sembrados en el centro de cajas petri con medio PDA (potato dextrose agar) e incubadas a una temperatura de 27°C durante un período de 30 días.

Las observaciones se realizaron cada 24 horas.

2.3 Estudio del efecto de *Trichoderma* sp. sobre *M. roreri*

Se realizaron ensayos con *Trichoderma* sp. con el fin de conocer su efecto antagónico sobre el desarrollo de *Moniliophthora roreri.*

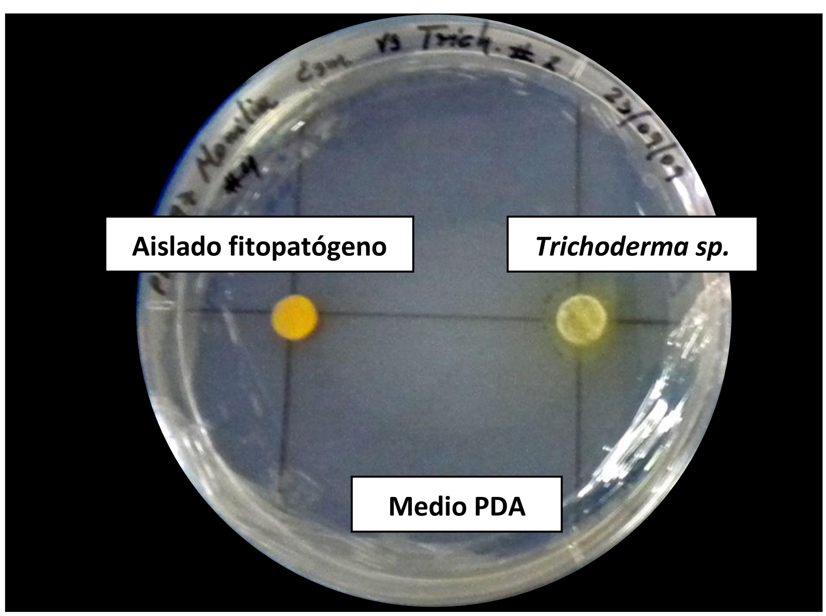
Bio – ensayos *in vitro*

Los ensayos consistieron en la evaluación del crecimiento de *M. roreri* frente a *Trichoderma* sp. en cultivo dual y el crecimiento de *M. roreri* bajo efecto de filtrados de *Trichoderma* sp., para determinar el porcentaje de inhibición en ambos casos.

Previo a la realización de estos ensayos, se evaluó el crecimiento radial de cada una de las cepas de *Trichoderma sp*. aisladas de las diferentes zonas en estudio, para lo cual se sembró discos de *Trichoderma* de 7mm de diámetro en el centro de cajas petri. Los valores de crecimiento fueron registrados cada 24 horas. Se realizaron cinco repeticiones por cada cepa, las cuales se mantuvieron a 27°C durante el período de evaluación.

2.3.1 Confrontación *in vitro* de cepas *Trichoderma* sp. y *Moniliophthora roreri.*

La prueba de enfrentamiento se realizó en medio PDA (papa dextrosa agar), siguiendo la metodología utilizada por Reyes y col (2008).



TRATAMIENTO	ANTAGONISTA (*Trichoderma* sp.)	PATÓGENO (*Moniliophthora roreri*)

FIGURA 2.1 Cultivo dual *in vitro* de los hongos *Moniliophthora roreri* y *Trichoderma* sp.

Las cajas fueron incubadas bajo las mismas condiciones del antagonista durante siete días, haciéndose mediciones cada 24 horas del crecimiento radial del micelio de cada uno de los hongos. Para los controles se sembró en cajas separadas un disco de de cada aislamiento patogénico, los cuales fueron incubados bajo las condiciones anteriormente mencionadas.

Los tratamientos consistieron en enfrentamientos (cultivo dual) de colonias de patógenos y colonias de antagonistas procedentes de la misma provincia (Tabla 3).

TABLA 3.

Tratamientos empleados para la evaluación de antagonismo de *Trichoderma* sp. frente a *M. roreri.*

T1	Esmeraldas	(TchE_001)	*M. roreri* Esmeraldas
T2	Esmeraldas	(TchE_002)	
T3	Manabí	(TchM_001)	*M. roreri* Manabí
T4	Manabí	(TchM_002)	
T5	Guayas	(TchG_001)	*M. roreri* Guayas
T6	Guayas	(TchG_002)	
T7	Los Ríos	(TchR _001)	*M. roreri* Los Ríos
T8	Los Ríos	(TchR _002)	
T9	El Oro	(TchO_001)	*M. roreri* El Oro
T10	El Oro	(TchO_002)	

2.3.2 Efecto de filtrados de *Trichoderma* sp. sobre *M. roreri.*

Para la obtención de los filtrados, discos de *Trichoderma* sp. de 7mm de diámetro provenientes de colonias en crecimiento fueron sembrados en matraces de 1000 ml con medio PDB (potato dextrose broth). Los matraces fueron sellados y colocados en una zaranda con agitación rotatoria constante a 120 r.p.m. durante un período de siete días.

A continuación se filtró el medio con micelio a través de papel filtro estéril, y se esterilizó el exudado a través de membranas hidrofílicas millipore de 0,22 *µm* conectado a una bomba al vacío.

Para evaluar la actividad antifúngica de cada filtrado se dispensó en cajas petri 10 ml de medio PDA (potato dextrose agar) mezclado con cada una de las concentraciones (v/v) de los filtrados de *Trichoderma.* Solidificado el medio se procedió a sembrar discos del patógeno en el centro de las cajas petri, las cuales se sellaron e incubaron a 27°C durante el período de evaluación.

En la tabla 4 se detalla cada uno de los tratamientos empleados en este ensayo:

TABLA 4.

Descripción de los Tratamientos para la evaluación de filtrados de *Trichoderma* sp.

TRATAMIENTO	FILTRADO (%)
T1	1
T2	5
T3	10
T4	30
T5	50
T6	70
Control	0

2.4 Parámetros de evaluación

De acuerdo al ensayo en ejecución, los parámetros evaluados fueron los siguientes:

1. *Radio de las colonias.*- para los ensayos con bioles y *Trichoderma* se midió el crecimiento radial de cada una de las colonias cada 24 horas; para realizar dicha medición se dividió la caja petri en cuatro cuadrantes, en los cuales se tomaron mediciones de cinco puntos de referencia. La medición se realizó con una regla milimétrica.

   Para calcular el porcentaje de inhibición se usó la fórmula PICR = (R1 – R2)/R1 x 100, donde R1 es el radio mayor (radio promedio del patógeno testigo) y R2 es el radio menor (radio promedio del patógeno en el tratamiento).

2. *Peso de micelio .*- 21 días después de la siembra de discos de *M. roreri* en medio líquido con biol ,se filtró el micelio de cada erlenmeyer en papel filtro previamente pesado, luego se registró su peso a las dos horas (peso húmedo) y a los dos días (peso seco).

Diseño experimental y análisis estadísticos.

El diseño utilizado fue completamente aleatorizado (DCA), utilizando una caja Petri como unidad experimental con cinco repeticiones por cada tratamiento.

Se empleó estadística descriptiva univariada para la estimación de parámetros de tendencia central y dispersión.

La normalidad de datos fue comprobada con el test de Kolmogorov-Smirnov, y la homogeneidad de varianzas con el test de Levene.

Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos y el estadístico de Tamhane para datos normales con varianzas no homogéneas y Tukey para varianzas homogéneas.
Todos los datos fueron analizados mediante la versión 13 SPSS para Windows y con el software estadístico Infostat.

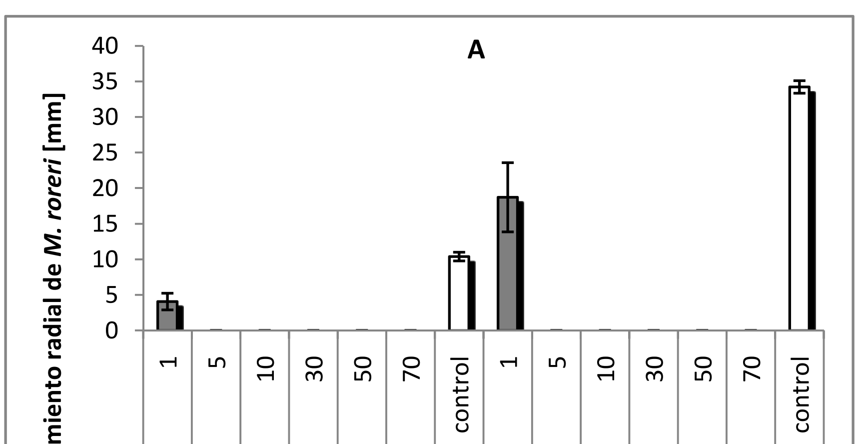
CAPÍTULO 3

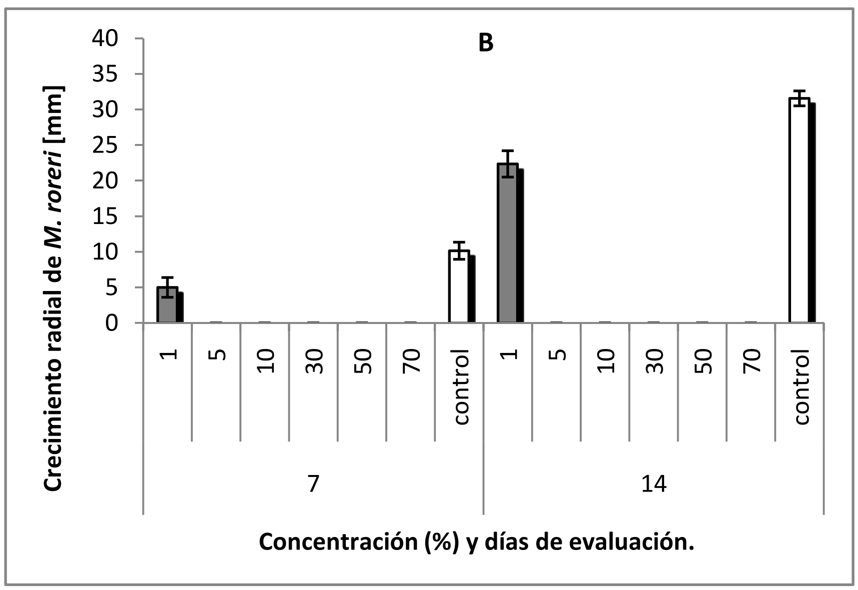
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

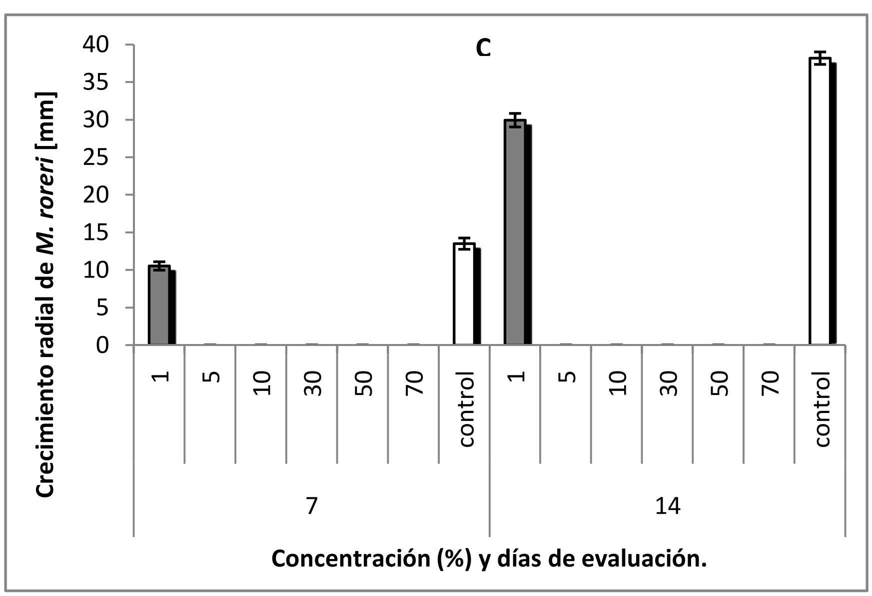
3.1 Efecto de bioles sobre *M.* roreri.

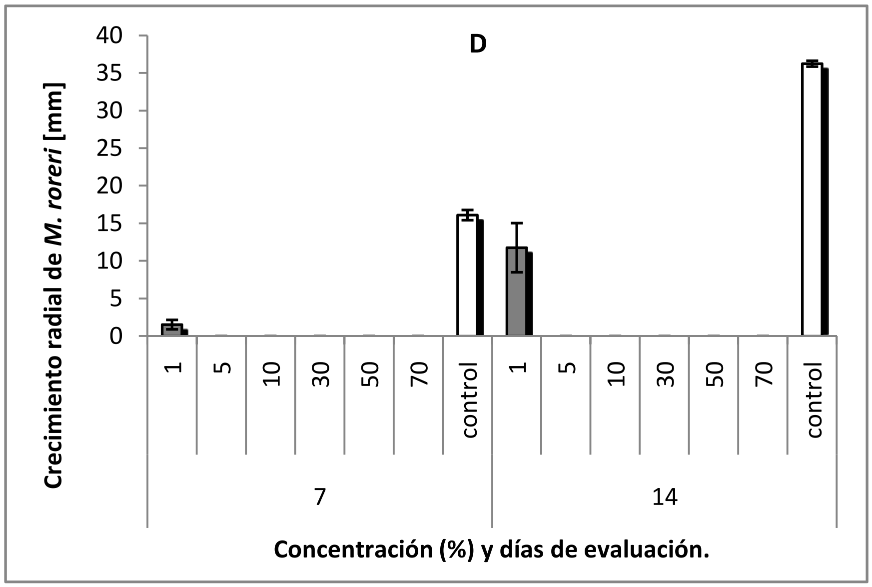
3.1.1 Efecto de concentraciones de bioles sobre el desarrollo de *M. roreri* en medio sólido

Se evaluaron seis concentraciones de bioles provenientes de cinco zonas, los cuales fueron elaborados bajo un mismo protocolo. A continuación se detalla los resultados por zona de estudio.




B
Crecimiento radial de M. roreri [mm]
40
35
30
25
20
15
10
5
0
1
5
10
30
50
70
control
1
5
10
30
50
70
control
7
14
Concentración (%) y días de evaluación.


C
Crecimiento radial de M. roreri [mm]
40
35
30
25
20
15
10
5
0
1
5
10
30
50
70
control
1
5
10
30
50
70
control
7
14
Concentración (%) y días de evaluación.



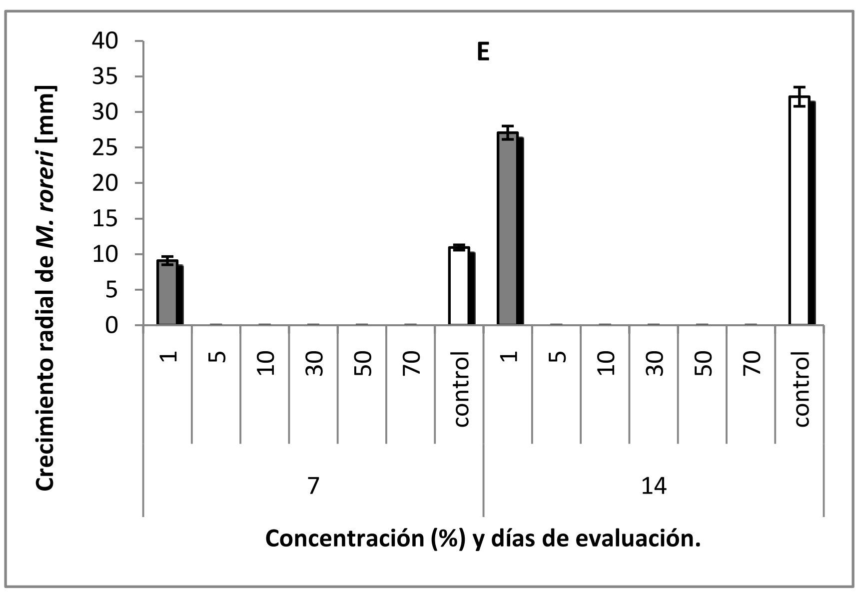


FIGURA 3.1 Crecimiento radial de *M. roreri* a los 7 y 14 días con diferentes concentraciones de los bioles provenientes de Esmeraldas (A), Manabí (B), Guayas (C), Los Ríos (D) y El Oro (E).

Como puede apreciarse, todos los bioles producidos lograron la inhibición total del crecimiento del patógeno al emplearse concentraciones del 5% o superiores. En los dos tiempos de evaluación los resultados fueron similares.

Los tratamientos en los que se empleó la mínima concentración de bioles (1%), fueron los únicos en los que se evidenció crecimiento del patógeno. No obstante, este fue inferior en todos los casos al crecimiento registrado en los controles. El biol de El Oro, fue el que produjo una menor inhibición del patógeno a la concentración del 1% (Figura 3.1 E). Los valores de crecimiento al 1% de cada uno de los bioles evaluados, en comparación con los controles se expresan en la Tabla 5.

TABLA 5

Tabla comparativa entre los valores de crecimiento radial promedio de *M. roreri* al 1% de concentración de biol y en el control. Resultados obtenidos a los 7 y 14 días de evaluación.

Tratamiento	**Crecimiento radial promedio de *M. roreri* [mm]**									
	Esmeraldas		**Manabí**		**Guayas**		**Los Ríos**		**El oro**	
	7*	**14***	**7**	**14**	**7**	**14**	**7**	**14**	**7**	**14**
1%	5,10	25,02	5,005	22,35	10,53	29,92	1,54	11,78	9,17	27,19
Control	10,40	34,23	10,16	31,57	13,50	38,17	16,11	36,25	10,93	32,13

* días de evaluación

TABLA 6

Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial de *Moniliophthora roreri* por efecto de bioles provenientes de Esmeraldas, Manabí, Guayas, Los Ríos y El Oro, a los 14 días de evaluación.

Concentración de biol (%)	Inhibición de *M. roreri*				
	Esmeraldas	Manabí	Guayas	Los Ríos	El oro
1	27,05 [a]	29,19 [a]	21,62 [a]	59,39 [a]	15,78 [a]
5	100 [b]	100 [b]	100 [b]	100 [b]	100 [b]
10	100 [b]	100 [b]	100 [b]	100 [b]	100 [b]
30	100 [b]	100 [b]	100 [b]	100 [b]	100 [b]
50	100 [b]	100 [b]	100 [b]	100 [b]	100 [b]
70	100 [b]	100 [b]	100 [b]	100 [b]	100 [b]

Medias con las mismas letras en la misma columna no difieren estadísticamente $p>0.05$

El estudio demostró que las enmiendas líquidas de producción local tienen propiedades inhibitorias *in vitro* sobre *M. roreri*.

A partir de concentraciones al 1% v/v de biol mezclado con medio de cultivo el desarrollo micelial de *M. roreri* se vio afectado presentando inhibición en un rango que varió de 15% a 59%, mientras que concentraciones al 5% v/v de los biopreparados provenientes de las cinco zonas en estudio inhibieron completamente el desarrollo del hongo. La efectividad de estos bioproductos orgánicos coincide con los resultados obtenidos por Jiménez (2008) al trabajar con *Mycosphaerella fijiensis*. También otros autores aluden la capacidad que tienen los bioles para reducir enfermedades causadas por *Botrytis*, *Phytophthora* y *Venturia* [21, 31, 42].

3.1.2 Efecto de concentraciones de bioles sobre el desarrollo de *M. roreri* en medio líquido.

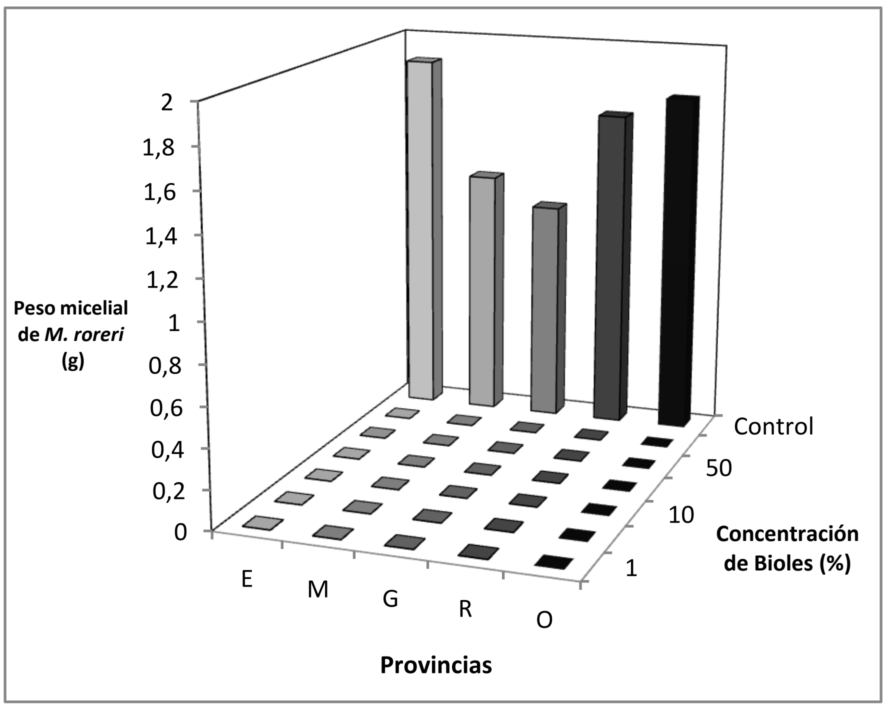


FIGURA 3.2 Peso de micelio de *M. roreri* en medio líquido con bioles preparados en cinco zonas: Esmeraldas (E), Manabí (M), Guayas (G), Los Ríos (R) y El Oro (O). Los bioles fueron evaluados a concentraciones de 1, 5, 10, 30, 50 y 70 % (v/v) previa esterilización por calor. La evaluación fue hecha a los 21 días después de la inoculación.

La variable peso considerada para el análisis de los bioles de las cinco provincias en medio líquido, evidenció que *M. roreri* no se desarrolló en ninguna de las concentraciones de bioles evaluadas. Este comportamiento difiere del registrado en el ensayo en medio sólido donde el patógeno aislado de cada una de las cinco localidades pudo crecer al utilizar 1% de biol en el medio. La figura 3.2 muestra el crecimiento de *M. roreri* solo en el tratamiento control. Estos resultados afirman que los bioles de las cinco zonas de la Costa, tienen propiedades inhibitorias *in vitro* sobre *M. roreri.*

Conjuntamente a la acción inhibitoria que poseen los bioles, se demostró que los metabolitos o compuestos relacionados con la inhibición del patógeno, poseen propiedades termo resistentes, es decir, a pesar de haber sido sometidos a altas temperaturas, los compuestos producidos durante la fermentación anaeróbica preservan su actividad fungicida. Resultados similares fueron observados por Quito (2007).

3.1.3 Recuperación de micelio de *M. roreri* luego del efecto directo de bioles.

La evaluación realizada en este ensayo reveló la incapacidad de *M. roreri* de poder recuperarse luego de haber sido sometido a concentraciones de biol de 5, 10, 30, 50 y 70%.

En la figura 3.3 se observa el efecto fungicida de los cinco bioles estudiados sobre el hongo causante de la moniliasis al no constarse crecimiento alguno. La duración de este efecto fue notorio habiendo transcurrido 60 días luego de haber retirado el biol del medio de cultivo.

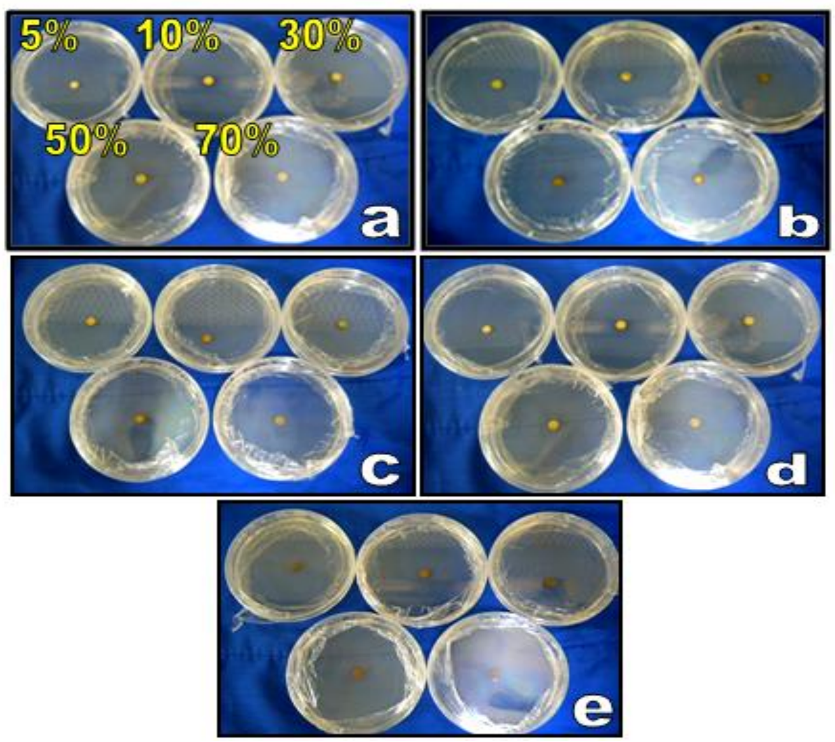


FIGURA 3.3 Discos de *M. roreri* en medio PDA luego del efecto directo de Bioles producidos en las provincias de Esmeraldas(a), Manabí (b). Guayas(c), Los Ríos (d) y El Oro (e). Se observa la muerte del patógeno que fue intoxicado con bioles en concentraciones desde 5% hasta 70% a los 60 días.

3.2 Efecto de *Trichoderma* sp. sobre *M. roreri*

3.2.1 Crecimiento de Cepas de *Trichoderma* sp.

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 3.4 y 3.5.

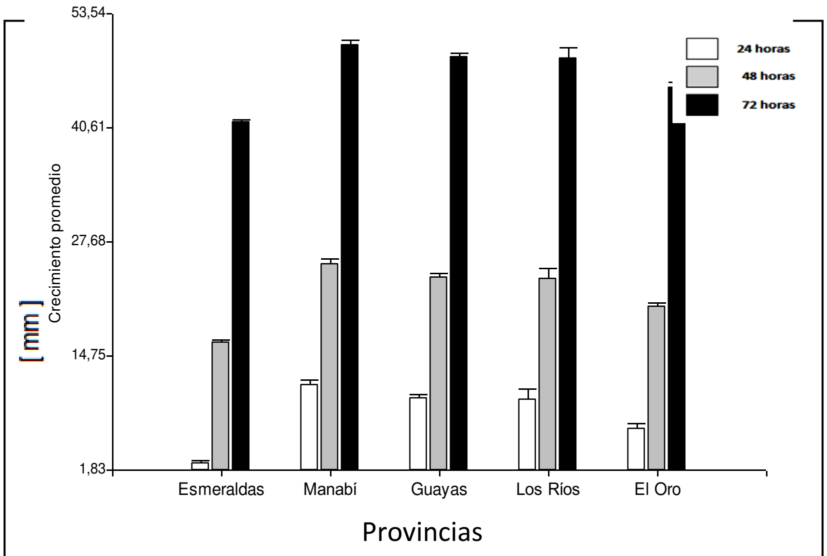
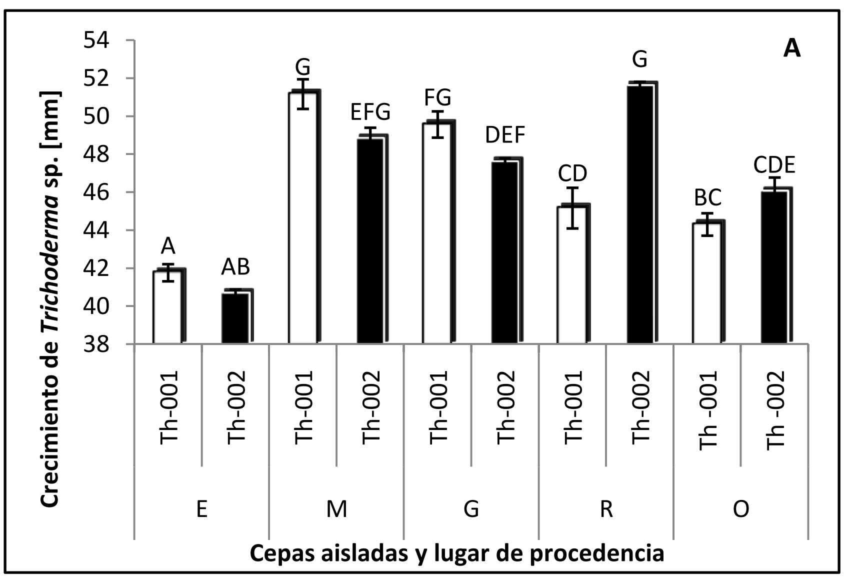
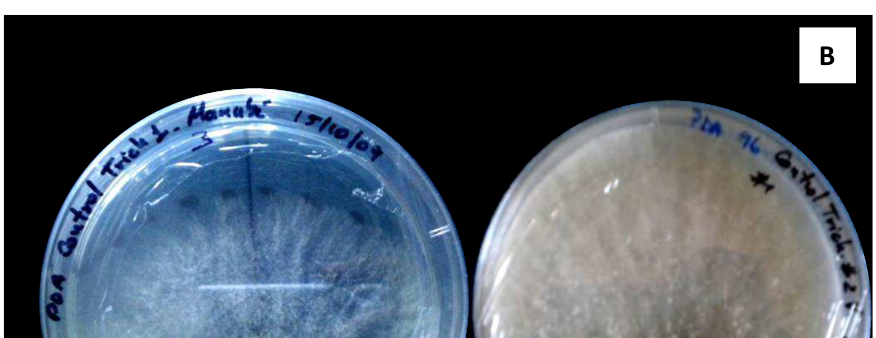


FIGURA 3.4 Crecimiento promedio de *Trichoderma* sp. por provincia. Datos registrados a las 24, 48 y 72 horas de evaluación.



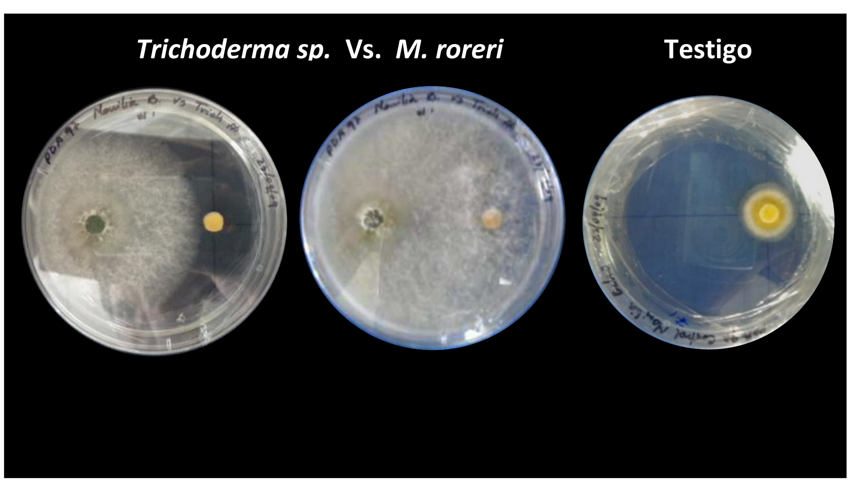


MANABÍ LOS RÍOS

FIGURA 3.5 Crecimiento radial de las cepas de *Trichoderma* sp. aisladas en diferentes provincias: Esmeraldas (E), Manabí (M), Guayas (G), Los Ríos (R) y El Oro (O). Evaluación realizada a las 72 horas después de la siembra (Figura A). Cultivos de las cepas con mayor crecimiento; TchM_001 Manabí y TchR_002 Los Ríos (Figura B).

El análisis de cada una de las cepas se llevó a cabo registrando el crecimiento radial cada 24 horas, los valores promedios obtenidos fueron de 41.2, 49.9, 48.6, 48.4, 45.2 mm para las provincias de Esmeraldas, Manabí, Guayas, Los Ríos y El Oro respectivamente (Figura 3.4). Los resultados obtenidos revelaron que existieron siete niveles de significancia (p≤0,05) entre las cepas aisladas de cada provincia, destacándose las cepas TchM_001 y TchR_002 de las provincias de Manabí y Los Ríos (Figura 3.5).

3.2.2 Efecto antagónico de *Trichoderma* sp. frente a *M. roreri* en cultivo dual.

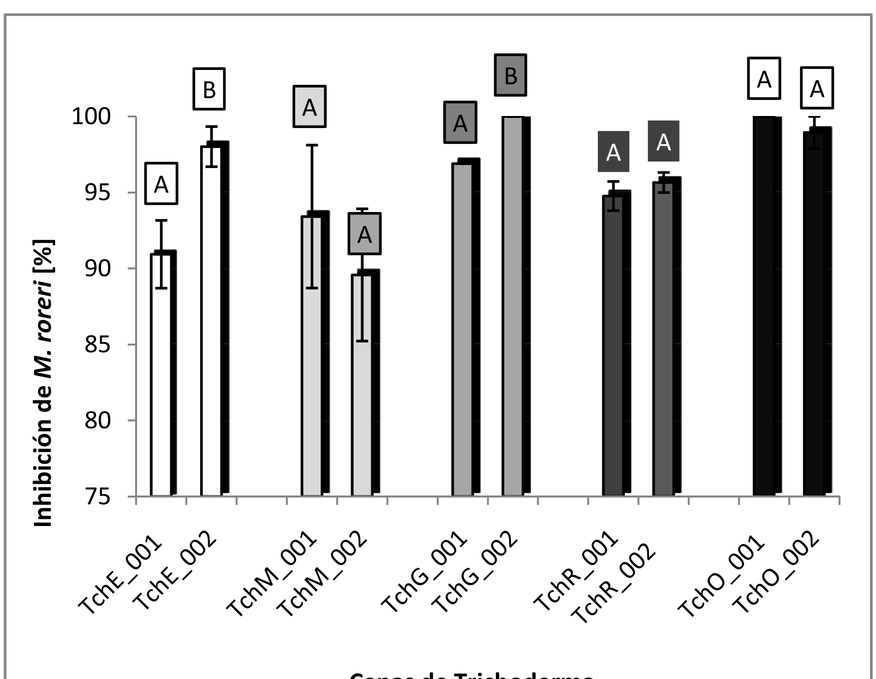


2 días 4 días 4 días

FIGURA 3.6 Cultivo dual de *Trichoderma sp.* cepa nativa de la provincia del Guayas con el aislado de *Moniliophthora roreri* (Izquierda y centro de la figura); Placa testigo sin el biocontrolador (derecha de la figura), incubadas a una temperatura de 27°C.

Luego de 15 días de incubación en cultivos duales, las cepas de *Trichoderma sp.* lograron inhibir el crecimiento de los aislados de *M. roreri*.

Al comparar la capacidad controladora entre las cepas por provincia, se pudo evidenciar diferencias significativas ($p \leq 0{,}05$) entre los aislados de Esmeraldas y Guayas únicamente, mientras que las dos cepas de cada una de las las provincias de Manabí, Los Ríos y El Oro tuvieron un efecto de control similar entre sí sobre *M. roreri,* es decir, sin diferencias estadísticas ($p>0{,}05$) entre ellas (Figura 3.7).



.

Letras distintas indican diferencias significativas al 5%

FIGURA 3.7 Porcentaje de inhibición de *Moniliophthora roreri* por efecto antagónico de aislados de *Trichoderma sp.* de las provincias de Esmeraldas, Manabí, Guayas, Los Ríos y El Oro. Evaluación realizada a los 15 días luego del enfrentamiento.

En general se inhibió el crecimiento del patógeno en un rango que varió de 89,57 % a 100 %, lo cual demuestra que probablemente *Trichoderma* sp. pudo tener una tasa de incorporación de nutrientes, tasa de metabolismo y un crecimiento superior a *M. roreri*, utilizando distintos mecanismos que le permitieron aprovechar mejor los nutrientes del medio y privar al patógeno de utilizar los recursos [44].

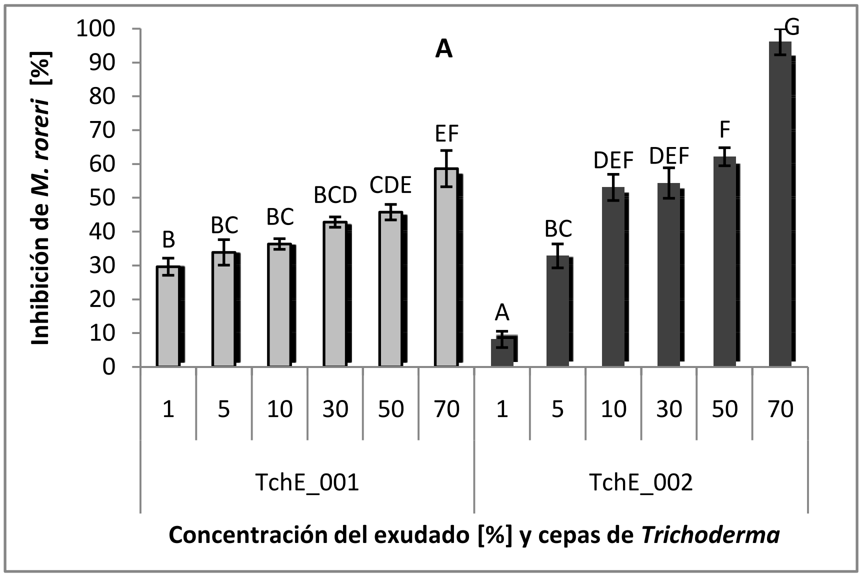
En concordancia con otros autores [30], estos microorganismos fueron capaces de generar un elevado nivel de competitividad por el sustrato, pues ejercieron un hiperparasitismo parcial y total sobre las colonias de los fitopatógenos, aspecto que se manifestó al realizar los ensayos y evaluarlos al término de 96 horas después de sembrados, tal como se observa las figuras en el apéndice B.

A pesar de esto, los valores de inhibición observados en las cepas TchE_001, TchE_002 , TchG_001 y TchG_002 indicarían una actividad selectiva de las cepas de *Trichoderma* sp. nativas. Según lo observado por Lo y col. (1998) existirían dos tipos de interacciones en siembras duales con *Trichoderma* sp. En la primera, las hifas del patógeno se aprecian dañadas y con menor crecimiento en la proximidad de las hifas de *Trichoderma* sp., indicando la acción de toxinas, enzimas extracelulares y/o antibióticos solubles o volátiles liberados por el agente biocontrolador. En la segunda, las hifas de *Trichoderma* se enrollan sobre las del patógeno utilizando estas como sustrato. En este ensayo se observó en todos los casos una detención del crecimiento de *M. roreri* y una posterior colonización de *Trichoderma* en toda la superficie de la placa en muy poco tiempo, característica que se atribuye a su alto nivel de esporulación.

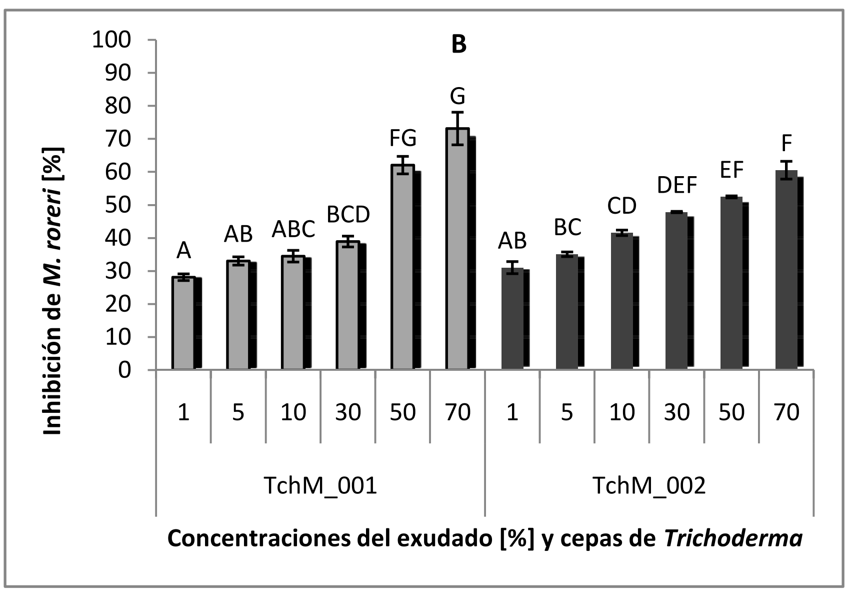
La actividad controladora de *Trichoderma sp.* sobre *M. roreri* es evidente al estar dentro de los rangos de efectividad por antagonismo reportados por Martínez y Solano [41] .

3.2.3 Inhibición de *M. roreri* por efecto de filtrados de *Trichoderma* sp.

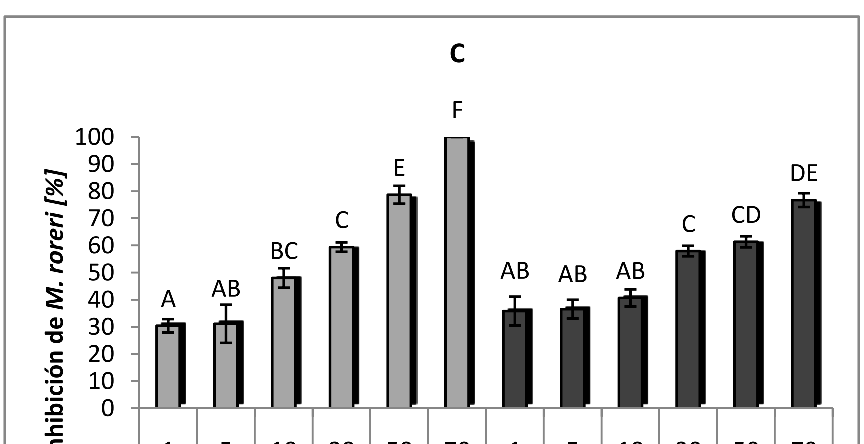
A continuación se detallan los resultados logrados con cada una de las concentraciones evaluadas de cada filtrado de las cepas de *Trichoderma* sp. aisladas en las cinco provincias.



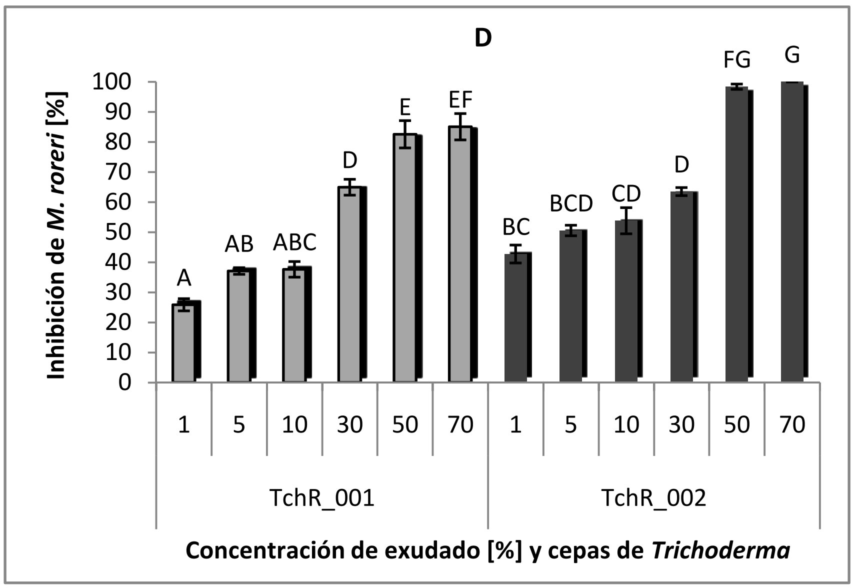
Letras distintas indican diferencias significativas al 5%



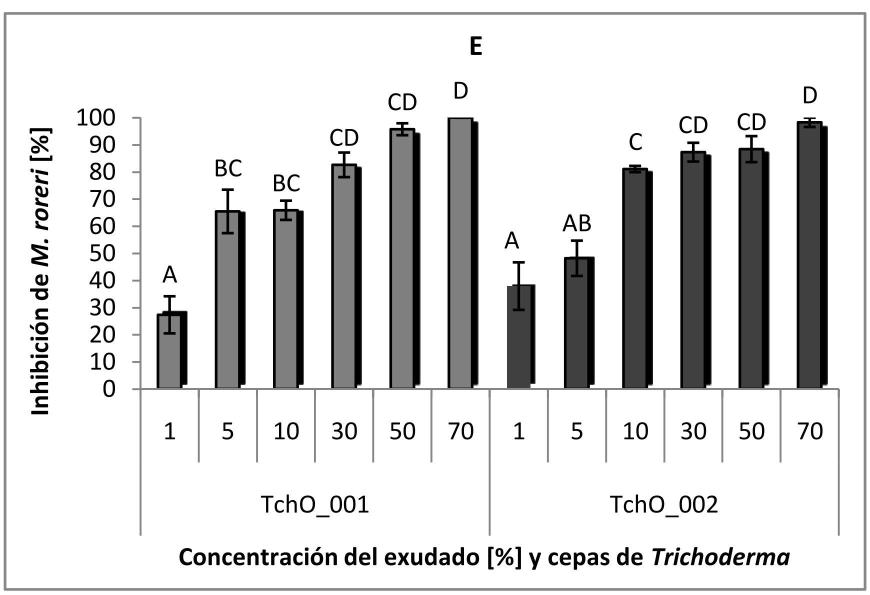
Letras distintas indican diferencias significativas al 5%



Letras distintas indican diferencias significativas al 5%



Letras distintas indican diferencias significativas al 5%



Letras distintas indican diferencias significativas al 5%

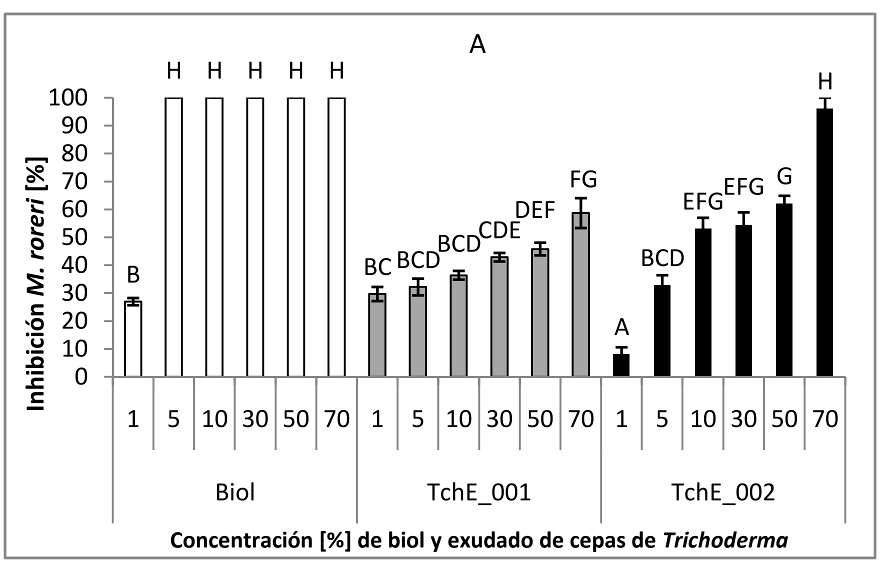
FIGURA 3.8 Porcentaje de inhibición de *M. roreri* por efecto de concentraciones del exudado de dos cepas de *Trichoderma* sp. aisladas de las provincias de Esmeraldas (A), Manabí (B), Guayas (C), Los Ríos (R) y El Oro (O). Evaluación realizada a los 15 días.

De manera general los resultados revelan que se inhibió el crecimiento de micelio de *M. roreri* en un rango que varió de 25,83% a 100 %. Los análisis mostraron que existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos. Las cepas de cada provincia que registraron mejores valores de inhibición *in vitro* para *M. roreri* fueron TchE_002, TchM_001, TchG_001, TchR_002 y TchO_001 con rangos de inhibición entre 32.8 - 96.1%, 33.1-86.2%, 29.2- 100%, 42.7- 100% y 27.3 – 100% , respectivamente.

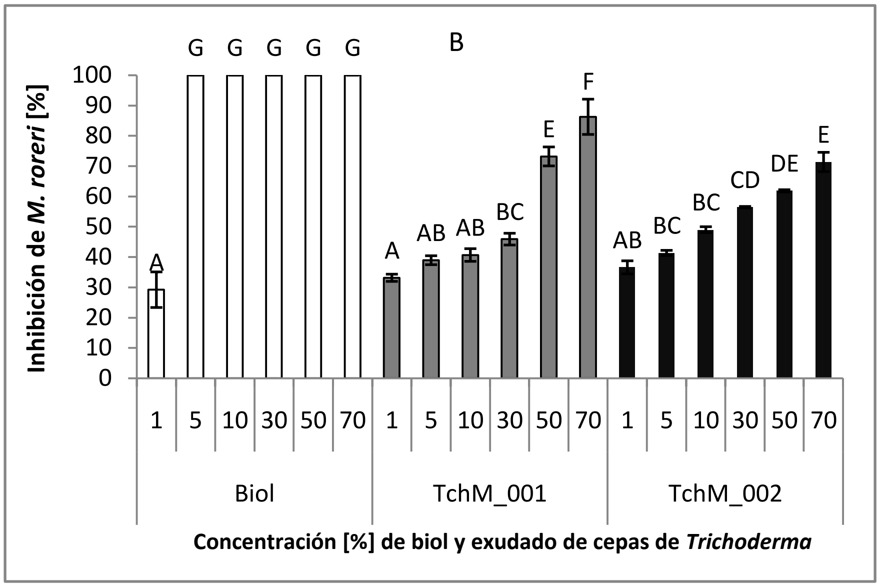
Se evidenció un efecto directo entre el porcentaje de inhibición y el porcentaje de exudado evaluado, es decir, el crecimiento micelial de *M. roreri* se vio afectado a medida que se incrementaba la concentración del exudado (v/v) en el medio de crecimiento; este comportamiento fue similar en todos los ensayos. Resultados similares obtuvieron Samuels y col (2006), quienes reportaron la inhibición del crecimiento radial de *M. roreri* en un 47 y 100% por el efecto de filtrados de dos especies de *Trichoderma* sp. También reportes indican inhibición del 100 % del crecimiento del micelio y formación de estructuras reproductivas en ensayos frente a *Botrytis cinérea* [9].

El efecto antagónico que presentaron cada una de las cepas fue muy cambiante, esta tendencia concuerda con lo expresado por Dennis y Worasatit [17,67] quienes indicaron que la producción de enzimas y otros metabolitos por cepas de *Trichoderma* es muy variable. Además, una cepa en particular puede producir diferentes metabolitos en diferentes estados de desarrollo dependiendo de las condiciones de cultivo [12].

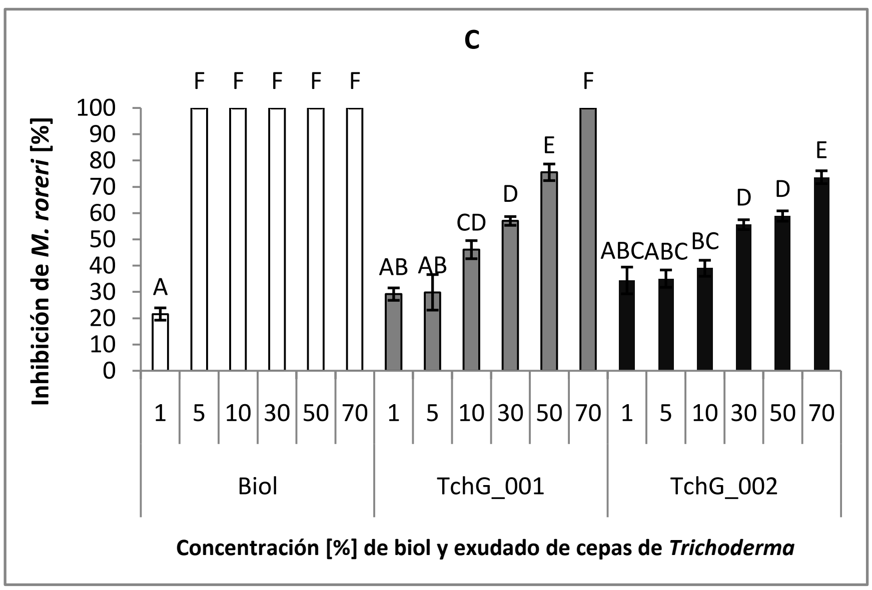
- **Análisis comparativo entre las alternativas de control para *M. roreri.***



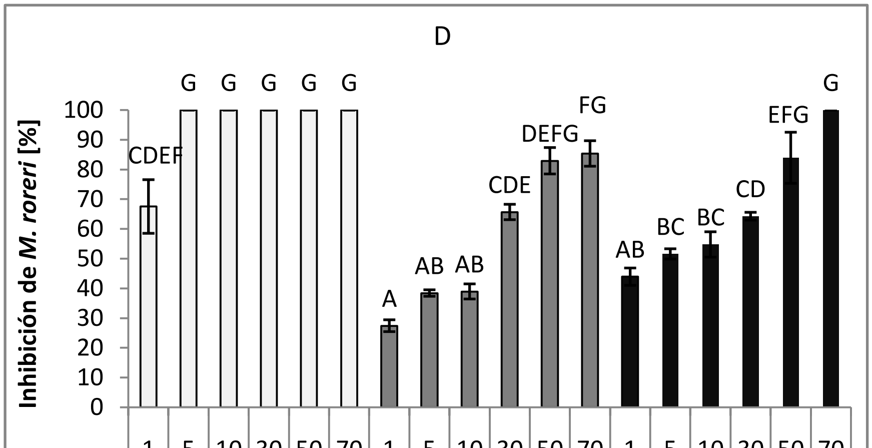
Letras distintas indican diferencias significativas al 5%



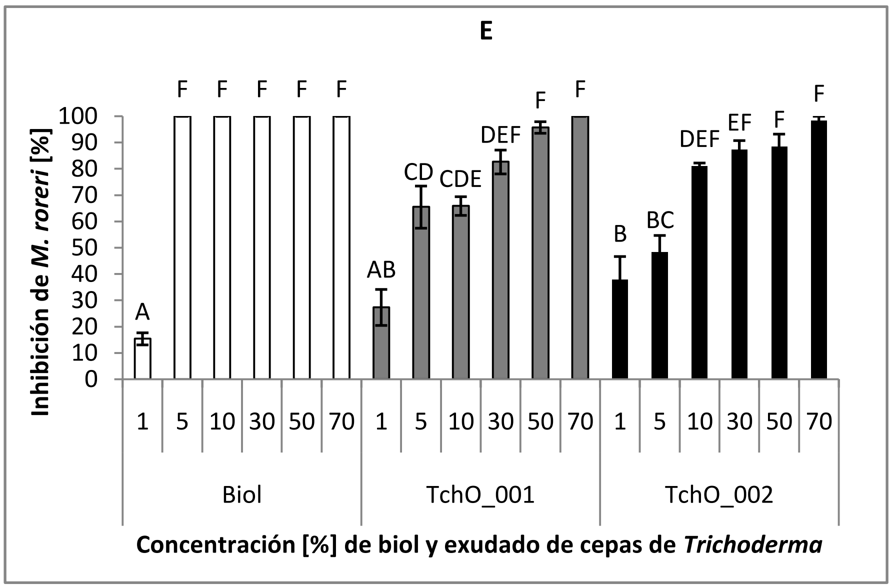
Letras distintas indican diferencias significativas al 5%



Letras distintas indican diferencias significativas al 5%



Letras distintas indican diferencias significativas al 5%



Letras distintas indican diferencias significativas al 5%

FIGURA 3.9 Análisis comparativo por cada alternativa de control empleada: Bioles y Cepas de *Trichoderma* sp. Porcentaje de inhibición promedio de *M. roreri* obtenido en cada uno de los tratamientos. Resultados observados con cada aislamiento patogénico por provincia: Esmeraldas(A), Manabí (B), Guayas(C), Los Ríos (D), y El Oro (E).

Como se observa en el gráfico 3.9 existieron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las alternativas de control empleadas en cada provincia, siendo evidente que el mayor % de inhibición se presentó con el uso de Biol, a partir de concentraciones bajas (5%), comportamiento observado en las cinco zonas estudiadas.

En cuanto a *Trichoderma sp*., el mayor efecto de control sobre *M. roreri* se observó en las concentraciones más altas; sin embargo la acción controladora mostrada por los filtrados de las cepas aisladas de la provincia de Los Ríos y El Oro se consideran aceptables para el control de esta enfermedad.

De manera general los resultados en este capítulo demostraron que existe un gran potencial para controlar *M. roreri* agente causal de la moniliasis del cacao con bioles preparados localmente (mayor grado) y con el uso de biocontroladores (menor grado).

Sin embargo, por la necesidad de determinar el modo de acción, es decir el efecto exacto de los bioles sobre el patógeno y la planta, se considera primordial el continuo estudio sobre estos bioproductos, los cuales desde ya se consideran con un elevado potencial para el combate de la moniliasis, pudiendo además contribuir a la reducción de las aplicaciones de fungicidas.

Estos productos tienen el potencial de formar parte de un sistema de manejo integrado y pueden hacer que la industria del cacao sea más sostenible, especialmente para pequeños agricultores.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

❖ **Conclusiones**

Los resultados de la presente investigación nos permiten concluir lo siguiente:

1. Los bioles estudiados en este experimento inhibieron el crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en condiciones *in vitro* a partir del 5% de concentración, según lo demostrado este trabajo sería el primer reporte del efecto del biol sobre *M. roreri.*

2. Los bioles poseen propiedades fungicidas al demostrarse que la reactivación del micelio de *M. roreri* luego de haber sido intoxicado con este producto fue nula.

3. El efecto inhibitorio de los biofertilizante líquidos evaluados, no fue afectado por la esterilización al calor.

4. Las cepas de *Trichoderma sp.* mostraron un claro efecto antagónico contra *Moniliophthora roreri* en los cultivos duales realizados *in vitro.*

5. Los filtrados de *Trichoderma sp.* presentaron un efecto fungistático sobre *Moniliophthora roreri* en las distintas concentraciones.

Recomendaciones

1. Se recomienda seguir realizando evaluaciones con los bioles en concentraciones menores al 5% para poder determinar la DL50.

2. Adicionalmente se recomienda evaluar estos bioproductos como alternativas de control para otros hongos fitopatógenos del cacao como *Moniliophthora perniciosa*.

3. Este tipo de bioproductos deben ser analizados de manera más profunda por lo cual se recomienda realizar una caracterización química para determinar los compuestos o ingredientes activos formados durante el proceso de fermentación, a los cuales se les atribuye las propiedades fungicidas.
4. Se recomienda estudiar la biología (componentes morfológicos y fisiológicos) de *Moniliophthora roreri* luego del efecto de bioles.

5. En cuanto a *Trichoderma*, se recomienda realizar ensayos en campo para determinar si el efecto controlador por competencia de sustrato sobre *M. roreri* se ve afectado o alterado por algún factor ambiental.

6. Se recomienda la búsqueda de cepas de *Trichoderma sp.* que liberen metabolitos secundarios con mayor grado de acción sobre hongos patógenos del cacao.

BIBLIOGRAFÍA

[1] ÁLVAREZ, M. 2006. Césped. Jardinería práctica.Editorial Albatros.112 p. Disponible en http://books.google.com.ec/books?id=ZnqVVd6IVPYC&dq=enmiendas+org%C3%A1nicas&lr=&source=gbs_navlinks_s (Consultado Marzo,2010).

[2] ARÉVALO,J.1998. Efecto del bioabono líquido en la producción de pastos y en la fertilidad del suelo. Disponible en http:// www.raaa.org (consultado Abril,2010).

[3] ASTUDILLO, M.C.,BLANCO, B. citado por Cruz, L.2007.Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii*Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis de grado.Bogotá.Pontificia universidad Javeriana.p148.

[4] BELANGER, R.; DUFOUR, N.; CARON, J.; BENHAMOU, N.1995.Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism.Biocontrol Sci techol 5, 41-54.

[5] BENÍTEZ, T., RINCÓN, A.M., LIMÓN, M.C., CODÓN, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma strains.* International Microbiology. Vol 7:249 -260.

[6] BENÍTEZ, T., RINCÓN, A.M., LIMÓN, M.C., REY, MANUEL., DELGADO-JARANA, J. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicida. Revista Iberoamericana de Micología. Vol 17:S31-S36.

[7] BENÍTEZ,E., MELGAR,R., SAINZ,H., GÓMEZ,M. Y NOGALES, R. 2000.Enzyme activities in the rhizosphere of pepper (*Capsicum annuun* ,L.) grown with olive cake mulches.*Soil Biol.Biochem.,* 32:1829-1835 .Citado por Moreno *et al ,*(2008).

[8] BETANCOURT, J.C. 1997.Evaluación de una técnica de pregerminación controlada en matriz sólida en combinación con los agentes de control biológico *Trichoderma koningii y Pseudomonas fluorescens* para el control del marchitamiento vascular del tomate *Lycopersicum esculentum* causado por el hongo *Fusarium oxysporum.* Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de los andes. Pp. 29-45.

[9] BONNARME, P., *et al.* 1997. Production of 6-Pentil –α-pyrone by *Trichoderma* sp. From vegetable oils. Journal of Biotechnology 56:143-150.

[10] CHÁVEZ E., 2008. Determinación de la calidad de biofertilizantes líquidos y estudio del potencial para la inhibición de *Mycosphaerella fijiensis* (morelet) en condiciones controladas y como alternativa en el manejo de sigatoka negra en sistemas de producción orgánica. Tesis Ing. Agrop. Guayaquil, EC. ESPOL.

[11] CLAVIJO, G.,1998 citado por Cruz, L.2007.Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii*Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis de grado.Bogotá.Pontificia universidad Javeriana.p148.

[12] COONEY, J.M., LAUREN, D.R., JENSEN, D.J., AND PERRY –MEYER, L.J. 1997. Effect of solid substrate, liquid supplement, and harvest time on 6-n-pentyl-2h-pyran-2-one (6PAP) production by *Trichoderma spp.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 45:531-534.

[13] CORPEI, 2009. Perfil del cacao y sus elaborados disponible en http://ecuadorexporta.org/archivos/documentos/muestra_de_cacao_y_sus_elaborados.pdf

[14] COTES, A. M. 1993.Study of common vean protection against damping – off by treatment of sedes with *Trichoderma koningii* Oudemans. Tesis de Doctorado. Gembloux, Facultad de Ciencias Agronómicas. Bélgica.p120.

[15] CRUZ, L.2007.Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii*Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis de grado.Bogotá.Pontificia universidad Javeriana.p148.

[16] DAL BELLO, G., MÓNACO C., CHÁVES A., 1997.Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo. Rev. Iberoam. Micol. 14: 131-134.

[17] DENNIS, C., AND WEBSTER, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma.* I. Production of non-volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57:25-39.

[18] DIVER,S.2001.Notes on Compost Teas: A 2001 supplement to the ATTRA publication: Compost Teas for Plant Disease Control. Disponible en http://attra.ncat.org (consultado Abril, 2010).

[19] DOMSCH, K., Anderson,W., Yersoon, T.H. Citado por Cruz, L.2007.Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii*Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis de grado.Bogotá.Pontificia universidad Javeriana.p148.

[20] ELABORACIÓN DE ABONOS ORGÁNICOS UTILIZANDO DESECHOS DE CULTIVO DE BANANO.2001. Manual práctico. Espol.EC p10.

[21] ELAD Y. and SHTIENBERG D. 1994. Effects of compost water extracts on grey mould, *Botrytis cinerea.* Crop Protection 13(2), 109-114. En memorias del Taller Latinoamericano. Biocontrol con *Trichoderma* y otros antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal.Ciudad de La Habana del 28-31 de mayo del 2006.

[22] EZZIYYANI, M., *et al* 2004.Trichoderma harzianum como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.).Universidad de Murcia, España.p45.

[23] FERNÁNDEZ-BAYO,J., *et al.* 2006. Improvement of Imidacloprid in soils by adding vermicompost from spent grape marc. Sci. Total. Environ. En prensa.

[24] FERNÁNDEZ-BAYO,J., NOGALES,R. Y ROMERO,E. 2006. Improvement of Imidacloprid in soils by adding vermicomposting from spent grape marc.Sci. Total.Enviromen.En prensa.

[25] FERRUZZI, C., 1994. Manual de lombricultura. Edit. Mundi prensa, Madrid. Disponible en http://www.e-aprendizaje.gob.mx/work/Cursos/ig012/ig012/contenidos/temas/t4_instrucciones.htm (consultado Abril ,2010).

[26] GÓMEZ,J. 2000. Abonos orgánicos.FERIVA.Cali,Colombia. P105. Citado por Quito ,D.,2007.Estudio comparativo de dos biofertilizantes líquidos en condiciones in vitro e invernadero en plantas de banano y su efecto en el desarrollo de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet).tesis de grado.Espol.Ecuador.

[27] GORDILLO, F. 2010.Evaluación comparativa de la calidad del compost producido a partir de diferentes combinaciones de desechos agroindustriales azucareros. Tesis de grado. Espol. Ecuador. pág 29-30.

[28] HARMAN, G. Citado por Cruz, L.2007.Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii*Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis de grado.Bogotá.Pontificia universidad Javeriana.p148.

[29] HERMOSA, M.R. , *et al.* 2000.Citado por Cruz, L.2007.Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii*Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis de grado.Bogotá.Pontificia universidad Javeriana.p148.

[30] HERNÁNDEZ MA, SIERRA PA, CARR A. 2006. Evaluación *in vitro* del antagonista de especies de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos que afectan las vitroplantas de Piña. (*Ananas comosis* L. Merr*).*

[31] HOITINK H., VAN DOREN D.M., AND SCHMITTHENNER A.F. 1977. Suppression of *Phytophthora cinnamomi* in a composted hardwood bark potting medium. Phytopathology 67:561-565.

[32] IIRR (Instituto internacional de reconstrucción rural, PH).1993.Guía práctica para su huerto familiar orgánico.p252.

[33] INGHAM, E. Citado por Quito ,D.,2007.Estudio comparativo de dos biofertilizantes líquidos en condiciones in vitro e invernadero en plantas de banano y su efecto en el desarrollo de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet).tesis de grado.Espol.Ecuador.p113.

[34] JIMÉNEZ M.I. 2008. Effect of the nutritional status of banana (*Musa sp.*) on leaf disease infestation by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet in Ecuador.Universidad Católica de Leuven.Bélgica.138 p.

[35] KUCUK, C., KIVANC, M., 2003. Isolation of *Trichoderma sp.* and determination of their Antifungal, Biochemical and Physiological Features. Turk J Biol 247-253.

[36] KYAN. T.,*et al.* 1999. Kyusei Nature Farming and the Technology of effective Microorganism. Asia Pacific Natural Agriculture Network.Bangkok.Thailand. 2- 19 p. Citado por Shintani *et al* ,(2000).

[37] LARCO REYES, E. 2004. Desarrollo y evaluación de lixiviados de compost y lombricompost para el manejo de sigatoka negra (*mycosphaerella fijiensis* morelet), en platano.Turrialba. C.R. CATIE.

[38] LO,C., NELSON, E., HAYES, C. AND HARMAN, G. 1998. Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. Phythopathology (on-line). Disponible en http://www.geocities.com/ecologialuz/trichoderma7.htm.

[39] LORITE,M.J., CIFUENTES,C., ROMERO,E., BENÍTEZ,E. Y NOGALES,R. 2005. Effectiveness of olive-derived organic amendments in suppressing *Rhizoctonia solani* in vetch cultures. Citado por Moreno *et al,* (2008).

[40] MACÍAS J., *et al*. 2001.Identificación de Mercados y Tecnología para productos agrícolas tradicionales de exportación, Cacao. Quito, EC. Consultado 2 feb.2010. Disponible en http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Convenio%20MAG%20IICA/productos/cacao_mag.pdf .

[41] MARTÍNEZ B, T.1994. Antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a *Alternaria solani* (Ellis y Martin) Jones y Grout. Protección Vegetal. 10:221-225.

[42] MERRIL R. and McKEON J. 1999.Organics teas from compost and manures. Project report 97/40. 1-51. Sta. Cruz, California, Organic Farming Research Foundation.

[43] MERRILL R. AND MCKEON J. 1999. Citado por Jiménez M.I. 2008. Effect of the nutritional status of banana (*Musa sp.*) on leaf disease infestation by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet in Ecuador.Universidad Católica de Leuven.Bélgica.

[44] MICHEL, A. 2001.Cepas nativas de *Trichoderma sp.* (Euascomycetes:Hypocreales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium*

subglutinans y *F. oxysporum* (Hyphomycetes:Hyphales).México: Universidad de Colima.

[45] MONZÓN, A., 2001 citado por Suárez, C.L., Fernández, R., Osvaldo, N., Gámez, R.M., Páez A.,2008. Antagonismo *in vitro* de Trichoderma harzianum Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.,asociado a la marchitez en maracuyá.Rev.Colomb.Biotecnolo.Vol X N_o 2.p43.

[46] MOORE, E.,citado por Cruz, L.2007.Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii*Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis de grado.Bogotá.Pontificia universidad Javeriana.p148.

[47] MORENO, J. Y MORAL, R. Compostaje.2008.España. Ediciones-Mundi Prensa, Madrid, 570 :189-207.

[48] NOGALES ,R. Y BENÍTEZ, E. 2006. Absorption of zinc and lead to *Dittrichia viscosa* grown in a contaminated soil amended with olive-derived wastes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 76:538-544.

[49] PICADO, J., AÑASCO, A., 2005. Preparación y uso de abonos orgánicos sólidos y líquidos. Serie agricultura orgánica N°8. San José .CR. 65 pág.

[50] QUITO ,D.,2007.Estudio comparativo de dos biofertilizantes líquidos en condiciones in vitro e invernadero en plantas de banano y su efecto en el desarrollo de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet).tesis de grado.Espol.Ecuador.p113

[51] REYES, Y., MARTÍNEZ, B. 2008. Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de *Trichoderma sp.* sobre *Rhizoctonia* sp. Rev. Protección Veg. Vol. 23 No 2: 112-117

[52] ROSERO, G., 2008.Evaluación de cuatro cepas de *Trichoderma* sp.y sus combinaciones para el control de *Fusarium* sp. en sandía (*Citrullus lanatus*).Tesis de grado.Zamorano.Honduras.

[53] SALDAMANDO, CLARA I. 1996. Control de *Rhizoctonia solani* Kuhn en tomate mediante una combinación de tratamientos de pregerminación controlada y el agente de control biológico *Trichoderma koningii* Oudemans. Tesis de pregrado. Biología.Facultad de Ciencias biológicas. Universidad de los Andes. Bogotá.Pp 12,33.

[54] SAMUELS, G. *et al*, 2006. Trichoderma theobromicola and T. paucisporum : two new species isolated from cacao in South America. British Mycological Society. 381– 392

[55] SANTOS A., 2007. Abonos orgánicos. Instituto de Recursos Naturales Colegio de Postgraduados. México. Disponible en www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/.../Abonos%20organicos.pdf

[56] SHINTANI M., LEBLANC H., TABORA P. 2000. Guía para uso práctico: Bokashi.Earth - Guácimo, Limón .CR. 25 pág.

[57] SUÁREZ, C.L., FERNÁNDEZ, R., OSVALDO, N., GÁMEZ, R.M., PÁEZ A.,2008. Antagonismo *in vitro* de Trichoderma harzianum Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá.Rev.Colomb.Biotecnolo.Vol X N_o 2. p43.

[58] SUQUILANDA, M. 1998.Agricultura Orgánica. Manual práctico para la elaboración de biol.Quito.Ecuador p30.

[59] SUQUILANDA, M. 2001.Elaboración,uso y manejo de los abonos orgánicos. Memoria del curso internacional de elaboración de abonos orgánicos. Disponible

en http://www.scribd.com/doc/13749074/Elaboracion-de-abonos (consultado marzo,2010).

[60] SUQUILANDA, M.1996. Agricultura orgánica. Alternativa tecnológica para el futuro. Ecuador. p654

[61] TRICHODERMA sp. Persoon Fr.,1974. disponible en http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/frameGenusOverview.cfm?gen=Trichoderma. Consultado Abril, (2010).

[62] VALENCIA, J. 1998. Control biológico de la pudrición basal del tallo en crisantemo (*Chysantemun morifolium*) ocasionada por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum* con algunos aislamientos de *Trichoderma sp. y Gliocadium sp.*Tesis de pregrado.Bacteriología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.Pp. 28,30,35,40.

[63] VERA D., Peña Venegas C., Cardona Vanegas G.. 2007. Trichoderma sp. Persoon 1794. Disponible en http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=542&method=displayAAT. Consultado Abril,(2010).

[64] VILLAVICENCIO, M. 2010**.** Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco provincias de la costa Ecuatoriana.Tesis de grado.Espol.Ecuador.

[65] WELTZIEN, H.C. 1990.The use of composted materials for leaf disease suppression in field crops. In: Unwin, R.ed. Crop protection in Organic and Low input agriculture; Options for reducing agrochemical usage. BCPC Monograph N°45. The British Crop Protection Council, Farnham. P115 – 120.Citado por Gepp,(1999).

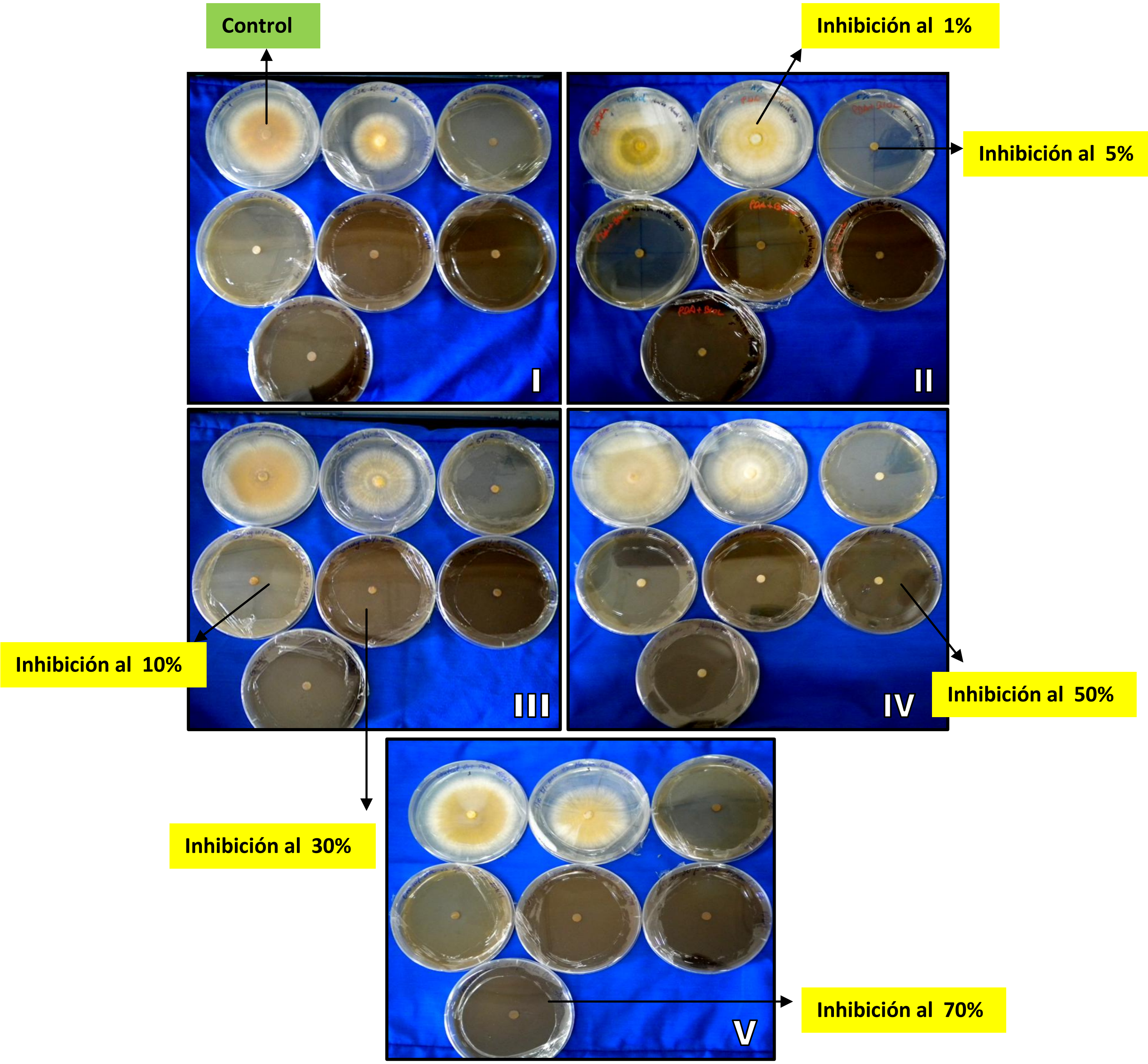
[66] WOOD and LASS. 1985. Cocoa 4th ed. Tropical Agriculture Series.Longman, New York. 620 pp.

[67] WORASATIT, N., SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E.L., AND ROWLAND, C. 1994. Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of *Rhizoctonia* root rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii.* Mycological Research 98:1357-1363.

APÉNDICES

APÉNDICE A

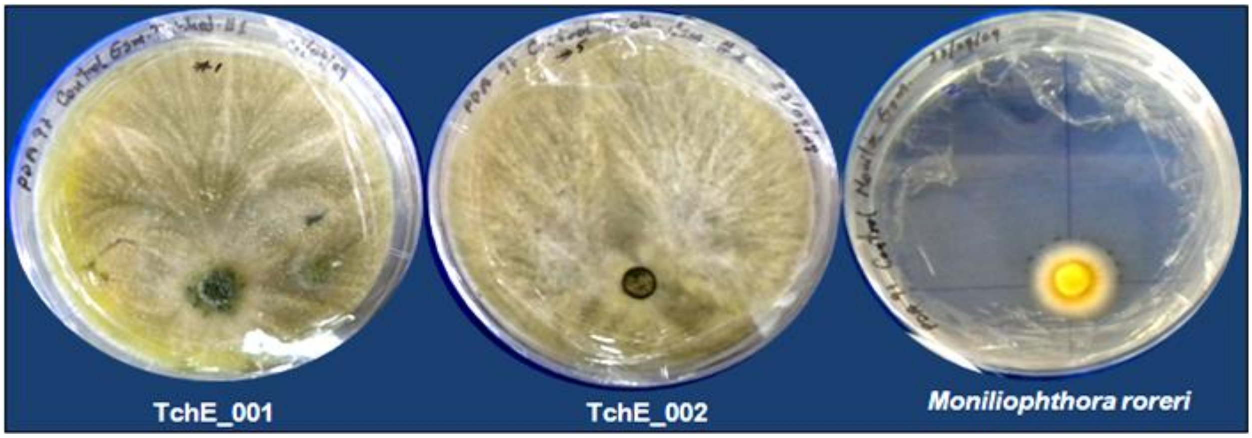
Resultados obtenidos en el crecimiento de las colonias de *M. roreri* con distintas concentraciones de bioles.

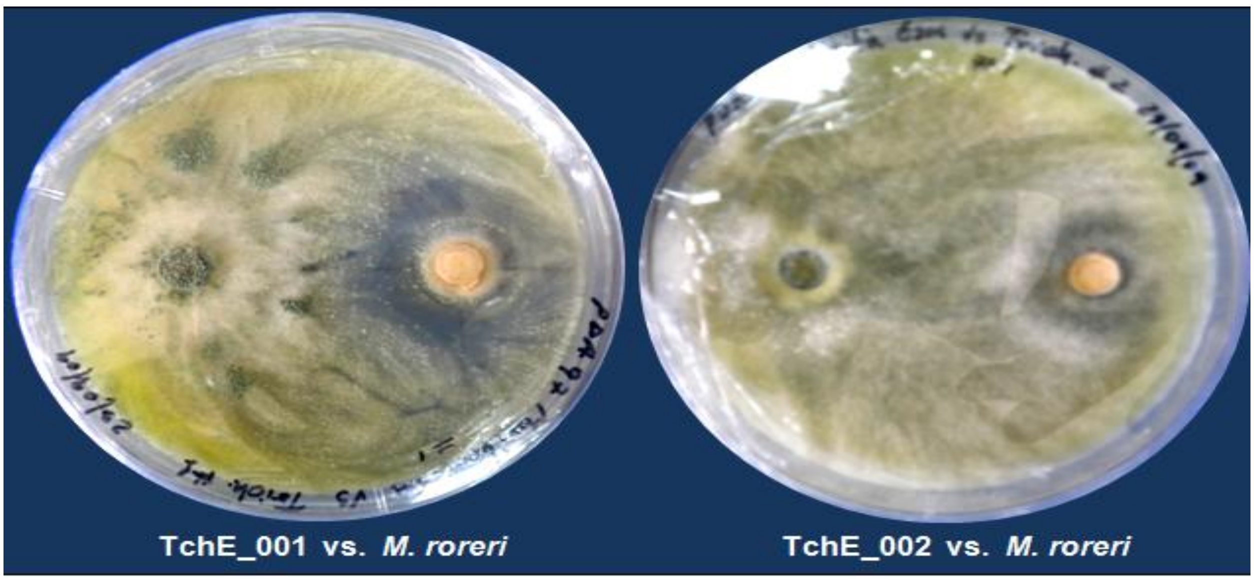


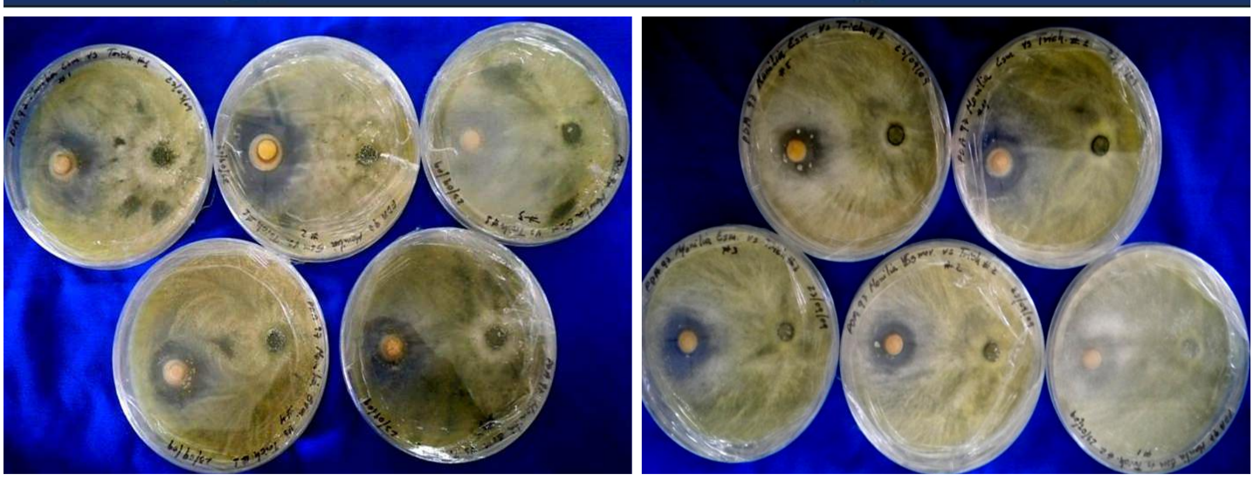
Discos de *M. roreri* en medio PDA + diferentes concentraciones de Bioles producidos en las provincias de Esmeraldas (I), Manabí (II), Guayas (III), Los Ríos (IV), El Oro (V). Se observa la inhibición del desarrollo del patógeno al emplear concentraciones de biol desde 5 hasta 70% (tercera a séptima caja Petri).

APÉNDICE B

RESULTADOS OBTENIDOS EN CULTIVO DUAL DE *Trichoderma* vs. *Moniliophthora roreri*.

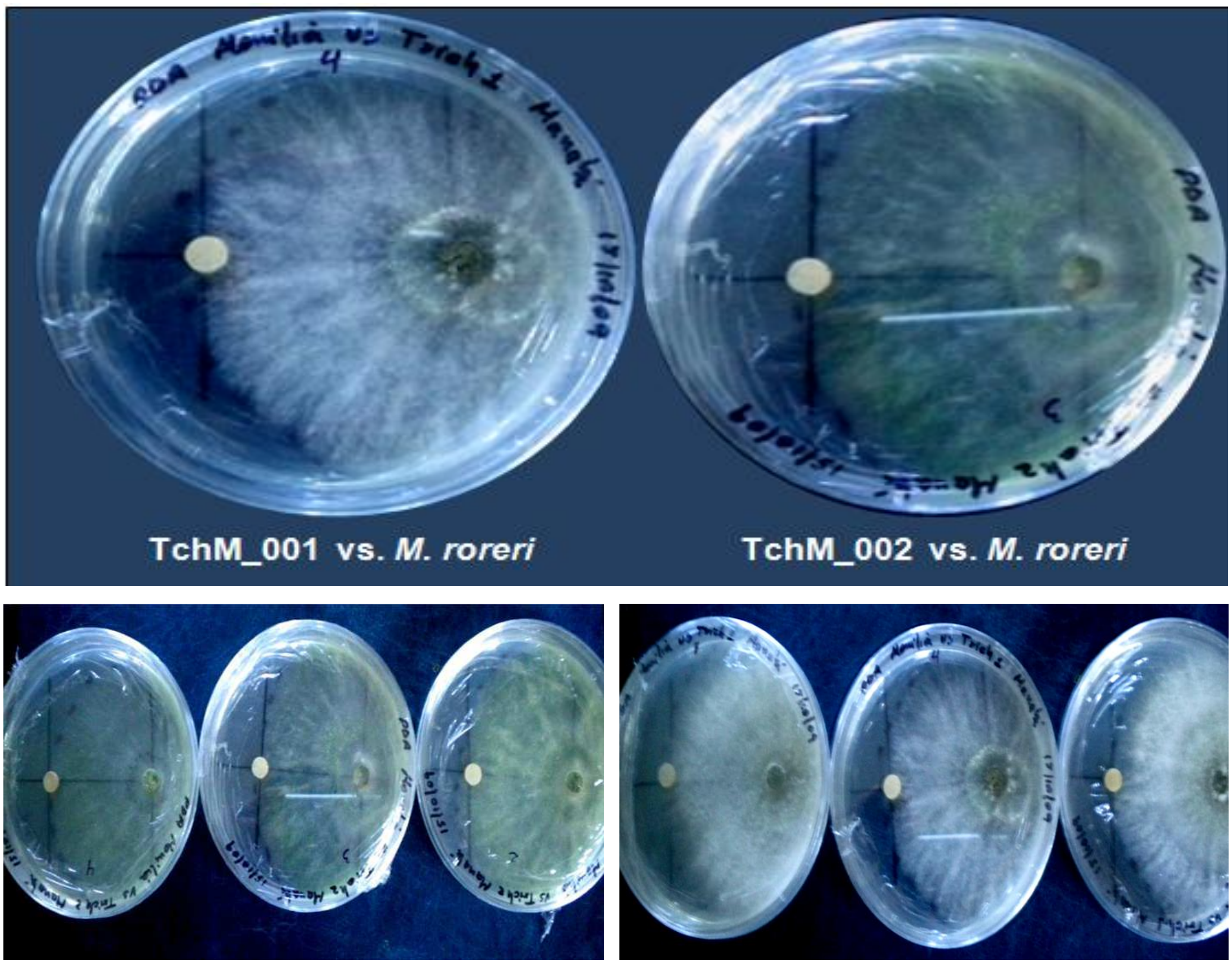




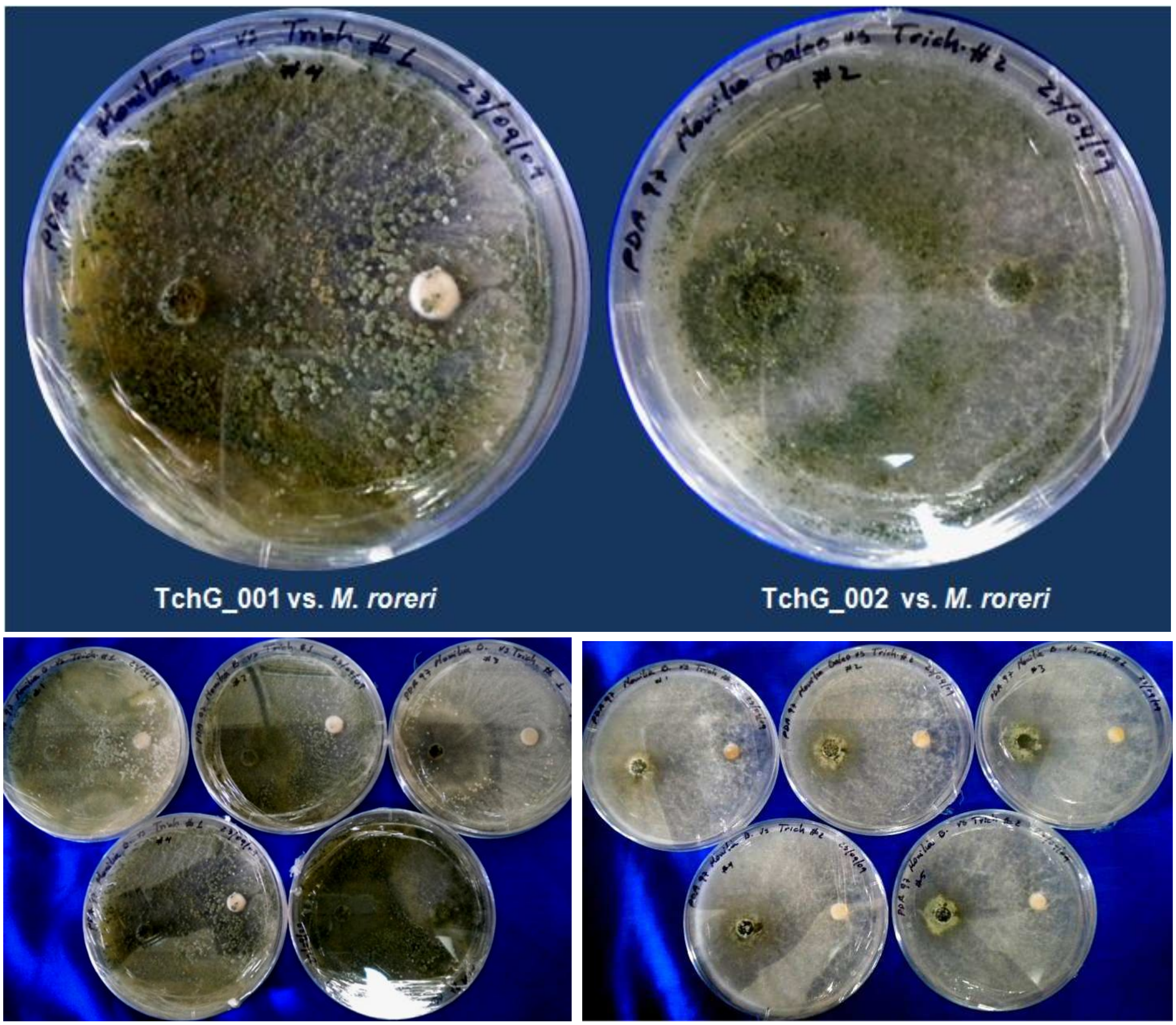


Cultivo dual de *Trichoderma* sp. vs *M. roreri* . Resultados evidenciados con aislamientos de la provincia de ESMERALDAS

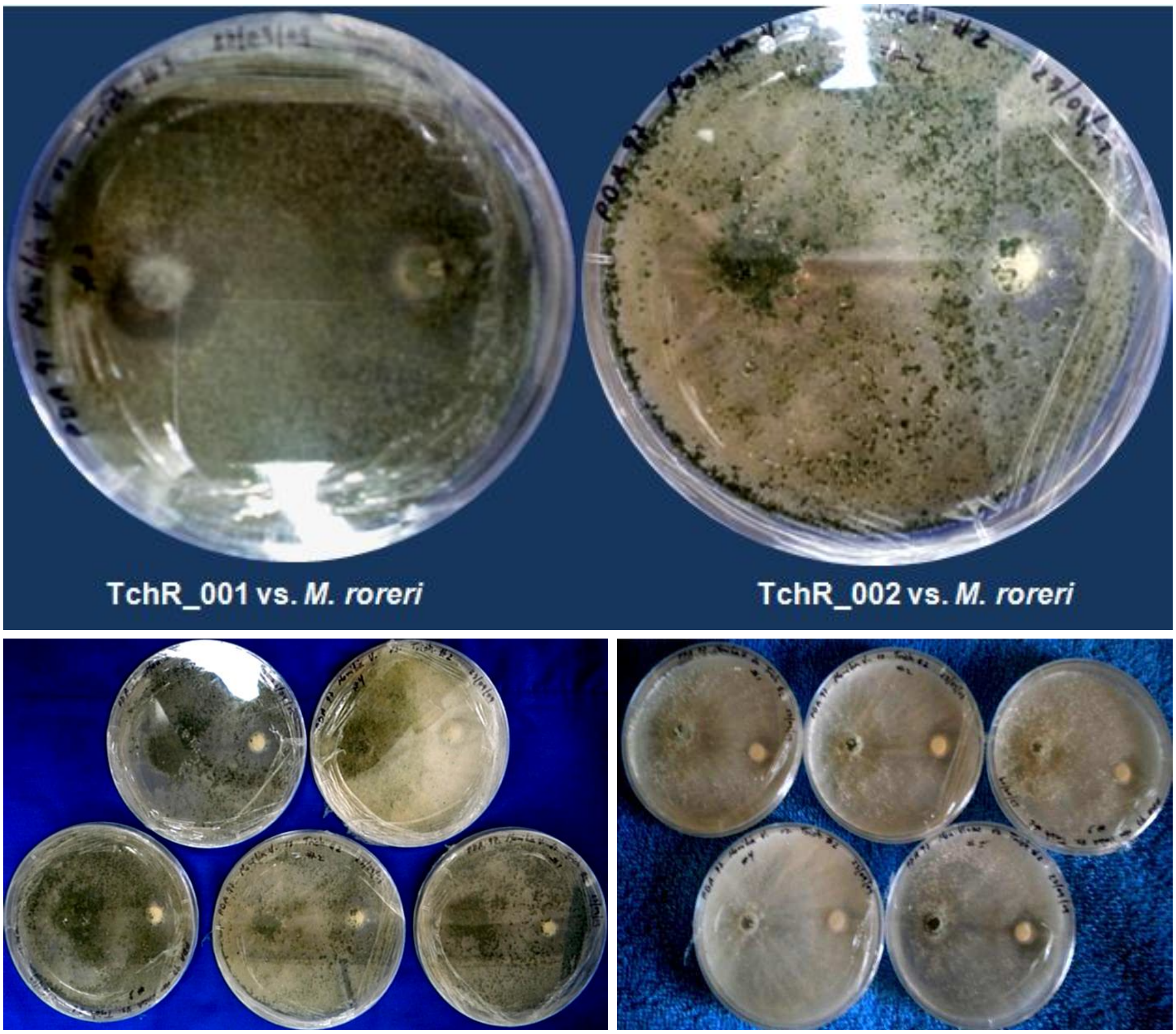
}



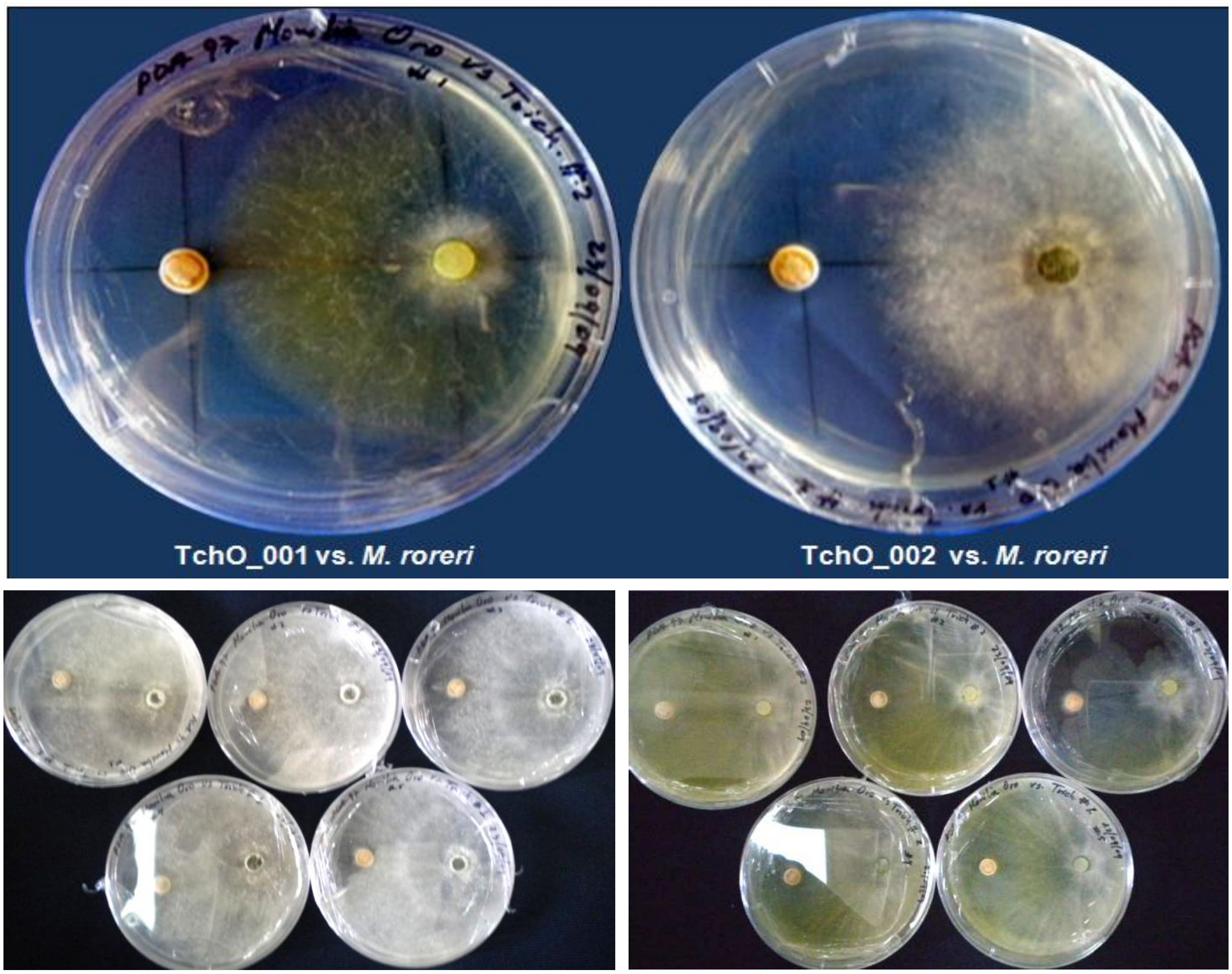
Cultivo dual de *Trichoderma* sp. vs *M. roreri* . Resultados evidenciados con aislamientos de la provincia de MANABÍ.



Cultivo dual de *Trichoderma* sp. vs *M. roreri* . Resultados evidenciados con aislamientos de la provincia del GUAYAS.



Cultivo dual de *Trichoderma* sp. vs *M. roreri* . Resultados evidenciados con aislamientos de la provincia de Los Ríos.



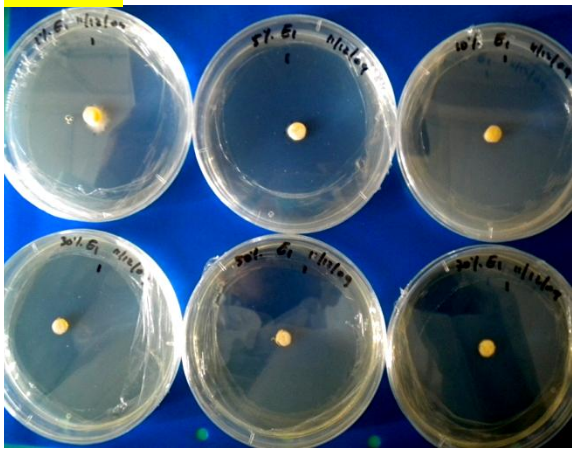
Cultivo dual de *Trichoderma* sp. vs *M. roreri* . Resultados evidenciados con aislamientos de la provincia de El Oro.

APÉNDICE C

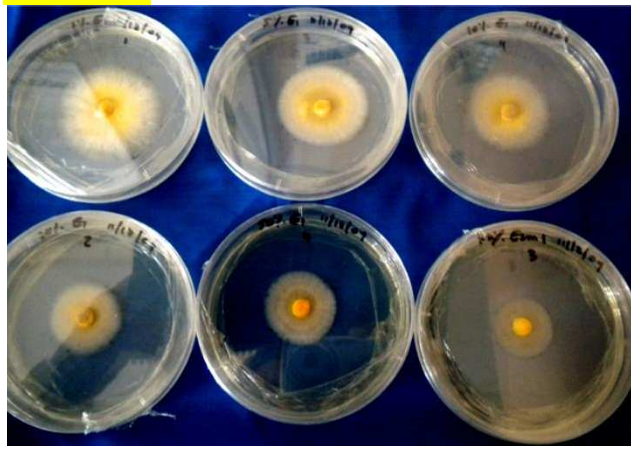
INHIBICIÓN DE *M. roreri* POR EFECTO DE FILTRADOS DE CEPAS DE *Trichoderma sp.*

ESMERALDAS TchE_001

5 días

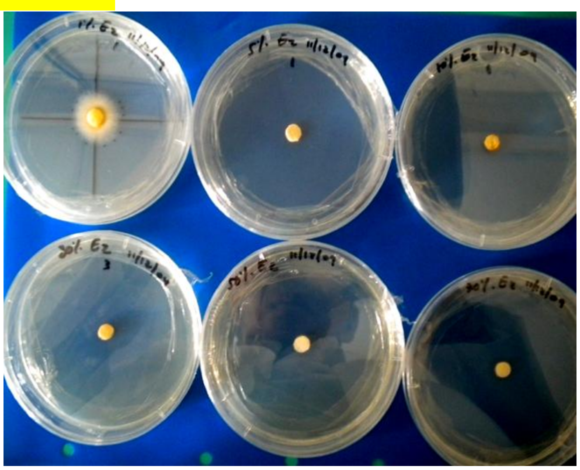


10 días

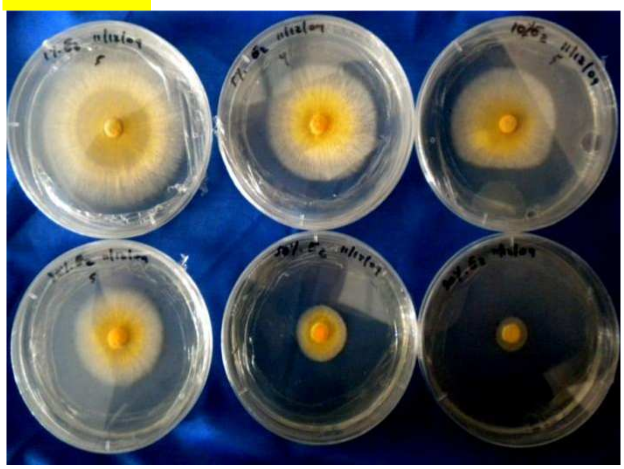


ESMERALDAS TchE_002

5 días



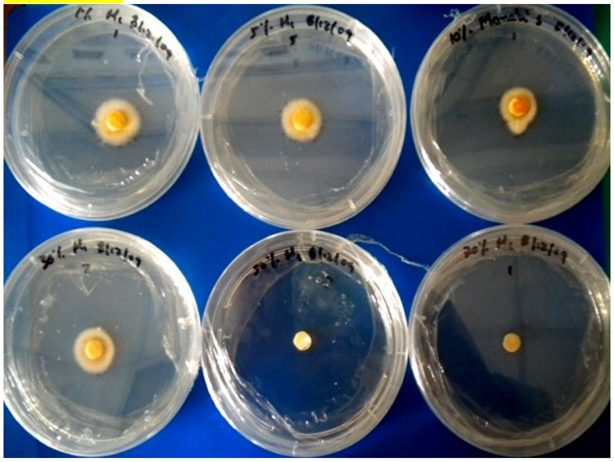
10 días



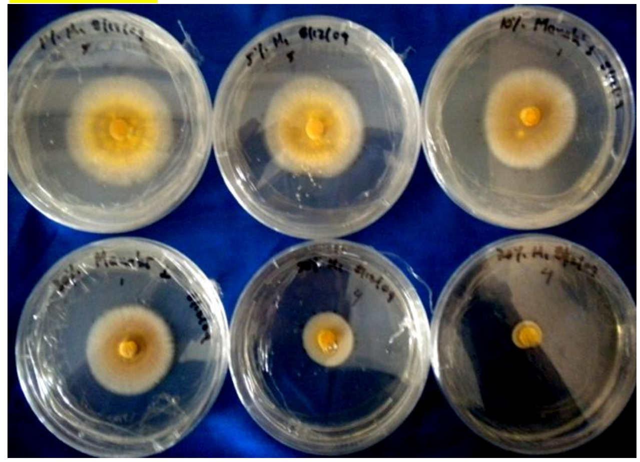
Efecto de filtrados de las cepas TchE_001 y TchE_002 aisladas de la provincia de Esmeraldas. Inhibición observada a los 5 y 10 días de evaluación en las concentraciones al 1, 5, 10, 30, 50 y 70% de concentración.

MANABÍ TchM_001

5 días

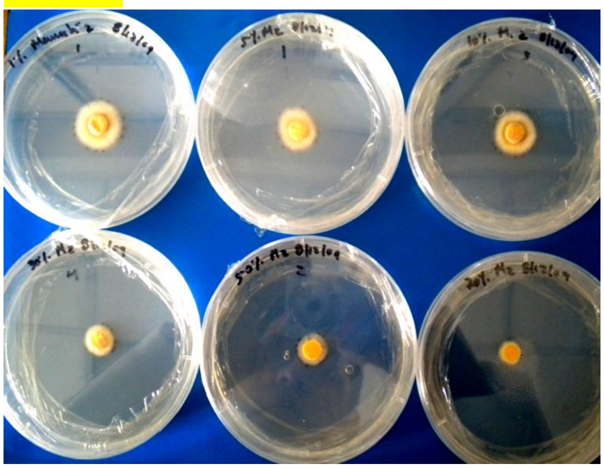


10 días

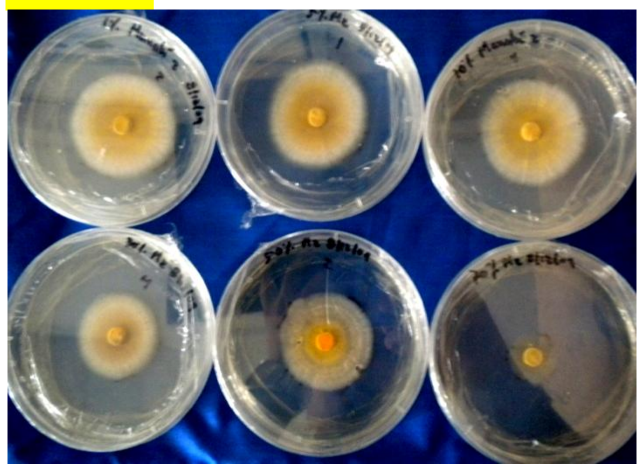


MANABÍ TchM_002

5 días



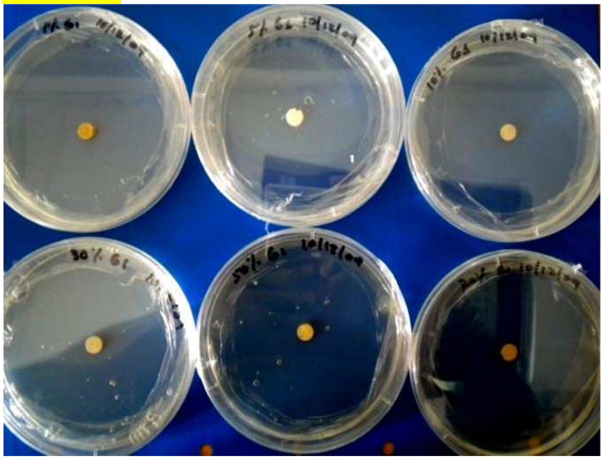
10 días

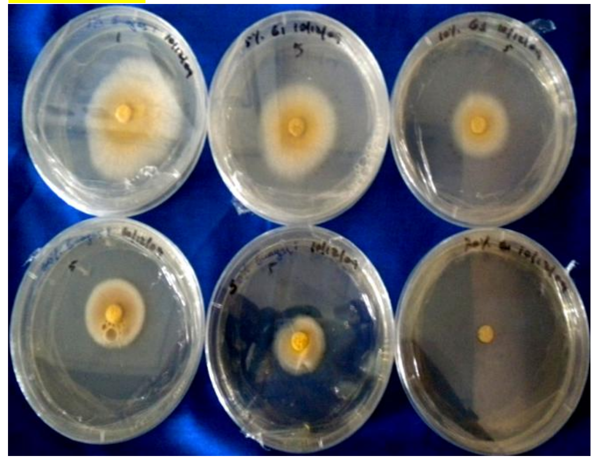


Efecto de filtrados de las cepas TchM_001 y TchM_002 aisladas de la provincia de Manabí. Inhibición observada a los 5 y 10 días de evaluación en las concentraciones al 1, 5, 10, 30, 50 y 70% de concentración.

GUAYAS TchG_001

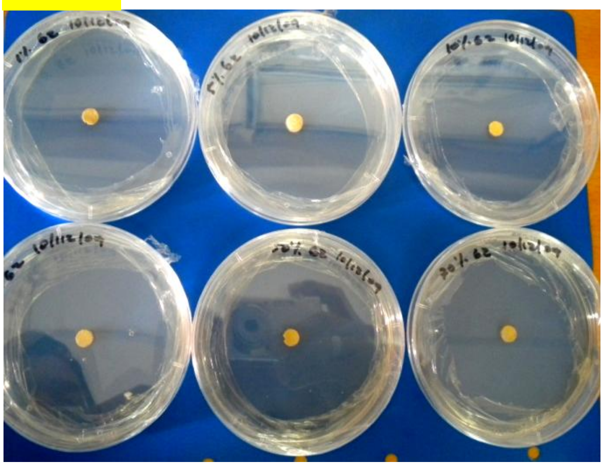
5 días **10 días**





GUAYAS TchG_002

5 días **10 días**

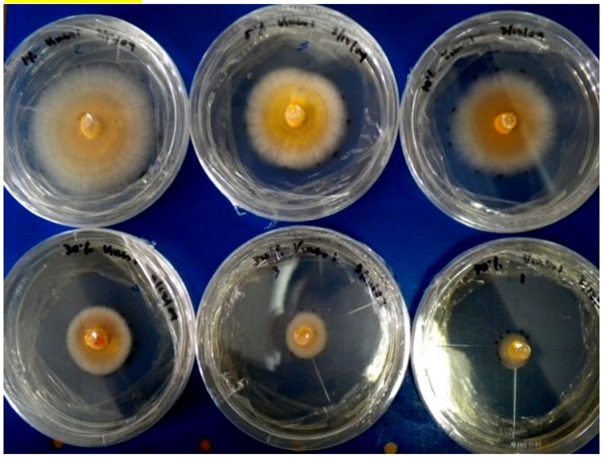


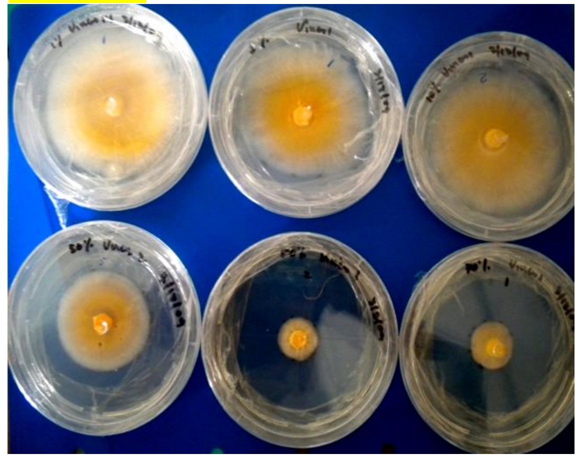
Efecto de filtrados de las cepas TchG_001 y TchG_002 aisladas de la provincia de Guayas. Inhibición observada a los 5 y 10 días de evaluación en las concentraciones al 1, 5, 10, 30, 50 y 70% de concentración.

LOS RÍOS TchR_001

10 días

15 días

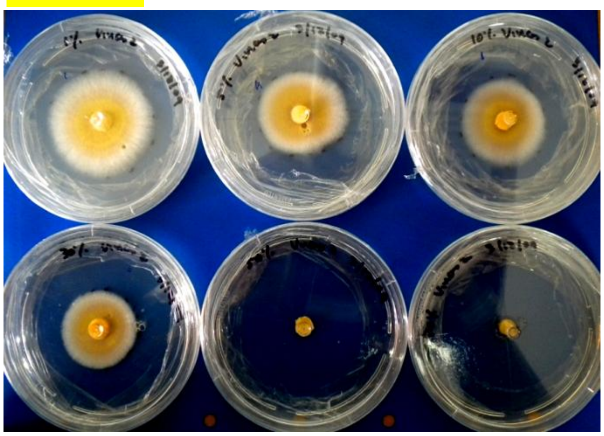


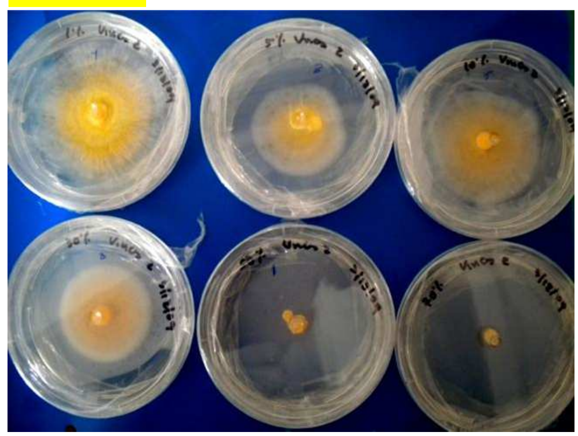


LOS RÍOS TchR_002

10 días

15 días

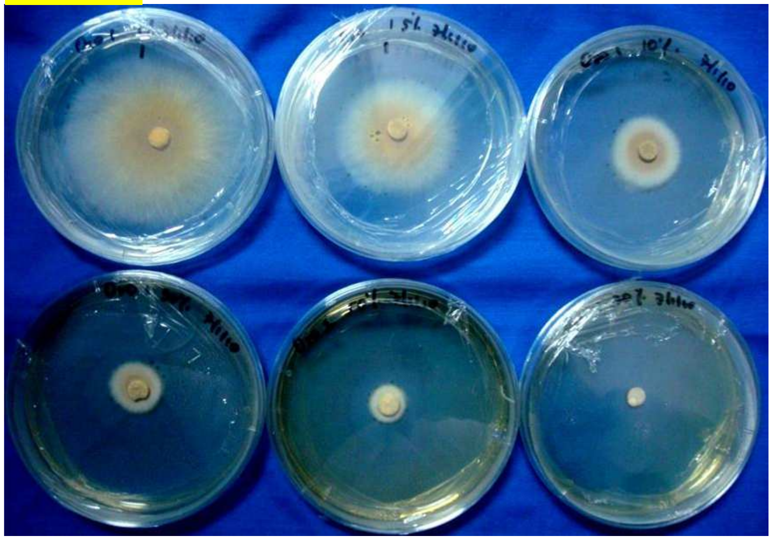




Efecto de filtrados de las cepas TchR_001 y TchR_002 aisladas de la provincia de Los Ríos. Inhibición observada a los 10 y 15 días de evaluación en las concentraciones al 1, 5, 10, 30, 50 y 70% de concentración.

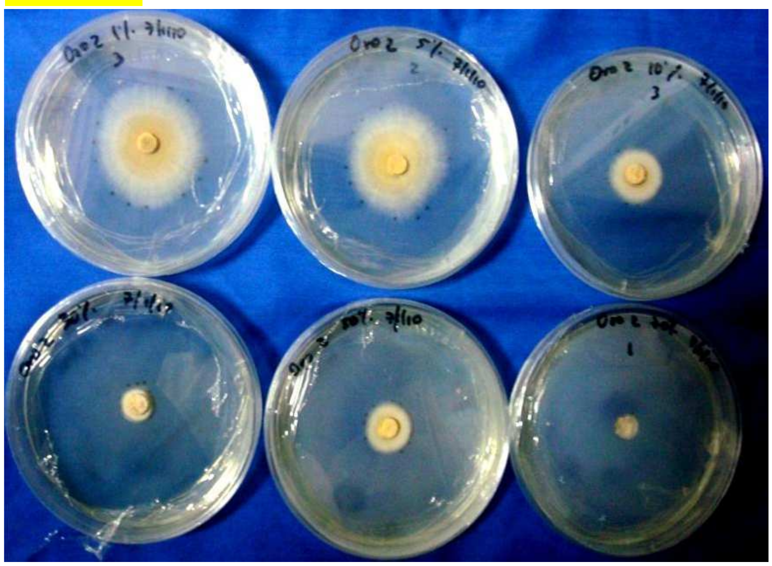
EL ORO   TchO_001

10 días



EL ORO   TchO_002

10 días



Efecto de filtrados de las cepas TchO_001 y TchO_002 aisladas de la provincia de El Oro. Inhibición observada a los 10 días de evaluación en las concentraciones al 1, 5, 10, 30, 50 y 70% de concentración.