



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA**

**“Evaluación del potencial de un microencapsulado en masa de *Trichoderma* spp., para el biocontrol de *Moniliophthora roreri* a través de ensayos *in vitro* e *in vivo*”**

**Trabajo de titulación previo la obtención del Título de Magister en Biociencias Aplicadas con mención en Biodescubrimiento**

Presentado por: Ing. Agr. Danny Daniel Avilés Párraga

Guayaquil – Ecuador

2020

## **AGRADECIMIENTO**

Al Señor Jesucristo por darme la vida, salud, perseverancia a lo largo de la carrera. Al VLIR NETWORK ECUADOR, a todos los docentes de Postgrado en Biociencias Aplicadas, en especial al Ph.D. Luis Galarza Romero, directo del proyecto de tesis, al Codirector Ph.D. Eduardo Chica, al Ph.D. Jonathan Coronel, Ph.D. Fernanda Calderón, por brindar su fundamental asesoría. Al coordinador del programa Ph.D. A Juan Manuel Cevallos por su destacada labor como coordinador de la maestría, a la directora del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Ph.D. Daynet Sosa y al Ph.D, José Álvarez por permitirme participar en este proyecto de investigación, como también al analistas de laboratorio de fitopatología, Ing. Fernando Espinoza y al Ing. Darlyn Amaya por su colaboración en laboratorio y trabajo de campo.

## **DEDICATORIA**

A mi madre, Virginia Párraga, a los profesores de la Maestría por su valioso aporte con sus conocimientos a lo largo del programa, al Centro de Investigaciones Biotecnológica del Ecuador (CIBE). Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL).

## **TRIBUNAL DE GRADUACIÓN**

Luis Galarza Romero Ph.D.  
DIRECTOR DEL PROYECTO DE  
TITULACIÓN

Eduardo Chica Ph.D.  
CODIRECTOR DEL PROYECTO DE  
TITULACION

Jonathan Coronel Ph.D.  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 1

María Fernanda Calderón Ph.D.  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 2

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

“La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral”.

Danny Daniel Avilés Párraga

## INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO .....	ii
DEDICATORIA .....	iii
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN .....	iv
DECLARACIÓN EXPRESA.....	v
INDICE GENERAL .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
Resumen.....	xiii
I. INTRODUCCION.....	13
1.1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN. ....	14
1.2 OBJETIVO GENERAL.....	16
1.3 Objetivos específicos.....	16
1.4 MARCO TEÓRICO .....	17
CAPÍTULO 2 .....	21
METODOLOGÍA.....	21
2.1 Selección de microorganismos antagonistas.....	21
2.2. Sistema de microencapsulación en masa de <i>T. ghanense</i> y <i>T. reesei</i> . ....	21
2.3. Capacidad antagonista de microcápsulas de <i>T. ghanense</i> y <i>T. reesei</i> frente a <i>M. royeri</i> a nivel <i>in vitro</i> . ....	22
2.4. Evaluación del efecto biocontrolador de microcápsulas de <i>T. ghanense</i> frente a <i>M. royeri</i> en condiciones <i>in vivo</i> . ....	24
2.4.1. Fecundación manual en plantas de cacao. ....	24
2.4.2. Análisis de control biológico sobre <i>M. royeri</i> en condiciones semicontroladas. ....	25

2.4.3. Análisis de control biológico sobre <i>M. royeri</i> en plantación comercial. ....	28
RESULTADOS .....	30
3.1 Sistema de microencapsulación en masa de <i>T. ghanense</i> y <i>T. reesei</i> .....	30
3.2. Capacidad antagonista de microcápsulas de <i>T. ghanense</i> y <i>T. reesei</i> frente a <i>M. royeri</i> a nivel <i>in vitro</i> . ....	30
3.2.1 Antagonismo .....	30
3.2.2 Micoparasitismo. ....	32
3.3. Evaluación del control biológico de las microcápsulas en frutos de 15 días de edad. ....	33
3.4. Evaluación del control biológico de microcápsulas con intervalos de aplicación en mazorcas de 28 días de edad. ....	35
3.5 Análisis del control biológico de las microcápsulas de <i>T. ghanense</i> en una plantación comercial.....	38
CAPITULO 4 .....	40
DISCUSIÓN.....	40
4.1. Microencapsulación de <i>T. ghanense</i> (C4B) y <i>T. reesei</i> (C2A) basado en la técnica de atomización. ....	40
4.2. Capacidad antagonista de microcápsulas de <i>T. ghanense</i> (C4B) y <i>T. reesei</i> (C2A) frente a <i>M. royeri</i> a nivel <i>in vitro</i> . ....	42
4.3. Evaluación del control biológico microencápsulas de <i>T. ghanense</i> (C4B) frente a <i>M. royeri</i> en condiciones <i>in vivo</i> .....	43
4.3.1. Biocontrol de <i>T. ghanense</i> frente a <i>M. royeri</i> en frutos de cacao con 15 días de edad.....	43
4.3.2. Biocontrol de <i>T. ghanense</i> y <i>M. royeri</i> en frutos de cacao con 28 días de edad. ....	45
Conclusiones .....	48

Recomendaciones .....	49
Bibliografía.....	50
ANEXO.....	58



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones para la microencapsulación de <i>Trichoderma</i> .....	22
Tabla 2. Escala citada por Ezziyyani et al., (2004) para evaluar la capacidad antagónica y micoparasitismo de <i>T. ghanense</i> y <i>T. reesei</i> sobre <i>M. roreri</i> . ....	24
Tabla 3. Descripción de tratamientos de <i>Trichoderma</i> para aplicación en frutos de 15 días de edad. ....	27
Tabla 4. Descripción de tratamientos de <i>Trichoderma</i> para aplicación en frutos de 28 días de edad. ....	28
Tabla 5. Tratamientos de <i>T. ghanense</i> para aplicación en finca comercial de cacao .	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> (A) Antagonista <i>T. ghanense</i> y (B) <i>T. reesei</i> .....	21
<b>Figura 2.</b> Esquema del cultivo dual de las microcápsulas de <i>Trichoderma</i> spp.....	23
<b>Figura 3.</b> (A) Fecundación y (B) tapado de las flores de cacao. ....	25
<b>Figura 4.</b> (A) muestra la inoculación de patógeno <i>M. roleri</i> (MR59), (B) tratamiento de <i>Trichoderma</i> , y (C) cubierta de los frutos en plantas de cacao.....	26
<b>Figura 5.</b> Aspersión de frutos de cacao con tratamientos de <i>Trichoderma</i> en finca comercial. ....	29
<b>Figura 6.</b> Microcápsulas a diferentes niveles, (A) 25 cm de altura, (B) 35 cm de altura capsulas formadas (flechas), (C) 45 cm de altura.....	30
<b>Figura 7.</b> Diagrama de cajas del Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Micelial (PICR) de <i>M. roleri</i> frente a <i>T. ghanense</i> y <i>T. reesei</i> , en condiciones <i>in vitro</i> , durante 10 días de evaluación. ....	31
<b>Figura 8.</b> (A) Antagonismo de <i>T. ghanense</i> y (B) <i>T. reesei</i> frente al patógeno <i>M. roleri</i> en condiciones <i>in vitro</i> . ....	32
<b>Figura 9.</b> Capacidad de micoparasitismo de <i>T. ghanense</i> y <i>T. reesei</i> , según la capacidad antagonista, frente al patógeno <i>M. roleri</i> en condiciones <i>in vitro</i> , durante 10 días de evaluación. El error estándar es cero para todos los tratamientos. ....	32
<b>Figura 10.</b> (A) Micoparasitismo de <i>T. ghanense</i> y (B) <i>T. reesei</i> , según la capacidad antagonista, frente al patógeno <i>M. roleri</i> en condiciones <i>in vitro</i> .....	33
<b>Figura 11.</b> (A) muestra el promedio de la severidad externa con tratamientos de <i>T. ghanense</i> durante nueve semanas de evaluación. (B) diagrama de cajas de la severidad externa para los tratamientos en la semana 8. No existe diferencia significativa según Kruskal-Wallis ( $P \leq 0.94$ ). ....	34
<b>Figura 12.</b> Síntomas externos de protuberancia causados por <i>M. roleri</i> . ....	34
<b>Figura 13.</b> Promedio de severidad interna en la novena semana post inoculación del patógeno y antagonista. ....	35

<b>Figura 14.</b> Aspecto interno de frutos de cacao inoculados con <i>M. royeri</i> y diferentes formulaciones de <i>T. ghanense</i> en frutos con 15 días de edad. (A) control negativo (agua), (B) microcápsula con solución acuosa de <i>T. ghanense</i> y patógeno (MCP), (C) solución de esporas de <i>T. ghanense</i> y patógeno (S.Esp), (D) microcápsulas secas de <i>T. ghanense</i> y patógeno (MCPs) y (E) control positivo (patógeno). .....	35
<b>Figura 15.</b> (A) Severidad externa por semana de evaluación. (B) Diagrama de cajas de la severidad externa en la semana 8 de evaluación; diferencias significativas para todos los tratamientos ( $P=0.03$ ), excepto el tratamiento con solución de esporas y patógeno (S.Esp+MR) según la prueba de Kruskal-Wallis ( $P=0.620$ ). .....	36
<b>Figura 16.</b> Síntomas externos causados por <i>M. royeri</i> durante la evaluación. ....	37
<b>Figura 17.</b> Severidad interna de frutos inoculados en combinación durante las ocho semanas de evaluación. Existe diferencia significativa de todos los tratamientos, contra el control negativo, excepto MR+S.Esp, según Kruskal-Wallis ( $P\leq 0.05$ ). .....	37
<b>Figura 18.</b> Aspecto interno de frutos de cacao inoculados con <i>M. royeri</i> en frutos con 28 días de edad. (A) Control negativo (agua), (B) Tratamiento de la interacción de la solución de esporas de <i>T. ghanense</i> y patógeno (S.Esp+MR), (C) Microcápsulas en solución acuosa de <i>T. ghanense</i> y patógeno (MCP+MR), (D) Patógeno y Microcápsulas secas de <i>T. ghanense</i> (MR+MCP), y (E) Control positivo (MR). .....	38
<b>Figura 19.</b> Promedio de la incidencia de la enfermedad mediante el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) durante los 90 días de evaluación, no presenta diferencia significativa entre los tratamientos, según prueba de Kruskal-Wallis ( $P\leq 0.05$ ). .....	39
<b>Figura 20.</b> Número de mazorcas sanas durante 90 días de evaluación. No existe diferencia significativa según la prueba de Kruskal Wallis (0.05). .....	39

## **ABREVIATURAS**

**PHF:** Pudrición Helada del Fruto

**MR:** *Moniliophthora roreri*

**MCPs:** Microcápsulas secas

**MCP:** Microcápsulas

**S.Esp:** Solución de esporas

## Resumen

Una de las principales enfermedades del cultivo de cacao es la moniliasis o Pudrición Helada del Fruto (PHF) causada por agente patógeno *Moniliophthora roreri*. En la búsqueda de disminuir la incidencia de la enfermedad en campo se está implementando nuevas alternativas de control. Por tal motivo, en este estudio se planteó el uso potencial de microcápsulas en masa a partir de solución de esporas de *Trichoderma* spp., evaluando las microcápsulas en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Obteniendo como resultado los parámetros ideales para el proceso de microencapsulación iniciando con una concentración del hongo benéfico de  $1 \times 10^8$  esporas/ml, una altura de aspersión de 35 cm, a una velocidad en el tanque de 120 rpm por 30 minutos. La capacidad de biocontrol de las microcápsulas procesadas mostraron porcentajes de inhibición para *T. ghanense* de entre 74.4 y 75.9%, en el caso de *T. reesei* del 73.8 al 76.4%. Pero sólo *T. ghanense* esporuló sobre la colonia del patógeno a nivel *in vitro*.

Por otro lado, los ensayos realizados en campo en condiciones semi-controladas, es decir, aplicando el producto en mazorcas de 15 días de edad se evaluó la severidad interna y externa, resultando que las aplicaciones con microcápsulas que se mantuvieron en agua presentaron 0% de afectación externas, así como interna, adicionalmente las microcápsulas que pasaron por un proceso de secado y la solución de esporas mostraron daño tanto externo como interno entre 1-25% y 0-50%, respectivamente.

Finalmente, en la evaluación de las microcápsulas en frutos de 28 días de edad, se realizaron aplicaciones intercaladas (antagonista – patógeno), las microcápsulas mantenidas en agua y la solución de esporas mostraron una severidad de las mazorcas entre el 1-25%. En contraste, en la siguiente aplicación (patógeno - antagonista) los daños de severidad externa e interna fueron de entre 26-75% y 80-100%, respectivamente. Adicionalmente, en la aplicación de la solución de esporas del antagonista los daños fueron del 60%.

En conclusión, las cepas de *Trichoderma* analizadas poseen características de agentes de control biológico, es así como *T. ghanense* (C4B) tuvo la capacidad de crecer y esporular sobre la cepa patógena en las pruebas *in vitro*, adicionalmente, la capacidad biocontroladora de esta cepa no disminuyó después del proceso de microencapsulación. En las pruebas de campo de las microcápsulas aplicadas en prevención, es decir, 15 días después de la formación del fruto, mostraron mayor eficacia reduciendo la incidencia del patógeno.

## I. INTRODUCCION

Originario de Sudamérica, el cultivo cacao (*Theobroma cacao*) fue domesticado, el cual se produce en regiones tropicales de América, África, Asia y Oceanía, de estos en su mayoría ubicados en Latinoamérica y el Caribe (1). Los parámetros climáticos de este cultivo requieren de adecuadas condiciones de temperatura y humedad con el fin de obtener una mejor producción disminuyendo de esta manera enfermedades (1) Ecuador encabeza la producción y exportación de cacao fino aroma el cual representan un 62% del mercado mundial, debido a sus características el producto ecuatoriano es altamente solicitado por su sabor único (2).

*M. royeri* agente causal de la Pudrición Helada del Fruto (PHF) es considerada una de las principales enfermedades del cultivo (3). Uno de los métodos usados para el control de la enfermedad en campo es el uso de agroquímicos de los cuales ya son conocidas sus afectaciones al ambiente, así como al hombre (4). Por otro lado, el control biológico es una alternativa amigable y compatible con el medioambiente y el hombre; debido a la utilización de microorganismos benéficos, los cuales tiene capacidad antagonista sobre fitopatógenos mediante diferentes mecanismos de acción y de amplio espectro (5); y que junto con las labores culturales disminuyen la incidencia de la enfermedad en campo (4).

Recientemente, el uso de microorganismos benéficos sometidos a un proceso de encapsulamiento y/o microencapsulación ha ido tomando fuerza debido a la protección que le da a los microorganismos para resistir ciertas condiciones adversas además de regular su liberación (6).

El género *Trichoderma* ha sido estudiado por varios años como agente de control biológico debido a sus diferentes mecanismos de acción, considerando al micoparasitismo y la antibiosis de los más importantes (7). Así también se destacan especies usadas para el control biológico de enfermedades en campo tales como: *T. harzianum*, *T. viride*, *T. asperellum*, *T. virens*, *T. atroviride*, *T. hamatum* (1).

En este estudio se analizó el potencial de un microencapsulado en masa de *Trichoderma ghanense* y *Trichoderma reesei* para el biocontrol de *M. royeri* por medio de pruebas duales *in vitro*. Adicionalmente, se evaluó el efecto del antagonista de *T. ghanense* contra *M. royeri* en condiciones de campo, mediante aspersión de microcápsulas lavadas, microcápsulas secas y solución de esporas de *T. ghanense*, utilizando un bulbo atomizador sobre frutos de cacao.

### **1.1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.**

La producción de cacao en Ecuador posee una alta demanda a nivel internacional para la exportación, demanda que representa en promedio 260 mil toneladas métricas para el año 2015. Entre las provincias con mayor número de hectáreas sembradas en nuestro país se encuentran las provincias de Guayas, Manabí y Los Ríos, seguidos de Esmeralda y El Oro. Además, la producción en la región Amazónica ha aumentado (8).

Ecuador ha sido productor de cacao desde 1780, con alta productividad durante la década 1890, convirtiéndose en el exportador principal a nivel mundial. No obstante, durante el año 1920 la incidencia de enfermedades afectó gravemente la producción ocasionando pérdidas del 30% en las plantaciones (9). Actualmente el cultivo de cacao sigue siendo afectado por enfermedades fúngicas como *M. royeri*, el cual afecta entre el 30-60% de la producción. Según el reporte durante el último semestre del 2015 un brote de la enfermedad disminuyó el 14% de la producción, representando 2000 toneladas menos para la exportación (10).

Como se lo ha mencionado anteriormente, uno de los métodos de control del patógeno en campo es el uso de agentes de control biológico, el cual se ha venido incrementando en los últimos años, adicionalmente el uso de este tipo de agentes benéficos facilita la disponibilidad de nutrientes y fitohormonas para mejorar la salud y desarrollo de las plantas (11) Unos de los agentes de control biológico son las especies del género

*Trichoderma* que se ha empleado como antagonista naturales y biofertilizantes, además, en base a diferentes cepas de este hongo benéfico se han desarrollado productos biológicos comerciales destinados para el control de patógenos como *Botrytis cinérea*, *Rhizoctonia solani*, *Armillaria* spp, y *Fusarium moniliforme* en cultivos de papa, arroz, tomate, y maíz (12,13).

En este contexto, *Trichoderma* spp., posee diferentes mecanismos de acción, tales como micoparasitismo, antibiosis, producción de toxinas, enzimas, y competitividad (14). La acción de micoparasitismos se considera a la interacción antagonista-patógeno (15), en la cual, el antagonista realiza un enrollamiento, penetración, vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis (16); el enrollamiento y adhesión, se genera por la agrupación de un azúcar de la pared del antagonista (17). La producción de las enzimas líticas extracelulares, especialmente glucanasas, proteasas y quitinasas tienen el potencial de degradar las paredes celulares del patógeno, facilitando la penetración de las hifas del hongo benéfico (18), de esta manera el micoparasitismo finaliza con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula hospedante, manifestando síntomas de disgregación (19).

Actualmente, se utilizan agentes antagonistas para el manejo de enfermedades, pero la aplicación directa de productos a base *Trichoderma* spp., muchas veces son inestables en el ambiente, afectando su viabilidad por ende el biocontrol; es así como la búsqueda de métodos alternativos tal es el caso de la encapsulación de agentes biológicos para mantener su viabilidad por un tiempo determinado (20). En el proceso de microencapsulación existen materiales óptimos tales como los polímeros biodegradables, de los cuales se mencionan a; alginatos, gomas, almidón, agar, pectina, celulosa, quitosano entre otros (21). En este sentido, se ha llevado a cabo la elaboración de microencapsulados (MCE) a base de *Trichoderma* spp, observando un mayor desarrollo de las plantas y potencial como agente de biocontrol contra patógenos que se encuentran en el suelo (6). Así también se reportó un sistema de microencapsulación de una cepa de *T. harzianum*, como agente de control biológico para mejorar la actividad antagónica frente a patógenos (11).



Durante ciertos procesos o protocolos de microencapsulado las cepas de *Trichoderma* spp., se someten a una fase de secado generando un estrés en el hongo benéfico reduciendo la concentración de esporas viables, resultando en una baja efectividad de control del microencapsulado (12). En tal sentido es importante establecer un sistema de producción en masa, de productos a base de cepas de *Trichoderma* spp., la cual se tiene que realizar mediante la producción de macropartículas para facilitar su aplicación en campo (13).

## **1.2 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el potencial antagónico, contra *M. royeri*, de *Trichoderma* spp., microencapsulado utilizando un sistema de producción en masa de micropartículas.

## **1.3 Objetivos específicos**

1. Establecer un sistema de microencapsulación en masa de *Trichoderma* spp., basado en la técnica de atomización.
2. Analizar la capacidad biocontroladora de *Trichoderma* spp., microencapsulado en masa, frente a *M. royeri* mediante pruebas *in vitro*.
3. Evaluar el efecto biocontrolador de un microencapsulado a base de *Trichoderma* spp., frente a *M. royeri* en condiciones de campo.

## 1.4 MARCO TEÓRICO

*Theobroma cacao L* (cacao) pertenece al grupo de cultivos perennes, se considera de mucha importancia socioeconómica el cual genera ingresos a más 100,000 familias del Ecuador (22). Nuestro país, es el primer productor de cacao fino de aroma con una participación del 61% de la oferta a escala mundial, alcanzando exportaciones récord de 250 mil toneladas métricas para el año 2017 (23).

La producción en el cultivo de cacao se ve afectada por distintas enfermedades como: PHF (*M. roreri*), escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*), y la mazorca negra (*Phytophthora* spp.) La PHF es una enfermedad que afecta los frutos de cacao, la cual se encuentra presente en casi todos los países latinoamericanos, adaptándose a diferentes condiciones ambientes, y provocando pérdidas devastadoras que alcanzan en un 60% en lo que equivale a la producción (24).

*M. roreri*, es un hongo mitospórico dentro del Orden Agaricales, posee una basipétala con septos doliporos en el micelio, por tal razón se ha considerado como el estado mitótico (anamorfo) de un basidiomycete (25). Mediante estudios citológicos se ha evidenciado que funcionan como meiosporas; estos conidios son multifuncionales para el intercambio genético, dispersión, infección y sobrevivencia del patógeno (26). La geometría de estas esporas puede variar de esférica a ovaladas, presentan dos casos de germinación; primero mediante poros germinativo, y directamente desde la pared celular, por medio de las esporas (22, 23).

El desarrollo de esta enfermedad comienza en los residuos de la cosecha (mazorcas contaminadas). Así es como rápidamente las conidias son diseminadas, por las lluvias, vientos o por el hombre, generando contaminación a frutos de otras plantaciones (29). En las plantaciones de cacao se pueden encontrar la mayor cantidad de esporas de *M. roreri* a una altura de 1 metro. Las conidias depositadas en los frutos, germinan cuando se presentan las condiciones propicias, estas pueden germinar directamente sobre la

superficie del fruto (30). La penetración del hongo ocurre de manera directa a través de los estomas, creciendo entre las células del córtex, lo que genera a la producción de conidios en el interior y en la superficie de los frutos (31). El daño externo del fruto es diferenciado por la presencia de necrosis, deformación y pudrición de la mazorca, sin embargo, en algunos frutos de 60 y 80 días pueden terminar su desarrollo sin presentar síntomas de la enfermedad en la parte externa, pero se puede encontrar daños en el tejido interno, ocasionando la pérdida del fruto (32).

Para un correcto control fitosanitario, se realizan podas de formación de los árboles con la finalidad de mantener baja la copa de los árboles y adelgazadas, para proporcionar suficiente ventilación, facilitar la detección y eliminación oportuna de los frutos enfermos (33). El control cultural se considera como una de las prácticas fundamentales para disminuir la incidencia de la enfermedad. El patógeno tiene un período latente de siete semanas aproximadamente, por ello los frutos enfermos con la presencia del patógeno deben retirarse, esto es antes que el hongo inicie la esporulación en la superficie del fruto, esta actividad es eficiente para el control fitosanitario siempre y cuando se la realice de manera regular (34). Una vez que son retirados los frutos enfermos estos deben dejarse en el suelo sin moverlos, para permitir la inactivación microbiana (35). Una medida extrema y muchas veces necesaria es la eliminación de la totalidad de los frutos (sanos y enfermos) al final de la cosecha con la finalidad de romper el ciclo de la enfermedad, esto en las fincas de cacao donde el daño por la presencia de PHF afecta significativamente la producción (33).

Por otro lado, para el control de la PHF se han empleado productos protectantes con sulfato de cobre en dosis de 2kg/ha, además de protectantes (por ejemplo “oxicloruro de cobre”), lo que ha demostrado una disminución en la incidencia de esta enfermedad en campo (36). En cuanto a la aplicación de este tipo de productos debe de realizarse semanalmente a principio de los picos más altos de floración por un periodo de tres meses en plantaciones con alta densidad (37). En plantaciones de cacao con alto rendimiento, las aplicaciones de Triadimefon (preventivo/curativo) en dosis de 60

ml/bomba aspersora (20L) ha mostrado buenos resultados (38). Además, se aconseja aplicar Azoxystrobin (preventivo/curativo) en dosis de 250 g/ha de ingrediente activo, distribuida en un periodo de tres meses para disminuir la incidencia de la enfermedad (39).

En cuanto al control genético, este involucra la identificación de materiales vegetales o plantas con ciertas características de resistencia a la enfermedad, ya sea que esta resistencia se haya obtenido de elección natural o mediante la utilización de ingeniería genética (40). Así también, la utilización de clones resistentes es una alternativa con buenos resultados para los productores agrícolas, reduciendo drásticamente los costos de producción, además de beneficiar al ambiente (41,42). En la Amazonía ecuatoriana se recomienda utilizar clones de cacao tipo Nacional y Fino de aroma: EET-103, EET-95 y EET-576 ya que han demostrado resultados favorables de resistencia a *moniliasis* (43).

Por otra parte, el control biológico consiste en la implementación de diversos microorganismos benéficos, con la finalidad de reducir el inóculo de patógenos en campo, por ello se emplean organismos que posean diferentes mecanismos de acción (40). En este sentido, el hongo benéfico *Trichoderma* spp., posee varios modos de acción, entre ellos: antibiosis, parasitismo, competencia por nutrientes y espacio, así como también es capaz de estimular el crecimiento y desarrollo de las plantas (44).

Las especies del género *Trichoderma*, han sido caracterizadas por su amplio potencial en la agricultura, generalmente se la utiliza para el control biológico de organismos patógenos que afectan a diversos cultivos (7). Este hongo benéfico es de tipo ascomiceto, su crecimiento es rápido se lo puede encontrar en todo el mundo, en materia orgánica, como también en la rizosfera de las plantas (45). Gracias a la capacidad que posee este microorganismo benéfico de habitar en diferentes ecosistemas se genera una alta tasa reproductiva, diversidad metabólica, como también la capacidad antagónica que tienen diferentes cepas de *Trichoderma* frente a otros

microorganismos; adicionalmente, es capaz de crecer a temperaturas que oscilan desde 7.7°C hasta 42°C, con temperatura óptima entre 25°C a 30°C para su mejor desarrollo (46,47).

El mecanismo de antagonismo de *Trichoderma* consiste en la competencia que se genera por nutrientes como hierro, nitrato y carbono generalmente (48). El antagonista secreta metabolitos de desigual naturaleza, que aplacan o eliminan a los competidores en el microambiente, este mecanismo de acción bloquea el paso al patógeno, obteniéndose excelentes resultados para la disminución de patógenos (55, 56).

El objetivo del proceso de encapsulado o microencapsulado es de brindar protección al agente biológico frente a estrés abiótico y bióticos, de esta manera prolongar su viabilidad, igualmente produce una lenta liberación de las esporas conforme se vaya degradando la microcápsula (51). Durante el proceso de microencapsulado se considera la gelificación iónica como un método muy adecuado, asimismo existen métodos como: secado por pulverización, gelificación termal, partículas huecas, coacervación compleja, los cuales son usadas para encapsular antibióticos y células vivas en biomedicina y la industria farmacéutica (51).

Entre los métodos más comunes en la microencapsulación son los basados en la gelificación iónica con alginato (52). El cual consiste en el proceso fisicoquímico mediante la suspensión del principio activo en una disolución de alginato de sodio al 1,5%, incluyendo una concentración ideal del organismo biológico, suspensión la cual es atomizada sobre una solución líquida de acetato de calcio al 2% (53), como resultado se obtiene perla o partículas encapsuladas, las cuales se solidifican en segundos al reaccionar los cationes con cadenas biopoliméricas y forman estructuras rígidas (51).

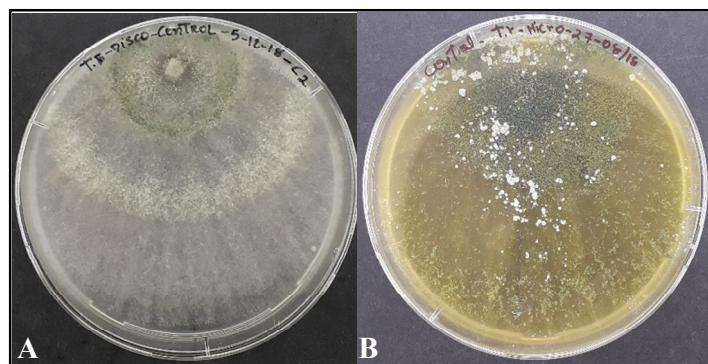
Esporas de *T. harzianum* y *Glomus* spp., inmovilizadas en perlas de alginato de sodio, han mostrado crecimiento a partir de la partícula generada, observándose hifas viables (54). Del mismo modo se ha encapsulado *Trichoderma* en alginato al 2% (p/v), mostrando que los conidios mantuvieron viabilidad por 14 meses a 28°C (55).

## CAPÍTULO 2

### METODOLOGÍA

#### 2.1 Selección de microorganismos antagonistas

El estudio se realizó en el Laboratorio de Fitopatología y Microbiología del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Las cepas utilizadas en este estudio pertenecen a la Colección de Microorganismos del CIBE, las cuales fueron aisladas de plantaciones de cacao en la Cantón de Naranjal, Provincia del Guayas. Las cepas benéficas seleccionadas fueron *T. ghanense* (código C4B) y *T. reesei* (código C2A) y la cepa patógena *M. royeri* (código MR59). Los aislados seleccionados fueron reactivados, resembrándolas tres veces e incubándolas a 28°C por 7 días, con el fin de que las cepas recuperen su viabilidad (Figura 1).



**Figura 1.** (A) Antagonista *T. ghanense* y (B) *T. reesei*

#### 2.2. Sistema de microencapsulación en masa de *T. ghanense* y *T. reesei*.

Para iniciar el ensayo se realizó la calibración del sistema de microencapsulación en las instalaciones del CIBE, mediante tres diferentes pruebas con las cepas de *T.*

*ghanense* y *T. reesei*, donde la variable a analizar fue la altura de aspersión, velocidad y tiempo los cuales inciden en el tamaño y forma de las microcápsulas (Tabla 1). Una vez implementadas las variables antes mencionadas, se procedió a colocar un volumen de 500  $\mu$ l de *T. ghanense* y *T. reesei* en 50 ml de alginato de sodio al 1,5%. La solución resultante se asperjó a través de una pistola atomizadora, sobre el tanque que contenía un volumen de 5 L de acetato de calcio al 2%, manteniéndola en agitación, todo el proceso fue realizado con materiales previamente esterilizados (Anexo 1) (56). Finalmente, las partículas de las microcápsulas de *Trichoderma*, se lavaron con agua destilada y se realizó un proceso de secado con 10 ml de muestra, colocando en cajas Petri de vidrio y fueron ubicadas en una estufa a 30°C por 30 minutos para obtener las microcápsulas secas.

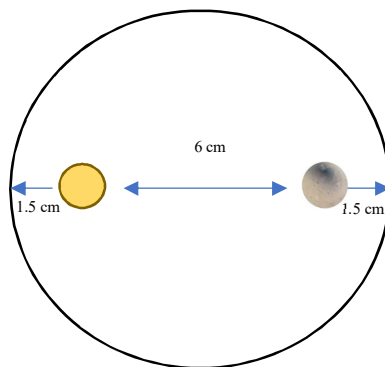
**Tabla 1.** Condiciones para la microencapsulación de *Trichoderma*.

Ensayo	Altura aspersión	rpm	Tiempo/min	Conc. Esporas
1	25	130	20	1x10 <sup>8</sup>
2	35	120	30	1x10 <sup>8</sup>
3	45	135	35	1x10 <sup>8</sup>

### 2.3. Capacidad antagonista de microcápsulas de *T. ghanense* y *T. reesei* frente a *M. royeri* a nivel *in vitro*.

Las pruebas de antagonismo se iniciaron con la siembra del patógeno a un extremo de la caja petri con un disco de 0.5 cm de diámetro, la cual fue incubada a 26°C durante 10 días en medio PDA. Luego, las cepas del hongo benéfico se colocaron en el extremo opuesto, lo cual consistió en el uso de microcápsulas de *T. ghanense* (C4B) y *T. reesei* (C2A) tanto lavadas, así como secas, adicionalmente, se usó como control positivo discos de 0.5 cm de ambas cepas de *Trichoderma* esporuladas, las cajas petri se

incubaron a 26°C por 3 días (Fig. 2). Las pruebas se realizaron por triplicado y se tomaron datos de crecimiento cada 24 horas (57).



**Figura 2.** Esquema del cultivo dual de las microcápsulas de *Trichoderma* spp.

### 2.3.1. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial.

La capacidad de control biológico de las cepas *T. ghanense* y *T. reesei* está supeditada a diferentes mecanismos de acción. En este sentido, se realizó el análisis de las siguientes variables: Radio de Crecimiento Antagonista (RCA), Radio de Crecimiento Patógeno (RCP) los cuales forman parte de la fórmula del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) (58), la cual se detallada a continuación:

$$\text{PIRGP} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

Donde:

R1: es el radio del fitopatógeno en PDA sin antagonista.

R2: es el radio de fitopatógeno en los ensayos de cultivos



### 2.3.2. Micoparasitismo.

Para la evaluación de este mecanismo de acción, se realizaron observaciones macroscópicas de los cultivos duales, teniendo en consideración el índice de micoparasitismo, considerando la capacidad de las cepas benéficas de colonizar al hongo patógeno, es decir, crecer sobre el cómo lo describe Ezziyyani et al., 2004 (58). (Tabla 2). Asimismo, se comprobó el micoparasitismo, por medio del microscopio, donde se analizaron las interacciones de las hifas antagonicas con las del patógeno.

**Tabla 2.** Escala citada por Ezziyyani et al., (2004) para evaluar la capacidad antagonica y micoparasitismo de *T. ghanense* y *T. reesei* sobre *M. roleri*.

<b>Grado</b>	<b>Capacidad antagonica</b>
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
1	Invasión de $\frac{1}{4}$ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
2	Invasión de $\frac{1}{2}$ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno esporulación sobre ella.

### 2.4. Evaluación del efecto biocontrolador de microcápsulas de *T. ghanense* frente a *M. roleri* en condiciones *in vivo*.

#### 2.4.1. Fecundación manual en plantas de cacao.

El trabajo de investigación se lo realizó en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) en conjunto con la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Según el protocolo interno de INIAP, se procedió a realizar fecundación dirigida en el clon EET-96, susceptible a la enfermedad. La fecundación se realizó con flores masculinas de CCN-51 el cual es compatible con el clon mencionado

anteriormente. Una vez realizado el proceso fecundativo la flor fue protegida. Finalmente, entre siete y quince días después la flor que aún se conservaba adherida al tronco nos indicaba que la fecundación manual fue un éxito (James Quiroz, conversación personal) (Fig. 3).

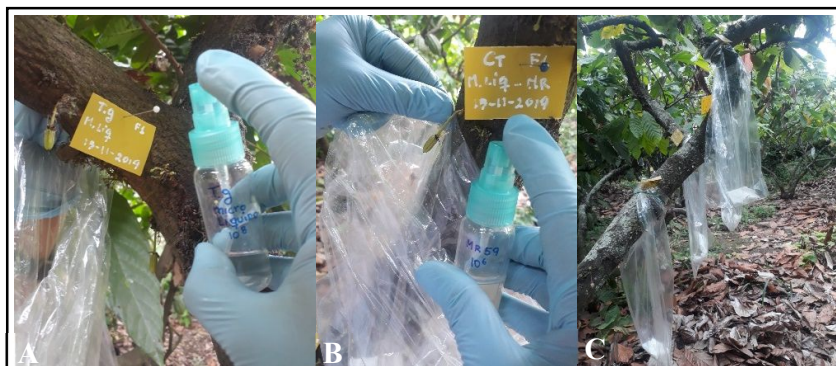


**Figura 3.** (A) Fecundación y (B) tapado de las flores de cacao.

#### **2.4.2. Análisis de control biológico sobre *M. royeri* en condiciones semicontroladas.**

Para la evaluación de *T. ghanense* frente a *M. royeri* se utilizaron cepas del patógeno con 11 días de edad, se procedió a coleccionar las esporas de la cepa agregando 4 ml de agua estéril en la caja Petri, se removió con un asa y luego se diluyó esta suspensión 10 veces. A partir de esta dilución se preparó una solución de esporas del patógeno a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/ml, verificado a través de conteos en una cámara de Neubauer. De forma similar, en el caso del hongo benéfico y para las microcápsulas, se preparó una suspensión de esporas con una concentración de  $1 \times 10^8$  esporas/ml. Por otro lado, el tratamiento con microcápsulas de *Trichoderma* secas fue diluido nuevamente en un volumen de agua (1:1 v/v) para la aplicación en campo.

En el primer ensayo se utilizaron 36 frutos de 15 días de edad, cada tratamiento de *T. ghanense* incluyó el control positivo y negativo, se inocularon 4 frutos por tratamientos (Tabla 3). Las aplicaciones realizadas en este ensayo fueron al mismo tiempo entre el patógeno *M. royeri* y las microcápsulas acuosas de *T. ghanense* (MCP), de la misma manera se procedió para el tratamiento de microcápsulas secas de *T. ghanense* (MCPs), adicionalmente como control positivo se usó una solución de esporas *T. ghanense* (S.Esp). Una vez realizadas las distintas aplicaciones, los frutos fueron cubiertos con fundas de polietileno transparente, y dentro de la funda fue colocado un papel toalla humedecido para mantener una alta humedad relativa (Fig. 4).



**Figura 4.** (A) muestra la inoculación de patógeno *M. royeri* (MR59), (B) tratamiento de *Trichoderma*, y (C) cubierta de los frutos en plantas de cacao.

**Tabla 3.** Descripción de tratamientos de *Trichoderma* para aplicación en frutos de 15 días de edad.

N° frutos	N° tratamientos	Tratamientos
4	1	Aplicación de microcápsulas de <i>T. ghanense</i> y patógeno ( <i>MCP</i> ).
4	2	Microcápsulas secas de <i>T. ghanense</i> y el patógeno ( <i>MCPs</i> ).
4	3	<i>T. ghanense</i> en forma de solución de esporas y el patógeno ( <i>S.Esp</i> ).
4	4	Control positivo ( <i>Control +</i> ).
4	5	Control negativo a base de agua estéril ( <i>Control -</i> ).

En el segundo ensayo se utilizaron 36 frutos de 28 días de edad. Los tratamientos fueron seis incluyendo los controles positivos y negativos (Tabla 4). La inoculación en campo, se realizó de la siguiente manera: En el primer tratamiento las microcápsulas acuosas de *T. ghanense* las cuales fueron aplicadas primero y cinco días después se aplicó la cepa patógena *M. royeri* (*MCP+MR*) en el mismo fruto. Continuando con la misma metodología de aplicación, se realizó la inoculación de la solución de esporas (*S.Esp*) de la cepa benéfica (*S.Esp+MR*). Por otro lado, siguiendo con las inoculaciones se procedió a inocular otras mazorcas con la cepa patógena de *M. royeri* en primera instancia y luego de cinco días la cepa benéfica tanto en microcápsulas (*MR+MCP*) como en solución de esporas (*MR+S.Esp*). Se emplearon 3 frutos por tratamientos con sus respectivos controles.

**Tabla 4.** Descripción de tratamientos de *Trichoderma* para aplicación en frutos de 28 días de edad.

N° frutos	N° tratamientos	Tratamientos
3	1	Aplicación de microcápsulas de <i>T. ghanense</i> luego el patógeno ( <i>MCP+MR</i> ).
3	2	Aplicación del patógeno luego las microcápsulas de <i>T. ghanense</i> ( <i>MR+MCP</i> ).
3	3	Aplicación de <i>T. ghanense</i> en forma de solución de esporas luego el patógeno ( <i>S.Esp+MR</i> ).
3	4	Aplicación del patógeno luego la solución de esporas de <i>T. ghanense</i> ( <i>MR+S.Esp</i> ).
3	5	Control positivo a base del patógeno <i>M. royeri</i> ( <i>Control +</i> ).
3	6	Control negativo a base de agua estéril ( <i>Control -</i> ).

#### 2.4.3. Análisis de control biológico sobre *M. royeri* en plantación comercial.

La investigación se llevó a cabo en la parroquia Taura, Cantón Naranjal provincia del Guayas, en una finca comercial. Las aplicaciones se iniciaron en noviembre del 2019 hasta febrero del 2020. El estudio realizado en esta plantación fue con la cepa *T. ghanense* (*C4B*) debido a su efectividad descrita en los experimentos previos. Los tratamientos aplicados en esta experimentación fueron tres, tal como se describen en la Tabla 5, la concentración usada en los bioproductos a base de la cepa benéfica fue  $1 \times 10^8$  esporas/ml. Las aplicaciones de los productos biológicos se realizaron cada quince días con una bomba de mochila manual (Fig. 5). De tal modo que las diferentes evaluaciones de los bioproductos se realizaron cada quince días utilizando la formula mencionada por Arguello 2000 (59), contando los frutos enfermos y sanos hasta los 90 días.

**Tabla 5.** Tratamientos de *T. ghanense* para aplicación en finca comercial de cacao

N° de árboles	N° tratamientos	Tratamientos
10	1	Microcápsulas lavadas de <i>T. ghanense</i> (MCP).
10	2	Solución de esporas de <i>T. ghanense</i> (S.Esp).
10	3	Control (agua).

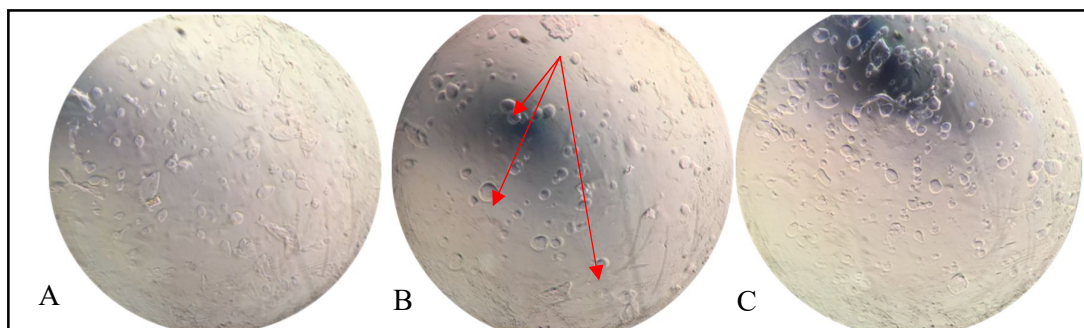
**Figura 5.** Aspersión de frutos de cacao con tratamientos de *Trichoderma* en finca comercial.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Sistema de microencapsulación en masa de *T. ghanense* y *T. reesei*.

La formulación de alginato de sodio al 1.5% y acetato de calcio 2% con las cepas benéficas se desarrollaron con éxito. Los ensayos del microencapsulamiento mostraron que las condiciones ideales para la obtención de microcápsulas fueron a una altura de aspersión de 35 cm, 120 rpm, por 30 minutos y una concentración de  $1 \times 10^8$  esporas/ml. En la figura 6 se visualiza con ayuda de microscopía las microcápsulas formadas.



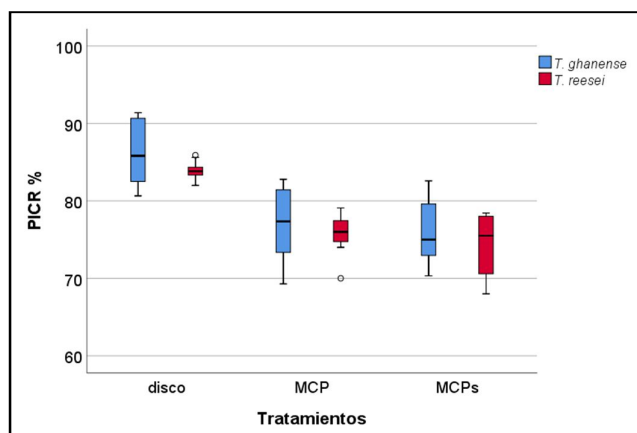
**Figura 6.** Microcápsulas a diferentes niveles, (A) 25 cm de altura, (B) 35 cm de altura capsulas formadas (flechas), (C) 45 cm de altura.

#### 3.2. Capacidad antagonista de microcápsulas de *T. ghanense* y *T. reesei* frente a *M. royeri* a nivel *in vitro*.

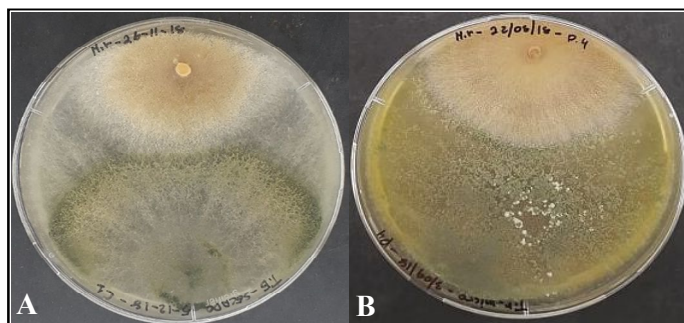
##### 3.2.1 Antagonismo

El porcentaje de inhibición del crecimiento de *M. royeri* cocultivado con *T. ghanense* en disco esporulado, microcápsulas conservadas en solución acuosa de *T. ghanense* (MCP) y microcápsulas secas de *T. ghanense* (MCPs) fue de 85.5, 74.4 y 75.9% respectivamente; mientras que para *T. reesei* fue de 83.9, 76.4, 73.8%

correspondientemente (Fig. 7). El efecto antagonista de las cepas de *T. ghanense* y *T. reesei*, mostraron un alto porcentaje de inhibición del patógeno, teniendo en cuenta que las diferencias no son significativas ( $P=0.427$ ) entre las cepas, pero si entre tratamiento de las cepas *Trichoderma* en disco esporulado ( $P=0.0001$ ). Adicionalmente, las microcápsulas secas y solución acuosa de *T. ghanense* y *T. reesei*, no sufrieron altas modificaciones a pesar de haber sido sometida a estrés del proceso (Fig. 7 y Fig. 8) fotos (Anexo 1).



**Figura 7.** Diagrama de cajas del Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Micelial (PICR) de *M. royeri* frente a *T. ghanense* y *T. reesei*, en condiciones *in vitro*, durante 10 días de evaluación.

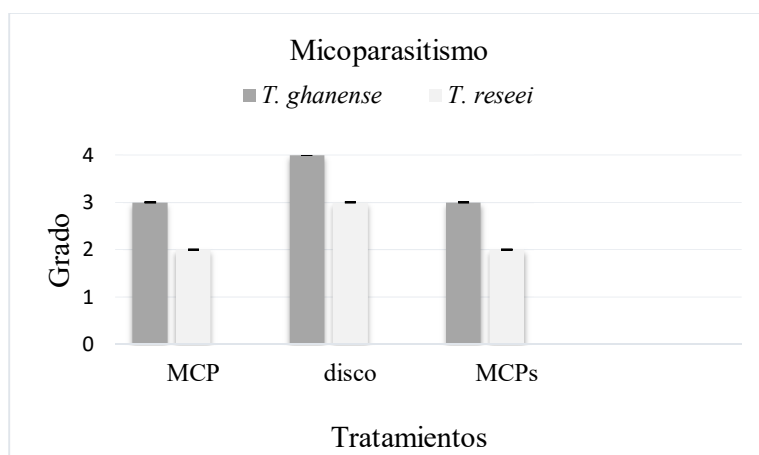




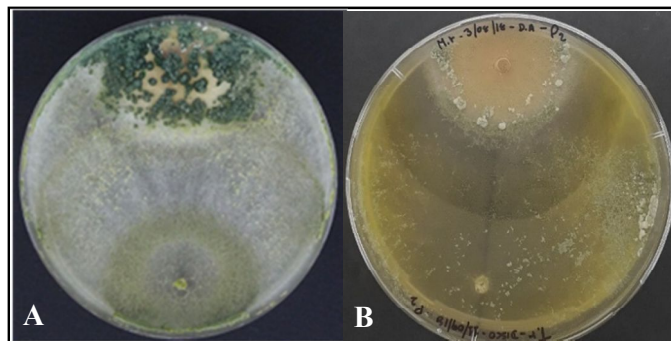
**Figura 8.** (A) Antagonismo de *T. ghanense* y (B) *T. reesei* frente al patógeno *M. royeri* en condiciones *in vitro*.

### 3.2.2 Micoparasitismo.

El tratamiento de *T. ghanense* y *T. reesei* en disco esporulado mostraron diferencia significativa ( $P=0.0001$ ), en comparación con los tratamientos MCP y MCPs. Se observó que *T. ghanense* fue mejor en el micoparasitismo sobre *M. royeri*, durante los diez días de evaluación, ya que invadió totalmente la superficie de la colonia del patógeno en condiciones de microcápsulas en solución acuosa, microcápsulas secas y en condiciones de disco y esporuló sobre ella. Por otro lado, las microcápsulas en solución acuosa y microcápsulas secas de *T. reesei*, colonizaron solo la mitad de la superficie del patógeno. Adicionalmente, la cepa de *T. reesei* en disco esporulado invadió totalmente la colonia del patógeno, pero no esporuló sobre ella. Mediante las pruebas *in vitro* se determinó que la cepa de *T. ghanense* tiene una mayor capacidad de emplear exitosamente el mecanismo de acción de micoparasitismo en contraste con la cepa *T. reesei*. (Fig. 9 y Fig.10) (Anexo 2).



**Figura 9.** Capacidad de micoparasitismo de *T. ghanense* y *T. reesei*, según la capacidad antagonista, frente al patógeno *M. royeri* en condiciones *in vitro*, durante 10 días de evaluación. El error estándar es cero para todos los tratamientos.

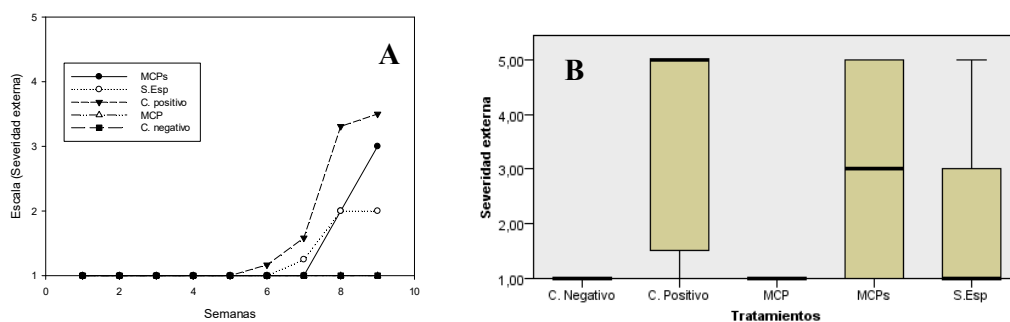


**Figura 10.** (A) Micoparasitismo de *T. ghanense* y (B) *T. reesei*, según la capacidad antagonista, frente al patógeno *M. rozeri* en condiciones *in vitro*.

### 3.3. Evaluación del control biológico de las microcápsulas en frutos de 15 días de edad.

El efecto biocontrolador de las microcápsulas secas de *T. ghanense* (MCPs) y *T. ghanense* en solución de esporas (*S.Esp*) no demostraron una alta eficacia contra *M. rozeri*, a diferencia de la solución acuosa de microcápsulas de *T. ghanense* (MCP), la cual no mostró daños externos en los frutos en el lapso de la evaluación. En el transcurso de la semana seis se presentaron síntomas que fueron desde el 1 al 25% en las mazorcas del control positivo (*M. rozeri*). (Fig. 11A). En este sentido, es notable que los síntomas externos, es decir, presencia de protuberancia en la superficie de las mazorcas, son más expresivos desde la séptima a novena semana (Fig. 12).

Finalmente, la severidad externa evaluada en la octava semana mostró que MCP obtuvo el 0% afectación según el grado cero de la escala (frutos sanos), *S.Esp* y MCPs fueron afectados entre 1-25% según el grado 1 de la escala de severidad externa, sin diferencia significativa frente al control negativo (Fig. 11B).

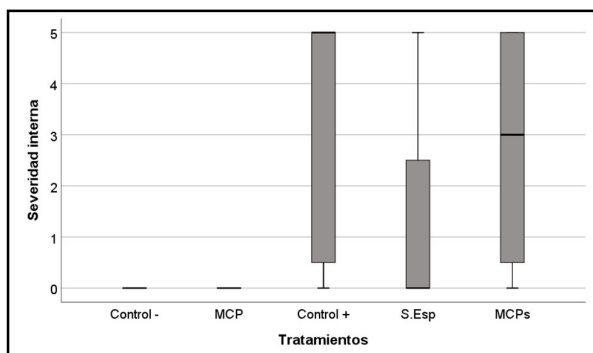


**Figura 11.** (A) Muestra el promedio de la severidad externa con tratamientos de *T. ghanense* durante nueve semanas de evaluación. (B) Diagrama de cajas de la severidad externa para los tratamientos en la semana 8. No existe diferencia significativa según Kruskal-Wallis ( $P \leq 0.94$ ).



**Figura 12.** Síntomas externos de protuberancia causados por *M. roreri*.

En cuanto a la severidad interna, los resultados ratifican que, entre los tratamientos evaluados en este estudio, las microcápsulas de *T. ghanense* y patógeno (MCP) y el control negativo presentaron el menor daño de severidad interna en los frutos (0%), con diferencia significativa respecto al control positivo (70%) ( $P=0.002$ ), según la escala de daños 0-5. Los tratamientos de *T. ghanense* S.Esp (25%), y MCPs (50%) no mostraron diferencias significativas según la escala de daño (1 – 3). En virtud de los resultados se infiere que aplicar en campo el agente antagonista en épocas tempranas, es decir, 15 días de edad del fruto puede disminuir positivamente el daño ocasionado por el patógeno (Fig. 13 y Fig. 14).



**Figura 13.** Promedio de severidad interna en la novena semana post inoculación del patógeno y antagonista.



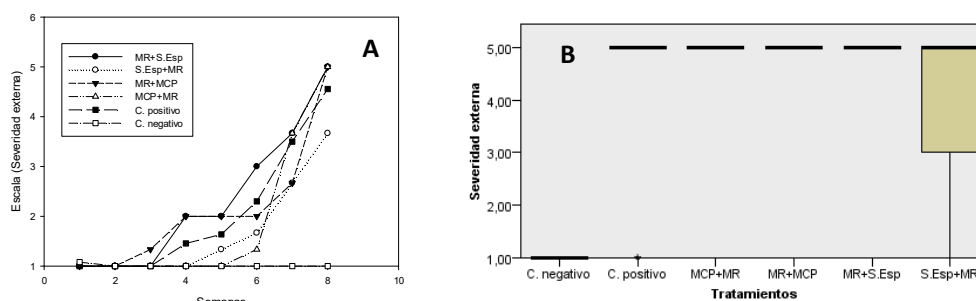
**Figura 14.** Aspecto interno de frutos de cacao inoculados con *M. royeri* y diferentes formulaciones de *T. ghanense* en frutos con 15 días de edad. (A) control negativo (agua), (B) microcápsula con solución acuosa de *T. ghanense* y patógeno (MCP), (C) solución de esporas de *T. ghanense* y patógeno (S.Esp), (D) microcápsulas secas de *T. ghanense* y patógeno (MCPs) y (E) control positivo (patógeno).

### 3.4. Evaluación del control biológico de microcápsulas con intervalos de aplicación en mazorcas de 28 días de edad.

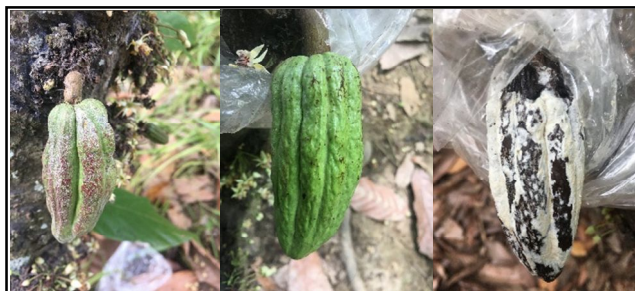
Durante la semana seis post aplicación de antagonista y patógeno, la severidad externa fue del 26.6% para el tratamiento de microcápsulas de solución acuosa de *T. ghanense* frente a *M. royeri* (MCP+MR), y el 33.2% para el tratamiento de solución de esporas (S.Esp+MR), en el caso que se aplicó primero el antagonista y luego el patógeno. Por

el contrario, cuando se aplicó primero el patógeno, la severidad externa se incrementó en un 40 y 60% en los tratamientos *M. royeri* frente solución de esporas (*MR+S.Esp*) y *M. royeri* frente solución acuosa de microcápsulas de *T. ghanense* (*MR+MCP*). Al finalizar las ocho semanas de evaluación, el daño externo estuvo entre 70-100% en todos los tratamientos (Fig. 15A), (Fig. 16).

De este modo, la severidad externa en la semana ocho mostró que los tratamientos *MR+S.Esp*, *MCP+MR*, y *MR+MCP* fueron afectados significativamente ( $P=0.03$ ) frente al control negativo, con valores entre el 26 y 75% según el grado 3 y 4 de la escala de severidad. No obstante, el tratamiento *S.Esp+MR* no fue afectado significativamente ( $P=0.620$ ) respecto al control negativo, con valores entre el 1 y 25% según el grado 2 de la escala. En consecuencia, únicamente el tratamiento solución de esporas *S.Esp+MR*, el cual incluyó primero el antagonista y después el patógeno fue menos afectados a nivel externo (Fig. 15B).

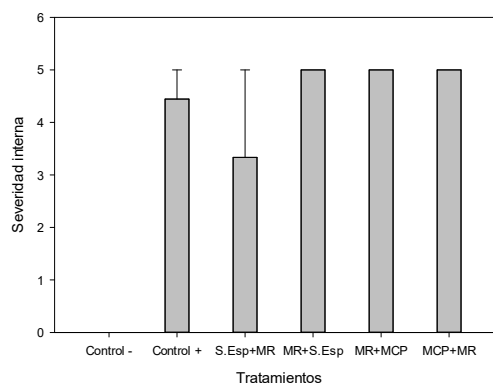


**Figura 15.** (A) Severidad externa por semana de evaluación. (B) Diagrama de cajas de la severidad externa en la semana 8 de evaluación; diferencias significativas para todos los tratamientos ( $P=0.03$ ), excepto el tratamiento con solución de esporas y patógeno (*S.Esp+MR*) según la prueba de Kruskal-Wallis ( $P=0.620$ ).



**Figura 16.** Síntomas externos causados por *M. royeri* durante la evaluación.

Según la severidad interna, los tratamientos, *MR+S.Esp*, *MCP+MR*, *MR+MCP* mostraron una afectación significativa entre 81 a 100% según la escala de daño 4-5 respecto al control negativo, mientras que *S.Esp+MR* no fue afectado significativamente, presentando daños entre 41 al 60% según el grado tres de daño frente al control negativo (Fig. 17,18). Consecuentemente los resultados nos indican que, al aplicar primero la solución de esporas a las mazorcas, la infección tiende a disminuir, considerando la edad de la mazorca al momento de realizar las aplicaciones



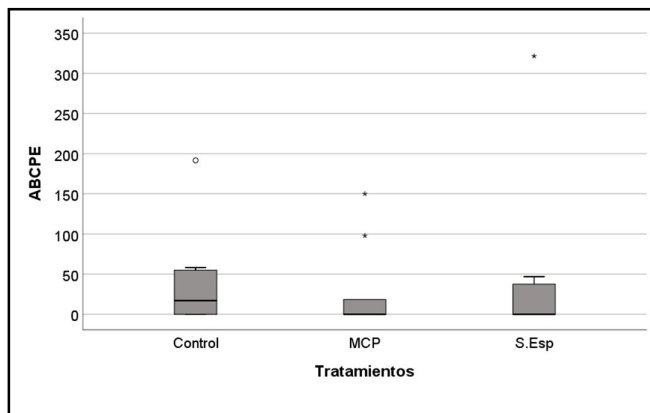
**Figura 17.** Severidad interna de frutos inoculados en combinación durante las ocho semanas de evaluación. Existe diferencia significativa de todos los tratamientos, contra el control negativo, excepto *MR+S.Esp*, según Kruskal-Wallis ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 18.** Aspecto interno de frutos de cacao inoculados con *M. royeri* en frutos con 28 días de edad. (A) Control negativo (agua), (B) Tratamiento de la interacción de la solución de esporas de *T. ghanense* y patógeno (*S.Esp+MR*), (C) Microcápsulas en solución acuosa de *T. ghanense* y patógeno (*MCP+MR*), (D) Patógeno y Microcápsulas secas de *T. ghanense* (*MR+MCP*), y (E) Control positivo (MR).

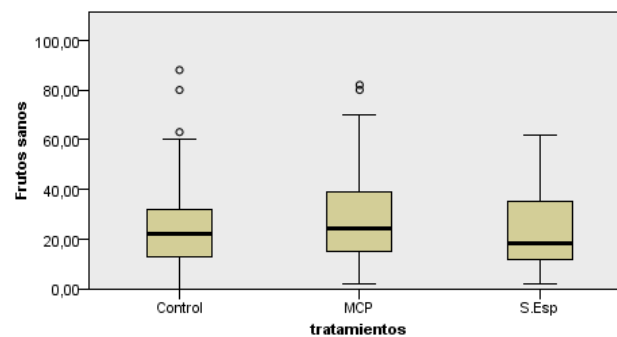
### 3.5 Análisis del control biológico de las microcápsulas de *T. ghanense* en una plantación comercial.

Durante la evaluación de la actividad de control biológico de las microcápsulas en condiciones de campo, los valores altos corresponden a los tratamientos mayormente afectados según el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (*ABCPE*). En este sentido, las aplicaciones de la solución líquida de microcápsulas de *T. ghanense* (*MCP*) y solución de esporas (*S.Esp*) no disminuyeron significativamente la incidencia de la enfermedad, respecto al tratamiento control (agua) (Fig. 19).



**Figura 19.** Promedio de la incidencia de la enfermedad mediante el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) durante los 90 días de evaluación, no presenta diferencia significativa entre los tratamientos, según prueba de Kruskal-Wallis ( $P \leq 0.05$ ).

Adicionalmente, con las aplicaciones realizadas, el número de mazorcas sanas en los tratamiento de solución líquida de microcápsulas (*MCP*) y solución de esporas (*S.Esp*) de *T. ghanense*, además del control fueron de 98.84, 81.73 y 90.92, respectivamente. Estos resultados no mostraron diferencias significativas ( $P=0.198$ ) entre tratamientos de acuerdo con el diagrama de cajas (Fig. 20).



**Figura 20.** Número de mazorcas sanas durante 90 días de evaluación. No existe diferencia significativa según la prueba de Kruskal Wallis (0.05).



## CAPITULO 4

### DISCUSIÓN

#### **4.1. Microencapsulación de *T. ghanense* (C4B) y *T. reesei* (C2A) basado en la técnica de atomización.**

El proceso de encapsulación o microencapsulación ha sido estudiado y aplicado en diferentes microorganismos, es así que la microencapsulación de *Lactobacillus plantarum* mejoró su viabilidad utilizando un método de gelificación iónica externa, con tres materiales de recubrimiento para microencapsular: 2% de alginato (Al), 1% de alginato / 1% de goma gellan (Al-GG) y 1,5% de alginato/ 3% de goma arábica (Al-GA) mediante un atomizador, mostrando mejorías en la estabilidad de almacenamiento de las células, siendo una excelente alternativa en el caso de brindarle protección a probióticos (56).

En este sentido, el escalamiento iniciado en las condiciones del centro se generó como resultado la combinación de 1,5% de alginato y 2% de acetato de calcio, una altura de aspersión de 35 cm, 120 rpm, por 30 minutos y la concentración de esporas de  $1 \times 10^8$  esporas/ml, para una óptima formación de microcápsulas. Considerando que la viscosidad proporcionada por el alginato contribuye en el tamaño y forma de las microcápsulas, documentando que la mejor concentración fue al 1% (60). No obstante, en este estudio el alginato de sodio al 1,5% también fue óptimo para las microcápsulas. Por otro lado, el uso de acetato de calcio dentro de la formulación para las microcápsulas proporciona durabilidad y consistencia, como menciona Castillo et al (2017), la concentración ideal de acetato de calcio fue al 2% en la microencapsulación de *L. plantarum* contribuyendo a la estabilidad y durabilidad del probiótico encapsulado a lo largo del tiempo, lo cual es similar a lo determinado en este estudio. Igualmente, durante la microencapsulación de *Bacillus* spp., proporcionó un 97.47% en viabilidad además de estabilidad, durabilidad a la cepa benéfica durante tres meses de almacenamiento (61).

Castillo et al, (2007) prepararon varias concentraciones 0.5, 1, y 2%, mostrando que la mejor concentración fue al 1%, no obstante, en este estudio el alginato de sodio al 1,5% también fue óptimo para las microcápsulas (60). Así también Muñoz (2015) desarrolló microcápsulas utilizando 20 ml del extracto de *Trichoderma asperellum*, lo cual consistió en una mezcla con 80 ml de alginato de sodio al 2% esterilizados previamente, y se dejaron en agitación por 15 min, y se asperjó sobre un recipiente que contenía Cloruro de Calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) al 2%, formándose las microcápsulas de forma instantánea (62).

El uso del acetato de calcio es muy importante para la durabilidad y consistencia de la microcápsula. En México las microcápsulas de alginato con matriz probiótica para la encapsulación de la *L. plantarum* mostró que la concentración ideal de  $\text{CaCl}_2$  es al 0.1M, mientras que este estudio manifestó buenas condiciones de las microcápsulas a 2% de acetato de calcio (60). Además, en este trabajo las esporas de *Trichoderma* en microcápsulas lavadas y secas tienen una viabilidad de cuatro meses según el tiempo evaluado. Esto se relaciona con los resultados obtenidos en la evaluación de la estabilidad y viabilidad de cepas probióticas (*Bacillus* spp.) durante tres meses de almacenamiento, mostrando que se mantuvo el 97.47% de viabilidad de forma constante (61). Anteriormente se ha estudiado la actividad antagónica de *Trichoderma* para estimar su efectividad frente a *P. capsici* mediante la obtención de microcápsulas con extractos (MCE), los resultados han mostrado que las cepas T10 y T31 inhibieron al patógeno a nivel *in vitro*, además las microcápsulas estimularon el crecimiento en plantas evaluadas. Esto coincide con este estudio ya que las microcápsulas en solución acuosa de *T. ghanense* ejercieron efecto antagónico.

#### 4.2. Capacidad antagonista de microcápsulas de *T. ghanense* (C4B) y *T. reesei* (C2A) frente a *M. royeri* a nivel *in vitro*.

Especies del género *Trichoderma* han sido calificadas como un agente de control biológico de enfermedades como *M. royeri* y *M. pernicioso* tanto en condiciones *in vitro* e *in vivo* en diferentes lugares geográficos (71, 75). Dado que *Trichoderma* sp., presenta gran potencial antagónico sobre el crecimiento micelial, al competir por espacio con el hongo fitopatógeno (65). Adicionalmente, *T. asperellum* co-encapsulado con quitosano mostró un PIC de 40% frente a *M. royeri*, superior al control sin encapsular, evidenciando ventajas favorables para aplicaciones en campo (13). Asimismo, la cepa de *T. harzianum* creció rápidamente superando el crecimiento del patógeno *Fusarium oxysporum*, mostrando un porcentaje de inhibición mayor al 50% (68).

En este sentido, según Mejía & Alvarado (2016), *Trichoderma* spp., mostró un rango de entre 40.13 a 46.77% de PICR contra cuatro aislados de *M. royeri* (69). En este estudio, quedó evidenciado que *T. ghanense* (C4B) y *T. reesei* (C2A) en microcápsulas obtuvieron el 77,4 y 76.4% de inhibición de crecimiento frente a *M. royeri*, lo que sugiere capacidad para controlar el patógeno a nivel *in vitro*, convirtiéndolas en cepas candidatas para el control biológico de enfermedades.

Por otra parte, los efectos del micoparasitismo de *Trichoderma* frente *M. royeri* han demostrado una deformación de las hifas del patógeno, a causa de esta acción de la cepa benéfica el patógeno no fue capaz de crecer al ser replantado nuevamente (65). En este contexto, se determinó que las microcápsulas de la cepa de *T. ghanense* produce una invasión total de la superficie de la colonia del hongo fitopatógeno *M. royeri*. Únicamente *T. ghanense* creció y esporuló sobre el patógeno; sin embargo, las cepas mostraron diferencias no significativas entre ellas. Del mismo modo, en investigaciones previas mencionan que las cepas de *Trichoderma* spp., colonizan, enrollan y parasitan hifas de *Moniliophthora* spp, y *Phytophthora* spp, como mecanismos para el biocontrol (70,71). Adicionalmente, cepas de *Trichoderma* han

mostrado que ejercen antagonismo mediante los mecanismos de acción antibiosis y micoparasitismo frente a *P. infestans*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora* spp., *Rosellinia* spp, *F. oxysporum*, provocando la lisis del micelio de los patógenos (81,83).

Por otro lado, se ha evidenciado que microorganismos (*e.g. Lactobacillus delbrueckii*) sin encapsular pierde su viabilidad a los 180 minutos de exposición del ambiente (6). No obstante, las pruebas *in vitro* realizadas en este trabajo demostraron la eficacia de las cepas de *T. ghanense* y *T. reesei*, esto a pesar de haber pasado por el estrés generado por el proceso de microencapsulamiento; En este sentido, es probable que la viabilidad disminuya en cierto porcentaje, pero las cepas se crecieron y generaron biocontrol frente a al patógeno inclusive logrando crecer sobre ella.

#### **4.3. Evaluación del control biológico microencápsulas de *T. ghanense* (C4B) frente a *M. royeri* en condiciones *in vivo*.**

##### **4.3.1. Biocontrol de *T. ghanense* frente a *M. royeri* en frutos de cacao con 15 días de edad.**

La evaluación antagónica de *Trichoderma* spp., y *Bacillus* spp., contra *M. royeri* en campo ha mostrado que *Trichoderma* disminuyó la severidad interna en un 28% y la severidad externa en un 19.5% del patógeno respecto al control (75). En efecto, Howel (2003) determinó que el potencial enzimático de *Trichoderma* spp., el cual puede detener infecciones de patógenos, por medio de la secreción de más de setenta metabolitos relacionados al control biológico de enfermedades (76). Por otro lado, la cepa de *Trichoderma* H20, H5 y la cepa B3 de *Bacillus* spp., lograron disminuir la infección en campo (77). Otros estudios revelan que los síntomas de la enfermedad se presentaron en las semana seis con la aplicación de *Trichoderma* spp., en campo (80).

Resultados similares se obtuvieron en esta investigación los síntomas externos, es decir la protuberancia observada en la superficie de las mazorcas, se manifestaron en la

semana seis, los cuales fueron más expresivos a partir de la semana siete. Resultados similares fueron obtenidos por Evans y Phillips (2007), quienes expresaron que los síntomas del patógeno se expresan entre 40-60 días (16, 23 ,83).

Además, los resultados obtenidos en este trabajo usando la solución líquida de microcápsulas (*MCP*) obtuvieron el 0% afectación según grado de cero de la escala (frutos sanos); mientras el tratamiento con solución de esporas de *T. ghanense* (*S.Esp*) y las microcápsulas secas de *T. ghanense* (*MCPs*) fueron afectados entre 1 y 25% según el grado 1 y 2 de la escala de severidad externa, pero únicamente el control positivo fue afectado a significativamente ( $P=0.0001$ ) en relación con el control negativo. Este resultado coincide con la aseveración de que un antagonista reduce la capacidad de *M. royeri* para infectar el tejido vegetal y provocar la enfermedad (80). Dado que las cepas de *Trichoderma* spp., poseen alta actividad de competencia frente a *M. royeri*, impidiendo su crecimiento en el mismo sustrato (81).

Adicionalmente, como resultado de la severidad interna de la mazorcas analizadas presentaron una afectación entre el 0, 25 y 50% en los tratamientos *MCP*, *S.Esp* y *MCPs* respectivamente; según la escala de daño (1 - 3), indicando una ausencia de diferencia significativa respecto al control negativo. En consecuencia, el resultado sugiere que al incluir agente de control biológico en mazorcas con 15 días de edad puede disminuir casi en su totalidad los daños, así como bajar la incidencia dentro del patógeno dentro de la plantación. Resultados similares fueron obtenidos por Villamil et al, (2015), donde el tratamiento *Trichoderma* H20 obtuvo el menor porcentaje de daño interno (77.5%), seguido de *Trichoderma* H5 (85.2%), bacteria B3 (88%); y el testigo un 96.5% (75).

Es posible que los efectos de severidad (0-50%) en los frutos se deban a variantes de precipitación y temperatura de la zona. Si bien es cierto que las condiciones óptimas para el desarrollo de *M. royeri*, es con precipitaciones entre 780 y 5.500 mm y temperatura media anual entre 18.6 - 28°C y 89% de humedad relativa (82). Virgen de

Fátima que fue la zona donde se realizó el experimento, tiene precipitaciones dentro del rango favorable para el patógeno, con precipitaciones entre 1000 - 1600mm anual y entre 26°C y 27°C de temperatura (83). Las evidencias anteriores definen que el manejo de *M. rozeri* mediante control biológico, debe realizarse desde la temprana edad del fruto (15 días).

#### **4.3.2. Biocontrol de *T. ghanense* y *M. rozeri* en frutos de cacao con 28 días de edad.**

Durante las diferentes aplicaciones de los productos biológicos, cuando se realizó en primer lugar la aspersión del benéfico tanto en microcápsulas como en solución de esporas y cinco días después el patógeno (*MCP+MR - S.Esp+MR*), las mazorcas fueron afectadas en un rango que fue del 1 al 25% según el grado 2 de la escala de daño externo. Por el contrario, cuando se aplicó en primero el patógeno (*MR*) y cinco días después los productos en base al antagonista, la severidad externa se incrementó en un rango del 26 al 75% (*MR+ MCP* y *MR+ S.Esp*), en general al finalizar las ocho semanas de evaluación, el daño externo osciló entre 70-100% de daño externo en todos los tratamientos. Similarmente Villamil et al (2016) reportaron que productos a base de cepas de *Trichoderma* comerciales en comparación con un fungicida obtuvieron baja efectividad (84).

No obstante, Sánchez (2012) indicó que el antagonismo de las especies *T. viride* y *T. harzianum* reducen el efecto de *M. rozeri* entre el 21.5 y 19.3% con relación al control (85). Estos resultados se debe a que las especies del género *Trichoderma* evita el desarrollo del patógeno al competir por alimento, disminuyendo su capacidad de enfermar los frutos, incluyendo la producción de enzimas como la endogluconasas, Trichodermina, viridina, celobiasas, que adquieren potencial antifúngico (86). Además, se ha comprobado la actividad de control biológico de *Trichoderma* spp., ante patógenos como *Rhizotocnia solani*, *S. rolfsii*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium* spp, *Phytophthora* spp. (58, 80, 81).

Si bien es cierto que en este estudio la severidad externa fue alta hasta finalizar las ocho semanas de evaluación, es probable que esto se deba a la interacción antagónica de *Trichoderma*, ya que pueda variar en su mecanismo de acción, lo cual depende del patógeno, aislamiento y condiciones ambientales (86). Además, la enfermedad se ve incrementada en los inicios de lluvia, esto podría favorecer al desarrollo del patógeno, considerando que las esporas de *M. royeri* requieren agua para germinar (79), ya que el presente estudio incluyó un mes de lluvia (enero) lo cual probablemente haya provocado el incremento la severidad de la enfermedad (88).

En contexto, la severidad interna en este estudio manifiesta que los tratamientos del control positivo, *MR+S.Esp*, *MCP+MR* y *MR+MCP* fueron más afectados (81-100%) según la escala de daño (4-5), mientras que el tratamiento con solución de esporas *S.Esp+MR* no fue afectado significativamente (41-60%) según el grado 3, pero presentó daños internos. De manera similar Bateman (2005), señaló que *Clonostachys byssicola* y *T. asperellum* junto con dos fungicidas (bitertanol y triadimeno) no disminuyeron los síntomas del patógeno *M. royeri* en condiciones de campo (89).

Además, se conoce que la infección del patógeno se realiza en periodos de 2 - 3 meses de edad del fruto (90). Similar a los resultados obtenidos en este estudio que se desarrolló con frutos de 28 días de edad, los síntomas fueron visibles a partir de la semana seis posts inoculación, esto resulta un tiempo de 2 meses o más para la manifestación de síntomas externos. De este modo, es probable que la edad del fruto (28 días) sea vital en la magnitud de daños. En consecuencia, según los resultados la infección es disminuida cuando los frutos son más pequeños (15 días), y los daños son expresivos a partir de la semana seis, lo cual sugiere que la aplicación de las microcápsulas de *T. ghanense* sean a partir de los quince días después de la formación del fruto para un manejo biológico de la enfermedad en campo.

Por último, el tercer experimento realizado en una finca comercial mediante la aspersión con bomba de mochila sobre frutos de cacao; la incidencia según el ABCPE

indicó que el tratamiento *de MCP* y *S.Esp* no mostraron diferencia significativa respecto al control, lo cual difiere con lo reportado por Villamil et al., (2015), donde según el ABCPE el hongo *Trichoderma* mostró mejor efecto antagónico contra *M. royeri* (85). De igual forma en este trabajo, el número de frutos sanos no fue significativo en ninguno de los tratamientos ( $P=0.198$ ). Cabe mencionar que inicialmente la incidencia de la enfermedad fue mínima, lo cual podría explicar la baja afectación de los frutos aún en el tratamiento control (91).



## Conclusiones

La microencapsulación los agentes de control biológico *T. ghanense* y *T. reesei*, con alginato de sodio y acetato de calcio, se determinó que las condiciones ideales fueron a 120 rpm, por 30 minutos, a una altura de 35 cm y una concentración de spora por  $1 \times 10^8$ , para una adecuada uniformidad de las microcápsulas.

La solución líquida de microcápsulas y las microcápsulas secas de *T. ghanense* (C4B) y *T. reesei* (C2A), no sufrieron altas modificaciones a pesar de haber sido sometida a estrés físico y químico en el proceso, siendo conveniente la utilización de estos, como control biológico, en la inhibición del hongo patógeno *M. royeri* (MR59).

Las microcápsulas lavadas y secas de *T. ghanense* y *T. reesei* tiene un nivel de micoparasitismo aceptable desde el punto de vista de biocontrol, indicando que estas cepas pueden actuar como agentes de control biológico del hongo patógeno *M. royeri* llevando ciclos constantes de aplicaciones.

En condiciones de campo, las microcápsulas de *T. ghanense* tiene un mayor antagonismo ante *M. royeri*, aun cuando se aplicó el patógeno junto con el antagonista en mazorcas de 15 días de edad.

En la aplicación de combinaciones patógeno-antagonista y antagonista-patógeno en mazorcas de 28 días de edad, casi todos los tratamientos fueron afectados (81-100%), excepto el tratamiento de solución de esporas (*S.Esp*), los daños fueron menores a 60%. Se sugiere que la aplicación de microcápsulas de *T. ghanense* debe realizarse quince días después de la formación de los frutos.

Con tres aplicaciones de microcápsulas de *T. ghanense* cada quince días, mediante aspersión de bomba sobre plantaciones de cacao, no se obtuvieron mayores cantidades de frutos sanos en finca comercial.

### Recomendaciones

1. Evaluar condiciones de microencapsulado a concentraciones superiores de  $1 \times 10^{10}$  esporas/ml de *Trichoderma* para evaluar su efectividad en campo en diferentes condiciones ambientales del cultivo.
2. Encapsular las cepas *T. ghanense* y *T. reesei* en conjunto y probar su antagonismo y micoparasitismo en condiciones *in vitro* e *in vivo*.
3. Evaluar la capacidad de adherencia de las microcápsulas post aplicación en campo.
4. Replicar los ensayos *in vivo* en diferentes edades del fruto (15, 30, y 45 días) y en épocas distintas del año.

### Bibliografía

1. Arvelo M, Rivera J, Delgado T, Maroto S, Higuera I. Estado actual sobre la producción y el comercio del cacao en América. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). 2016. 1-79 p.
2. ANECACAO. Historia del Cacao en Ecuador [Internet]. 2015. p. 4. Available from:<http://www.anecacao.com/index.php/es/noticias/el-cacao-ecuatoriano.html>.
3. Villamil Carvajal Jorge Enrique, Jorge Orlando Blanco Valbuena SEVR. In vitro evaluation of Native Microorganisms for their Antagonism against *Moniliophthora roreri* Cif & Parin Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *FacNalAgrMedellín*. 2012;65(1):6305–15.
4. Smeltekop Hugh, Almanza Loza MM. Evaluación de la capacidad biocontroladora de cepas nativas de *Trichoderma* spp sobre *Rhizoctonia* sp y *Fusarium* sp en café (*Coffea arabica*) en condiciones experimentales. *J Selva Andin*. 2011;2–34.
5. Peláez-Álvarez , Sergio de los Santos-Villalobos, Enrico A. Yépez FIP-C y RTR. contra *Colletotrichum gloeosporioides* ( Penz .)\* Synergistic effect of *Trichoderma asperelleum* T8A and captan 50 ® against *Colletotrichum gloeosporioides* ( Penz .) Resumen Introducción. 2016;7:1401–12.
6. Cuello REG, Mendoza JP, Alcázar LBM. Efecto de la microencapsulación sobre la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* sometido a jugos gástricos simulados. *Inf Tecnol*. 2015;11–6.
7. Argumedo-Delira R, Alarcón A, Ferrera-Cerrato R, Peña-Cabriales JJ. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. Vol. 25, *Rev. Int. Contam. Ambient*. 2009.
8. Solórzano Chavez E, Nicklin C, Amores Puyutaxi F, Jiménez Barragan J, Barzola Miranda S. Comparación sensorial del cacao (*Theobroma cacao* L.) Nacional fino de aroma cultivado en diferentes zonas del Ecuador. *Cienc y Tecnol*. 2015 Dec 18;8(1):37–47.
9. ProEcuador. Análisis del sector cacao y elaborados 2013 contenido [Internet]. 2013 [cited 2020 Jul 12]. Available from: [http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2016/06/PROEC\\_AS2013\\_CACAO.pdf](http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2016/06/PROEC_AS2013_CACAO.pdf).
10. Reyes, Figueroa; Carlos F Ortiz; Magdiel Torres-de la Cruz LL-E. *Trichoderma* species from the cacao agroecosystem with biocontrol potential of *Moniliophthora roreri*. 2016 [cited 2020 Jul 12]; Available from: [https://www.researchgate.net/publication/301717832\\_Trichoderma\\_species\\_from\\_the\\_cacao\\_agroecosystem\\_with\\_biocontrol\\_potential\\_of\\_Moniliophthora](https://www.researchgate.net/publication/301717832_Trichoderma_species_from_the_cacao_agroecosystem_with_biocontrol_potential_of_Moniliophthora)

roreri.

11. Adzmi F, Meon S, Musa MH YN. Preparation, characterisation and viability of encapsulated *Trichoderma harzianum* UPM40 in alginate-montmorillonite clay. *J Microencapsul.* 2012;29(3):205–10.
12. Jin X, Custis D. Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. *Biol Control.* 2011;56(2):202–8.
13. Carrera Navarrete Ludwing Alexander. Universidad San Francisco De Quito (USFQ) Colegio de Ciencias de la Salud [Internet]. Universidad San Francisco de Quito; 2017. Available from: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6805/1/134853.pdf>.
14. Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts [Internet]. Vol. 2, *Nature Reviews Microbiology.* *Nat Rev Microbiol*; 2004 [cited 2020 Jul 12]. p. 43–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15035008/>.
15. Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL, Lorito M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biol Biochem.* 2008;.
16. Chet I, Harman GE, Baker R. *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microb Ecol.* 1981 Mar;7(1):29–38.
17. Mäntylä M, Paloheimo M, Suominen P. Industrial mutants and recombinant strains of *Trichoderma reesei*. In: *Trichoderma and Gliocladium.* Taylor and Francis Inc; 1998.
18. Kucuk C MK. In vitro antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. Department of Biology, Faculty of Science, Anadolu University 26470 Eskiflehir - TURKEY. 2004.
19. Nico AI, Bello D, Alippi H. Efecto de la adición de enmiendas orgánicas al suelo sobre la capacidad patogénica de *Rhizoctonia solani*: ii. micoflora asociada y antagonismo In Vitro de los aislados más frecuentes. 2005.
20. Vemmer M, Patel A V. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biol Control.* 2013;67(3):380–9.
21. Wandrey C, Bartkowiak A, Harding SE, Wandrey C, Bartkowiak A, Harding SE, et al. *Materials for Encapsulation.* Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Laboratoire de Médecine Régénérative et de Pharmacobiologie, Station 15, CH-1015, Lausanne, Switzerland. 2010.
22. Cuenca-Cuenca EW, Puentes-Páramo YJ, Menjivar-Flores JC. Efficient use of nutrients in fine aroma cacao in the province of Los Ríos-Ecuador. *Rev Fac Nac Agron Medellin.* 2019 Sep 1;72(3).
23. ANECACAO. Cacao Nacional | Anecacao Ecuador. [Internet]. 2019. Available

from: <http://www.anecacao.com/uploads/estadistica/cacao-ecuador-2019.pdf>.

24. Correa Álvarez J, Castro Martínez S, Coy J. Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia Biology stage of *Moniliophthora roreri* in Colombia. 2014.
25. Evans HC, Holmes KA, Reid AP. Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. Vol. 52, Plant Pathology. 2003.
26. Evans HC. Symposium Cacao Diseases: pustules.
27. Evans HC, Holmes KA, Reid AP. Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. Vol. 52, Plant Pathology. 2003 Aug.
28. Evans HC, Bastos CN. Basidiospore germination as a means of assessing resistance to *Crinipellis pernicioso* (witches' broom disease) in cocoa cultivars. Trans Br Mycol Soc. 1980 Jun;74(3):525–36.
29. Navarro Prado Melba IMA. Cultivo del Cacao en Sistemas Agroforestales. 2006.
30. Phillips-Mora W, Cawich J, Garnett W, Aime MC. First report of frosty pod rot (moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Belize. Vol. 55, Plant Pathology. 2006 Aug.
31. Zambrano A. *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. en el cultivo de cacao *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. in the crop of cocoa. 2012.
32. Mora SFD, Fiallos GRF. in the Crop of Cocoa. In 2012. p. 249–58.
33. Evans H.C. et al. *Moniliophthora roreri* (frosty pod rot). Detailed coverage of invasive species threatening livelihoods and the environment worldwide. 2007;16–22.
34. Krauss, U.; Martijn ten Hoopen, G.; Hidalgo, E.; Martínez, A.; Estribo, T.; Arroyo C. El efecto de la enmienda de la melaza de caña en el biocontrol de la podredumbre helada (*Moniliophthora roreri*) y la vaina negra (*Phytophthora* spp.) Del cacao (*Theobroma cacao*) en Panamá. 2006.
35. Ochoa Fonseca, Ramírez Lyda Esperanza, González Sandra Isabel, López, Báez, Ramírez Orlando Espinosa, Zaragoza S, Alvarado Gaona ÁE, Siman. Á. Control in vivo de *Moniliophthora roreri* en *Theobroma cacao*, utilizando polisulfuro de calcio y silicosulfocálcico. Cienc y Agric. 2017 Aug 10;14(2).
36. Suárez Yeirme Jaimes HFA. Manejo de las Enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*). 2010.

37. Crespo del Campo E, Crespo Andía F. Cultivo y beneficio del cacao CCN51. Editorial el Conejo; 1997. 136 p.
38. Correa Álvarez J, Castro Martínez S, Coy J. Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia Biology stage of *Moniliophthora roreri* in Colombia. 2017.
39. Torres de la Cruz, Ortiz García C.F, Téliz Ortiz D, Mora Aguilera A NDC. Temporal progress and integrated management of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) of cocoa in Tabasco, Mexico. 2011;31–36.
40. Jaimes Suárez Yeirme HAF. Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma Cacao L*) en Colombia, con énfasis en *Monilia (Moniliophthora Roreri)*. Microbióloga MSc Investig Corpoica, EE La Suiza. 2010;2–34.
41. Johnson A, Castillo A, Leon L. Manual de manejo y producción del cacaotero. 2008.
42. Solís Bonilla José Luis, Zamarripa Colmenero Alfredo, Pecina Quintero Víctor GRE y HGE. Evaluación agronómica de híbridos de cacao (*Theobroma cacao L.*) para selección de alto rendimiento y resistencia en campo a moniliasis. 2015;6.
43. Pico R. J, Calderón Peña ED, Fernández A. F, Díaz M. A. Repositorio Digital INIAP: Guía del manejo integrado de enfermedades del cultivo de cacao (*Theobroma cacao L*) en la amazonía. 2012.
44. Jaime ACP, Montserrat R rez S, Vladimir S nchez L pez, Mario R rez L. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* VSL291 on phytopathogenic fungi isolated from cocoa (*Theobroma cacao L.*) fruits. African J Biotechnol. 2011 Sep 12;10(52):10657–63.
45. Hui TS. Morphological characterization and sequence analysis of 5.8s-its region of *Trichoderma* species. 2013.
46. Geraldine AM, Lopes FAC, Carvalho DDC, Barbosa ET, Rodrigues AR, Brandão RS, et al. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. Biol Control. 2013 Dec;67(3):308–16.
47. Ruano-Rosa D, Del Moral-Navarrete L, López-Herrera CJ. Estudio de temperaturas de crecimiento In Vitro en aislados de *Trichoderma* sp. y de *Rosellinia necatrix*. evaluación del antagonismo mediante cultivos duales. 2003.
48. Sivan A, Chet I. Degradation of Fungal Cell Walls by Lytic Enzymes of *Trichoderma harzianum*. Microbiology. 1989 Mar 1;135(3):675–82.
49. Martínez B, Reyes Y, Infante D, González E, Baños H, Cruz A. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. Candidatos a biofungicidas para el control de

- Rhizoctonia sp. En arroz selection of Trichoderma spp. Isolate candidates to biofungicides for the control of Rhizoctonia sp. On rice. Rev. Protección Veg. 2008.
50. Reyes Y, Martínez B, Infante D. Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de Trichoderma spp. Sobre Rhizoctonia sp. Rev. Protección Veg. 2008.
  51. Patel V y. Impact of the biological control agent, *Laricobius nigrinus*, on hemlock woolly adelgid sistens generation and their ovisacs in the eastern United States. Biol Control. 2013;67(3).
  52. Connick WJ. Formulation of Living Biological Control Agents with Alginate. Springer Link. 1988.
  53. INESCOP. Técnicas de Microencapsulación. 2016; Available from: <https://www.inescop.es/es/investigacion/microencapsulacion>.
  54. Jaeger I.E, Providencia, Rouhier D. Co-entrapment of *Trichoderma harzianum* and *Glomus* sp. within alginate beads: Impact on the arbuscular mycorrhizal fungi life cycle. Journal of Applied Microbiology. 2011.
  55. Locatelli GO, dos Santos GF, Botelho PS, Finkler CLL, Bueno LA. Development of *Trichoderma* sp. formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life. Biol Control. 2017;117.
  56. Chun H, Kim CH, Cho YH. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* DKL 109 using external ionic gelation method. Korean J Food Sci Anim Resour. 2014 Oct 1;34(5):692–9.
  57. Insuasty CE, Acosta Rodríguez J, Salazar González C, García CB. Sanidad vegetal y protección de cultivos artículo de investigación científica y tecnológica. Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu. 2014.
  58. Ezziyyani M, Pérez Sánchez C, Requena E, Sid A, María A&, Candela E, et al. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. An Biol [Internet]. 2004 [cited 2020 Mar 25];26:61–8. Available from: <https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/07-EVALUACION.pdf>.
  59. Arguello. Manejo integrado de la monilia en cacao (*Theobroma cacao* L.). pp. [Internet]. 2000. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000066&pid=S0304-2847201500010000500002&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000066&pid=S0304-2847201500010000500002&lng=en).
  60. Castillo S.L, Alvarado J.M, Baez J.G, Macías E, Ramírez-Baca P, Candelas-Cadillo Ma.G GCT. Diseño de microcápsulas de alginato con matriz prebiótica de aloe vera para la encapsulación de *Lactobacillus plantarum*. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2017.

61. Cayra E, Dávila JH, Villalta JM, Rosales Y. Evaluación de la Estabilidad y Viabilidad de Dos Cepas Probióticas Microencapsuladas Evaluación de la Estabilidad y Viabilidad de Dos Cepas Probióticas Microencapsuladas por Lecho Fluidizado. Departamento de I&D, Empresa Camarones S.A.C., Carretera Salamanca km 04, Tumbes, Perú. (e-mail: 2017).
62. Muñoz González YL. Microencapsulación de extractos de *trichoderma asperellum*, y su efecto sobre *phytophthora capsici* en el desarrollo de plantas de chile pimiento (*capsicum annum*) [Internet]. [Saltillo, México]: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2015 [cited 2020 Jul 13]. Available from: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/43315>.
63. Hebbar PK. Cacao diseases: A global perspective from an industry point of view. *Phytopathology*. 2007 Dec;97(12):1658–63.
64. Bailey B, Bae H, Crozier J, Thomas S, Samuels G, Vinyard B, et al. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*. 2008;2(22–333).
65. Suárez, Cabrales2 CP. Identificación de especies de cepas nativas de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. y evaluación de su potencial antagonista in vitro frente al hongo fitopatógeno nativo *Moniliophthora roreri* en el departamento de Norte de Santander. 2008;(1):12.
66. Krauss U, Hidalgo E, Bateman R, Adonijah V, Arroyo C, García J, et al. Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical agents against frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in cocoa (*Theobroma cacao*). *Biol Control*. 2010;54:230–40.
67. Medeiros FH V, Pomella AW V, De Souza JT, Niella GR, Valle R, Bateman RP, et al. A novel, integrated method for management of witches' broom disease in Cacao in Bahia, Brazil. *Crop Prot*. 2010;1–8.
68. Fernández B y CL. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. 2009;6.
69. Mejía Betancourt F de los Á, Alvarado Rodríguez RY. Evaluación in vitro de hongos nativos antagonistas de *Moniliophthora roreri* (Cif. & Par., Evans et al.,) en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). 2016;6.
70. Loguercio LL, de Carvalho AC, Niella GR, De Souza JT, Pomella AWV. Selection of *Trichoderma stromaticum* isolates for efficient biological control of witches' broom disease in cacao. *Biol Control*. 2009 Oct 1;51(1):130–9.
71. Mejía LC, Rojas EI, Maynard Z, Bael S Van, Arnold AE, Hebbar P, et al. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biol*

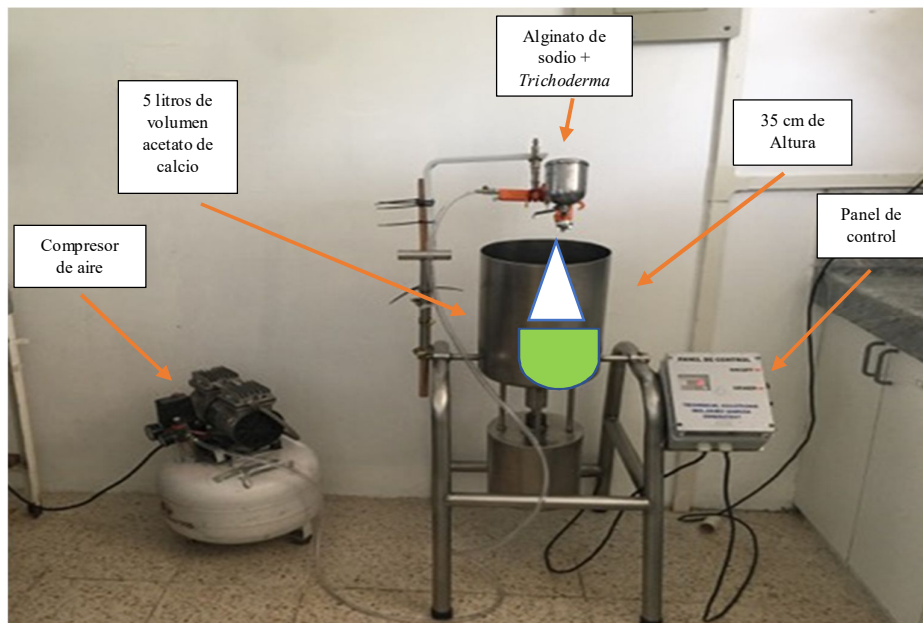


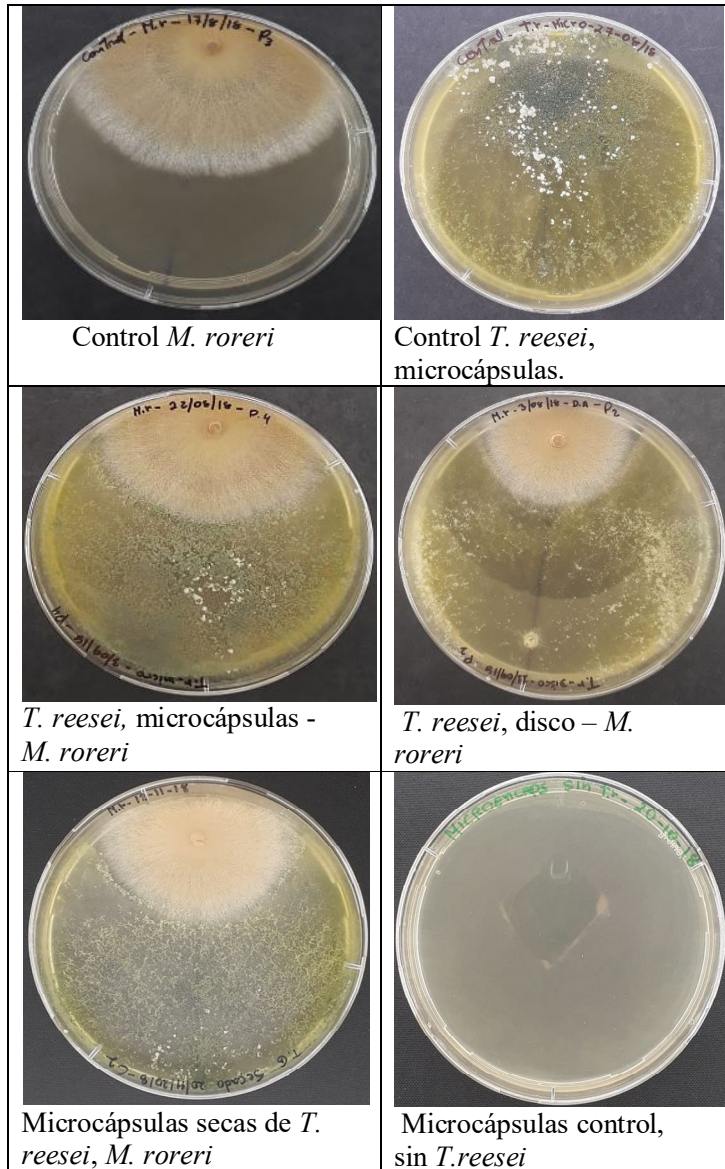
- Control. 2008 Jul;46(1):4–14.
72. Mohammed Ezziyyani, Consuelo Pérez Sánchez ASA. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). 2004;12.
  73. Torres E, Iannacone J, Gomez H. Biocontrol del moho foliar del tomate biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. 2008.
  74. Quiroz Vivian Francisca, Ferrera Sarmiento, Ronald, Cerrato, Alarcón Alejandro LHME. Antagonismo in vitro de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. *Sci Fungorum*. 2008 Feb 1;46:27–34.
  75. Villamil Carvajal JE, Viteri Rosero SE, Villegas Orozco WL. Aplicación de Antagonistas Microbianos para el Control Biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. Bajo Condiciones de Campo. *Rev Fac Nac Agron Medellín*. 2015;68(1):7441–50.
  76. Howell CR. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Vol. 87, *Plant Disease*. American Phytopathological Society; 2003. p. 4–10.
  77. Sánchez A. Evaluación de *Trichoderma* spp. como biofertilizante y controlador biológico de *Verticillium albo-atrum* en cultivos de *Rubus glaucus*. 2017.
  78. Hoyos-Carvajal L, Chaparro P, Abramsky M, Chet I, Orduz S. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones in vitro y de invernadero. Vol. 26, *Agronomía Colombiana*. 2008.
  79. Phillips-Mora W, Aime MC, Wilkinson MJ. Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathol*. 2007 Dec;56(6):911–22.
  80. Torres. Progreso temporal y manejo integrado de la moniliasis [*Moniliophthora roreri* (Cif y Par.) Evans et al.] del cacao (*Theobroma cacao*) en Tabasco, México. 2010.
  81. Bedoya Verde WG. Efecto de dos hongos antagonistas (*Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*) en el control de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif y Par. Evans et. al) del cacao en la región Ucayali. 2006.
  82. Phillips-Mora W, Wilkinson MJ. Frosty pod of cacao: A disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. Vol. 97, *Phytopathology*. 2007 Dec.
  83. Aranzazu, F. Jaimes Y. Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma*

- cacao l) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*) [Internet]. 2010. Available from: [https://www.fedecacao.com.co/site/images/recourses/pub\\_doctecnicos/fe-decacao-pub-doc\\_04A.pdf](https://www.fedecacao.com.co/site/images/recourses/pub_doctecnicos/fe-decacao-pub-doc_04A.pdf).
84. Villamil C. JE, Sierra A. LJ, Olarte L. Y, Mosquera E. AT, Fajardo C. JD, Pinzón EH, et al. Integración de prácticas culturales y control biológico para el manejo de *Moniliophthora roreri* Cif & Par. *Rev Ciencias Agrícolas*. 2016;32(2):13.
  85. Villamil Jorge Enrique C Lizeth Johana Sierra A, Yeimy Olarte L.1, Ana Teresa Mosquera E, Juan David Fajardo C, Elberth H. Pinzón JWMO. Integración de prácticas culturales y control biológico para el manejo de *Moniliophthora roreri* Cif & Par Integration of agronomical and biological practices for the management of *Moniliophthora roreri* Cif & Par. 2015;13–25.
  86. Hernández-Rodríguez AI, Ruíz-Beltrán YI, Acebo-Guerrero YI, Miguélez-Sierra YI, Heydrich-Pérez MI. Antagonistas microbianos para el manejo de la pudrición negra del fruto en *Theobroma cacao* L. Estado actual y perspectivas de uso en Cuba. Vol. 29, *Rev. Protección Veg*. 2014.
  87. Torres E, Iannacone J, Gomez. Biocontrol del moho foliar del tomate biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. 2008.
  88. Wilbert Phillips-Mora. Moniliasis del cacao - CropLife Latin America [Internet]. Vols. 22–5, Tropical Agricultural Research and Higher Education Center CATIE, Costa Rica. 2013 [cited 2020 May 13]. Available from: <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/moniliasis-del-cacao>.
  89. Bateman RP, Hidalgo E, García J, Arroyo C, Ten Hoopen GM, Adonijah V, et al. Application of chemical and biological agents for the management of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in Costa Rican cocoa (*Theobroma cacao*). *Ann Appl Biol*. 2005;147(2):129–38.
  90. Cuéllar AS, Andrea M, Daza H, Hernando C, León R, Marieth Y, et al. Reacción a *Moniliophthora roreri* en *Theobroma* spp . en Caquetá , Colombia. 2015;(11):183–90.
  91. Bg A, Mk N, Gopalakrishnan S, Ys A, Gururaj S. A review on the biological control of plant diseases using various microorganisms. ~ 506 ~ *J Pharmacogn Phytochem*. 2019;8(2):506–10.

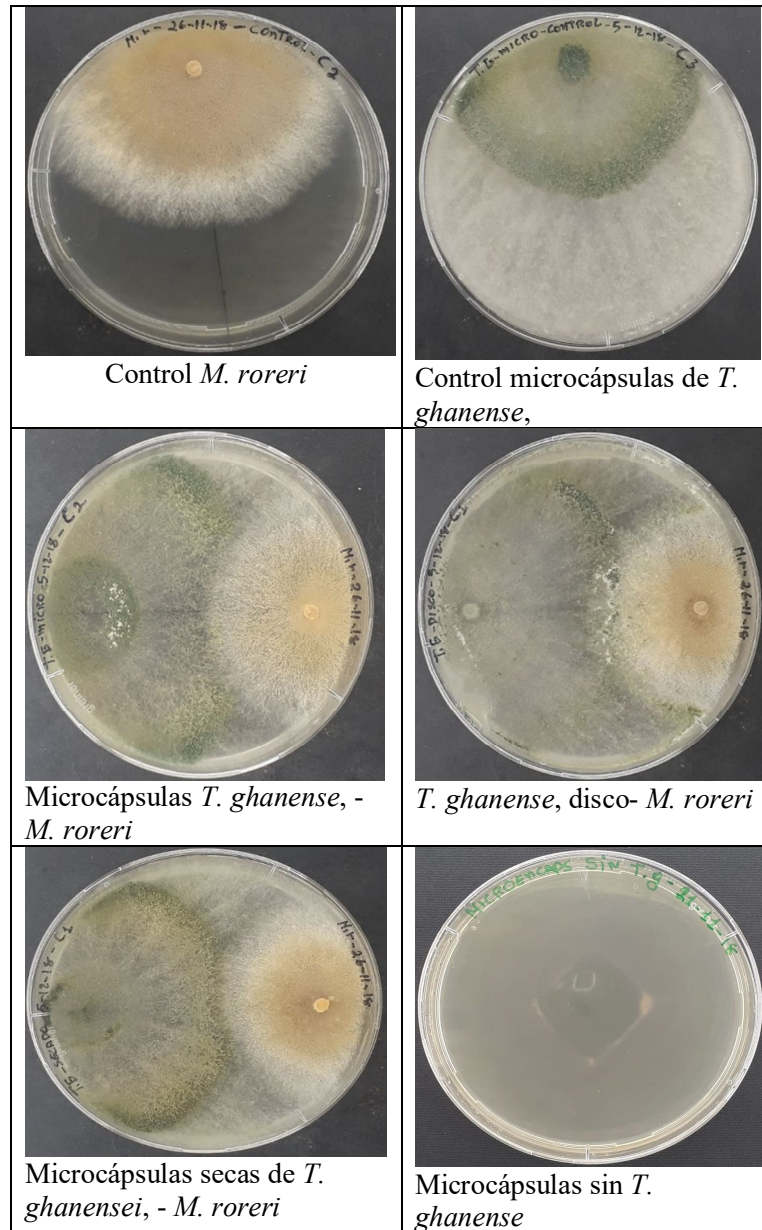
# ANEXO

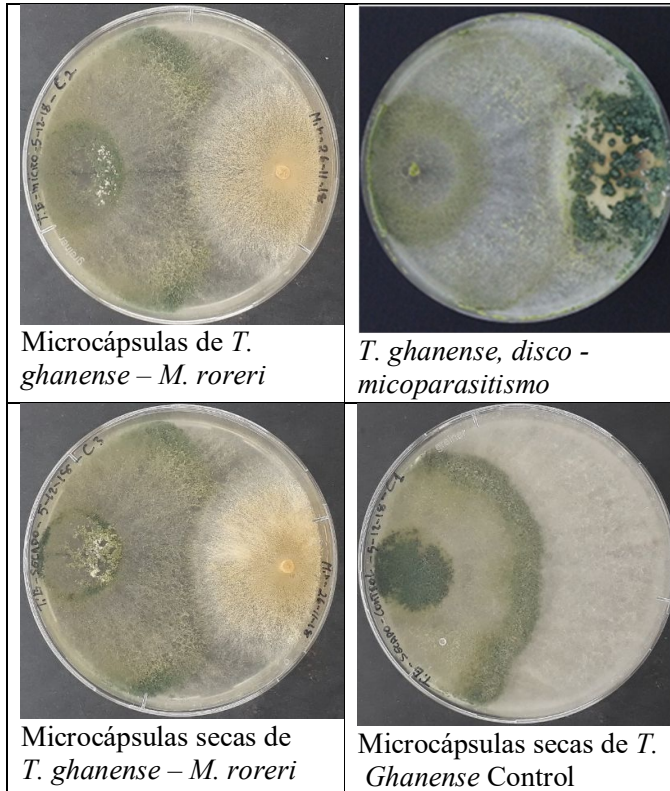
**Anexo 1.** Sistema de elaboración de las microcápsulas de *Trichoderma en masa*.

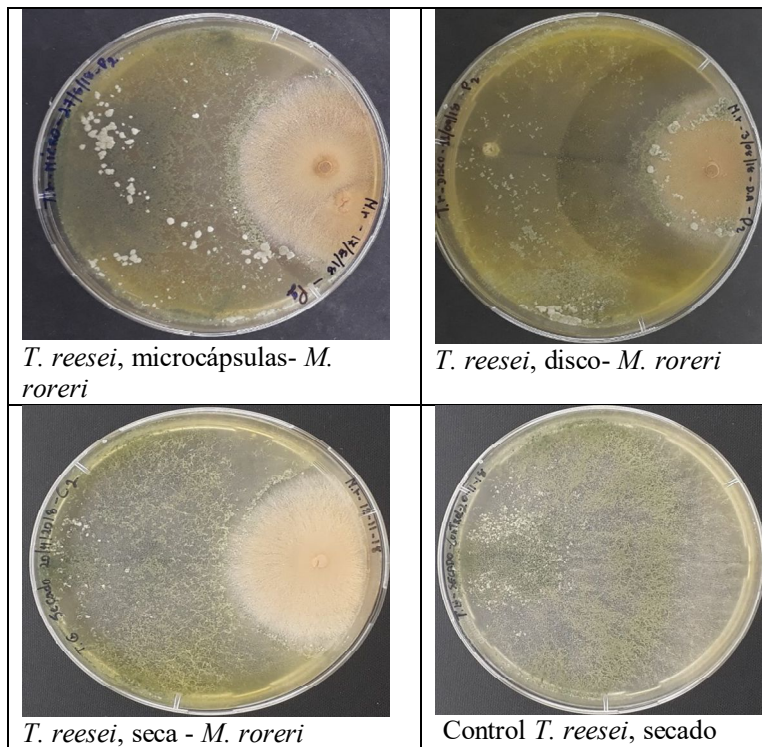
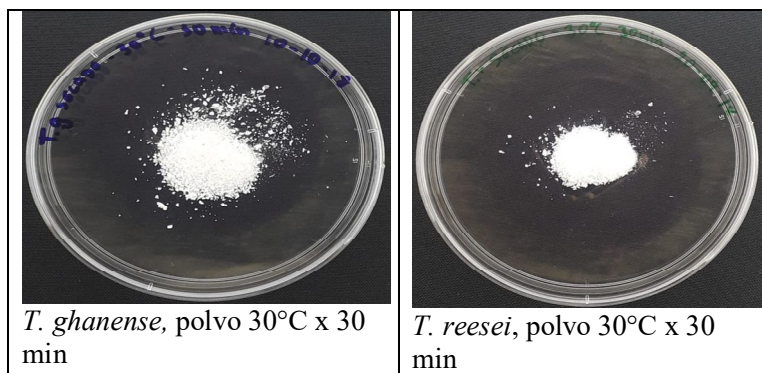


Anexos 2. Antagonismo de *T. reesei*.

**Anexo 3.** Antagonismo de *T. ghanense*.



**Anexo 4.** Micoparasitismo de *T. ghanense*.

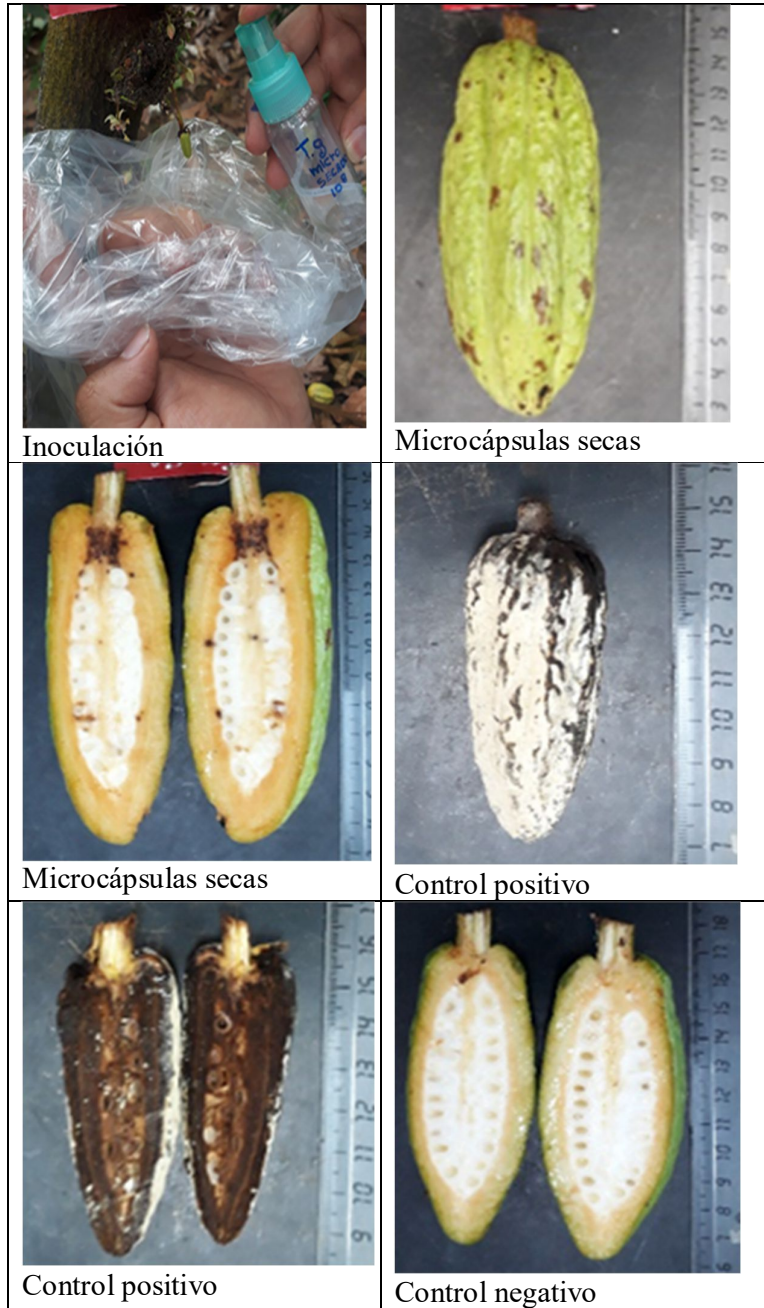
**Anexo 5.** Micoparasitismo *T. reesei*.**Anexo 6.** Polvo de *T. ghanense* y *T. reesei*.



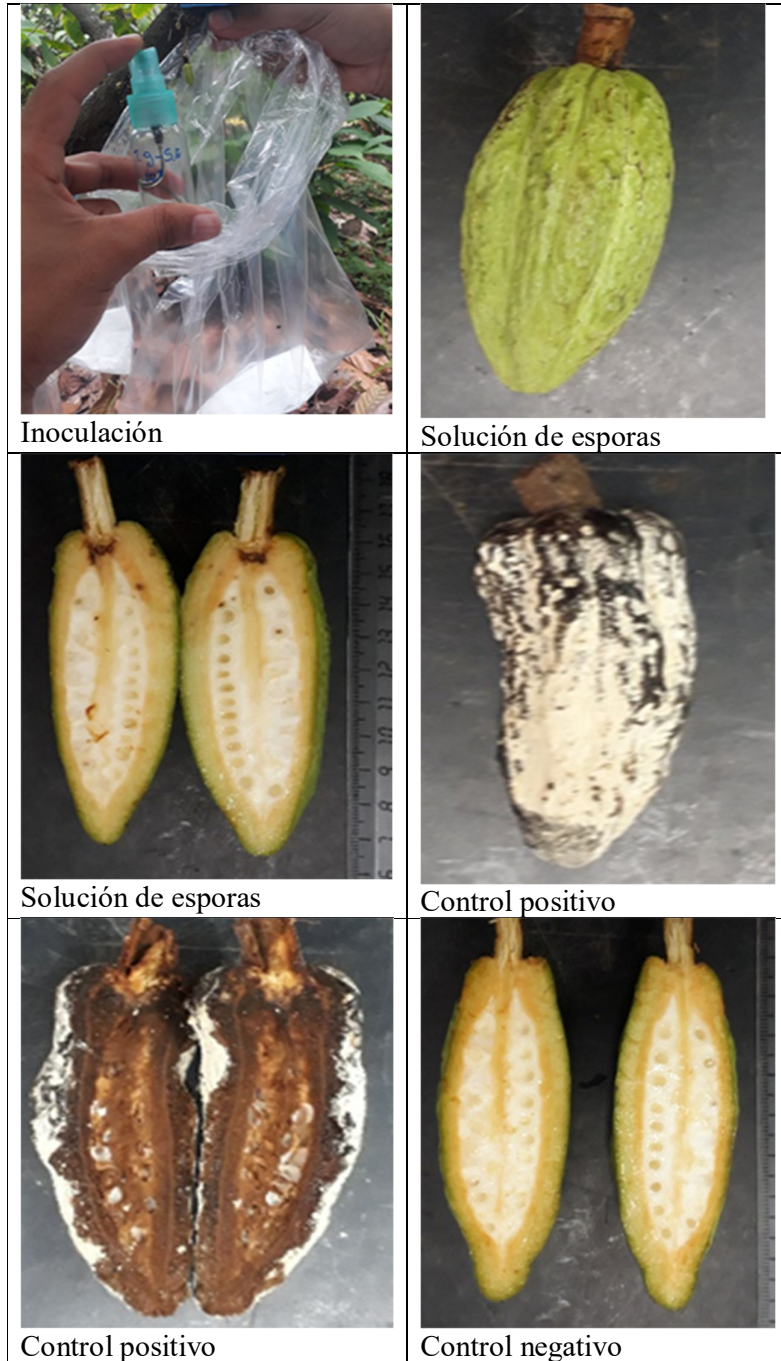
**Anexo 7.** Tratamiento con Microcapsulas mas patógeno (MCP) en frutos de 15 días edad.



**Anexo 8.** Tratamientos con Microcápsulas secas (MCPs) en frutos de 15 días de edad.



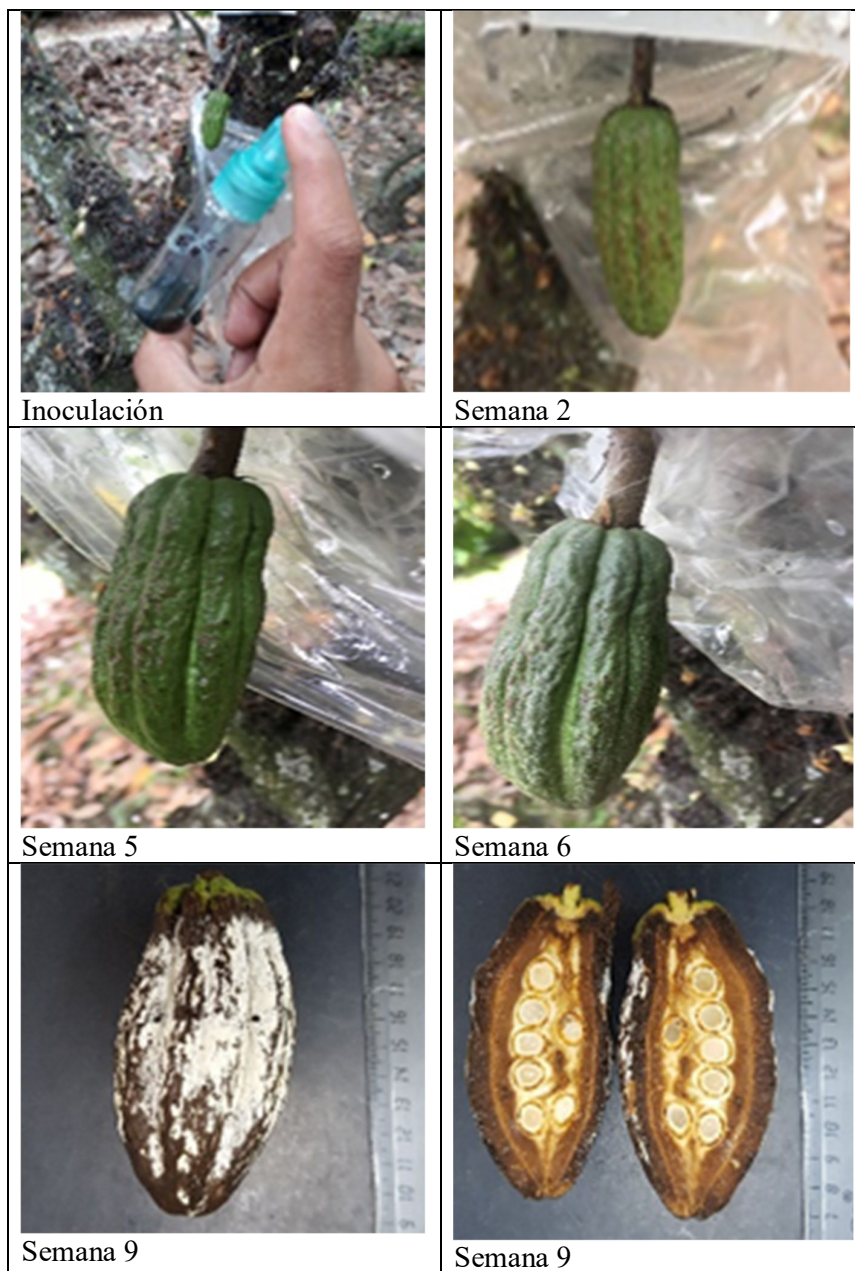
**Anexo 9.** Tratamientos con Solución de esporas (*S.Esp*) en frutos de 15 días de edad.



**Anexo 10.** Tratamientos con patógeno más microcápsulas (*MR+MCP*) en frutos de 28 días de edad.



**Anexo 11.** Tratamientos con patógeno más solución de esporas (*MR+S.Esp*) en frutos de 28 días de edad.



**Anexo 12.** Aplicación de *T. ghanense* en finca comercial de cacao



Tratamientos



Aplicación con bomba de espalda



Aplicación microcápsulas



Aplicación de solución de esporas



Aplicación microcápsulas



Control negativo

**Anexo 13.** ANOVA según Kruskal -Wallis para la severidad externa e interna en tratamientos de antagonista y patógeno (juntos).

Severidad externa

Tratamientos	N	Medias	Ranks	H	p
<i>MCP</i>	4	1±0,00a	12,00	11,02	<0,00032
<i>Control -</i>	12	1±0,00a	12,00		
<i>S.Esp</i>	4	2,00±2,00ab	16,63		
<i>MCPs</i>	4	3,00±2.31ab	21,25		
<i>Control +</i>	12	3,50±1.88b	24,88		

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

Severidad interna

Tratamientos	N	Medias	Ranks	H	p
<i>MCP</i>	4	0±0,0	11,00	12,23	0,0024
<i>Control -</i>	10	0±0,0	11,00		
<i>S.Esp</i>	4	1,25±2,5ab	15,63		
<i>MCPs</i>	4	2,75±2,63ab	23,25		
<i>Control +</i>	12	3,08±2,39b	23,79		

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

**Anexo14.** ANOVA según Kruskal -Wallis para la severidad externa e interna en tratamientos de antagonista más el patógeno (combinación)

Severidad externa

Tratamientos	N	Ranks	Medias	H	p
<i>C. negativo</i>	10	6.60	1.10±0.32a	16.57	0.0004
<i>C. positivo</i>	9	16.67	4.56±1.33b		
<i>MCP+MR</i>	3	20.22	5.00±0,00b		
<i>MR+MCP</i>	3	22.00	5.00±0,00b		
<i>MR+S.Esp</i>	3	22.00	5.00±0,00b		
<i>S.Esp+MR</i>	3	22.00	3.67±2.31 ab		

Severidad interna

Tratamientos	N	Medias	Ranks	H	p
<i>Control -</i>	10	0±0,0 a	6,5	16,85	0,0003
<i>S.Esp+MR</i>	3	3,33±2,89ab	16,83		
<i>Control +</i>	9	4,44±1,67b	20,28		
<i>MR+ S.Esp</i>	3	5±0,0b	22,00		
<i>MR+MCP</i>	3	5±0,0b	22,00		
<i>MCP+MR</i>	3	5±0,0b	22,00		

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