



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TESIS DE GRADO
PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE
INGENIERO AGRÓNOMO

TEMA:

“DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE SEIS PRODUCTOS
“BIORRACIONALES” SOBRE *Moniliophthora perniciosa*,
AGENTE CAUSAL DE ESCOBA DE BRUJA EN CACAO
(*Theobroma cacao* L.)”

AUTOR

JONATHAN JOSEPH ESPINOZA CARRANZA.

DIRECTORA

Ph.D. CARMEN SUÁREZ CAPELLO

QUEVEDO - LOS RÍOS - ECUADOR

2012

**EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN FUE
AUSPICIADO POR LAS SIGUIENTES INSTITUCIONES.**

**INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE
INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS, INIAP**

&

**IMPROVING LIVES THROUGH BIODIVERSITY
RESEARCH**





UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Tesis presentada al Honorable Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Agrarias como requisito previo para la obtención del Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

TEMA:

**“DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE SEIS PRODUCTOS
“BIORRACIONALES” SOBRE *Moniliophthora perniciosa*, AGENTE
CAUSAL DE ESCOBA DE BRUJA EN CACAO (*Theobroma cacao L.*)”**

APROBADA:

PhD. Carmen Suárez - Capello

DIRECTORA DE TESIS

Ing. Agr. M.Sc. Ignacio Sotomayor Herrera

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Agr. M.Sc. Alfonso Vasco

MIEMBRO DE TRIBUNAL

Ing. Agr. Luis Cantos

MIEMBRO DE TRIBUNAL



CERTIFICACIÓN

Ph.D. Carmen Suárez Capello, Docente de la Facultad de Ciencias Agrarias de la **UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**, Certifico: Que el egresado: **ESPINOZA CARRANZA JONATHAN JOSEPH**, realizó las actividades necesarias para la elaboración de la tesis de grado titulada “**DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE SEIS PRODUCTOS “BIORRACIONALES” SOBRE *Moniliophthora perniciosa*, AGENTE CAUSAL DE ESCOBA DE BRUJA EN CACAO (*Theobroma cacao L.*)**”, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ph.D. Carmen Suárez Capello.
DIRECTORA DE TESIS

*La única cosa que se es saber que nada sé;
y esto cabalmente me distingue de los demás,
que creen saberlo todo.*

Sócrates.

DEDICATORIA

Después de haber culminado mi trabajo de tesis quiero dedicárselo a:

DIOS por darme el don de la vida y la sabiduría para enfrentar los retos, las alegrías y los obstáculos que se me presentan constantemente.

Mi padre, **Dionicio Jacinto Espinoza Carranza**, por darme la vida, por guiarme por el buen camino, por mi formación como persona y como profesional y por apoyarme siempre en mis necesidades y en mis sueños.

Mi madre, **Blanca Graciela Carranza Rizzo**, quien con su amor infinito, ternura, apoyo y comprensión se convirtió en mi mejor amiga y guía. Madre, por lo que representas en mi vida, le pido a mi Señor que nos de vida para compartirla juntos y para hacerte la madre más feliz del mundo. TE AMO.

Mi esposa, **Germania Roció Mora Rodríguez**, quien me brindó su amor, cariño, comprensión, confianza y su ayuda incondicional para la realización de mi trabajo de investigación.

Mi hijo, **Jahir Espinoza**, porque al llegar a este mundo me hizo ver la vida de otra manera, llenándome de alegría y de motivos de llegar a ser alguien en esta vida para ser un padre ejemplar. TE AMO mi chinito.

Mis hermanos, **Soraida, Diana, Meibol, Wellintong, Graciela, nike**, por sus muestras de afecto y motivarme para alcanzar esta meta tan importante como es la obtención de mi título profesional.

Mis inolvidables compañeros de aula: Erick Benalcázar, Adrian Cabezas, Bernardo Castro, Luis Castro, Cristhian Cuadros, Fabricio Garcés, Luis Liu-Ba, Jonathan López, Miguel Martínez, Samuel Mendieta, Danny Mise, José Mogro, Freddy Ríos, Iván Suarez, Fabricio Vera, José Velez y Jefferson Zambrano.

AGRADECIMIENTO

De manera especial quiero agradecer a todas las personas y entidades que me brindaron su desinteresada colaboración para que la presente investigación llegue a su culminación.

Primeramente agradezco a DIOS, por verme traído al mundo y por tener a mis padres gozando de su salud y que ellos puedan apreciar la culminación de mi carrera universitaria con éxito, que es lo que más han deseado en este mundo.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (**UTEQ**), por ser mi segundo hogar en el transcurso de los cinco años de estudio y por todas las facilidades brindadas en este tiempo de estudio. GRACIAS.

A **BIOVERSITY INTERNATIONAL**, entidad no gubernamental que financió el presente trabajo de investigación.

Al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (**INIAP**) y a la Estación Experimental Tropical Pichilingue, institución en donde me permitieron realizar mi trabajo de investigación.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Escuela de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, por las facilidades brindadas durante los cinco años cursados en este importante centro de educación superior.

A la Dra. Carmen Suárez PhD, mi directora de tesis por haberme dado la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis en el Departamento Nacional de Protección Vegetal de la EET-Pichilingue el cual ella dirigió, quien compartió conmigo de sus valiosos conocimientos, me brindó su apoyo incondicional en las circunstancias buenas y malas por las que viví durante el desarrollo del presente trabajo de investigación y sobre todo por su gran calidad humana como Directora y amiga. MUCHAS GRACIAS DOCTORA.

A todo el personal Administrativo y Laboral de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y muy especialmente a la Sra. Alexandra Mendoza, a la Ing. Lorena Escobar y a los Sres. Sandro Montoya y Amado Coello, quienes siempre estuvieron atentos cuando requerí de su ayuda.

Ing. M.Sc. Ignacio Sotomayor Herrera, Líder del Programa Nacional de Banano, Plátano y otras Musáceas de la EET-Pichilingue del INIAP y Presidente de mi Tribunal de Sustentación, por sus acertados consejos y cambios constructivos, al proyecto que desembocaron en el pulimento de mi trabajo de tesis.

Ing. M.Sc. Pedro Rosero, ex Sub-decano de la Facultad de Ciencias Agrarias e Ing. M.Sc. David Campi, ex Director de Escuela de la carrera de Ing. Agronómica, gracias por su apoyo y confianza en todo momento.

Al Ing. Agr. Luis Cantos y el Ign. Agr. M. Sc. Alfonso Vasco, Miembros de mi Tribunal de Tesis, quienes aportaron con asesoramiento y sugerencias para el desarrollo de mi tesis.

Al Ing. Stalin Revelo, por compartir alegrías y tristezas en las buenas y en las malas, por sus valiosos consejos sabios y por su apoyo incondicional en realización de mi tesis. GRACIAS DOCTOR.

A todo el personal del Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV) de la EET-Pichilingue. Ings. Danilo Vera, Stalin Revelo, Karina Solís, Bióloga. Adela Quevedo, a las Tecnólogas Sofía Peñaherrera y Lorena Ledesma.

A mis compañeros becarios y amigos de la EET-Pichilingue, Mayra Vélez, Galo Cedeño, Pablo Páez, Jose Velez, Jonathan López, y Jefferson Zambrano. Gracias por su apoyo incondicional.

A mi compañero Bernardo Castro el cual siempre me brindó su apoyo de manera desinteresada en la realización de mi tesis.

La responsabilidad por las investigaciones, resultados y conclusiones presentados en esta tesis pertenecen exclusivamente al autor.

Jonathan Espinoza Carranza

ÍNDICE GENERAL

Aprobación por el tribunal de evaluación y seguimiento	ii
Certificación del director de tesis	iii
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento	vi
Autoría	ix
Índice general	x
Índice de cuadros.....	xiv
Índice de figuras.....	xv
Índice de anexos.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN	1
A. Justificación	3
B. Objetivos.....	4
1. General	4
2. Específicos.....	4
C. Hipótesis.....	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
A. Enfermedades del cacao	5
B. Enfermedades de la “escoba de bruja”.....	5
1. Agentes causal	5
2. Descripción morfológica de estructuras sexuales del patógeno	6
3. Clasificación taxonómica	6
4. Origen y distribución	7
5. Diversidad Patogenica	8
6. Ciclo de la Enfermedad.....	8
7. Síntomas.....	9
C. Métodos de control de Escoba de bruja	10
1. Control cultural.....	10
2. Control químico	11
3. Control biológico	11
4. Manejo integrado	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS	14

A. Localización del estudio	14
B. Características Climáticas	14
C. Materiales y equipos	15
1. Materiales usados en la fase de laboratorio.....	15
2. Materiales usados en la fase de invernadero.....	15
D. Factor en estudio.....	16
E. Descripción metodológica	16
F. Productos en estudio	17
1. Trichoeb 5WP (Acondicionador del suelo).....	17
2. Ecoflora (Acondicionador biológico).....	18
3. Ecofungi (Inoculante de micorrizas).....	18
4. 3B112 S.C. (Inhibidor de la esporulación de hongos).....	19
5. Bankit (Fungicida sistémico)	19
5. Trichoderma stromaticum (INIAP).....	20
6. Testigo	20
G. Tratamientos a usar	20
H. Experimento 1	21
1. Diseño experimental	21
2. Recolección y selección de materia en campo	22
3. Preparación de los productos para sumergir las escobas secas	22
4. Variables registradas	23
4.1. Numero de basidiocarpos antes de la inoculación.....	23
4.2. Numero de basidiocarpos después de la inculacion en periodos de 15 días	23
i. Segundo experimento	23
1. Diseño experimental	23
2. Descripción de Metodología.....	24
3. Preparación de los productos	24
4. Variables registradas	24
4.1. Crecimiento radial.....	24
4.2. Reacción física del patógeno	25
j. Tercer experimento	25
1. Analisis Estadistico	25

2. Descripción de metodología.....	26
3. Obtención de semillas y plántulas.....	26
4. Preparación del inoculo	27
5. Soluciones necesaria para la preparación del inoculo	28
5.1. Solución A.....	28
5.2. Solución B.....	28
5.3. Solución C.....	28
7. Inoculación de semillas pregerminadas y plántulas	28
8. Formas de aplicación.....	29
9. Variables registradas	29
9.1. Período de incubación (PI).....	29
9.2. Incidencia (%)	30
10 Manejo de las plántulas después de la inoculación	30
IV. RESULTADOS	31
A. Efectos de productos biorracionales sobre la producción de basidiocarpos en escobas secas	31
B. Confrontación de los productos con <i>M. perniciosa</i> en placa de PDA precolonizada.....	32
C. Efecto de los Biorracionales en plántulas inoculadas con <i>M. perniciosa</i>	35
V. DISCUSIÓN	37
VI. CONCLUSIONES	39
VII. RECOMENDACIONES	40
VIII. Resumen	41
SUMMARY.....	42
IX. BIBLIOGRAFÍA CITADA	45
ANEXOS	50

ÍNDICE DE CUADROS

	Paginas
Cuadro 1 Condiciones meteorológicas y ecológicas de la Estación Experimental Tropical Pichilingue.....	14
Cuadro 2. Dosis de producto comerciales por ha. de los biorracionales que se usaron en el anteproyecto de tesis	22
Cuadro 3. Análisis de varianza del primer experimento. EET-Pichilingue, INIAP, 2012	23
Cuadro 4. Análisis de varianza del segundo experimento. EET-Pichilingue, INIAP, 2012	25
Cuadro 5. Análisis de varianza del tercer experimento. EET-Pichilingue, INIAP, 2012	28

ÍNDICE DE FIGURAS

	Paginas
Figura 1. Ciclo de vida de <i>M. pernicioso</i>	8
Figura 2. Efecto de los productos biorracionales- biologicoc (Stromaticum, Trichoeb, Ecoflora, Ecofungi) sobre colonias de <i>M. pernicioso</i> , en variable crecimiento radial (AUDPC). EET-Pichilingue, INIAP, 2012.....	34
Figura 3. Efecto de los productos biorracionales- botánicos (Bankit, 3b112) sobre colonias de <i>M. pernicioso</i> , en variable crecimiento radial (AUDPC). EET-Pichilingue, INIAP 2012.	34
Figura 4. Colonizacion de Stromaticum y Trichoeb en colonias de <i>M. pernicioso</i> de 15 días de edad en PDA. EET-Pichilingue, INIAP, 2012.....	35
Figura 5. Reacción de colonias de <i>M. pernicioso</i> de 15 días de edad en PDA a la adición de productos biorracionales (Ecoflora, Ecofungi). EET-Pichilingue, INIAP, 2012	36
Figura 6. Reacción de colonias de <i>M. pernicioso</i> de 15 días de edad en PDA a la adición de productos biorracionales (3B112 y Bankit). EET-Pichilingue, INIAP, 2012.....	36
Figura 7. Colonia de <i>M. pernicioso</i> mostrando sus características normales de crecimiento.	37
Figura 8. Interacción el producto con la inoculación de <i>M. pernicioso</i> en la variable Periodo de incubación EET-Pichilingue, INIAP, 2012.	37

Figura 9. Incidencia (%) de <i>M. pernicioso</i> en plántulas de cacao EET-95, EET-Pichilingue, INIAP, 2012	38
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS DEL ANEXO

	Paginas
Figura 1. Sitio especialmente apropiado para la producción de basidiocarpos (escobero)	51
Figura 2. Escobas inoculadas con los productos biorracionales	54
Figura 3. Cámara húmeda para la inoculación de las escobas con stromaticum	55
Figura 4. Colonias de escoba lista para el repique y obtener colonias puras.....	56
Figura 5. Colonia pura y de tamaño óptimo para inocular en cada punto señalado..	59
Figura 6. Inoculación con micro pipeta de 10 ul.	60
Figura 7. Trichoderma stromaticum demostrando su agresividad ante escoba de bruja	61
Figura 8. Trichoeb inhibiendo completamente a escoba	62
Figura 9. Reacción física del patógeno al presentar una coloración más intensa que la del testigo.....	64
Figura 10. Reacción de crecimiento anormal del patógeno con el medio nutritivo PDA mezclado con bankit.....	61
Figura 11. Crecimiento del patógeno en medio pda mexclado con 3b112.....	62
Figura 12. Semilla sin mucilago ni testa y cubierta con papel toalla humedecido con agua estéril.....	61

Figura 13. Semilla pre germinada con tamaño de radícula de 5 cm mostrando sus raíces secundarias sumergidas en sus respectivos productos.....	62
Figura 14. Recolección de basidiocarpos. Y el píleo pegado en una caja Petri untada con vaselina.	62
Figura 15. Descarga de espora en el laboratorio y recolección de inóculo	61
Figura 16. Preparación de inóculo de escoba de bruja.....	62
Figura 17. Inoculación de plantas de cacao con el método Agar-drop.....	62
Figura 18. Síntomas provocados por Escoba de bruja.....	61
Figura 19. Vista general del invernadero donde se ubicó las plantas inoculadas con <i>M. pernicioso</i>	62

I. INTRODUCCION

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.), además de considerarse un cultivo proteccionista, está ligado a la historia económico-social de toda la subregión. La superficie ocupada, sembrada como monocultivo o como parte del complejo sistema de producción campesina es variable en los diferentes países de Sudamérica. Para el Ecuador el cacao representa uno de los principales productos generadores de divisas (SICA, 2006).

El cultivo ofrece halagadores perspectivas; principalmente para el cacao Nacional sabor “arriba” poseedor de un “aroma” apetecido para la industria extranjera; esta característica asegura el mercado internacional y es conveniente continuar manteniéndola como un legado de la naturaleza.

Uno de los problemas fundamentales que enfrenta el cultivo es el bajo rendimiento, estimado entre 250 a 300 kg/ha/año (ANECACAO, 2006), considerado uno de los más bajos comparado con otros países productores, debiéndose entre otros factores al efecto acumulado del ataque severo de enfermedades fungosas, consecuencia de un manejo muy pobre o inexistente.

El cacao como cualquier organismo viviente es susceptible al ataque por microorganismos que alteran su desarrollo, causando una o varias enfermedades, una de las principales es la escoba de bruja, causada por *Moniliophthora perniciosa*. Esta enfermedad provoca pérdidas del 40 al 70% de la producción, sin tomar en cuenta la reducción del vigor de la planta por el ataque a brotes, entrenudos y cojinetes florales.

Hasta el momento el mejor control para esta enfermedad es el manejo integrado del cultivo, que incluye podas anuales, adecuada fertilización, remoción semanal de frutos enfermos y aplicación de productos químicos protectores y agentes de biocontrol.

La agricultura actual demanda la reducción de plaguicidas químicos y la introducción a sistemas sostenibles, una de cuyas alternativas es el uso de agentes biorracionales, para el control de plagas y enfermedades.

Los Biorracionales son sustancias que se derivan de microorganismo, plantas o minerales. También pueden ser sustancias sintéticas similares o idénticas a otras que se encuentren en la naturaleza. Estos se caracterizan por tener una toxicidad muy baja para los humanos y otros vertebrados, descomponerse en pocas horas después de aplicados o ser específico para lo que deseamos controlar. Por esta razón son ambientalmente benignos. Su efecto en la vida silvestre y en el medio ambiente es menos perjudicial que los plaguicidas convencionales. Este tipo de productos ha empezado a proliferar en el medio pero existe muy poca información científica al respecto.

A. Justificación.

La producción de cacao en el Ecuador se encuentra muy ligada a las condiciones ambientales y esto es determinante para un aumento en la calidad del producto. Sin embargo, existen muchos factores que limitan la producción, uno de esto se debe a la presencia de diversas enfermedades que producen daños, entre ella la escoba bruja. Como en todas las enfermedades de cultivos quizás la alternativa más usada por el productor son los fungicidas.

Los plaguicidas químicos son contaminantes para el medio ambiente y el control a veces de eficacia dudosa. Se estima que los productos denominados biorracionales presentan una alternativa de control barata, efectiva, permanente y que no interfiere negativamente con otros procesos del ecosistema, sin embargo es poco lo que se conoce sobre los mismos aun cuando se expenden más o menos libres en el país.

Considerando que la composición, origen y bajo impacto ambiental hace de estos una buena opción, la presente investigación tiene como principal objetivo evaluar algunos de los diferentes productos biorracionales disponibles en el mercado local, para el manejo de la escoba bruja, en cacao sobre todo a nivel de vivero y plantas jóvenes.

B. Objetivos:

1. General

- Seleccionar productos alternativos, eficientes para el control de escoba bruja *M. perniciosa* en cacao.

2. Específicos

- Determinar la eficiencia de productos biorracionales sobre *M. perniciosa* a nivel de laboratorio e invernadero
- Evaluar el efecto de algunos de los productos biorracionales existentes en el mercado nacional como supresores de basidiocarpos de *M. perniciosa*.

C. Hipótesis

Productos biorracionales existentes en el mercado controlan, eficazmente la escoba de bruja en el cacao, especialmente a nivel de vivero.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. Enfermedades del cacao

Las enfermedades son el principal factor limitante en la producción de cacao, y para nuestras condiciones tres son los principales organismos patogénicos:

Moniliophthora perniciosa agente causal de la enfermedad “Escoba de Bruja”, ataca principalmente tejidos meristemáticos en crecimiento activo, induciendo a un desarrollo anormal y gigantesco (hipertrofias e hiperplastias) (Suárez y Delgado, 1993); ***Moniliophthora roreri*** infecta solo a mazorcas, principalmente en las primeras etapas de crecimiento (Enriquez, 2004); las dos enfermedades permanecen epidémicas y causan alrededor del 60% de pérdidas de cosecha potencial, elevándose al 81% en años o regiones particularmente malos (Suárez, 1996); y ***Ceratocystis cacaofunesta*** que ataca la zona del cambium y xilema causando la muerte del árbol (Angamarca, 2007).

B. ESCOBA DE BRUJA

1. Agentes causal

La enfermedad conocida como “Escoba de bruja” fue descrita primero por Stahel en 1915, denominándola *Marasmius perniciosa* Stahel, sin embargo en estudios realizados por Singer en 1942 fue renombrada a *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer.

Con este nombre fue conocido hasta antes del 2005, cuando en estudios realizados por Aime y Phillips-Mora (2005) utilizando secuencias de ADN, demostraron la existencia de una estrecha relación con el patógeno *Moniliophthora*

roreri, y a la vez, más distante de especies del tipo *Crinipellis*, denominándolo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime y Phillips-Mora, en esta, al igual que en las últimas investigaciones se hará mención del nuevo nombre del género.

2. Descripción morfológica de estructuras sexuales del patógeno

El píleo es de color púrpura intenso, pero se torna más claro con la edad, algo convexo y deprimido en el centro, donde también presenta un color más intenso, su diámetro completamente expandido varía de 5-30mm y presenta surcos radiales. La Lamela: es blanquecina y gruesa (0,2 mm), generalmente con 15 o más laminillas, que corresponden a los surcos del píleo. El estipe es hueco y mide de 5 a 10 mm, su color es blanco cremoso, excepto en la parte engrosada de la base que es de color pardo. Las basidias producen cuatro esporas uninucleadas y el resto del himenio es de forma similar al de otros basidiomicetos (Holliday, 1980; Suárez y Delgado, 1993).

3. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de *M. perniciosa* (Stahel) Aime y Phillips-Mora, según Meinhardt., et al (2008) es la siguiente:

Super-reino: Eukaryota

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Subphylum: Agaromycota

Clase: Agaricomycetes

Subclase: Agaricomycetidae

Orden: Agaricales

Familia: Marasmiaceae

Género: *Moniliophthora*

Especie: *perniciosa*.

4. Origen y distribución

El origen de la enfermedad ha sido por mucho tiempo objeto de especulación, siendo la teoría más aceptada y difundida la que establece que la enfermedad es endémica del valle amazónico y de ahí fue diseminada a otras áreas (Suárez, 1993).

La enfermedad fue reportada en Guyana (1906), Colombia (1917), Ecuador (1921), Trinidad (1928), Tobago (1939), Grenada (1948), Sta. Vicente (1988), Panamá (1989) y Brazil, en el estado de Bahia (1989) (Purdy y Smith, 1996; Wheeler y Suárez, 1993).

El patógeno se encuentra localizado en las principales áreas cacaoteras de América Latina, con excepción de Centroamérica al norte del Istmo de Panamá, incluyendo México (Suárez, 1993).

La diversidad de hospederos de ***M. perniciosa*** incluye especies de los géneros: *Theobroma spp.* y *Herrania spp* (Malvaceae) (Evans, 1978). También se ha encontrado este género en asociación con algunas plantas hospederas en familias muy poco relacionadas con cacao, incluyendo: Solanaceas, Bignoniaceae, Bixaceae y Malpighiaceae (Evans y Bastos, 1985; Griffith *et al.*, 2003). En recientes investigaciones en Brasil, se continúan ampliando el rango de hospederos y el grado de especificidad de ***M. perniciosa*** entre estas poblaciones, pero esto requiere de pruebas más profundas (Evans, 2007).

5. Diversidad patogénica

El patógeno ***M. perniciosa***, es un hongo hemibiotrófico del cual se conocen cuatro biotipos diferentes (C, H, L y S), clasificados de acuerdo a su biología y especificidad de hospedero: el biotipo C infecta especies de *Theobroma spp* y *Herrania spp.*; el biotipo S infecta un diverso rango de hospederos dentro de la familia *Solanaceae*; mientras el biotipo H ha sido recientemente identificado infectando una especie de la familia *Malpighiaceae*; aislados del biotipo L se encuentran en lianas y en especies de la familia *Bignoniaceae* (Griffith *et al.*, 2003; Meinhardt *et al.*, 2008).

Wheeler y Mepsted (1988), mencionan la existencia de variaciones patogénicas en el biotipo C, especialmente en el tiempo requerido para la formación de la escoba y en su tamaño: la forma A, es un aislado más virulento y está presente en Bolivia, Colombia y Ecuador, en este último indujo severos síntomas y formación de escoba en el clon Scavina 6; y la forma B, es un aislado menos virulento que está presente en Brasil, Trinidad y Venezuela.

6. Ciclo de la enfermedad

El patógeno es un hongo hemibiotrófico, con dos fases distintas en su ciclo de vida: la primera comienza con la infección en el tejido joven por parte del tubo germinativo de la basidiospora, el cual entra a través del estoma o penetra directamente por la epidermis o tricomas, invadiendo el tejido a nivel intercelular, donde aparentemente causa un desbalance hormonal induciendo a hipertrofias e hiperplastias y el patógeno vive como parásito obligado (biotrófica) (Wheeler y Suárez, 1993).



Figura 1. Ciclo de vida de *Moniliophthora perniciosa*¹.

Los mismos autores mencionan que la segunda fase (saprofítica) inicia con la muerte del tejido hipertrofiado, el hongo entonces, invade a nivel celular, crece como saprófito y eventualmente si las condiciones son favorables se producen los basidiocarpos en los cuales se forman las esporas infectivas.

7. Síntomas

La expresión sintomatológica de la enfermedad es la parte más estudiada de la misma; el síntoma más conspicuo es una proliferación de brotes verticales que forman las llamadas “Escobas de Bruja” (Suárez, 1979). Hay sin embargo, una cierta variación de síntomas que incluyen deformaciones y alteraciones de los tejidos, cuya intensidad varia con el tipo y edad del tejido involucrado; la constitución genética de los árboles, la patogenicidad del aislado; su estado nutricional y manejo (Suárez, 1993; Wheeler y Suárez, 1993).

¹ Fuente: C. Suarez Capello y K. Solís Hidalgo, 2010 INIAP DEPARTAMENTO NACIONAL DE PROTECCION VEGETAL.- Afiche divulgativo.

El hongo ataca principalmente tejidos meristemáticos en crecimiento activo: brotes vegetativos, cojinetes florales y frutos (Baker y Holliday, 1957); ocasionando la formación de escobas y malformaciones en frutos conocidos como chirimoyas o frutos zanahoria.

El tejido afectado se hipertrofia, los brotes pierden su dominancia apical, desarrollando ramificaciones laterales (escobas); y en su última etapa, las escobas comienzan a secarse desde las puntas hasta que se necrosan completamente y mueren, dando a las plantas el aspecto de “quemadas por fuego”, tales síntomas pueden deberse a la producción de enzimas por parte del hongo, que inactivan las auxinas del hospedero (Suárez y Delgado, 1993).

La sintomatología de la enfermedad “Escoba de Bruja” a nivel de plantas adultas ha sido detalladamente ilustrada y descrita por varios autores (Baker y Holliday, 1957; Thorold, 1975; Evans, 1981; Rudgard, 1989). El tiempo necesario para la aparición de síntomas varía en forma considerable (3-14 semanas), pero en promedio es de 5 a 6 semanas (Suárez, 1993; Rivera, 1995).

C. Medidas de control de Escoba de Bruja

1. Control Cultural.

A nivel de plantaciones tradicionales la recomendación de manejo cultural se establece en primer lugar la rehabilitación de huertas mediante podas de descope para bajar la altura de los árboles y mejorar su capacidad productiva.

De ahí en adelante se deben realizar anualmente por lo menos una, eliminación anual de escobas para mejorar la sanidad del cultivo y evitar que se eleven los niveles de inóculo dentro de la plantación (Suarez, 1993; Suárez y Solís, 2003). A

nivel de vivero y durante el primer año de establecimiento cuando la planta está en proceso de formación, el productor depende principalmente de la protección de nuevos brotes con productos químicos, especialmente en plantas de semilla.

2. Control Químico.

Múltiples moléculas de fungicidas han sido probadas para el control de *M. pernicioso*. El uso único de esta práctica no ha tenido resultados prácticos en plantaciones tradicionales de cacao, debido a que no es rentable cuando los niveles de infección son elevados y la huerta carecen de manejo agronómico (Suarez y Solís, 2003). Por eso el uso de fungicidas debe hacerse como parte de un manejo integrado de la plantación para que resulte eficaz y sostenible.

Entre los productos antes recomendados están clorotalonil y el óxido cuproso, estos pertenecen a un nivel toxicológico II se cambiaron por una azoxistrobina III (Bankit (0.6 Kg i.a./ha) y el Hidróxido de cobre (Kocide 101- 3g. i.a./árbol) (Suarez, 1993) con un nivel toxicológico más bajo IV. Para evitar la formación de basidiocarpos de *M. pernicioso*, Suarez (1993) recomienda la aplicación de aceite agrícola solo o emulsión con agua hasta 10% sobre las escobas amontonadas en el suelo, particularmente al inicio de las lluvias.

3. Control Biológico.

Para Evans (1999), el control biológico de enfermedades no es otra cosa que el uso de uno o más organismos actuando como agentes que permiten mantener en niveles bajos la incidencia de agentes patógenos, sin permitir que se conviertan en plagas claves que afectan al desarrollo del cultivo.

Fokkema (1995), indica que a nivel de campo es poco probable que las medidas de control biológico puedan erradicar patógeno o su daño; sin embargo el antagonismo de un agente de control biológico puede reducir la capacidad de un patógeno para producir y mantener altos niveles de inóculo. Disminuyendo esa fuente se reducirán eventualmente niveles altos de incidencia y severidad de la enfermedad, permitiendo que otras medidas de control, incluida la resistencia genética, mejoren su eficacia.

Existe una amplia gama de géneros de hongos reportados como antagonistas de enfermedades de cacao y de estos *Cladobotryum amazonense*, *Clonostachys spp.* (*Gliocladium spp.*) y *Trichoderma spp.* son los que a la fecha se presentan como antagonistas promisorios para la enfermedades de cacao causadas por *M. pernicioso* y *M. roreri*. (Bastos, 2005; Solís, 1999; Suarez y Solis, 2003; Krauss y Soberanis 2003)

A la misma categoría de control biológico pertenecen los productos derivados de vegetales u otros hongos, benéficos, conocidos también como biorracionales que sugieren un control efectivo para enfermedades del cacao aunque no se hayan trabajos que respalde esta aseveración, al menos en el ámbito nacional; sin embargo en Ecuador se conocen ejemplos exitosos del uso de estos productos en el manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de papa (Gallejos, 2011).

El interés de desarrollar biofungicidas nace de la necesidad de obtener otras alternativas a las químicas. Reemplazando algunos de los tratamientos de fungicidas químicos como agentes de control biológico sino que también puede resultar un mejor control de la enfermedad (Hjeljord y Tronsmo, 1998; Bateman, 2004).

4. Manejo Integrado.

Es el conjunto de prácticas que permitan la total expresión productiva de la planta*. Lorito et al. (1996) señalan que las medidas de control integrado pueden también ser sinérgicas. Estas sustancias podrían tener un efecto directo del combate de la enfermedad o debilitar al patógeno dando a sus propágulos más susceptibilidad al subsecuente ataque de un antagonista.

Cada vez es más frecuente que las recomendaciones de combate de enfermedades este dirigida hacia un control integrado de la misma, teniendo el cultivo como dentro de dicha estrategia, aplicando todas las condiciones que permitan su máximo rendimiento y sanidad, de modo que la aplicación de pesticidas sea reducida para reducir costos y optimizar la protección del ambiente y productor

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Localización del estudio

La presente investigación se llevó a cabo en la Estación Experimental Tropical Pichilingue del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en el Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV); ubicado en la provincia de Los Ríos en el Km. 5 vía Quevedo – El Empalme. La Estación Experimental está situada entre las coordenadas geográficas 1° 06´ Latitud Sur y 79°25´ Longitud Occidental, con una altura promedio de 75 metros sobre el nivel del mar.

B. Características Climáticas

En el **cuadro 1**, se indican las condiciones meteorológicas y ecológicas de la Estación Experimental Tropical Pichilingue.

Cuadro 1. Condiciones meteorológicas y ecológicas de la EET. Pichilingue.

Parámetros	Valores promedios
Temperatura (°C)	24,80 *
Humedad relativa media (%)	84,00
Precipitación (mm anual)	2252,20
Heliofanía (hora luz/anual)	894,00
Zona ecológica	Bh-t

Fuente: Estación del INAMHI.

(*) Valores promedios registrados desde 1971 a 2009 en la Estación Meteorológica Pichilingue del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI).

C. Materiales y Equipos.

En este estudio se utilizaron diversos materiales, herramientas y equipos, los que se describen a continuación:

1. Trabajo de laboratorio:

- Agar
- Agitador
- Agitador calentador magnético.
- Agua destilada estéril
- Alcohol
- Algodón
- Autoclaves
- Balanza gramera
- Basidiocarpos frescos
- Bisturíes
- Bolígrafos, lápices y marcadores
- Buretas 200 ml
- Cajas petri
- Cámara de flujo laminar
- Contadores manuales
- Cubreobjetos
- Erlenmeyer
- Espátulas
- Estreptomicina
- Estufa
- Hemacitómetro
- Incubadoras
- Libro de campo
- Mecheros
- Microondas
- Micropipeta de 1000 μL
- Microscopio
- NaOH al 10 %
- Nitrógeno líquido
- PDA
- Peachímetro
- Pipetas
- Portaobjetos
- Probeta
- Soporte universal con pinzas.
- Tween 20
- Vasos de precipitación
- Vortex

2. Trabajo de invernadero:

- Conos
- Gavetas de cono

- Bandejas plásticas
- Sustrato
- Semillas
- Agua destilada estéril
- Papel aluminio
- Papel toalla
- Piola
- Libro de campo
- Marcadores
- Etiquetas
- Casa de cultivo

D. Factores en estudio.

Tanto en las pruebas experimentales en condiciones *in vitro* e invernadero, se estudió un solo factor constituido por seis productos biorracionales para el que se evaluaron de tres ángulos diferentes: en escobas secas produciendo basidiocarpos, en confrontación en medio de cultivo en laboratorio y en invernadero a nivel de plántulas.

E. Descripción metodológica

La investigación comprendió tres experimentos: dos experimentos se realizaron en condiciones de invernadero y el tercero bajo condiciones *in vitro* a nivel de laboratorio. Para el primer experimento se recolectaron escobas secas en proceso de producir basidiocarpos, estas escobas se sumergieron durante cinco minutos en una solución de los respectivos productos, se dejaron escurrir y finalmente se colocaron en un umbráculo sometidas a un régimen de 8 horas de irrigación y 16 horas sin agua para provocar producción de basiocarpos. Como testigo se mantuvo un grupo igual de escobas sin aplicar ningún producto.

En el segundo experimento, a nivel de laboratorio se obtuvieron colonias puras del hongo a partir de escobas verdes aproximadamente de cuatro semanas de

edad para ser aisladas en el medio artificial PDA (Potato Dextrose Agar) para obtener colonias puras de escoba de bruja. Discos de 0,5 cm de estas colonias se inocularon platos petri conteniendo PDA + los biorracionales.

El tercer experimento consistió en plicar la solución de los biorracionales en brotes de plántulas mantenidas en el invernadero y luego se inocularon con *M. pernicioso* por medio de la tecnología de la (gota de agua+una suspensión de esporas de patógeno).

F. Descripción de los productos en estudio

Los biorracionales se describen a continuación:

1. TRICHOEB 5WP. (promocionado como acondicionador del suelo).

Este producto es fabricado por ECUABIOLÓGICA, casa comercial que indica que se debe utilizar en dosis de 150 g. del producto por hectárea.

Es un fungicida biológico que contiene conidias de hongo *Trichoderma spp.* *T. harzianum*, *T. viridae*. Se lo recomienda como biorregulador, bioestimulante y antagonista de fitopatógenos. Ayuda con la absorción de micronutrientes, estimulando el crecimiento de la planta y además activa los mecanismos de defensa de las mismas.

Su modo de acción está determinado por la competencia de nutrientes y espacio, parasitismo y antibiosis.

2. ECOFLORA (Acondicionador biológico)

Este producto es fabricado por MUNDO VERDE, casa comercial que recomienda utilizar de 500 a 1 Kg. / Ha. Es un producto 100% orgánico, promueve la supervivencia y el crecimiento de las plantas recién sembradas y las ya establecidas. Es un concentrado seco de microorganismos benéficos *Bacillus subtilis*, *B. Polimyxa*, *B. Pumilus*, *Penibacillus exotofixans*, *Pseudomonas aureofaciociens*, *Streptomyces lybicious*, *Trichoderma harcianum*, aminoácidos esenciales, vitaminas, biotinas, ácido fólico y azúcares naturales.

Modo de acción: Se logra la exclusión competitiva, debido a que los microorganismos de ecoflora son más eficientes en la adquisición de nutrientes que los organismos patógenos. Por otra parte, excreta quitinasas, enzimas que degradan la quitina presente como componente estructural de la pared celular de hongos patógenos y finalmente presenta exudación de antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas en hongos patógenos, acciones éstas que le confieren actividad biocontroladora.

3. ECOFUNGI (Inoculante de micorrizas).

Este producto es fabricado también por MUNDO VERDE, que recomienda utilizar 250 g. / Ha. Es un concentrado de esporas de tres especies de micorrizas en polvo, seleccionadas por su compatibilidad, con variedad de plantas, alto grado de colonización, adaptación a diversos suelos y a diferentes condiciones ambientales. El tamaño de la partícula es inferior a 0.2 milímetros, que lo hace ideal para aplicaciones por rocío, por inmersión de raíces o por irrigación en suelos porosos.

Tiene una concentración mínima garantizada de 280.000 esporas de micorrizas por kilogramos

Modo de acción. Este caso no se indica acción funguicida específica sino que producen sustancias que estimulan el crecimiento de las raíces, mejoran la

adquisición de nutrientes disponibles y limitantes (P;Zn;Cu) y reducen los efectos estresantes causadas por: sequías, sales, pesticidas, temperaturas extremas, metales pesados como (Al), organismos patógenos. De esta forma al aumentar vigor y bienestar de la planta esta podría defenderse de organismos patógenos

4. 3b112 S.C.(Inhibidor de la esporulación de hongos)

Este producto es fabricado por IREC, casa comercial que recomienda utilizar 200 cc / Ha. Es un fungicida natural botánico de contacto, de alto poder, que actúa en varios sitios del hongo (multisitio). Ideal para ser utilizado en programas permanentes de manejo integrado de plagas y enfermedades (M I P E). Su fórmula a base de aceites esenciales (50%) y sales minerales (50%), hace que su fijación sea más rápida, no se especifica de que aceites y sales minerales está compuesto el producto.

Modo de acción: Actúa como inhibidor de la esporulación de hongos fitopatógenos del orden de los *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes*, favorece a mecanismos de defensa propios de la planta, no crea resistencia.

5. BANKIT (Fungicida sistémico) (Testigo referencial)

Este producto es fabricado por SYNGENTA AGRO, S.A. DE C.V. Se recomienda utilizar 400ml de i.a/Há. Es un fungicida sistémico a base de Azoxistrobina con efectos preventivos y/o curativos. Fungicida que al ser aplicado en las hojas, es absorbido, presentando movimiento translaminar y un ligero movimiento a través de las nervaduras de la hoja vía xilema.

Modo de acción. Inhibe la esporulación y crecimiento de algunos patógenos causante de enfermedades en diversos cultivos. La *azoxystrobina* se comenzó a vender por primera vez en 1998, y es un fungicida sistémico y de contacto, de amplio espectro, cuya actividad está dirigida contra los cuatro principales

grupos de hongos patógenos: *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes* y *Oomycetes*. Inhibe la germinación de las esporas y el crecimiento micelial. Según la agroquímica Zeneca Agro (de Syngenta), este fungicida pertenece a la nueva familia química de las estrobilurinas, compuestos naturales producidos por los hongos *Oudemansiella mucida* y *Strobilurus tenacellus*, que crecen en la madera en descomposición.

6. *Trichoderma stromaticum* (INIAP).

Hongo aislado de huerta de cacao específicamente en escobas secas.

Su acción parasítica sobre el micelio de *M. pernicioso* previene la formación de nuevo inóculo por la supresión de la formación de basidiocarpos. Es categorizado como un parásito directo del micelio del patógeno.

7. Testigo

Para el primer experimento tenemos las escobas secas sin aplicación de los productos, para el segundo ensayo las cajas Petri con las colonias de escoba de bruja sin inoculación alguna y para el tercer ensayo las plántulas inoculadas con esporas de *M. pernicioso* con una concentración de 25000 esporas/ml.

G. Tratamientos a usar. En los tres experimentos que se describen más adelante se usaron los tratamientos y dosis que se indican en el siguiente cuadro.

Cuadro 2. Dosis de productos comerciales por ha. de los biorracionales que se usaran en el proyecto de tesis.

Producto	Dosis/ha
Trichoeb	150 g
Ecoflora	2 kg
Ecofungi	250 g
T. stromaticum	1×10^{12} esporas
Azoxistrobina (Bankit)	400 cc
3b112	200 cc
Testigo	0

H. Experimento 1.

Efectos de productos biorracionales sobre la producción de basidiocarpos en escobas secas.

1. Diseño Experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), constituido por 7 tratamientos con 4 repeticiones por cada producto. El análisis de variancia correspondiente se indica en el cuadro 3. para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico Infostat 2012.

Cuadro 3. Análisis de varianza del primer experimento EET-Pichilingue, INIAP, 2013.

Fuente de variación		Grados de libertad
Tratamiento	$t - 1$	6
Error	$t(r - 1)$	21
Total	$rt - 1$	27

Para la comparación de los promedios entre tratamientos se efectuó la prueba estadística de Tukey con un nivel de significancia del 95 % de probabilidad.

2. Recolección y selección de material en campo.

La recolección de las escobas secas se la realizó en época seca donde la escoba se encuentra en un periodo de dormancia, las escobas fueron seleccionadas por su color marrón y que estén libres de otro patógeno pero por seguridad antes de entrar al invernadero lugar del experimento se le aplicó un fungicida sistémico (Benlate al 10%) con dosis alta.

3. Preparación de los productos para sumergir las escobas secas.

Para este experimento toda la dilución de los productos está dada en 10 litros de agua.

Se procedió pesar la dosis correspondiente a cada uno de los productos, se agitó la mezcla para conseguir una solución o suspensión uniforme y se sumergieron las escobas por 5 minutos. Para *Trichoderma Stromaticum* se preparó una suspensión de $1,25 \times 10^{11}$ esporas; luego de ese lapso se colocaron sobre una malla con objetivo que se escurran por 24 horas, pasando ese tiempo se trasladaron al umbráculo “Escobero” y se mantuvieron con riego por aspersión en régimen de 8 horas y 16 de sequía para estimular la producción de basidiocarpos los datos se registraron cada 15 por 1 mes.

El tratamiento con *T. stromaticum* se trató de manera diferente para evitar contaminar los demás tratamientos; se construyó una cámara húmeda con estructura de madera y cubierta con un plástico semitransparente, las escobas se colgaron dentro de la cámara y se la sometió al mismo régimen que las demás usando un aspersor manual para formar el microclima óptimo.

4. Variables registradas.

4. 1. Número de basidiocarpos antes de la inoculación.

Antes de ser sumergidas en los biorracionales con sus respectivas dosificaciones se contaron los basidiocarpos para correlacionar después de la inoculación y saber si hubo o no inhibición.

4.2. Número de basidiocarpos después de la inoculación en periodos de 15 días.

Después de cada lapso de tiempo (15 y 30 días) se contará el número de basidiocarpos presentes en la superficie de las escobas.

I. Experimento 2:

Confrontación de los productos con *M. perniciosa* en placa de PDA precolonizada.

1. Diseño Experimental

En este experimento se usó un Diseño Completamente al Azar (DCA), los tratamientos se originaron a partir del factor en estudio (Biorracionales) los cuales se aplicarán por separado. La unidad experimental estaba constituida por 10 platos petri por cada tratamiento; y en cada repetición se añadió un testigo referencial (colonias de *M. perniciosa*).

Cuadro 4. Análisis de varianza del segundo experimento EET-Pichilingue, INIAP, 2013.

Fuente de variación		Grados de libertad
Tratamiento	$t - 1$	6
Error	$t(r - 1)$	63
Total	$rt - 1$	69

Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico Infostat, versión estudiantil 2012. Para la comparación de los promedios entre tratamientos se efectuó la prueba estadística de Tukey con un nivel de significancia del 95 % de probabilidad.

2. Descripción de la metodología

Para el primer caso se recolectaran escobas vegetativas del campo para ser aisladas en laboratorio en medio artificial PDA (patata - dextrosa - agar), para posteriormente ser inoculadas.

Para los químicos se mezcló con el medio nutritivo PDA siendo bien homogenizada.

3. Preparación de los productos

Se procedió a pesar y a medir la dosis de cada uno de los productos estudiados, y se procedió a obtener una solución en 100ml de agua estéril. Seguidamente colocaron tres gotas de 10 microlitros equidistantes alrededor de la colonia en *M. perniciosus* creciendo en medio PDA.

Para el tratamiento de Bankit y 3b112 la respectivas dosis se suspendieron en agua destilada esteril (50ml) y se mezclaron con el PDA previamente esterilizado, calculando mantener la concentración de agar, este ultimo. Se colocó el medio en cajas petri, se dejó enfriar y luego se inocularon con *M. perniciosus* en el centro de la caja

4. Variables registradas.

5.1 Crecimiento radial.

Se registró el crecimiento micelial de la colonia *M. perniciosa* desde el día de la inoculación hasta que el testigo cubra todo el diámetro de la caja petri, el cual es de 9 cm.

5.2 Reacción física del patógeno.

En esta variable se registrara cualquier cambio en el aspecto físico tanto de la colonia como del medio de cultivo al ser comparada con el crecimiento normal del testigo en PDA.

J. Experimento 3.

Efecto de los biorracionales en plántulas inoculadas con *M. perniciosa*.

1. Análisis estadístico

Los tratamientos utilizados en el presente ensayo consideraron dos factores. El primer factor correspondió a las etapa pre y post inoculación del patógeno (*M. perniciosa*) y el segundo factor por la aspersión de los productos Biorracionales en estudio. Para el efecto, se utilizó un Diseño Completamente al Azar con 10 observaciones (repeticiones). El esquema del análisis de varianza se presenta en el cuadro 5. Para la diferencia de las medias de los tratamientos, se empleó la prueba de rangos múltiples Tukey al 95% de la probabilidad.

Cuadro 5. Análisis de varianza

Fuente de variación		Grados de libertad
Factor 1 (tratamiento)	$t - 1$	5
Factor 2 (inoculación)	$i - 1$	1
Factor 1 x Factor 2	$(t - 1)(i - 1)$	5
Error	$ti(r - 1)$	108
Total	$tir - 1$	119

2. Descripción de Metodología

Para este estudio se usaron plantas de semillas de libre polinización del clon EET-95 que es susceptible a escoba de bruja.

3. Obtención de semillas y plántulas para inoculación.

Se procedió a recolectar frutos del clon EET-95 para posteriormente remover la testa y el mucilago de la semilla para que esta tenga uniformidad al germinar al ser sembrada en conos plásticos de 288 cm³ con un sustrato de tierra de montaña y aserrín de balsa con relación de 4:1. Usamos un total de 120 plantas, 60 plantas para la pre inoculación y 60 para la post inoculación.

Para las semillas pre germinadas se procedió a cubrirlas con papel toalla dándole humedad permanente para su germinación, al tener la radícula un tamaño de 5cm y que sus raíces secundarias sean visibles se inocularon.

4. Obtención de basidiocarpos para inoculación

Siguiendo procedimiento estándar en el laboratorio, se recolectaron basidiocarpos en horas de la tarde y llevados al laboratorio. Los píleos de los basidiocarpos se adhirieron con vaselina en la tapa de una caja petri con las laminillas hacia fuera seguidamente se colocaron sobre un vaso de precipitación que contenía 10 ml de una solución colectora denominada Solución A.(16% de glicerol, buffer MES [2-(N-Morpholino ethanensulfonic acid)], agua destilada, 0.01 % de Tween-20 y el pH fue ajustado a 6,2).

La descarga de basidiosporas sobre la solución colectora se realizó durante la noche, manteniéndose en agitación constante con la ayuda de una barra

agitadora y un plato agitador magnético que conservaba dispersas las basidiosporas.

A la mañana siguiente se recolectó la solución A conteniendo las basidiosporas, para ser almacenadas en cápsulas de polipropileno de 2ml y conservadas en un tanque con Nitrógeno líquido. Una muestra de la solución, se separaba para determinar su capacidad de germinación y calibrar su concentración en un hematocimetro. El porcentaje de germinación se determinó colocando cuatro gotas de la solución A con basidiosporas en una caja petri conteniendo agar-agua, al cabo de dos horas se detuvo la germinación con tripan blue y se escogieron cuatro campos ópticos para realizar contajes de 150 a 200 basidiosporas. El porcentaje de germinación de las basidiosporas en la solución colectora es usado para tener un conocimiento del número de basidiosporas viables/ml (Purdy *et al.*, 1997; Luz *et al.*, 1999).

5. Preparación de inóculo

Para la preparación del inóculo se siguió la metodología descrita por el Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV) y Frías *et al.*, 1995.

Para permitir la germinación de las basidiosporas es necesario bajar la concentración de glicerol de la solución colectora del 16 al 3%; siendo necesario el uso de dos diluyentes (Solución B y Solución C).

6. Soluciones necesarias para la preparación de inóculo:

6.1 Solución A: Solución colectora: 160 ml de glicerol, 1,95 g de MES [2-(N-Morpholina ethanensulfonic acid)], 840 ml de agua destilada, ajustar el pH a 6,2 con NaOH.

6.2 Solución B: Dilución del glicerol: 1,95 g de MES, 1000 ml de agua destilada y el pH ajustado a 6,2 con NaOH.

6.3 Solución C: La solución inóculo: 30 ml de glicerol, 1,95 g de MES, 970 ml de agua destilada y pH ajustado a 6,2 con NaOH. En las tres soluciones se añadió 0,01% de Tween 20 antes de usar. Las tres soluciones fueron autoclavadas y almacenadas a 3°C, para su utilización.

7. Inoculación de semillas pre germinadas y plántulas

Para el caso de las semillas pre germinadas simplemente se disolvieron los productos biorracionales con su respectiva dosis y luego se sumergían por 5 minutos.

En el producto Bankit se realizó la pre inoculación 3 días antes de ser inoculada con el patógeno y las post inoculación tres días después de ser inoculada con el patógeno.

La inoculación en las plántulas se realizó cuando el brote tenía un tamaño de 2 a 3 siguiendo metodología de “agar – drop”, desarrollada por Surujdeo-Majarah (2002). Para el efecto se inocularán los brotes apicales de plántulas provenientes del clon EET- 95, previamente inoculadas con los productos biorracionales.

Este método consistió en depositar una gota (30 ul) de la suspensión de inóculo diluida en 0.3% de agar, sobre el meristemo apical de cada plántula, usando una micro pipeta(figura 14). Se utilizará la concentración de inóculo de 25000 esporas/ ml.

Después de la inoculación las plántulas se trasladaron a una cámara de incubación regulada a 25°C y 100% de humedad relativa. En este sitio permanecieron por 24 horas siguiendo el procedimiento descrito por Revelo (2010)

8. Formas de aplicación

- a) Se inoculó *M. perniciosa* y después de tres días se aplicaron los productos estudiados.
- b) Se aplicaron primero los productos estudiados y cuando la plantula tenga un tamaño de brote de 2 a 3cm se inoculó *M. perniciosa*.

La evaluación se realizó diariamente después de realizar la inoculación tanto del hongo como de los productos biorracionales hasta que el 50% de las plántulas muestren síntomas del hongo.

9. Variables

9.1 Período de Incubación (PI).

Este comprende el tiempo desde la inoculación hasta la aparición del primer síntoma. La evaluación fue diaria, hasta cuando el 50% de las plántulas inoculadas presenten síntomas

9.2 Incidencia (I).- Es decir el numero de plantas q presentaron infección. Se registró en porcentaje.

10. Manejo de las plántulas después de la inoculación

Las plántulas inoculadas se evaluaron en invernadero por un período de dos meses a partir de la inoculación, recibieron dos a tres riegos semanales., según fuera necesario.

IV RESULTADOS

A. Efectos de productos biorracionales sobre la producción de basidiocarpos en escobas secas.

Este experimento consto de dos variables que son número de basidiocarpos antes y después de la inoculación evaluados a los 15 y 30 días.

Todos los productos biorracionales utilizados en este ensayo causaron algún tipo de efecto en esta variable, tal y como se observa en Figura 1, donde los productos, Stromaticum, Trichoeb y bankit redujeron significativamente la producción de basidiocarpos tanto a los 15 como a los 30 días, efecto menos marcado mostraron Ecoflora, Ecofungi los cuales presentaron valores cercanos al testigo.

Contrastando el efecto de los demás productos, 3B112 no causo ningún efecto antifungico en las escobas ya que presento una mínima diferencia a los 15 días y el mismo valor que el testigo a los 30 días (Cuadro.....).

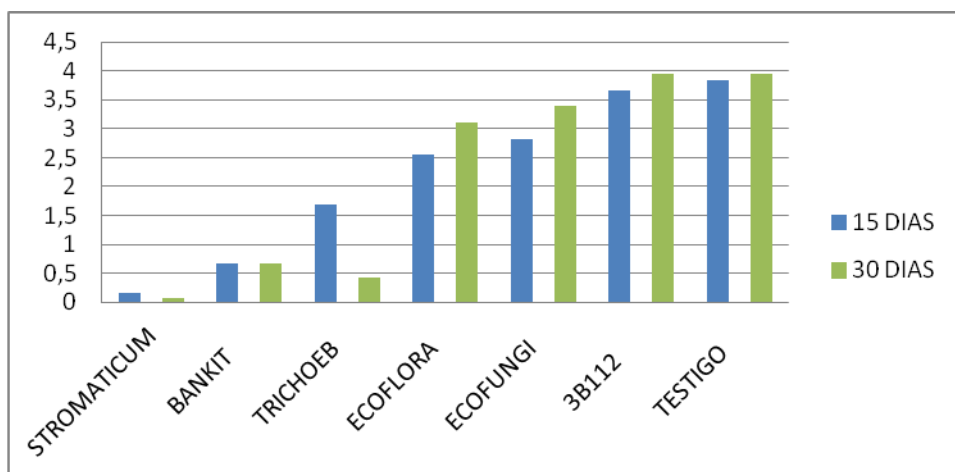


Figura 1. Número de basidiocarpos por escoba producidos en los diferentes tratamientos 15 y 30 días después de la aplicación.

B. Confrontación de los productos con *M. pernicioso* en placa de PDA precolonizada.

En este experimento se clasifico los productos aplicados en dos grupos: 1er Grupo: Stromaticum, Trichoeb, Ecoflora, Ecofungi y en el 2do Grupo: Bankit y 3b112.

En este experimento Stromaticum difirió estadísticamente de los demás tratamiento en estudio, presentando el menor valor para esta variable a excepción de Trichoeb que ocupa el segundo lugar, no difiriendo estadísticamente de los demás tal y como se observa en la figura 2.

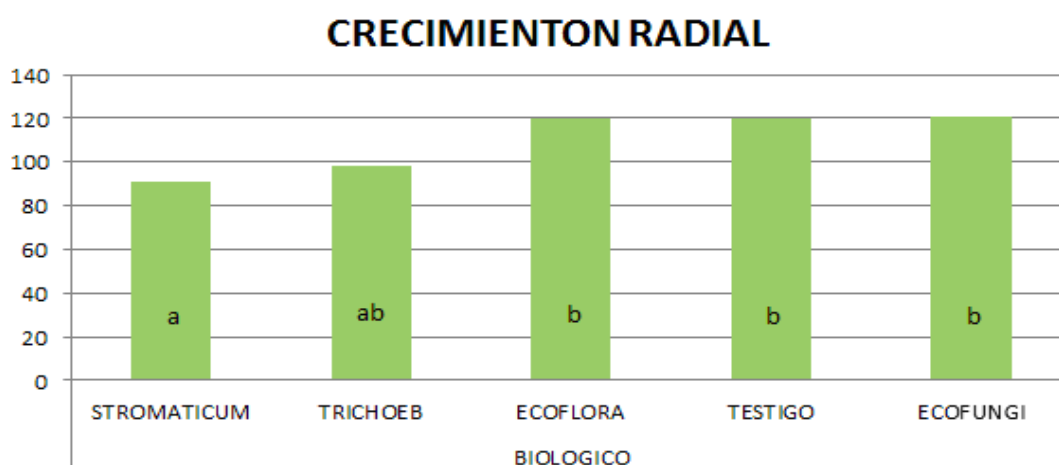


Figura 2. Efecto de los productos biorracionales- biológicos (Stromaticum, Trichoeb, Ecoflora, Ecofungi) sobre colonias de *M. pernicioso*, en variable crecimiento radial. EET-Pichilingue, INIAP, 2012.

En la Figura 3 se observa claramente como bankit, inhibe el crecimiento de *M. pernicioso*, a diferencia de 3B112 el cual en comparación al testigo ejerce un mínimo efecto antifúngico.

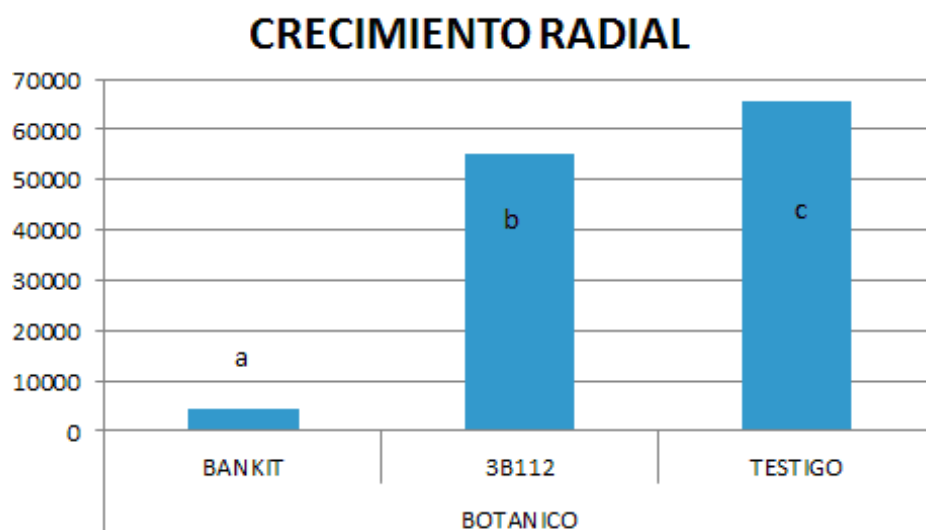


Figura 3. Efecto de los productos biorracionales- botánicos (Bankit, 3b112) sobre colonias de *M. perniciosus*, en variable crecimiento radial. EET-Pichilingue, INIAP, 2012.

En lo que respecta a la reacción física del hongo cada producto se comportó de manera diferente, alterando el aspecto de *M. perniciosus* en relación a la colonia testigo. *Stromaticum*, inhibió totalmente el desarrollo de escoba esto demuestra la capacidad antagónica del organismo, este esporula sobre la colonia de escoba tal y como se aprecia en la figura 4. (Lado izquierdo).

En el caso de Trichoeb le toma un poco más tiempo y su forma de demostrar su capacidad antagónica es un diferente al delimitar el crecimiento solo de los bordes hacia mientras que en diferencia con trichoeb es solo por los bordes, tal y como se puede apreciar en la figura 4.(lado derecho).

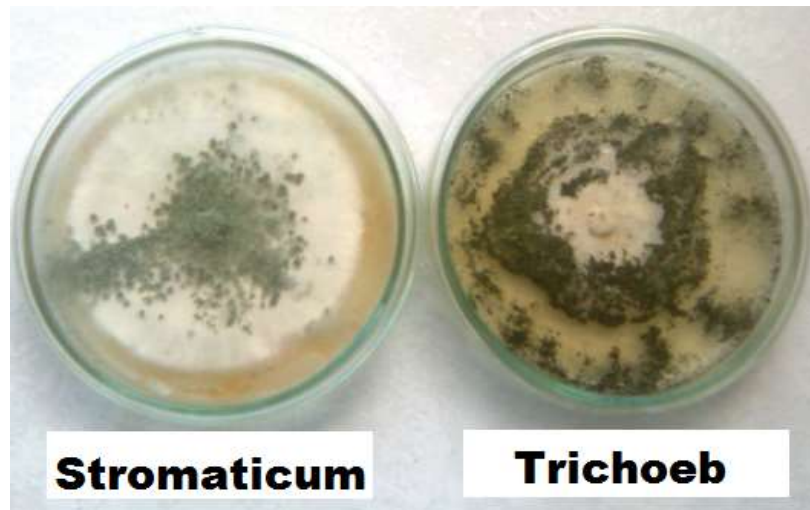


Figura 4. Colonización de Stromaticum y Trichoeb en colonias de *M. perniciosus* de 15 días de edad en PDA. EET-Pichilingue, INIAP, 2012.

Ecoflora (Lado izquierdo) no inhibió el crecimiento de *M. perniciosus* pero causó una reacción diferente en su aspecto, mostrando una colonia aterciopelada hialina muy diferente a su aspecto normal (el producto presento muchos agentes contaminantes (*Rhizopus* sp, *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp), claramente visible en la Fig 5. Reacción similar causó Ecofungi (Lado derecho, fig. 5).



Figura 5. Reacción de colonias de *M. perniciosus* de 15 días de edad en PDA a la adición de productos biorracionales (Ecoflora, Ecofungi). EET-Pichilingue, INIAP, 2012.

Con 3b112 tal y como se observa en la Fig. 6 (Lado izquierdo) la característica de la colonia en crecimiento era muy similar a la del testigo pero en su aspecto

fue muy diferente, presentándose como una colonia acuosa y compacta a diferencia de Bankit (lado derecho) además de provocar un cambio en su aspecto presento una colonia algodonosa y delimitada.

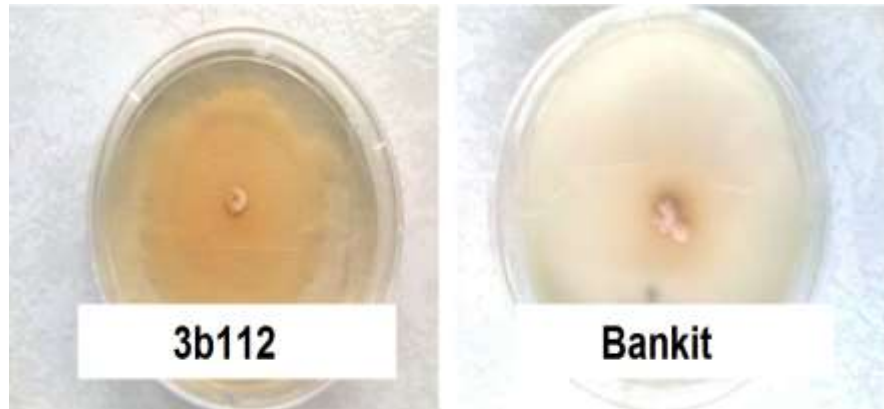


Figura 6. Reacción de colonias de *M. pernicioso* de 15 días de edad en PDA a la adición de productos biorracionales (3b112 y Bankit). EET-Pichilingue, INIAP, 2012.

En la **Figura. 7**, podemos observar el desarrollo esperado normal de una colonia de *M. pernicioso* en medio de cultivo PDA (Potato Dextrose agar, deshidratado) de 21 días de edad, aspecto contra el cual se comparan los resultados en este estudio..



Figura 7. Colonia de *M. pernicioso*, EET-Pichilingue, INIAP, 2012.

C. Efecto de los Biorracionales en plántulas inoculadas con *M. perniciosa*.

En la figura 8, correspondiente a la variable período de incubación, se aprecia que tanto la aplicación previa como post inoculación de la esporas de *M. perniciosa*, tienen un comportamiento similar en casi todos los productos, siendo Bankit con 25,92 días, Trichoeb con 22,51 y Stromatium con 20,96 días los que presentaron los mejores resultados, esto en la aplicación del producto previo a la inoculación de las esporas del patógeno. Cabe recalcar también BANKIT, fue superior a todos los otros tratamientos, tanto en la aplicación previa como en la post aplicación de las esporas de *M. perniciosa*.

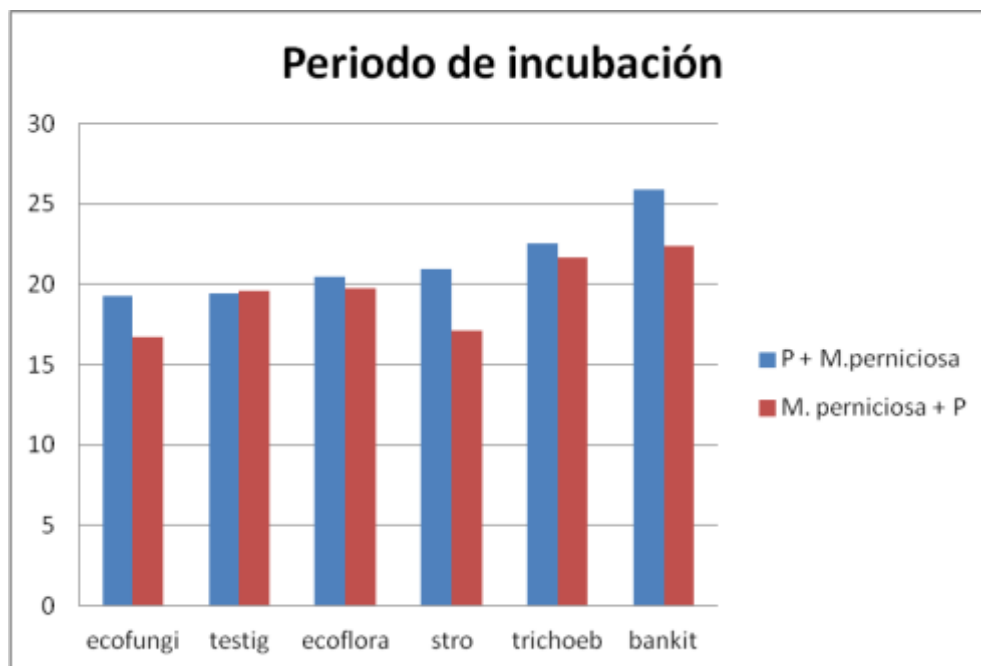


Figura 8. Interacción del producto con la inoculación de *M. perniciosa* en la variable Período de incubación EET-Pichilingue, INIAP, 2012.

Caso similar presento la variable incidencia, en la cual *Stromaticum*, bankit y Trichoeb siguen ubicados en las primeras posiciones, pero en un distinto orden, tal y como se puede observar en la Fig. 9, apareciendo Stromaticum con un 30% en primer lugar y ecofungi con un 87,5% en último lugar.

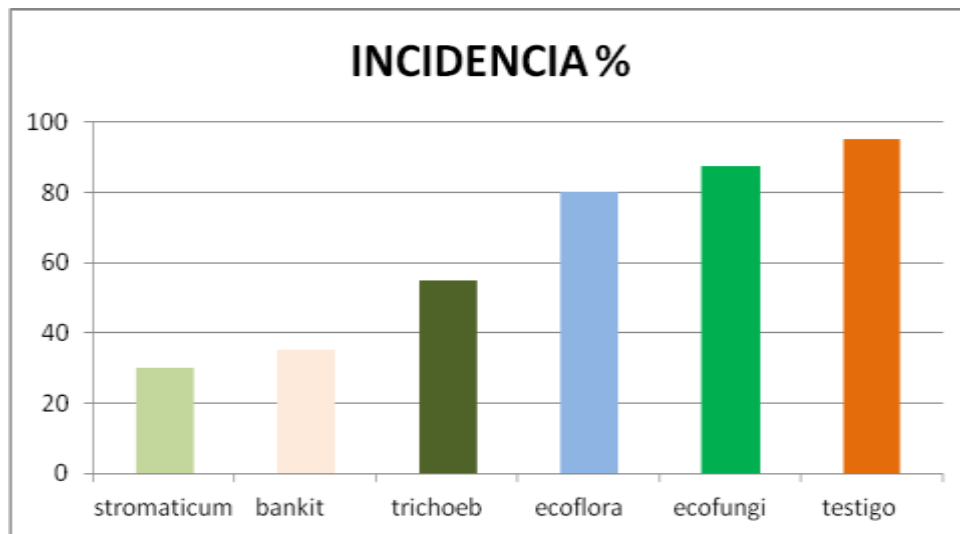


Figura 9. Incidencia (%) de *M. perniciosa* en plántulas de cacao EET-95, EET-Pichilingue, INIAP, 2012.

V. DISCUSION

En relación a la producción de basidiocarpos, los resultados indican que tanto el Bankit (Fungicida de origen orgánico) como los biorracionales *Stromaticum* y *Trichoeb* inhiben la producción de basidiocarpos dando los tres, los mejores resultados mientras que la eficiencia de *Ecoflora* y *Ecofungi*, realmente no promete mucho; resultados similares obtuvieron Arias y Guerrero, (2005) con *Stromaticum*. Por otra parte los resultados obtenidos con el tratamiento *Trichoeb* a base de conidias de *Trichoderma spp* ratifica lo enunciado por Hebbar, et al (2000) en relación al uso de *diversas especies de Trichoderma*

En el segundo ensayo al evaluar las variables crecimiento radial y reacción física del patógeno, presentan resultados similares al anterior experimento, con Bankit inhibiendo totalmente a *M. pernicioso*, seguidos muy de cerca por *Stromaticum* y *Trichoeb* los cuales cubrieron y rodearon respectivamente la colonia del patógeno evitando su crecimiento posterior a la inoculación con los biorracionales, esta es reacción característica de competencia de *Trichoderma spp*. Por su parte, los otros productos, 3b112, *Ecofungi* y *Ecoflora* causaron cambios en el aspecto de la colonia, presentándose esta como acuosa, algodonosa, aterciopelada respectivamente.

El tercer experimento consistió en la inoculación de semillas pregerminadas (con *Stromaticum*, *Trichoeb*, *Ecoflora*, *Ecofungi*) en donde se observó que los productos biorracionales aplicados ejercieron un mejor efecto antes de estar presente el patógeno, aunque los valores de post aplicación de los biorracionales no son tan desalentadores ejerciendo un excelente control, en ambos casos *Ecofungi* presenta los más cortos periodos de incubación. Resultados similares con *Ecoflora* y *Ecofungi* los presento Vélez, 2012, en el cual para la inhibición de *M. fijiensis* en ninguno de los ensayos establecidos presentaron buenos resultado ni en inhibición de germinación del patógeno ni como producto antifungico.

En plántulas de cacao EET-95 inoculadas en el brote (Stromaticum, Trichoeb, Ecoflora, Ecofungi, bankit) presento resultados similares al del ensayo anterior debido a que Bankit, Trichoeb y Stromaticum presentaron los periodos de incubación más largos tanto en post como en pre aplicación de los biorracionales, lo que podría explicar por qué Bankit presento el periodo de incubación más largo es que según García, 2003, el Bankit posee un efecto protectante , debido a que su translocación es vía xilema a distancias más largas del punto de aplicación, solo cambiando de lugar en incidencia ya que Stromaticun presento el menor porcentaje seguido de Bankit y en tercer lugar Trichoet, debido a que 3b112 no presento ningún efecto antifúngico en el primer ensayo no se lo utilizo. Por último los productos orgánicos son una buena alternativa preventiva, más que curativa ya que estos tienen un modo de acción por competencia de alimentos.

Con los antecedentes expuestos, los productos Stromaticum y Trichoeb (Biológicos) al igual que Bankit (Químico), sobresalen en la investigación con lo que se permite aceptar la hipótesis planteada la cual dice que; “Productos biorracionales existentes en el mercado controlan, eficazmente la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) en el cacao”, lo que permite la reducción del uso de moléculas químicas y su efecto nocivo en el ambiente.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos en la presente investigación se emiten las siguientes conclusiones y recomendaciones.

A. Conclusiones

1. BANKIT ratificase como un producto adecuado para el manejo de Escoba de Bruja. El producto presentó el segundo lugar en los resultados sobre la reducción de la incidencia de *M. pernicioso* en plántulas de cacao EET-95.
2. STROMATICUM Y TRICHOEB 5WP, demuestran su alta capacidad de control de *M. pernicioso* lo que los convierte en una herramienta eficaz a diferencia de productos como (Bankit) susceptibles de desarrollar resistencia del patógeno.
3. Independientemente del producto usado, todos ejercieron una actividad más bien protectora, reduciendo la acción del hongo en presencia del producto, la excepción fueron BANKIT y STROMATICUM que adicionalmente tuvieron acción terapéutica.
4. Los productos usados en esta investigación presentan buena actividad antifúngica aun en presencia inicial del hongo, con alta posibilidad de control aunque ya el hongo se halle en la planta. Esta acción es más visible con el BANKIT y STROMATICUM.

VII. Recomendaciones

- 1.** Ampliar esta investigación, aplicando estos productos a nivel de campo para confirmar resultados de su comportamiento en plantaciones ya establecidas y observar el impacto final en la producción de infecciones y reproducción del patógeno.
- 2.** Incluir a estos productos en programas de fumigación, combinado con la estrategia de manejo integrado del cultivo.

RESUMEN

La escoba de bruja, causada por *Moniliophthora perniciosa*. Esta enfermedad ataca al cultivo de cacao generando pérdidas del 40 al 70% de la producción, sin tomar en cuenta la reducción del vigor de la planta por el ataque a brotes, entrenudos y cojinetes florales y frutos, el mejor control para esta enfermedad es el manejo integrado del cultivo, que incluye podas anuales, adecuada fertilización, remoción semanal de frutos enfermos y aplicación de productos químicos protectores y el uso de los biorracionales, la agricultura actual demanda la reducción de plaguicidas químicos y la introducción a sistemas sostenibles, una de cuyas alternativas es el uso de agentes biorracionales, para el control de plagas y enfermedades que podría ser una estrategia promisorio de control. El presente estudio fue realizado en la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP y tuvo como objetivo estudiar la eficacia de seis productos biorracionales para el manejo de Escoba de bruja (*M. perniciosa*) en el cultivo De cacao (*Theobroma cacao L.*) a nivel de laboratorio e invernadero. Los productos biorracionales estudiados fueron: TRICHOEB 5WP (Acondicionador del suelo), ECOFLORA (Acondicionador biológico), ECOFUNGI (Inoculante de micorrizas), 3b112 S.C. (Inhibidor de la esporulación de hongos) y el BANKIT (Fungicida sistémico). En el ensayo de invernadero a nivel de Escobas secas se midieron las variables número de basidiocarpos antes de la inoculación y número de basidiocarpos después de la inoculación, en el ensayo de Laboratorio se midió Crecimiento radial del patógeno y Reacción física del hongo, a nivel de plántulas se estudió Periodo de incubación (Pi) y Incidencia. Para los dos primeros ensayos se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) y para el tercer ensayo se utilizó un Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial de 2 x 6 con 10 observaciones. Para la diferencia de las medias de los tratamientos, se empleó la prueba de rangos múltiples Tukey al 95% de la probabilidad. En el primer ensayo Stromaticum, Trichoeb y bankit redujeron significativamente la producción de basidiocarpos tanto a los 15 como a los 30 días. En el segundo ensayo Bankit y Stromaticum difirió estadísticamente de los demás tratamiento en estudio inhibiendo el

crecimiento radial del patógeno. En el tercer experimento siendo Bankit, Trichoeb y Stromatium los que presentaron los mejores resultados en la variable Periodo de incubación (PI) y en la variable incidencia Stromaticum, bankit y Trichoeb siguen ubicados en las primeras posiciones.

SUMMARY

The witches' broom, caused by pernicious *Moniliophthora*. This disease attacks the cocoa generating losses of 40 to 70% of production, without taking into account the reduction of plant vigor for the attack on shoots, internodes and bearing flowers and fruits, the best control for this disease is the integrated crop management, including annual pruning, proper fertilization, weekly removal of diseased fruits and application of protective chemicals and the use of biorational, current agricultural demand reduction of chemical pesticides and the introduction of sustainable systems, one of whose alternative is to use biorational agents for the control of pests and diseases that could be a promising strategy to control. This study was conducted at the Experimental Station of Tropical Pichilingue INIAP and aimed to study the efficacy of six biorational products for handling Witches' broom (*M. perniciosa*) in cocoa (*Theobroma cacao* L.) at laboratory and greenhouse. Biorational products studied were: TRICHOEB 5WP (soil conditioner), ECOFLORA (biological Conditioner), ECOFUNGI (mycorrhizal inoculant), 3b112 SC (Inhibitor of fungal sporulation) and Bankit (systemic fungicide). In the greenhouse trial dry Brooms level variables were measured number of basidiocarps before inoculation and number of basidiocarps after inoculation in the laboratory test was measured radial growth of pathogenic fungus and physical reaction at the level of seedlings was studied incubation period (Pi) and incidence. For the first two trials used a completely randomized design (DCA) and the third trial used a completely randomized design with factorial arrangement of 2 x 6 with 10 observations. For the difference of treatment means, we used the Tukey's multiple range test at 95% probability. In the first trial stromaticum, Bankit Trichoeb and significantly reduced production of both basidiocarps 15 as at 30 days. In the second trial and stromaticum Bankit differ statistically from the other study treatment inhibiting radial growth of the pathogen. In the third experiment being Bankit, Stromaticum Trichoeb and those with the best

results in the variable incubation period (IP) and the variable incidence
stromaticum, Bankit and Trichoeb still located at the top.

BIBLIOGRAFIA

Aime, M. C. and Phillips-Mora, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (Chocolate, *Theobroma cacao*) from a new lineage of Marasmiaceae. *Mycology* 97(5):1012-1022.

ANECACAO (Asociación Nacional de Exportadores de Cacao). 2006. Origen del cacao en el Ecuador. Disponible en <http://www.anecacao.com/Espanol/espanol.htm>

Angamarca, M. 2007. Determinación del comportamiento de los cultivares de cacao tipo forastero (*Theobroma cacao*), frente al ataque del hongo *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted, a nivel de laboratorio y campo. Tesis de grado para ingeniero agrónomo. Quito, Ecuador. Universidad Central del Ecuador.

Bastos, C. 2005. Estrategias de controle biológico de fitopatógenos de cacaueiro. In Annais VIII Reuniao de control Biologico de Fitopatoxenos. Ministerio de agricultura, pecuaria e Abastecimento / CEPLAC (BR). p. 25-27

Bateman, R. 2004. Constraints and enabling technologies for mycopesticides development. In Outlooks on Pest management/Pesticide Outlook 2004 p. 64-65.

Baker, D.; Holliday, P. 1957. Witches broom disease of cacao (*Marasmius perniciosus* Stahel) *Phytopathological Papers* N°2. Kew: Commonwealth Micological Institute. 42 pp.

Del Pozo, P. 2005. Comparación de métodos para evaluación temprana de Resistencia a escoba de bruja *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer en cacao (*Theobroma cacao*). Tesis de grado para ingeniero agrónomo. Quito, Ecuador. Universidad Central del Ecuador. 63p.

EVANS, H.; 1999. Classical Biological Control. In Workshop Manual: Research Methodology for the Biological Control of plant diseases with special reference to fungal disease of cocoa. CATIE, Costa Rica. Krauss U and Hebbbar P. (Eds).

----- 2007. Cacao disease-The trilogy revisited. Phytopathology 97: 1640-1643.

Enriquez, 2004. Cacao orgánico. Guía para productores ecuatorianos. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Manual N° 54. p 241-246.

Evans, H.C. 1978. Witches broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*) in

.

Fokkema, N. 1995 Strategies for biocontrol of foliar fungal diseases. In M. MANKA (Ed), Environmental Biotic Factors Integrated Plant Disease Control. The Polish Psychopathological Society, Pozman, p. 69-79.

Gallegos, 2011. Bioinsecticida controlador de las tres clases de polillas de la papa, Boletín de prensa Nro. 0038, coordinación de comunicación social INIAP.

Griffith, G; Nicholson, J; Nenninger, A; Birch, R; Hedger, J. 2003. Witches Broom and Frosty pod: Two major pathogens of cocoa. New Zeland. Journal of Botany 41: 423-435.

Hjeljord, L.; Tronsmo, A. 1998. Trichoderma and Gliocadium in biological control: an overview. In Harman, G. & Kubicek, C. Trichoderma & Gliodadium II: Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor & Francis Ltd. P. 131-152.

Holliday. 1980. Fungus disease of tropical crops. New York, USA Cambridge University Press. P 115-177.

Krauss, U.; Soberanis, W. 2003. Biological control of frosty pod (*Moniliophthora roreri*) and other pod pathogens in Peru. In 13 Conferencia Internacional de Investigacion en cacao. p. 741-748

Lorito, M.; Woo, S.; D'Ambrosio, M.; Harman, G.; Hayes, C.; Scala, F. 1996. Synergistic interaction between cell Wall degrading enzymes and membrane affection compounds. *Molecular Plant Microbiology Interactions* 9:206-213.

Meinhardt, L; Rincones, J; Bailey, B; Aime, M; Griffith, G; Zhang, D; Pereira, G. 2008. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches broom disease of cacao: what's new from this old foe? *Molecular pathology* (5): 577-588.

Purdy, L; Schmidh, R. 1996. Status of cacao witches broom: biology, epidemiology and management. *Annual Review of Phytopathology* 34: 573-594.

Revelo, S. 2010. Ajustes de metodologia de evaluacion temprana para la busqueda de resistencia a *Moniliophthora perniciosa* (stahel) Aime & Phillips-Mora. Tesis de grado para ingeniero agrónomo. Quito, Ecuador. Universidad Central del Ecuador. 71 p.

Ristaino, J.; Lewis, J.; Lumsden, R. 1994. Influence of isolates of *Gliocladium virens* and delivery systems on biological control of

southern blight on carrot and tomato in the field. Plant Disease. 78(2): 153-156.

Rivera, J. 1995. Evaluación de la reacción de materiales promisorios de cacao de origen nacional a Escoba de Bruja *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer. Tesis de grado para ingeniero agrónomo. Guayaquil, Ecuador. Universidad Agraria del Ecuador. 88p.

Suarez, C. 1979. Las enfermedades del cacao en Latinoamérica. *In* 7ma Conferencia internacional de Investigación en cacao. Douala. Camerún. p 257- 254.

-----, C. 1993. Enfermedades de cacao y su control. In manual del cultivo de cacao, II Edicion. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Quevedo-Ecuador.

-----, 1996. Control de enfermedades de cacao en un sistema sostenible de producción agrícola en el Litoral Ecuatoriano. Revista informativa del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias N°7. p 8-11.

-----, C.; Solis, K. 2003. Tacticas de manejo integrado de enfermedades disponibles para producción de cacao organico en el Ecuador. In 1er. Seminario Nacional de Investigacion en Agricultura Organica. EETP-INIAP/PROCIANDINO/ GTZ. Tema 11.

Solis, K. 1999. Determinacion de organismos antagonicos a Monilia historia del cultivo de cacao en el Ecuador. Origen del cultivo y exportación en América roreri a partir de mazorcas de cacao dejadas en el suelo. Tesis Ing. Agr. Guayaquil, Ecuador. Universidad de Guayaquil 55p.

SICA (Servicio de Información y Censo Agropecuario) 2006. Breve Tropical. Disponible en www.sica.gov.ec/cadenas/cacao/docs/.htm.

Surujdeo Maharaj, S. 2002. Development of an optimised inoculation method to identify resistance to Witches' broom disease in cacao. Report annual 2002. Cocoa Reseach Unit. The University of the West Indies. p. 44-52

Wheeler, B; Mepsted, R. 1988. Phathogenic variability amongst isolates of *Crinipellis perniciosa* from cocoa (*Theobroma cacao*). Plant Pathol. 37: 475-488.

-----; Suarez, C. 1993. The pathosystem. In: Rudgard SA, Maddison AC, Andebrhan T, eds. Disease Management in Cocoa: Comparative Epidemiology of Witches' Broom. London, UK: Chapman & Hall, p 9-19.

ANEXOS

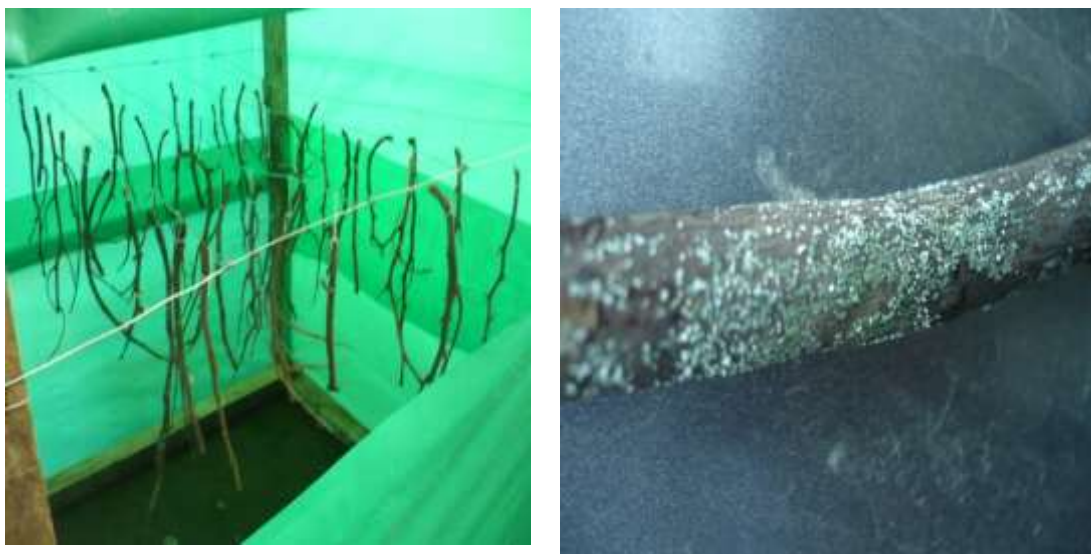
Anexo 1.- Sitio especialmente apropiado para la producción de basidiocarpos (escobero)



Anexo 2.- Escobas inoculadas con los productos biorracionales



Anexo 3.- Cámara húmeda para la inoculación de las escobas con stromaticum



Anexo 4.- Crecimiento *in vitro* de *M. pernicioso* en medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar).



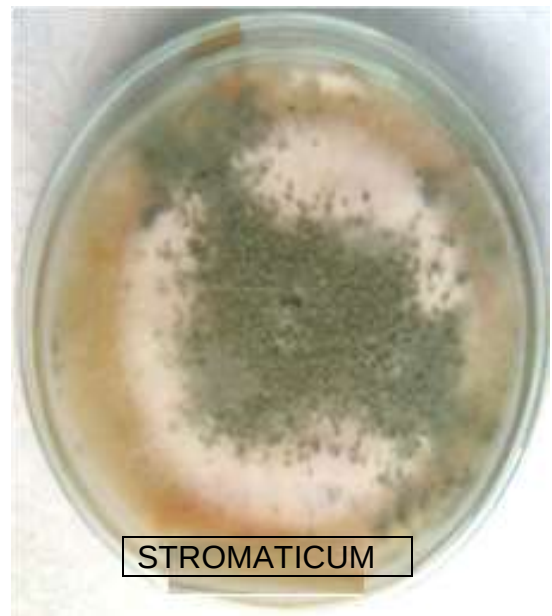
Anexo 5.- colonia pura y de tamaño óptimo para inocular en cada punto señalado.



Anexo 6.- Inoculación con micro pipeta de 10 ul.



Anexo 7.- *Trichoderma stromaticum* demostrando su agresividad ante escoba de bruja



Anexo 8.- *Trichob* inhibiendo completamente a escoba.



Anexo 9.- Reacción física del patógeno al presentar una coloración más intensa que la del testigo.



Anexo 10.- Reacción de crecimiento anormal del patógeno con el medio nutritivo PDA mezclado con Bankit.



Anexo 11.- Crecimiento del patógeno en medio PDA mezclado con 3b112



Anexo12.- Semilla sin mucilago ni testa y cubierta con papel toalla humedecido con agua estéril.



Anexo 13.- Semilla pre germinada con tamaño de radícula de 5 cm mostrando sus raíces secundarias sumergidas en sus respectivos productos.



Anexo 14.- Recoleccion de basidiocarpos. Y el pileo pegado en una caja Petri untada con vaselina.



Anexo 15.- Descarga de espora en el laboratorio y recolección de inóculo



Anexo 16.- Preparación de inóculo de escoba de bruja



Anexo 17.- Inoculación de plantas de cacao con el método Agar-drop.



Anexo 18.- Síntomas provocados por Escoba de bruja



Anexo 19.- Vista general del invernadero donde se ubicó las plantas inoculadas con *M. pernicioso*.

