



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMÍA

**ANTAGONISMO *IN VITRO* DE *Trichoderma* sp. Y DIVERSIDAD
GENÉTICA DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans DEL CACAO
(*Theobroma cacao* L.) EN LA PROVINCIA DE ORELLANA**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA AGRÓNOMA

AUTORA:

MARIA GABRIELA QUISPE GUAMANI

Riobamba – Ecuador

2023



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMÍA

**ANTAGONISMO *IN VITRO* DE *Trichoderma* sp. Y DIVERSIDAD
GENÉTICA DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans DEL CACAO
(*Theobroma cacao* L.) EN LA PROVINCIA DE ORELLANA**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA AGRÓNOMA

AUTORA: MARIA GABRIELA QUISPE GUAMANI

DIRECTOR: Ing. PABLO ISRAEL ÁLVAREZ ROMERO PhD.

Riobamba – Ecuador

2023

© 2023, Maria Gabriela Quispe Guamani

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Maria Gabriela Quispe Guamani, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 11 de diciembre de 2023



Maria Gabriela Quispe Guamani

C.I. 050411248-3

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMÍA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Proyecto de Investigación, **ANTAGONISMO *IN VITRO* DE *Trichoderma sp.* Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans DEL CACAO (*Theobroma cacao* L.) EN LA PROVINCIA DE ORELLANA**, realizado por la señorita: **MARIA GABRIELA QUISPE GUAMANI**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing Victor Alberto Lindao Cordova, PhD. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2023-12-11
Ing. Pablo Israel Álvarez Romero, PhD. DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-12-11
Ing. Norma Soledad Erazo Sandoval, PhD. ASESORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-12-11

DEDICATORIA

A Dios y la Virgencita por llenar mi corazón en cada momento, por no soltarme en los momentos más difíciles de mi adolescencia, a mis padres; Segundo y Martha por haberme guiado en todo momento y a ver fomentado en mis valores que me han conducido a donde estoy han sido mi ejemplo de lucha, cada logro es por ellos y para ellos, a mi hermano Marlon por apoyarme por encima de todo, a mis abuelos, tíos y demás familia por motivarme a nunca rendirme por mis sueños, y por siempre alentarme a cumplir mis metas, estaré eternamente agradecida por nunca haberme soltado en esta trayectoria de mi vida, al amor de mi vida Franklin por su apoyo incondicional, por sus consejos y por sobre todo luchar conmigo en todo momento, a mis amigos Magaly, Jhean Carlos, Yolanda, Javier, Adriana por haber sido mi segunda familia por no dejar que me rindiera nunca, este trabajo es para ustedes los amo inmensamente.

Gabriela

AGRADECIMIENTO

Mi más sincero agradecimiento al Ing. Pablo Álvarez Romero Ph. D por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por ser un ejemplo de perseverancia y motivarme a alcanzar mis metas, a la Ing. María Fernanda Espinoza y al Ing. Alvaro Rivera por ser mi guía en cada inquietud presentada en el desarrollo de mi trabajo, del mismo modo agradezco a las personas que me estiman, sin el cual no tendría la fuerza y energía que me anima a crecer como persona y como profesional.

Gabriela

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
SUMMARY.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	2
1.1. Planteamiento del problema.....	2
1.2. Objetivos.....	2
1.2.1. <i>General</i>	2
1.2.2. <i>Específicos</i>	2
1.3. Justificación.....	2
1.4. Hipótesis.....	3
1.4.1. <i>Nula</i>	3
1.4.2. <i>Alterna</i>	3

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. <i>Trichoderma</i> sp.....	4
2.1.1. <i>Generalidades</i>	4
2.1.2. <i>Taxonomía</i>	5
2.1.2. <i>Mecanismos de acción</i>	5
2.1.4. <i>Antagonismo</i>	7
2.2. <i>Moniliphthora roleri</i> H.C Evans.....	7
2.1.1. <i>Taxonomía</i>	8
2.2.2. <i>Ciclo biológico</i>	8
2.2.3. <i>Síntomas y daños</i>	9
2.2.4. <i>Especies afectadas</i>	10
2.2.5. <i>Manejo integrado</i>	10

2.2.5.1.	<i>Control cultural</i>	10
2.2.5.2.	<i>Control químico</i>	10
2.2.5.3.	<i>Control biológico</i>	11
2.3.	Cacao (<i>Teobroma cacao</i> L.)	11
2.3.1.	<i>Origen</i>	11
2.3.2.	<i>Clasificación taxonómica</i>	11
2.3.3.	<i>Morfología de la planta</i>	12
2.3.4.	<i>Principales enfermedades</i>	12
2.3.4.1.	<i>Moniliasis</i>	13
2.3.4.2.	<i>Phytophthora palmivora</i>	13
2.3.4.3.	<i>Escoba de bruja</i>	13
2.3.5.	<i>Principales países productores de cacao</i>	13

CAPÍTULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	15
3.1.	Características del lugar	15
3.1.1.	<i>Localización</i>	15
3.1.2.	<i>Ubicación geográfica</i>	15
3.2.	Materiales y equipos	15
3.2.1.	<i>Materiales de laboratorio</i>	15
3.2.2.	<i>Equipos de laboratorio</i>	15
3.2.3.	<i>Reactivos e insumos</i>	16
3.2.4.	<i>Material biológico</i>	16
3.2.5.	<i>Materiales de oficina</i>	17
3.3.	Metodología	17
3.3.1.	<i>Operacionalización de las variables</i>	17
3.3.1.1.	<i>Variables dependientes</i>	17
3.3.1.2.	<i>Variables independientes</i>	18
3.3.2.	<i>Diseño experimental</i>	18
3.3.2.1.	<i>Antagonismo</i>	18
3.3.2.2.	<i>Diversidad genética</i>	18
3.3.3.	<i>Análisis funcional</i>	18
3.4.	Manejo del ensayo de Antagonismo	18
3.4.1.	<i>Medio de cultivo</i>	19
3.4.2.	<i>Reactivación de cepas de antagonistas y patógenos</i>	19

3.4.3.	<i>Cultivo dual</i>	19
3.4.4.	<i>VARIABLES EVALUADAS</i>	20
3.4.4.1.	<i>Tasa de crecimiento micelial M.roreri</i>	20
3.4.5.	<i>Inhibición del crecimiento</i>	20
3.5.	Manejo del ensayo de diversidad genética	20
3.5.1.	<i>Extracción de ADN</i>	20
3.5.2.	<i>PCR con primers genéricos</i>	23
3.5.3.	<i>Electroforesis</i>	24
3.5.4.	<i>Secuenciamiento y análisis</i>	24
3.5.5.	<i>Análisis filogenético</i>	24
3.5.6.	<i>PCR con marcadores moleculares de tipo RAPDS</i>	25
3.5.7.	<i>Electroforesis</i>	26
3.5.8.	<i>Análisis de datos de la diversidad genética</i>	26

CAPÍTULO IV

4.	MARCO DE ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	28
4.1.	Procesamiento, análisis e interpretación de resultados	28
4.1.1.	<i>Adecuación del antagonismo in vitro</i>	28
4.1.2.	<i>Porcentaje de inhibición de Trichoderma sp. vs M.roreri</i>	28
4.1.2.1.	<i>Mecanismos de acción de Trichoderma sp.</i>	34
4.1.3.	<i>Caracterización molecular de las cepas de Moniliophthora</i>	36
4.1.4.	<i>Análisis filogenético</i>	38
4.1.5.	<i>Análisis de riqueza de los genotipos de M.roreri de diferentes localidades</i>	39
4.1.6.	<i>Discusión de resultados</i>	42
4.1.7.	<i>Comprobación de la hipótesis</i>	45

CAPÍTULO V

5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	47
5.1.	Conclusiones	47
5.2.	Recomendaciones	48

GLOSARIO

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1: Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma</i> sp	5
Tabla 2-2: Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> sp.....	6
Tabla 2-3: Clasificación taxonómica de <i>Moniliophthora roreri</i>	8
Tabla 2-4: Clasificación taxonómica del cacao	11
Tabla 2-5: Morfología y descripción de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	12
Tabla 2-6: Principales países productores de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) a nivel internacional	14
Tabla 3-1: Características geográficas del cantón Riobamba	15
Tabla 3-2: Cepas de <i>Moniliophthora roreri</i> H.C Evans utilizados en el estudio.....	16
Tabla 3-3: Especies de <i>Trichoderma</i> sp. utilizados como antagonistas.....	17
Tabla 3-4: Escala de evaluación de la capacidad antagónica de <i>Trichoderma</i> sp.....	19
Tabla 3-5: Protocolo de extracción de ADN.....	22
Tabla 3-6: Primers utilizados para el proceso de PCR.....	23
Tabla 3-7: Perfil térmico usado para realizar PCR	23
Tabla 3-8: Códigos de secuencias utilizadas para el árbol filogenético.....	24
Tabla 3-9: RAPDs empleados para determinar la diversidad genética.....	25
Tabla 3-10: Perfil térmico para marcadores RAPDs.....	26
Tabla 3-11: Matriz binaria para determinar el número de locus de los aislados de <i>M.roreri</i>	26
Tabla 4-1: Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición de <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Moniliophthora roreri</i> H.C Evans.....	31
Tabla 4-2: Secuenciación de especies de <i>M.roreri</i>	37
Tabla 4-3: Conjunto de aislados de <i>M.roreri</i> para el análisis de diversidad.....	39
Tabla 4-4: Índice de riqueza de los genotipos de <i>M.roreri</i> por localidad	41
Tabla 4-5: Índice de Shannon para los aislados de <i>M.roreri</i> por localidad.....	41

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 2-1:	Caracterización morfológica de <i>Trichoderma</i> spp	5
Ilustración 2-2:	Síntomas causados por <i>M.roreri</i> , a)Presencia de deformaciones llamadas gibas b) Maduración prematura (A + puntos aceitosos B) c) Manchas irregulares de color café d)Micelio incipiente en mancha color café e) Micelio del hongo sobre la mancha café, la etapa más contagiosa f) Fruto momificado	10
Ilustración 3-1:	a) Esterilización de materiales b) Retiró del micelio c) colocación de nitrógeno líquido al micelio d) Maceración del micelio e) Micelio pulverizado a un tubo nuevo f) Tubo con micelio pulverizado	21
Ilustración 3-2:	a) Adición de la solución de lisis nuclear b) Vortex por 3 s c) Incubación a 65°C d) Adición de la solución de precipitación de proteínas e) formación del pellet f) Transferencia del sobrenadante	21
Ilustración 3-3:	a) Adición de Isopropanol b) Formación de hilos de ADN c) Centrifugación d) Lavado con etanol e) Segundo lavado f) Incubar a 65° por 20 min g) Adición de la solución de rehidratación h) Cuantificación	22
Ilustración 4-1:	Confrontaciones de <i>Trichoderma</i> sp. vs <i>Moniliophthora roreri</i> H.C Evans	28
Ilustración 4-2:	a) <i>Trichoderma harzianum</i> (TH2) vs <i>M. roreri</i> (P), control del patógeno (CP). Especie de <i>Trichoderma</i> sp. con menor porcentaje de inhibición b) <i>Trichoderma</i> sp. colección Orellana (LBS1T) vs <i>M. roreri</i> (P), control del patógeno (CP).....	28
Ilustración 4-3:	a) <i>Trichoderma</i> sp. (A) vs <i>M. roreri</i> cepa 25 (P C25), control del patógeno(C25C). Cepa de <i>Moniliophthora roreri</i> H.C Evans con mayor porcentaje de inhibición a) <i>Trichoderma</i> sp. (A) vs <i>M. roreri</i> cepa 1 (P C1), control del patógeno (C1 C).....	29
Ilustración 4-4:	Interacciones con mayor porcentaje de inhibición de la especie de <i>Trichoderma</i> sp. frente a <i>Moniliophthora roreri</i> H.C Evans. a) <i>Trichoderma breve</i> (TB6) vs <i>M. roreri</i> Cepa 26 (C26) b) <i>Trichoderma harzianum</i> colección Orellana (NSHS3T) vs <i>M. roreri</i> Cepa 25 (C25 c) <i>Trichoderma breve</i> (TB6) vs <i>M. roreri</i> Cepa 17 (C17) d) <i>Trichoderma</i> sp. colección Orellana (LBS1T) vs <i>M. roreri</i> Cepa 25 (C25) e) <i>Trichoderma lentiforme</i> (TL3) vs <i>M. roreri</i> Cepa 11 (C11) f) <i>Trichoderma lentiforme</i> (TL3) vs <i>M. roreri</i> Cepa 25 (C25)	29

Ilustración 4-5:	Interacciones con menor porcentaje de inhibición de la especie de <i>Trichoderma</i> sp. frente a <i>Moniliophthora roreri</i> H.C Evans. a) <i>Trichoderma resei</i> (TR5) vs <i>M. roreri</i> Cepa 22 (C22) b) <i>Trichoderma</i> sp. colección Orellana (TB7) vs <i>M. roreri</i> Cepa 22 (C22) c) <i>Trichoderma</i> sp. colección Orellana (TB7) vs <i>M. roreri</i> Cepa 17 (C17) d) <i>Trichoderma</i> sp. colección Orellana (LBS1T) vs <i>M. roreri</i> Cepa 1 (C1) e) <i>Trichoderma</i> sp. colección Orellana (LBS1T) vs <i>M. roreri</i> Cepa 14 (C14) f) <i>Trichoderma resei</i> (TL3) vs <i>M. roreri</i> Cepa 24 (C24)	30
Ilustración 4-6:	Prueba de Tukey al 5 % para el porcentaje de inhibición de <i>Trichoderma</i> sp y <i>Moniliophthora roreri</i> H.C Evans.....	31
Ilustración 4-7:	Prueba de Tukey al 5 % para el porcentaje de inhibición de <i>Trichoderma</i> sp y <i>M.roreri</i>	32
Ilustración 4-8:	Escala de Bell de las mejores especies de <i>Trichoderma</i> sp. a) <i>Trichoderma harzianum</i> vs <i>M. roreri</i> b) <i>Trichoderma harzianum</i> obtenido de la provincia de Orella vs <i>M. roreri</i> c) <i>Trichoderma</i> sp. vs <i>M. roreri</i> d) <i>Trichoderma breve</i> vs <i>M.roreri</i> e) <i>Trichoderma longibrachatum</i> vs <i>M.roreri</i> f) <i>Trichoderma</i> sp vs <i>M.roreri</i> g) <i>Trichoderma resei</i> vs <i>M.roreri</i>	33
Ilustración 4-9:	Especies de <i>Trichoderma</i> sp. de clase II a) <i>Trichoderma andinanse</i> vs <i>M. roreri</i> b) <i>Trichoderma</i> sp. vs <i>M. roreri</i>	34
Ilustración 4-10:	Especies de <i>Trichoderma</i> sp. según la escala de Bell et al (1982)	34
Ilustración 4-11:	a) Competencia por espacio de <i>Trichoderma</i> sp.(A) vs <i>M.roreri</i> (P), la flecha corresponde al crecimiento del micelio sobre el hongo <i>M.roreri</i> , a las 72 horas b)Corresponde al crecimiento total alas 98h de crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. vs <i>M.roreri</i>	35
Ilustración 4-12:	a) Micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> sp.(A) vs <i>M.roreri</i> (P), el círculo corresponde a la forma de parasitar del hongo sobre <i>M.roreri</i> corresponde al crecimiento del micelio sobre el hongo <i>M.roreri</i> , b) <i>Trichoderma</i> sp. destruye las hifas de <i>M.roreri</i>	35
Ilustración 4-13:	Árbol filogenético generado de los aislados de <i>M.roreri</i> analizados en el estudio	38
Ilustración 4-14:	Número de genotipos multilocus por localidad.....	40
Ilustración 4-15:	Índice de riqueza de <i>M.roreri</i> por localidad.....	40
Ilustración 4-16:	Índice de riqueza de Shannon por localidad.....	41

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** CÁLCULOS PARA DETERMINAR REACTIVOS Y CANTIDADES PARA PREPARAR MEDIO V8 MODIFICADO
- ANEXO B:** PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO
- ANEXO C:** CULTIVO DUAL *M. roreri* vs *Trichoderma* sp.
- ANEXO D:** REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
- ANEXO E:** PROCESO ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR
- ANEXO F:** GELES REVELADOS EN ELECTROFORESIS CON PRIMERS ITS 4 Y 5
- ANEXO G:** GELES REVELADOS EN ELECTROFORESIS CON PRIMERS TIPO RAPDS
- ANEXO H:** CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans VS *Trichoderma andinense* (TA1)
- ANEXO I:** CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans VS *Trichoderma resei* (TR5)
- ANEXO J:** CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans VS *Trichoderma breve* (TB5)
- ANEXO K:** CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans VS *Trichoderma harzianum* (TH2)
- ANEXO L:** CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans VS *Trichoderma harzianum* colección Orellana (NSHS3T)
- ANEXO M:** CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans VS *Trichoderma lentiforme* (TL3)
- ANEXO N:** CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans VS *Trichoderma longibrachatum* (TL4).
- ANEXO O:** CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans VS *Trichoderma* sp. (LBS1T)
- ANEXO P:** CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans VS *Trichoderma* sp. (TB7)
- ANEXO Q:** PORCENTAJE DE INHIBICIÓN *Trichoderma* sp. vs *Moniliophthora roreri* H.C Evans
- ANEXO R:** PORCENTAJE DE INHIBICIÓN *Trichoderma* sp. vs *Moniliophthora roreri* H.C Evans

RESUMEN

El hongo *Moniliophthora roreri* H.C Evans ha causado pérdidas significativas en la producción del cultivo de cacao ya que no existen estrategias de control biológico ni información sobre la diversidad genética del patógeno en la provincia de Orellana, por lo tanto, el objetivo del presente trabajo de investigación fue estudiar el antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* sp. y la diversidad genética de *Moniliophthora roreri* H.C Evans del cacao (*Theobroma cacao* L.) en la provincia de Orellana. Se empleó un diseño completo al azar bifactorial, con nueve especies de *Trichoderma* sp. (factor A) y 21 cepas de *M. roreri* (factor B) con tres repeticiones, se realizaron confrontaciones mediante la técnica de cultivo dual, donde se evaluó el nivel de antagonismo, y se analizó mediante la prueba de Tukey al 5%. Para la diversidad genética, se extrajo el ADN genómico de *M. roreri* utilizando el Kit de Promega Wizard, y se agruparon los aislados de *M. roreri* por localidad luego se realizó el proceso de PCR con marcadores RAPD. Los resultados indicaron que *Trichoderma harzianum* fue la especie que generó el mayor porcentaje de inhibición sobre *M. roreri*, y la cepa C25 de la localidad La Belleza CCN51 del cantón Francisco de Orellana fue la más inhibida, del mismo modo las especies de *Trichoderma* sp. exhibieron capacidad antagónica de grado 1 y grado 2, en cuanto a la diversidad genética, la localidad de La Belleza destacó con siete genotipos y un índice de Shannon de 34,58. En conclusión, *Trichoderma* sp., demostró ser un hongo antagónico capaz de combatir patógenos y limitar el crecimiento de *M. roreri*, con relación a la diversidad la localidad de La Belleza fue la que presentó mayor número de genotipos multilocus en todos los análisis siendo la más diversa.

Palabras clave: <ANTAGONISMO>, <DIVERSIDAD GENÉTICA >, <CACAO (*Theobroma cacao* L.)>, <*Trichoderma* sp.>, <MONILLA (*Moniliophthora roreri*) >, <ELECTROFORESIS>, <INHIBICIÓN>, <AMPLIFICACIÓN>.



21-12-2023

2281-DBRA-UPT-2023

SUMMARY

The fungus *Moniliophthora roreri* H.C Evans has caused important losses in cocoa crop production because there are no biological control strategies or information on the genetic diversity of the pathogen in *Orellana* province, therefore, this investigation aimed to study the *in vitro* antagonism of *Trichoderma* sp. and the genetic diversity of *Moniliophthora roreri* H.C Evans of cocoa (*Theobroma cacao* L.) in *Orellana* province. A bifactorial randomized complete design was used, with nine species of *Trichoderma* sp. (factor A) and 21 strains of *M. roreri* (factor B) with three repetitions. Confrontations were carried out using the dual culture technique, to evaluate the antagonism and analyze it using Tukey's test at 5%. For genetic diversity, *M. roreri* genomic DNA was extracted using the Promega Wizard Kit, and *M. roreri* isolates were grouped by locality and then PCR was performed with RAPD markers. The results showed that *Trichoderma harzianum* was the species that generated the highest percentage of inhibition on *M. roreri*, and strain C25 from the places as *La Belleza* CCN51 in *Francisco de Orellana* canton was the most inhibited, in the same way the species of *Trichoderma* sp. exhibited antagonistic capacity of grade 1 and grade 2, in terms of genetic diversity, *La Belleza* stood out with seven genotypes and a Shannon index of 34.58. It is concluded that, *Trichoderma* sp. proved to be an antagonistic fungus good at combating pathogens and limiting the growth of *M. roreri*. Regarding to diversity, *La Belleza* was the place with the highest number of multilocus genotypes in all the analyses, and it was the most diverse.

Keywords: <ANTAGONISM>, <GENETIC DIVERSITY>, <COCOA (*Theobroma cacao* L.)>, <*Trichoderma* sp.>, <MONILLA (*Moniliophthora roreri*) >, <ELECTROPHORESIS>, <INHIBITION>, <AMPLIFICATION>.



Esthela Isabel Colcha Guashpa
0603020678

21-12-2023
2281-DBRA-UPT-2023

INTRODUCCIÓN

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el Ecuador ha constituido un importante rol en la economía e historia ecuatoriana, permitiendo a nuestro país mantenerse en altos estándares de productividad, propiciando de esta manera que este cultivo sea utilizado como alimento y como moneda. Las exportaciones de cacao en Ecuador crecieron un 14% en los primeros ocho meses de este año según lo informa la asociación de Exportadores de Cacao (ANECACAO, 2023), sin embargo, las últimas décadas se ha propagado la enfermedad de la moniliasis siendo está causada por el hongo basidiomiceto *Moniliophthora roreri* (Cif.) H.C. Evans, Stalpers, Samson & Benny, que ataca principalmente al cultivo de cacao y está presente en las zonas tropicales húmedas del Ecuador (García et al., 2021: págs.152-172).

El hongo fitopatógeno *M.roreri* es responsable de pérdidas de al menos el 80% de las cosechas anuales, su proceso de infección comienza cuando las esporas del hongo llegan a las mazorcas de cacao atacando únicamente a los frutos en diferentes etapas de desarrollo hasta su maduración, por lo general las partes más susceptibles son las mazorcas de uno a tres meses de edad, sus síntomas principalmente se asocian a deformación, manchas y estroma esporulante, la prevención y control de esta enfermedad necesita de un manejo integrado del cultivo que implica el conocimiento de la variabilidad y estructura genética del patógeno en estudio (Rodríguez y Fusco, 2017: págs. 60-61).

El hongo *M.roreri* ha sido combatido en su mayoría con los denominados fungicidas de contacto y sistémicos que controlan hasta un 20% de la enfermedad y protegen el cultivo, son utilizados con el objeto de mantener la constante producción del cultivo, sin embargo, el costo es elevado y no se ha observado eficiencia por parte de productos químicos conlleva a buscar nuevas medidas de control (González, 2018, págs. 1-10).

Por ello ante esta problemática fitosanitaria el empleo de microorganismos es cada vez más frecuente, es así que especies del género *Trichoderma* sp. aisladas en el hábitat donde se desarrollan las enfermedades de cacao se han presentado en experimentos *in vitro* contra los efectos de *M. roreri* agente causal de la moniliasis. En la búsqueda de alternativas de manejo integrado de esta enfermedad la selección de microorganismos antagonistas de *M.roreri* constituye una atractiva solución presentando riesgos ambientales y a la salud menores que los derivados por fungicidas de síntesis reduciendo la capacidad del patógeno para producir inóculo. *Trichoderma* sp. es capaz de producir diversos metabolitos y de adaptarse a diversas condiciones ambientales y sustratos, además de ser capaz de actuar como agente antagonista contra diferentes patógenos (Leiva et al., 2022: págs. 2-4).

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del problema

En el Ecuador la presencia del hongo *Moniliophthora roreri* (Cif.) H.C. Evans, Stalpers, Samson & Benny en el cacao (*Theobroma cacao* L.) es responsable de al menos el 80 % de pérdidas de producción, esta enfermedad hace que exista una disminución significativa de los ingresos económicos al país al ser el cacao un cultivo de exportación. No se posee información sobre el antagonismo de *Trichoderma* sp. a *M.roreri* , ni la diversidad genética de este patógeno en la provincia de Orellana.

1.2. Objetivos

1.2.1. General

Estudiar el antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* sp. y la diversidad genética de *Moniliophthora roreri* H.C Evans del cacao (*Theobroma cacao* L.) en la provincia de Orellana.

1.2.2. Específicos

Estudiar el antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* sp. a *Moniliophthora roreri* H.C Evans del cacao (*Theobroma cacao* L.) en la provincia de Orellana.

Analizar la diversidad genética de *Moniliophthora roreri* H.C Evans del cacao (*Theobroma cacao* L.) en la provincia de Orellana.

1.3. Justificación

El hongo *M.roreri* del cacao (*Theobroma cacao* L.) se ha considerado difícil de controlar para los agricultores dedicados a este cultivo, ya que en nuestro país no se posee suficiente información sobre el antagonismo de organismos biológicos como *Trichoderma* sp. a *M.roreri* , ni la diversidad genética de este patógeno en la provincia de Orellana, limitando de esta manera el desarrollo de estrategias de manejo que permitan reducir el impacto de la enfermedad sobre el cultivo de cacao, por tal motivo la investigación busca generar información sobre la diversidad

genética que posee *M.roreri* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con marcadores RAPD que permiten identificar polimorfismos además de la variabilidad genética, y a su vez determinar una alternativa de control usando organismos antagonistas como es el caso del hongo *Trichoderma* sp.

El antagonismo se realizó con la finalidad de evaluar el comportamiento del hongo *M.roreri* frente a siete especies de *Trichoderma* sp. (*T.harzianum* (TH2), *T.lentiforme* (TL3), *T.longibrachatum* (TL4), *T.resei* (TR5), *T.breve* (TB6), *T.andinanse* (TA1), *T.harzianum* (NSHS3T) y dos cepas de *Trichoderma* sp. (LBS1T Y B7) ,siendo organismos biológico importantes por sus diferentes mecanismos de acción frente a hongos fitopatógenos.

1.4. Hipótesis

1.4.1. Nula

Ninguna de las cepas de *Trichoderma* sp. presentan antagonismo *in vitro* y ninguno de los aislados de *Moniliophthora roreri* H.C Evans difieren genéticamente.

1.4.2. Alterna

Al menos una de las cepas de *Trichoderma* sp. presentan antagonismo *in vitro* y los aislados de *Moniliophthora. Roreri* H.C Evans difieren genéticamente.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. *Trichoderma* sp.

2.1.1. *Generalidades*

El hongo *Trichoderma* es cosmopolita es decir está distribuido en todo el mundo, siendo el más estudiado y conocido como agente de control biológico al ser un hongo antagonista en condiciones naturales, así mismo al tener un rápido crecimiento y desarrollo facilita su producción masiva para usarse posteriormente en la agricultura (Thapa et al., 2020: págs. 1-2).

Trichoderma sp. se distingue del resto de hongos por combatir organismos fitopatógenos transmitidos por diferentes medios en gran variedad de cultivos, su estudio ha permitido que sea usado con fines de uso agrícola en cultivos como el maíz, el tomate, el trigo, arroz, papas, tabaco, algodón, entre otros, controlando enfermedades como *Rhizotonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytum* sp. ,y *Sclerotinia sclrerotium*.(López, 2011, pág. 13)

Una de sus características más representativas es la de impedir el crecimiento y germinación de hongos patógenos en diferentes condiciones, en cuanto a su morfología presenta conidióforos ramificados en forma de un árbol pequeño, crestas compactadas con forma de anillos que simulan un sistema de ramas desigual en forma de pirámide, y pueden emerger directamente del micelio (Ilustración 2-1). Al tener una amplia gama de interacciones con varios organismos y ser considerado como un hongo cosmopolita su aislamiento del suelo es sumamente fácil debido a su capacidad de crecimiento rápido y además de colonización en diferentes tipos de sustratos (Mesa et al., 2019: págs. 33-34).



Ilustración 2-1: Caracterización morfológica de *Trichoderma* sp

Fuente: (Sood et al., 2020: págs. 3-4).

Este hongo puede introducirse en varios sistemas ya que además de generar un impacto reducido en el equilibrio de la capa freática del suelo permite que los organismos benéficos que controlan diferentes patógenos no sean perjudicados, además al ser utilizado en la rizosfera de una planta permite que esta mejore su defensa contra varios organismos perjudiciales como los hongos, y bacterias ya que genera una resistencia de las plantas a diferentes agentes principalmente de naturaleza biótica, esta resistencia es producto del incremento de metabolitos, enzimas y otros compuestos (Sood et al., 2020: págs. 3-4).

2.1.2. Taxonomía

Tabla 2-1: Clasificación taxonómica de *Trichoderma* sp

Reino:	Fungi
Phylum:	Acomyvota
Clase:	Sordariomycetes
Orden:	Hypocreales
Familia:	Hypocreaceae
Género:	<i>Trichoderma</i>

Fuente: (Schoch CL, et al. 2020).

Realizado por: Quispe, G., 2023.

2.1.2. Mecanismos de acción

El género *Trichoderma* sp. como antagonista posee diferentes mecanismos de acción como se mostrarán a continuación:

Tabla 2-2: Mecanismos de acción de *Trichoderma* sp

Mecanismo de acción	
Micoparasitismo	<p><i>Trichoderma</i> sp. es el hongo con mayor relevancia ya que es capaz de parasitar hongos fitopatógenos ya sea en mayor o menor medida, dando como resultado una estrategia de control inminente (Meyer et al., 2022: pp. 185-187). Las especies de <i>Trichoderma</i> que se usan con el fin de micoparasitismo crecen formando un complejo de interacción que es entre el patógeno y el antagonista actuando quimiotrópicamente en el hospedante, de este modo se enrolla a las hifas del hongo hasta destruirlas en diferentes (Harman et al., 2022: pág. 45).</p>
Antibiosis	<p>La actividad antibiótica de <i>Trichoderma</i> se caracteriza debido a la secreción de sustancias antibióticas o metabolitos que inhiben la actividad parasita de los patógenos, estos metabolitos cooperan con las enzimas que se encargan de la degradación de la pared celular en su posible control, ya sea en combinación con otros microorganismos o solos, beneficiaran al desarrollo de bioprotectores y bioestimulantes ecológicamente activos que no perjudiquen el suelo.(Meyer et al., 2022). En ocasiones al producir antibióticos existe una correlación con la posibilidad de control biológico, estos mecanismos van a depender de la cepa de <i>Trichoderma</i> y el hongo que se busca parasitar por ello para activar este mecanismo de acción se requiere de la producción de metabolitos (Infante et al., 2009: págs. 18-19).</p>
Inducción a la resistencia	<p>A si mismo la inducción a la resistencia de <i>Trichoderma</i> sp. por su característica celular, hace que el organismo de este hongo sea capaz de liberar compuestos que constituyen un mecanismo eficiente de defensa frente a otros hongos perjudiciales, en primera instancia libera proteínas que rápidamente se encargan de convertir una base en un producto, activar la resistencia del hongo indica que ocasionara diferentes cambios a nivel celular en el huésped de este modo las células contaminadas mueren (Martínez et al., 2022: págs. 5-6).</p>

Competencia	La competencia es un mecanismo de acción que determina el requerimiento que demandan dos organismos en un mismo ambiente, tal es el caso del hongo <i>Trichoderma</i> sp. que compite de manera extraordinaria por nutrientes y espacio en suelos , además debido a su rápido crecimiento de micelio crece sobre hongos fitopatógenos es decir de cierto modo impide que el patógeno absorba los nutrientes de un determinado medio evitando su desarrollo, mediante cultivo dual <i>in vitro</i> se ha observado como <i>Trichoderma</i> sp. actúa de manera inmediata creciendo y absorbiendo nutrientes del medio de cultivo impidiendo el crecimiento del hongo patógeno (Martínez et al., 2022: págs. 10-13).
Promoción de crecimiento	<i>Trichoderma</i> sp. se encuentran comúnmente en las raíces de las plantas, ya que primeramente deben colonizar las raíces de cualquier planta, para que se promueva el desarrollo vegetal y la protección ante diferentes enfermedades, existen estudios que garantizan que este hongo es muy eficiente, y el más utilizado para mejorar el crecimiento radical de las plantas (Santamarina et al., 2005).

Realizado por: Quispe, G., 2023.

2.1.4. Antagonismo

El antagonismo se considera como un fenómeno que acontece en microorganismos presentes en la rizosfera y el suelo, los hongos antagonistas son los encargados de producir antibióticos, que a su vez proceden a competir por nutrientes y por consecuencia generando que el hospedero tenga mayor resistencia. Específicamente el género *Trichoderma* sp. se caracteriza por estar presente en el suelo además de su rápido desarrollo en cualquier base o sustrato, este hongo ha sido utilizado con un objetivo ; brindar protección a las plantas durante el proceso de infección o incluso antes, considerado como antagonista por su capacidad de competencia además de parasitar al patógeno en combinación con sus mecanismos de acción que son indispensables ya que a través de ellos elimina al patógeno evitando que se propague (Navarrete y Tellos,2018: págs. 11-12).

2.2. Moniliphthora roreri H.C Evans

La moniliasis es una enfermedad cuyo agente causal es el hongo *M.roreri* que afecta únicamente a los frutos de cacao, puede afectar a la mayoría de ellos cuando los cultivos están siendo manejados inadecuadamente (Evans et al. , 2003 ; citados Pérez y Zorrilla, 2017). Se considera a esta enfermedad con el potencial de afectar los rendimientos cacaoteros entre un 20 y 80%, conocida también la enfermedad de la vaina helada, o enfermedad de Quevedo en honor al lugar en donde

empezó a existir la epidemiología de la enfermedad, es importante tener en cuenta que es una de las enfermedades más destructivas del cultivo de cacao, puesto que afecta al fruto de cacao en cualquier edad (Delgado y Suarez, 1993: págs.10-11).

Al existir indicios de la existencia de esta enfermedad en las plantaciones de cacao ecuatorianas en provincias como Guayas y Los Ríos, se tuvo que confrontar un severo problema ya que la producción empezaba a generar grandes pérdidas. (Montalvo, 2012, pág. 29).

2.1.1. Taxonomía

Tabla 2-3: Clasificación taxonómica de *Moniliophthora roreri*

Reino:	Fungi
Phylum:	Basidiomycota
Clase:	Basidiomycetes
Orden:	Agaricales
Familia:	Tricholomataceae
Género:	<i>Moniliophthora</i>
Especie:	<i>Moniliophthora roreri</i>

Fuente: (Bailey & Meinhardt, 2016 págs; 75-76).

Realizado por: Quispe, G., 2023.

2.2.2. Ciclo biológico

M.roreri inicia cuando la humedad es baja es decir en época de sequía, ya que se generan gran cantidad de esporas, las mismas que son transportadas a través del viento y depositadas en los frutos y en la superficie de las plantas de cacao produciendo de esta manera la diseminación de la enfermedad. Las partes de las plantas más propensas a ser infectados con la enfermedad son los frutos con una edad menor a tres meses en donde se observan como masas blancas en estado polvoriento infecta la superficie del fruto, el patógeno generalmente actúa en el instante en que los conidios germinan en temperaturas que superan los 24°C y en ambientes que generen humedad, en el transcurso de 8 horas las hifas son capaces de atravesar por la epidermis que se dirigen a los tejidos principales que se encuentren en el mesodermo y las semillas provocando que se generen aquellas proteínas que producen la necrosis lo que causa que el tejido del fruto mueran, uno de los factores clave para detectar la distribución de esta enfermedad en Ecuador es la cantidad de mazorcas infectadas en diversas zonas productora de cacao (Álvarez et al., 2014 págs.391).

De acuerdo con la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (2003, pág.10), los conidios siempre requerirán que exista agua para su posterior germinación, por lo que la enfermedad tiene mayor incidencia durante épocas de lluvia, cuando el inoculo se presenta en mayor cantidad los síntomas y daños serán más severos , en la mayoría de los casos la diseminación de la enfermedad se da por el mismo ambiente , es decir si existen frutos que contienen las esporas y se realizan las actividades de manejo de cultivo se genera la liberación de conidios a otras áreas de las plantaciones.

2.2.3. Síntomas y daños

Los síntomas más frecuentes de la enfermedad se observan en órganos como el fruto con no menos de tres meses siendo los más susceptibles a la infección, de acuerdo a la edad de la fruta los síntomas varían por ejemplo en frutos de tres meses de edad el primer síntoma de infección es la aparición de bultos, o protuberancias, por otro lado, en frutos de más de tres meses, el primer síntoma es la aparición de manchas de aceite bajo la epidermis en el interior del fruto (Cubillos et al., 2019 págs.14).Estos tejidos al descomponerse se tornan en una masa de una sustancia acuosa debido a su descomposición, en algunos casos siendo las almendras destruidas, dependiendo del tiempo de infección algunas almendras pueden o no ser afectadas, a partir del proceso de la infección se produce hasta los primeros síntomas pasa un mes o un mes y medio dando paso a la mancha chocolate, y luego de 9 días se observa una estructura lanosa o en color crema que indica que las esporas del hongo han madurado (Perez,2016; citado en Medina, 2022, págs. 12-13).

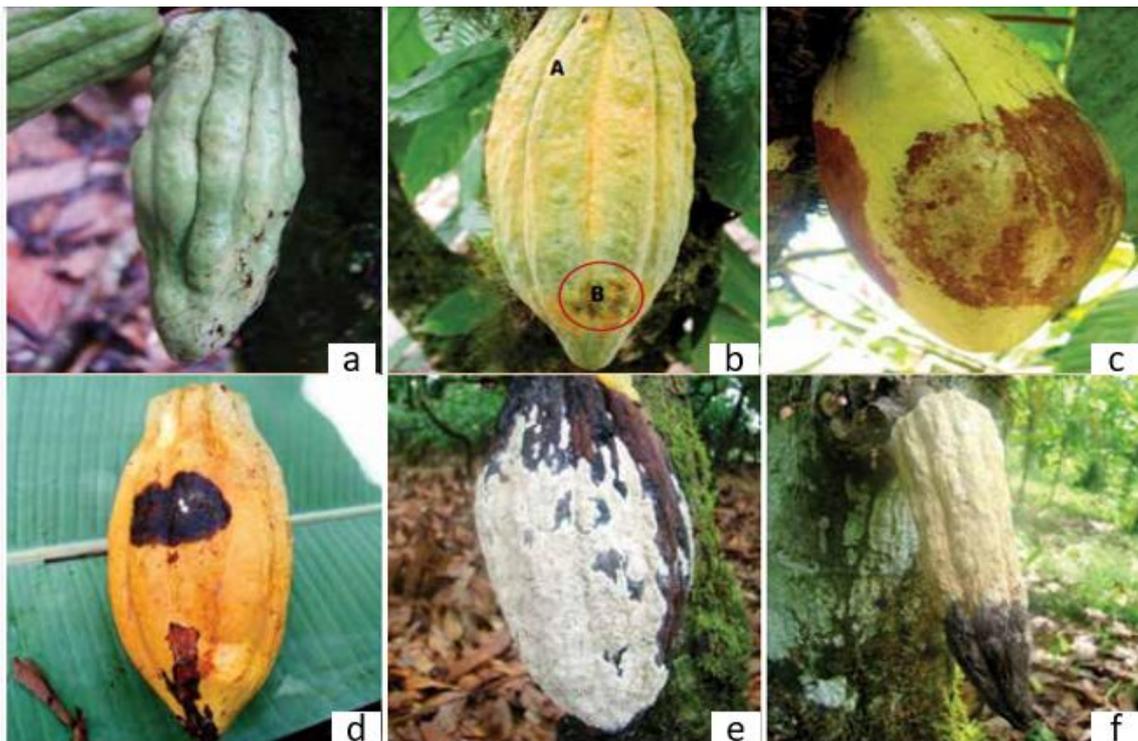


Ilustración 2-2: Síntomas causados por *M.roreri*, a) Presencia de deformaciones llamadas gibas b) Maduración prematura (A + puntos aceitosos B) c) Manchas irregulares de color café d) Micelio incipiente en mancha color café e) Micelio del hongo sobre la mancha café, la etapa más contagiosa f) Fruto momificado

Fuente: (Phillips y Cerda, 2011, pág.6).

2.2.4. Especies afectadas

M.roreri como hospedero principal se encuentra en frutos de *Theobroma cacao*, y en parientes cercanos como *T. bicolor* y *T. glandiflorum*, las pérdidas de producción van desde 45% a 100 % en variedades comerciales como el cacao clonal de la Colección Clonal Naranjal 51 (CCN-51) representa pérdidas millonarias al año, dentro de las especies de cacao las especies que presentan síntomas y daños de la enfermedad de la moniliasis son los cultivares; Super Árbol, CCN51 y Cacao Nacional. (Phillips y Cerda, 2011, pp. 5-6).

2.2.5. Manejo integrado

2.2.5.1. Control cultural

Una de las actividades del manejo integrado para combatir esta enfermedad está en el control cultural, cuyo objetivo se centra en ayudar a que los productores de cacao apliquen un manejo adecuado para la conservación de sus plantaciones, para ello dentro de este enfoque se busca impedir que hongo entre y ataque al fruto, entre las actividades que evitan la diseminación están ; remover los frutos infectados antes de que las esporas se dispersen limitando de manera inmediata el crecimiento del hongo, del mismo modo controlar las malezas, realizar podas en la época y manera correcta beneficiara a que las plantas posean mayor vigorosidad (Sánchez y Garcés, 2012: pág. 254).

2.2.5.2. Control químico

El uso de productos químicos ha sido el control más utilizado, dentro de los fungicidas utilizados los sistémicos son aquellos que generan mayor control sobre *M.roreri*, algunos productos con elementos de oxiclورو de cobre poseen la mayor eficacia sobre el cultivo de cacao en cuanto a su control, aunque se suelen emplear productos químicos protectantes, aun así, los de mayor utilidad son aquellos con compuestos de cobre y protectantes de tipo biológico demuestran una reducción en la incidencia del hongo. Se ha sugerido el uso de fungicidas para el control de

M.roreri de cacao en diferentes lugares, sin embargo, en la mayoría de los casos se consideran poco eficiente y costoso, lo que determina que este método sea menos eficaz. Además, los fungicidas, al igual que otros pesticidas, causan contaminación al ambiente, con efectos nocivos en diferentes organismos, por lo cual, no se recomienda su aplicación (Sánchez y Garcés, 2012: pág. 255).

2.2.5.3. Control biológico

El control biológico es la manipulación directa e indirecta de los seres humanos en la que organismos con vida son utilizados con la finalidad de reducir la incidencia de diferentes patógenos y sus densidades poblacionales, generalmente suelen hallarse de forma natural y tienen la capacidad de control, bajo condiciones de laboratorio se han obtenido resultados efectivos aislando cepas de los hongos *Trichoderma* sp. con acción antagónica sobre la colonia de *M.roreri* (Vera et al., 2018: pág. 83).

2.3. Cacao (*Theobroma cacao* L.)

2.3.1. Origen

Se considera que el principal origen del árbol de cacao está situado en el Noroeste de América del Sur, en los trópicos húmedos de la zona alta de la Amazonia en países como Brasil, Colombia, Perú, Ecuador, se fue extendiendo a América Central donde las culturas nativas de esta región, como los Olmec y los Mayas, lo utilizaban y lo consideraban como "el alimento de los dioses". El cacao fue localizado por primera vez por los colonos en 1519 en México puesto que se cultivaba por la civilización Azteca de allí comienza su expansión y generando centros de producción masivas en lugares como Ecuador, América central y Venezuela (Alcívar et al., 2016: pág.9).

2.3.2. Clasificación taxonómica

Tabla 2-4: Clasificación taxonómica del cacao

División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Malvales
Familia:	Esterculiaceae
Género	<i>Theobroma</i>
Especie:	<i>Theobroma cacao</i> L.

Fuente: (Schoch CL, et al., 2020).

Realizado por: Quispe, G., 2023.

2.3.3. Morfología de la planta

Tabla 2-5: Morfología y descripción de cacao (*Theobroma cacao* L.)

Raíz:	Su sistema radicular se caracteriza por ser pivotante en plantas que provienen de semillas formándose hasta los 2 m, consta de raíces principales y secundarias distribuidas a 15 cm por debajo del suelo, además los pelos absorbentes ubicados de 0 a 5 cm de profundidad del suelo encargados de la absorción de agua y nutrientes
Tallo:	La planta de cacao posee dos tipos de tallos: aquellos que crecen de forma recta y vertical llamados ortotrópico que provienen de plantas por semillas y aquellas plantas que son producidas por injertos que su crecimiento es horizontal y lateral llamados plagiotrópicos. La corteza del tallo es de color oscuro (gris-café), pueden alcanzar entre 1 – 2 m de altura a una edad de 1 a 1.5 años de edad, es donde sus yemas apicales se detienen para dar inicio a la formación de 3 a 5 ramas laterales las cuales son conocidas como horquetas o verticilo
Hojas	Las hojas son grandes y perennes, están ordenadas de forma alterna poseen longitudes de 20-35 cm de largo y de 15 cm de ancho, tienen consistencias gruesas son de color verde oscuro en el haz, y en el envés de tono más pálido.
Flores	También llamado cojinete floral o botón floral el cual puede contener de 1 – 40 flores que una vez abiertas solo tienen 48 horas de viabilidad para ser polinizadas por insectos o de forma manual
Fruto	La fruta del árbol de cacao es conocida como mazorca, botánicamente es una baya la cual adopta diversas formas, tamaños y colores de acuerdo a la especie y variedad que pertenezcan, sus tamaños varían de los 10 – 35 cm de longitud, su forma es ovalada y alargada con puntas prominentes y otras achatadas según su variedad que pertenezcan, son de color verde o rojas en su fase inicial y cuando llegan a la maduración se tornan de color amarillo generalmente
Semillas	Son del tamaño de almendras grandes de color chocolate, recubiertas por el mucilago blanco y de sabor dulce lo que lo caracteriza, comúnmente se conocen como granos de cacao o como habas.

Fuente: (Valencia y Zambrano, 2020, págs. 7-8).

Realizado por: Quispe, G., 2023.

2.3.4. Principales enfermedades

2.3.4.1. *Moniliasis*

Es causada por el hongo *M. rozeri*, esta enfermedad ocasiona pérdidas del 40% de la producción de cacao, la infección se presenta en cualquier fase de desarrollo del fruto, aunque la mayor susceptibilidad afecta a los frutos de cacao en los primeros inicios de crecimiento del mismo. Los síntomas de la enfermedad se presentan de forma diferente en función de la edad del fruto, las condiciones climáticas son un factor fundamental para que inocule el, en los frutos jóvenes se observa la formación de protuberancias en la corteza denominada giba siendo visibles las lesiones en el tiempo de 45 o 85 días y es considerada como la etapa biotrófica de ataque del hongo, por otra parte cuando las lesiones toman un aspecto de color café o en tono chocolate se denomina la etapa necrótica del hongo cuando estas manchas crecen cubren todo el fruto dando lugar a la formación de una capa de aspecto algodonoso que es el micelio del hongo. (Suárez y Aranzazu, 2010, pág. 47).

2.3.4.2. *Phytophthora palmivora*

Esta enfermedad ataca con mayor intensidad a los frutos de cacao, aunque se pueden detectar síntomas en diferentes partes de la planta, genera pérdidas del 30% al año además de matar a los árboles de cacao, se caracteriza por presentar manchas de color pardo que pueden llegar a contaminar todo el fruto evitando su producción, en épocas de lluvia el agua traslada las esporas que se localizan en el suelo siendo uno de los factores de mayor diseminación de la enfermedad. (Suárez y Aranzazu, 2010, pág. 28).

2.3.4.3. *Escoba de bruja*

En Ecuador es considerada una de las enfermedades más severas con el 80% de pérdidas de la producción de cacao, su agente causal es *Moniliophthora perniciosa*, provoca varios síntomas en el cultivo, durante el ciclo vegetativo la enfermedad ataca las partes de los árboles como ramas y brotes provocando un abultamiento en la infección haciendo que la planta se debilite, si el patógeno invade las yemas da lugar a la formación de pequeñas hojas en forma de escoba causado por la hipertrofia, otro síntoma visible son la clorosis de las hojas, hojas quebradizas y necrosadas; cuando En el fruto ataca en las 35 primeras semanas de formación del fruto y se desarrolla a medida que el fruto crece (Suárez y Aranzazu, 2010, pág. 38).

2.3.5. *Principales países productores de cacao*

El cacao es representativo a nivel internacional puesto que su producción a generado diversas fuentes de trabajo que han incrementado en una gran escala el desarrollo económico a nivel nacional e internacional. Los países con mayor producción a nivel son mundial África con mayor cobertura del 73%, seguido en segundo lugar por América con el 17%, y Asia y Oceanía con el 10%, a nivel de países en orden de importancia son Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Nigeria, Camerún, Brasil, Ecuador, Perú, República Dominicana y Colombia que concentran el 93% de la producción total (Tabla 2-6) (Arévalo et al. 2016, págs. 4-5).

Tabla 2-6: Principales países productores de cacao (*Theobroma cacao* L.) a nivel internacional

Principales países productores a nivel mundial	Producción (miles TM)
Costa de Marfil	1,471,267
Ghana	747,635
Indonesia	656,127
Nigeria	340,845
Camerún	232,108
Brasil	224,159
Ecuador	155,488
República Dominicana	60,701
Perú	56,586
Papua Nueva Guinea	44,2
México	28,213
Otros	274,766

Fuente: (Arévalo et al. 2016, págs. 4-5).

Realizado por: Quispe, G., 2023.

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Características del lugar

3.1.1. Localización

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ubicado en el Cantón Riobamba provincia de Chimborazo.

3.1.2. Ubicación geográfica

Tabla 3-1: Características geográficas del cantón Riobamba

Lugar	Riobamba provincia de Chimborazo
Altitud	2850 m. s. n. m.
Latitud	01° 38' 51'' S
Longitud	78° 40' 59'' W

Fuente: (Estación Meteorológica ESPOCH, 2021).

Realizado por: Quispe, G., 2023.

3.2. Materiales y equipos

3.2.1. Materiales de laboratorio

Cajas Petri de vidrio (90 mm), botellas de vidrio de tapa roscable (900 mL), sorbetes, palillos, morteros y pistilos esterilizados, guantes de nitrilo, papel toalla, papel film, puntas para micropipetas de (10 µL, 100 µL y 1000 µL), cinta masking, papel aluminio, Erlenmeyer de 100 ml, microtubos de 2 µL, 1,5 µL y 200 ml, mascarillas, probeta (100 mL y 1000 mL), micropipeta (10 µL, 100 µL y 1000 µL), cucharas desechables, jeringa.

3.2.2. Equipos de laboratorio

Cámara de flujo laminar (OASIS 200038), incubadora (J.P SELECTA S.A 2001249), destilador de agua (BOECO WS 8000), autoclave (BIOBASE BKQ-B100II), microondas (PANASONIC 900W), calibrador digital (VERNIER), balanza de precisión (RADWAG AS220.R2), secador de

vidrio (SELECTA 200038), cámara fotográfica (CANNON), centrifuga (EPPENDORF 5424), termociclador (EPPENDORF Vapo.protect), bioespectrofotómetro (EPPENDORF basic), refrigeradora (DUREX), vortex (QILINBEIER QL-901), transluminador UV (FISHER SCIENTIFIC 88A), termobloque (HM100-PRO), agitador magnético (STABLE TEMP 03407-00), cuba de electroforesis (FISHER SCIENTIFIC FB-SB-710), fuente de poder para electroforesis (FISHER SCIENTIFIC FB300).

3.2.3. Reactivos e insumos

Alcohol al 70%, agua destilada estéril, asparagina (DIFCO), carbonato de calcio (ACROS ORGANICS), bacto agar (BD DIFCOTM), extracto de malta (MERCK), maltosa (GIBCO), jugo de vegetales V8, Kit de extracción de ADN (PROMEGA Wizard® Genomic DNA), isopropanol grado biología molecular frío, cloroformo-alcohol-isoamílico (24:1), nitrógeno líquido, etanol 70%, ampicilina de 500 g, agua ultrapura, Mix 2X Go Taq® Green, Primers RAPDs (OPA 2, OPA 4, OPA 1), PRIMERS (ITS 4 Y 5), Intercalante (Diamond™ Nucleic Acid Dye), DNA Ladder Bench Top 100 kb (PROMEGA), 10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen).

3.2.4. Material biológico

Las cepas de *M. roreri*, empleadas en el estudio son aislados provenientes de diferentes localidades y genotipos de la provincia de Orellana (Tabla 3-7).

Tabla 3-2: Cepas de *Moniliophthora roreri* H.C Evans utilizados en el estudio

CANTÓN	Localidad	GENOTIPO	CÓDIGO	N° CEPA
Loreto	La paz	Super Árbol	OL-03-A1	C10
Loreto	La paz	CCN51	OL-P-07-A1	C1
Francisco De Orellana	La Belleza	CCN51	O-FO-03-A1	C18
Francisco De Orellana	La Belleza	CCN51	O-FO-03-A2	C20
Francisco De Orellana	La Belleza	CCN51	O-FO-05-A1	C19
Francisco De Orellana	La Belleza	CCN51	O-FO-09-A1	C21
Francisco De Orellana	La Belleza	CCN51	O-FO-09-A2	C14
Francisco De Orellana	Bajo Huiruno	CCN51	OL-09-A1	C6
Francisco De Orellana	La Belleza	CCN51	O-FO-MF-05	C23
Francisco De Orellana	La Madgalena	CCN51	O-FO-MD-02	C24
Francisco De Orellana	La Belleza	CCN51	O-FO-COCA	C25
Joya de los Sachas	La Calumeña	Super Árbol	OS-LS-03-A1	C3
Joya de los Sachas		Super Árbol	OS-UM-03-A2	C22
Joya de los Sachas	INIAP EECA	Tipo Nacional	OS-SC-03-A1	C8
Joya de los Sachas	INIAP EECA	Tipo Nacional	OS-SC-03-A2	C15

Joya de los Sachas	La Calumeña	Super Árbol	OS-LS-05-A 2	C12
Joya de los Sachas	La Calumeña	Super Árbol	OS-LS-05-A3	C9
Joya de los Sachas	INIAP EECA	Tipo Nacional	OS-SC-05-A1	C16
Joya de los Sachas	La Calumeña	Super Árbol	OS-LS-09-A3	C11
Joya de los Sachas	INIAP EECA	Tipo Nacional	OS-SC-09	C17
Joya de los Sachas	Getsemaní	CCN51	O-FO-SACHA	C26

Realizado por: Quispe, G., 2023.

Las especies de *Trichoderma* sp. que se utilizaron como antagonistas se muestran en la siguiente tabla (Tabla 3-9):

Tabla 3-3: Especies de *Trichoderma* sp. utilizados como antagonistas

ESPECIE	Código
<i>Trichoderma harzianum</i>	NSHS3T
<i>Trichoderma</i> sp.	LBS1T
<i>Trichoderma andinense</i>	TA1
<i>Trichoderma harzianum</i>	TH2
<i>Trichoderma lentiforme</i>	TL3
<i>Trichoderma longibrachatum</i>	TL4
<i>Trichoderma resei</i>	TR5
<i>Trichoderma breve</i>	TR6
<i>Trichoderma</i> sp.	TB7

Realizado por: Quispe, G., 2023.

3.2.5. Materiales de oficina

Computadora, calculadora, papel bond, impresora, flash memory, libreta de apuntes, cinta adhesiva, estiletes, esferográficos, cámara, fomix azul, marcador punta fina, regla 50 cm.

3.3. Metodología

3.3.1. Operacionalización de las variables

3.3.1.1. Variables dependientes

-Nivel de antagonismo de *Trichoderrma* sp.

-Diversidad genética de *Moniliophthora roreri* H.C Evans.

3.3.1.2. Variables independientes

-Cepas de *Trichoderma* sp.

-Localidades

-Genotipos de cacao.

3.3.2. Diseño experimental

Se tomó en consideración 21 cepas de *Moniliophthora roreri* H.C Evans de la provincia de Orellana, las mismas que fueron analizadas en las siguientes fases

3.3.2.1. Antagonismo

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) bifactorial (9 x 21) con tres repeticiones.

Factor A: Especies de *Trichoderma* sp.

Factor B: Cepas de *M.roreri*

Factor AxB: Especies de *Trichoderma* sp. x Cepas de *M.roreri*

3.3.2.2. Diversidad genética

Se calculó los índices de diversidad de riqueza e Índices de Shannon.

3.3.3. Análisis funcional

Para la separación de medias con respecto al antagonismo se utilizó la prueba de Tukey al 5%

3.4. Manejo del ensayo de Antagonismo

3.4.1. Medio de cultivo

Para la siembra del hongo *M.roreri* se utilizó el medio de cultivo V8 modificado propuesto por Phillips-Mora (2003, pág.7).

3.4.2. Reactivación de cepas de antagonistas y patógenos

Para la reactivación del hongo *M.roreri*, y de las especies de *Trichoderma* sp. , se esterilizó cajas Petri ,medio de cultivo y palillos en el autoclave, posteriormente en la cabina de flujo laminar se dispensó 15 mL de medio V8 en cada caja, dejando que se gelifique por un determinado tiempo, con un palillo estéril se tomó una porción de micelio de tubos conservados con el hongo y el antagonista, se transfirió el micelio de cada cepa en cada caja, seguidamente se selló las cajas con el fin de evitar contaminación hasta que el medio de cultivo se encuentre lleno.

3.4.3. Cultivo dual

Se realizaron confrontaciones en donde se evaluó el nivel de antagonismo de 9 cepas nativas de *Trichoderma* sp. frente a 21 cepas de *M.roreri* *in vitro*, mediante el método de cultivo dual en cajas Petri en medio de cultivo V8, con un sorbete esterilizado se procedió a colocar discos de 5 mm de micelio en cada extremo de la caja petri dejando 1cm al borde de cada una, y se incubo a 25° C ,donde se observó los mecanismos de acción, competencia por espacio, nutrientes, y grado de inhibición; se utilizó un diseño completo al azar, con 3 repeticiones para cada evaluación.

Para el tipo de antagonismo se utilizó la escala (Bell et ál., 1982):

Tabla 3-4: Escala de evaluación de la capacidad antagónica de *Trichoderma* sp.

GRADO	CAPACIDAD ANTAGÓNICA
1	<i>Trichoderma</i> coloniza el 100% de la superficie del medio y crece sobre el fitopatógeno
2	<i>Trichoderma</i> coloniza dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo y limita el crecimiento del fitopatógeno
3	<i>Trichoderma</i> y el fitopatógeno colonizan cada uno la mitad de la superficie ningún hongo domina
4	El fitopatógeno coloniza dos terceras partes de la superficie del medio y limita el crecimiento de <i>Trichoderma</i>
5	El fitopatógeno coloniza el 100% de la superficie del medio y crece sobre el <i>Trichoderma</i>

Fuente: (Bell et al., 1982).

Realizado por: Quispe, G., 2023.

3.4.4. Variables evaluadas

3.4.4.1. Tasa de crecimiento micelial *M.roreri*

Una vez realizado el ensayo se procedió a la medición del diámetro de cada tratamiento con su cepa correspondiente de manera horizontal y vertical cada 24 h, para determinar la tasa de crecimiento micelial del hongo *M.roreri*, se utilizó la siguiente fórmula propuesta por Rojas y Hormaza (2014, pág. 9).

$$TCM = \frac{\text{Crecimiento de micelio}}{\text{Número de días}}$$

3.4.5. Inhibición del crecimiento

Para determinar el porcentaje de inhibición de las confrontaciones (PICM) se utilizó la fórmula descrita por Fakhurunnisa et. al (2006, pág. 8) en donde;

$$PICM = \frac{R1 - R2}{R1}$$

Donde:

PICM: Porcentaje de inhibición crecimiento micelial (mm)

R1: es el crecimiento micelial del diámetro (mm) del hongo patógeno evaluado como control.

R2: es el crecimiento micelial del diámetro (mm) del hongo patógeno evaluado en enfrentamiento.

3.5. Manejo del ensayo de diversidad genética

3.5.1. Extracción de ADN

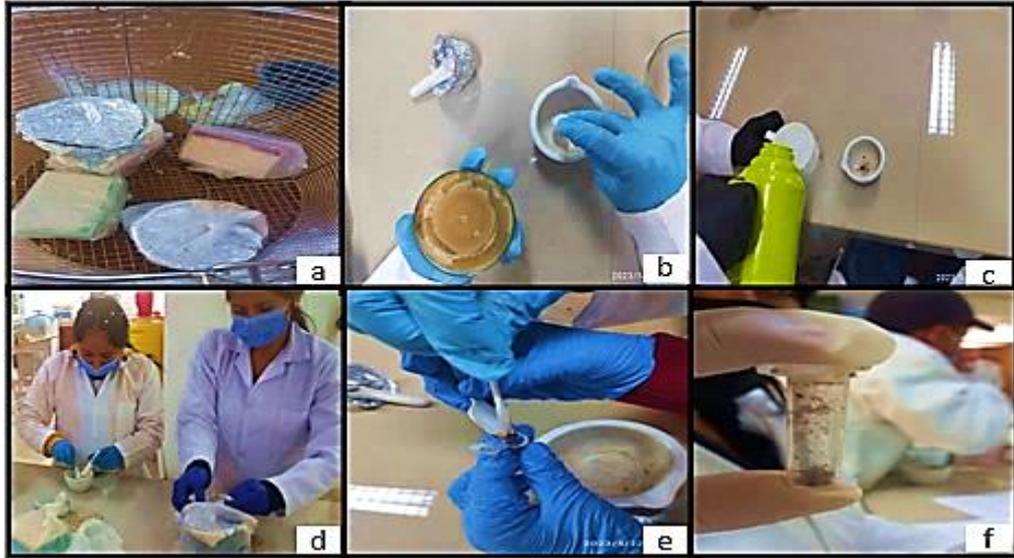


Ilustración 3-1: a) Esterilización de materiales b) Retiró del micelio c) colocación de nitrógeno líquido al micelio d) Maceración del micelio e) Micelio pulverizado a un tubo nuevo f) Tubo con micelio pulverizado

Realizado por: Quispe, G., 2023.



Ilustración 3-2: a) Adición de la solución de lisis nuclear b) Vortex por 3 s c) Incubación a 65°C d) Adición de la solución de precipitación de proteínas e) formación del pellet f) Transferencia del sobrenadante

Realizado por: Quispe, G., 2023.

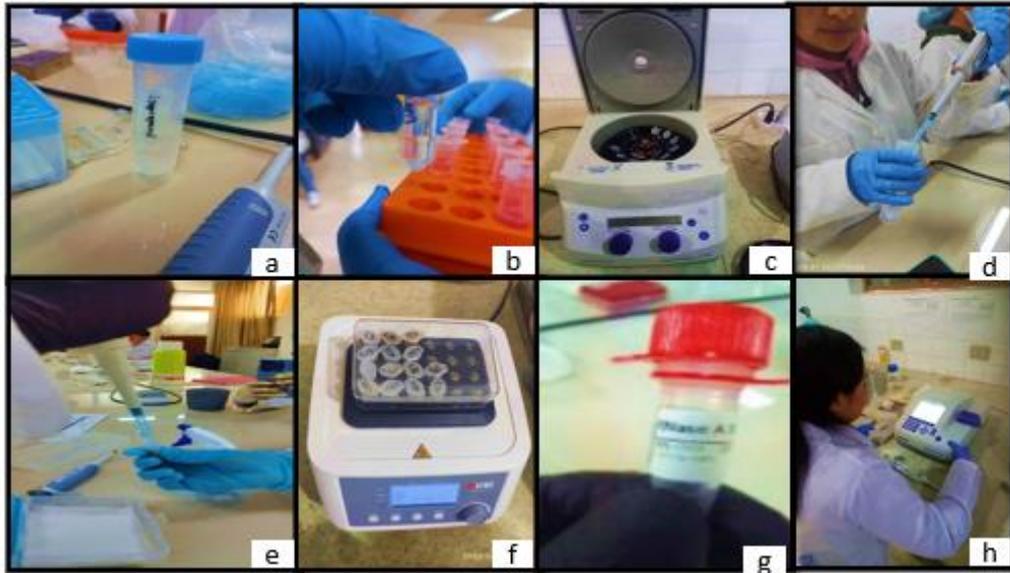


Ilustración 3-3: a) Adición de Isopropanol b) Formación de hilos de ADN c) Centrifugación d) Lavado con etanol e) Segundo lavado f) Incubar a 65° por 20 min g) Adición de la solución de rehidratación h) Cuantificación

Realizado por: Quispe, G., 2023.

Se realizó la extracción de ADN genómico del micelio del hongo *M. royeri* que se obtuvo en las cajas Petri, para ello se llevó a cabo el siguiente protocolo propuesto por Promega Wizard descrito en la siguiente tabla :

Tabla 3-5: Protocolo de extracción de ADN

Con una cuchara esterilizada se extrajo solo el micelio de cada muestra, y se maceró con nitrógeno líquido utilizando un pistilo y mortero hasta obtener una consistencia polvosa, que luego se transfirió a microtubos de 1,5 mL. (Ilustración 3-3)

Posteriormente se adicionó 600 μ L de la solución de lisis nuclear, y se incubó a 65 °C por 15 minutos, y se invirtió los tubos cada 5 minutos, luego se colocó 200 μ L de la solución de precipitación de proteínas, y se procedió a centrifugar por 10 min a 14000 rpm, el precipitado de proteínas formó un pellet, y cuidadosamente se transfirió 600 μ L del sobrenadante dejando el pellet en el fondo del tubo, seguidamente se adicionó 600 μ L de cloroformo alcohol-isoamílico (24:1) vórtex por 20 segundos , y se realizó la centrifugación de 8 min a 14000 rpm, del mismo modo se transfirió 600 μ L del sobrenadante conteniendo el ADN para un nuevo microtubo.(Ilustración 3-4)

Se añadió 600 µL de isopropanol frío cuidadosamente se realizó la mezcla de la solución invirtiendo los tubos hasta observar una masa de hilos pequeños visible de ADN y se dejó la solución en el freezer por 10 min para nuevamente centrifugar a 14000 rpm por 10 min. Se observó la formación del pellet en el fondo del tubo, y se procedió a realizar dos lavados con etanol cuidadosamente, en cada lavado se agregó 600 µL de etanol al 70% frío y se centrifugo a 14000 rpm por 5 minutos.

Se eliminó el etanol con cuidado y se colocó los tubos en el termobloque por aproximadamente 20 minutos, al estar seco se suspendió el pellet con 50 µL de la solución de rehidratación y 2 µL de RNasa en cada tubo, se procedió a incubar a 37° C por 12 horas, y el ADN en el freezer a -20°C, para su cuantificación.

Realizado por: Quispe, G., 2023.

3.5.2. PCR con primers genéricos

Para la amplificación de los aislados a partir del proceso de PCR se utilizó Primers ITS 4 e ITS 5, que permiten la identificación molecular de las especies de *M.roreri*.

Tabla 3-6: Primers utilizados para el proceso de PCR

PRIMER	Secuencia
ITS 4 (Reverse)	5´- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -3´
ITS 5 (Forward)	5´- TCC GCT TAT TGA TAT GC -3´

Fuente: (White et al., 1990).

Realizado por: Quispe, G., 2023.

Para la PCR se preparó 6,25 µL de Master Mix 2X Go Taq ® Green, 1 µL de primer ITS 4 (Reverse) y 1 µL de primer ITS 5(Forward), adicionando 2,25 µL de agua ultrapura estéril y 2 µL de ADN de las muestras de cada uno de los aislados sumando un total de 12,5 µL, se utilizó un termociclador utilizando las siguientes condiciones.

Tabla 3-7: Perfil térmico usado para realizar PCR

Perfil Térmico	
Desnaturalización Inicial	96°C
Tiempo	01:30 min
Desnaturalización	96°C
Tiempo	45 s
Ciclos	40
Anelamiento	51°C
Tiempo	1min
Extensión	72°C
Tiempo	01:30 min

Extensión Final	72°C
Tiempo	10 min
Fuente: (Londoño. et al, 2011).	
Realizado por: Quispe, G., 2023.	

3.5.3. Electroforesis

Se preparó un gel al 1,2% de agarosa (Agarose, LE, Analitical), adicionando 3 µL de Intercalante (Diamond™ Nucleic Acid Dye), el corrido de la electroforesis se realizó con un voltaje de 70 v durante 60 min, al terminar la electroforesis en gel se colocó en el transluminador UV, y se procedió a observar si existió amplificación de ADN mediante la formación de bandas.

3.5.4. Secuenciamiento y análisis

El secuenciamiento de las muestras se realizó con la tecnología SANGER en la empresa MACROGEN de Corea, y conjuntamente con el software Chromas versión 2.6.6 se observaron los electrofotogramas, se procedió a eliminar las partes de calidad baja, y se exportó el formato en archivo FASTA, para luego introducir la secuencia editada compararla en el programa BLAST del NCBI, la especie se determinó de acuerdo a los siguiente: % de identidad, %, de cobertura, e-value.

3.5.5. Análisis filogenético

Para el análisis filogenético se realizó un árbol con el método de Maxium Parsimony (Tree) en el software MEGA 11 con las secuencias editadas de las cepas de la provincia de Orellana, así mismo se agregó secuencias *M. roreri* y *M.perniciosa* de diferentes países (Tabla 3-14)

Tabla 3-8: Códigos de secuencias utilizadas para el árbol filogenético

Código	Lugar
>KY0_ <i>M. perniciosa</i>	Ecuador (Pichilingue)
>KX9_ <i>M. perniciosa</i>	Ecuador
>MK7_ <i>M. perniciosa</i>	Ecuador
>MK78_ <i>M. perniciosa</i>	Brasil
>EU8_ <i>M. perniciosa</i>	Santa Lucia
>MK785_ <i>M. perniciosa</i>	Brasil
>OM77_ <i>M. perniciosa</i>	Venezuela
>ON6_ <i>M. perniciosa</i>	Colombia
>KX91_ <i>M. perniciosa</i>	Ecuador (Guayas)
>MK7851_ <i>M. perniciosa</i>	Brasil
>DQ_ <i>M.roreri</i>	México

>AY1_ <i>M. roreri</i>	Ecuador
>JN2_ <i>M. roreri</i>	México
>JX3_ <i>M. roreri</i>	Ecuador (Quevedo)
>JX5_ <i>M. roreri</i>	Bolivia
>JX51_ <i>M. roreri</i>	Bolivia
>HQ2_ <i>M. roreri</i>	México
>OP80_ <i>M. roreri</i>	Colombia
>OP82_ <i>M. roreri</i>	Colombia
>OR6_ <i>Pleurotus</i> sp.	Pakistán
>C18_ <i>M. roreri</i> _CCN51_ESPOCH	Orellana
>C6_ <i>M. roreri</i> _CCN51_ESPOCH	Orellana
>C21_ <i>M. roreri</i> _CCN51_ESPOCH	Orellana
>C23_ <i>M. roreri</i> _CCN51_ESPOCH	Orellana
>C12_ <i>M. roreri</i> _Super_Árbol_ESPOCH	Orellana
>C10_ <i>M. roreri</i> _Super_Árbol_ESPOCH	Orellana
>C19_ <i>M. roreri</i> _CCN51_ESPOCH	Orellana
>C1_ <i>M. roreri</i> _CCN51_ESPOCH	Orellana
>C25_ <i>M. roreri</i> _CCN51_ESPOCH	Orellana
>C3_ <i>M. roreri</i> _Super_Árbol_ESPOCH	Orellana
>C16_ <i>M. roreri</i> _Nacional_ESPOCH	Orellana
>C24_ <i>M. roreri</i> _CCN51_ESPOCH	Orellana
>C15_ <i>M. roreri</i> _Nacional_ESPOCH	Orellana

Realizado por: Quispe, G., 2023.

3.5.6. PCR con marcadores moleculares de tipo RAPDS

Para la identificación molecular se utilizó la técnica de la amplificación en cadena del ADN con los iniciadores que permitieron identificar diferentes genotipos.

Tabla 3-9: RAPDs empleados para determinar la diversidad genética

PRIMER	Secuencia
OPA-01	(5' CAGGCCCTTC 3')
OPA-02	(5' TGCCGAGCTG 3')
OPA-04	(5' AATCGGGCTG 3')

Fuente: (Sangeetha et al,2011).

Realizado por: Quispe, G., 2023.

Para la PCR se preparó 3,13 µL de Master Mix 2X Go Taq ® Green, 1 µL de cada uno de los OPAS (01-02-04), adicionando 1,12 µL de agua ultrapura estéril y 1 µL de ADN de las muestras de cada uno de los aislados sumando un total de 6,25 µL, se utilizó un termociclador utilizando las siguientes condiciones.

Tabla 3-10: Perfil térmico para marcadores RAPDs

Perfil Térmico	
Desnaturalización Inicial	95°C
Tiempo	5 min
Desnaturalización	95°C
Tiempo	30 s
Ciclos	45
Anelamiento	39°C
Tiempo	1min
Extensión	72°C
Tiempo	2 min
Extensión Final	72°C
Tiempo	15 min

Fuente: (Rojas, 2015).

Realizado por: Quispe, G., 2023.

3.5.7. Electroforesis

Se utilizó un gel de agarosa al 1,5% (Agarose, LE, Analitical) con 5 µL de Intercalante (Diamond™ Nucleic Acid Dye), se colocó en la cuba de electroforesis para posteriormente dejar correr por 2h, con un voltaje de 60v y 65 A, se observó en cada marcador la presencia de locus ya que mostró amplificación de bandas y un color fluorescente permitiendo así identificar diferentes genotipos.

3.5.8. Análisis de datos de la diversidad genética

Tabla 3-11: Matriz binaria para determinar el número de locus de los aislados de *M.roreri*

ISOLAD O ¹	ESTADO ²	Locus1 ³	Locus2	Locus3	Locus4	Locus5	Locus6
C1	LPCN5_	0	0	0	0	1	0
C8	INEETN_	0	0	1	1	1	0
C20	LBCN5_	0	0	0	1	1	0
C3	LCSA_						
C16	INEETN_						
C17	INEETN_						
C23	LBCN5_						
C11	LCSA_						
C6	BHCN5_						
C19	LBCN5_						
C18	LBCN5_						
C12	LCSA_						
C21	LBCN5_						
C15	INEETN_						
C9	LCSA_						
C25	LBCN5_						

C24	LMCN5_						
C26	GTMCN5_						
C22	JASA_						
C10	LPSA_						
C11	LBCN5_						

¹Cepa de *M.roreri* en estudio, ²Código por localidad de cada cepa, ³Número de locus en donde se localiza presencia de ese marcador.

Nota:

0: Indica que en ese sitio existe ese marcador

1: Indica que en ese sitio existe ese marcador

Realizado por: Quispe, G., 2023.

Para el análisis de diversidad los datos fueron descritos en una matriz binaria en donde se muestran las cepas de *M.roreri* y cada uno de los locus que mostró cada marcador de tipo RAPD (OPA 1,2,4), por cada marcador se realizó una matriz(Tabla 3-17),que finalmente se agrupó en una sola para proceder al análisis de los datos de la diversidad genética utilizando el programa Rstudio versión 4.2.2 en el que se calculó los índices de diversidad de los aislados y los índices de Shannon.

CAPÍTULO IV

4. MARCO DE ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Procesamiento, análisis e interpretación de resultados

4.1.1. Adecuación del antagonismo *in vitro*



Ilustración 4-1: Confrontaciones de *Trichoderma* sp. vs *Moniliophthora roreri* H.C Evans

Realizado por: Quispe, G., 2023.

De acuerdo con el Gráfico 1-4, se observó que después de transcurrir 96 h de haber realizado la confrontación entre el *Trichoderma* sp. con código A frente a *M.roreri* con código P, el antagonista *Trichoderma* sp. fue el que mayor porcentaje de inhibición presentó frente al patógeno utilizando la escala de Bell.

4.1.2. Porcentaje de inhibición de *Trichoderma* sp. vs *M.roreri*

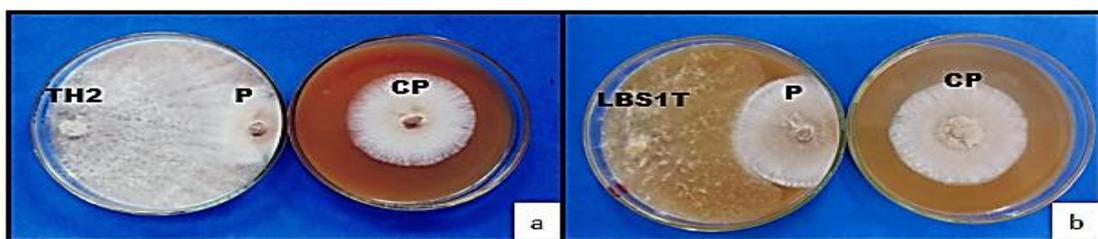


Ilustración 4-2: a) *Trichoderma harzianum* (TH2) vs *M. roreri* (P), control del patógeno (CP). Especie de *Trichoderma* sp. con menor porcentaje de inhibición b) *Trichoderma* sp. colección Orellana (LBS1T) vs *M. roreri* (P), control del patógeno (CP).

Realizado por: Quispe, G., 2023.

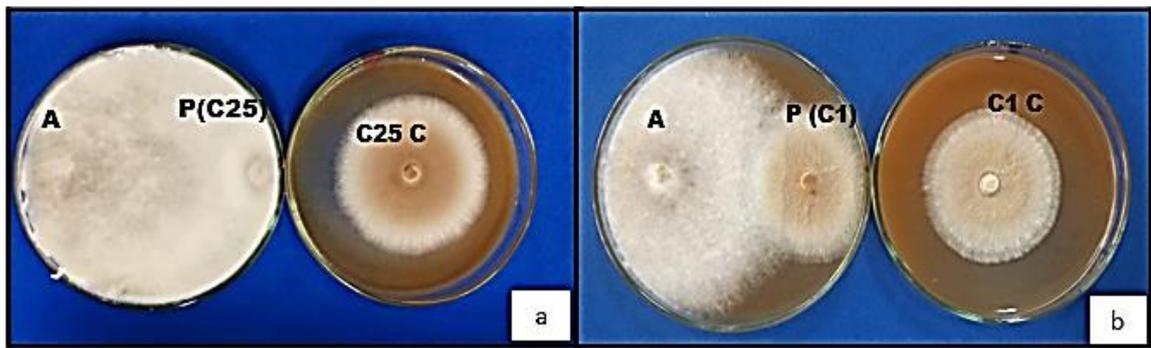


Ilustración 4-3: a) *Trichoderma* sp. (A) vs *M. roreri* cepa 25 (P C25), control del patógeno(C25C). Cepa de *Moniliophthora roreri* H.C Evans con mayor porcentaje de inhibición a) *Trichoderma* sp. (A) vs *M. roreri* cepa 1 (P C1), control del patógeno (C1 C).

Realizado por: Quispe, G., 2023.

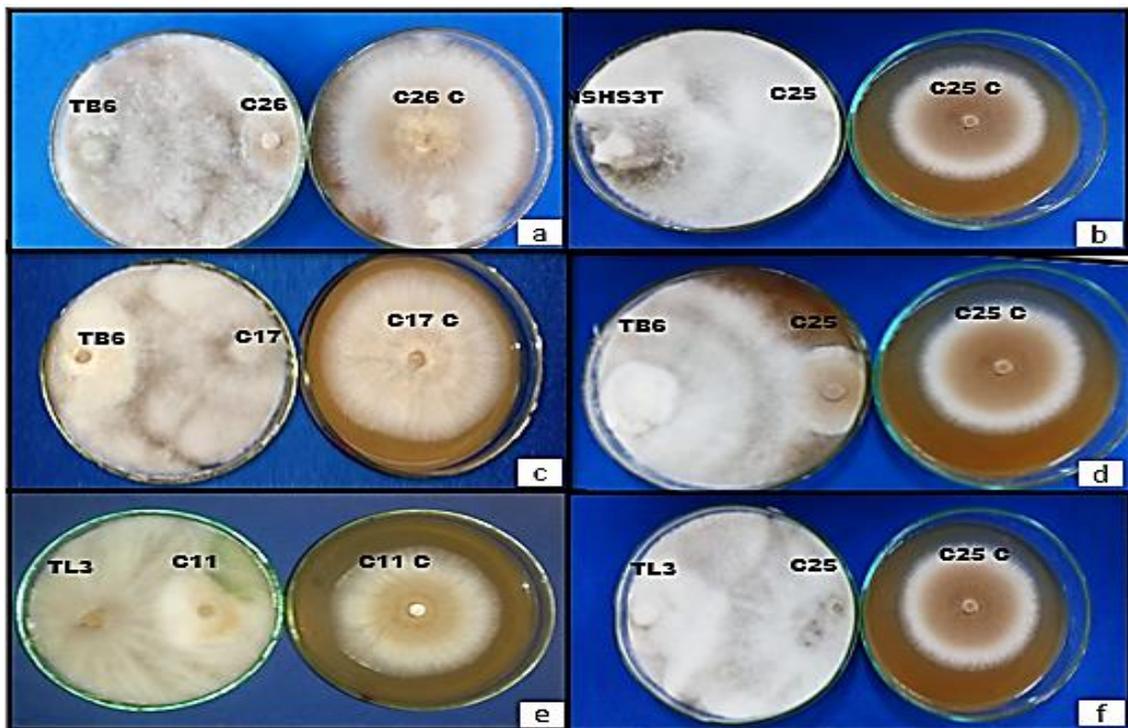


Ilustración 4-4: Interacciones con mayor porcentaje de inhibición de la especie de *Trichoderma* sp. frente a *Moniliophthora roreri* H.C Evans. a) *Trichoderma breve* (TB6) vs *M. roreri* Cepa 26 (C26) b) *Trichoderma harzianum* colección Orellana (NSHS3T) vs *M. roreri* Cepa 25 (C25) c) *Trichoderma breve* (TB6) vs *M. roreri* Cepa 17 (C17) d) *Trichoderma* sp. colección Orellana (LBS1T) vs *M. roreri* Cepa 25 (C25) e) *Trichoderma lentiforme* (TL3) vs *M. roreri* Cepa 11 (C11) f) *Trichoderma lentiforme* (TL3) vs *M. roreri* Cepa 25 (C25)

Realizado por: Quispe, G., 2023.

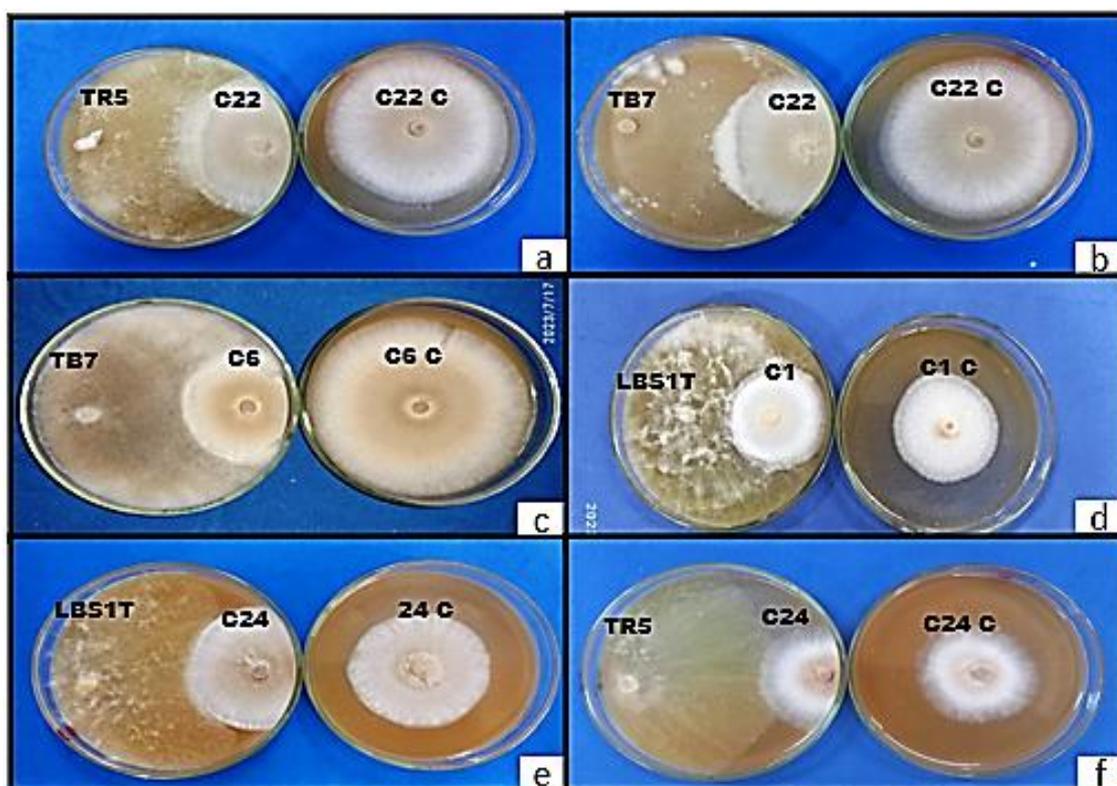


Ilustración 4-5: Interacciones con menor porcentaje de inhibición de la especie de *Trichoderma* sp. frente a *Moniliophthora roreri* H.C Evans. a) *Trichoderma resei* (TR5) vs *M. roreri* Cepa 22 (C22) b) *Trichoderma* sp. colección Orellana (TB7) vs *M. roreri* Cepa 22 (C22) c) *Trichoderma* sp. colección Orellana (TB7) vs *M. roreri* Cepa 17 (C17) d) *Trichoderma* sp. colección Orellana (LBS1T) vs *M. roreri* Cepa 1 (C1) e) *Trichoderma* sp. colección Orellana (LBS1T) vs *M. roreri* Cepa 14 (C14) f) *Trichoderma resei* (TL3) vs *M. roreri* Cepa 24 (C24)

Realizado por: Quispe, G., 2023.

El análisis de varianza correspondiente al porcentaje de inhibición de las diferentes especies de *Trichoderma* sp. frente a las cepas de *M. roreri* determinó diferencias altamente significativas ($P < 0,05$) para los 3 factores (especie de *Trichoderma* sp., cepa de *M. roreri*, y la interacción de los dos factores) (Tabla 4-1), con un coeficiente de variación de 23,4%.

Tabla 4-1: Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición de *Trichoderma* sp. y *Moniliophthora roreri* H.C Evans

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Especie ¹	20650,19	8	2581,27	35,02	<0,0001
Cepa ²	12324,35	20	616,22	8,36	<0,0001
Especie*cepa ³	32310,74	160	201,94	2,74	<0,0001
Error	27860,59	378	73,71		
Total	93145,87	566			

¹Especie de *Trichoderma* sp., ²Cepa de *M.roreri*, ³Interacción de la especie de *Trichoderma* sp. frente a *M.roreri*

Realizado por: Quispe, G., 2023.

Nota:

p-valor: > 0,01 y > 0,05 = ns (No significativo)

p-valor: > 0,01 y < 0,05 = * (Significativo)

p-valor: < 0,01 y < 0,05 = ** (Altamente significativo)

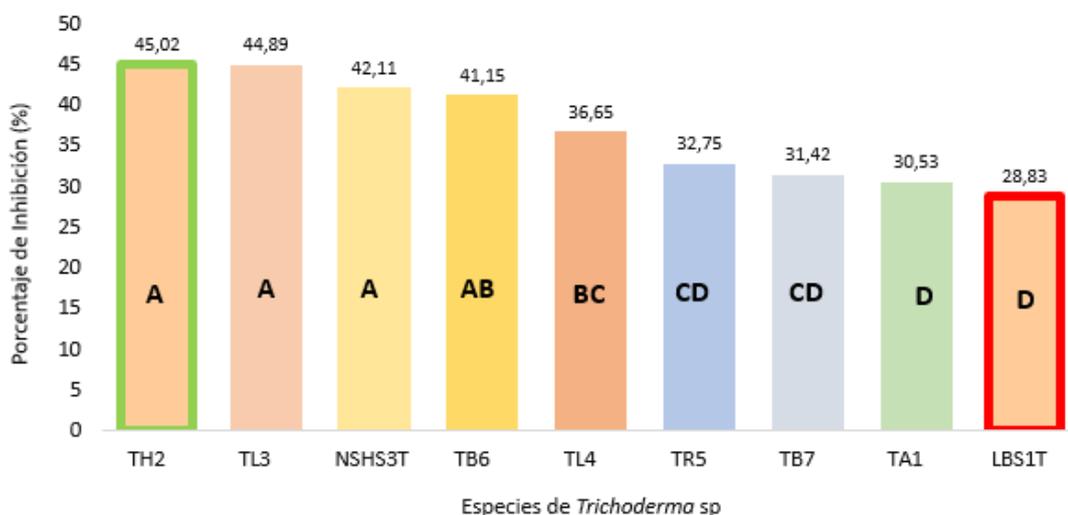


Ilustración 4-6: Prueba de Tukey al 5 % para el porcentaje de inhibición de *Trichoderma* sp y *Moniliophthora roreri* H.C Evans

Realizado por: Quispe, G., 2023.

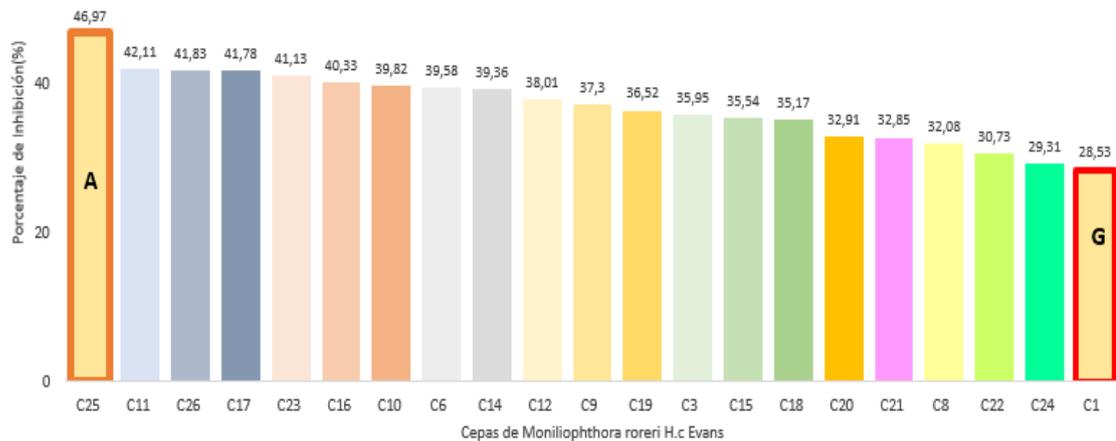


Ilustración 4-7: Prueba de Tukey al 5 % para el porcentaje de inhibición de *Trichoderma* sp y *M.roreri*

Realizado por: Quispe, G., 2023.

La prueba de Tukey al 5% (Ilustración 4-11), para el porcentaje de inhibición del factor especies de *Trichoderma* sp. frente a *M. roreri*, mostró cinco grupos, en el grupo A se determinaron 3 especies de *Trichoderma* sp. siendo estas: *T. harzianum* (cepa TH2) con el 45,02% de inhibición del crecimiento micelial de *M.roreri*, *T.lentiforme* (cepa TL3) con el 44,89%, y *T. harzianum* (cepa NSHS3T) con el 42,11%, para el grupo D las especies que inhibieron en menor porcentaje el crecimiento micelial de *M.roreri* son las especies de *T.andinanse* (cepa TA1) con el 30,53% de inhibición, y *Trichoderma* sp. (cepa LBST1) con el 28,53% de inhibición.

La prueba de Tukey al 5% (ANEXO K), para el porcentaje de inhibición del factor cepas de *M.roreri* frente a *Trichoderma* sp. mostró doce grupos, sin embargo el grupo que presentó mayor nivel de significancia en el grupo A ($P < 0,05$) fue la cepa C25 con el 46,97% de inhibición correspondiente al genotipo CCN51 de la localidad La Belleza del cantón Francisco de Orellana, el último grupo que presento diferencias significativas lo constituye el grupo G siendo la de menor porcentaje de inhibición representado por la cepa C1 con 28,53% de inhibición que corresponde al genotipo CCN51 de la localidad La Paz del cantón Loreto (Ilustración 4-12), se pudo observar el comportamiento de la cepa C25 frente a *Trichoderma* sp. (Ilustración 4-6 a), y la cepa C1 siendo más resistente al hongo antagonista (Ilustración 4-6 b).

La prueba de Tukey al 5% (ANEXO L), para el porcentaje de inhibición del factor AXB; cepas de *M.roreri* frente a especies de *Trichoderma* sp. mostró varios grupos con diferencias significativas ($P < 0,05$), la interacción de *Trichoderma breve* frente a la cepa C26 de *M.roreri* proveniente de la localidad Getsemaní genotipo CCN51 del cantón Joya de los Sachas mostró el

mejor porcentaje de inhibición de 66,57% (Ilustración 4-7 a), así mismo se muestran diferentes interacciones donde la inhibición del antagonista es más sobresaliente sobre el patógeno (Ilustración 4-7 b,c,d,e,f), por otro lado la interacción que mostro menor porcentaje de inhibición fue la especie de *Trichoderma* sp. (LBST1) frente a la cepa C24 de la localidad de La Madgalena genotipo CCN51 del cantón Francisco de Orellana con el 17,53% de inhibición(Ilustración 4-8 a) se muestran a su vez las interacciones que mostraron menor porcentaje de interacción entre *Trichoderma* sp. vs *M.roreri* (Ilustración 4-8 b,c,d,e,f).

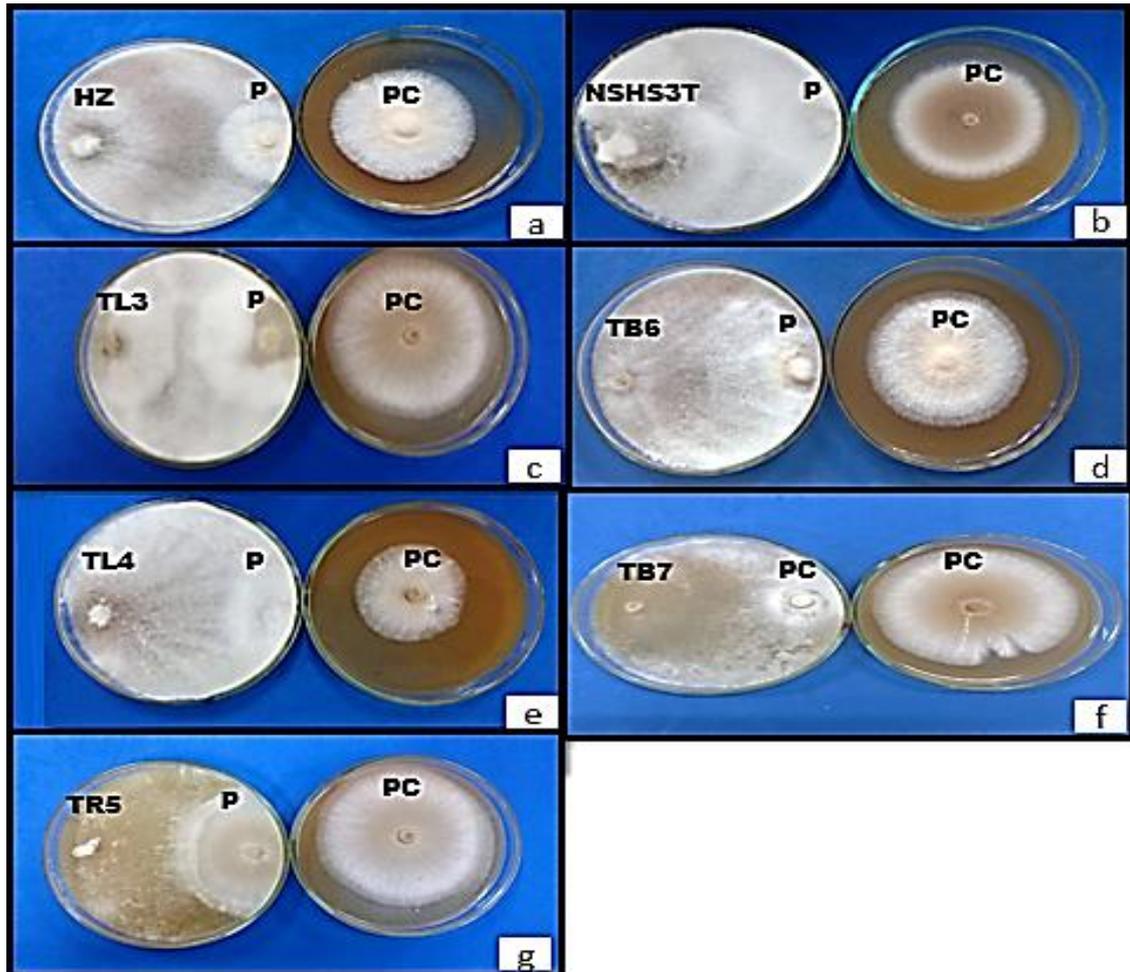


Ilustración 4-8: Escala de Bell de las mejores especies de *Trichoderma* sp. a) *Trichoderma harzianum* vs *M. roreri* b) *Trichoderma harzianum* obtenido de la provincia de Orella vs *M. roreri* c) *Trichoderma* sp. vs *M. roreri* d) *Trichoderma breve* vs *M. roreri* e) *Trichoderma longibrachatum* vs *M. roreri* f) *Trichoderma* sp vs *M. roreri* g) *Trichoderma resei* vs *M. roreri*

Realizado por: Quispe, G., 2023.

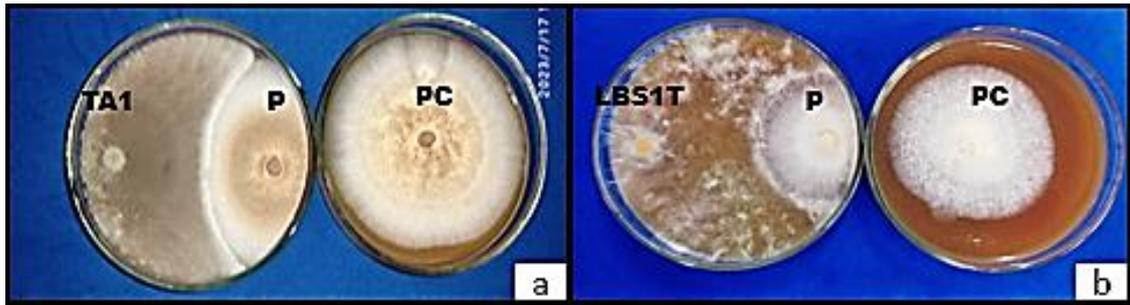


Ilustración 4-9: Especies de *Trichoderma* sp. de clase II a) *Trichoderma andinanse* vs *M. roreri*
b) *Trichoderma* sp. vs *M. roreri*

Realizado por: Quispe, G., 2023.

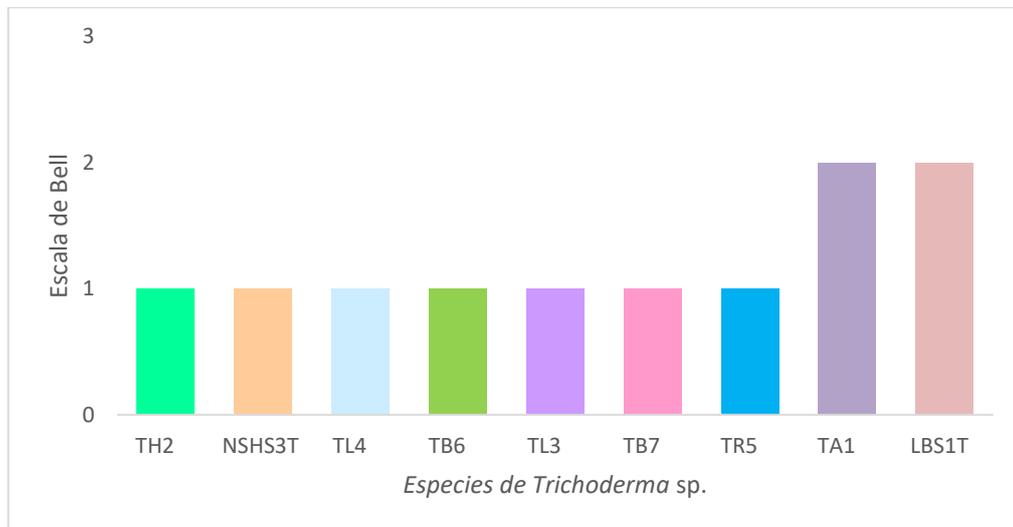


Ilustración 4-10: Especies de *Trichoderma* sp. según la escala de Bell et al (1982)

Realizado por: Quispe, G., 2023.

De acuerdo a la escala Bell et al (1982), los aislamientos se encuentran en las categorías I y II (Ilustración 4-10) siendo los de clase I: *T. harzianum* (TH2), *T. lentiforme* (TL3), *T. longibrachatum* (TL4), *T. resei* (TR5), *T. breve* (TB6), *T. harzianum* (NSHS3T) y dos cepas de *Trichoderma* sp. (B7), estos hongos demostraron su capacidad antagonista ya que colonizaron el 100% del medio de cultivo y crecieron sobre el fitopatógeno en su totalidad (Ilustración 4-9).

Por otra parte, las especies de *Trichoderma* sp. de grado II una cepa de *Trichoderma* sp. (LBS1T) y la especie de *T. andinanse* (TA1) en donde se observó que el antagonista coloniza las dos terceras partes del medio de cultivo, y limitó el crecimiento del hongo *M. roreri* (Ilustración 4-10).

4.1.2.1. Mecanismos de acción de *Trichoderma* sp

Competencia por espacio y por nutrientes

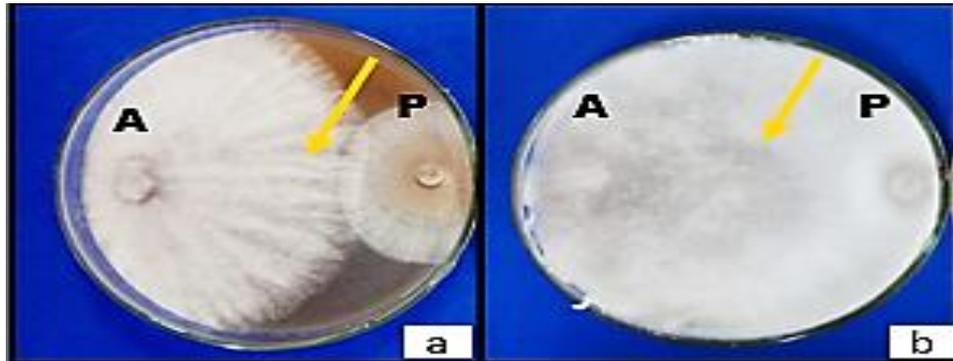


Ilustración 4-11: a) Competencia por espacio de *Trichoderma* sp.(A) vs *M. royeri*(P), la flecha corresponde al crecimiento del micelio sobre el hongo *M. royeri* , a las 72 horas b)Corresponde al crecimiento total alas 98h de crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. vs *M. royeri*

Realizado por: Quispe, G., 2023.

A las 72 h de las confrontaciones se observó como *Trichoderma* sp. tiene mayor velocidad de crecimiento que *M. royeri* (Ilustración 4-11 a), siendo capaz de llenar el medio de cultivo a las 96 h y creciendo por encima del fitopatógeno (Ilustración 4-11 b).

Micoparasitismo

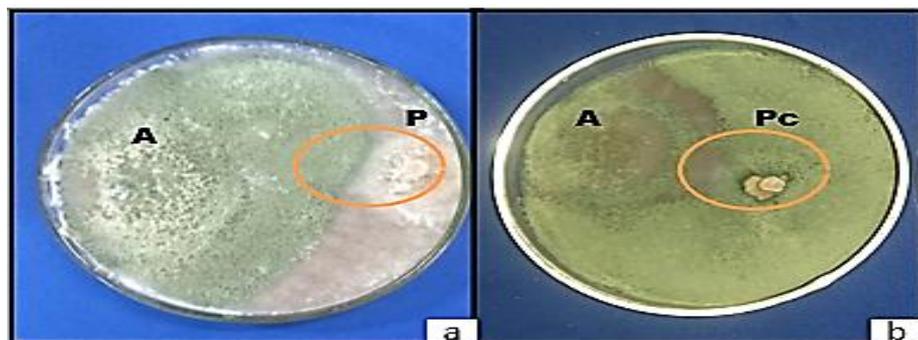


Ilustración 4-12: a) Micoparasitismo de *Trichoderma* sp.(A) vs *M. royeri*(P), el círculo corresponde a la forma de parasitar del hongo sobre *M. royeri* corresponde al crecimiento del micelio sobre el hongo *M. royeri*, b) *Trichoderma* sp. destruye las hifas de *M. royeri*

Realizado por: Quispe, G., 2023.

4.1.3. Caracterización molecular de las cepas de Monilophthora

Tabla 4-2: Secuenciación de especies de *M.roreri*

Código Muestra	Microorganismo identificado	Región amplificada	%IDENTIDA D	ACCESO¹	ORIGEN ²	Tamaño de nucleótidos³	e-value⁴
C1	<i>M.roreri</i>	ITS	98,60%	OP806971.1	Colombia	727	0
C25	<i>M.roreri</i>	ITS	98,24%	OP806971.1	Colombia	726	0
C18	<i>M.roreri</i>	ITS	98,14%	OP806971.1	Colombia	730	0
C23	<i>M.roreri</i>	ITS	98,00%	OP806971.1	Colombia	733	0
C21	<i>M.roreri</i>	ITS	97,99%	OP806971.1	Colombia	731	0
C12	<i>M.roreri</i>	ITS	97,56%	OP806971.1	Colombia	734	0
C3	<i>M.roreri</i>	ITS	97,46%	OP806971.1	Colombia	730	0
C16	<i>M.roreri</i>	ITS	97,16%	OP806971.1	Colombia	725	0
C24	<i>M.roreri</i>	ITS	96,29%	AY230254.1		1105	0
C6	<i>M.roreri</i>	ITS	95,76%	OP806971.1	Colombia	721	0
C10	<i>M.roreri</i>	ITS	95,58%	OP806971.1	Colombia	735	0
C19	<i>M.roreri</i>	ITS	94,85%	OP806971.1	Colombia	794	0
C15	<i>M.roreri</i>	ITS	90,16%	MT127258.1	México	984	3,00E-09

¹Equivalente al DNI de la secuencia, ²Lugar de donde proviene la cepa de *M.roreri* ³Tamaño de la cadena de AND, ⁴Número de alineamientos

Realizado por: Quispe, G., 2023.

Se trabajo con 13 cepas de *M.roreri* que mostraron amplificación para la región ITS, se comprobó que todas las especies en estudio corresponden a la especie *M.roreri* con porcentajes de identidad que van desde el 98,60% al 90,16% , la cepa con mayor porcentaje de identidad corresponde a C1 con el 98,60 % con su lugar de origen en Colombia y con un tamaño de nucleótidos de 727 pb está representada con el código OP806971.1 , la cepa que presentó menor porcentaje de identidad fue C15 con el 90,16% siendo la única que tiene su lugar de Origen en Colombia, con una tamaño de nucleótidos de 984 pb. (Tabla 4-19).

4.1.4. Análisis filogenético

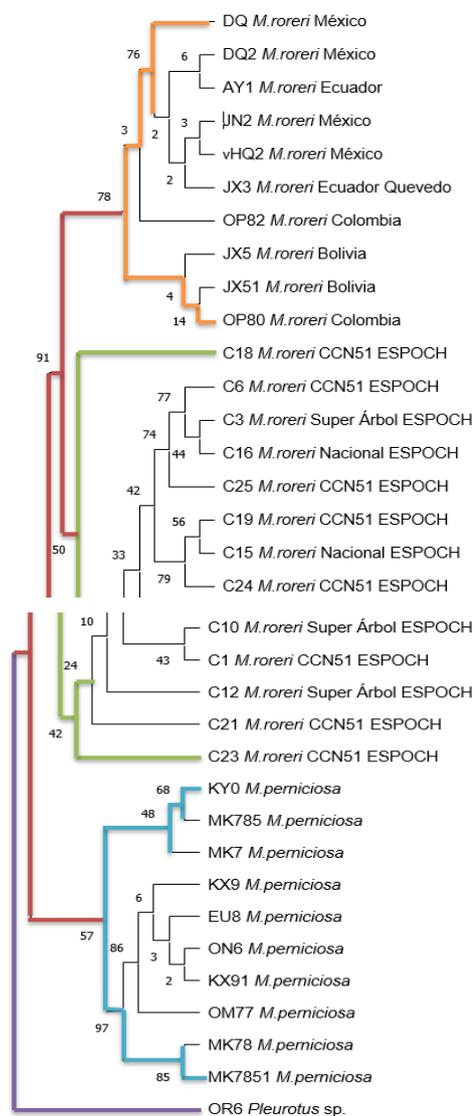


Ilustración 4-13: Árbol filogenético generado de los aislados de *M.roreri* analizados en el estudio

Realizado por: Quispe, G., 2023.

El análisis filogenético produjo un dendrograma con tres grupos en el grupo basal A se observan aislados de *M.roreri* obtenidos de distintos países de la base de datos del NCBI con un porcentaje de parentesco de 78% ,el grupo B está constituido por muestras ecuatorianas procedentes de la provincia de Orellana formando un solo clado, con un porcentaje de 50%, el grupo C se encuentra formado por muestras de *M.perniciosa* con secuencias de diferentes países con un porcentaje de 57%.

4.1.5. Análisis de riqueza de los genotipos de *M.roreri* de diferentes localidades

Tabla 4-3: Conjunto de aislados de *M.roreri* para el análisis de diversidad

Aislado	Código	Localidad
C1	LPCN5_	La Paz/CCN51
C8	INEETN_	INIAP EECA/ TIPO NACIONAL
C20	LBCN5_	La Belleza/ CCN51
C3	LCSA_	La Calumeña/ SUPER ÁRBOL
C16	INEETN_	INIAP EECA/ TIPO NACIONAL
C17	INEETN_	INIAP EECA/ TIPO NACIONAL
C23	LBCN5_	La Belleza/ CCN51
C11	LCSA_	La Calumeña/ SUPER ÁRBOL
C6	BHCN5_	Bajo Huiruino/ CCN51
C19	LBCN5_	La Belleza/ CCN51
C18	LBCN5_	La Belleza/ CCN51
C12	LCSA_	La Calumeña/ SUPER ÁRBOL
C21	LBCN5_	La Belleza/ CCN51
C15	INEETN_	INIAP EECA/ TIPO NACIONAL
C9	LCSA_	La Calumeña/ SUPER ÁRBOL
C25	LBCN5_	La Belleza/ CCN51
C24	LMCN5_	La Madgalena/CCN51
C26	GTMCN5_	Getsemaní/CCN51
C22	JASA_	Joya de los Sachas/SUPER ÁRBOL
C10	LPSA_	La paz/SUPER ÁRBOL
C14	LBCN5_	La Belleza/ CCN51

Realizado por: Quispe, G., 2023.

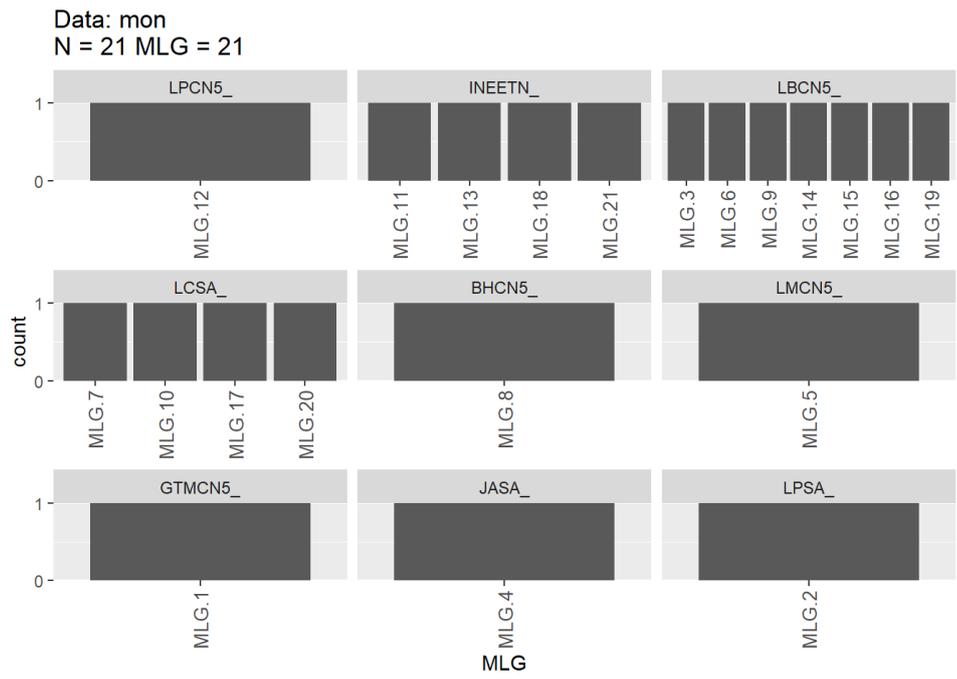


Ilustración 4-14: Número de genotipos multilocus por localidad.

Realizado por: Quispe, G., 2023.

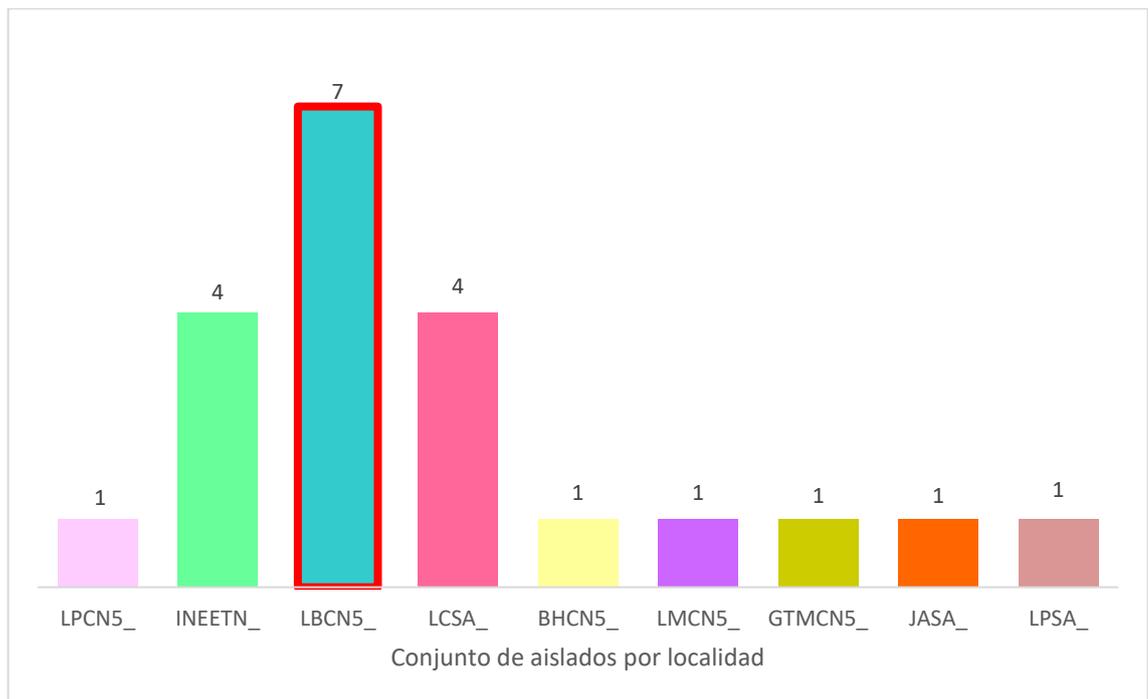


Ilustración 4-15: Índice de riqueza de *M. royeri* por localidad

Realizado por: Quispe, G., 2023.

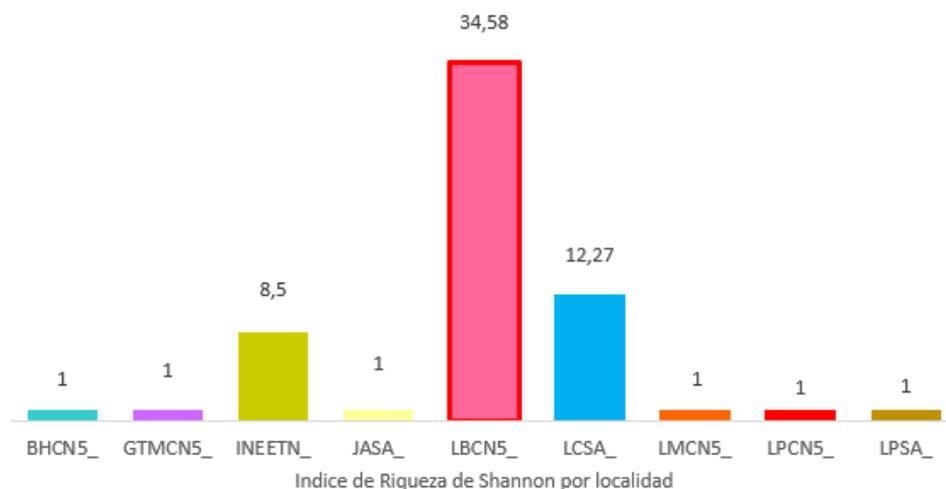


Ilustración 4-16: Índice de Shannon por localidad

Realizado por: Quispe, G., 2023.

Tabla 4-4: Índice de riqueza de los genotipos de *M. royeri* por localidad

Pop	N	MGL	eMLG
LPCN5_	1	1	1
INEETN_	4	4	4
LBCN5_	7	7	7
LCSA_	4	4	4
BHCN5_	1	1	1
LMCN5_	1	1	1
GTMCN5_	1	1	1
JASA_	1	1	1
LPSA_	1	1	1
TOTAL	21	21	10

Realizado por: Quispe, G., 2023.

Tabla 4-5: Índice de Shannon para los aislados de *M. royeri* por localidad

Aislado	Estimator	s.e.	LCL	UCL
BHCN5_	1,0	0,0	1,0	1,0
GTMCN5_	1,0	0,0	1,0	1,0
INEETN_	8,5	2,32	4,0	13,04
JASA_	1,0	0,0	1,0	1,0
LBCN5_	34,58	10,47	14,07	55,11
LCSA_	12,27	4,18	4,06	20,48
LMCN5_	1,0	0,0	1,0	1,0
LPCN5_	1,0	0,0	1,0	1,0
LPSA_	1,0	0,0	1,0	1,0

Realizado por: Quispe, G., 2023.

El índice con mayor riqueza es para la localidad de La Belleza-CCN51 (LBCN5_) ya que obtuvo mayor número de genotipos por localidad con un total de 7 genotipos (Ilustración 4-19), por otro lado, las localidades de La Paz-CCN51 (LPCN5_), Bajo Huiruino-CCN51 (BHCN5_), La Madgalena-CCN51 (LMCN5_), Getsemaní-CCN51 (GTMCN5_), Joya de los Sachas-SUPER ÁRBOL (JASA_) y La paz/SUPER ÁRBOL (LPSA_) obtuvieron los índices de riqueza más bajos con un genotipo.

De acuerdo con el índice de Shannon la localidad con mayor índice fue La Belleza-CCN51 (LBCN5_) obtuvo mayor número de genotipos que las demás localidades de 34,58, seguido de la localidad La Calumeña-Super Árbol (LCSA_) con 12,27 sin embargo, para las localidades La Paz-CCN51 (LPCN5_), Bajo Huiruino-CCN51 (BHCN5_), La Madgalena-CCN51 (LMCN5_), Getsemaní-CCN51 (GTMCN5_), Joya de los Sachas-SUPER ÁRBOL (JASA_) y La paz/SUPER ÁRBOL (LPSA_) el índice de riqueza fue bajo ya que solo tienen un índice de diversidad de 1.

4.1.6. Discusión de resultados

En la actualidad se utiliza el control biológico en contra de organismos patógenos que reduzcan los daños en un cultivo que tenga relevancia económica, tal es el caso del cultivo de cacao (*Teobroma cacao* L.) que se ve afectado principalmente por el hongo *Moniliophthora roreri* H.C Evans, por ello se evaluó la inhibición que presenta las especies del género *Trichoderma* sp. ya que este hongo posee un comportamiento de carácter antagonista, las enzimas y elementos antimicrobianos que excreta son capaces de controlar diferentes enfermedades que se encuentran en los cultivos, al ejercer un control biológico sobre otros microorganismos hace que sea efectivo, su capacidad de inhibición se encarga de destruir las paredes celulares de organismos perjudiciales, , sin embargo es necesario tomar en cuenta que no todas las especies de *Trichoderma* sp. van a actuar de la misma forma ya que algunas actúan como hongos débiles , como resultado de las condiciones de temperatura o la condición del cultivo.

En este trabajo de investigación se determinó la capacidad de 7 especies de *Trichoderma* sp. (*T.harzianum* (TH2), *T.lentiforme* (TL3), *T.longibrachatum* (TL4), *T.resei* (TR5), *T.breve* (TB6), *T.andinanse* (TA1), *T.harzianum* (NSHS3T) y dos cepas de *Trichoderma* sp. (LBS1T Y B7) , utilizados como especies antagonistas en medio de cultivo *in vitro* contra el hongo *M.roreri*, la colonización de los aislados de *Trichoderma* sp. y *M.roreri* en medio de cultivo V8 se desarrolló de forma diferente al igual que su tasa de crecimiento, *Trichoderma* sp. muestra su capacidad para inhibir el crecimiento de *M. roreri* y competir con él incluso después de que el patógeno tuvo una ventaja inicial de 5 días debido a que su desarrollo es más lento, esto sugiere que *Trichoderma*

sp. posee mecanismos que le permiten no solo reducir el crecimiento del patógeno sino también prosperar en su presencia (Villamil et al, 2012, p.6308).

La especie de *Trichoderma* sp. que mayor porcentaje de inhibición generó sobre las cepas de *M.roreri* fue *Trichoderma harzianum* con el 45,02% esto coincide con los estudios realizados por Cadena & Poma (2022) que obtuvieron un valor del 58.60% de inhibición demostrando una capacidad significativa para inhibir el crecimiento del micelio de *Moniliophthora roreri* en las condiciones de la prueba dual, lo que representa una diferencia no tan distante al de los resultados obtenidos en esta investigación, por otro lado Tirado et al (2016) mencionó que se evidenciaron pruebas donde *Trichoderma harzianum* mostró un alto porcentaje de inhibición de 75% contra el hongo *M.roreri* siendo su valor superior al alcanzado en la investigación con una diferencia del 30% lo que podría deberse a las condiciones ambientales donde se realizó el ensayo, Pérez (2012) menciona que esta especie de *Trichoderma* sp. genera mayor inhibición sobre el patógeno, además de utilizar el mecanismo de acción de competir por nutrientes y espacio, siendo capaz de crecer en el medio de cultivo de forma inmediata y evitar el desarrollo del fitopatógeno. *Trichoderma harzianum* produce diversas enzimas que son; la β -1,3-glucanasa, quitinasa, proteasa y celulasa desempeñando un papel crucial en la capacidad para colonizar y degradar las paredes celulares de otros hongos y microorganismos (Cuervo-Parra et al. 2011). Además, (López. et al, 2017) menciona que esta especie produce ácido nonanoico (AN) es un compuesto que se ha identificado en *Trichoderma harzianum* y se ha asociado con propiedades inhibidoras en el crecimiento micelial y la germinación de esporas de varios patógenos fúngicos, incluyendo *Moniliophthora roreri*.

Gams y Bissett (1998) destacan que *Trichoderma harzianum*, en un sentido estricto, abarca la mayoría de las cepas empleadas en el control biológico de hongos fitopatógenos, siendo esta especie de *Trichoderma* importante en la agricultura como agente de control biológico contra enfermedades que afectan a los cultivos, existen resultados reportados por Villamil et al. (2015) que al evaluar cepas de *T. harzianum*, *T. hanatum* y *T. viride* encontraron antagonismo sobre el hongo fitopatógeno *M. roreri* de forma *in vitro* e *in situ*, considerando que *Trichoderma harzianum* se incorpore en planes de manejo integrado de la enfermedad.

A pesar que las especies de *Trichoderma* sp. evaluadas presentan diferentes formas de crecimiento y desarrollo cada uno de ellos generó inhibición sobre el crecimiento micelial del patógeno, se observó su rápido crecimiento y desarrollo creciendo sobre el medio de cultivo, en las pruebas de confrontación *Trichoderma harzianum* creció sobre *M.roreri* evitando que se desarrolle, del mismo modo se evidencio que *T.harzianum* (TH2), *T.lentiforme* (TL3) y *T. harzianum* (NSHS3T) de la colección de Orellana son los que mayor porcentaje de inhibición generaron pudiendo usar cualquiera de estas especies para combatir el hongo *M.roreri*.

La cepa de *Moniliophthora roreri* H.C Evans que genero mayor porcentaje de inhibición por *Trichoderma* sp. fue la representada con el código C25 con el 46,97 % de inhibición correspondiente al genotipo CCN51 de la localidad La Belleza del cantón Francisco de Orellana, lo que concuerda con lo mencionado por Villa (2015) que afirma que el genotipo CCN51 es susceptible a moniliasis, tal es el caso de La Troncal donde el CCN-51 es susceptible a la moniliasis, y se confirma que esta variedad no posee factores de tolerancia a esta enfermedad en esa ubicación específica, es decir la susceptibilidad o resistencia de una variedad de cacao a la moniliasis puede variar según factores ambientales, prácticas agrícolas y otras condiciones locales, por otro lado la cepa C1 con 28,53% de inhibición que corresponde al genotipo CCN51 de la localidad La Paz del cantón Loreto que representa la de menor porcentaje de inhibición con el 15,29%, Caiza (2013) en sus estudios menciona que algunas cepas de *M.roreri* suelen ser difíciles de controlar debido a factores como la capacidad de la cepa de *M.roreri* para acoplarse al medio de cultivo o deber al lugar de colecta del que fue traído el organismo, por lo que se puede considerar que esta cepa es la más resistente ya que como se mencionó anteriormente no todas las especies de *Trichoderma* sp. actúan por igual, en ciertos casos las especies poseen mayor sensibilidad sobre condiciones como humedad y temperatura, diferentes estudios demuestran que los patógenos enfrentados en cultivo dual en los tratamientos se resiste al control, así mismo si se requiere determinar la capacidad antagónica de *Trichoderma* sp. no se requiere un control total del 100%.

La interacción de *Trichoderma breve* frente a la cepa C26 de *M.roreri* proveniente de la localidad Getsemaní del cantón Joya de los Sachas mostró el mayor porcentaje de inhibición de 66,57%, así mismo se muestran diferentes interacciones donde la inhibición del antagonista es más sobresaliente sobre el patógeno (Ilustración 4-7 b,c,d,e,f) , por otro lado la interacción que mostro menor porcentaje de inhibición fue la especie de *Trichoderma* sp. (LBST1) frente a la cepa C24 de la localidad de La Madgalena del cantón Francisco de Orellana con el 17,53% de inhibición

Con respecto a la diversidad se obtuvo que las 13 cepas que amplificaron para la región ITS corresponden al hongo *M.roreri* , con su lugar de origen en Colombia ya que *M. roreri* es un patógeno originario de Colombia y es en este país donde se encuentra la mayor diversidad genética poblacional. (Phillips-Mora et al., 2007; Ali et al., 2015)

Moniliophthora roreri ha sido caracterizado principalmente por su fase asexual, y se ha informado que carece de una fase sexual o teleomórfica bien definida, lo que lo clasifica como un hongo anamórfico (Evans. et al, 2003).

Phillips (2003) en sus estudios realizó el primer análisis sobre diversidad genética del hongo *M.roreri* con el fin de identificar cual es el centro de origen del hongo tomando en cuenta muestras de países productores de cacao, utilizando marcadores moleculares de tipo ISSR(Inter Secuencias simples repetidas) y AFLP(polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción amplificados), encontrando de este modo que los aislados de *M.roreri* de Colombia presentaron mayor diversidad genética, para los aislados de Ecuador una escala intermedia y bajo para aislados de América Central, por lo que se sugiere a Colombia como el lugar de origen de *M.roreri* , por otra parte no se han realizado análisis de diversidad que amplifican para las regiones ITS, sin embargo Phillips-Mora et al. (2007) realizó nuevamente un estudio con marcadores AFLP e ISSR donde se analizó un total de 94 aislamientos de América Central y América del Sur, como resultado se encontró que los índices de Shannon para América Central fueron de $(0 \cdot 20 \pm 0 \cdot 06)$, mientras que para aislados de Ecuador la diversidad genética fue menor de $(0 \cdot 15 \pm 0 \cdot 04)$, estos resultados fueron similares a los realizados con primers que amplifican para las regiones ITS encontrando mayor variabilidad genética en los aislados de Colombia y siendo menor para Ecuador, sin embargo al tomar en cuenta los índices de Shannon de la investigación realizada es mayor a los realizados por Phillips-Mora et al. (2007), ya que los aislados de la provincia de Orellana alcanzaron valores que van desde $(34,58 \pm 1)$ siendo superiores, en otros estudios realizados por Melo et al., (2014) de los 28 loci de microsatélites analizados, se encontró que solo 10 de ellos eran polimórficos, esto significa que en la población de *M. roreri* en Ecuador, solo un subconjunto de los loci examinados mostró variación en términos de alelos diferentes, esto indica que, en promedio, cada loci polimórfico tenía aproximadamente 3.2 alelos diferentes en la población *M.roreri*, y esta variabilidad puede proporcionar información sobre la diversidad genética dentro de la población, por otro lado se presentó un valor de 0.3 heterocigosidad siendo un nivel moderado, lo que puede influir en la adaptabilidad y la capacidad del patógeno para evadir las defensas del hospedero.

Analizando la parte genética de acuerdo a los índices de diversidad, La Belleza-CCN51 (LBCN5_) obtuvo 7 genotipos en el índice de riqueza multilocus y de igual manera la misma localidad en el índice de Shannon sigue manteniendo la mayor cantidad de genotipos de 34,58 este efecto pudo deberse a que la mayoría de las muestras fueron obtenidas de la localidad de la Belleza del cantón Francisco de Orellana del mismo modo podría deberse a que en este lugar existen aislados sensibles y resistentes

4.1.7. Comprobación de la hipótesis

Mediante el estudio realizado se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna que menciona que al menos una de las cepas de *Trichoderma* sp. presentan antagonismo *in vitro* y los aislados de *Moniliophthora roreri* difieren genéticamente.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Las especies que presentaron mayor porcentaje de inhibición de *Trichoderma* sp. frente a *M. royeri* fueron *T. harzianum* (cepa TH2) con el 45,02% *T.lentiforme* (cepa TL3) con el 44,89%, y *T. harzianum* (cepa NSHS3T) con el 42,11% , por otro lado *T.andinanse* (cepa TA1) con el 30,53% de inhibición, y *Trichoderma* sp. (cepa LBST1) con el 28,53% de inhibición , fueron las más bajas con respecto al porcentaje de inhibición.

La cepa de *M.royeri* que mayormente fue inhibida fue la cepa C25 con 46,97% de inhibición que corresponde al genotipo CCN51 de la localidad La Belleza del cantón Francisco de Orellana, y la cepa C1 con 28,53% de inhibición que corresponde al genotipo CCN51 de la localidad La Paz del cantón Loreto fueron la que menor se inhibió ya que presenta mayor resistencia.

La interacción de *T.breve* vs C26 de *M.royeri* presentó el mayor porcentaje de inhibición del 66,57% proveniente del cantón de la Joya de los Sachas por otro lado, la especie de *Trichoderma* sp. (LBST1) frente a la cepa C24 de la localidad de La Madgalena del cantón Francisco de Orellana presento el menor porcentaje de inhibición.

El nivel de antagonismo que es más visible es con el *Trichoderma harzianum* (TH2) donde el antagonista., crece completamente por encima del patógeno y cubre totalmente la superficie del medio de cultivo; del nivel se determinó a *Trichoderma* sp. (LBS1T) como menos eficiente es decir que el antagonista sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio, sin embargo, es capaz de limitar el crecimiento del patógeno.

La localidad de La Belleza-CCN51 presentó 7 genotipos multilocus, siendo la misma localidad la de mayor numero de índice de riqueza de 7 genotipos, de acuerdo al índice de Shannon la localidad con mayor índice fue la Belleza-CCN51 (LBCN5_) con un valor de 34,58, seguido de la localidad La Calumeña-Super Árbol (LCSA_) con 12,27.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda utilizar la especie de *Trichoderma harzianum* (NSHS3T) colección Orellana, ya que se encuentra adaptada al clima y condiciones ambientales de la provincia de Orellana

Realizar pruebas en campo a menor y mayor escala con las especies de *Trichoderma* sp. que mostraron una fuerte actividad inhibitoria sobre el patógeno, además de tomarlo en cuenta como método de control biológico.

Realizar PCR para aquellas cepas que no mostraron amplificación, además utilizar más variedad de marcadores genéticos para identificar mayor fuente de polimorfismos.

GLOSARIO

AFLP: (Polimorfismo para el largo de los fragmentos amplificados) se refiere a la variabilidad en la longitud de los productos amplificados durante una reacción de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). La PCR es una técnica molecular utilizada para amplificar secuencias específicas de ADN (Suárez, 2017, pág. 427).

Antagonismo: oposición o confrontamiento entre diferentes organismos mediante la cual se puede evaluar la capacidad que tiene un hongo antagonista sobre un patógeno (Barreno y Pérez, 2003, p. 479).

Basidiomicete: Un basidiomiceto es un tipo de hongo perteneciente al grupo Basidiomycota, una de las principales divisiones en el reino Fungi. Estos hongos son conocidos por producir estructuras reproductivas especializadas llamadas basidios, que son células portadoras de esporas (Barreno y Pérez, 2003, pág. 440).

Conidio: Un conidio es una estructura de reproducción asexual que se encuentra en ciertos grupos de hongos, especialmente en los filamentos microscópicos llamados hifas (Barreno y Pérez, 2003, p. 446).

Electroforesis: técnica en la que se aplica una corriente de energía a un gel que está compuesto por las moléculas de ADN de interés (Morales y Romero, 2016).

Esporas: Las esporas son estructuras reproductivas especializadas que se encuentran en diversos organismos, principalmente en hongos, musgos, helechos y algunas bacterias. (Suárez, 2017, pág. 428).

Género: Grupo bien definido de especies que se distingue claramente de otros microorganismos (Ryan y Ray, 2017, págs. 80-125).

Hifa: Las hifas son estructuras tubulares y filamentosas que forman el cuerpo vegetativo de los hongos y constituyen la red llamada micelio. Estas estructuras son esenciales para las funciones metabólicas y reproductivas de los hongos. (Barreno y Pérez, 2003, pág. 462).

Inhibición: Hace referencia a la propiedad de un conjunto de células en medio de cultivo que son capaces de impedir o reprimir el crecimiento de otra cuando estas entran en contacto. (Barreno y Pérez, 2003, pág. 463).

Micelio: Se considera como micelio a un grupo de tejidos filamentosos que conforman el cuerpo vegetativo de un hongo. (Barreno y Pérez, 2003, pág. 462).

Patogénico: Capaz de ocasionar enfermedad (Ryan y Ray, 2017, págs. 80-125).

PCR: La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción que se caracteriza por amplificar millones de veces una secuencia específica de ADN. (Alcívar, 2016, pág. 9).

Primer: oligonucleótidos compuestos por al menos 6 bases que se utilizan como iniciadores en la amplificación in vitro de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se conocen comúnmente como "cebadores" o "primers". Estos cebadores son esenciales para la síntesis de ADN durante la PCR, ya que proporcionan el punto de inicio para la acción de la enzima polimerasa (Ferreira, 2000, pág. 9).

RAPD: Amplificación al azar de ADN Polimórficos, estos cebadores son oligonucleótidos cortos (generalmente de 10 a 20 nucleótidos) y se seleccionan de manera aleatoria sin información previa sobre la secuencia del genoma (Ferreira, 2000, pág.9).

Saprófito: Organismo que vive de la materia orgánica muerta en el ambiente (Ryan y Ray, 2017, págs. 80-125).

Secuenciamiento: la secuenciación se denomina al orden en el que se determina las bases que forman la cadena de ADN (Morales y Romero,2016, pág.8).

Síntoma: Reacciones o alteraciones internas o externas que sufre una planta como resultado de su enfermedad (Peña et al., 2015: pág.11).

Trichoderma sp.: considerado un hongo anaeróbico se encuentra principalmente en el suelo, además es considerado benéfico siendo capaz de actuar como antagonista, toma los nutrientes del otro y los degrada (Morales y Romero,2016, pág. 5).

BIBLIOGRAFÍA

1. **ALCÍVAR, Bienvenido; et al.** *El gran cacao de los pequeños productores. Una mirada al escenario agro socioeconómico de los cacaoteros en la Cordillera Oriental del Ecuador.* Guayaquil-Ecuador: Holguín S.A., 2016, pág. 9
2. **ÁLVAREZ CORREA, K.; et al.** “Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia”. *Acta agronómica* [en línea], 2014 (Colombia) vol 63 (4), pág. 392. [Consulta: 18 mayo 2023] ISSN 2323-0118. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169932435011>
3. **ANECACAO.** *Ecuador registra aumento de la exportación de cacao en primeros ocho meses de este 2023.* [blog]. Ecuador: Blogger, 2023. [Consulta: 10 noviembre 2023]. Disponible en: https://www.facebook.com/anecacao.ecuador/?locale=es_LA
4. **ARGUMEDO DELIRA, R.; et al.** “El género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos”. *Revista internacional de contaminación ambiental*, vol. 25, n°4 (2009), (México). pág. 258
5. **ARVELO SÁNCHEZ, Miguel Ángel; et al.** *Estado actual sobre la producción y el comercio del cacao en América* [En línea]. Ecuador: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), 2016. [Consulta: 26 septiembre 2023]. Disponible en: [file:///C:/Users/MI%20PC/Downloads/BVE18019631e%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/MI%20PC/Downloads/BVE18019631e%20(1).pdf)
6. **BAILEY, Brayan A. & MEINHARDT, Lyndel W.** “Cacao Diseases A History of Old Enemies and New Encounters”. *SciELO* [en línea], 2016, (USA), vol. 1 (2), págs. 75-76. [Consulta: 20 agosto 2023]. ISBN 978-7878. Disponible en: file:///C:/Users/MI%20PC/Downloads/vdoc.pub_cacao-diseases-a-history-of-old-enemies-and-new-encounters.pdf
7. **BARRENO RODRIGUEZ, Eva, & PÉREZ ORTEGA, Sergio.** *Líquenes de la reserva Natural Integral de Muniellos, Austrias.* 10ª ed. Madrid-España: Álvarez Lorenzana, 2003, págs. 437- 480.
8. **CADENA, F.A.; & POMA LOZA, E.** “Manejo de la moniliasis del cacao (*Moniliophthora roreri*) con la aplicación de dos especies de *Trichoderma*”. *RIIARn* [online]. 2022, (Bolivia)

vol 9 (2), pág. 38. [Consulta: 15 septiembre 2023]. ISSN 2409-1618. Disponible en_ <https://doi.org/10.53287/toks1912pc491>.

9. **CUBILLOS, Gabriel; et al.** *La moniliasis del cacao: daños, síntomas, epidemiología y manejo*. Medellín-Colombia: Compañía Nacional de Chocolates S.A.S., 2019. pág. 14.
10. **DELGADO ARCE, Julio Cesar; & SUÁREZ CAPELLO, Carmen.** *Moniliasis del cacao*. Quito-Ecuador: Corporación andina de gerencia social,1993. págs.10-11
11. **EVANS, Harry C; et al.** “Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases”. *Mycological Progress* [en línea], 2003, (Ecuador) vol. 2 (2), pág.155 [Consulta: 19 octubre 2023]. ISSN 2054-0125. Disponible en: <file:///C:/Users/HP/Downloads/Evansetal2003.pdf>
12. **FAKHRUNNISA, M.H.; et al.** "In vitro interaction of *Fusarium* spp., with other fungi". *Pakistan Journal of Botany* [en línea], 2006, (Pakistán) vol. 38(4), pág. 1317. [Consulta: 28 agosto 2023]. ISSN. 1200-0360. Disponible en: [https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/38\(4\)/PJB38\(4\)1317.pdf](https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/38(4)/PJB38(4)1317.pdf)
13. **FERREIRA, Laura Ines.** Estudio de la variabilidad y la diferenciación genética por medio de técnicas de Isoenzimas y RAPD en poblaciones naturales de especies e híbridos del Género *Prosopis* (Leguminosae). [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires-Argentina. 2000. pág. 9. [Consulta: 2023-10-23]. Disponible en: https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n3314_Ferreyra.pdf
14. **GARCÍA BRIONES, A.; et al.** “La cadena de producción del Cacao en Ecuador: Resiliencia en los diferentes actores de la producción”. *Revista Digital Novasinerгия* [en línea], 2021, (Ecuador) vol 4 (2), págs.152-172. [Consulta: 24 abril 2023]. ISSN 2631-2654. Disponible en: <http://scielo.senescyt.gob.ec/pdf/rns/v4n2/2631-2654-rns-4-02-00152.pdf>
15. **GONZÁLEZ LOPEZ, Galo Cesar.** Alternativas orgánicas para el control de moniliasis (*Moniliophthora roreri*, cif y par) en el cultivo de cacao [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad Técnica de Machala. Machala, -Ecuador. 2018. págs. 1-10. [Consulta: 2023-07-23]. Disponible en:

http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/12429/1/DE00015_TRABAJODETITULACION.pdf

16. **HARMAN, Gary.E; et al.** “Trichoderma species - Opportunistic, avirulent plant symbionts”. *Nature Reviews Microbiology* [en línea], 2004, (United State of America) vol. 2 (1), pág. 45. [Consulta: 24 junio 2023]. ISSN 3232-0021. Disponible en: 10.1038/nrmicro797
17. **INFANTE, D.; et al.** “Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos”. *Revista de protección vegetal*, vol. 24, n°1, (2009), (Cuba). págs.18-19.
18. **LEIVA, S.; et al.** “Phylogenetic Affinity in the Potential Antagonism of *Trichoderma* spp. against *Moniliophthora roreri*”. *Agronomy* [en línea], 2022, (Perú) vol. 12 (9), págs. 2-4. [Consulta: 22 abril 2023]. ISSN 2073-4395. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/agronomy12092052>
19. **LONDOÑO MURILLO, Juliana; et al.** “Caracterización molecular de clones de *Theobroma cacao* L., por medio de marcadores moleculares microsatélites”. *Luna Azul* [en línea], 2011, (Colombia), vol. 12 (32), pág. 54. [Consulta: 20 agosto 2023]. ISSN 1909-2474. Disponible en: file:///C:/Users/HP/Downloads/Theobroma_cacao_L_CLONES_MOLECULAR_CHARACTERIZATION.pdf
20. **LÓPEZ-FERRER, Úrsula del Carmen; et al.** “Papel de *Trichoderma* en los sistemas agroforestales cacaotal como un agente antagónico”. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. [en línea], 2017, (México), vol. 20 (1), pág.95. [Consulta: 15 noviembre 2023]. ISSN 1870-0462. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/939/93950595003.pdf>
21. **LÓPEZ MONDÉJAR, Rubén.** Detección y cuantificación de *Trichoderma harzianum*, y evaluación de su actividad biocontrol frente a la Fusariosis vascular del melón mediante la aplicación de herramientas moleculares (Trabajo de titulación). (Doctoral) Universidad de Alicante. Alicante-España, (2011). pág.13.
22. **MARTINEZ, B.; et al.** “*Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos”. *Revista de Protección Vegetal*. vol. 28, n° 1, (2013), (Cuba) págs. 5-6.

23. **MARTÍNEZ PADRÓN, H.Y; et al.**” Control biológico de fitopatógenos mediante aislados de *Trichoderma spp*”. *Agro Productividad*. vol. 10, n° 2, (2017), (México) págs. 10-13
24. **MEDINA PINOARGOTE, Marcos Alejandro.** Evaluación de la capacidad antagónica in vitro de dos cepas de *Trichoderma spp.* frente a *Moniliophthora roreri* (Cif. & Par.) y *Phytophthora spp.* en mazorcas de *Theobroma cacao* L. (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad Técnica de Babahoyo. Babahoyo-Ecuador. 2022. págs. 12-13.
25. **MELO, B.L.B. et al.** “Development of microsatellites for the cacao frosty pod rot pathogen, *Moniliophthora roreri*”. *Forest Pathology* [en línea], 2014, (Ecuador), vol. 44 (4), pág. 4. [Consulta: 25 noviembre 2023]. ISSN. 1012-1050. Disponible en: <file:///C:/Users/HP/Downloads/10.1111-efp.12103MroreriForestPathology1.pdf>
26. **MESA VANEGAS, A.M.; et al.** "Metabolitos secundarios en *Trichoderma spp.* y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas”. *Actualidades Biológicas*, [en línea], 2019, (Colombia) vol. 41 (111), págs. 2-4. [Consulta: 30 abril 2023]. ISSN 0304-3584. Disponible en: <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n111a02>
27. **MEYER, Mauricio Conrado; et al.** *Trichoderma: su uso en la agricultura*. 1.^a ed. Brasilia: DF-Embrapa, 2022. págs. 185-187
28. **NAVARRETE RAMOS, Rita Stephani Pierina & TELLO GONZALES, Xenia Briseida.** EFECTO ANTAGÓNICO in vitro DE *Trichoderma sp.* Y *Pseudomonas sp.* FRENTE A *Lasiodiplodia sp* [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad Nacional “SAN LUIS GONZAGA”, ICA, Perú. 2018. págs. 11-12. [Consulta: 2023-08-23]. Disponible en: <https://repositorio.unica.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13028/3419/Efecto%20Antag%C3%B3nico%20in%20vitro%20de%20Trichoderma%20sp.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
29. **PÉREZ CALDERÓN, Ernesto Daniel, & ZORILLA CABRERA, Julio César.** Biofungicidas para el control de moniliasis en el cultivo de *Theobroma cacao* L. clon 575 en la ESPAM MFL [En línea] (Trabajo de titulación). (Titulación) Escuela Superior Politécnica de Manabí. Manabí-Ecuador. 2017. pág.7 [Consulta: 2023-07-20]. Disponible en: <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/537/1/TA64.pdf>

- 30. PHILLIPS-MORA, Wilbert.** Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et al. as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Maestría). University of Reading, department of Agricultural Botany, School of Plant sciences. Inglaterra. 2003. págs.52-53. [Consulta:2023-10-09]. Disponible en: https://cadenacacaoca.info/CDOC-Deployment/documentos/Origin,_biogeography,_genetic_diversity_and_taxonomic_affinities_of_the_cacao.pdf
- 31. PHILLIPS MORA, W.; et al.** “Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America”. *Plant Pathology* [en línea], 2007, vol.56, págs.916-917. [Consulta: 15 noviembre 2023]. ISSN 1365-3059. Disponible en: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-3059.2007.01646.x>
- 32. RODRIGUEZ, D. & FUSCO, M.** “GESTIÓN DE RIESGOS AGROPECUARIOS EN EL SECTOR DEL CACAO EN ECUADOR”. *Revista de Investigación en Modelos Financieros* [en línea], 2017, (Argentina), vol.1 (1), págs. 60-61. [Consulta: 20 agosto 2023]. ISSN 2250-6861. Disponible en: <https://www.economicas.uba.ar/wp-content/uploads/2016/02/Rodriguez-D.-Fusco-M.-Gestion-de-riesgos-agropecuarios-en-el-sector-del-cacao-en-Ecuador1.pdf>
- 33. ROJAS BARRETO, J.A, & HORMAZA ANAGUANO, A.** “Evaluación del crecimiento y compatibilidad de hongos de la podredumbre blanca.”. *Revista Ciencia en desarrollo*, vol. 5, n° 2, (2014), (Colombia). pág. 200.
- 34. ROJAS PANTOJA, Ruben Dario.** Evaluación de la diversidad genética en las razas criollas e indígenas de maíz en Colombia mediante marcadores moleculares tipo RAMs. [En línea]. (Trabajo de titulación). Universidad Nacional de Colombia. Palmira-Colombia. 2015. pág. 26 [Consulta: 2023-10-23]. Disponible en: https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/53918/Ruben_Dario_Rojas_Pantoja.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- 35. SCHOCH C.; et al.** *Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford)*. USA:PubMed, 2020. págs.4-12.

36. SUÁREZ CONTRERAS, Liliana Yanet. “Diversidad genética de *Monilophthora roleri* mediante Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLPs)”. *Revista colombiana de Ciencias Hortícolas*, vol. 11, n° 2, (2017), (Colombia). págs.427.

DIRECCION DE BIBLIOTECAS
Y RECURSOS PARA EL APRENDIZAJE
Y LA INVESTIGACION
INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
C. A. I. V. I. A.
ANALISTA DE BIBLIOTECA 1



ANEXOS

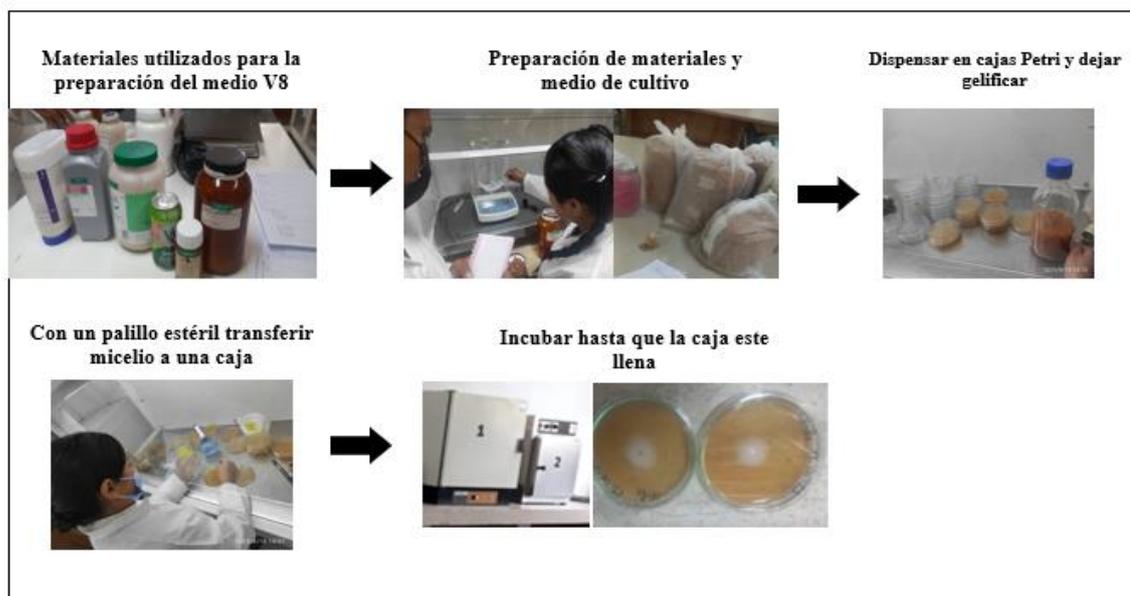
ANEXO A: CÁLCULOS PARA DETERMINAR REACTIVOS Y CANTIDADES PARA PREPARAR MEDIO V8 MODIFICADO

Reactivos	Cantidad
Jugo V8	200 mL
Maltosa	20 g
Asparagina	1 g
Extracto de	
Malta	10 g
CaCO ₃	3 g
Agar-Agar	20 g

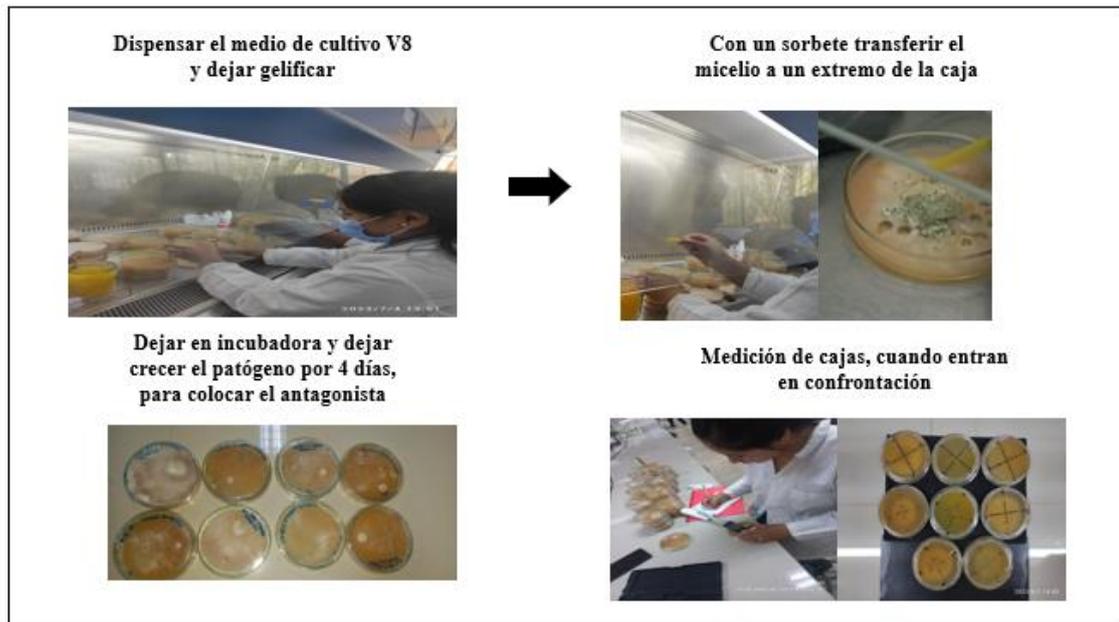
Fuente: (Recheigl,1978)

Realizado por: Quispe, G., 2023.

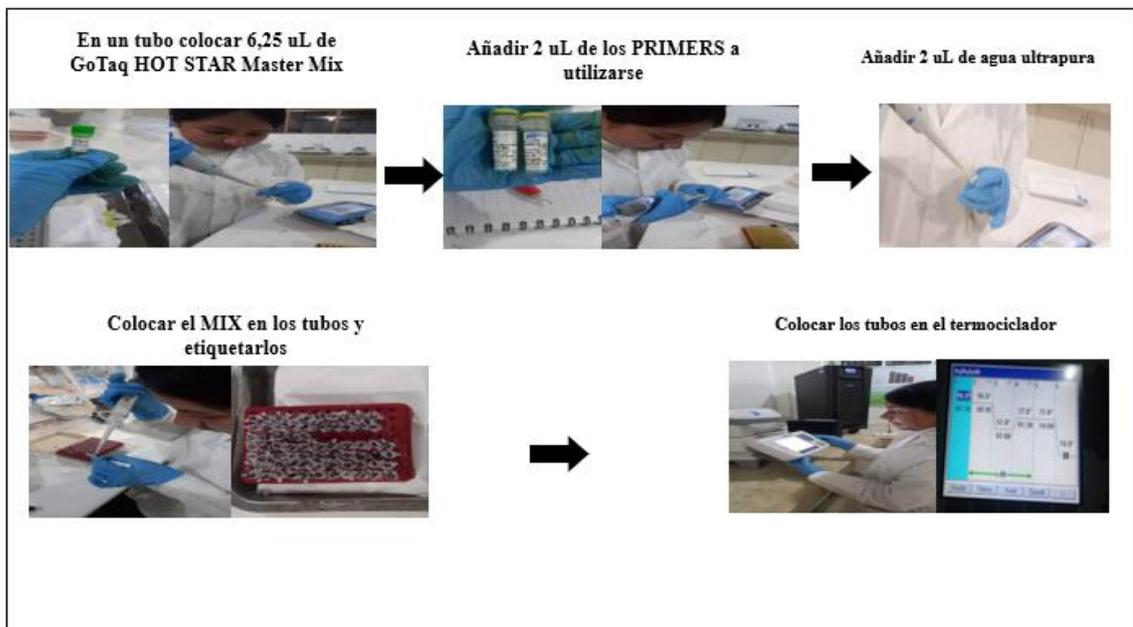
ANEXO B: PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO



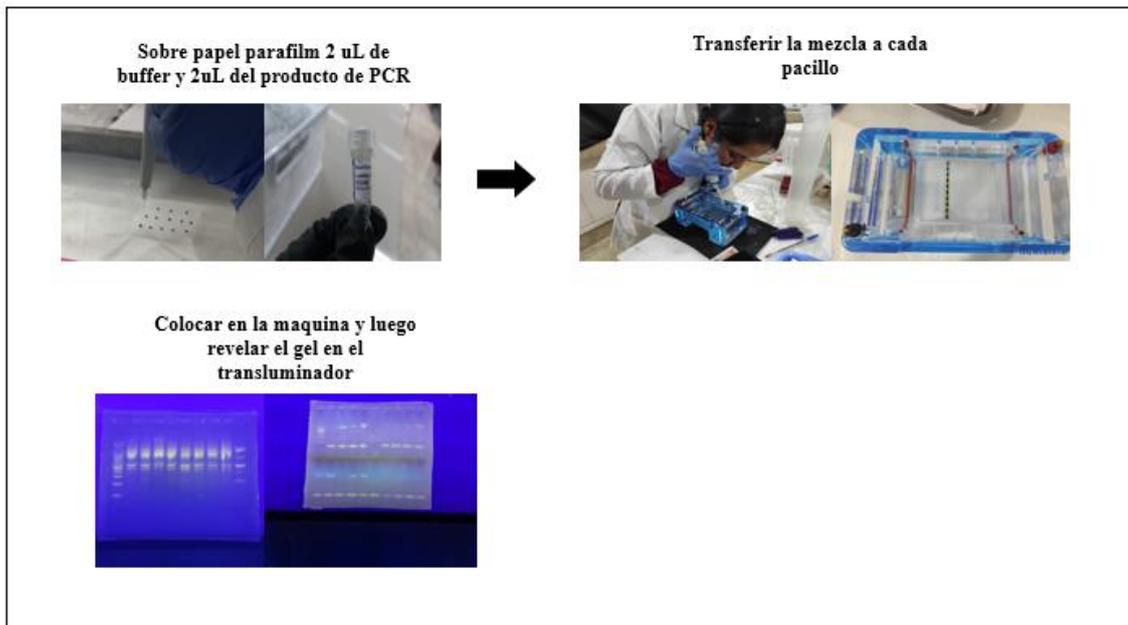
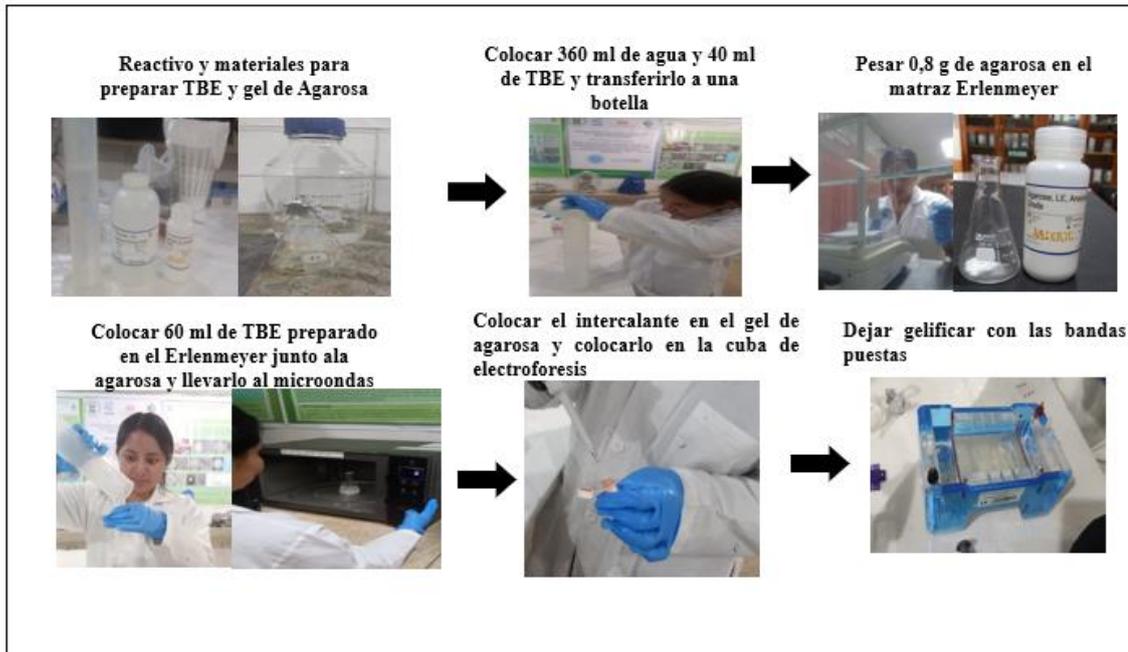
ANEXO C: CULTIVO DUAL *M. roreri* vs *Trichoderma* sp.



ANEXO D: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

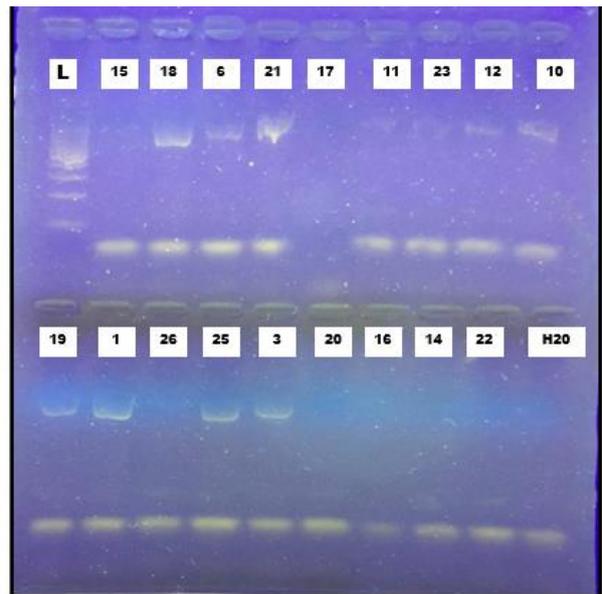


ANEXO E: PROCESO ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR

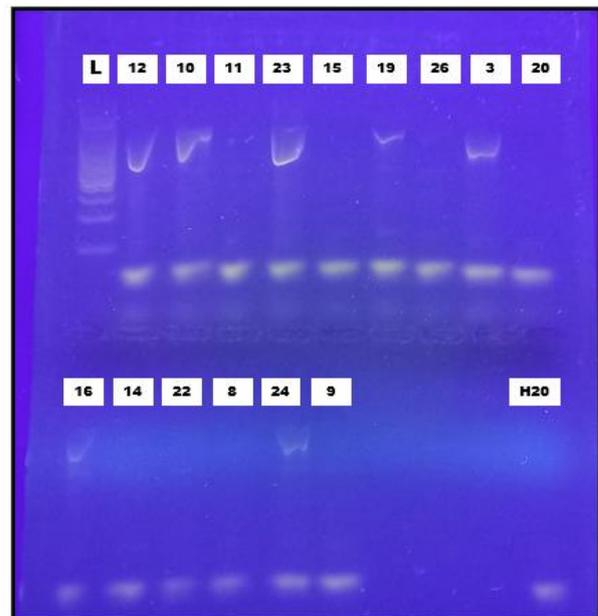


ANEXO F: GELES REVELADOS EN ELECTROFORESIS CON PRIMERS ITS 4 Y 5

Patógeno: *Moniliophthora roreri* H.C Evans
Provincia: Orellana
Lugar:
Positivos:
C18,C6,C21,C12,C10,C19,C1,C25,C3,C11,C23
Tiempo: 70 minutos
Agarosa:1,2%
Intercalante: 3uL
Fecha: 29/06/2023

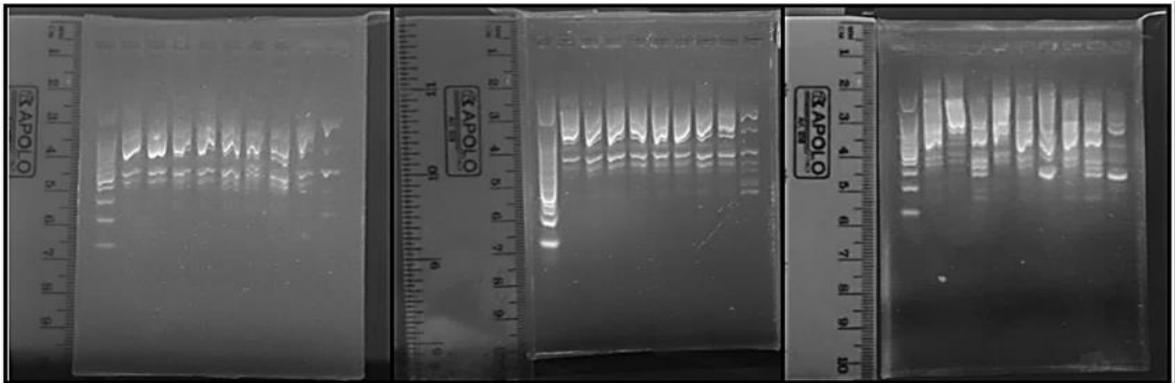


Patógeno: *Moniliophthora roreri* H.C Evans
Provincia: Orellana
Lugar:
Positivos:
C12,C10,C23,C19,C3,C16,C24
Tiempo: 70 minutos
Agarosa:1,2%
Intercalante: 3uL
Fecha: 03/07/2023

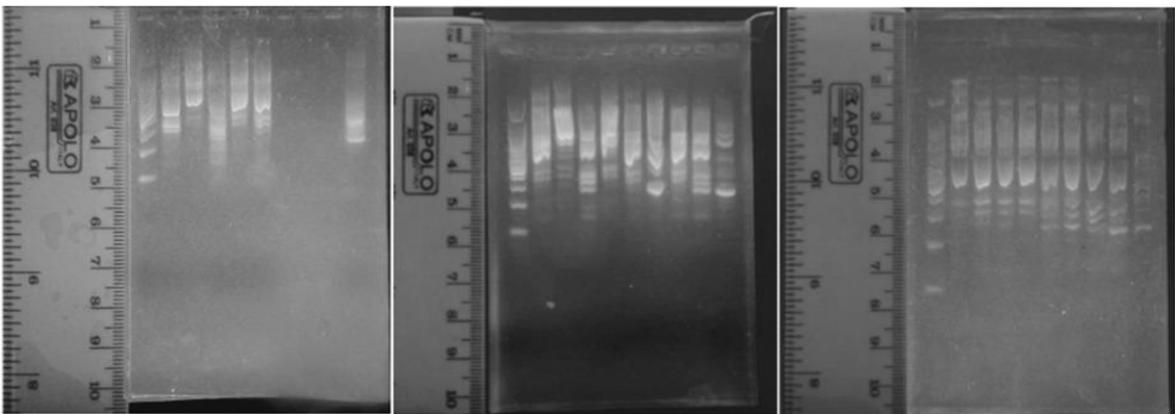


ANEXO G: GELES REVELADOS EN ELECTROFORESIS CON PRIMERS TIPO RAPDS

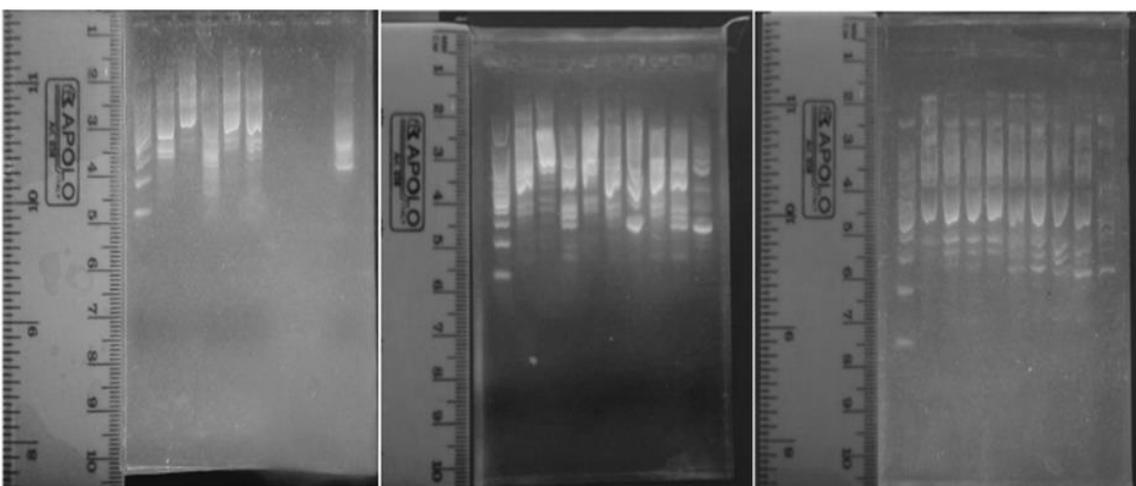
OPA 2



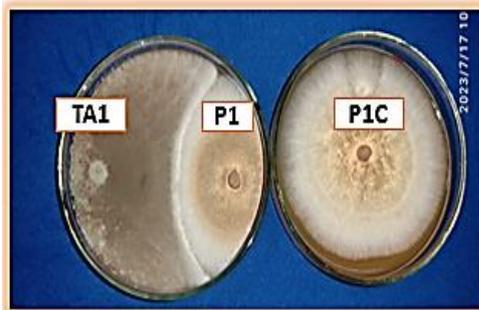
OPA 4



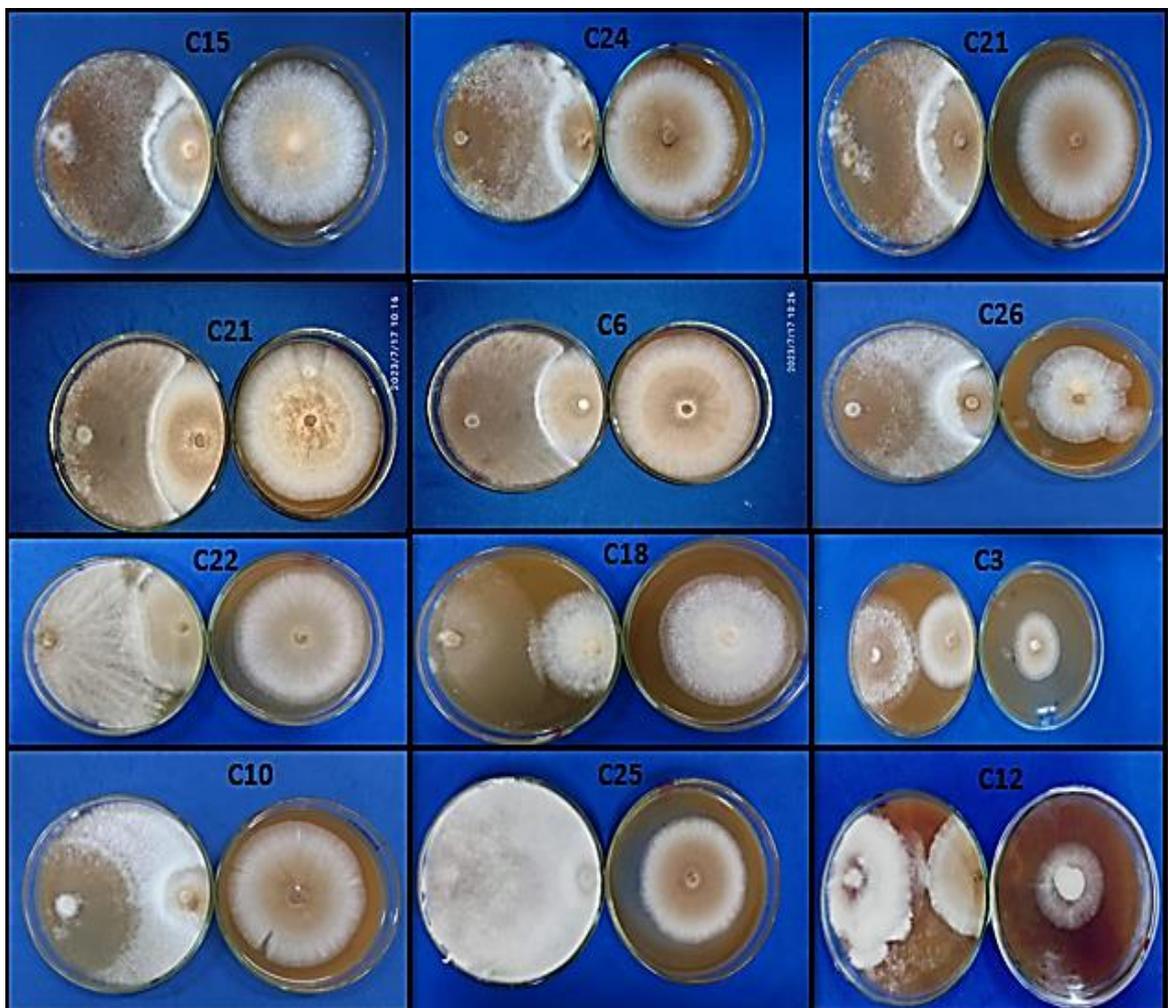
OPA 1



ANEXO H: CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans VS *Trichoderma andinense* (TA1)

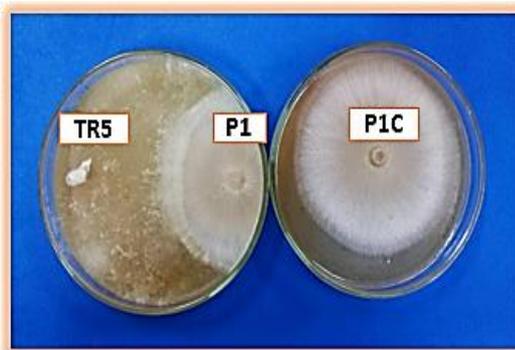


A1: *Trichoderma andinense*
P1: *Moniliophthora roreri* H.C Evans
P1C: Control *M. roreri*

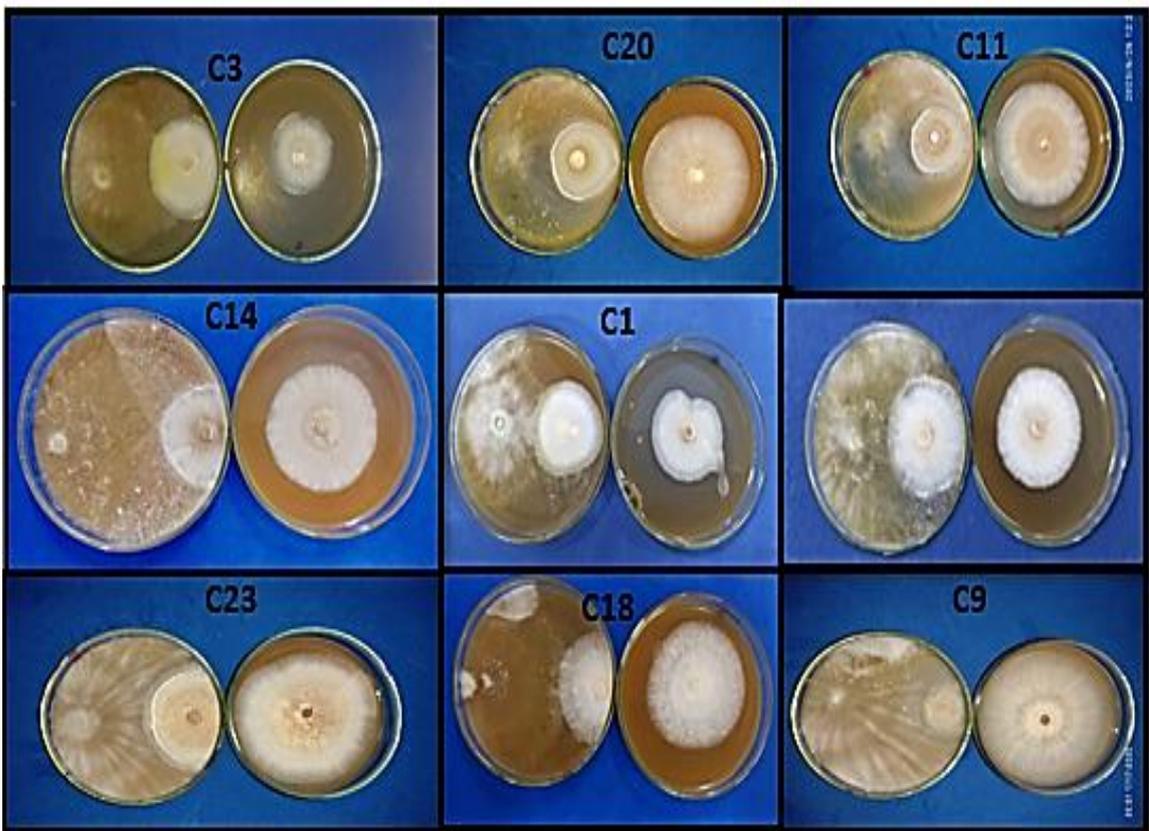
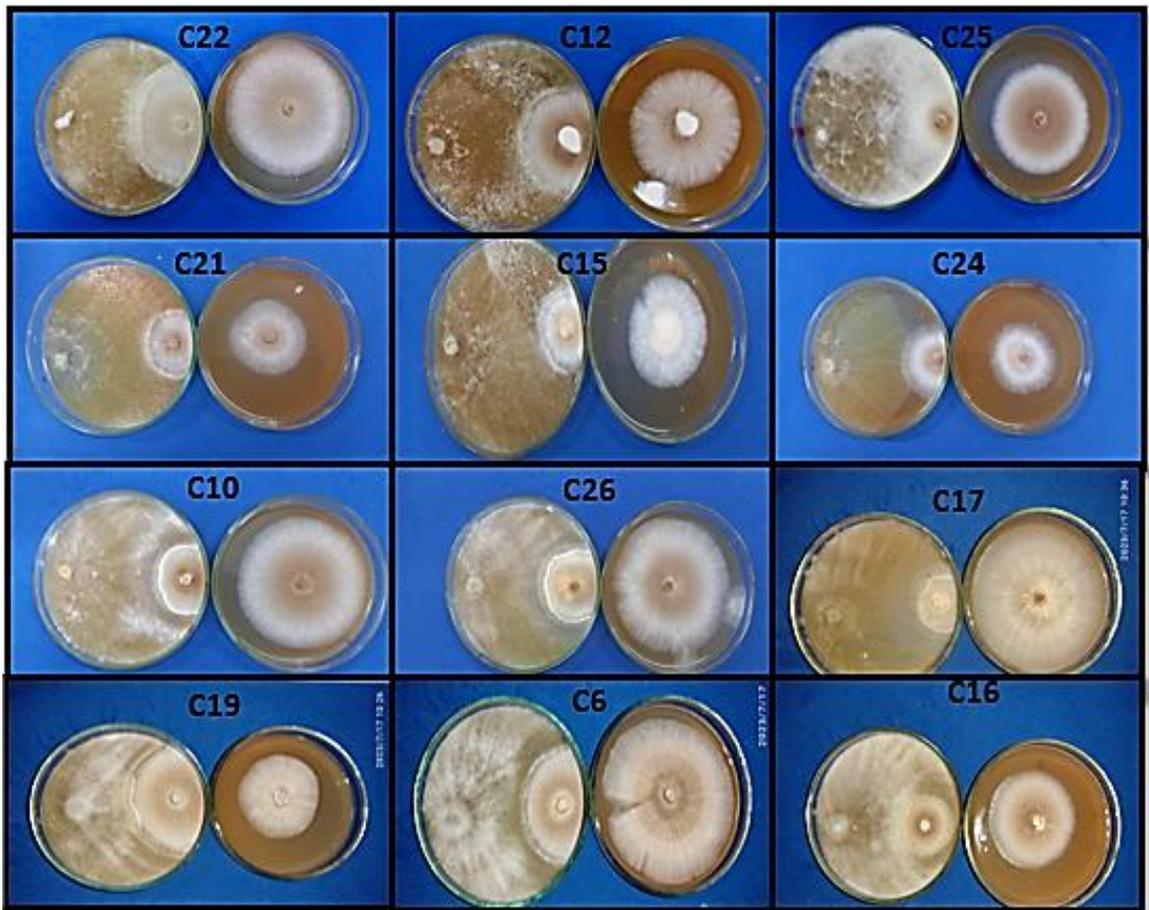




ANEXO I: CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans VS *Trichoderma resei* (TR5)



TR5: *Trichoderma resei*
P1: *Moniliophthora roreri* H.C Evans
P1C: Control *M.roreri*

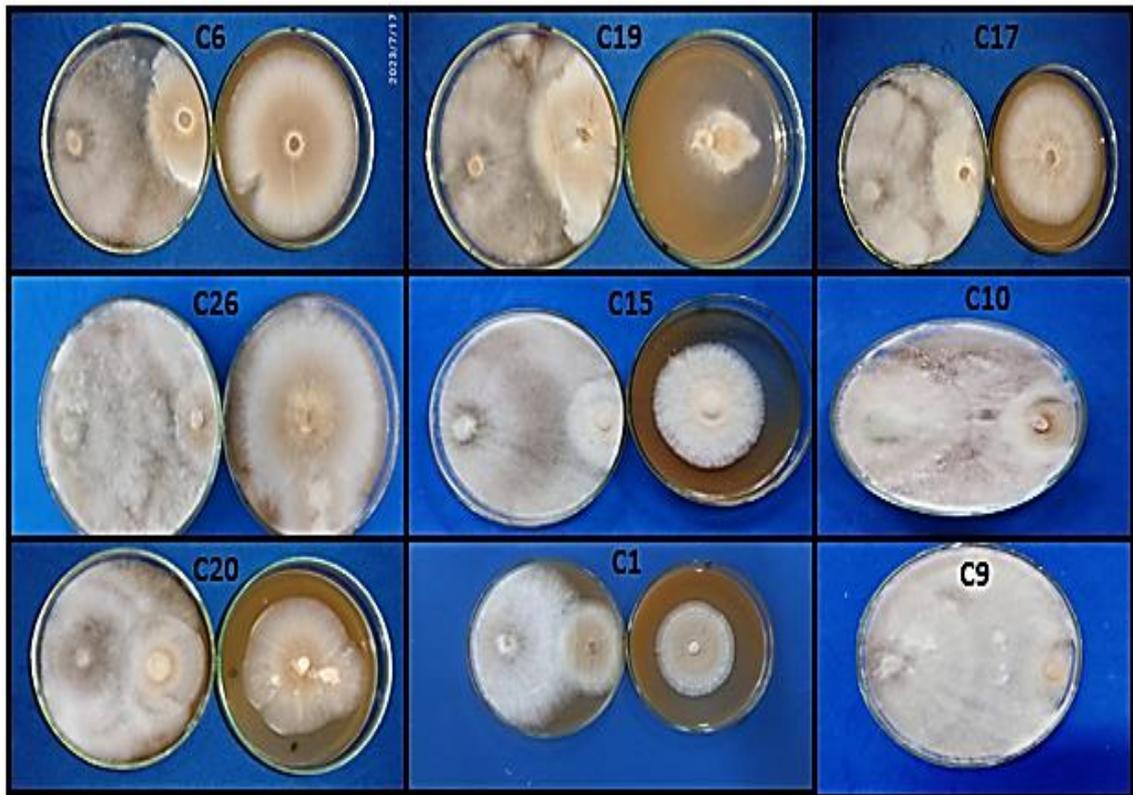


ANEXO J: CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans VS *Trichoderma breve* (TB5)

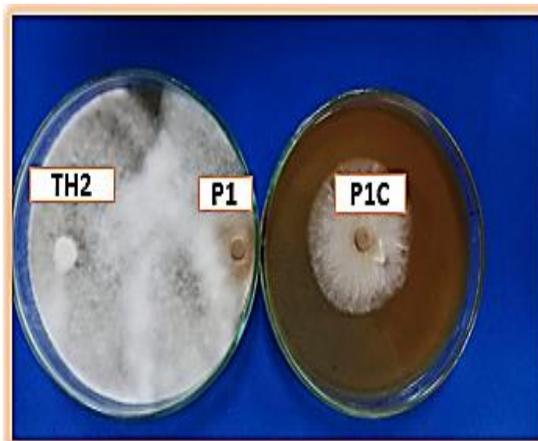


TB6: *Trichoderma breve*
P1: *Moniliophthora roreri* H.C Evans
P1C: Control *M.roreri*

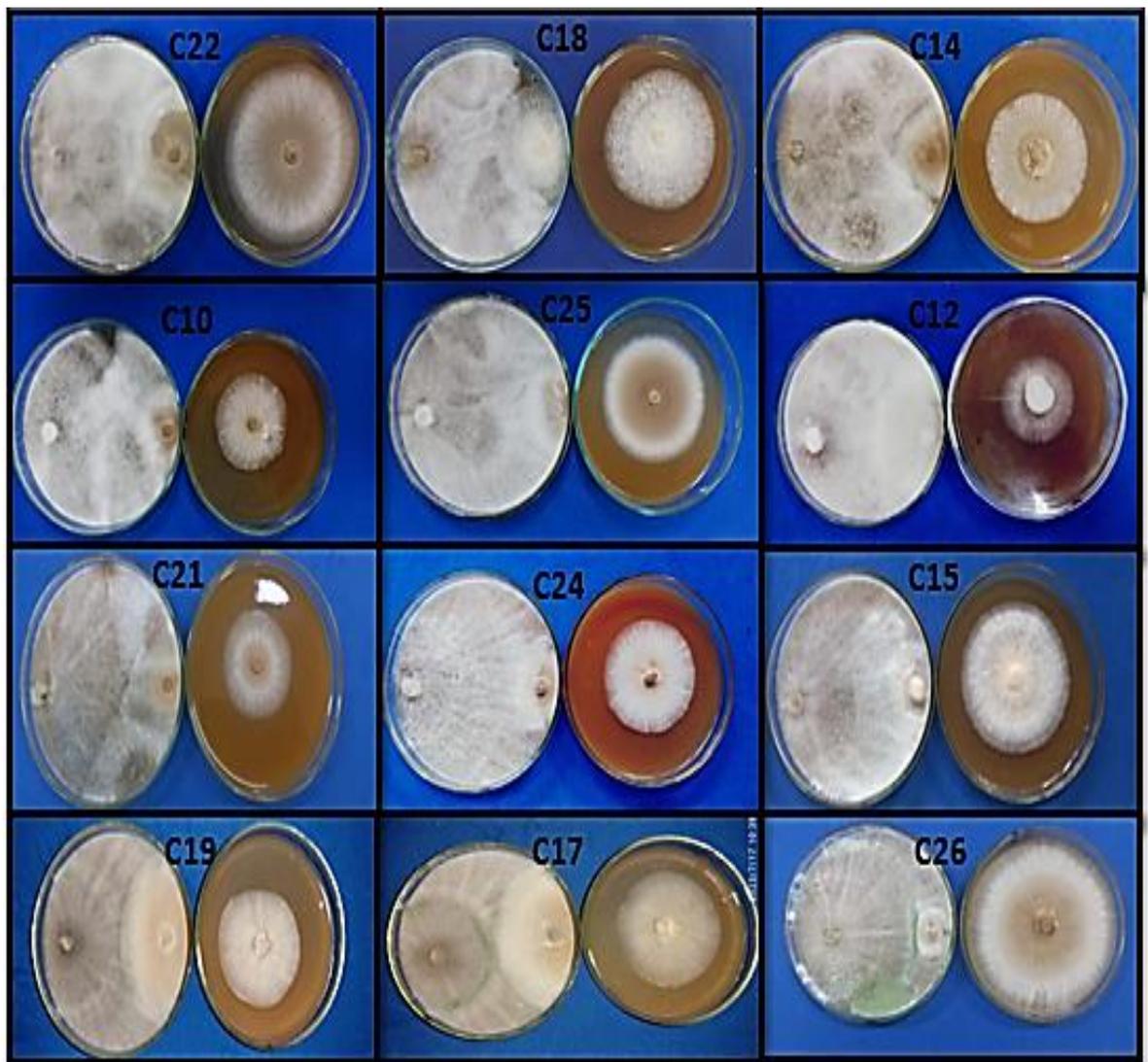


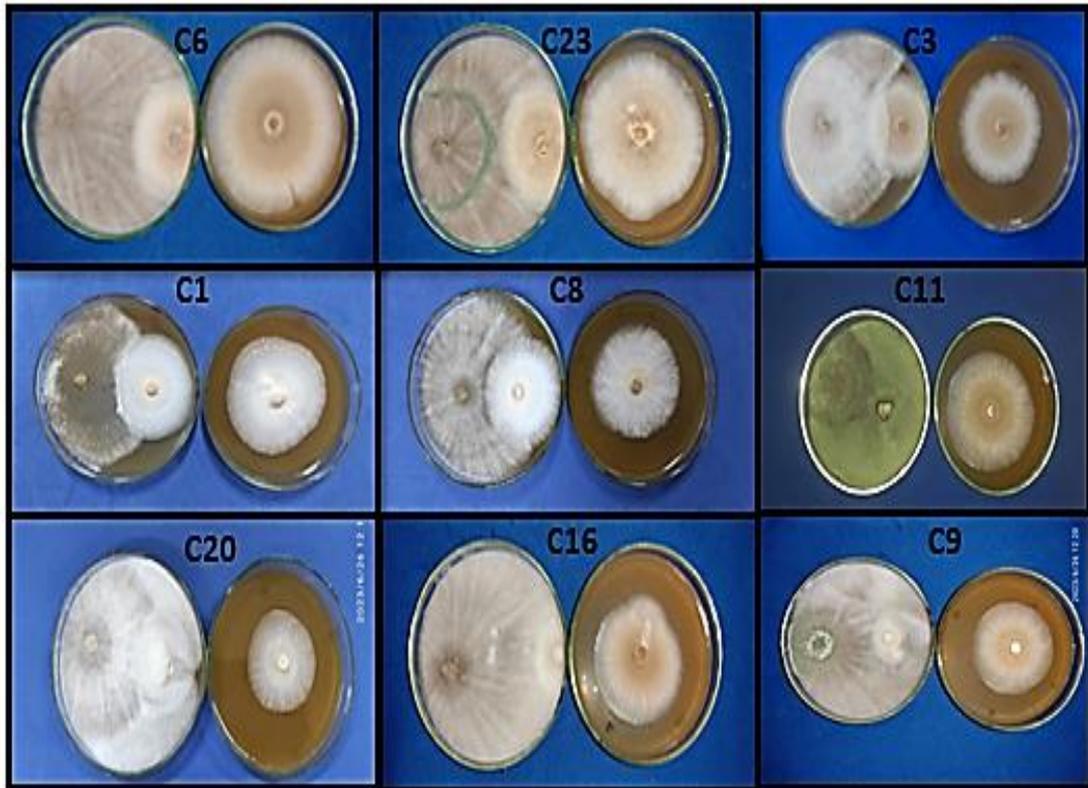


ANEXO K: CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans VS *Trichoderma harzianum* (TH2)

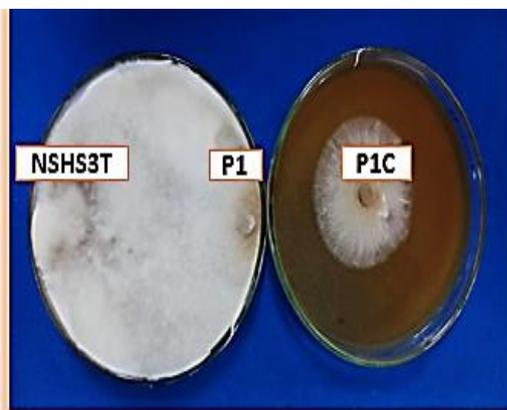


TH2: *Trichoderma harzianum*
P1: *Moniliophthora roreri* H.C Evans
P1C: Control *M.roreri*

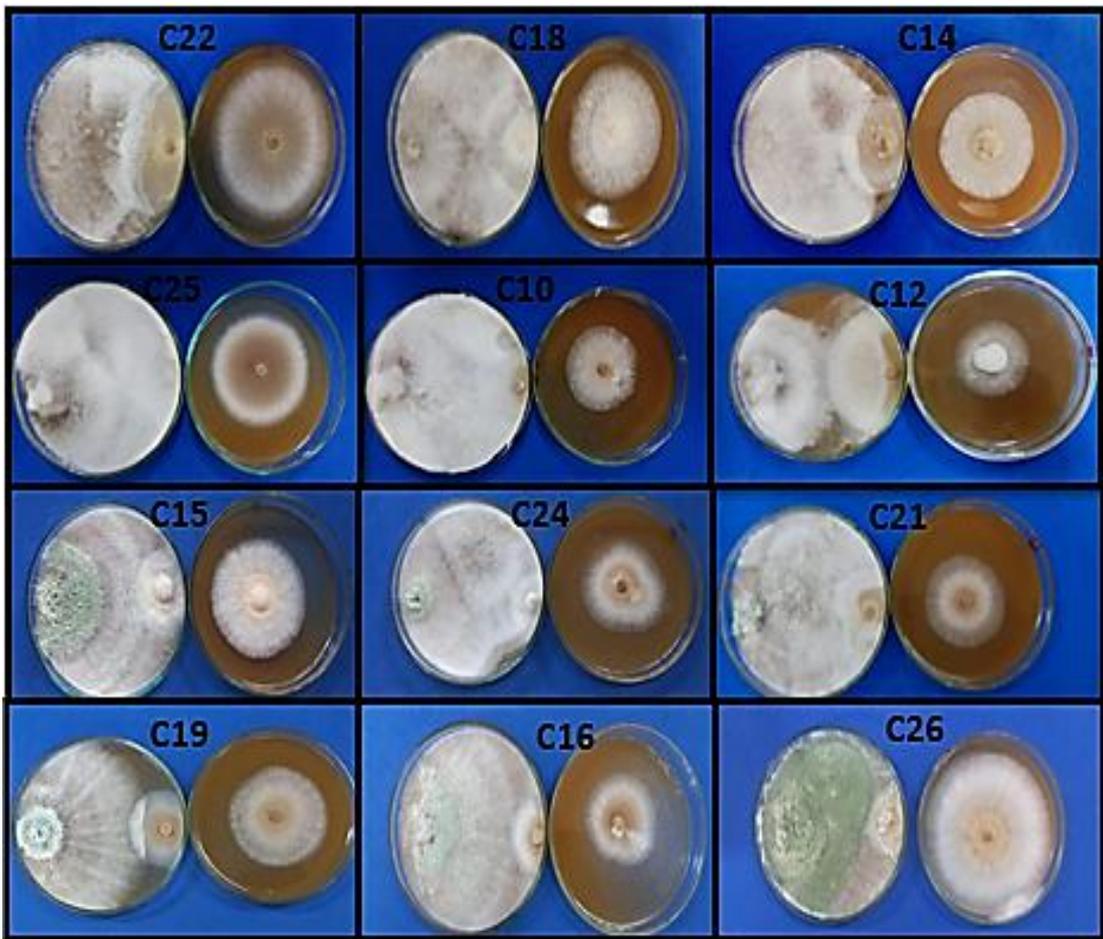




ANEXO L: CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans VS *Trichoderma harzianum* colección Orellana (NSHS3T)



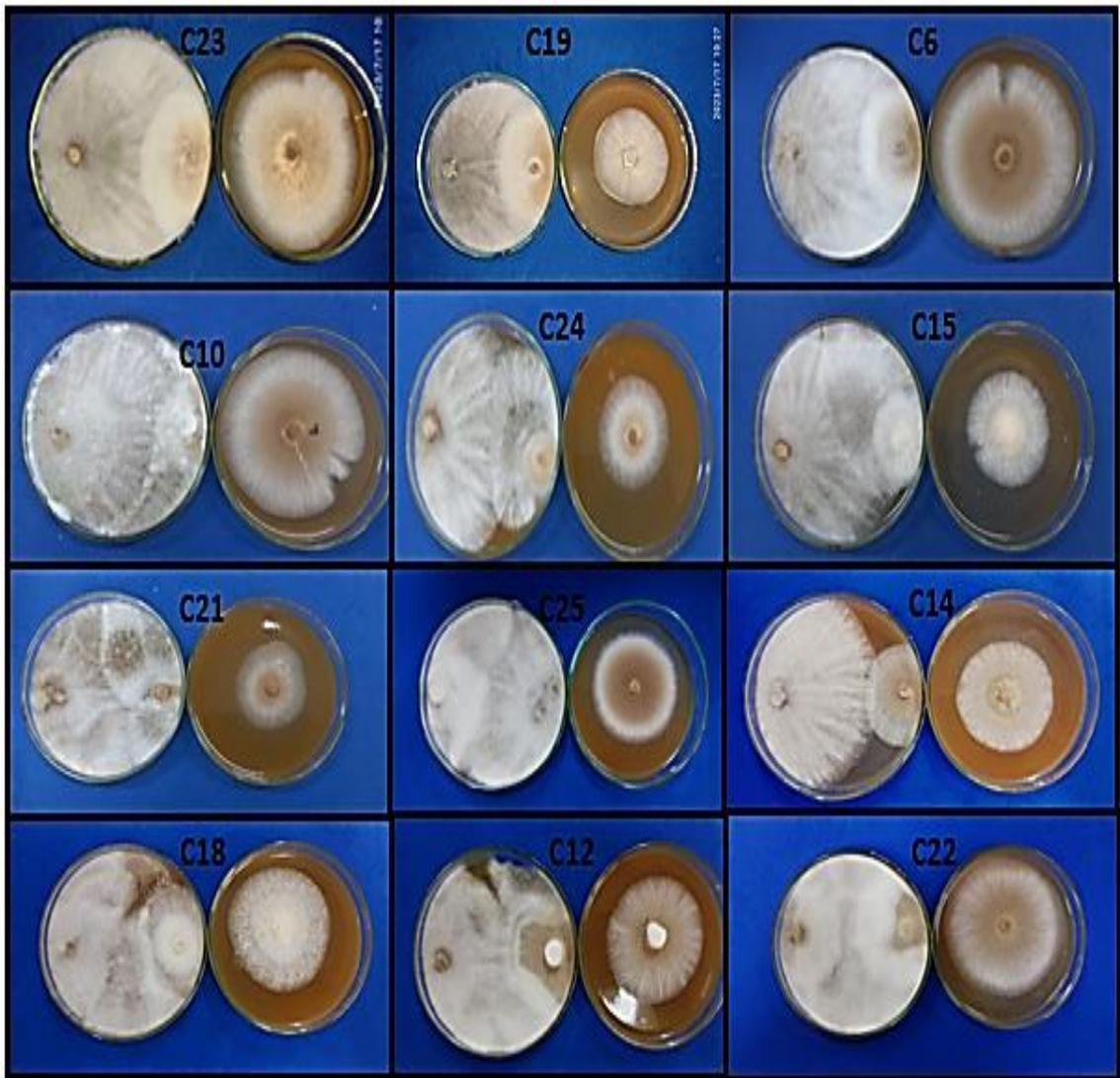
NSHS3T: *Trichoderma harzianum*
(Colección Orellana)
P1: *Moniliophthora roreri* H.C Evans
P1C: Control *M.roreri*

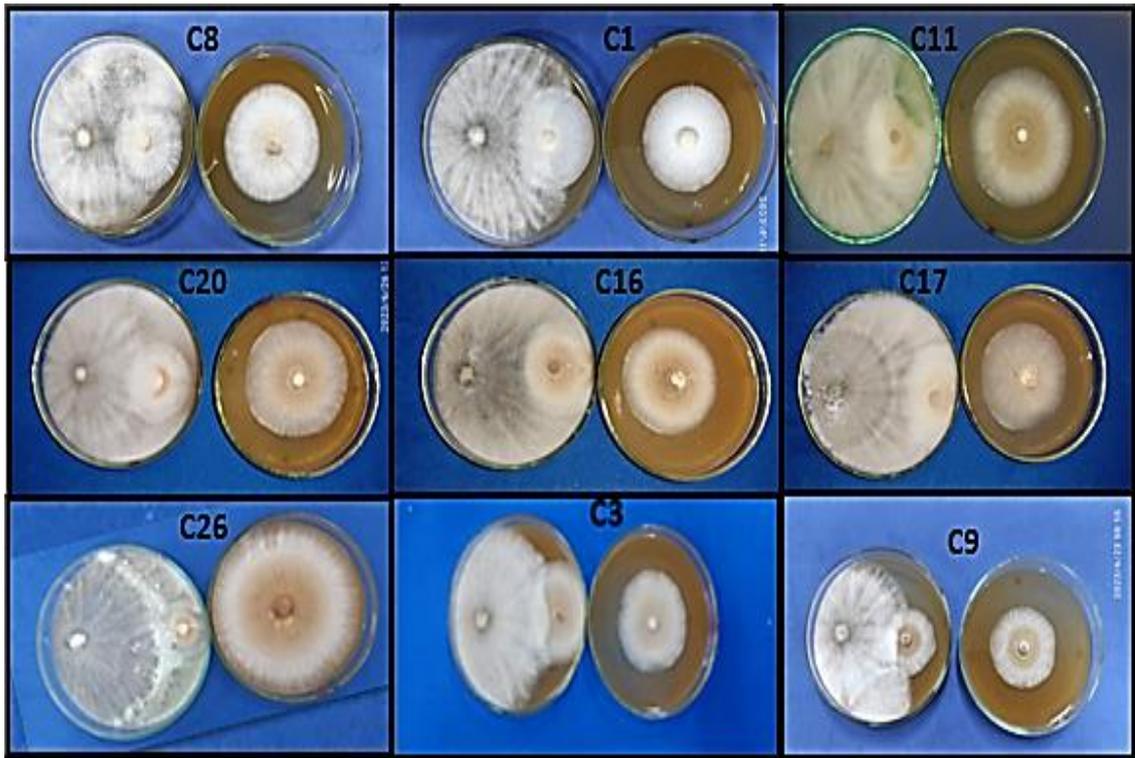


ANEXO M: CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans VS *Trichoderma lentiforme* (TL3)



TL3: *Trichoderma lentiforme*
P1: *Moniliophthora roreri* H.C Evans
P1C: Control *M. roreri*

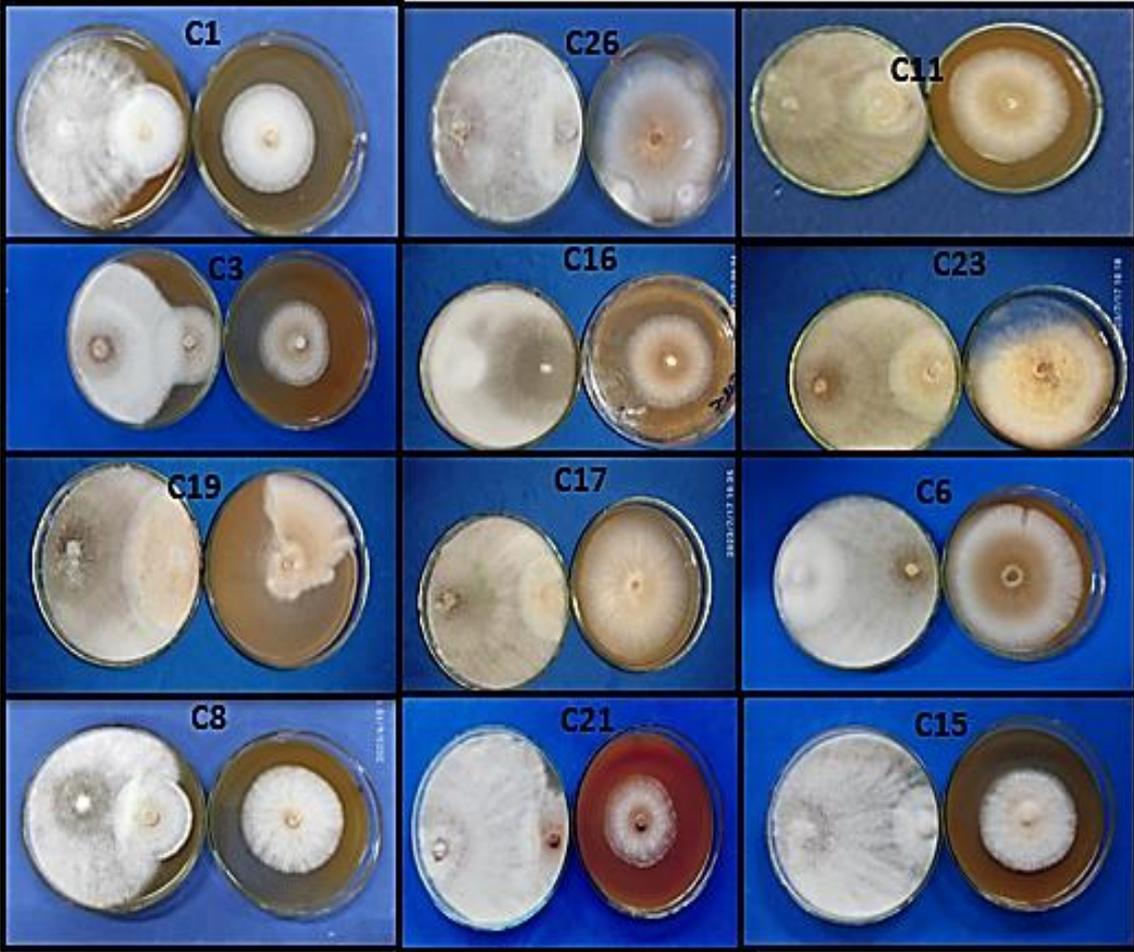


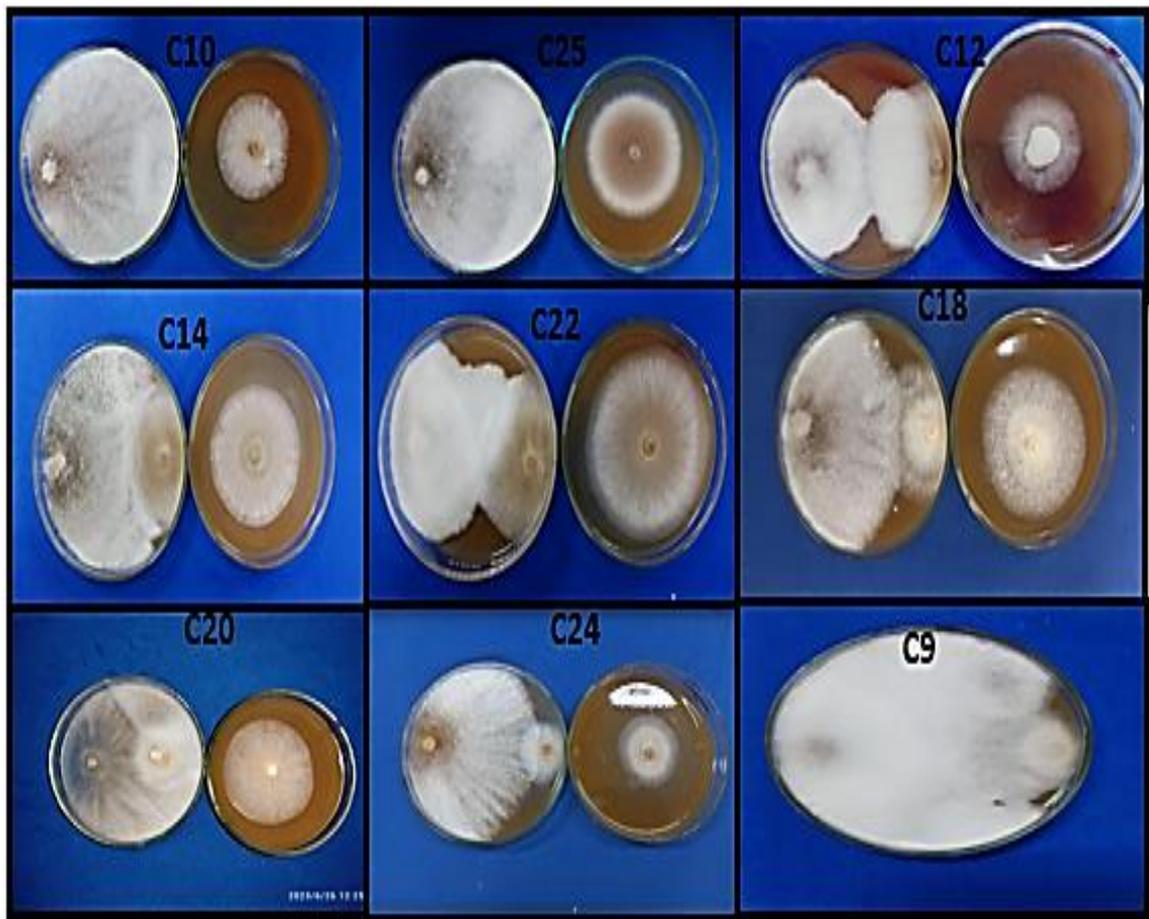


ANEXO N: CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans VS *Trichoderma longibrachatum* (TL4).

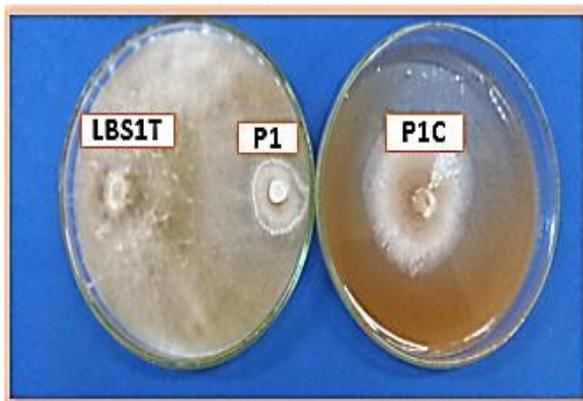


TL4: *Trichoderma longibrachatum*
P1: *Moniliophthora roreri* H.C Evans
P1C: Control *M.roreri*



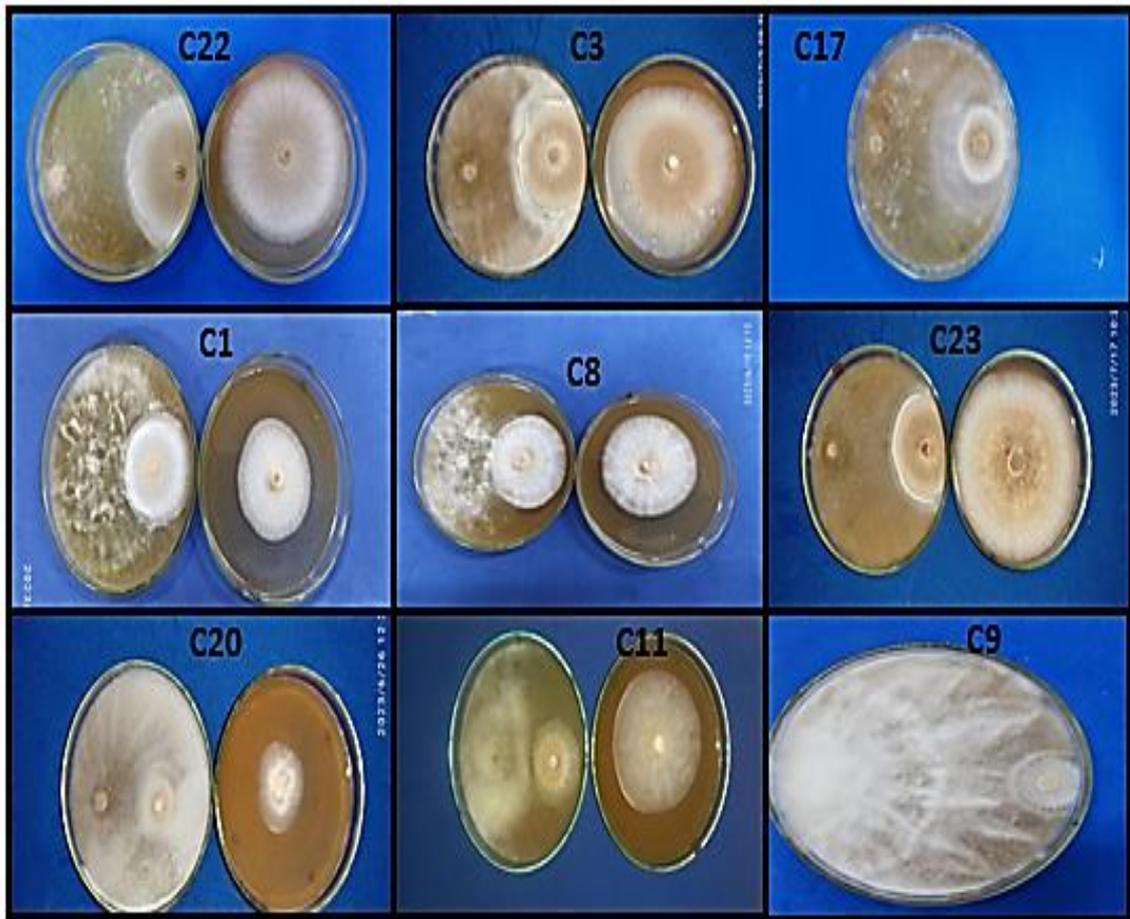


ANEXO O: CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans VS *Trichoderma* sp. (LBS1T)

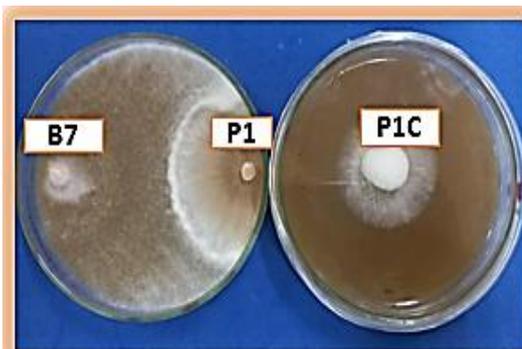


LBS1T: *Trichoderma* sp.
P1: *Moniliophthora roreri* H.C Evans
P1C: Control *M.roreri*

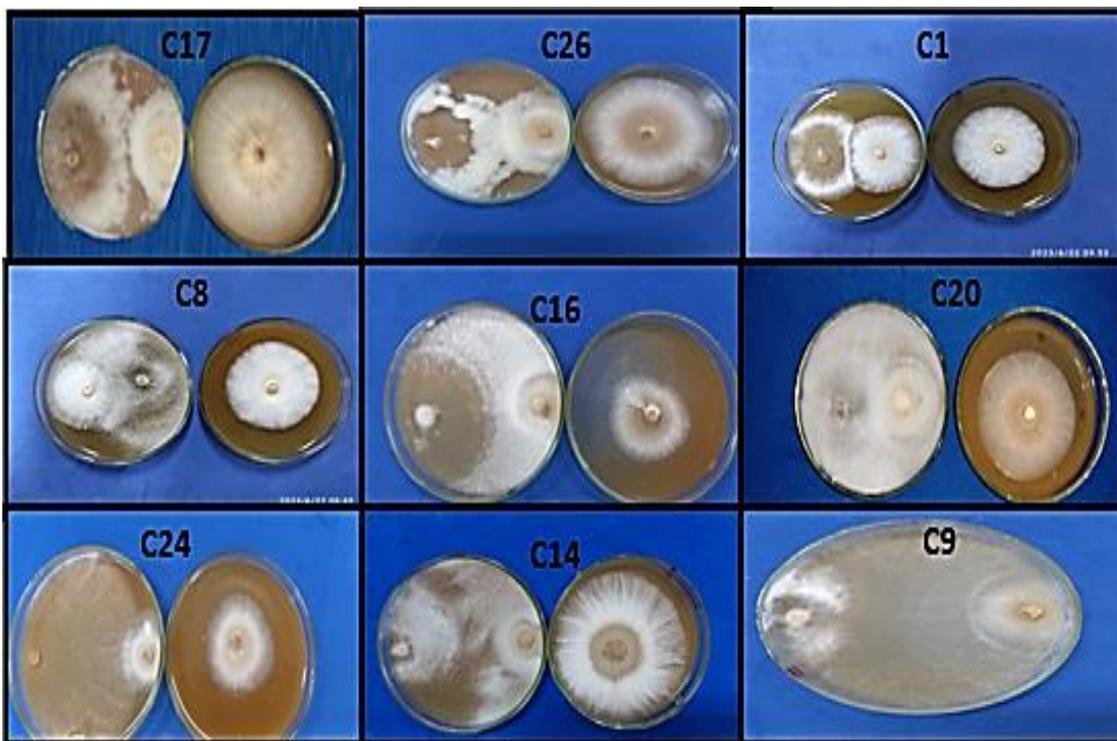
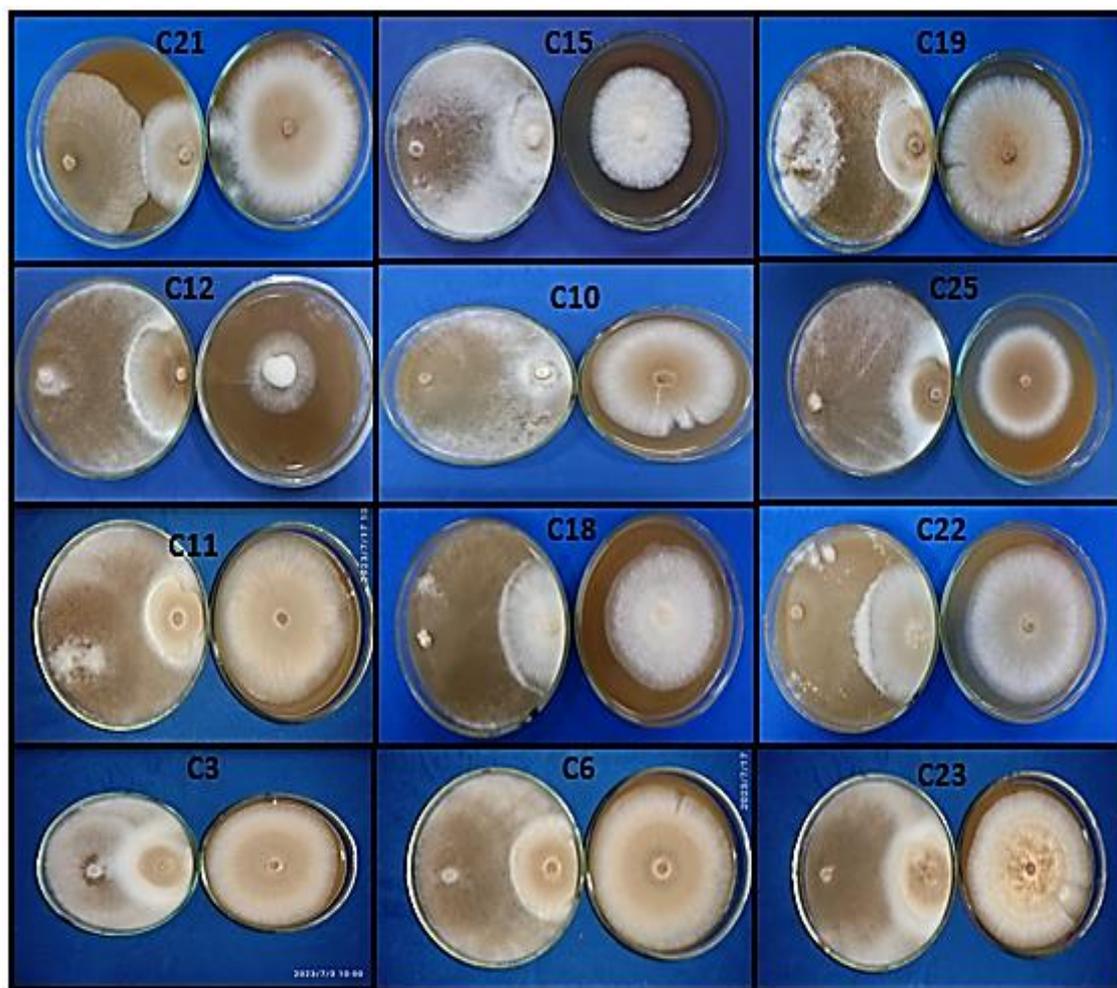




ANEXO P: CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Moniliophthora roreri* H.C Evans VS *Trichoderma* sp. (TB7)



B7: *Trichoderma* sp.
P1: *Moniliophthora roreri* H.C Evans
P1C: Control *M.roreri*



ANEXO Q: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN *Trichoderma* sp. vs *Moniliophthora roreri* H.C
Evans

CEPA	MEDIAS	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
C25	46,97	a
C11	42,11	ab
C26	41,83	bc
C17	41,78	bcd
C23	41,13	bcde
C16	40,33	bcdef
C10	39,82	bcdef
C6	39,58	cdefg
C14	39,36	cdefg
C12	38,01	cdefg
C9	37,3	defg
C19	36,52	efgh
C3	35,95	efgh
C15	35,54	efghi

ANEXO Q: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN *Trichoderma* sp. vs *Moniliophthora roreri* H.C
Evans

ESPECIES	CEPA	MEDIAS	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
TB6	C26	66,57	A
TL3	C11	64,5	AB
TB6	C17	60,43	ABC
NSHS3T	C25	59,88	ABCD
TB6	C25	59,26	ABCDE
TL3	C25	59,17	ABCDE
TH2	C25	58,27	ABCDEF
NSHS3T	C11	57,42	ABCDEFG
TB6	C11	56,99	ABCDEFGH
TL4	C25	56,41	ABCDEFGHI
NSHS3T	C14	56,08	ABCDEFGHIJ
TR5	C17	55,28	ABCDEFGHIJK
NSHS3T	C16	55,13	ABCDEFGHIJK
TH2	C26	54,53	ABCDEFGHIJKL
TL3	C3	54,31	ABCDEFGHIJKLM
TH2	C9	53,59	ABCDEFGHIJKLM
TL3	C10	53,48	ABCDEFGHIJKLM
TL4	C9	53,09	ABCDEFGHIJKLMNO

TB6	C9	52,41	ABCDEFGHIJKLMNPO
TL4	C23	52,35	ABCDEFGHIJKLMNPO
TH2	C3	52,2	ABCDEFGHIJKLMNPO
TL3	C16	51,7	ABCDEFGHIJKLMNPO
TL3	C19	50,42	ABCDEFGHIJKLMNPOQ
TB6	C19	50,2	ABCDEFGHIJKLNOPQR
TL3	C14	49,67	ABCDEFGHIJKLMNOPQRS
TH2	C23	49,03	ABCDEFGHIJKLMNOPQRST
TH2	C12	48,97	ABCDEFGHIJKLMNOPQRST
TL4	C10	48,89	ABCDEFGHIJKLMNOPQRST
TH2	C21	48,72	ABCDEFGHIJKLMNOPQRST
TH2	C6	48,52	ABCDEFGHIJKLMNOPQRST
TH2	C11	48,27	ABCDEFGHIJKLMNOPQRST
TH2	C17	48,25	ABCDEFGHIJKLMNOPQRST
TL3	C23	48,13	ABCDEFGHIJKLMNOPQRST
TL3	C17	48,02	ABCDEFGHIJKLMNOPQRST
NSHS3T	C10	47,94	ABCDEFGHIJKLMNOPQRST
NSHS3T	C6	47,64	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
NSHS3T	C19	47,64	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TL3	C6	47,23	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TL4	C26	46,71	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
NSHS3T	C17	46,54	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB6	C6	46,48	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TL3	C26	46,41	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
NSHS3T	C15	46,02	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TH2	C14	45,86	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TL3	C8	45,36	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TL4	C16	45,24	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TA1	C14	45,22	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TR5	C6	45,18	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TH2	C19	45,01	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TR5	C25	44,87	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
LBS1T	C6	44,75	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
NSHS3T	C22	44,53	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB6	C23	44,45	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TH2	C8	44,4	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TH2	C18	44,32	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TL3	C12	44,28	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB6	C12	44,25	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
NSHS3T	C9	43,92	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TL3	C21	43,51	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TH2	C22	43,06	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
LBS1T	C11	42,99	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU

NSHS3T	C26	42,73	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
LBS1T	C23	42,35	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TL4	C20	42,24	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TH2	C24	41,01	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB6	C10	40,06	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TR5	C16	40,06	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TA1	C20	39,85	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TH2	C15	39,72	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB7	C10	39,63	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TL4	C22	39,45	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TL3	C15	39,44	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TL4	C18	39,34	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TL3	C24	39,09	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
NSHS3T	C3	38,87	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB7	C16	38,47	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TL4	C15	38,38	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TL4	C12	38,35	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TH2	C20	37,91	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TH2	C10	37,86	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TA1	C23	37,39	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TL3	C20	37,08	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
LBS1T	C16	37,06	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB7	C15	36,89	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB6	C16	36,83	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TR5	C12	36,77	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB6	C8	36,69	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB7	C14	36,4	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB7	C26	36,37	ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTU
NSHS3T	C18	36,17	BCDEFGHIJKILNOPQRSTU
TB7	C17	36,07	BCDEFGHIJKILNOPQRSTU
TB6	C24	35,92	BCDEFGHIJKILNOPQRSTU
LBS1T	C17	35,59	BCDEFGHIJKILNOPQRSTU
TB6	C18	35,41	BCDEFGHIJKILNOPQRSTU
TR5	C15	35,12	BCDEFGHIJKILNOPQRSTU
NSHS3T	C20	35,04	BCDEFGHIJKILNOPQRSTU
TA1	C10	35,03	BCDEFGHIJKILNOPQRSTU
TB7	C3	35	BCDEFGHIJKILNOPQRSTU
TR5	C18	34,92	BCDEFGHIJKILNOPQRSTU
TR5	C21	34,61	BCDEFGHIJKILNOPQRSTU
TB7	C25	34,45	BCDEFGHIJKILNOPQRSTU
TA1	C18	34,38	BCDEFGHIJKILNOPQRSTU
TL4	C21	34,13	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB7	C1	34,05	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU

TL3	C22	33,95	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
LBS1T	C12	33,87	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB6	C14	33,84	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB7	C8	33,38	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB7	C23	33,37	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TR5	C9	33,37	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TL3	C18	33,05	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TR5	C3	32,95	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TA1	C25	32,9	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TA1	C12	32,83	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TA1	C16	32,71	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB6	C1	32,45	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TR5	C1	32,41	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TA1	C19	32,4	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
NSHS3T	C23	32,34	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
NSHS3T	C12	32,19	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB6	C3	31,78	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
NSHS3T	C24	31,67	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TL4	C1	31,34	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
NSHS3T	C8	31,16	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB7	C18	31,15	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TL4	C14	31,06	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB7	C21	30,8	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TR5	C23	30,74	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB6	C15	30,69	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TB7	C12	30,55	CDEFGHIJKLMNOPQRSTU
TH2	C1	30,04	DEFGHIJKLMNOPQRSTU
TA1	C21	29,86	DEFGHIJKLMNOPQRSTU
TR5	C10	29,79	DEFGHIJKLMNOPQRSTU
LBS1T	C14	29,67	DEFGHIJKLMNOPQRSTU
TA1	C9	29,43	EFGHIJKLMNOPQRSTU
TA1	C3	29,28	EFGHIJKLMNOPQRSTU
TR5	C11	28,77	FGHIJKLMNOPQRSTU
LBS1T	C20	28,71	FGHIJKLMNOPQRSTU
TL3	C1	28,63	FGHIJKLMNOPQRSTU
LBS1T	C15	28,48	FGHIJKLMNOPQRSTU
LBS1T	C21	28,48	FGHIJKLMNOPQRSTU
TL4	C11	28,26	FGHIJKLMNOPQRSTU
TB7	C19	28,19	FGHIJKLMNOPQRSTU
TR5	C26	28,1	FGHIJKLMNOPQRSTU
TB7	C11	28,04	FGHIJKLMNOPQRSTU
LBS1T	C26	28,01	FGHIJKLMNOPQRSTU
LBS1T	C18	27,84	GHIJKLMNOPQRSTU

TA1	C6	27,58	GHIJKLMNOPQRSTU
TA1	C26	27,01	HIJKLMNOPQRSTU
LBS1T	C3	26,65	IJKLMNOPQRSTU
TA1	C22	26,58	IJKLMNOPQRSTU
TR5	C14	26,45	IJKLMNOPQRSTU
TA1	C24	26,38	IJKLMNOPQRSTU
NSHS3T	C1	26,37	IJKLMNOPQRSTU
TL4	C24	26,36	IJKLMNOPQRSTU
TB6	C20	26,24	IJKLMNOPQRSTU
TA1	C17	25,81	JKLMNOPQRSTU
TH2	C16	25,78	KLMNOPQRSTU
LBS1T	C10	25,75	KLMNOPQRSTU
TL4	C19	25,44	KLMNOPQRSTU
TL4	C6	25,44	KLMNOPQRSTU
TA1	C8	25,38	KLMNOPQRSTU
TR5	C20	25,37	KLMNOPQRSTU
TR5	C8	25,31	KLMNOPQRSTU
TR5	C19	25,24	KLMNOPQRSTU
TL3	C9	25,19	KLMNOPQRSTU
TA1	C15	25,12	KLMNOPQRSTU
NSHS3T	C21	25,04	KLMNOPQRSTU
TL4	C8	24,69	KLMNOPQRSTU
LBS1T	C19	24,14	KLMNOPQRSTU
TA1	C11	23,79	LMNOPQRSTU
TB7	C20	23,78	MNOPQRSTU
TB7	C9	23,76	NOPQRSTU
LBS1T	C22	23,53	NOPQRSTU
TB7	C6	23,39	NOPQRSTU
TB7	C24	23,03	OPQRSTU
TB7	C22	22,96	OPQRSTU
TB6	C22	22,84	OPQRSTU
TR5	C24	22,75	PQRSTU
TL4	C3	22,54	PQRSTU
LBS1T	C8	22,33	PQRSTU
TA1	C1	22,3	PQRSTU
LBS1T	C9	20,98	QRSTU
TB6	C21	20,47	QRSTU
TL4	C17	19,99	RSTU
TR5	C22	19,63	STU
LBS1T	C1	19,17	TU
LBS1T	C25	17,53	U
LBS1T	C24	17,53	U



epoch

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 17 / 01 / 2024

INFORMACIÓN DE LA AUTORA
Nombres – Apellidos: Maria Gabriela Quispe Guamani
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Recursos Naturales
Carrera: Agronomía
Título a optar: Ingeniera Agrónoma
f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. CPA. Jhonatan Rodrigo Parreño Uquillas. MBA.

DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS
Y RECURSOS PARA EL APRENDIZAJE
Y
Ing. Jhonatan Rodrigo Uquillas MBA
DBRA1 ANALISTA DE BIBLIOTECA 1

2281-DBRA-UPT-2023