



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DR. JACOBO BUCARAM ORTIZ
CARRERA AGRONOMÍA

**EFFECTO DEL CONTROL ANTIFÚNGICO SOBRE LA
FAMILIA *BOTRYOSPHAERiaceae* EN CULTIVO DE
CACAO (*Theobroma cacao L.*) BAJO CONDICIONES
CONTROLADAS.**

TRABAJO EXPERIMENTAL

Trabajo de titulación presentado como requisito para la
obtención de título de
INGENIERO AGRÓNOMO

AUTOR
JURADO AREVALO AARON MISAE

TUTOR
ING. ESPINOZA MORAN WINSTON Msc.

GUAYAQUIL – ECUADOR

2023



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DR. JACOBO BUCARAM ORTIZ
CARRERA AGRONOMÍA

APROBACIÓN DEL TUTOR

Yo, **ING. WINSTON ESPINOZA MORAN, MSc** docente de la Universidad Agraria del Ecuador, en mi calidad de Tutor, certifico que el presente trabajo de titulación: **EFFECTO DEL CONTROL ANTIFÚNGICO SOBRE LA FAMILIA BOTRYOSPHAERIACEAE EN CULTIVO DE CACAO (*Theobroma cacao L.*) BAJO CONDICIONES CONTROLADAS**, realizado por el estudiante **JURADO AREVALO AARON MISAEL**; con cédula de identidad **N° 0925460347** de la carrera **AGRONOMÍA**, Facultad de Ciencias Agrarias “Dr. Jacobo Bucaram Ortiz” Campus Universitario “Dr. Jacobo Bucaram Ortiz” **Guayaquil**, ha sido orientado y revisado durante su ejecución; y cumple con los requisitos técnicos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador; por lo tanto, se aprueba la presentación del mismo.

Atentamente,

ING. WINSTON ESPINOZA MORAN, MSc.

Guayaquil, 2 de octubre del 2023



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DR. JACOBO BUCARAM ORTIZ
CARRERA AGRONOMÍA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

Los abajo firmantes, docentes designados por el H. Consejo Directivo como miembros del Tribunal de Sustentación, aprobamos la defensa del trabajo de titulación: **EFFECTO DEL CONTROL ANTIFÚNGICO SOBRE LA FAMILIA *BOTRYOSPHAERIACEAE* EN CULTIVO DE CACAO (*Theobroma cacao L.*) BAJO CONDICIONES CONTROLADAS**, realizado por el estudiante **JURADO AREVALO AARON MISAEL**, el mismo que cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador.

Atentamente,

Paulo Centanaro Quiroz, PhD
PRESIDENTE

Juan Martillo Garcia, Msc.
EXAMINADOR PRINCIPAL

Arturo Alvarado Barzallo, Msc.
EXAMINADOR PRINCIPAL

Winston Espinoza Moran, Msc.
EXAMINADOR SUPLENTE

Guayaquil, 2 de octubre del 2023

Dedicatoria

El presente proyecto es dedicado a las personas que me acompañaron en el proceso estudiantil, mis padres por darme la mejor herencia que es la educación con el deseo de superación, a mi novia que fue el apoyo incondicional y a mis ángeles que son mis abuelos este logro también es gracias a ustedes por cuidarme y guiarme en la niñez.

Agradecimiento

A Dios, por acompañarme todos los días y ser parte fundamental de mi vida.

A la Universidad Agraria del Ecuador y sus docentes, por su apoyo en cada paso para el logro de mi desarrollo profesional.

A mi Tutor de tesis, por su apoyo, guía y orientación en el desarrollo de nuestro trabajo experimental.

A mi madre por ser mi ejemplo, apoyo y motivación para continuar con mi desarrollo profesional.

Autorización de autoría intelectual

Yo **JURADO AREVALO AARON MISAEL**, en calidad de autor del proyecto realizado, sobre **“EFECTO DEL CONTROL ANTIFÚNGICO SOBRE LA FAMILIA *BOTRYOSPHAERIACEAE* EN CULTIVO DE CACAO (*Theobroma cacao L.*) BAJO CONDICIONES CONTROLADAS”** para optar el título de **INGENIERO AGRÓNOMO**, por la presente autorizo a la **UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR**, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autora me correspondan, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8; 19 y demás pertinentes de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Guayaquil, 2 de octubre del 2023

JURADO AREVALO AARON MISAEL

C.I: 0925460347

Índice general

PORTADA.....	1
APROBACIÓN DEL TUTOR	2
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN	3
Dedicatoria.....	4
Agradecimiento	5
Autorización de autoría intelectual.....	6
Índice general	7
Índice de tablas	10
Índice de figuras.....	12
Resumen	14
Abstract.....	15
1. Introducción.....	16
1.1 Antecedentes del problema.....	16
1.2 Planteamiento y formulación del problema	17
1.2.1 Planteamiento del problema.....	17
1.2.2 Formulación del problema.....	17
1.3 Justificación de la investigación	17
1.4 Delimitación de la investigación	18
1.5 Objetivo general	18
1.6 Objetivos específicos.....	18
2. Marco teórico.....	20
2.1 Estado del arte.....	20
2.2 Bases teóricas	25
2.2.1 Métodos de inoculación.....	25

2.2.1.1. <i>Por suspensión</i>	26
2.2.1.2. <i>Por contacto o directa</i>	27
2.2.1.3. <i>Cribado en tubos de ensayo modificado (T4)</i>	27
2.2.3 Condiciones ambientales que provocan muerte regresiva en cacao...	29
2.2.4 Monitoreo del fruto de inoculación.....	31
2.2.5 Fungicidas	32
2.2.5.1. <i>Oxicloruro de cobre:</i>	33
2.2.5.2. <i>Azoxystrobin</i>	33
2.2.5.3 <i>Tebuconazole</i>	34
2.3 Marco legal.....	36
3. Materiales y métodos	38
3.1 Enfoque de la investigación	38
3.1.1 Tipo de investigación.....	38
3.1.2 Diseño de investigación	38
3.2 Metodología	38
3.2.1 Variables	38
3.2.1.1. <i>Variable independiente</i>	38
3.2.1.2. <i>Variable dependiente invitro</i>	39
3.2.1.3. <i>Variable dependiente invivo</i>	39
3.2.2 Tratamientos.....	39
3.2.3 Diseño experimental	40
3.2.4 Recolección de datos.....	40
3.2.4.1. <i>Recursos</i>	40
3.2.4.2. <i>Métodos y técnicas</i>	41
3.2.5 Análisis estadístico	42

4. Resultados	44
4.1 Identificación de las características morfológicas de <i>Lasiodiplodia</i>, <i>Botryosphaeria</i> y <i>Diplodia</i> a nivel <i>invitro</i>.	44
4.1.1 Crecimiento radial a nivel <i>invitro</i>.	44
4.1.2 Presencia de micelio.	44
4.1.3 Presencia de necrosis.	45
4.2 Estimar la sensibilidad de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>, <i>Botryosphaeria</i> <i>dothidea</i> y <i>Diplodia</i> frente a fungicidas.	46
4.2.1 Sensibilidad longitudinal a nivel <i>invitro</i>.	46
4.2.2 Sensibilidad de esporulación a nivel <i>invitro</i>.	48
4.2.3 Sensibilidad de necrosis a nivel <i>invitro</i>.	50
4.2.4 Promedio de crecimiento en cm² a nivel <i>invitro</i>.	52
4.2.5 Porcentaje de inhibición de crecimiento	54
4.3 Evaluar a nivel <i>invivo</i> el efecto del agente causal que presente un nivel de tolerancia a fungicidas.	57
4.3.1 Crecimiento del agente causal a nivel <i>invivo</i>.	57
5. Discusión	59
6. Conclusiones	62
7. Recomendaciones	63
8. Bibliografía	64
9. Anexos	72

Índice de tablas

Tabla 1. Descripción de los tratamientos	39
Tabla 2. Delimitación.....	40
Tabla 3. Combinación entre tratamientos y variables (AXB)	42
Tabla 4. Análisis de varianza (ANDEVA) ensayo invitro	43
Tabla 5. Longitud de crecimiento de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , <i>Botryosphaeria dothidea</i> y <i>Diplodia</i> en medios de cultivos envenenados con Oxiclورو de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole (5-15 días)	47
Tabla 6. Longitud decrecimiento de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , <i>Botryosphaeria dothidea</i> y <i>Diplodia</i> en medios de cultivos envenenados con Oxiclورو de cobre, Azoxystrobin y Tabuconazole (20-25 días)	48
Tabla 7. Crecimiento del micelio de <i>Lasiodiplodia theobromeae</i> , <i>Botryosphaeria dothidea</i> y <i>Diplodia</i> en medios de cultivos con Oxiclورو de cobre, Azoxystrobin y tabuconazole (5-15 días).....	49
Tabla 8. Crecimiento del micelio de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , <i>Botryosphaeria dothidea</i> y <i>Diplodia</i> en medios de cultivos envenenados con Oxiclورو de cobre, Azoxystrobin y Tabuconazole (20-25 días)	50
Tabla 9. Crecimiento de la necrosis en <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , <i>Botryosphaeria dothidea</i> y <i>Diplodia</i> en medios de cultivos envenenados con Oxiclورو de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole (5-15 días)	51
Tabla 10. Crecimiento de la necrosis en <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , <i>Botryosphaeria dothidea</i> y <i>Diplodia</i> en medios de cultivos envenenados con Oxiclورو de cobre, Azoxystrobin y Tabuconazole (20-25 días)	52

Tabla 11. Promedio de crecimiento en cm ² de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , <i>Botryosphaeria dothidea</i> y <i>Diplodia</i> en medios de cultivos envenenados con Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole (5-15 días)	53
Tabla 12. Promedio de crecimiento en cm ² de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , <i>Botryosphaeria dothidae</i> y <i>Diplodia</i> en medios de cultivos envenenados con Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole (20-25 días)	54
Tabla 13. Porcentaje de inhibición de crecimiento en <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , <i>Botryosphaeria dothidea</i> y <i>Diplodia</i> en medios de cultivos envenenados con Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole (5-15 días)	55
Tabla 14. Porcentaje de inhibición de crecimiento en <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , <i>Botryosphaeria dothidea</i> y <i>Diplodia</i> en medios de cultivos envenenados con Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole (20-25 días).	56
Tabla 15. Crecimiento del agente causal a nivel <i>invivo</i> en chupones de cacao (<i>Theobroma cacao L.</i>) con método preventivo en Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole (5-10 días).....	57

Índice de figuras

Figura 1. Diámetro de la esporulación en crecimiento	44
Figura 2. Diametro de la necrosis en crecimiento	46
Figura 3. Diseño experimental	72
Figura 4. Oxicloruro de cobre.....	72
Figura 5. Azoxystrobin.....	72
Figura 6. Tebuconazole	73
Figura 7. Preparación del medio de cultivo	73
Figura 8. Comportamiento morfológico de <i>Botryosphaeria</i> (6 días de evaluación)	73
Figura 9. Comportamiento morfológico <i>Lasiodiplodia</i> (6 días de evaluación) ...	73
Figura 10. Comportamiento morfológico en <i>Diplodia</i> (6 días de evaluación) ...	73
Figura 11. Dosificación del AGAR.....	73
Figura 12. Proceso de esterilización	74
Figura 13. Medios de cultivo envenenados.....	74
Figura 14. Clasificación de tratamientos	74
Figura 15. Inoculación de cepas en medios de cultivos envenenados.....	74
Figura 16. Evaluación microbiológica.....	74
Figura 17. Clasificación de muestras.....	74
Figura 18. Presencia de <i>Lasiodiplodia</i>	75
Figura 19. Presencia de <i>Lasiodiplodia</i> en tratamiento con oxicloruro de cobre; Error! Marcador no definido.	75
Figura 20. Preparación de los envases para tratamientos	75
Figura 21. Proceso de dosificación para envases de 50ml.....	75
Figura 22. Recolección de brotes jóvenes de cacao (<i>Theobroma cacao L.</i>)....	75

Figura 23. Clasificación de brotes para tratamientos mediante cinta de colores	75
Figura 24. Proceso de inoculación a nivel <i>in vivo</i>	76
Figura 25. Preparación de área para evaluación a nivel <i>in vivo</i>	76
Figura 26. Presencia de Oxidación en la unidad experimental T1 (<i>Lasiodiplodia</i> x oxiclورو de cobre) a los 10 días de evaluación.	76
Figura 27. Presencia de Oxidación en la unidad experimental T6 (<i>Botryosphaeria</i> x azoxystrobin) a los 10 días de evaluación.....	76
Figura 28. Presencia de Oxidación en la unidad experimental T3 (<i>Lasioidiplodia</i> x testigo absoluto) a los 10 días de evaluación.	77
Figura 29. Mejor tratamiento T3 (<i>Lasioidiplodia</i> x tebuconazole) no presentó oxidación a los 10 días de evaluación.....	77
Figura 30. Recopilación y clasificación de datos obtenidos en los 10 días de evaluación a nivel <i>in vivo</i>	77

Resumen

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Agraria del Ecuador campus Dr. Jacobo Bucaram Ortiz, el objetivo fue determinar el efecto del control antifúngico sobre la familia *Botryosphaeriaceae* en cultivo de cacao (*Theobroma cacao L.*) bajo condiciones controladas, para determinar el tratamiento que obtuvo mayor prevención se utilizó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con arreglo factorial (A*B) con doce tratamientos y cuatro repeticiones resultando 48 unidades experimentales a nivel *invitro* e *invivo*, en el control de los hongos: *Botryosphaeria*, *Lasidiopodia* y *Diplodia*, se procedió estudiar la morfología de cada cepa basada en catorce días de evaluación en donde se observó en medio de cultivo la presencia total de micelio y necrosis. Conociendo la morfología de las cepas se procedió a una evaluación a nivel *invitro* de medios de cultivos envenenados con los tres funguicidas: oxiclورو de cobre, azoxystrobin y tebuconazole, siendo tebuconazole el único funguicida que presento los mejores resultados redujo la actividad microbiológica a un 100% ya que afecta la pared celular a través de la inhibición del ergosterol impidiendo de que se cumpla el proceso de división celular y ruptura en el tejido celular. La evaluación a nivel *invivo* dio como resultado una similitud a la evaluación a nivel *invitro* demostrando que tebuconazole fue el funguicida que dio el mejor resultado, la regresión celular no se manifestó, a diferencia de los tratamientos que fueron con oxiclورو de cobre y azoxystrobin que presento oxidación que se expandía 1cm por día y finalmente no presento micelio.

Palabras claves: Inhibición, micelio, muerte regresiva, necrosis, ruptura celular.

Abstract

The present research was undertaken in the Biotechnology laboratory at Universidad Agraria del Ecuador campus Dr. Jacobo Bucaram Ortiz, the objective was to determine the effect of antifungal control on the Botryosphaeriaceae family in cocoa crops (*Theobroma cacao L.*), under controlled conditions, to determine the treatment that obtained greater prevention, a completely randomized block design (DBCA) with factorial arrangement (A*B) which was used with 12 treatments and 4 replications resulting in 48 experimental units at the invitro and invivo levels, in the control of the fungi: *Botryosphaeria*, *Lasidiopodia* and *Diplodia*, we proceeded to study the morphology of each strain based on 14 days of evaluation where the total presence of mycelium and necrosis was observed in the culture medium. Knowing the morphology of the strains, we proceeded to an evaluation at the invitro level of culture media poisoned with the three fungicides: copper oxychloride, azoxystrobin and tebuconazole, tebuconazole being the only fungicide that presented the best results, reducing the microbiological activity to 100% since it affects the cell wall through the innivision of the ergosterol, preventing the process of cell division and rupture in the cellular tissue. The invivo evaluation resulted in a similarity to the invitro evaluation showing that tebuconazole was the fungicide that gave the best result, cell regression was not manifested, unlike the treatments with copper oxychloride and azoxystrobin that presented oxidation that expanded 1 cm per day and finally did not present mycelium.

Key words: Regressive death, cellular rupture, mycelial innivision, necrosis.

1. Introducción

1.1 Antecedentes del problema

El cacao, una planta nativa de la Amazonía y que crece en regiones tropicales húmedas, es cultivado en Ecuador, donde alrededor de 100000 familias productoras (de las cuales el 80% son pequeños productores) se dedican a su producción. Se estima que hay más de 500000 hectáreas de cacao en sistemas forestales, y más del 80% de estas corresponden a variedades de cacao aromático.

Banco de Desarrollo de América Latina [CAF], (2017) En términos de producción a nivel continental, Brasil se destaca como el principal productor de cacao en el continente americano, contribuyendo con aproximadamente el 18% de la producción mundial. Le sigue Ecuador, con un aporte del 6%, mientras que Colombia y México contribuyen con el 1% cada uno. Se estima que más de 20 millones de personas dependen directamente de este cultivo en la región, y es importante destacar que el 90% de la producción proviene de minifundios, que son parcelas de menos de cinco hectáreas.

Moreira, Cedeño, Martínez, y Garcés (2021) ellos describen que *Lasiodiplodia theobromae*, es un hongo necrótrofo perteneciente al filo Ascomycota, que muestra diferentes colores durante su desarrollo en condiciones de laboratorio. Inicialmente, se observa un crecimiento micelial de color blanco, que posteriormente se vuelve de un tono cenizo oscuro y, finalmente, adquiere un aspecto negruzco.

Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de plagas (2018) demuestra una anomalía que el patógeno *Botryosphaeria dothidea* se caracteriza por atacar cultivos de manzanos, durazneros y cacao, la sintomatología que presenta este hongo en frutos, ramas y tallos son los canchales bien definidos en árboles jóvenes la caracterización de este patógeno son anomalías o protuberancias que se pueden ver a simple vista mediante el monitoreo científico. *Diplodia* es un hongo que ataca

principalmente a los árboles de cacao que no cuentan con vigor, es considerado como un patógeno débil, pero conlleva un gran número de hospedantes que con el tiempo logra afectar de manera destructiva.

1.2 Planteamiento y formulación del problema

1.2.1 Planteamiento del problema

La muerte regresiva de la planta de cacao (*Theobroma cacao L.*) es detectada de manera numerosa en los resultados por productores que se dedican a la actividad agrícola manifiestan que esta enfermedad en los últimos años ha ganado importancia logrando su presencia en varios países. Durante años para visualizar la morfología de los hongos que atacan al cultivo de cacao, se utiliza la técnica in vitro para poder detectar las anomalías que presentan los agentes patógenos, durante el tiempo de respuesta de ataque que ejerce el patógeno, se procede a utilizar la técnica in vivo, que ayuda a observar en campo el rango de afectación que el patógeno ejerce en el cultivo, lo que ayuda a observar de manera completa gracias a estas dos técnicas.

Debido a esta problemática del impacto fúngico, se estudiará el comportamiento de los patógenos desde su primer día de infestación hasta producir la muerte regresiva en las plantas de cacao.

1.2.2 Formulación del problema

¿Cuál será el resultado de los fungicidas seleccionados que combaten la muerte regresiva del cacao con sus respectivas dosis?

1.3 Justificación de la investigación

Este trabajo de investigación tuvo como finalidad la disminución del impacto fúngico que recibe el cultivo de cacao, hoy en día es muy común escuchar que cultivos de cacao se exponen a la necrosis que conlleva a su muerte regresiva. Las

dosis de los fungicidas seleccionados para este estudio se darán a conocer en el comportamiento que sobrelleva esta enfermedad. En el laboratorio de biotecnología de la Universidad Agraria del Ecuador se llevará a cabo el estudio de la aplicación de los fungicidas en el comportamiento de patógenos en las plantas infectadas por la necrosis. El objetivo de este análisis es obtener datos y a partir de ellos encontrar soluciones que puedan ayudar a los productores del cultivo de cacao.

1.4 Delimitación de la investigación

La delimitación del presente estudio determinará el espacio, el tiempo y las poblaciones agrícolas que se beneficiaran de los resultados obtenidos del proyecto.

- **Espacio:** Laboratorio de biotecnología de la Universidad Agraria del Ecuador.
- **Tiempo:** El trabajo de titulación se llevó a cabo durante un periodo de seis meses. desde enero hasta junio del año 2023.
- **Población:** Agricultores que se dedican a la producción de cacao, estudiantes de agronomía y asociaciones agrícolas de cacao.

1.5 Objetivo general

Determinar el efecto del control antifúngico sobre la familia *Botryosphaeriaceae* en cultivo de cacao (*Theobroma cacao L.*) bajo condiciones semicontroladas.

1.6 Objetivos específicos

Identificar las características morfológicas de *Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia* a nivel in vitro.

Estimar la sensibilidad de *Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia* frente a fungicidas.

Evaluar a nivel in vivo el efecto del agente causal que presente un nivel de tolerancia a fungicidas.

1.7 Hipótesis

De acuerdo al estudio del comportamiento de los patógenos se espera llegar a la solución de la muerte regresiva del cacao mediante los fungicidas seleccionados.

2. Marco teórico

2.1 Estado del arte

Durante los últimos tres o cuatro años, se ha registrado un aumento significativo de casos de esta enfermedad en las plantaciones comerciales de aguacate en el sur de España. Sin embargo, la muerte regresiva no es exclusiva de esta especie en particular, sino que afecta a la mayoría de las especies de plantas leñosas que se han investigado, y no se limita únicamente a nuestro clima y ubicación geográfica (España, 2022).

Núñez (2012), menciona que los síntomas característicos de la muerte regresiva causada por *Botryosphaeria* spp. Incluyen necrosis o lesiones localizadas, manchas oscuras en la madera, manifestaciones en las hojas y la supresión del crecimiento de brotes. En el pasado, esta enfermedad solía ser confundida con otros trastornos y no se le consideraba una enfermedad relevante.

Los árboles afectados experimentan un declive progresivo y sufren un deterioro rápido, lo que puede resultar en la muerte del árbol en un período que varía desde unos pocos meses hasta dos o tres años. En las etapas tempranas del problema, las raicillas sufren un deterioro y descomposición, lo que dificulta encontrar raíces normales en los árboles enfermos (Bastidas, 2019, p.1).

La muerte regresiva Eutypa es el resultado del daño causado por una enfermedad fúngica llamada *Eutypa lata*, que afecta principalmente las partes leñosas de las plantas de vid. Esta enfermedad suele ser más común en vides maduras, con una edad de más de 8 años (Smith, 2019).¹ Se observó la presencia de síntomas como necrosis en las ramas apicales, gomosis, pudrición de raíces y corona, y muerte de las plantas en árboles frutales de cacao blanco de Piura. Mediante la caracterización morfológica y pruebas de

patogenicidad, se pudo identificar a *Phytophthora palmivora* como el agente causal de esta enfermedad (Aguilar, Carrasco, Morales, Yovera, y Maldonado, 2020, p.187-192).

La mayoría de los árboles cultivados en una extensión de 60 hectáreas presentaban síntomas de muerte regresiva en las ramas, y un número significativo mostraba cáncer en el tronco. Debido a la gravedad del daño, se tomaron muestras para determinar la identidad del o los patógenos involucrados. Se obtuvieron secciones de tejido enfermo de ramas y troncos, algunos de los cuales se utilizaron para realizar aislamientos en medios de cultivo, mientras que otros fueron incubados en una cámara húmeda (Cedeño y Carrero, 2018, p.1-9).

En un estudio publicado en el 2019, que trata sobre la muerte repentina de *Theobroma cacao* L. causado por *Verticillium dahliae* Kleb. En el Perú y su biocontrol *in vitro*, se genera una respuesta con respecto a la problemática investigativa.

Los metabolitos extraídos de los aislamientos de *Trichoderma* endofítico en caldo cps mostraron un mayor efecto en la inhibición del crecimiento micelial de *V. dahliae*. El aislamiento TE-91, tanto en minutos (min) como en cps, demostró una excelente capacidad de biocontrol *in vitro* al inhibir por completo el crecimiento micelial de *V. dahliae*. Le siguieron TE-17 y TE-126, obtenidos en cps y cem, respectivamente, que también mostraron una buena capacidad de inhibición (León, Enrique, y Bouchon, 2019, p.117-148).

Las micotoxinas son compuestos tóxicos producidos por ciertas cepas de hongos como resultado de su infestación en productos agrícolas, como cereales y frutos secos, durante la etapa final de su crecimiento. Según la FAO,

aproximadamente el 25% de las cosechas de granos a nivel mundial se ven afectadas por hongos que producen toxinas (Raíz , 2016).

Los hongos que son comunes atacan a cultivos como el cacao, maíz, frejol, en campos agrícolas y lugares de almacenamiento, se encuentran los géneros de hongos *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, los cuales tienen la capacidad de producir micotoxinas. El crecimiento del hongo *Aspergillus* y la contaminación de alimentos con aflatoxinas son consecuencia de la interacción entre el hongo, el hospedero y el entorno (Martínez , Hernández , Reyes, y Vásquez , 2013).

La ocratoxina A (OTA) es una toxina que se produce principalmente por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Esta toxina presenta propiedades nefrotóxicas, inmunotóxicas, teratogénicas y carcinogénicas. Además, afecta a varios cultivos, incluyendo el cacao (Ramos et al, 2018).

La presencia de moho verde en su mayoría de ocasiones es inevitable en el sector campo debido a los contaminantes ambientales que existen alrededor del perímetro, este hongo es la principal causa de podredumbres en poscosecha (Panozzo, Almirón , Bello, y Vásquez , 2018).

Estudios sobre la biota que colonizan los sedimentos indican que las comunidades microbianas bentónicas están dominadas por cianobacterias, y microalgas como las diatomeas (Cuadrado y Blasi, 2017).

Las variaciones en la disponibilidad de nutrientes tienen implicaciones significativas en la determinación de los requisitos nutricionales y su relación con la contaminación ambiental. Las propiedades biológicas del suelo son de vital importancia para comprender los cambios que ocurren debido a la deposición de residuos en la superficie del suelo (Abril, Salas, Lovera, Kopp, y Murillo, 2005).

La selección de cultivares y líneas de *Theobroma cacao L.* con tolerancia al estrés abiótico se ha centrado principalmente en la evaluación en condiciones de cultivo in vitro. Para identificar características deseables, se han utilizado indicadores de selección como la pérdida de electrolitos y la liberación de fosfato inorgánico en tejido foliar en respuesta al estrés causado por altas temperaturas (Ramírez, et al. 2019).

En laboratorios que se dedican a diagnosticar el comportamiento microbiano de bacterias y hongos la técnica de RAPDs (ADN Polimórfico Amplificado al Azar) es ampliamente utilizada y altamente eficiente para detectar variaciones genéticas tanto en plantas regeneradas in vitro como en estudios de diversidad genética entre diferentes variedades de la misma especie vegetal (Oropeza, Vargas, y Ramírez , 2006).

Los microorganismos de relevancia agrícola desempeñan un papel crucial en la promoción del desarrollo integrado de prácticas agrícolas, como la gestión de nutrientes, enfermedades y plagas. Esta estrategia ecológica tiene como objetivo reducir la dependencia de productos químicos en la agricultura y mejorar el rendimiento de los cultivos (Álvarez, Tucta, Quispe, y Meza, 2018).

Los principales combatientes para las amenazas agronómicas son los métodos preventivos Para prevenir la presencia de hongos que causan infecciones en las plantas, es importante tener en cuenta que algunos de estos hongos son parásitos facultativos que se encuentran en el suelo. Estos hongos pueden causar enfermedades altamente destructivas, principalmente afectando las raíces de las plantas. Sin embargo, en condiciones de suelo muy húmedo, también pueden afectar las hojas, tallos, frutos, semillas, así como las cortezas y la madera central de los árboles (Alcalá, Vargas, y Pire, 2005).

La micropropagación y la propagación vegetativa ofrecen la posibilidad de utilizar técnicas de selección y mejora de plantas, aprovechando las características deseables a través de la selección clonal. Las características que pueden mejorarse cubren un amplio rango de posibilidades de presencia de hongos dañinos para el cultivo (Hernández y González, 2010).

El cultivo celular in vitro se realiza utilizando diferentes estrategias, siendo las más destacadas el método del explante y el método de disgregación mediante técnicas enzimáticas o mecánicas. El método del explante implica la inoculación y mantenimiento de fragmentos pequeños de tejido vivo sin desintegrar, donde el crecimiento se limita a la migración y, ocasionalmente, a la proliferación celular en los bordes del explante (Castro, et al. 2015).

El cacao tradicional es un recurso genético local que posee características morfológicas y genéticas que aún se conocen de manera limitada. Su presencia en áreas aisladas, donde se le presta poca atención en términos de cuidados culturales, sugiere que puede tener resistencia a factores bióticos y abióticos del entorno. Además, las semillas blancas de algunas plantas tienen un valor especial por ser altamente valoradas en el mercado internacional (Martínez, et al. 2021).

Se llevó a cabo la poda en los árboles de cacao en etapa de producción con el objetivo de estimular el desarrollo de nuevas yemas y renovar el sistema fotosintético de la planta. Esto se hizo con la intención de lograr un equilibrio entre el crecimiento vegetativo y reproductivo, buscando así incrementar la productividad y la calidad del grano. Durante la práctica, se eliminaron ramas sombreadas, entrecruzadas, viejas, enfermas y secas, con el fin de prolongar la vida útil del árbol, aumentar su rendimiento biológico y mejorar su capacidad productiva (Gutiérrez, Leiva, y Ramírez , 2019).

El azoxystrobin es un fungicida que pertenece al grupo químico Metoxi-acrilatos. Inhibe la respiración mitocondrial en las células de los patógenos. Detiene la transferencia de electrones entre el citocromo b al c1, en el sitio de oxidación del ubiquinol, causando la no formación de ATP, energía para el trabajo celular en el complejo III del citocromo bc1. Puede ser transportado acropetalmente y de forma translaminar dentro de las hojas (Alburquerque y Mata, 2018).

2.2 Bases teóricas

La inoculación es una técnica utilizada para promover la adhesión de bacterias fijadoras de nitrógeno a la superficie de las semillas, con el objetivo de mejorar el sistema radicular de las plantas y permitir una mayor fijación de nitrógeno. Esta práctica puede resultar en un aumento de los rendimientos, aunque no es ampliamente adoptada por los productores debido a diversas circunstancias.

2.2.1 Métodos de inoculación

Los microorganismos constan de una gran variabilidad de formas de introducción de un patógeno u organismo que cause una reacción positiva a determinadas partes de la planta (estos pueden ser sus raíces, tallos, hojas, flores) al igual que para las semillas, tierra o sustratos de cultivo. Mientras que (Martínez, 2020) menciona que la inoculación es una técnica que tiene como objetivo facilitar la adhesión de bacterias fijadoras de nitrógeno a la superficie de las semillas. Esto se hace con el propósito de promover el desarrollo de un sistema radicular más eficiente en las plantas, permitiéndoles fijar el nitrógeno necesario para su crecimiento.

La selección de inoculantes efectivos plantea un desafío significativo en términos de elegir los microorganismos adecuados que han sido aislados. La capacidad de adaptación al entorno en el que son introducidos puede ser un obstáculo para su

uso en la agricultura, lo que podría explicar la baja eficacia del tratamiento inoculado que utiliza la mezcla de los tres microorganismos en las variables analizadas, posiblemente debido a la inhibición mutua entre ellos (Soteldo, Jiménez, De Zan, y Cueto, 2012, p.21-31).

Según Ferlini (2008) la aplicación de hongos y/o bacterias a semillas de diferentes cultivos, técnica conocida como inoculación, es ampliamente conocida en la familia de las leguminosas (alfalfa, soja, tréboles, etc.) (p.16-20). El proceso que con lleva La inoculación de bacterias endófitas provocó alteraciones morfológicas que contribuyen a mitigar el estrés. El análisis morfométrico realizado mediante cortes histológicos reveló que la inoculación bacteriana induce cambios en la estructura que pueden favorecer una mejor adaptación a condiciones de pre-aclimatación (Pérez, 2017).

Desde los años 80, las publicaciones científicas han demostrado que las cepas autóctonas o nativas suelen ser las más competitivas, pero no necesariamente las más eficientes, es decir, las que llevarán a la planta a producir más biomasa, el propósito de la inoculación es introducir cepas competitivas y eficientes para asegurar que el cultivo cuente con los mejores aliados (Rauglaudre, 2022).

2.2.1.1. Por suspensión

La inoculación de medios de cultivo y la manipulación de cultivos microbianos deben de realizarse dentro un laboratorio de microbiología, de forma sencilla se trata de procedimientos importantes que deben realizarse teniendo presente algunas precauciones con el fin de evitar una contaminación proveniente de la preparación que se está generando. Para un mejor entendimiento acerca de este tipo de inoculación, lo explica Ortega et al. (2010) de tal forma que En el caso de la suspensión, se llevó a cabo una incisión (herida) en las hojas

utilizando una aguja de disección esterilizada, donde se aplicaron alrededor de 0.5 mL de la suspensión de esporas de uredinios. (p.17).

2.2.1.2. Por contacto o directa

También conocida como Osteomielitis contigua, causada por contacto directo entre el tejido y las bacterias durante la provocación de un traumatismo, esto le dará paso a una infección ubicada en el hueso secundario a la inoculación directa, o tras la cirugía por la diseminación de un foco contiguo de infección o sepsis después de la intervención. Se explica el procedimiento según (Revista Chapingo, 2010) En el método de inoculación por contacto, se aplicaron trozos de hojas con heridas mediante la frotación de hisopos esterilizados impregnados con una solución de esporas de uredinios.

2.2.1.3. Cribado en tubos de ensayo modificado (T4)

El proceso de cribado es una etapa inicial en el tratamiento de aguas residuales, generalmente llevada a cabo en una instalación ubicada al principio del sistema, con el propósito de eliminar objetos de gran tamaño presentes en el agua residual que podrían causar problemas en los equipos y procesos posteriores (Koei, 2011, p.11).

La operación de cribado es la primera etapa esencial en una planta de tratamiento de aguas, diseñada para eliminar los contaminantes más grandes presentes en el agua residual, tanto los que flotan como los que están suspendidos. La eficiencia de remoción se clasifica según el nivel de tratamiento: el tratamiento primario remueve alrededor del 5% de los contaminantes, el tratamiento secundario logra una remoción de entre el 30% y el 50%, y el tratamiento terciario o avanzado puede alcanzar una remoción de entre el 80% y el 95% (Ramón, 2014).

El cual método comprende: proporcionar una población de plantas o partes de las plantas entre la población; incubar las plantas o partes de las plantas que tienen una superficie herida creada sobre las mismas en un entorno acuoso para permitir que tenga lugar la decoloración en ellas o sobre ellas; observar la decoloración en las plantas o sobre las plantas o partes de las plantas; comparar la decoloración observada con la decoloración que se observa en la planta o parte de la plantatestigo para identificar las plantas o partes de las plantas que no muestran decoloración (De Elzaburu, 2017).

Para explicar de una mejor manera la implementación de este método de inoculación se hará referencia a un experimento en plántulas de maracuyá.

Se emplearon plántulas de *P. edulis* f. *flavicarpa* con dos hojas verdaderas, las cuales tenían aproximadamente tres semanas desde la siembra. En tubos de ensayo de boquilla lisa se agregaron 10 mL de agua. A continuación, se colocó una sección del aislamiento en medio de cultivo PDA en contacto directo con el cuello de la raíz de la plántula y se selló el tubo con algodón y papel de aluminio. En el grupo de control, se utilizó PDA estéril sobre el cuello de la raíz. Este método se propuso originalmente para llevar a cabo pruebas de cribado en plántulas de trébol. (García, Robledo, Castaña, 2018).

2.2.2 Edad de las plantas de cacao infectadas por muerte regresiva

Estudios recientes citan a especies del género *Lasiodiplodia* causando enfermedades en el trópico en cultivos importantes como cacao (*Theobroma cacao* L.) se reporta la existencia de tres especies pertenecientes al género *Lasiodiplodia* (*L. theobromae*, *L. citricola* y *L. pseudotheobromae*) que están asociadas con la aparición de síntomas de gomosis, muerte progresiva de ramas y, en casos más severos, la muerte completa de los árboles afectados (De la Paz, et al. 2020).

El hongo patógeno puede provocar la muerte de ramas jóvenes, lo cual es un síntoma característico que se observa en el campo. Además, puede ocasionar la pudrición y momificación de los frutos, e incluso llevar a la muerte regresiva de la planta. El manejo de los patógenos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae es complicado, especialmente cuando el patógeno ya está presente en el área de cultivo. Sin embargo, existen diversas medidas de control, como el control genético, cultural, biológico y químico, entre otras, que pueden ser integradas y utilizadas en el cultivo del cacao (Moreira, Cedeño, Martínez, y Garcés, 2021, p. 653-662).

En los otros casos se presentaban plantas enfermas, pero no constituían causa de alarma para los viveristas. Los hongos aislados del vivero “con problemas” resultaron no ser patogénicos, y su entrada en las plántulas fue como oportunistas debido al inadecuado manejo del sustrato (Universidad Estatal de Milagro, 2017).

El hongo *L. theobromae* tiene la capacidad de infectar a lo largo de todo el año. La fuente inicial de inóculo son las mazorcas enfermas y momificadas que permanecen en la planta. A partir de estas mazorcas, los conidios del hongo se dispersan mediante el viento, el agua, los implementos de trabajo o los insectos perforadores del tronco. Los conidios ingresan a la planta a través de heridas, lo que puede resultar en la muerte de ramas o incluso de la planta completa en un lapso aproximado de tres meses, dependiendo del punto de infección y la susceptibilidad de la planta (Morrillo, Cedeño, Martínez, y Garcés, 2021).

2.2.3 Condiciones ambientales que provocan muerte regresiva en cacao

Con el fin de anticipar la vulnerabilidad de las especies frente al aumento de la aridez pronosticado por los modelos climáticos, se están llevando a cabo investigaciones. Los efectos de este aumento en la aridez ya se están observando en numerosos bosques de diversas regiones del mundo factor secundario que

provoca muerte regresiva en cultivos leñosos. En nuestra área específica, el pino rojo es una de las especies que está experimentando un impacto significativo, especialmente en relación con períodos de sequía intensa (Martínez, 2010).

Un tercer problema que genera preocupación entre los productores de cacao es la muerte prematura de las mazorcas conocida comúnmente como "cherelle wilt" la cual provoca una caída de frutos. Las causas de este problema son aún desconocidas, aunque algunos investigadores lo asocian con el estado nutricional de la planta (Toala, Ventura, Alvarado, Castro, y Otiniano, 2019).

La evaluación de la densidad y transparencia de las copas de los árboles proporcionó una visión general de los porcentajes de biomasa presentes en ellas. Además, se identificaron árboles con declinación prematura mediante la observación de la muerte regresiva. En términos generales, la salud de los árboles en este bosque urbano se calificó como variable, ya que se observaron altas proporciones de copa viva, bajas densidades de copa y altas transparencias de copa (Bosques, 2016)

El porcentaje de muerte regresiva no tiene en cuenta la caída natural de ramas debido a la competencia por luz en la parte inferior de la corona. Sin embargo, se considera la muerte de ramas en los lados y en la parte superior de la corona debido a la sombra de edificios u otros árboles (De la Concha, 2016, p.8-41).

La vía más común de infección conocida se da mediante esporas, las cuales tienen la capacidad de nadar (por así decirlo), estas se activan cuando hay la cantidad suficiente de humedad y se da dentro de un periodo de baja temperatura seguido por otro caliente, casi de manera inmediata, ante el cambio drástico de temperatura. Las esporas son transportadas de una mejor manera por la lluvia, el fuerte viento, por animales como las hormigas, entre otros elementos de menor

repercusión. Cabe recalcar que el contacto de forma directa entre los frutos sanos y enfermos también es una vía real de contagio.

2.2.4 Monitoreo del fruto de inoculación

En los tratamientos de decapitación e inyección con la bacteria del género *Xanthomonas* spp, se observa un ligero incremento en el pH de la savia, superando el rango establecido, al igual que en el tratamiento de inyección combinada con *Erwinia* spp. Por otro lado, los métodos de punción y filtración no mostraron un efecto significativo en las variables medidas, y el género *Ralstonia* spp tuvo un impacto mínimo. El tratamiento de decapitación, cuando se combinó con todos los géneros de bacterias, mostró un mayor impacto en el daño del fruto. Este método resultó ser más invasivo para la inoculación de bacterias (De la Cruz y Pineda, 2022, p.50).

No se observaron síntomas en los frutos a los 20 días después de la inoculación en todas las edades evaluadas. Sin embargo, a los 40 días después de la inoculación, se manifestaron síntomas en las edades de 20, 40, 60, 100, 120 y 160. Finalmente, a los 60 días después de la inoculación, todas las edades mostraron síntomas tanto internos como externos de severidad. Entre los 18 genotipos estudiados, se identificó que el genotipo Indes-31 no presentó síntomas de moniliasis, lo que sugiere que podría poseer resistencia genética potencial frente a esta enfermedad (Tapia , 2021).

La inoculación se lleva a cabo mediante la colocación de una conidia simple en la superficie de un fruto inmaduro. Después de la germinación de la conidia, se forma una estructura adhesiva plana llamada apresorio, que se origina a partir de la cual se desarrolla una hifa puntiaguda que atraviesa la capa protectora de la célula epidérmica del huésped. El apresorio contiene una capa interna de melanina y tiene

una permeabilidad selectiva al agua, lo que significa que permite la entrada de agua pero no su salida. (RedAgricola, 2018).

2.2.5 Fungicidas

Se trata de un tratamiento de tipo plaguicida, el cual tiene una función específica, en donde, se enfoca de controlar los hongos que están en la posición de causar alguna enfermedad. Teniendo toda esta informacio en cuenta, antes de su aplicación es realmente importante asegurar que los síntomas presentados por parte de los cultivos presentes encajan con la acción de este tipo determinado de organismos.

Si se habla acerca de un control químico en el cultivo, se lo aplica cuando resulta ser el último recurso a usar, si los demás controles empleados no han sido suficientes para lograr el cometido, de preferencia los agricultores optan por utilizar productos poco tóxicos y selectivos, con el fin de no perjudicar el medio ambiente ni tampoco su producción. Un ejemplo sería la aplicación de oxiclورو de cobre para el control de escoba de bruja. Los fungicidas se clasifican dependiendo principalmente de la concentración de sustancias químicas dentro de su composición.

Los fungicidas se dividen en dos categorías principales: los protectantes y los sistémicos. Los fungicidas protectantes actúan formando una barrera física en la superficie de la planta, impidiendo que las esporas de los hongos se adhieran y penetren en ella. Por otro lado, los fungicidas sistémicos están diseñados para ingresar a la planta y combatir los hongos desde su interior. (Inestroza, 2017).

Los fungicidas son pesticidas que matan o previenen el crecimiento de hongos y sus esporas, los cuales deben eliminarse ya que pueden llegar a dañar o matar todo tu cultivo. También suelen usarse para controlar el moho y los hongos en otros

entornos. Los fungicidas funcionan de diversas formas, pero la mayoría dañan las membranas celulares de los hongos o interfieren con su reproducción (BasicFarm, 2020, p.2).

Las enfermedades de los frutos en la postcosecha pueden significar pérdidas económicas para los productores. Como hemos visto, la mayoría de estas patologías se eliminan o previenen con la aplicación de fungicidas que actúan contra los microorganismos patógenos, los tratamientos con fungicidas químicos de síntesis son los más habituales en estos casos (Decco, 2019, p.5).

2.2.5.1. Oxiclورو de cobre:

El Oxiclورو de cobre ($\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$) un producto autorizado en agricultura ecológica. En pocas palabras se trata de una sustancia sólida y cristalina verde oscura, la cual se extrae de forma natural mediante yacimientos. Según (Agromática, 2022) el oxiclورو de cobre también tiene una actividad fungicida y también se utiliza para complementar la alimentación de animales.

La etapa de acción del cobre toma un comienzo con la germinación de las esporas propias de los hongos, de ahí que su acción esté limitada a prevenir la aparición de enfermedades de origen fúngico. Según (PortalFruticola, 2019) el modo de actuación es simple, diversos hongos en sus fases iniciales son incapaces de crecer o reproducirse cuando el contenido en Cu está por encima de un determinado nivel (2 o 3 ppm, por ejemplo).

2.2.5.2. Azoxystrobin

Es un fungicida sistémico con actividad translaminar, efecto preventivo y curativo y traslocación acrópeta lenta pero presenta una distribución uniforme en lo que concierne toda la hoja, también se deriva del ácido β -metoxiacrílico.

Diversos estudios han demostrado que estos productos se enlazan en un determinado punto en los citocromos b. Según (Labraris, 2021) No existen fungicidas convencionales que posean la capacidad de eliminar las resistencias cruzadas entre los metoxiacrilatos y otras clases de fungicidas. Estos fungicidas son eficaces para controlar cepas de hongos patógenos que han desarrollado resistencia a los inhibidores de la enzima 14-desmetilasa, como los bencimidazoles, dicarboximidias y fenilamidias. (p.1-2).

En el agua, en oscuridad, se considera estable pero se fotodegrada con la luz con una vida media de 11-17 días. Es capaz de degradarse de forma muy rápida dado a los microorganismos provenientes del suelo con una vida media entre 3 y 39 días y se fotodegrada, Además, en el suelo, los metabolitos experimentan una degradación rápida, con una vida media total de 11 días. Esto implica que los metabolitos se someten a una descomposición rápida y se transforman en dióxido de carbono (CO₂). Lo que quiere decir que su potencial de lixiviación es de medio a bajo. Por lo tanto no es volátil y es moderadamente persistente en el suelo, vida media 72-164 días.

Amistar es un fungicida que contiene Azoxistrobin, un compuesto de estrobilurina conocido por su eficacia y amplio espectro de acción contra enfermedades que afectan a diversas plantas como tomate, pimiento, lechuga, pepino, fresa, frambueso, caqui, guisantes, patata y otros cultivos. (Syngenta, 2022).

2.2.5.3 Tebuconazole

Es un fungicida con acción sistémica y protectante y curativa y erradicante. Destruye las membranas celulares de los hongos, en las que la estructura y función de los esteroides (especialmente ergosterol) juegan un papel importante. Los

Triazoles actúan como inhibidores de la biosíntesis de los esteroides y este proceso está relacionado con alteraciones de las membranas celulares (Tifon, 2018).

Uno de los principales fungicidas sistemáticos más usados encontramos de forma aislada al tebuconazole debido a su acción de eliminar hongos de manera eficaz, comprobado en medios de cultivos que sirvieron como observación para medir el grado de efectividad ante agentes fúngicos (Moreira A. , Cedeño, Canchignia, y Fiallos, 2021).

2.3 Marco legal

Texto unificado de legislación secundaria del MAG, libro i

Art. 6.- Para importar material vegetal con fines de investigación, el Gobierno Nacional, universidades y escuelas politécnicas, estaciones experimentales, e instituciones del sector privado u organismos internacionales, deberán cumplir con los requisitos previstos en el artículo anterior.

Art. 7.- El Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria - SESA, a través de la División de Inspección, Certificación y Control Cuarentenario, estudiará la información contenida en las solicitudes de importación, pudiendo establecer requisitos, restricciones o prohibiciones a la importación parcial o total del material vegetal, con sujeción a la ley y convenios fitosanitarios internacionales.

Art. 10.- No se permitirá la nacionalización del material vegetal, en cualquiera de sus formas, que presente daños por ataque de plagas o se haya detectado la presencia de agentes causales exóticos.

Art. 11.- Si el producto importado es perecible, los inspectores de Cuarentena Vegetal y de Aduanas, darán atención preferente al trámite y despacho del embarque.

Art. 12.- Las medidas fitosanitarias que el Ecuador se obligue a tomar en defensa de sus intereses y que involucren rechazo o destrucción del material vegetal importado, serán comunicados al Servicio Nacional de Sanidad Vegetal del país exportador (Texto unificado de legislación secundaria del mag, libro1, 2010, p.3).

Art. 18.- Las personas que lleguen al país por vía aérea, marítima o terrestre, portando en su equipaje material vegetal, debe hacer las declaraciones respectivas ante el Inspector de Cuarentena Vegetal, quien puede permitir su ingreso al tratarse de productos industrializados, en perfecto estado fitosanitario. En los casos de semilla o material de propagación, en ausencia del certificado fitosanitario del país de origen, se procederá de acuerdo a lo que establece el artículo 30 de la Ley de Sanidad Vegetal.

Art. 19.- Todo material vegetal destinado a la propagación, a más de cumplir con lo establecido en el presente título, requiere que en el certificado fitosanitario del país de origen consten los productos químicos y dosis utilizadas en el tratamiento de desinfección y desinfestación.

Art. 20.- Los cónsules o embajadores ecuatorianos en los lugares de embarque, así como los organismos oficiales que laboran en los puertos aéreos, marítimos y terrestres, están en la obligación de colaborar en el cumplimiento de estas disposiciones.

Art. 21.- Toda importación de productos, subproductos, semillas, plantas, yemas, bulbos y cualquier otro material de propagación que no haya cumplido los requisitos establecidos para su introducción al país, se considerará como contrabando, debiendo el personal de la Corporación Aduanera Ecuatoriana del respectivo puerto de embarque, proceder a su decomiso e informar al Ministerio de Agricultura y Ganadería, para que por medio del personal de inspectores de Cuarentena Vegetal del Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria - SESA, se levante el acta de destrucción, aparte de la imposición de la multa correspondiente al infractor.

Art. 22.- El material vegetal, productos y subproductos en tránsito serán inspeccionados de oficio y solo en casos de encontrarse infectados o infestados, para evitar contagio de los lugares por los que atraviere el país, se adoptarán

las medidas de tratamiento y seguridad, establecidas en el manual de procedimiento respectivo.

Art. 23.- El Ministerio de Agricultura y Ganadería, a través del Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria - SESA, prohibirá la importación de material vegetal proveniente de países o áreas donde existen plagas que constituyen un peligro potencial para los cultivos agrícolas (Texto unificado de legislación secundaria del mag, libro1, 2010, p.4).

Art. 27.- En caso de introducir al país material vegetal para ferias, exposiciones internacionales sin fines de propagación, es necesario que se cumpla con los requisitos básicos establecidos para la importación de productos y material vegetal.

Art. 28.- El comercio doméstico de productos vegetales destinados al consumo de las ciudades fronterizas, cuyo ingreso o salida no fuese prohibido o condicionado por regulaciones internas o convenios internacionales, no requerirá cumplir con la exigencia del certificado fitosanitario, si el caso amerita se realizará una inspección fitosanitaria.

3. Materiales y métodos

3.1 Enfoque de la investigación

El presente proyecto tiene un enfoque investigativo de campo y laboratorio donde se observa la forma de afectación que ejercen los *patógenos Lasidoplotia theobromae, Botryosphaeria Dothidea y Diplodia* que causan la muerte regresiva en el cultivo de cacao. Este estudio se caracterizó en visualizar cuál de los cinco fungicidas tiene mayor eficacia y cual patógeno presento mayor resistencia a los tratamientos con los respectivos fungicidas.

3.1.1 Tipo de investigación

El presente ensayo está formado por los siguientes tipos de investigación:

- Investigación experimental: Se trabajó con las variables dependientes e independientes para visualizar los resultados del comportamiento de los patógenos al momento de su inoculación.
- Investigación aplicada: Se realizó la respectiva aplicación de fungicidas para observar la resistencia y afectación de los patógenos.

3.1.2 Diseño de investigación

Este proyecto tuvo un enfoque en la investigación experimental, el cual consiste en identificar cuál de los cinco fungicidas otorgara de manera preventiva un mejor efecto frente a los patógenos que provocan la muerte regresiva.

3.2 Metodología

3.2.1 Variables

3.2.1.1. Variable independiente

Modo de acción de los fungicidas Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin, Tebuconazole, para la muerte regresiva del cacao causada por los hongos

Lasiodiplodia theobromae, *Botryosphaeria Dothidea* y *Diplodia*, realizado bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*.

3.2.1.2. Variable dependiente invitro

3.2.1.2.1. %PIC (Porcentaje de inhibición de crecimiento).

Formula que se utilizó para poder evaluar el porcentaje de inhibición de crecimiento radial, a través de la fórmula de Ezziyani: $R1-R2/R1 \times 100$

3.2.1.2.2. Área de crecimiento

Se evaluó el comportamiento de la necrosis mediante el tiempo de infección causado por los patógenos.

3.2.1.3. Variable dependiente invivo

3.2.1.3.1. Área de necrosis (cm²)

Se realizó la medición con la ayuda de un calibrador, de tal forma que se evaluará el área afectada por necrosis.

3.2.1.3.2. Supervivencia (%)

Se evaluó la cantidad de brotes que resistieron a los patógenos atacantes.

3.2.1.3.3. Mortalidad (%)

Se evaluó la cantidad de brotes que murieron por los patógenos atacantes.

3.2.2 Tratamientos

Tabla 1. Descripción de los tratamientos

No.	Tratamientos	Descripción	Dosis		Frecuencia de Aplicación (Días)
			Ha	Parcela	
1	Oxicloruro de cobre	Funguicida	5kg/Ha	10 g /L	1 aplicación por mes
2	Azoxystrobin	Funguicida	1.5 l/Ha	7.5 cc/L	1 aplicación por mes
3	Tebuconazole	Funguicida	2.7 kg/Ha	135 g/L	1 aplicación por mes
4	Testigo absoluto	—————	—————	—————	—————

Jurado, 2023

3.2.3 Diseño experimental

Para llevar a cabo este estudio se desarrolló 2 experimentos subsecuentes. En los dos casos, se tendrán dos factores de estudio el primero comprenderán 3 hongos de una misma familia y el segundo, 3 alternativas de control; adicionando un nivel testigo para estos últimos. Estos dos experimentos considerando el ambiente dentro el cual se llevó a efecto, se realizó bajo un diseño completamente al azar (DCA) integrado por 12 combinaciones (tratamientos) de los factores antes indicados. Cabe indicar que el primer experimento, la unidad experimental estuvo representado por una caja Petri; mientras que en el segundo, por un brote joven de cacao. En el primer ensayo se utilizaron 5 repeticiones y en el segundo 4 repeticiones.

Tabla 2. Delimitación

Número de tratamientos	4
Número de repeticiones	4
Ancho de parcela (m)	0,40
Espacio entre plantas (cm)	0,35
Número total de plantas del ensayo	48
Área total del ensayo (m ²)	35

Jurado, 2023

3.2.4 Recolección de datos

3.2.4.1. Recursos

- **Recursos bibliográficos:** Para tener conocimiento del comportamiento de los patógenos, se usó en el presente proyecto: tesis de grado, informes técnicos, revistas científicas, libros digitales y sitios web.

- **Materiales y equipos:** Este ensayo fue experimental y se lo llevo a cabo dentro del el área del laboratorio de tal forma que se usaron los siguientes instrumentos: cuaderno, esferos, lápiz, borrador, calibrador, envases dosificadores de 50ml, agujas esterilizadas, mecheros, cajas Petri, laptop, pendrive, impresora, celular.

- **Ubicación geográfica:** El presente estudio tuvo su localidad en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Agraria del Ecuador campus Dr. Jacobo Bucaram Ortiz en la provincia del Guayas.

3.2.4.2. Métodos y técnicas

3.2.4.2.1. Método inductivo

Este método nos permitió observar los resultados que se verificaron de la conclusión con la hipótesis planteada.

- Preparación de los bloques: Se montaron tres bloques para el experimento, cada bloque incluyo una cepa en estudio con los respectivos fungicidas para la aplicación.

- Ubicación de las plantas: Cada brote tuvo una distancia de 10 cm ubicadas en sus respectivos bloques.

- Distintivo visual de los tratamientos: Se usaron cintas de colores para identificar los tratamientos.

- Aplicación de fungicidas: de forma preventiva; preparación con envases de 50ml, se diluirá los fungicidas según los tratamientos en agua destilada estéril, luego se atomizara el producto en las plantas de cacao.

- Preparación de esporas para la inoculación: En él laboratorio de fitopatología se preparó colonias de los agentes causales que provocan la muerte regresiva para el ensayo in vivo.

- **Inoculación:** Se inocularon las plantas previamente esterilizadas con el método de contacto utilizando una aguja estéril con esporas siguiendo el protocolo de provocar un trauma con el material estéril en el tallo, luego la frotación con hisopos esterilizados humedecidos con urediniosporas.

3.2.5 Análisis estadístico

Programa que se utilizó: el software INFOSTAT se usó para obtener el análisis estadístico y para comparar resultados se realizó la prueba de Tukey (5% de significancia), todos estos datos recopilados sirvieron para obtener una hipótesis. Las variables : longitud de crecimiento, crecimiento del micelio, crecimiento de la necrosis, promedio de crecimiento en cm² y porcentaje de inhibición de crecimiento en medios de cultivos envenenados (5-15 días), no posee distribución normal, no posee igualdad de varianza, por lo cual se utilizó la estadística no paramétrica mediante la prueba de Kruskal Wallis.

Tabla 3. Combinación entre tratamientos y variables (AXB)

Tratamientos	Combinación	Factor A	Factor B
T 1	A1 B1	A1: Lasidopodia theobromae	B1: Oxicloruro de cobre
T 2	A1 B2	A2: Botryphaeria Dothidea	B2: Azoxystrobin
T 3	A1 B3	A3: Diplodia	B3: Tebuconazole
T 4	A1 B4		B4: Testigo absoluto
T 5	A2 B1		
T 6	A2 B2		
T 7	A2 B3		
T 8	A2 B4		
T 9	A3 B1		
T 10	A3 B2		
T 11	A3 B3		
T 12	A3 B4		

Tabla 4. Análisis de varianza (ANDEVA) ensayo invitro

Fuentes de variación	Formulas	Desarrollo	Grado de libertad
Factor A	$a - 1$	$3 - 1$	2
Factor B	$b - 1$	$4 - 1$	3
A x B	$(a-1)(b-1)$	$(3-1)(4-1)$	6
Error	$ab(r-1)$	$[12(5-1)]$	48
Total	$A*b*r-1$	$3*4*5-1$	59

Jurado, 2023

Tabla 5. Análisis de varianza (ANDEVA) ensayo *in vivo*

Fuentes de variación	Formulas	Desarrollo	Grado de libertad
Factor A	$a - 1$	$3 - 1$	2
Factor B	$b - 1$	$4 - 1$	3
A x B	$(a-1)(b-1)$	$(3-1)(4-1)$	6
Error	$ab(r-1)$	$[12(4-1)]$	36
Total	$A*b*r-1$	$3*4*4-1$	47

Jurado, 2023

4. Resultados

4.1 Identificación de las características morfológicas de *Lasiodiplodia*, *Botryosphaeria* y *Diplodia* a nivel *invitro*.

4.1.1 Crecimiento radial a nivel *invitro*.

En un periodo de evaluación de veinte días se realizaron cuatro mediciones de las variables longitud, micelio y necrosis donde se tomaron datos de estas variables cada cinco días, las evaluaciones fueron a nivel *invitro* para observar el comportamiento de las cepas *Lasiodiplodia*, *Botryosphaeria* y *Diplodia*, en condiciones controladas en el medio de cultivo (PDA).

Las tres cepas de hongos: *Lasiodiplodia*, *Botryosphaeria* y *Diplodia* presentan una aproximación de crecimiento de 1cm- 2cm por día en el indicador de I. siendo *Lasiodiplodia* y *Botryosphaeria* las cepas que mayor crecen en el medio de cultivo y *Diplodia* la cepa con crecimiento más lento (véase en la imagen 1).

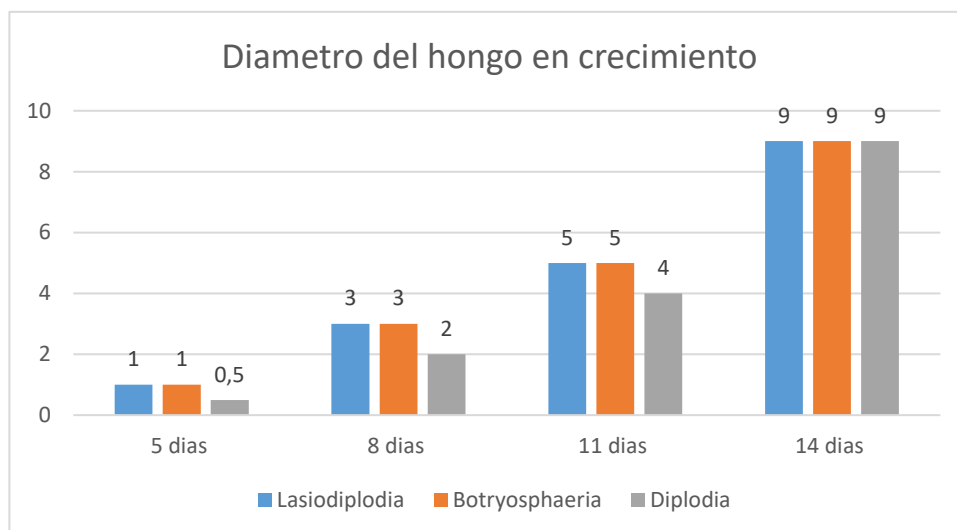


Figura 1. Diámetro de la esporulación de los microorganismos.

Jurado, 2023

4.1.2 Presencia de micelio.

La presencia de esporulaciones es en su mayor rango de crecimiento relacionado a la longitud del hongo en periodo de evaluaciones, en ocasiones se

los puede confundir con bacterias del ambiente, *Lasiodiplodia* sigue siendo la cepa con mayor margen de crecimiento de esporulaciones por su rango de longitud en cm (1cm por día).

4.1.3 Presencia de necrosis.

Tenemos como indicador final la necrosis que es la presencia de muerte prematura de las células de un tejido conocida también como la muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido del organismo, debida a un agente nocivo que ha provocado una lesión tan grave que no se puede reparar o curar, progresivo a la esporulación esta presencia se manifiesta de un color negro en el medio de cultivo, la cepa *Diplodia* presento 2cm de crecimiento en la primera evaluación y fue la primera en rodear los 9cm de la caja petri con necrosis, se puede referenciar al crecimiento de cada cepa *Botryosphaeria*, *Lasiodiplodia* y *Diplodia* en el último de día de evaluación y su desigualdad al momento de crecer en el medio de cultivo *Botryosphaeria*, *Lasiodiplodia* crecen de manera igual con un promedio de 0,45 a diferencia de *Diplodia* que tiene un promedio de 0,6 cm, la igualdad es obtenida en la ultima evaluación a los 11 días en medio de cultivo, monitoreo representado en grafico de barras con su respectivo dato referencial al objetivo planteado a nivel *invitro* posterior en la presente investigación se verificara a nivel *invivo*.

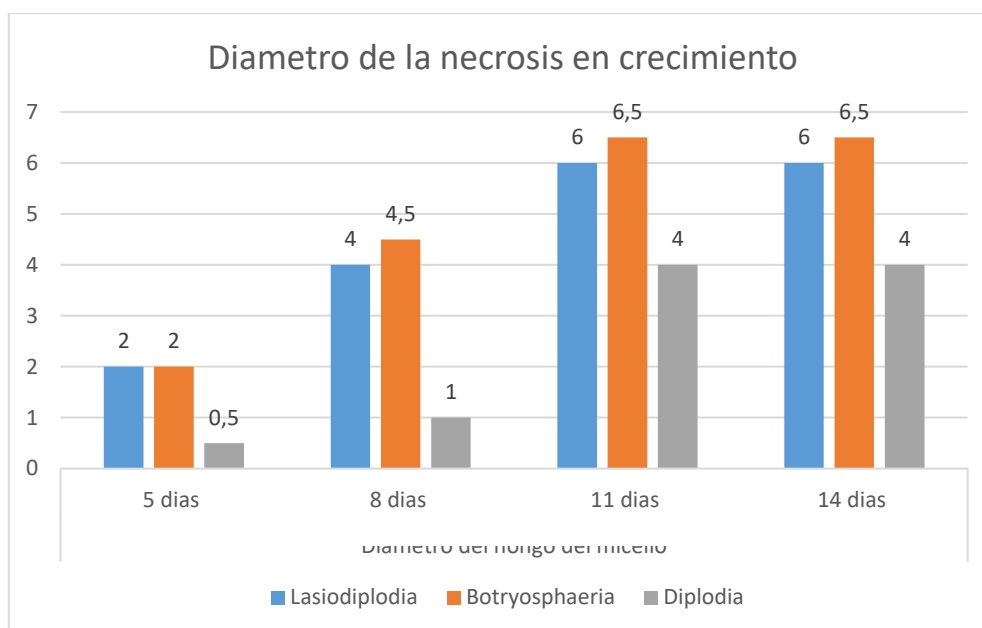


Figura 2. Diametro de la necrosis en crecimiento
Jurado, 2023

4.2 Estimar la sensibilidad de *Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia* frente a fungicidas.

4.2.1 Sensibilidad longitudinal a nivel *invitro*

En la tabla cinco se puede apreciar los datos obtenidos entre el Factor A que caracteriza a las cepas pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae (*Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia*) y el Factor B que caracterizan a los fungicidas de acción preventiva para la presencia de muerte regresiva (Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole) que pertenecen a la variable longitud, los datos no presentan variación normal, por lo que se determinó un p-valor de $0,0001 < 0,05$ en los tres primeros periodos de evaluación que van desde el día 5 hasta el día quince por la razón de que los métodos si reflejan significancia. De acuerdo al análisis de tukey donde se observa que en las variaciones de cinco días no se observa crecimiento en los tratamientos de acción preventiva con Oxicloruro de cobre y tenuconazole con *Lasiodiplodia*, *Diplodia*, *Botryosphaeria* a diferencia cuyo mayor diámetro son los tratamientos con testigo

absoluto que alcanzan hasta un diámetro radial de 2.50 cm, a los diez días de evaluación llega 4.21 cm y en la última evaluación su diámetro final es de 4.25.

Tabla 5. Longitud de crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia* en medios de cultivos envenenados con Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole (5-15 días)

HONGOS	FUNGICIDAS	N	Longitud 5 días	Longitud 10 días	Longitud 15 días
Lasiodiplodia	Oxicloruro de cobre	4	0,00	0,00	2,13
Diplodia	Azoxystrobin	4	0,20	0,61	0,48
Diplodia	Tebuconazole	4	0,00	0,00	0,00
Diplodia	Testigo absoluto	4	1,25	3,88	4,50
Lasiodiplodia	Azoxystrobin	4	0,00	0,00	0,00
Lasiodiplodia	Tebuconazole	4	0,00	0,00	0,00
Lasiodiplodia	Testigo absoluto	4	1,25	1,75	4,00
Botryosphaeria	Oxicloruro de cobre	4	0,00	0,28	0,50
Botryosphaeria	Azoxystrobin	4	0,25	0,63	0,53
Botryosphaeria	Tebuconazole	4	0,00	0,00	0,00
Botryosphaeria	Testigo absoluto	4	2,50	4,21	4,25
Diplodia	Oxicloruro de cobre	4	0,00	0,10	0,10
P			<0,0001	<0,0001	<0,0001

Jurado, 2023

En la tabla 6 presenta un cambio, al obtener los datos entre el Factor A (*Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia*) y el Factor B (Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole) relacionados al crecimiento longitudinal entre el periodo de evaluación 20-25 días, de acuerdo con el análisis de varianza, se presenta un coeficiente de variación de %20.70 en los 20 días de evaluación y un coeficiente de variación de %18.92 en los veinticinco días que representan la última evaluación siendo la aplicación del tratamiento T3 (*Lasiodiplodia* x tebuconazole) el que presento menor crecimiento longitudinal teniendo resultados positivos por la eliminación del agente fúngico, se determina

que los tratamientos T4(*Lasiodiplodia* x testigo absoluto) y T12(*Diplodia* x testigo absoluto) presentaron crecimiento longitudinal en el medio de cultivo.

Tabla 6. Longitud de crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia* en medios de cultivos envenenados con Oxiclورو de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole (20-25 días)

Hongo	Fungicida	N	Longitud 20 días	Longitud 25 días
Lasiodiplodia	Tebuconazole	4	0,00 A	0,00 A
Diplodia	Oxiclورو de cobre	4	0,10 A	0,15 A
Botryosphaeria	Oxiclورو de cobre	4	0,50 A	0,60 A
Botryosphaeria	Azoxystrobin	4	0,52 A B	0,59 A
Diplodia	Azoxystrobin	4	0,68 A B	0,96 A B
Diplodia	Tebuconazole	4	0,00 A	0,00 A
Botryosphaeria	Tebuconazole	4	0,00 A	0,00 A
Lasiodiplodia	Azoxystrobin	4	3,25 C	3,25 C
Lasiodiplodia	Oxiclورو de cobre	4	4,00 C D	4,50 D
Botryosphaeria	Testigo absoluto	4	4,06 C D	4,50 D
Diplodia	Testigo absoluto	4	4,50 D	4,50 D
Lasiodiplodia	Testigo absoluto	4	4,50 D	4,50 D
CV%			20,70	18,92

Jurado, 2023

4.2.2 Sensibilidad de esporulación a nivel *invitro*.

La siguiente tabla presenta los datos obtenidos entre el Factor A (*Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia*) y el Factor B (Oxiclورو de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole) relacionados al crecimiento de esporulaciones, la variable representativa de estos datos es la de micelio, los datos no presentan variación normal se determinó un p-valor de $0,0001 < 0,05$ en los tres primeros periodos de evaluación que van desde el día 5 hasta el día 15 por la acción de los métodos preventivos, los tratamiento que tienen Tebuconazole como principio activo eliminaron la esporulación de las cepas (*Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia*), el tratamiento que tiene como factor A *Diplodia*

y tratamiento testigo absoluto es el tratamiento que presento mayor crecimiento en el micelio.

Tabla 7. Crecimiento del micelio de *Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia* en medios de cultivos con Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y tebuconazole (5-15 días)

Hongos	Fungicidas	N	Micelio 5 días	Micelio 10 días	Micelio 15 días
Lasiodiplodia	Oxicloruro de cobre	4	0,00	0,00	2,13
Diplodia	Azoxystrobin	4	0,11	0,19	0,25
Diplodia	Tebuconazole	4	0,00	0,00	0,00
Diplodia	Testigo absoluto	4	1,68	4,38	4,50
Lasiodiplodia	Azoxystrobin	4	0,00	0,00	3,25
Lasiodiplodia	Tebuconazole	4	0,00	0,00	0,00
Lasiodiplodia	Testigo absoluto	4	0,38	0,85	4,00
Botryosphaeria	Oxicloruro de cobre	4	0,00	0,19	0,46
Botryosphaeria	Azoxystrobin	4	0,06	0,10	0,11
Botryosphaeria	Tebuconazole	4	0,00	0,00	0,00
Botryosphaeria	Testigo absoluto	4	2,50	4,21	4,30
Diplodia	Oxicloruro de cobre	4	0,00	0,06	0,10
P			<0,0001	<0,0001	<0,0001

Jurado, 2023

En la tabla 8 presenta un cambio, al obtener los datos entre el Factor A (*Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia*) y el Factor B (Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole) relacionados al crecimiento del micelio entre el periodo de evaluación 20-25 días, de acuerdo con el análisis de varianza, se presenta un coeficiente de variación de %13.05 en los 20 días de evaluación y un coeficiente de variación de %5.98 en los veinticinco días, los tratamientos T3(*Lasiodiplodia* x tebuconazole), T7(*Botryosphaeria* x tebuconazole) y T11(*Diplodia* x tebuconazole) presentaron mayor prevención anti fúngica evitando el crecimiento de micelio, mientras los tratamientos T1(*Lasiodiplodia* x

oxicloruro de cobre), T4(Lasiodiplodia x testigo absoluto), T8(Botryosphaeria x testigo absoluto) y T12(Diplodia x testigo absoluto) presentaron presencia de esporulación en todo el rango del medio de cultivo.

Tabla 8. Crecimiento del micelio de *Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia* en medios de cultivos envenenados con Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole (20-25 días)

Hongos	Fungicidas	N	Micelio 20 días	Micelio 25 días
Botrysphaeria	Tebuconazole	4	0,00 A	0,00 A
Diplodia	Tebuconazole	4	0,00 A	0,00 A
Lasiodiplodia	Tebuconazole	4	0,00 A	0,00 A
Diplodia	Oxicloruro de cobre	4	0,05 A	0,09 A
Botrysphaeria	Azoxystrobin	4	0,10 A	0,16 A
Diplodia	Azoxystrobin	4	0,11 A	0,19 A
Botrysphaeria	Oxicloruro de cobre	4	0,46 A	0,58 B
Lasiodiplodia	Azoxystrobin	4	3,25 B	3,25 C
Botrysphaeria	Testigo absoluto	4	4,00 C	4,50 D
Lasiodiplodia	Oxicloruro de cobre	4	4,00 C	4,50 D
Lasiodiplodia	Testigo absoluto	4	4,50 C	4,50 D
Diplodia	Testigo absoluto	4	4,50 C	4,50 D
CV%			13,05	5,98

Jurado, 2023

4.2.3 Sensibilidad de necrosis a nivel *invitro*.

La siguiente tabla presenta los datos obtenidos entre el Factor A (*Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia*) y el Factor B (Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole) relacionados al crecimiento y presencia de muerte prematura de las células, la variable representativa de estos datos es la de necrosis, los datos no presentan variación normal se determinó un p-valor de $0,0001 < 0,05$ en los tres primeros periodos de evaluación que van desde el día 5 hasta el día 15 por la acción de los métodos preventivos, siendo el T11 (*Diplodia* x Tebuconazole),

T10 (*Diplodia* x Azoxystrobin), T3 (*Lasiodiplodia* x Tebuconazole), T7 (*Botryosphaeria* x Tebuconazole) la combinación que neutralizo la presencia y el crecimiento de necrosis.

Tabla 9. Crecimiento de la necrosis en *Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia* en medios de cultivos envenenados con Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole (5-15 días)

Hongos	Fungicidas	N	Necrosis 5 días	Necrosis 10 días	Necrosis 15 días
Lasiodiplodia	Oxicloruro de cobre	4	0,00	0,00	2,13
Diplodia	Azoxystrobin	4	0,00	0,00	0,00
Diplodia	Tebuconazole	4	0,00	0,00	0,00
Diplodia	Testigo absoluto	4	0,88	2,84	4,50
Lasiodiplodia	Azoxystrobin	4	0,00	0,00	2,23
Lasiodiplodia	Tebuconazole	4	0,00	0,00	0,00
Lasiodiplodia	Testigo absoluto	4	0,00	0,00	4,00
Botryosphaeria	Oxicloruro de cobre	4	0,00	0,00	0,00
Botryosphaeria	Azoxystrobin	4	0,00	0,00	0,00
Botryosphaeria	Tebuconazole	4	0,00	0,00	0,00
Botryosphaeria	Testigo absoluto	4	0,00	1,09	3,63
Diplodia	Oxicloruro de cobre	4	0,00	0,00	0,00
P			<0,0001	<0,0001	<0,0001

Jurado, 2023

En la tabla 10 presenta un cambio, al obtener los datos entre el Factor A (*Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia*) y el Factor B (Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole) relacionados al crecimiento y presencia de muerte prematura de las células entre el periodo de evaluación 20-25 días, de acuerdo con el análisis de varianza, se presenta un coeficiente de variación de %13,05 en los 20 días de evaluación y un coeficiente de variación de %5,98 en

los 25 días, los tratamientos T3(*Lasiodiplodia* x tebuconazole), T7(*Botryosphaeria* x tebuconazole) ,T11(*Diplodia* x tebuconazole), T5(*Botryosphaeria* x oxiclóruo de cobre), T9(*Diplodia* x Oxiclóruo de cobre), T6(*Botryosphaeria* x azoxystrobin) y T10(*Diplodia* x azoxystrobin) presentaron mayor prevención anti fúngica evitando el crecimiento de necrosis , mientras los tratamientos T4(*Lasiodiplodia* x testigo absoluto) y T12(*Diplodia* x testigo absoluto) presentaron presencia de muerte prematura de las células en todo el rango del medio de cultivo.

Tabla 10. Crecimiento de la necrosis en *Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia* en medios de cultivos envenenados con Oxiclóruo de cobre, Azoxystrobin y Tabuconazole (20-25 días)

Hongos	Fungicidas	N	Necrosis 20 días	Necrosis 25 días
Botrysphaeria	Tebuconazole	4	0,00 A	0,00 A
Diplodia	Tebuconazole	4	0,00 A	0,00 A
Lasiodiplodia	Tebuconazole	4	0,00 A	0,00 A
Diplodia	Oxicloruro de cobre	4	0,00 A	0,09 A
Botrysphaeria	Azoxystrobin	4	0,00 A	0,00 A
Diplodia	Azoxystrobin	4	0,00 A	0,00 A
Botrysphaeria	Oxicloruro de cobre	4	0,00 A	0,09 A
Lasiodiplodia	Azoxystrobin	4	2,23 B	2,23 B
Botrysphaeria	Testigo absoluto	4	3,88 C	4,50 C
Lasiodiplodia	Oxicloruro de cobre	4	4,00CD	4,50 C
Lasiodiplodia	Testigo absoluto	4	4,50 D	4,50 C
Diplodia	Testigo absoluto	4	4,50 D	4,50 C
CV%			13,63	0,86

Jurado, 2023

4.2.4 Promedio de crecimiento en cm² a nivel *invitro*.

La siguiente tabla presenta los datos obtenidos entre el Factor A (*Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia*) y el Factor B (Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole) relacionados al crecimiento promediado en cm², la

variable representativa de estos datos es Aprom1cm^2 , los datos no presentan variación normal se determinó un p-valor de $0,0001 < 0,05$ en los tres primeros periodos de evaluación que van desde el día 5 hasta el día 15 por la acción de los métodos preventivos. Los tratamientos T11 (*Diplodia* x tebuconazole), T3 (*Lasiodiplodia* x tebuconazole), T7 (*Botryosphaeria* x tebuconazole) no presentaron crecimiento en el periodo de evaluación a nivel *invitro* durante 15 días.

Tabla 11. Promedio de crecimiento en cm^2 de *Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia* en medios de cultivos envenenados con Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole (5-15 días)

Hongos	Fungicidas	N	Aprom1_cm2 5 días	Aprom1_cm2 10 días	Aprom1_2 15 días
Lasiodiplodia	Oxicloruro de cobre	4	0,00	0,00	8,06
Diplodia	Azoxystrobin	4	0,07	0,13	0,08
Diplodia	Tebuconazole	4	0,00	0,00	0,00
Diplodia	Testigo absoluto	4	2,84	24,50	35,78
Lasiodiplodia	Azoxystrobin	4	0,03	0,03	14,95
Lasiodiplodia	Tebuconazole	4	0,00	0,00	0,00
Lasiodiplodia	Testigo absoluto	4	0,52	1,33	28,27
Botryosphaeria	Oxicloruro de cobre	4	0,00	0,06	0,25
Botryosphaeria	Azoxystrobin	4	0,02	0,12	0,08
Botryosphaeria	Tebuconazole	4	0,00	0,00	0,00
Botryosphaeria	Testigo absoluto	4	5,11	17,91	27,20
Diplodia	Oxicloruro de cobre	4	0,00	0,01	0,09
P			<0,0001	<0,0001	<0,0001

Jurado, 2023

En la tabla 12 presenta un cambio, al obtener los datos entre el Factor A (*Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia*) y el Factor B (Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole) relacionados al promedio de crecimiento en cm^2 entre el periodo de evaluación 20-25 días, de acuerdo con el análisis de varianza, se presenta un coeficiente de variación de %20,61 en los 20

días de evaluación y un coeficiente de variación de %2,80 en los 25 días, los tratamientos T3(*Lasiodiplodia* x tebuconazole), T7(*Botryosphaeria* x tebuconazole), T11(*Diplodia* x tebuconazole), T5(*Botryosphaeria* x oxicloruro de cobre), T9(*Diplodia* x Oxicloruro de cobre) y T6(*Botryosphaeria* x azoxystrobin) presentaron menor promedio de crecimiento fúngico, mientras los tratamientos T4(*Lasiodiplodia* x testigo absoluto) y T12(*Diplodia* x testigo absoluto) presentaron mayor promedio de crecimiento en el medio de cultivo.

Tabla 12. Promedio de crecimiento en cm² de *Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidae* y *Diplodia* en medios de cultivos envenenados con Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole (20-25 días)

Tratamiento	Fungicidas	N	Aprom1cm2 20 días		Aprom1cm2 25 días	
Botrysphaeria	Tebuconazole	4	0,00	A	0,00	A
Diplodia	Tebuconazole	4	0,00	A	0,00	A
Lasiodiplodia	Tebuconazole	4	0,00	A	0,00	A
Diplodia	Oxicloruro de cobre	4	0,01	A	0,09	A
Botrysphaeria	Azoxystrobin	4	0,08	A	0,12	A
Diplodia	Azoxystrobin	4	0,14	A	0,28	A
Botrysphaeria	Oxicloruro de cobre	4	0,25	A	0,35	A
Lasiodiplodia	Azoxystrobin	4	14,95	B	14,95	B
Botrysphaeria	Testigo absoluto	4	28,47	C	35,78	C
Lasiodiplodia	Oxicloruro de cobre	4	28,27	C	35,78	C
Lasiodiplodia	Testigo absoluto	4	35,78	D	35,78	C
Diplodia	Testigo absoluto	4	35,78	D	35,78	C
CV%			20,61		2,80	

Jurado, 2023

4.2.5 Porcentaje de inhibición de crecimiento

La siguiente tabla presenta los datos obtenidos entre el Factor A (*Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia*) y el Factor B (Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole) relacionados al porcentaje de inhibición de

crecimiento, la variable representativa de estos datos es %PIC, Los tratamientos T11 (*Diplodia* x Tebuconazole), T3 (*Lasiodiplodia* x Tebuconazole), T7 (*Botryosphaeria* x Tebuconazole) fueron aquellos que obtuvieron un %PIC en un 100%, los datos no presentan variación normal se determinó un p-valor de $0,0001 < 0,05$ en los tres primeros periodos de evaluación que van desde el día 5 hasta el día 15 por la acción de los métodos preventivos.

Tabla 13. Porcentaje de inhibición de crecimiento en *Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia* en medios de cultivos envenenados con Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole (5-15 días)

Tratamiento	Fungicidas	N	%PIC 5 días	%PIC 10 días	%PIC 15 días
Lasiodiplodia	Oxicloruro de cobre	4	100,00	100,00	71,48
Diplodia	Azoxystrobin	4	99,36	99,44	97,36
Diplodia	Tebuconazole	4	100,00	100,00	100,00
Diplodia	Testigo absoluto	4	9,47	4,02	0,00
Lasiodiplodia	Azoxystrobin	4	97,80	94,38	47,13
Lasiodiplodia	Tebuconazole	4	100,00	100,00	100,00
Lasiodiplodia	Testigo absoluto	4	13,27	10,30	0,00
Botryosphaeria	Oxicloruro de cobre	4	100,00	99,67	98,86
Botryosphaeria	Azoxystrobin	4	99,39	99,67	99,32
Botryosphaeria	Tebuconazole	4	100,00	100,00	100,00
Botryosphaeria	Testigo absoluto	4	27,78	20,35	11,35
Diplodia	Oxicloruro de cobre	4	100,00	99,99	99,97
P			<0,0001	<0,0001	<0,0001

Jurado, 2023

En la tabla 14 presenta un cambio, al obtener los datos entre el Factor A (*Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia*) y el Factor B (Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole) relacionados al porcentaje de

inhibición de crecimiento entre el periodo de evaluación 20-25 días, de acuerdo con el análisis de varianza, se presenta un coeficiente de variación de %10,47 en los 20 días de evaluación y un coeficiente de variación de %1,66 en los 25 días, los tratamientos T3(*Lasiodiplodia* x tebuconazole), T7(*Botryosphaeria* x tebuconazole), T11(*Diplodia* x tebuconazole), T5(*Botryosphaeria* x oxicloruro de cobre), T9(*Diplodia* x Oxicloruro de cobre) ,T6(*Botryosphaeria* x azoxystrobin) y T10(*Diplodia* x azoxystrobin) presentaron mayor porcentaje de inhibición de crecimiento, mientras los tratamientos T4(*Lasiodiplodia* x testigo absoluto) y T12(*Diplodia* x testigo absoluto) presentaron menor porcentaje de inhibición de crecimiento en el medio de cultivo.

Tabla 14. Porcentaje de inhibición de crecimiento en *Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia* en medios de cultivos envenenados con Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole (20-25 días).

Tratamiento	Fungicidas	N	%PIC 20 días	%PIC 25 días
Lasiodiplodia	Testigo absoluto	4	0,00 A	0,00 A
Diplodia	Testigo absoluto	4	0,00 A	0,00 A
Botryosphaeria	Testigo absoluto	4	20,43 B	0,00 A
Lasiodiplodia	Oxicloruro de cobre	4	20,99 B	0,00 A
Lasiodiplodia	Azoxystrobin	4	58,23 C	58,23 B
Botryosphaeria	Tebuconazole	4	100,00 D	100,00 C
Botryosphaeria	Oxicloruro de cobre	4	99,03 D	98,67 C
Diplodia	Azoxystrobin	4	99,60 D	99,22 C
Diplodia	Tebuconazole	4	100,00 D	100,00 C
Botryosphaeria	Azoxystrobin	4	99,68 D	99,68 C
Diplodia	Oxicloruro de cobre	4	99,99 D	99,96 C
Lasiodiplodia	Tebuconazole	4	100,00 D	100,00 C
CV%			10,47	1,66

4.3 Evaluación a nivel *invivo* el efecto del agente causal que presente un nivel de tolerancia a fungicidas.

4.3.1 Crecimiento del agente causal a nivel *invivo*.

Se realizó la evaluación final, con un periodo de 10 días, de los cuales se observó la presencia de agente causal que fue el óxido alrededor de la herida, se realizó un control preventivo con el Factor B (Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole), se procede como último paso iniciar el proceso de inoculación por técnica de contacto las cepas a inocularse fueron: (*Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea* y *Diplodia*) en los brotes jóvenes de cacao (*Theobroma cacao L.*) los datos no presentan variación normal se determinó un coeficiente de variación de 17,81% en los primeros cinco días en diámetros, 14.08% en los diez días de evaluación y 6,37% en los 10 días de evaluación la toma de medidas (cm) dio como resultado al T7(*Botryosphaeria Tebuconazole*), T6 (*Botryosphaeria x tebuconazole*), T1 (*Lasiodiplodia x oxicloruro de cobre*) y T3 (*Lasiodiplodia x tebuconazole*) como los mejores tratamientos que previnieron el crecimiento total del agente causal en los chupones de cacao, a diferencia de los tratamientos T8 (*Botryosphaeria x testigo absoluto*) y T12 (*Diplodia x testigo absoluto*) que presento mayor crecimiento del agente causal tomando como referencia el promedio de datos a nivel *invitro* de las cepas que provocan la muerte regresiva o también llamada pudrición del tallo, que ataca principalmente a los cultivos de origen leñosos.

Tabla 15. Crecimiento del agente causal a nivel *invivo* en chupones de cacao (*Theobroma cacao L.*) con método preventivo en Oxicloruro de cobre, Azoxystrobin y Tebuconazole (5-10 días).

Hongos	Fungicidas	N	Diámetro 5 días	Diámetro 7 días	Diámetro 10 días
Botryspheeria	Tebuconazole	4	0,08 A	0,20 A	0,50 A
Botryspheeria	Azoxystrobin	4	0,10 A	0,20 A	0,50 A
Lasidoplodia	Oxicloruro de cobre	4	0,10 A	0,23 A	0,55 A
Lasidoplodia	Tebuconazole	4	0,10 A	0,20 A	0,50 A
Lasidoplodia	Azoxystrobin	4	0,13 A B	0,28 AB	0,50 A
Diplodia	Tebuconazole	4	0,15 A B	0,35 ABC	0,63 A
Diplodia	Azoxystrobin	4	0,28 BC	0,45 BC	0,98 C
Botryspheeria	Oxicloruro de cobre	4	0,35 CD	0,55 C	0,80 B
Diplodia	Oxicloruro de cobre	4	0,48 D	1,00 E	1,58 D
Lasidoplodia	Testigo absoluto	4	0,50 D	0,78 D	0,95 C
Botryspheeria	Testigo absoluto	4	1,05 E	1,55 G	2,00 E
Diplodia	Testigo absoluto	4	1,05 E	1,33 F	1,95 E
CV%			17,81	14,08	6,37

Jurado, 2023

5. Discusión

Según Núñez (2012), Los síntomas característicos de la muerte regresiva causada por *Botryosphaeria spp.* Incluyen necrosis o lesiones localizadas, manchas oscuras en la madera, manifestaciones en las hojas y la supresión del crecimiento de brotes. En el pasado, esta enfermedad solía ser confundida con otros trastornos y no se le consideraba una enfermedad relevante. Difiere en los resultados del presente estudio determinan el grado de afectación que causan una de las cepas de la familia *Botryosphaeriaceae* la cual es *Lasiodiplodia* en la etapa inicial del cacao (*Theobroma cacao L.*) es considerada hoy en día una de las principales enfermedades que provocan necrosis en los cultivos.

Durante los últimos cuatro años, se ha registrado un aumento significativo de casos de esta enfermedad en las plantaciones comerciales de cacao y aguacate en el sur de España. Sin embargo, la muerte regresiva no es exclusiva de esta especie en particular, sino que afecta a la mayoría de las especies de plantas leñosas que se han investigado, y no se limita únicamente a nuestro clima y ubicación geográfica por (España, 2022). Los resultados concuerdan, porque el solo hecho de tener presencia de necrosis en el tallo de cultivos leñosos es motivo de preocupación por el daño causado de la pudrición del tallo a nivel *invivo* como se observó en los tratamientos T4 (*Lasiodiplodia* x testigo absoluto), T8 (*Botryosphaeria* x testigo absoluto) y T12 (*Diplodia* x testigo absoluto) que comenzó como oxidación en el diámetro, son toma de decisiones en métodos preventivo para no pasar por la enfermedad fitosanitaria como lo es la muerte regresiva.

El hongo *Lasiodiplodia* tiene la capacidad de infectar a lo largo de todo el año. La fuente inicial de inóculo son las mazorcas enfermas y momificadas que permanecen en la planta. A partir de estas mazorcas, los conidios del hongo se dispersan

mediante el viento, el agua, los implementos de trabajo o los insectos perforadores del tronco. Los conidios ingresan a la planta a través de heridas, lo que puede resultar en la muerte de ramas o incluso de la planta completa en un lapso aproximado de tres meses, dependiendo del punto de infección y la susceptibilidad de la planta por (Morrillo, Cedeño, Martínez, y Garcés, 2021). El presente estudio dio resultados que concuerdan que *Lasiodiplodia* es una de las cepas más rápidas en atacar de forma microbiana al tallo de cacao por su capacidad de esporulación inmediata el resultado se determinó similar con los esquejes que no tuvieron método preventivo.

No se observaron síntomas en los frutos a los 20 días después de la inoculación en todas las edades evaluadas referentes al cultivo de cacao. Sin embargo, a los 40 días después de la inoculación, se manifestaron síntomas en las edades de 20, 40, 60, 100, 120 y 160. Finalmente, a los 60 días después de la inoculación, todas las edades mostraron síntomas tanto internos como externos de severidad por Tapia (2021) entre los 18 genotipos estudiados, se identificó que el genotipo Indes-31 no presentó síntomas de moniliasis, lo que sugiere que podría poseer resistencia genética potencial frente a esta enfermedad. A diferencia de la moniliasis, la muerte regresiva se la puede observar en los primeros 10 días de infección con un diámetro de 2cm en el esqueje que fue inoculado con *Botryospheria* según el resultado que se obtuvo en el presente estudio de prevención fitosanitaria.

La etapa de acción del cobre toma un comienzo con la germinación de las esporas propias de los hongos, de ahí que su acción esté limitada a prevenir la aparición de enfermedades de origen fúngico por PortalFruticola (2019) el modo de acción es simple, diversos hongos en sus fases iniciales son incapaces de crecer o reproducirse cuando el contenido en Cu está por encima de un determinado nivel

(2 o 3 ppm, por ejemplo). El presente estudio determinó que la prevención que otorga el oxiclورو de cobre son solo en los primeros 10 días de inoculación a nivel *invitro*, demuestra pérdida de eficacia en la prevención en el día 25 de evaluación, en cambio en el T9 (*Diplodia* x oxiclورو de cobre) controlo la cepa *Diplodia* de manera significativa con una esporulación mínima a los 25 días de evaluación.

Es un fungicida con acción sistémica, protectante, curativa y erradicante. Destruye las membranas celulares de los hongos, en las que la estructura y función de los esteroides (especialmente ergosterol) juegan un papel importante. Los *Triazoles* actúan como inhibidores de la biosíntesis de los esteroides y este proceso está relacionado con alteraciones de las membranas celulares por Tifon (2018). Se presentó una evaluación positiva a nivel *invitro* manteniendo la prevención en un 100% en donde no permitió que se desarrollen las cepas *Botryosphaeria*, *Lasiodiplodia* y *Diplodia*, de esta forma fue neutralizada la germinación.

Uno de los principales fungicidas sistemáticos más usados encontramos de forma aislada es el tebuconazole debido a su acción de eliminar hongos de manera eficaz, comprobado en medios de cultivos frutíhortícolas y cereales que sirvieron como observación para medir el grado de efectividad ante agentes fúngicos por (Moreira A. , Cedeño, Canchignia, y Fiallos, 2021). Se presento una evaluacion positiva a nivel *invivo* manteniendo la prevencion al 100% observado mediante el calculo del porcentaje de incidencia de *Colletotrichum gloeosporioides* en la unidad experimental de brotes de cacao (*Theobroma cacao L.*) que ayuda a la representacion de accion preventiva de los fungicidas con mejor resultado, dado el caso no permitio el desarrollo de las cepas *Botryosphaeria*, *Lasiodiplodia* y *Diplodia*, de esta forma fue neutralizada la germinación y propagación.

6. Conclusiones

Se puede referenciar al crecimiento de cada cepa *Botryosphaeria*, *Lasidopodia* y *Diplodia* en el último de día de evaluación y su desigualdad al momento de crecer en el medio de cultivo *Botryosphaeria*, *Lasidopodia* crecen de manera igual con un promedio de 0,45 a diferencia de *Diplodia* que tiene un promedio de 0,6 cm, la igualdad es obtenida en la última evaluación a los 11 días en medio de cultivo con 9 cm en las tres cepas evaluadas: *Botryosphaeria*, *Lasidopodia* y *Diplodia*, con un ritmo de crecimiento general 0,64 cm/día.

Mediante la reacción microbiológica con cultivos envenados los cuales fueron: Oxiclóruo de cobre, Azoxystrobin y tebuconazole, fue tebuconazole el fungicida usado de manera preventiva que redujo la actividad microbiológica a un 100% ya que afecta la pared celular a través de la inhibición del ergosterol impidiendo de que se cumpla el proceso de división celular y ruptura en el tejido celular.

La regresión celular no se manifestó en algunos tratamientos siendo destacado en otros tratamientos esta fue mediante la oxidación que se expandía 1cm por día y finalmente no presentó micelio, los tratamientos T3 (*Lasidopodia* x Tebuconazole), T7 (*Botryosphaeria* X Tebuconazole) y T11 (*Diplodia* x Tebuconazole) fueron aquellos que tuvieron un 100% de prevención en las unidades experimentales de chupones de cacao (*Theobroma cacao* L.).

El resultado general fue la reducción de la pudrición del tallo de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante los fungicidas seleccionados, pruebas invitro en cajas petri y pruebas a nivel in vivo en brotes jóvenes de cacao indicaron que el mejor método preventivo fue tebuconazole por su mejor acción contra las cepas de hongos que causan necrosis en el tallo de cacao (*Theobroma cacao* L.) pertenecientes a la familia *Botryosphaeriaceae*.

7. Recomendaciones

De acuerdo a las conclusiones de la presenta evaluación se recomienda:

El muestreo para futuras inoculaciones se puede tomar a partir del día 15 de incubación debido a que su propagación está en un 100% ocupada en el medio de cultivo. Se pudo confirmar la actividad microbiológica de 3 cepas: *Botryosphaeria*, *Lasidopodia* y *Diplodia* en cacao (*Theobroma cacao L.*) considerando futuras investigaciones en otros géneros vinculado con la muerte regresiva.

Se seguirá cumplir adecuadamente con los protocolos microbiológicos de hongos y bacterias con la aplicación de antibióticos.

Considerar el periodo de carencia de los ingredientes activos y la frecuencias de aplicación ya que la actividad microbiológica en condiciones *invivo* manifestaron lesiones necróticas sobre las áreas inoculadas a partir de los 10 días de evaluación siendo factible aplicar más de una dosis.

8. Bibliografía

- León, B., Enrique, G., & Bouchon, A. (2019). Muerte repentina de *Theobroma cacao* L. causado por *Verticillium dahliae* Kleb. en el Perú y su biocontrol in vitro. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 20(1), 117-148.
- Rauglaudre, C. (2022). *¿Por qué inocular cultivos con microorganismos?*
- Abril, A., Salas, P., Lovera, E., Kopp, S., & Murillo, N. (2005). Efecto acumulativo de la siembra directa sobre algunas características del suelo en la región semiárida central de Argentina. *Ciencia del suelo*, 23(2), 78-87.
- Agromática. (2022). *El oxiclورو de cobre y su función en la agricultura*. Copyright. Obtenido de <https://www.agromaticas.es/>
- Aguilar, R., Carrasco, C., Morales, A., Yovera, F., & Maldonado, E. (2020). Etiología de la muerte regresiva por *Phytophthora palmivora* en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Manglar*, 17(3), 187-192.
- Alburqueque, D., & Mata, R. (2018). Eficacia de fungicidas químicos para el control in vitro de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldoa*, 25(2), 489-498.
- Alcalá, D., Vargas, N., & Pire, A. (2005). Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial in vitro de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 24(4), 315-324.
- Álvarez, M., Tucta, F., Quispe, E., & Meza, V. (2018). Incidencia de la inoculación de microorganismos benéficos en el cultivo de fresa (*Fragaria* sp.). *Scientia Agropecuaria*, 9(1), 33-42.
- Banco de desarrollo de América latina (CAF). (2017). *Cacao prime del mundo*. Lima.

- BasicFarm. (2020). *¿Qué es un fungicida y para qué sirve?* Bogotá. Obtenido de <https://basicfarm.com/blog/que-es-fungicida-utilidad/>
- Bastidas, W. (2019). *Identificación de las principales enfermedades en el cultivo de aguacate*. Babahoyo: Universidad Técnica de Babahoyo (tesis de grado).
- BROKAW ESPAÑA S.L. (2022). *La muerte regresiva en aguacate*. Algarrobo. Málaga. Obtenido de <https://www.viverosbrokaw.com/la-muerte-regresiva-en-aguacate/>
- Castro, L., Guerrero, M., Centeno, C., Chávez , M., Chaves, N., & Rojas, M. (2015). Cultivo in vitro de autoinjertos epiteliales para el tratamiento de lesiones en la piel. *Revista Tecnología en Marcha*, 8, 33-45.
- Cedeño, L., & Carrero, C. (2018). CACAO: Muerte regresiva de las ramas y cáncer del tronco. *Researchgate*, 43, 1-9. doi:10.13140/RG.2.2.29373.72166
- Contreras, P. (2017). *Control fitosanitario en el cultivo de cacao CCN 51 con tres grupos de fungicidas sobre los problemas que afectan a su producción, en la zona de*. Babahoyo: Universidad Técnica de Babahoyo (Tesis de grado).
- Cuadrado, D., & Blasi, A. (2017). Reconocimiento de actividad microbiana en ambientes silicoclásticos actuales y en paleoambientes. Estudio comparativo para el establecimiento de análogos. *Latin American journal of sedimentology and basin analysis*, 24(2), 36-42. Obtenido de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-49792017000200003
- De Elzaburu, M. (2017). *Método de cribado para la selección de plantas que muestran una reducida decoloración de*. España: oficina española de patentes y marcas.

- De la Concha, H. (2016). *Manual de toma de datos*. Mexico: i-Tree ECO. Obtenido de https://www.itreetools.org/documents/190/03_Manual_de_campo_para_toma_de_datos_i-Tree_ECO.pdf
- De la Cruz, A., & Pineda, M. (2022). *Métodos de inoculación de bacterias en el cultivo de tomate (Solanum lycopersicum L.) bajo condiciones de invernadero*. Honduras: Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana.
- De la Paz, M., Sánchez, D., Parales, D., López, V., Juárez, P., Fernández, E., . . . Hernández, A. (2020). Distribución, incidencia y severidad de la muerte descendente (*Lasiodiplodia* spp.) en lima persa en Morelos, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 37(3), 464-478.
- Decco. (2019). *Cuáles son los tipos de fungicidas más adecuados en postcosecha*. Narurally Postharvest. Obtenido de <https://www.deccoiberica.es/cuales-son-los-tipos-de-fungicidas-mas-adecuados-en-postcosecha/>
- DVA. (2021). *Triadimefon 250 ec-dva*. obtenido de ficha técnica: <https://dva.com.co/producto/fungicida-triadimefon/>
- Ferlini, H. (2008). *Inoculación de semillas, una técnica también para gramíneas*. Santa clara: produccion-animal. Obtenido de https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas%20artificiales/105-inoculacion.pdf
- Gutiérrez, E., Leiva, E., & Ramírez, R. (2019). La poda y su efecto en la calidad del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Agronomía Costarricense*, 43(2), 167-176.

- Hernández , Y., & González , M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento Invitro de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4), 43-46.
- Inestroza, M. (2017). *Clasificación de fungicidas y mecanismos de acción*. Honduras: Grupo Cadelga. Obtenido de <https://grupocadelga.com/vive-tu-tierra/clasificacion-de-fungicidas-y-mecanismos-de-accion>
- KOEI, N. (2011). Cribado y Estudios Hidráulicos de la Cámara de Llegada. *CAR*, 8(3), 11.
- Labraris. (2021). *Azoxystrobin 50 WG*. Obtenido de Viejos retos,nuevas soluciones: <https://labraris.com/fichatecnica/FT-Azoxystrobin-50-WG.pdf>
- Martínez , A. (2020). *Inoculación de semilla para obtener mejores cosechas* . Obtenido de CYMMYT: <https://idp.cimmyt.org/inoculacion-de-semilla-para-obtener-mejores-cosechas/>
- Martínez , H., Hernández , S., Reyes, C., & Vásquez , G. (2013). El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Revista mexicana de fitopatología*, 31(2), 126-143.
- Martínez , Í., Fernández , Y., Bertín , P., Heide, D., Rivera, M., Valdez, M., . . . Decock, C. (2021). Diversidad morfológica, genética y fitopatología del cacao (*Theobroma cacao* L.) tradicional cubano. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*, 11(3), 89-103.
- Mora, P., & Amores, F. (s.f.).
- Moreira, A., Cdeño , A., Canchignia, F., & Garces, F. (2021). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maul [(sin.) *Botryodiplodia theobromae* Pat] en el cultivo de cacao: síntomas, ciclo biológico y estrategias de manejo. *Scientia Agropecuaria*.

- Moreira, A., Cedeño, A., Canchignia, F., & Fiallos, F. (2021). Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griffon & Maul [(sin.) Botryodiplodia theobromae Pat] en el cultivo de cacao: síntomas, ciclo biológico y estrategias de manejo. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 653-662.
- Moreira, A., Cedeño, Á., Martínez, F., & Garcés, F. (2021). Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griffon & Maul [(sin.) Botryodiplodia theobromae Pat] en el cultivo de cacao: síntomas, ciclo biológico y estrategias de manejo. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 653-662.
- Morrillo, A., Cedeño, Á., Martínez, F., & Garcés, F. (2021). Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griffon & Maul [(sin.) Botryodiplodia theobromae Pat] en el cultivo de cacao: síntomas, ciclo biológico y estrategias de manejo. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 653-662.
- Núñez, N. (2012). *Evaluación del potencial de Trichoderma spp. y Glomus intraradices para controlar a Lasiodiplodia theobromae, uno de los agentes causales de la muerte regresiva por Botriosferia en vid (Vitis vinifera L.)*. Ensenada, Baja California, México: Centro de investigación científica y de educación superior de Ensenada.
- Oropeza, M., Vargas, T., & Ramírez, M. (2006). Establecimiento de un protocolo rápido eficiente para plantas de ñame. *Agronomía Tropical*, 56(4), 601-606.
- Ortega, S., Guillén, D., Ramos, R., Troncoso, R., Villanueva, R., Bosquez, E., . . . Bautista, S. (2010). Métodos de inoculación y evaluación de extractos botánicos e isotiocianatos de la familia Brassicaceae en el control de la roya del gladiolo. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 16(1), 17.
- Panozzo, M., Almirón, N., Bello, F., & Vásquez, D. (2018). Caracterización de aislamientos de moho verde (*Penicillium digitatum*) resistentes al fungicida

- pirimetanil en la región citrícola del río Uruguay. *RIA. Revista de investigaciones agropecuarias*, 44(2), 61-64.
- Pérez, E. (2017). *Micropropagación y biotización de jojoba (Simmondsia chinensis L. [Schneider]) mediante bacterias endófitas promotoras de crecimiento vegetal*. La Paz, Baja California Sur: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C (Tesis de Doctorado) .
- PortalFruticola. (2019). *El oxiclورو de cobre y su función en la agricultura*.
- Raíz , J. (2016). Las micotoxinas y salud. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 82(4), 387-388.
- Ramírez , A., Veitía, N., Torres, D., Rivero, L., Garcías , L., Collado, R., & López , M. (2019). Longitud de la raíz: indicador morfológico de la respuesta al estrés hídrico en *Phaseolus vulgaris* L. en casa de cultivo. *Bioteología Vegetal*, 19(3), 34-43.
- Ramón, Ó. (2014). *Cribado en el Tratamiento de las Aguas Residuales*. Prezzi. Obtenido de <https://prezi.com/gp4nhp5aavat/cribado-en-el-tratamiento-de-las-aguas-residuales/>
- Ramos, N., Castro, A., Félix , M., Milla, F., Soria, R., Alcarraz, M., . . . Valdiviezo , D. (2018). Evaluación de ocratoxina a en *Theobroma cacao* L. "Cacao trinitario", por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y análisis micotoxigénico durante el proceso de cosecha, fermentado, secado y almacenado. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 84(4), 477-487.
- Ramos, R., & Dominguez, C. (2016). *Fungicidas protectantes para el control de monilia (Moniliophthora roreri cif & par) en clones de cacao (Theobroma cacao l.) Eet-103 y ccn-51*. Quevedo: UTEQ. 91 p.
- RedAgricola. (2018). *Estrategias para un correcto control de antracnosis en mango*

- Romero, L., Alvarado, D., Hernández, P., Martínez, T., Mora, G., & Villa, J. (2016). Condición de copa, indicador de salud en árboles urbanos del Bosque San Juan de Aragón, Ciudad de México. *Madera y bosques*, 22(2).
- Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de plagas. (2018). *Botryosphaeria dothidea*. *Gobar*.
- Smith, D. (2019). *Muerte Regresiva Eutypa, o Brazo Muerto, de las Uvas (Eutypa Dieback, or Dead Arm, of Grapes)*. Oklahoma: Grapes. Obtenido de <https://grapes.extension.org/muerte-regresiva-eutypa-o-brazo-muerto-de-las-uvas-eutypa-dieback-or-dead-arm-of-grapes/#:~:text=La%20muerte%20regresiva%20Eutypa%20es,de%20la%20planta%20de%20vida>
- Soteldo, L., Jiménez, J., De Zan, A., & Cueto, M. (2012). Efecto de inoculación de microorganismos en crecimiento de rábano (*Raphanus sativus*) . *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 21-31.
- Sumitomo Chelical. (2021). *Triadimefon 25% WP*. Obtenido de Ficha Técnica : <https://www.sumitomochemical.com/asd/fungicidas-chile/triadimefon-25-wp/#:~:text=Triadimefon%2025%25%20WP%20es%20un,en%20Frutales%20C%20Cultivos%20y%20Hortalizas>
- Syngenta. (2022). *Amistar*. Obtenido de Ficha Técnica : <https://www.syngenta.es/productos/proteccion-cultivos/fungicida/amistar>
- Tapia , A. (2021). *Estudio del proceso de infección de mONILIOPHTHORA RORERI en frutos de cacao (tHEOBROMA) en la provincia de utcubamba - región amazonica*. chachapoyas – Perú: Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (Tesis de pregrado).
- Texto unificado de legislación secundaria del mag, libro1. (2010).

- Tifon. (2018). *Fungicida agrícola curativo, sistémico*. eCUADOR: zenith crop sciences bulgaria ltd.
- Toala, V., Borjas, R., Alvarado, L., Castro, V., & Julca, A. (2019). Control cultural, biológico y químico de *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora* spp en *Theobroma cacao* 'CCN-51'. *Scientia Agropecuaria*, 10(4), 511-520.
- Toala, V., Ventura, R., Alvarado, L., Castro, V., & Otiniano, A. (2019). Control cultural, biológico y químico de *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora* spp en *Theobroma cacao* 'CCN-51'. *Scientia Agropecuaria*, 10(4), 511-520.

FICHA TÉCNICA TEBU 4E	
DATOS DE LA EMPRESA	
Empresa Comercializadora	SARMACRO S.A.
Título de Registro	FARMACRO S.A.
Número de Registro	APR 01-AG-026424
IDENTIDAD	
Composición	Clotrimazol
Concentración	480 g/l
Formulación	Concentrado emulsionable
Estado Químico	Resfriado
Clase de uso	Insecticida
Familia Fungicida	TRIAZOLIMIDAZOL
Fórmula Estructural	
Peso Molecular	382.53 g/mol
CARACTERÍSTICAS	
TEBU 4E es un insecticida fungicida de amplio espectro de acción acción por contacto, ingestión y acción de vapor fungicida que puede estar por inhalación a los insectos, tiene un efecto preventivo, es más efectivo para controlar en el suelo y superficies de las plantas.	
PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	
Densidad	1.079 a 10.0 g/L a 20°C
pH	3.5 a 11.0 en solución acuosa
Estado Físico	Líquido
Sabor	Amargo a dulce
Oloro	Característico
Estabilidad en Almacenamiento	Se evalúa bajo condiciones normales de manipulación y almacenamiento por 2 años
Inflamabilidad	No explosivo
Corrosividad	No corrosivo



Figura 6. Tebuconazole
Agripac, 2023

Figura 7. Preparación del medio de cultivo
Jurado, 2023



Figura 8. Comportamiento morfológico
de *Botryosphaeria* (6 días de evaluación)
Jurado, 2023

Figura 9. Comportamiento morfológico
de *Lasiodiplodia* (6 días de evaluación)
Jurado, 2023



Figura 10. Comportamiento morfológico
en *Diplodia* (6 días de evaluación)
Jurado, 2023



Figura 11. Dosificación del AGAR
Jurado, 2023



Figura 12. Proceso de esterilización
Jurado, 2023



Figura 13. Medios de cultivo envenenados
Jurado, 2023



Figura 14. Clasificación de tratamientos
Jurado, 2023



Figura 15. Inoculación de cepas en medios
de cultivos envenenados.
Jurado, 2023



Figura 16. Evaluación microbiológica
Jurado, 2023



Figura 17. Clasificación de muestras
Jurado, 2023



Figura 18. Presencia de *Lasiodiplodia*

Jurado, 2023



Figura 19. Presencia de *Lasiodiplodia* en tratamiento con oxiclورو de cobre.

Jurado, 2023



Figura 20. Preparación de los envases para tratamientos

Jurado, 2023



Figura 21. Proceso de dosificación para envases de 50ml.

Jurado, 2023



Figura 22. Recolección de brotes jóvenes de cacao (*Theobroma cacao* L.).

Jurado, 2023



Figura 23. Clasificación de brotes para tratamientos mediante cinta de colores.

Jurado, 2023



Figura 24. Proceso de inoculación a nivel *in vivo*.
Jurado, 2023



Figura 25. Preparación de área para evaluación a nivel *in vivo*.
Jurado, 2023



Figura 26. Presencia de Oxidación en la unidad experimental T1 (*Lasidopodia* x oxiclورو de cobre) a los 10 días de evaluación.
Jurado, 2023



Figura 27. Presencia de Oxidación en la unidad experimental T6 (*Botryosphaeria* x azoxystrobin) a los 10 días de evaluación.
Jurado, 2023



Figura 28. Presencia de Oxidación en la unidad experimental T3 (*Lasiodiplodia* x testigo absoluto) a los 10 días de evaluación.

Jurado, 2023



Figura 29. Mejor tratamiento T3 (*Lasiodiplodia* x tebuconazole) no presentó oxidación a los 10 días de evaluación.

Jurado, 2023



Figura 30. Recopilación y clasificación de datos obtenidos en los 10 días de evaluación a nivel *in vivo*.

Jurado, 2023