# UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

## UNIDAD DE ESTUDIOS A DISTANCIA

## MODALIDAD SEMIPRESENCIAL

## CARRERA INGENIERÍA AGROPECUARIA

**Tema de Tesis**

# COMBINACION DE AGENTES BIOLOGICOS PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES DEL FRUTO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)

**Previo a la obtención del título de:**

**INGENIERO AGROPECUARIO**

**Autora**

**SOFIA LORENA PEÑAHERRERA VILLAFUERTE**

**Director de Tesis**

**Ing. FREDDY JAVIER GUEVARA SANTANA, M.Sc**

**Quevedo - Ecuador**

**2013**

## DECLARACION DE AUTORIA Y CESION DE DERECHOS

Yo, **SOFIA LORENA PEÑAHERRERA VILLAFUERTE**, declaro que el trabajo aquì descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningùn grado o calificaciòn profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, segùn lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

SOFIA LORENA PEÑAHERRERA VILLAFUERTE

## CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

El suscrito, Ing. Freddy Javier Guevara Santana**,** M.Sc., Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la Egresada Sofia Lorena Peñaherrera Villafuerte, realizó la tesis de grado titulada "COMBINACION DE AGENTES BIOLOGICOS PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES DEL FRUTO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)**"**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Freddy Javier Guevara Santana, M.Sc

**DIRECTOR DE TESIS**

# UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
# UNIDAD DE ESTUDIOS A DISTANCIA CARRERA
# INGENIERÍA AGROPECUARIA

**"COMBINACIÓN DE AGENTES BIOLÓGICOS PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES DEL FRUTO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)"**

**TESIS DE GRADO**

Presentado al Comité Técnico Académico como requisito previo a la obtención del título de **INGENIERO AGROPECUARIO**

**Aprobado:**

**Ing. Caril Arteaga Cedeño, M.Sc.**
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

**Ing. Jessica Mackencie Álvarez, M.Sc.**
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**Ing. María del Carmen Samaniego, M.Sc.**
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**QUEVEDO – ECUADOR**

**2013**

## AGRADECIMIENTO

A mí amada familia Peñaherrera Villafuerte y Gavilanes Peñaherrera por su amor y confianza, por acompañarme en cada paso que he dado.

A mí adorado tío, Segundo Villafuerte Marín, sé que hoy no estás aquí conmigo para celebrar este triunfo, aprendí que las metas si se pueden cumplir.

A los miembros del proyecto "Desarrollo de un sistema de manejo integral de las enfermedades de cacao con énfasis en control biológico" USDA – ARS por la oportunidad brindada, en especial al Dr. Bryan Bailey.

A Carmita Suárez Capello, Jayne Crozier, Rachel Melnick, Ronald Collins, Eduardo Hidalgo y Claudio Arroyo por su amistad, orientación y sugerencias para el desarrollo de esta investigación.

A Stela Dalva Vieira Midlej Silva, Socorro García y Jorge Mendoza mi agradecimiento fraterno por su amistad y apoyo brindado durante estos años.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias - Departamento de Protección Vegetal por brindarme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo.

A la Unidad de Estudios a Distancia de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

A Javier Guevara Santana, por la dirección de mi tesis.

A mis queridos docentes por sus conocimientos y experiencias que fueron parte de mi formación: Carmita Samaniego, Ricardo Luna, Marlene Medina y Héctor Castillo, gracias por su colaboración en mi formación como profesional.

Mi eterno agradecimiento a quienes aportaron de una u otra manera a lo largo de mi vida, para que este sueño se haga realidad, gracias a todos.

# ÍNDICE GENERAL

Portada ..... I
Declaración de autoría y cesión de derecho ..... II
Certificación de la Director de Tesis ..... III
Tribunal de Tesis ..... IV
Agradecimiento ..... V
Índice general ..... VI
Índice de cuadros ..... VIII
Índice de figuras ..... IX
Índice de anexos ..... X
Resumen ejecutivo ..... XI
Abstrac ..... XII
**CAPITULO I** ..... 1
**MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACION** ..... 1
1.1. Introducción ..... 2
1.2.Justificación ..... 5
1.3. Objetivos ..... 6
1.3.1.General ..... 6
1.3.2.Especificosl ..... 6
1.4. Hipótesis ..... 6
**CAPITULO II** ..... 7
**MARCO TEORICO** ..... 8
2.1.Fundamentación Teórica ..... 8
2.1.1.La moniliasis y su efecto ..... 8
2.1.2.El hongo ..... 8
2.1.3 Medidas de control y manejo ..... 9
2.2. Control biológico ..... 12
2.3. Ecología de *Trichoderma* ..... 12
2.4. Control biológico de enfermedades del cacao con *Trichoderma* spp ..... 13
2.4.1.Factores ambientales que afectan la germinación de conidios de hongos antagonistas ..... 13
2.5.Principales componentes para una formulación ..... 14
2.6. *Bacillus pumilus* ..... 14
2.7. Ventajas de Agentes de Control Biológico ..... 15
**CAPITULO III** ..... 16
**METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION** ..... 16
3.1. Materiales y métodos ..... 17
3.1.1.Localización y duración de la investigación ..... 17
3.2. Condiciones metereológicas ..... 17

3.3. Materiales y equipos ..... 18
3.4. Tratamientos ..... 19
3.5. Esquema del experimento ..... 19
3.6. Diseño experimental ..... 20
3.7.Análisis de Varianza ..... 20
3.8. Mediciones Experimentales ..... 21
3.8.1.Número de mazorcas ..... 21
3.8.2. Número de frutos marchitos o Cherelles wilt ..... 21
3.8.3. Presencia de *Trichoderma* ..... 21
3.8.4. Presencia de *Bacillus pumilus* ..... 22
3.9. Manejo del Experimento ..... 22
3.9.1. Mapeo del lote ..... 23
3.9.2. Delimitación de las parcelas ..... 23
3.9.3. Aplicación de la combinación de *Trichoderma* con y sin aceite de palma africana ..... 23
3.9.4. Aplicación de *Bacillus pumilus* con y sin Silweet - 77 ..... 24
**CAPITULO IV** ..... 26
**RESULTADOS Y DISCUSION** ..... 26
4.1. Resultados y discusión ..... 27
4.1.1. Número de mazorcas sanas ..... 27
4.1.2.Número de Cherrelles wilt ..... 28
4.1.3.Presencia de *Trichoderma* ..... 30
4.1.4.Presencia de *Bacillus pumilus* ..... 32
**CAPITULO V** ..... 34
**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES** ..... 34
5.1. Conclusiones ..... 35
5.2. Recomendaciones ..... 36
**CAPITULO VI** ..... 37
**BIBLIOGRAFIA** ..... 37
6.1.Bibliografia ..... 38
**CAPITULO VII** ..... 42
**ANEXOS** ..... 42
Anexos ..... 43

## ÍNDICE DE CUADROS

**Cuadro 1**.Condiciones meteorológicas de la EET – Pichilingue ..... 17
**Cuadro 2**. Materiales y equipos ..... 18
**Cuadro 3**. Tratamientos ..... 19
**Cuadro 4**. Esquema del experimento ..... 20
**Cuadro 5**. Análisis de varianza ..... 21
**Cuadro 6**. Concentración de las suspensiones ..... 24
**Cuadro 7**. Presencia de *Bacillus pumilus* ..... 32

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Número de mazorcas sanas ..... 27
**Figura 2.** Número de Cherrelles wilt ..... 28
**Figura 3.** Valores promedios de presencia de *Trichoderma* a los 7 días ..... 30
**Figura 4.** Valores promedios de recuperación de *Trichoderma* a los 21 días ..... 31

## ÍNDICE DE ANEXOS

**Anexo 1.** Auspicio de la investigación ..... 43
**Anexo 2.** Croquis de campo ..... 44
**Anexo 3.** Delimitación de parcelas ..... 45
**Anexo 4.** Preparación de la combinación de los agentes de control biológico ..... 46
**Anexo 5.** *Trichoderma koningiopsis*, *stromaticum*, *ovalisporum* y *Bacillus pumilus* ..... 47
**Anexo 6.** Aplicación de los tratamientos ..... 48
**Anexo 7.** Aislamientos de cojinetes florales ..... 49
**Anexo 8.** Recuperación de organismos ..... 50
**Anexo 9.** Equipos de aspersión usados ..... 51
**Anexo 10**. Análisis de varianza ..... 52

# RESUMEN EJECUTIVO

En Ecuador, más del 80% de las huertas de cacao son cultivadas por pequeños agricultores, sin recibir manejo de cultivo; en donde dos hongos patógenos *Moniliopthora perniciosa* (Escoba de bruja) y *M. roreri* (Moniliasis) destruyen entre 40 – 60% de la producción. Existen varias opciones de manejo disponible para disminuir este impacto que incluye prácticas culturales, control químico y resistencia. Se siguen evaluando medidas de control biológico con buenas expectativas con el propósito de incluirlos en la estrategia de Manejo Integrado del Cultivo (MIC).

El Departamento de Protección Vegetal del INIAP cuenta con una colección de agentes de control biológico para cacao, de la cual tres cepas de *Trichoderma spp.* (*T. koningiopsis, T. stromaticum* y *T. ovalisporum*), se usaron en esta investigación. Los objetivos fueron determinar la combinación de agentes biológicos para el control de enfermedades del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L.) y, determinar la eficiencia de diferentes combinaciones con tres especies de *Trichoderma* y una de *Bacillus pumilus* para el control de la pudrición del fruto causada por *M. roreri* y *M. perniciosa* en plantación de cacao. Además, establecer la formulación adecuada para disminuir la incidencia de *M. roreri* en cacao.

También se comparó el efecto de estas especies a nivel de campo con el fungicida Hidróxido de Cobre. El experimento se realizó en el laboratorio de Fitopatología de la EET – Pichilingue y consistió en dos etapas. En la primera etapa se realizaron aplicaciones de las combinaciones de agentes de control biológico en una plantación establecida en campo (Lote Clones Locales) en donde se pudo evidenciar el efecto de los agentes de control biológico en la cantidad de mazorcas sanas y Cherrelles wilt. En la segunda fase se recuperaron, aislaron y purificaron las 3 cepas de *Trichoderma* inoculadas, lo que no ocurrió con *B. pumilus* ya que en ninguna de las evaluaciones se pudo recuperar. Estos resultados demuestran que los *Trichoderma* spp constituyen una opción para el manejo de enfermedades del fruto en el cultivo de cacao.

# ABSTRAC

In Ecuador, more than 80% of the cocoa orchards are cultivated by small farmers, without receiving crop management, where two fungal pathogens *Moniliopthora perniciosa* (witches' broom) and *M. roreri* (moniliasis) destroy between 40 to 60% of production. There are several management options available to reduce this impact, including cultural practices, chemical control and resistance.

The Plant Protection Department INIAP has a collection of biological control agents for cacao which three strains of *Trichoderma* spp (*T. koningiopsis, T. stromaticum* and *T. ovalisporum*) are those used in this research. The objectives were to determine the combination of biological agents for controlling diseases of fruit of cocoa (*Theobroma cacao* L.), and determine the efficiency of different combinations of three species of *Trichoderma* and *Bacillus pumilus* control fruit rot by *M. roreri* and *M. perniciosa* in cocoa plantation. Furthermore establish the appropriate formulation for reducing the incidence of *M. roreri* in cocoa.

We also compared the effect of these species at field level compared with the fungicide copper hydroxide. The experiment was conducted in the laboratory of Plant Pathology EET - Pichilingue and consisted of two stages. In the first stage, they used, the combinations of biological control agents in a plantation established in the field (local clones Lot) where it was evident the effect of biological control agents in the amount of healthy ears, Cherrelles wilt. In the second phase was recovered, isolated and purified the 3 strains of *Trichoderma* inoculated with *Bacillus* different behavior as occurred in any of the evaluations it was recovered. This confirms the *Trichoderma* spp as an option for handling fruit diseases in cocoa farming.

# CAPÍTULO I

# MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

## 1.1 Introducción

Las plagas agrícolas han sido controladas durante años mediante el empleo de productos sintéticos de fuerte impacto negativo sobre los organismos benéficos presentes en el ambiente y no siempre son tan eficaces como sería deseable, especialmente en cultivos perennes como cacao. Entre otras alternativas de control que se viene manejando en las últimas décadas está el control biológico, el cual se basa en el uso de hongos y bacterias, que compiten con la población de hongos fitopatógenos, reduciendo su impacto en el cultivo y mejorando la aplicación de prácticas complementarias.

La Moniliasis, causada por el hongo *M. roreri*, es considerada la enfermedad más destructiva de los frutos del cacao. Su ataque es con frecuencia tan severo que constituye uno de los factores limitantes de mayor importancia en la producción de cacao, en lugares donde se lo siembra, especialmente en el litoral ecuatoriano.

Las labores culturales, especialmente la remoción semanal de frutos enfermos, ejercen su efecto acumulativo para la reducción de fuentes de inóculo de Monilia; sin embargo, la práctica exige un gran esfuerzo por parte del productor, por lo que la enfermedad persiste en las huertas, lo que lleva a la búsqueda de nuevas alternativas, integrando al manejo de enfermedades la estrategia del control biológico con el uso de especies antagónicas aisladas en el hábitat donde se desarrollan las enfermedades del cacao.

El Manejo Integrado de Plagas (MIP), puede ser visto desde tres niveles de organización: un banco de conocimientos básicos que incluye la información fundamental; las herramientas para suprimir las poblaciones de la plaga y retardar el progreso o reducir la incidencia de la enfermedad en cada tipo de control, lo que es considerada como una táctica; y, la capacidad de emplear estas herramientas para manejar la enfermedad. La puesta en ejecución de éstas tácticas es lo que se considera una estrategia integrada. El MIP es un

enfoque en el cual se maximiza el control natural de las poblaciones de una plaga o patógeno, basándose en el conocimiento de la biología del organismo, su ambiente, los enemigos naturales y las prácticas de agricultura.

Se ha demostrado ampliamente que removiendo cada ocho días los frutos enfermos presentes en el árbol y con al menos una poda sanitaria anual, se reduce significativamente el riesgo de infección de Monilla en los frutos tiernos y Escoba de bruja en frutos y brotes de cacao, como resultado de la disminución de la cantidad de esporas que emiten los hongos causantes de ambas enfermedades al colonizar los tejidos vegetales. Con la ejecución permanente de esta práctica, el porcentaje de mazorcas enfermas se recorta hasta un tercio si se compara con la cifra estimada para huertas sin manejo sanitario. En estas huertas el porcentaje de mazorcas enfermas puede llegar al 40 o 50% del total presente, aunque en casos extremos alcanza el 90%.

En cacao, el empleo de microorganismos nativos como antagonistas ha mostrado buenos resultados para el control de *M. roreri*, *M. perniciosa* y *Phytophthora* sp. Los agentes de control biológico han sido probados como antiesporulantes de *M. roreri*. Se indica la coevolución de micoparásitos con efecto de control biológico. Trabajos reportados señalan a especies del hongo del género *Trichoderma* como antagonistas contra *M. roreri*, entre los cuales se encuentran *Trichoderma ovalisporum*, *T. koningiopsis* y *T. paucisporum* seleccionados en ensayos preliminares en Ecuador, Perú y Costa Rica. Estos microorganismos reducen la esporulación del patógeno sobre las mazorcas y se establecen alrededor de cuatro meses sobre los cojinetes florales.

Por otro lado, el género *Bacillus*, pertenece a la familia Bacillaceae, una de las familias bacterianas con mayor actividad bioquímica referenciada en la literatura científica que abarca tanto su utilización dentro de las actuales políticas de control biológico como el uso de los productos de su metabolismo para la industria. Son bacilos aerobios y anaerobios facultativos, *Gram* positivos, producen endosporas con morfología oval o cilíndrica que le permite

resistir condiciones desfavorables en el ambiente, son móviles por la presencia de flagelos laterales, realizan catálisis positiva, presentando hemólisis variable y un crecimiento activo en un rango de pH entre 5,5 – 8,5. La propagación activa del microorganismo se produce en medios que presentan superficie húmeda.

## 1.2 Justificación

Una combinación adecuada de los componentes de producción, es la base para el éxito de un bioplaguicida de origen microbiano; la posibilidad de obtener productos viables, depende de las propias características del microorganismo, su relación con los componentes de la formulación y las condiciones de almacenamiento. En condiciones de laboratorio resulta difícil mantener la viabilidad de hongos entomopatógenos por más de seis meses. Razón por la cual es necesario formular un entomopatógeno, lo cual consiste en adicionarle determinados compuestos que mejoran su desempeño en el campo, facilitando su manejo, aplicación y que permita su almacenamiento en condiciones que disminuyen el costo, con una pérdida mínima de las cualidades del producto.

Esta adecuada tecnología permitirá desarrollar nuevas formulaciones en el manejo de estos antagonistas que pueden mejorar la eficiencia en el control de esta enfermedad. Por tanto, los resultados de esta investigación aportarán información sobre el uso de hongos y bacterias que se utilizarán dentro del componente biológico para el manejo de enfermedades en el cultivo del cacao; complementando a las prácticas de manejo integrado, con lo cual se beneficiará al sector productor de cacao.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1. General

- Determinar la combinación de agentes biológicos para el control de enfermedades del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L.)

### 1.3.2. Específicos

- Determinar la eficiencia de diferentes combinaciones con tres especies de *Trichoderma* y una de *Bacillus pumilus* para el control de la pudrición del fruto causada por *M. roreri* y *M. perniciosa* en plantación de cacao.
- Establecer la formulación adecuada para disminuir la incidencia de *M. roreri* en cacao.

.

## 1.4 Hipótesis

- La combinación adecuada de agentes de control biológico reducirá eficientemente la incidencia de *M. roreri* y *M. perniciosa* en cacao.

# CAPÍTULO II

# MARCO TEÓRICO

## 2.1 Fundamentación Teórica

### 2.1.1. La moniliasis y su efecto

Esta enfermedad fue reportada por primera vez en Ecuador, en 1914; por mucho tiempo permaneció restringida en la zona noroccidental de América del Sur; posteriormente se reportó en Perú y Costa Rica, luego en Panamá, Nicaragua y México. Actualmente la moniliasis está presente en 11 países (Ecuador, Bolivia, Perú, Colombia, Venezuela, Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Honduras, Guatemala y México) y sus efectos desbastadores han causado el abandono de miles de hectáreas de cacao **(PHILLIPS, 2006)**.

Cuando la infección ocurre en los primeros tres meses de edad los frutos se pierden completamente, por su mayor susceptibilidad. El primer síntoma típico consiste en puntos aceitosos o hidrosis en la corteza **(LOPEZ, 2007)**.

### 2.1.2. El hongo

La moniliasis es causada por el hongo *M. roreri;* es de fácil dispersión, se distribuye principalmente con la acción del aire, lluvias, animales y las personas. Los frutos pueden infectarse en cualquier etapa del desarrollo. La penetración del hongo ocurre directamente a través de la epidermis del fruto. El hongo invade el tejido interno, intracelularmente, tarda entre 20 a 60 días para manifestarse externamente y presentan los síntomas de la enfermedad en forma de necrosamiento, deformación de la mazorca, hidrosis, madurez irregular y prematura **(LOPEZ, 2007)**.

Luego de la presencia en las mazorcas enfermas de manchas chocolate con borde irregular, cerca de tres a siete días después aparece la masa de micelio blanquecino. Tres a cinco días más tarde, el micelio se torna crema por la presencia de esporas **(RAM *et al*., 2004)**. Una mazorca madura puede producir más de 7.000 millones de esporas, las cuales son producidas

sucesivamente sobre los frutos durante más de un año. Las esporas de *M. roreri* están comúnmente presentes en el aire, por lo que las infecciones pueden ocurrir en cualquier momento siempre que las condiciones sean favorables **(PHILLIPS, 2006)**.

Tanto *M. roreri* como *M. perniciosa* causan grandes pérdidas de mazorcas en el Ecuador, esto depende de la duración e intensidad de la temperatura y de las lluvias. Sin embargo, en Ecuador la larga temporada seca da oportunidad a las mazorcas de escapar a la enfermedad con un riesgo de ataque reducido. Esto da lugar a que la severidad del ataque de la moniliasis varíe de lugar y año, de acuerdo con las condiciones del clima. El patógeno permanece en estado de conidio y micelio sobre y dentro de los frutos infectados durante todas las estaciones del año, constituyéndose éstos en la principal fuente de dispersión de la enfermedad **(LOPEZ, 2007)**.

### 2.1.3 Medidas de control y manejo

La moniliasis requiere de un manejo permanente y sistemático a través de todo el año **(PINZON y ROJAS, 2008)**. El control de la enfermedad debe de ser de carácter preventivo; tan pronto como el hongo ha penetrado en el interior de los tejidos atacados no puede ser eliminado sin que antes se destruya el órgano enfermo.

Mediante labores culturales, como la remoción de frutos enfermos, reduce la perdida hasta el 24%. Por otro lado, la aplicación de productos protectores a base de cobre ayuda a que las mazorcas lleguen sanas a la cosecha **(SANCHEZ *et al.,* 2003)**. En cultivos con altas densidades es necesario realizar podas periódicas, para permitir una mayor aireación y entrada de luz solar dentro del cacaotal **(FHIA, 2004)**.

La rehabilitación de huertas incluye la poda de descope para bajar la altura de los árboles y mejorar su capacidad productiva. Seguidamente, esta alternativa de control comprende prácticas de remoción frecuente de frutos enfermos, eliminación anual de escobas para mejorar la sanidad de cultivo y evitar que se eleven los niveles de inóculo dentro de la plantación **(SUAREZ y SOLIS, 2003)**.

A nivel biológico se considera que *T. harzianum* puede ser un hongo antagonista factible de incorporar en planes de manejo integrado de la enfermedad **(USAID, 2007)**. Entre los antagónicos más estudiados para el combate de enfermedades figuran las especies de hongos del género *Trichoderma* utilizados como antagonistas para patógenos del suelo y aéreos como los causantes de la Escoba de bruja y Monilia. *T. stromaticum* es la especie más descrita en tiempos recientes, eficiente para el control de *Crinipellis perniciosa* **(CARVALHO *et al*., 2005)**, suprimiendo la formación de basidiocarpos **(BASTOS, 1996)**.

En Pichilingue, Ecuador, se prestó atención a la búsqueda de micoparásitos de *M. roreri*, encrontandose microorganismos antagónicos asociados a mazorcas infectadas *por M. roreri*, estos microorganismos están asociados a mazorcas los cuales reducen la esporulación hasta el 9% **(DIAZ y PUCHA, 2007)**.

Es importante recalcar que en pruebas *in vitro, T. koninguiopsis* no inhibió su crecimiento en presencia de azoxystrobina y oxido cuproso y, *T. stromaticum* solo creció en presencia de azoxystrobina **(ARIAS y GUERRERO, 2006**). Las aplicaciones de *T. ovalisporum* mantuvieron en un 34% la infección de Monilia y, se pudieron recuperar de segmentos de plantas las especies de *Trichoderma* aplicadas, lo que confirma su colonización de los tejidos de la

planta principalmente de las mazorcas que llegan sanas a la cosecha **(HOLMES *et al*., 2006)**.

Es importante señalar, que se tiene un concepto errado al asumir a los bio-preparados y agentes de control biológico al igual que a los productos químicos sintéticos para el manejo de poblaciones patógenas. El principio básico de la obtención del agente antagónico al patógeno es que sea nativo, ya que éstos agentes se regresan al medio del que fueron obtenidos, pero en mayores cantidades que las existentes naturalmente; sin embargo, cuando existe una gran infección en campo, por más eficientes que sean los agentes de control biológico o los fungicidas, estos no son efectivos debido a que la presión de la enfermedad dificulta la protección del cultivo **(SUAREZ y SOLIS, 2008)**.

Es conviene usar estrategias que integren tantos componentes como sea posible. Los estudios de agentes de control biológico, referente a su modo de acción, formas más eficientes y frecuencias de aplicación. Se desarrollan técnicas de multiplicación masiva en sustrato sólido y líquido para facilitar la extracción de esporas y se están iniciando estudios para definir una formulación que permita el uso a gran escala de organismos de agentes de control biológico **(SUAREZ y SOLIS, 2008)**.

Gran parte del control biológico para el manejo de enfermedades de cacao ha sido enfocado en Centro y Sur América. Los métodos de control utilizados consisten en la aplicación de hongos no patogénicos para reducir el nivel de producción de inóculo de patógeno o en la introducción de un hongo benéfico en los tejidos del árbol actuando como antagonista o induciendo resistencia **(PAN, 2001)**.

Una alternativa reciente para integrarse a las técnicas de control de la enfermedad es la aplicación de agentes de control biológico antagónicos al patógeno para reducir el nivel de inóculo de *M. roreri* **(SOLIS y SUAREZ, 2006)**.

## 2.2. Control Biológico

El control biológico de enfermedades de plantas, por medio de antagonistas, ha despertado gran interés. Como consecuencia, esta alternativa de control adquiere cada vez más importancia en la agricultura mundial ya que el control químico, resulta con frecuencia ineficiente contra este tipo de patógenos y los productos químicos son cada vez más costosos y de difícil adquisición. Más grave aún, en muchos casos ocasionan desbalance en el ecosistema resultando contaminación del ambiente y de los alimentos **(GARCIA, 2000)**.

## 2.3. Ecología de *Trichoderma*

En la creciente necesidad de reducir el uso de agroquímicos para el control de enfermedades, el hongo del género *Trichoderma* tiene un grupo de especies ampliamente utilizadas en la agricultura, constituyéndose en el fungicida biológico más empleado **(DIAZ y PUCHA, 2007)**.

Son saprófitos, que crecen en los desechos orgánicos, o parásitos de otros hongos. Ellos pueden competir por los exudados de las semillas que estimulan la germinación de los propágulos de hongos patógenos en el suelo. Especies de *Trichoderma* producen enzimas. Algunas especies afectan directamente el crecimiento de plantas mediante el aumento de los brotes y / o el peso de la raíz. Trabajar con los árboles de cacao ha demostrado que las

especies de *Trichoderma* son comunes y endófitos dominantes en troncos de árboles asintomáticos (**EVANS *et al.,* 2003)**.

## 2.4. Control biológico de enfermedades del cacao con *Trichoderma* spp.

Entre estos organismos se han identificado varias cepas de *Trichoderma* spp **(SUAREZ y SOLIS, 2003)**. Este hongo actúa como micoparásito sobre *M. roreri*, y por la rapidez de su crecimiento sería un excelente competidor **(DIAZ y PUCHA, 2007).** Un microorganismo competitivo ofrece una protección biológica a la planta, destruyendo el inóculo patógeno presente y contribuyendo a prevenir su formación, con lo cual se facilita la acción de otros componentes de control que, en conjunto reduzcan impacto económico de estos organismos **(ARIAS y GUERRERO, 2006)**.

### 2.4.1. Factores ambientales que afectan la germinación de conidios de hongos antagonistas

Entre los factores ambientales que influyen sobre la germinación de conidios y el desarrollo de los hongos antagonistas está la humedad relativa, temperatura, pH y nutrientes. La humedad influye sobre la germinación y el desarrollo de hongos, puede presentarse en forma de lluvia, como alta humedad relativa en la atmósfera y como rocío; el efecto más importante de la humedad se centra en la germinación de las esporas de los hongos y sobre la penetración del tubo germinativo en el hospedante **(AGRIOS, 2005**).

## 2.5. Principales componentes para una formulación

Formular un hongo consiste en adicionarle determinados compuestos como agentes humectantes, dispersantes, reguladores de la viscosidad, protectores de luz ULV, atrayentes, tensoactivos, solventes, emulsificantes o gelificantes, y otros aditivos que pueden ser nutrientes o estimulantes. Estos materiales favorecen la longevidad del hongo, mejoran su desempeño en el campo, facilitan su manejo, aplicación, y permiten su almacenamiento en condiciones que disminuyen el costo, con una pérdida mínima de las cualidades del producto **(URTUBIA y FRANCE, 2007)**.

En toda formulación se distinguen tres tipos principales de componentes, los cuales son el principio activo, ya sea conidios o micelio **(URTUBIA y FRANCE, 2007)**, y clamidosporas en el caso de *Trichoderma* **(FERNÁNDEZ, 2006)**. El diluyente o vehículo puede ser sólido o líquido. Los adyuvantes son materiales inertes, pero tienen función protectora, dispersante y adherente **(KOVACH *et al*., 2000)**.

## 2.6. *Bacillus pumilus*

El beneficio adicional de *Bacillus pumilus* es la producción de endosporas. Las formulaciones de las bacterias formadoras de endosporas tienen una vida útil prolongada y son ambientalmente resistentes al calor y la humedad de los trópicos. La naturaleza endofítica de *B. pumilus* también podría aumentar los beneficios de este agente de control biológico, cuando se compara con los organismos previamente ensayados, a través de la activación de los mecanismos de defensa de la planta **(MELNICK, 2010)**.

## 2.7. Ventajas de los agentes de control biológico

Las aplicaciones de *T. koningiopsis* y *T. stromaticum* mostraron tendencia a mejorar la sanidad del cultivo en general al disminuir las infecciones de enfermedades en la plantación elevando la producción de mazorcas sanas. Los agentes de control biológico aplicados poseen la capacidad de reducir las infecciones causadas por *M. roreri* de manera similar a los fungicidas evaluados. De ellos, *T. koningiopsis* mostro ser el más eficaz a nivel de mazorcas y con mayor potencial para el control biológico del patógeno **(ARIAS y GUERRERO, 2006)**.

# CAPÍTULO III

# METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

## 3.1. MATERIALES Y METODOS

### 3.1.1. Localización y duración de la investigación

La presente investigación se efectúo durante el año 2012, a nivel de campo y en Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Protección Vegetal de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP. La Estación se encuentra ubicada en el km. 5 vía Quevedo - El Empalme, perteneciente al Cantón Mocache, de la Provincia de Los Ríos, geográficamente[1/] a un 1° 05' Latitud Sur y 79° 26' Longitud Occidental, a una altitud promedio de 75 m.s.n.m. La investigación se realizó en 210 días.

### 3.2. Condiciones meteorológicas

Las condiciones meteorológicas[2/] del lugar donde se realizó la investigación se detallan en el cuadro 1.

**Cuadro 1. Condiciones meteorológicas[1/] de la EET- Pichilingue, 2012.**

| Parámetros | Promedio anual |
|---|---|
| Temperatura (ºC) | 24.8 |
| Humedad relativa (%) | 83 |
| Heliofanía (horas de sol / año) | 880.32 |
| Precipitación (mm) | 2.148 |

[1/]Coordenadas geográficas registradas con GPS.
[2/]Valores promedios registrados 2012 en la Estación Meteorológica del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI), localizada en la EET. Pichilingue del INIAP.

### 3.3. Materiales y equipos

Los materiales y equipos utilizados en la presente investigación se presentan en el Cuadro 2.

**Cuadro 2. Materiales y equipos que se utilizaron, en el estudio de combinación de agentes biológicos para el control de enfermedades del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L). EET-Pichilingue, 2012.**

| Descripción | Cantidad |
|---|---|
| **Laboratorio** | |
| Lecitina emulsificante (mL) | 500 |
| Silweet L-77 dispersante (mL) | 200 |
| Potato Dextrosa Agar (g) | 500 |
| Potato Dextrose Broth (g) | 500 |
| Aceite de Palma Africana (L) | 20 |
| Licuadora Blender (u) | 1 |
| Platos Petri plásticos (u) | 2.034 |
| Cloro Ajax (L) | 12 |
| Esporas de Agente Control Biológico (g) | 0.50 |
| Concentración de *Bacillus pumilus* (L) | 1 |
| **Campo** | |
| Fertilizantes (kg) | 495 |
| Bomba rociadora Ace (u) | 2 |
| Caja Térmica (u) | 1 |
| Probeta plástica 1000 (mL) | 1 |
| Overol (u) | 5 |
| Mascarilla (u) | 5 |
| Moto fumigadoras Sthill (u) | 2 |
| Hidróxido de Cobre Kocide (g) | 750 |
| Guantes plásticos (u) | 10 |
| Protectores de oídos (u) | 1 |
| Combustible (gl) | 10 |
| **Mano de obra** | |
| Jornales (u) | 15 |
| **Servicios** | |
| Impresiones / Empastado de Tesis (u) | 4 |
| Cuaderno y lápiz para registro de datos (u) | 1 |

## 3.4. Tratamientos

En el Cuadro 3, se indican los tratamientos que se instalaron en lote experimental de cacao del Departamento de Protección Vegetal, denominado "Clones Locales".

**Cuadro 3. Tratamientos, en el estudio de la combinación de agentes biológicos para el control de enfermedades del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L). EET- Pichilingue, 2012.**

| Tratamiento | Descripción |
|---|---|
| $T_1$ | Combinación de aceite de palma africana con la mezcla de los Agentes de Control Biológico (ACB) 1[a/]y 2[a/]. |
| $T_2$ | Combinación de aceite de palma africana con el ACB 3[a/]. |
| $T_3$ | Combinación sin aceite con la mezcla de ACB 1 y 2. |
| $T_4$ | Combinación sin aceite con el ACB 3. |
| $T_5$ | Combinación de *Bacillus pumilus* con surfactante (Silweet L-77). |
| $T_6$ | Combinación de *Bacillus pumilus* sin surfactante. |
| $T_7$ | Testigo. |
| $T_8$ | Testigo químico con fungicida cúprico. |

[a]**/ 1** = *Trichoderma koningiopsis*

[a]**/ 2** = *Trichoderma stromaticum*

[a]**/ 3** = *Trichoderma ovalisporum*

## 3.5. Esquema del experimento

En Cuadro 4, se muestra el esquema del experimento donde se describe las características de establecimiento de unidades experimentales.

**Cuadro 4. Esquema del experimento, en el estudio de la combinación de agentes biológicos para el control de enfermedades. EET- Pichilingue, 2012.**

| Descripción | Cantidad |
|---|---|
| Número de tratamientos | 8 |
| Número de repeticiones | 3 |
| Total unidades experimentales (UE) | 24 |
| Número de árboles por UE | 8 |
| Total de observaciones UE ($m^2$) | 135 |
| Separación entre arboles dentro de las UE (m) | 3 x 3 |
| Separación entre repeticiones (m) | 6 |
| Área total del experimento ($m^2$) | 8 928 |
| Fecha de siembra | 27- 12 - 99 |
| Material genético | 14 |

### 3.6. Diseño experimental

Se utilizó un Diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA), con ocho tratamientos y tres repeticiones. Los tratamientos en estudio se instalaron en forma aleatoria en las parcelas. Para la comparación de las medias de tratamientos se utilizó la prueba de TUKEY al 0,05% de probabilidad.

### 3.7. Análisis de Varianza

A continuación en el Cuadro 5, se indica el esquema del análisis de varianza del estudio planteado.

**Cuadro 5. Análisis de Varianza, en el estudio de la combinación de agentes biológicos para el control de enfermedades del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L). EET- Pichilingue, 2012.**

| Fuente de Variación | | g.l. |
|---|---|---|
| Tratamientos | (T-1) | 7 |
| Repeticiones | (R-1) | 2 |
| Error | (R-1) (T-1) | 14 |
| TOTAL | (T x R) – 1 | 23 |

## 3.8. Mediciones Experimentales

### 3.8.1. Número de mazorcas

Las mazorcas sanas se cosecharon cuando cumplieron su madurez fisiológica.

### 3.8.2. Número de frutos marchitos o Cherelles wilt

Mensualmente se registró el número de frutos marchitos por Cherelles wilt.

### 3.8.3. Presencia de *Trichoderma*

Para evaluar la presencia de *Trichoderma* en los tratamientos aplicados, se colectó una mazorca por árbol dentro de la unidad experimental, las cuales se trasladaron al laboratorio donde se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5%, se enjuagaron con agua destilada estéril y eliminando el exceso de agua con papel toalla.

De cada mazorca se tomaron cinco segmentos (5 mm.) al azar cortados con sacabocados involucrando epicarpio y endocarpio de la mazorca.

Los discos se inocularon en medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar) deshidratado marca DIFCO®. El muestreo en campo se efectuó a los 7 y 21 días después de cada aplicación.

Se colectaron 5 flores por cada árbol dentro de la unidad experimental, las cuales se inocularon *in situ*, en platos de Petri con medio de cultivo PDA más antibiótico Cloranfenicol® 0,05%. Se incubó a 25 ± 2° C (temperatura ambiente de laboratorio) durante 7 días. Transcurrido este periodo se hizo observaciones visuales para identificar las colonias de *Trichoderma* spp.

### 3.8.4. Presencia de *Bacillus pumilus*

Se utilizó similar protocolo anteriormente descrito para la recolección y desinfección de *Trichoderma* y para la recolección e incubación *in situ*, no se utilizó ningún antibiótico. Se incubó a 25 ± 2° C durante 2 días, pero no se obtuvo crecimiento bacteriano (*Bacillus pumilus*).

## 3.9. Manejo del Experimento

En el lote experimental se realizó control de malezas, manual y mecánica con motoguadaña; la primera al iniciar el ensayo, donde se delimitaron los árboles en estudio y la segunda tres meses después. Se efectuó una poda sanitaria a todo el lote, donde se eliminaron las ramas entrecruzadas para equilibrar la arquitectura de los árboles y permitir la entrada de luz solar y la ventilación, se eliminaron escobas de bruja vegetativas además de mazorcas enfermas y sanas. Las heridas se protegieron con pasta Bordelesa®.

### 3.9.1. Mapa del lote

En campo se actualizó el mapa del lote "Clones Nacionales", para definir el total de plantas de cacao existentes y proceder a marcar los árboles parar instalar el ensayo (Anexo. 1).

### 3.9.2. Delimitación de las parcelas

Se delimitaron las parcelas por cada tratamiento donde se seleccionaron los árboles e identificaron con una cinta distintiva y con postes de caña guadua de 1m. de largo, con el extremo superior pintado de color azul (Anexo. 2). Se realizó la separación entre parcelas experimentales conforme al mapa actualizado.

### 3.9.3. Aplicación de la combinación de *Trichoderma* con y sin aceite de palma africana

Se realizaron aplicaciones de los tratamientos cada 21 días, dando un total de cinco aplicaciones con una concentración de $1x10^{12}$ esporas/mL. Las formulaciones se realizaron con cada una de las especies de *Trichoderma,* para lo cual se homogenizó con ayuda de una licuadora (marca Waring Laboratory, Variable Speed), donde se colocó el aceite de palma africana, agua y lecitina hasta formar una emulsión (Anexo. 3).

Esporas de *Trichoderma koningiopsis, Trichoderma stromaticum* y *Trichoderma ovalisporum*, (Anexo. 4) pertenecientes a la colección de organismos antagónicos del Laboratorio de Fitopatología de la EET- Pichilingue. Se homogenizaron en medio líquido Potato Dextrosa Broth (PDB) marca DIFCO®, contenido en matraz de Erlenmeyer (100 mL) y se añadieron a la combinación de aceite y lecitina en constante agitación, lo que correspondió a los tratamientos T1 y T2.

Para los tratamientos T3 y T4 se aplicó el mismo proceso descrito para las especies de *Trichoderma*, donde se suspendieron las esporas en agua destilada estéril, es decir sin la emulsión y se procedió a la inoculación en campo. Se describe en el siguiente cuadro:

**Cuadro 6. Concentración de las suspensiones, frecuencia y número de aplicaciones de *Bacillus pumilus,* fungicida y combinaciones de *Trichoderma* sp. EET- Pichilingue, 2012.**

| Tratamientos | Concentración de esporas | Frecuencia de aplicación | Número de aplicaciones |
|---|---|---|---|
| *T. koningiopsis* | $1x10^{12}$ esporas $ha^{-1}$ | Cada 21 días | 5 |
| *T. stromaticum* | $1x10^{12}$ esporas $ha^{-1}$ | Cada 21 días | 5 |
| *T. ovalisporum* | $1x10^{12}$ esporas $ha^{-1}$ | Cada 21 días | 5 |
| *Bacillus pumilus* | $1x10^{8}$ esporas $ha^{-1}$ | Cada 21 días | 5 |
| Hidróxido de cobre | 4.3 g de i.a./ árbol | Cada 21 días | 5 |
| Testigo | - | Cada 21 días | 5 |

Las aplicaciones de la combinación se realizaron con aspersores motorizados de espalda de uso exclusivo para productos biológicos (marca STIHL SR – 420), usando la boquilla de color gris número Ø 0.65, con una descarga de 165 mL por cada árbol (Anexo. 5).

### 3.9.4. Aplicación de *Bacillus pumilus* con y sin Silweet L-77

La aplicación de *Bacillus pumilus* combinado con Silweet L-77 se aplicó con una bomba rociadora asperjando frutos y brotes tiernos de los árboles. Por cada árbol se utilizó 200 mL de inóculo, con una concentración de $1x10^{8}$ esporas/mL (Anexo. 4). Esto correspondió al tratamiento T5; mientras que, el tratamiento T6 consistió en aplicar *Bacillus pumilus* sin Silweet.

En el tratamiento testigo T7 se realizó aplicaciones de agua, recibió el manejo sanitario al igual que los otros tratamientos. En el tratamiento T8, se aplicó hidróxido de cobre en el mismo día de la aplicación del *Trichoderma*, usando aspersor motorizado de espalda de uso exclusivo para producto sintético (STIHL SR – 420). La dosis de aplicación fue 150 gramos de producto

comercial en 10 litros de agua.  La altura estimada de alcance de la aplicación en todos los tratamientos fue de tres metros.

# CAPÍTULO IV

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 4.1. Resultados y discusión

### 4.1.1. Número de mazorcas sanas en el estudio de la combinación de agentes biológicos para el control de enfermedades del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L).

Analizando el número de mazorcas sanas, se encontró diferencia en los porcentajes del tratamiento *Trichoderma koningiopsis* y *Trichoderma stromaticum* combinado con el aceite de palma africana (Figura 1), este mostró 41,90%, y el *Trichoderma ovalisporum* combinado con el aceite de palma africana indicó un porcentaje menor de 11,69, mientras que el *Trichoderma koningiopsis* y *Trichoderma stromaticum* sin aceite de palma africana mostró un porcentaje de 29,87 a diferencia de este tratamiento el *Trichoderma ovalisporum* presentó 16,53%, los demás tratamientos presentaron 0% de mazorcas.

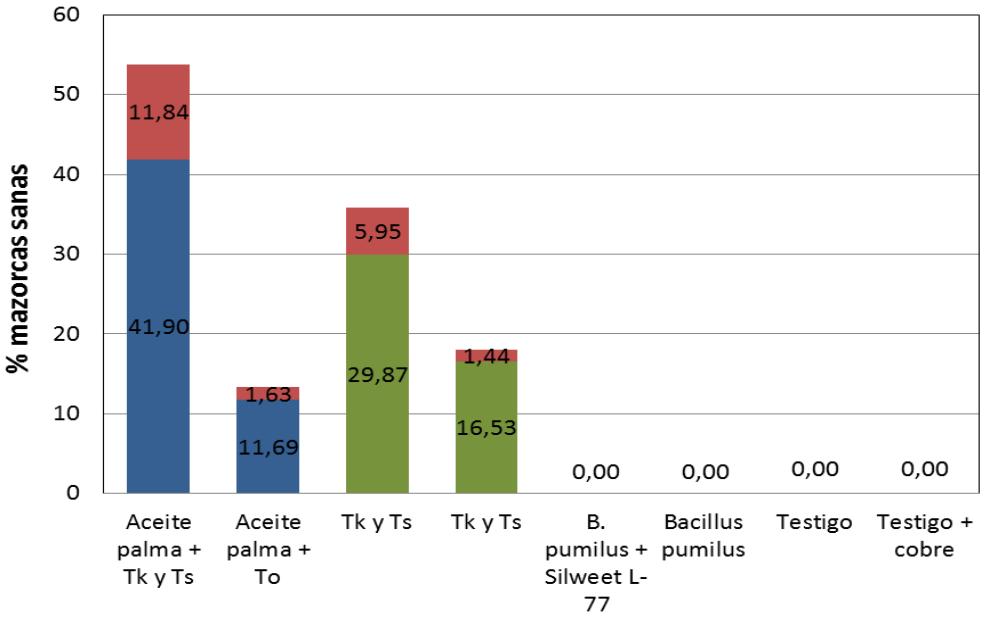



**Figura 1. Porcentaje de mazorcas de cacao sanas en el estudio de la combinación de agentes biológicos para el control de enfermedades del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L). EET-Pichilingue, 2012.**

**HEBBAR *et al.*, (2000),** señalan que la aplicación de combinaciones de agentes de control biológico fueron más eficientes que aplicaciones solas. Esto se confirma con los resultados de este trabajo, pues las aplicaciones combinadas de *Trichoderma koningiopsis* y *stromaticum* mostraron mayor efecto en el control de enfermedades en fruto.

### 4.1.2. Número de Cherelles wilt en el estudio de la combinación de agentes biológicos para el control de enfermedades del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L).

En el análisis del porcentaje de mazorcas Cherelles wilt (Figura 2) obtenidos, el mayor porcentaje de frutos marchitos lo presentó el testigo, con 10,38%, el tratamiento con *Trichoderma ovalisporum* sin aceite de palma africana presentó un 2,67% de Cherelles wilt, claramente se puede observar que en todos los tratamientos hay un efecto de reducción de Cherelles wilt a excepción del testigo.

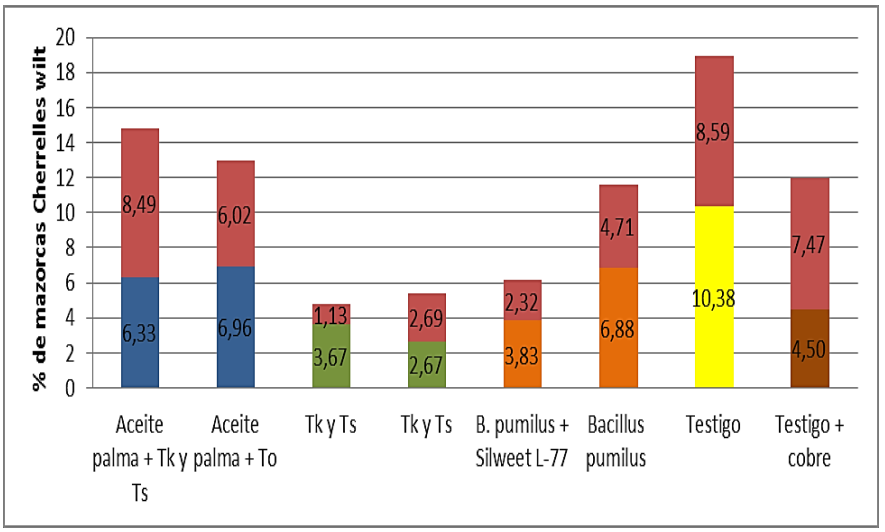



**Figura 2. Porcentajes de mazorcas Cherelles wilt en el estudio de la combinación de agentes biológicos para el control de enfermedades del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L). EET-Pichilingue, 2012.**

Al parecer, *Trichoderma koningiopsis* además de disminuir las infecciones de *M. roreri* tiene potencial para reducir la formación de Cherelles wilt. **BASTOS, (2005)**, **ARIAS y GUERRERO, (2006)**, también observaron esta situación, especialmente causada por *Trichoderma koningiopsis*. Este conjunto de evidencias sugiere la necesidad estudiar este hecho, pues se conoce que la marchitez de los frutos es una reacción fisiológica propia y normal de las plantas de cacao, por lo tanto, se vuelve necesario explicar algún mecanismo que *Trichoderma* pueda ejercer sobre el árbol para inhibir esa reacción generadora frutos marchitos.

**DIAZ y PUCHA, (2007)**, dicen que los agentes de control biológico persisten por cinco meses en condiciones naturales de campo, y aparentemente protegen a las mazorcas del ataque de otros patógenos que atacan a los frutos como *Fusarium, Colletotrichum, Penicillium, Lasiodiploidia y Verticillium* sp. Estos patógenos son algunos de los que pueden infectar a los frutos pequeños e incluso pueden causar confusión entre frutos marchitos y mazorcas enfermas.

Es posible que la reducción observada sobre la variable frutos marchitos se deba, al menos en parte, a que los biocontroladores están actuando contra estos patógenos y ya no se observan frutos marchitos. En todo caso, es conveniente afinar la observación sobre esta variable diferenciando claramente entre frutos enfermos y frutos con marchitez fisiológica, pues en caso de que *Trichoderma* cause la reducción de marchitez existen muchas oportunidades económicas.

### 4.1.3. Presencia de *Trichoderma* en el estudio de la combinación de agentes biológicos para el control de enfermedades del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L).

La recuperación de *Trichoderma* fue una variable medida en dos ocasiones, a los 7 y a los 21 días luego de la aplicación, estos resultados se muestran a continuación:

El efecto de los agentes de control biológico recuperados en laboratorio, los resultados obtenidos después de las aplicaciones realizadas en campo, se presentan en la Figura 3, se indica que *Trichoderma koningiopsis* y *Trichoderma stromaticum* combinado con el aceite de palma africana ocupó el primer lugar en lo que respecta a esta variable en el primer período de evaluación (7 días), con 9,2 %; *Trichoderma ovalisporum* con aceite mostró 2,5% de presencia, mientras que en la aplicación sin aceite presentó 1,7% no obstante el tratamiento *Trichoderma koningiopsis* y *Trichoderma stromaticum* sin aceite de palma africana mostró un 0,8%, por el contrario el testigo presentó 0%. Se excluyen de la figura los tratamientos con *Bacillus pumilus*.

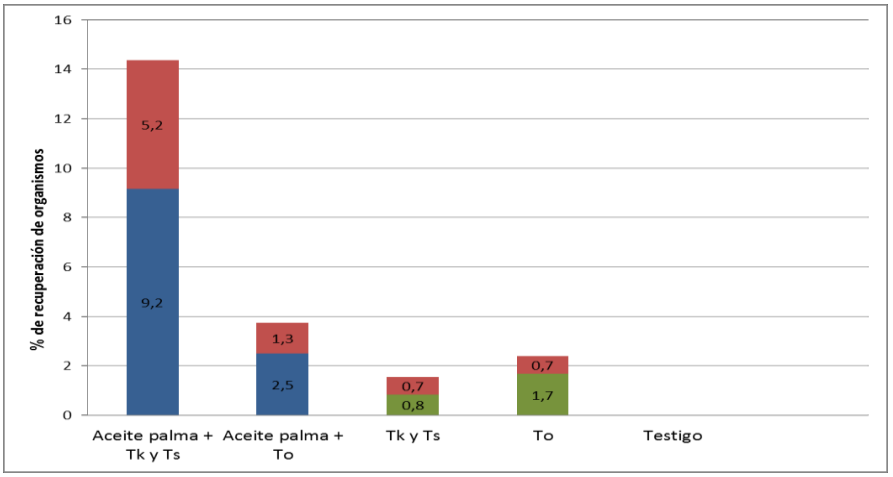



**Figura 3. Valores promedios de presencia de *Trichoderma koningiopsis, T. stromaticum* y *T. ovalisporum* a los 7 días después de aplicaciones en campo. EET- Pichilingue, 2012.**

Los resultados obtenidos después de las aplicaciones realizadas en campo, se presentan en la Figura 4 muestran que *Trichoderma koningiopsis* y *Trichoderma stromaticum* combinado con el aceite de palma africana ocupó el primer lugar en lo que respecta a esta variable a los 21 días, con 11,3%, no obstante los tratamientos *Trichoderma koningiopsis* y *Trichoderma stromaticum* y *Trichoderma ovalisporum* sin aceite de palma africana presentaron el 10,4%, con *Trichoderma koningiopsis* y *Trichoderma stromaticum* sin aceite mostró un 2,1%, el testigo y *Trichoderma ovalisporum* con aceite de palma africana reflejaron el 0%. Se excluyen de la figura los tratamientos con *Bacillus pumilus.*

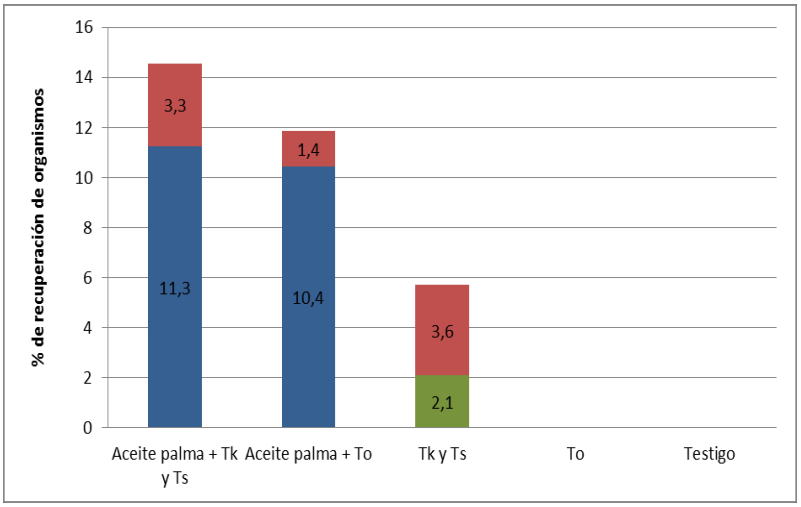



**Figura 4. Valores promedios de presencia de *Trichoderma koningiopsis, T. stromaticum* y *T. ovalisporum* a los 21 días después de aplicaciones en campo. EET- Pichilingue, 2012.**

**HJELJORD y TRONSMO, (1998),** indican que la selección de la época y frecuencia de aplicación deben hacerse cuando el antagonista tenga ventaja competitiva sobre el patógeno, para que pueda efectuarse el control de la enfermedad. Se reconoce que la eficiencia de los microorganismos podría estar influenciada por la época de aplicación, humedad y temperatura, debido a que estos parámetros influyen en su establecimiento**.**

Los períodos secos prolongados provocan que las poblaciones de *Trichoderma* en el suelo decrezcan, es posible que se desarrollen en la parte

área de la planta, en especial en tejido nuevo como flores **PAPAVIZAS, (1985)**.

De la observación de los dos figuras, se evidencia una concordancia entre lo ocurrido en la primera y en la segunda recuperación. El aceite de palma, por lo observado, ayuda a la colonización del agente de control biológico, la diferencia observada entre T1 y T2 podría deberse al hecho de que se está aplicando el doble de esporas en el primer caso pues en el T1 son 2 organismos, cada uno a razón de $1x10^{12}$ esporas cada uno, a diferencia del t2 en donde solo hay un organismo con dosis de $1x10^{12}$ esporas. En todo caso siempre es mayor la recuperación cuando el aceite interviene en la mezcla aplicada.

### 4.1.4. Presencia de *Bacillus pumilus* en el estudio de la combinación de agentes biológicos para el control de enfermedades del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L).

Se presentan en el Cuadro 7, los resultados obtenidos después de las aplicaciones realizadas en campo, el testigo y los tratamientos de *Bacillus pumilus* con y sin el surfactante presentaron el 0%, a los 7 y 21 después de cada aplicación.

**Cuadro 7. Valores promedios de presencia de *Bacillus pumilus*, a los 7 y 21 Valores promedios después de aplicaciones en campo. EET- Pichilingue, 2012.**

| Tratamientos | 7 DIAS | 21 DIAS |
|---|---|---|
| T5 | 0% | 0% |
| T6 | 0% | 0% |
| T7 | 0% | 0% |

Con respecto a la hipótesis planteada en esta investigación, se determinó que los tratamientos T1 (combinación de aceite de palma africana con la mezcla de los ACB 1 y 2), T2 (combinación de aceite de palma africana con el ACB 3),T3 (combinación sin aceite con la mezcla de ACB 1 y 2) y T4 (combinación sin aceite con el ACB 3), son los que presentaron menor incidencia de enfermedades en fruto, con respecto a los demás tratamientos, con un % superior de mazorcas sanas con un 41,90 % en el T1, y con un 11,69 % en el T2, mientras que en el T3 mostró un 29,87 % y 16,53 % en el T4, con lo cual se acepta la hipótesis inicialmente planteada.

# CAPÍTULO V

# CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 5.1. CONCLUSIONES

- Que las aplicaciones de *Trichoderma koningiopsis* y *Trichoderma stromaticum* combinado con el aceite de palma africana, mostraron tendencia a mejorar la sanidad del cultivo. En general, al disminuir las infecciones de enfermedades, aumentó la presencia de mazorcas sanas.

- Que *Trichoderma koningiopsis* y *Trichoderma stromaticum* son especies que se adaptan fácilmente al agroecosistema del cultivo de cacao y tienen la capacidad de mantenerse asociado a este.

- Que *Bacillus pumilus* requiere más frecuencia de aplicaciones y tiempo de evaluación para poder cuantificar su efecto.

## 5.2. RECOMENDACIONES

- Aplicar la combinación de aceite de palma africana con *Trichoderma koningiopsis* y *Trichoderma stromaticum*, en clones de cacao Nacional y Trinitario para evaluar la eficacia y eficiencia en el manejo de enfermedades.

- Evaluar en estudios posteriores diferentes dosis, época y frecuencia de aplicación de *Trichoderma koningiopsis, Trichoderma stromaticum* y *Trichoderma ovalisporum* en combinación con aceite de palma africana.

- Prolongar las aplicaciones de *Bacillus pumilus* a largo plazo (época de invierno) para que su mecanismo de acción sea más efectivo.

# CAPÍTULO VI

# BIBLIOGRAFÍA

## 6.1. Bibliografía

**AGRIOS, G. 2005.** Fitopatología. Fifth Edition. Elsevier Academic Press 922 p.

**ARIAS, D. y GUERRERO, R. 2006.** Determinación de la eficiencia de dos especies de los hongos del género *Trichoderma* (*T. koningiopsis – T. stromaticum*) para el control de las enfermedades de la mazorca de cacao (Theobroma cacao). Tesis. Ing. Agr. Quevedo. Ecuador. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. 96 p.

**BASTOS, C. 1996.** Potencial de *Trichoderma viride* no controle da vassoura de bruxa (*Crinipelis perniciosa*) do cacauerio. Fitopatología Brasileira, 21: 509 – 512.

**CARVALHO, A.; LOGUERCIO, L.; AITKEN, M.; COSTA, T.; POMELLA, A. 2005.** Desenvolvimiento de bioensaio para selecao de isolados de *Trichoderma stromaticum*, correlacionando esporulacao em campo com colonizacao em laboratorio. ***In***: Annais VIII Reuniao de Control Biológico de Fitopatógenos. Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimiento/ CEPLAC (BR). 114 p.

**DIAZ, M. y PUCHA, R. 2007.** Eficiencia de especies de *Trichoderma* en el control biológico de la Moniliasis (*Moniliopthora roreri*) y Escoba de bruja (*Crinipellis perniciosa*) del Cacao *Theobroma cacao* L. Tesis Ing. Agr. Quevedo. Ecuador. Universidad Técnica Estatal de Quevedo.59 p.

**EVANS, H.; HOLMES, K.; REID, A. 2003.** Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. Plant Pathology, 52: 476 – 485.

**FERNANDEZ, O. 2006.** Los microorganismos en el control biológico. Alternativas de producción en cuba. ***En***: Memorias del Curso Internacional Manejo Agroecológico de Plagas en el Sistema de Producción. Inisav, La Habana.

**FUNDACION HONDUREÑA DE INVESTIGACION AGRICOLA (FHIA). 2004.** Cultivo de cacao bajo sombra de maderables o frutales. Guía técnica. La

Lima, Cortes, Honduras, C. A. Diseño e Impresión: Centro de Comunicación Agrícola de la FHIA. Mayo 2004.

**GARCIA, E. 2000.** Control biológico de enfermedades en cultivos agrícolas, ***En***: Control biológico de plagas. Colegio de Postgraduados, Texcoco, México.

**HEBBAR, P.; KRAUSS, U.; SOBRERANIS, W.; LAMBERT, S.; MACHADO, R.; DESSIMONI, C.; AITKEN, M.; 2000.** Biocontrol of cacao diseases in Latino America status of field trials. ***In*** Workshop Manual Research Methodology for the Biological Control of Plant Diseases with special reference to fungal diseases of cacao. CATIE, Costa Rica. Krauss U. and Hebbar P. (eds).

**HJELJORD, L. y TRONSMO, A. 1998.** *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. ***En:*** Harman, G. Kubicek, C. *Trichoderma & Gliocladium* II: Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor & Francis Ltd. pp. 131 – 152.

**HOLMES, K.; SOLIS, K.; BEKKER, M.; GUERRERO, R.; ARROYO, C.; PENAHERRERA, S.; THOMAS, S.; CROZIER, J; KRAUSS, U.; SUAREZ, C. 2006.** Endophytic biocontrol agents, most effective isolate, at the right time?. ***In***: Eds. A. Y. Akrofi; F. Baah. Proceedings of INCOPED 5th Int. Seminar, 15 – 17 th. Oct., 2006, San José, CR. Pp. 55 - 61.

**KOVACH, J.; PETZOLDT, R.; HARMAN, E. 2000.** Use of Honey Bees and Bumble Bees to Disseminate *Trichoderma harzianum* to Strawberries for Botrytis Control. Holland.

**LOPEZ, O. 2007.** Determinación de grados de resistencia a la moniliasis en varios genotipos de cacao mediante la inoculación artificial de las mazorcas con *Moniliopthora roreri*. Tesis Ing. Agr. Quevedo. Ecuador. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. 54 p.

**MELNICK, R. 2010.** Endophytic *Bacillus* spp. of *Theobroma cacao*: ecology and potential for biological control of cacao diseases. The Pennsylvania

State University. The Graduate School Department of Plant Pathology. Pennsylvania. Thesis Doctor of Philosophy. 152 p.

**PAN (Pesticide Action Network – UK). 2001.** Sistemas de producción sostenibles de cacao. Reseñas sobre manejo de plagas No 12. 4 p. Disponible en http://www.pan-uk.org/Internat/IPMMinDC/Spanish12.pdf. Consultado el 09 de mayo del 2012.

**PAPAVIZAS, G. 1985.** *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology, 23: 23 – 24.

**PHILLIPS, W. 2006.** La Moniliasis del Cacao: un enemigo que podemos y debemos vencer. ***In*** Taller Regional Andino de Aplicación Tecnológica en el Cultivo de Cacao. Disco Compacto de ACCESO/INIAP/USDA.

**PINZON, U. y ROJAS, A. 2008.** Guía técnica para el cultivo del cacao. 3 ed. Bogotá. Colombia. FEDECACAO. 189 p.

**RAM, A.; VALLE, R.; ARÉVALO, E. 2004.** A Monilia do Cacaueiro. São Paulo, SP. Fundação Cargill. 36 p.

**SANCHEZ, L. ; GAMBOA, E. ; RINCON, J. 2003**. Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliopthora roreri* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao* L) en el estado Barinas. Rev. Fac. Agron. 20: 188 - 194.

**SUAREZ, C. y SOLIS, K. 2003.** Tácticas de manejo integrado de enfermedades disponibles para la producción de cacao orgánico en el Ecuador. ***En*** 1er. Seminario Nacional de Investigación en Agricultura Orgánica. EETP – INIAP/PROCIANDINO/GTZ. Tema 11.

**SOLIS, K. y SUAREZ, C. 2006.** Uso de *Trichoderma* spp. Para control del complejo moniliasis – escoba de bruja del cacao en Ecuador. ***En*** 15° Conferencia Internacional de Investigación en Cacao.

**SUAREZ, C. y SOLIS, K. 2008.** Avances de investigación en el manejo de Monilia, con énfasis en el Control Biológico y Químico. Ecuador.2 p.

**URTUBIA, I. y FRANCE, A. 2007.** Formulaciones de hongos entomopatógenos para el control de plagas en la agricultura. Disponible

en http://www.inia.cl/%20medios/biblioteca/ta/NR34779.pdf. Venezuela. Consultado el 11 de marzo del 2012.

**UNITED STATES AGENCY FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT. (USAID). 2007.** Informe de evaluación de plaguicidas y plan de acción para su uso más seguro (PERSUAP). Bogotá, Colombia 686 p.

# CAPÍTULO VII

# ANEXOS

## 7.1 ANEXOS

**Anexo 1.** **El presente trabajo de investigación fue auspiciado por las siguientes instituciones. EET - Pichilingue. 2012.**

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

**INIAP**

&

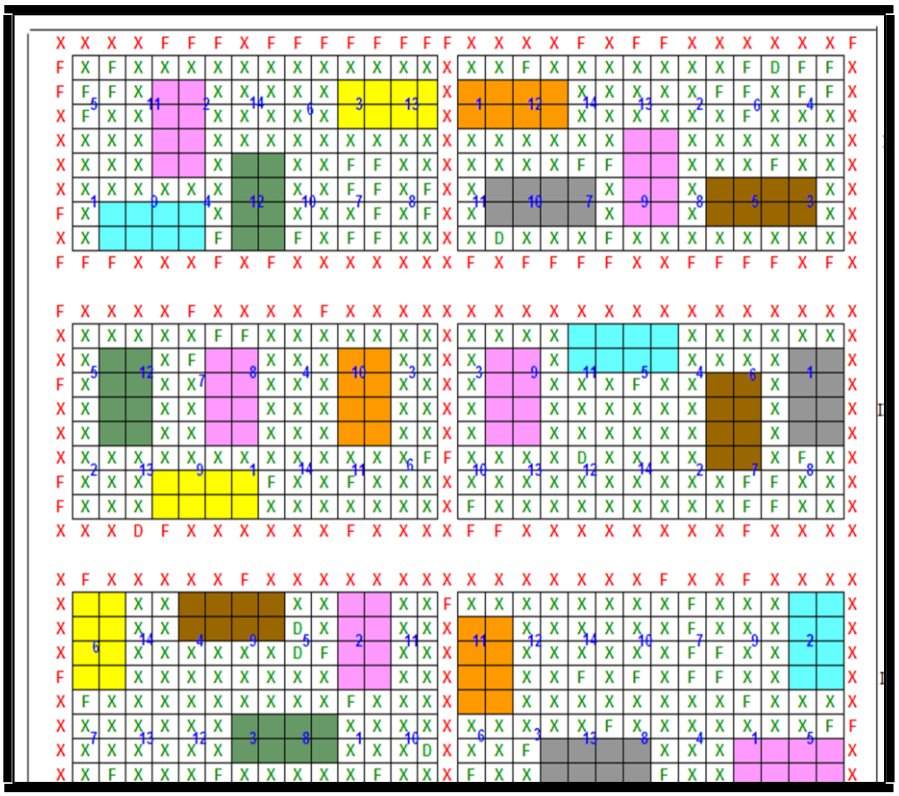
UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE

AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE

**USDA-ARS**

**PROYECTO:** "Desarrollo de un sistema de manejo integral de las enfermedades de cacao con énfasis en control biológico"

**Anexo 2. Croquis de campo del ensayo de selección de "Clones Nacionales". EET - Pichilingue. 2012.**



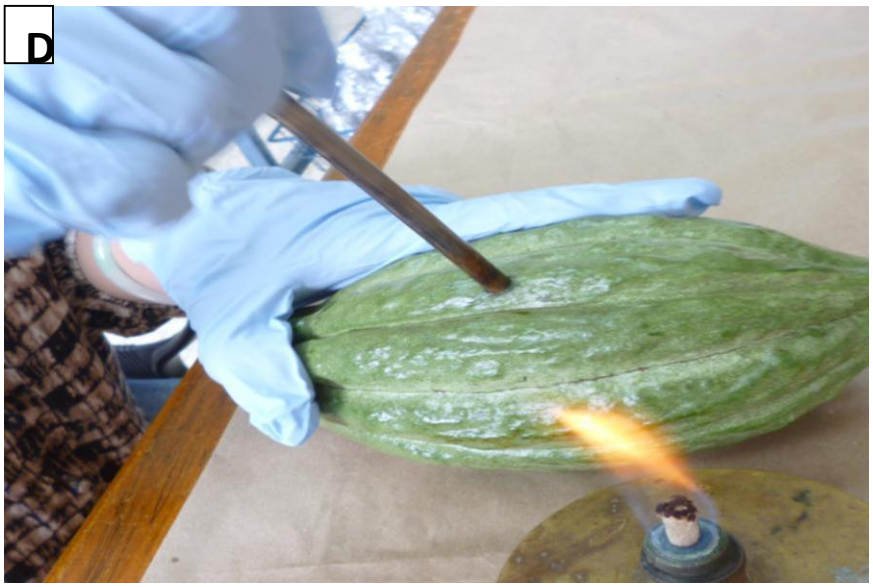
**Anexo 3. Delimitación de parcelas (A) y colocación de placas (B) a los árboles lote "Clones Nacionales". EET - Pichilingue. 2012.**

**Anexo 4. Preparación de la combinación de los agentes de control biológico con el aceite de palma africana. EET – Pichilingue. 2012.**

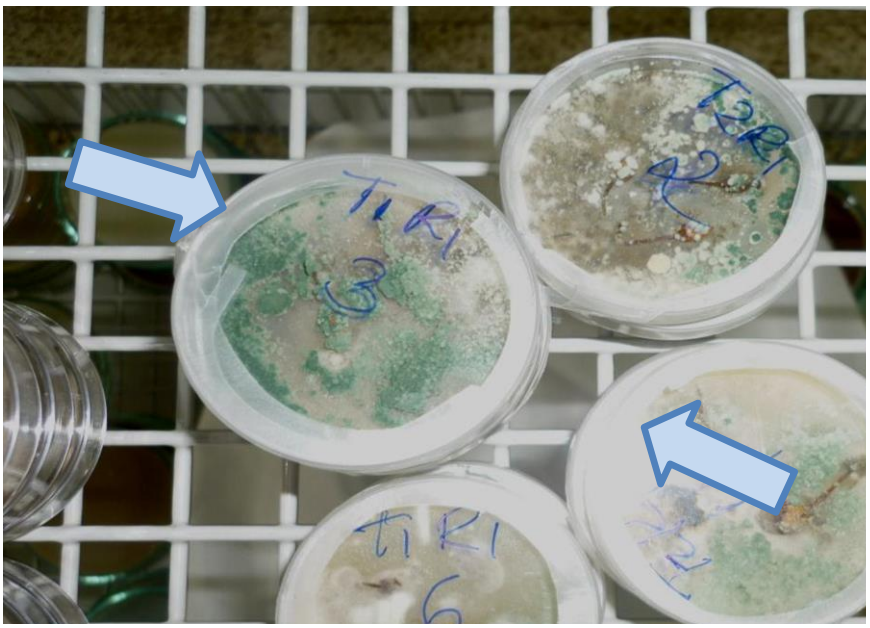
**Anexo 5.** ***Trichoderma koningiopsis, T. stromaticum, T. ovalisporum* y *Bacillus pumilus.* EET -- Pichilingue. 2012.**

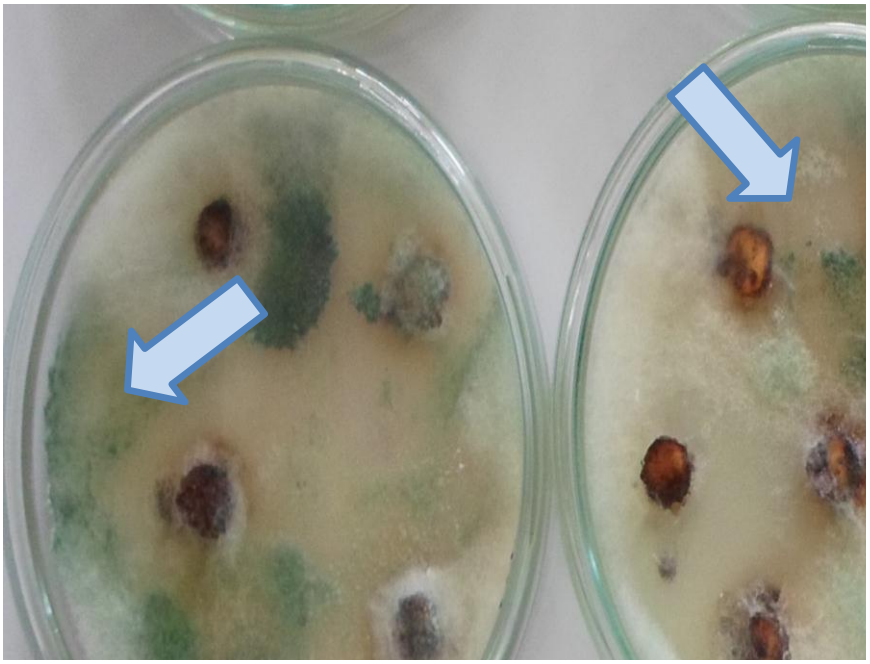
**Anexo 6. Aplicación de los tratamientos, en el estudio de la combinación de los agentes de control biológico con el aceite de palma africana. EET -- Pichilingue. 2012.**

**Anexo 7. Aislamientos de cojinetes florales (C) y de mazorca (D), de la combinación de los agentes de control biológico con el aceite de palma africana. EET - Pichilingue.2012.**



**Anexo 8. Recuperación de organismos (*Trichoderma*), aplicados con la combinación de los agentes de control biológico con el aceite de palma africana. EET - Pichilingue. 2012.**



**Anexo 9. Equipos de aspersión usados durante el experimento. INIAP- Pichilingue, 2012.**

**Anexo 10. Análisis de varianza de los valores promedios de recuperación de *Trichoderma koningiopsis, T. stromaticum* y *T. ovalisporum* a los 7 y 21 días después de aplicaciones en campo. INIAP- Pichilingue, 2012.**

**7 DIAS**

| Variable | N | $R^2$ | $R^2$ Aj | CV |
|---|---|---|---|---|
| 7 DIAS | 192 | 0,35 | 0,32 | 197,54 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---|---|---|---|---|---|
| Modelo. | 0,63 | 9 | 0,07 | 10,89 | <0,0001 |
| Tratamiento | 0,60 | 7 | 0,09 | 13,42 | <0,0001 |
| Repetición | 0,03 | 2 | 0,01 | 2,04 | 0,1332 |
| Error | 1,17 | 182 | 0,01 | | |
| Total | 1,80 | 191 | | | |

**Test:Tukey Alfa=0,01 DMS=0,08195**

*Error: 0,0064 gl: 182*

| Tratamiento | Medias | n | E.E. | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 8,00 | 0,00 | 24 | 0,02 | A | |
| 5,00 | 0,00 | 24 | 0,02 | A | |
| 3,00 | 0,02 | 24 | 0,02 | A | |
| 7,00 | 0,02 | 24 | 0,02 | A | |
| 6,00 | 0,03 | 24 | 0,02 | A | |
| 4,00 | 0,03 | 24 | 0,02 | A | |
| 2,00 | 0,05 | 24 | 0,02 | A | |
| 1,00 | 0,18 | 24 | 0,02 | | B |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,01)*

**21 DIAS**

| Variable | N | $R^2$ | $R^2$ Aj | CV |
|---|---|---|---|---|
| 21 DIAS | 192 | 0,52 | 0,50 | 140,21 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---|---|---|---|---|---|
| Modelo. | 2,47 | 9 | 0,27 | 22,12 | <0,0001 |
| Tratamiento | 2,42 | 7 | 0,35 | 27,89 | <0,0001 |
| Repetición | 0,05 | 2 | 0,02 | 1,92 | 0,1501 |
| Error | 2,26 | 182 | 0,01 | | |
| Total | 4,73 | 191 | | | |

**Test:Tukey Alfa=0,01 DMS=0,11372**

*Error: 0,0124 gl: 182*

| Tratamiento | Medias | n | E.E. | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 6,00 | 0,00 | 24 | 0,02 | A | |
| 8,00 | 0,00 | 24 | 0,02 | A | |
| 5,00 | 0,00 | 24 | 0,02 | A | |
| 4,00 | 0,00 | 24 | 0,02 | A | |
| 7,00 | 0,04 | 24 | 0,02 | A | |
| 3,00 | 0,05 | 24 | 0,02 | A | |
| 2,00 | 0,26 | 24 | 0,02 | | B |
| 1,00 | 0,28 | 24 | 0,02 | | B |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,01)*