



**UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR**

**ESCUELA DE POSGRADO “ING. JACOBO BUCARAM  
ORTIZ, PHD”**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN SANIDAD VEGETAL**

**PROYECTO DE TITULACIÓN COMO REQUISITO PREVIO PARA  
LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
MAGÍSTER EN SANIDAD VEGETAL**

**ESTUDIO DE HONGOS ENDÓFITOS COMO ANTAGONISTA  
DE *Phytophthora sp.* EN HOJAS DE CACAO (*Theobroma  
cacao L.*) EN CONDICIONES CONTROLADAS, GUAYAS**

**ING. AGRON. JAVIER ULISES MENDOZA THOMPSON**

GUAYAQUIL, ECUADOR

2024

**ESCUELA DE POSGRADO “ING. JACOBO BUCARAM  
ORTIZ, PHD”**

**CERTIFICACIÓN**

El suscrito, Docente de la Universidad Agraria del Ecuador, en mi calidad de Director **CERTIFICO QUE:** he revisado el Trabajo de Titulación, denominada: **ESTUDIO DE HONGOS ENDÓFITOS COMO ANTAGONISTA DE *Phytophthora sp.* EN HOJAS DE CACAO (*Theobroma cacao L.*) EN CONDICIONES CONTROLADAS, GUAYAS**, el mismo que ha sido elaborado y presentado por el estudiante, Ing. Agron. Javier Ulises Mendoza Thompson; quien cumple con los requisitos técnicos y legales exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador para este tipo de estudios.

Atentamente,

---

**Ing. Daniel Mancero Castillo, PhD**

Guayaquil, 3 de junio del 2024

**UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR  
ESCUELA DE POSGRADO “ING. JACOBO BUCARAM  
ORTIZ, PHD”**

**ESTUDIO DE HONGOS ENDÓFITOS COMO ANTAGONISTA DE *Phytophthora*  
*sp.* EN HOJAS DE CACAO (*Theobroma cacao L.*) EN CONDICIONES  
CONTROLADAS, GUAYAS**

**ING. AGRON. JAVIER ULISES MENDOZA THOMPSON**

**TRABAJO DE TITULACIÓN  
APROBADA Y PRESENTADA AL CONSEJO DE POSTGRADO  
COMO REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

**MAGÍSTER EN SANIDAD VEGETAL**

**TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN**

---

**Ing. Tany Burgos Herrería, MSc.  
PRESIDENTE**

---

**Ing. Dioselina Navarrete Chevez, MSc.  
EXAMINADOR PRINCIPAL**

---

**Ing. Daniel Mancero Castillo, PhD.  
EXAMINADOR PRINCIPAL**

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Agraria del Ecuador, que a través de la escuela de posgrado “Ing. Jacobo Bucaram Ortiz, PhD” me permitió especializarme y reforzar conocimientos precisos para contribuir al desarrollo del sector agrícola del país.

A mi tutor Ing. Daniel Mancero, PhD por el apoyo que me ha ofrecido, con conocimientos y sugerencias para el desarrollo del presente trabajo.

A la UTEQ por brindarme las instalaciones de su laboratorio de biotecnología para el desarrollo experimental.

Al Ing. Ángel Cedeño por contribuir con sus conocimientos y experiencia en fitopatología y biotecnología necesarios en esta investigación.

A mis abuelos y familiares del cantón El Empalme que me brindaron su apoyo, paciencia y fortaleza, sobre todo dándome comodidades para realizar la investigación.

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a mis padres, quienes me enseñaron y fomentaron el valor de la responsabilidad para alcanzar cualquier objetivo y desarrollarlo de la manera más eficaz.

A mis hermanos, que han sido un pilar fundamental y apoyo constante frente a las dificultades que surgieron.

A mis abuelos y familiares cercanos, por el respaldo que me ofrecieron a lo largo de cada etapa de mi educación.

A mis amigos: M.L; D.A; M.Y; S.O; I.V; K.C y K.P cuyo apoyo incondicional y compañía inestimable han sido fundamentales con sus palabras de ánimo, consejos sinceros y los momentos compartidos que han hecho más llevaderos los desafíos de esta etapa.

## **RESPONSABILIDAD**

La responsabilidad, derecho de la investigación, resultados, conclusiones y recomendaciones que aparecen en el presente Trabajo de Titulación corresponden exclusivamente al Autor y los derechos académicos otorgados a la Universidad Agraria del Ecuador.

**Ing. Agron. Javier Ulises Mendoza Thompson**

**C. I. 0951799931**

## RESUMEN

El cacao es crucial para la economía y sociedad de varias regiones, incluyendo Ecuador, donde se cultivan dos variedades: CCN-51 y Nacional. *Phytophthora palmivora* afecta diversas etapas, desde plántulas hasta plantas adultas. Los microorganismos antagonistas son una alternativa para controlar estas enfermedades. Esta investigación buscó identificar hongos endófitos que actúen como antagonistas de *Phytophthora sp.* en hojas de cacao bajo condiciones controladas. El estudio se realizó en vivero y laboratorio; se recolectaron muestras de frutos infectados para aislar *P. palmivora*, y se utilizaron hojas de cacao (CCN-51 y Nacional) para evaluar la patología y la actividad antagonista de los hongos endófitos. Los hongos fueron *Trichoderma sp.*, *Fusarium sp.*, y *Lasiodiplodia sp.* Los resultados mostraron que la inhibición de la enfermedad fue del 18,4% con *Trichoderma sp.*, del 21,5% con *Lasiodiplodia sp.*, mientras que *Fusarium sp.* mostró inhibición reducida del 3,3%. *Trichoderma sp.* demostró un mayor efecto antagónico en pruebas de susceptibilidad en discos de hojas, reduciendo la severidad. Se concluyó que los hongos endófitos protegen las plantas de enfermedades y reduciendo la infección del patógeno en las hojas de cacao.

**Palabras claves:** Cacao, *Phytophthora sp.*, Hongos endófitos, Antagonistas, *Trichoderma sp.*

## SUMMARY

Cocoa is crucial to the economy and society of several regions, including Ecuador, where two varieties are grown: CCN-51 and Nacional. *Phytophthora palmivora* affects various stages, from seedlings to adult plants. Antagonist microorganisms are an alternative to control these diseases. This research sought to identify endophytic fungi that act as antagonists of *Phytophthora sp.* in cocoa leaves under controlled conditions. The study was carried out in a nursery and laboratory; samples of infected fruits were collected to isolate *P. palmivora*, and cocoa leaves (CCN-51 and Nacional) were used to evaluate the pathology and antagonistic activity of endophytic fungi. The fungi were *Trichoderma sp.*, *Fusarium sp.*, and *Lasiodiplodia sp.* The results showed that the inhibition of the disease was 18,4% with *Trichoderma sp.*, 21,5% with *Lasiodiplodia sp.*, while *Fusarium sp.* showed reduced inhibition of 3,3%. *Trichoderma sp.* It showed a greater antagonistic effect in susceptibility tests in leaf discs, reducing the severity. It was concluded that endophytic fungi protect plants from disease and reduce infection of the pathogen in cocoa leaves.

**Keywords:** Cocoa, *Phytophthora sp.*, Endophytic fungi, Antagonists, *Trichoderma sp.*

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
Caracterización del tema.....	15
Planteamiento de la Situación Problemática.....	15
Justificación de la investigación.....	15
Delimitación de la investigación.....	16
Formulación del problema.....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos.....	16
Hipótesis o idea a Defender.....	16
Aporte Teórico o Conceptual.....	16
Aplicación Práctica.....	17
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>18</b>
<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>18</b>
1.1 Estado de arte.....	18
1.2 Bases Científicas y Teóricas de la temática.....	23
1.2.1 Origen e importancia del cacao.....	23
1.2.2 Producción de cacao.....	23
1.2.3 Descripción taxonómica.....	24
1.2.4 Requerimientos edafodimáticos del cacao.....	24
1.2.5 Manejo agronómico del cacao.....	26
1.2.6 Enfermedades causadas por Phytophthora sp.....	28
1.2.7 Hongos endófitos.....	29
1.3 Fundamentación legal.....	30
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>32</b>
<b>ASPECTOS METODOLÓGICOS.....</b>	<b>32</b>
2.1 Métodos.....	32
2.2 Modalidad y Tipo de Investigación.....	32
2.3 Variables.....	32
2.3.1 Variable independiente.....	32
2.3.2 Variable dependiente.....	32
2.3.3 Operacionalización de las variables.....	34
2.4 Población y Muestra.....	35

2.4.1 Población .....	35
2.4.2 Muestra .....	35
2.5 Técnica de Recolección de Datos .....	35
2.6 Estadística Descriptiva e Inferencial. ....	35
2.7 Diseño Experimental.....	37
2.7.1 Tratamientos .....	38
2.8 Cronograma de actividades .....	39
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>46</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA CITADA .....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>53</b>
<b>APÉNDICES .....</b>	<b>53</b>

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo N° 1.</b> Cepa monospórica de <i>Phytophthora palmivora</i> aislada de mazorca de cacao.....	41
<b>Anexo N° 2.</b> Cepa monospórica de <i>Trichoderma sp.</i> aislada de hojas de cacao.....	41
<b>Anexo N°3.</b> Cepa monospórica de <i>Fusarium sp.</i> aislada de hojas de cacao. ..	42
<b>Anexo N°4.</b> Cepa monospórica de <i>Lasiodiplodia sp.</i> aislada de hojas de cacao.....	42
<b>Anexo N°5.</b> Identificación molecular <i>Phytophthora palmivora</i> mediante PCR por tamaño de fragmento de Internal Transcribed Region (ITS). .....	43
<b>Anexo N°6.</b> Preparación de vivero. ....	53
<b>Anexo N°7.</b> Preparación de material vegetal y PDA. ....	53
<b>Anexo N° 8.</b> Siembra de material vegetal en PDA.....	54
<b>Anexo N° 9.</b> Inoculación de tejido infectado en mazorcas para posterior purificación.....	54
<b>Anexo N° 10.</b> Purificación de hongos del tejido vegetal cultivado para posterior identificación.....	55
<b>Anexo N° 11.</b> Identificación microscópica de hongos endófitos aislados. ....	55
<b>Anexo N° 12.</b> Realización de prueba de cultivo dual patógeno vs endófitos. ...	56
<b>Anexo N° 13.</b> Aspersión de hongos endófitos en hojas de cacao. ....	56
<b>Anexo N° 14.</b> Colocación de patógeno en hojas de cacao inoculadas con endófitos seleccionados.....	57
<b>Anexo N° 15.</b> Resultados de secuencia realizada de patógeno. ....	58
<b>Anexo N° 16.</b> Seguimiento del tutor .....	58

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla N° 1.</b> Taxonomía <i>Theobroma cacao</i> .....	24
<b>Tabla N°2.</b> Escala de evaluación según el tamaño e intensidad de síntomas ..	33
<b>Tabla N°3.</b> Esquema ANDEVA.....	38
<b>Tabla N°4.</b> Tratamientos de ensayo como antagonista de microorganismos benéficos contra <i>Phytophthora sp.</i> en caja Petri .....	38
<b>Tabla N°5.</b> Tratamientos de ensayo con microorganismos benéficos en hojas de cacao.....	38
<b>Tabla N°6.</b> Crecimiento micelial de hongos (mm) .....	40
<b>Tabla N°7.</b> Prueba de antagonismo de hongos endófitos de cacao contra patógeno <i>Phytophthora palmivora</i> . .....	43
<b>Tabla N°8.</b> Susceptibilidad de hojas de cacao con aplicación de hongos endófitos .....	44

## ÍNDICE DE APÉNDICES

<b>Apéndice N° 1.</b> Análisis de varianza no paramétrica del crecimiento micelial..	59
<b>Apéndice N° 2.</b> Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento.....	59
<b>Apéndice N° 3.</b> Análisis de varianza de variables en estudio. ....	62

## INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo de importancia económica y social en muchas regiones del mundo y en Ecuador debido a la producción de granos de cacao, que se utilizan en la elaboración de chocolate y otros productos derivados. Sin embargo, el cultivo del cacao se enfrenta a muchos problemas fitopatológicos, entre los que destaca la presencia del género *Phytophthora* sp., un grupo de patógenos que provocan graves enfermedades en las plantas de cacao (MAG, 2019).

La enfermedad conocida como mazorca negra es provocada por el cromista Oomycete *Phytophthora* sp. es un hongo que puede causar pudrición de raíz y tallo, de frutos y hojas, afectan seriamente la productividad y calidad del cultivo de cacao y causan pérdidas económicas a los agricultores del 10 % de la producción mundial de cacao; en Ecuador existen registros que tienen un fuerte impacto en la producción de cacao, con porcentajes que van desde el 16% hasta el 80%. Estos valores pueden variar dependiendo del manejo preventivo y control de estas enfermedades y las zonas en las que se presenten (Chávez, 2020).

El conocimiento de los hongos endófitos y su capacidad para infectar a *Phytophthora* sp. en hojas de cacao puede proporcionar una alternativa sostenible y respetuosa con el medio ambiente para el control de enfermedades en este cultivo. Además, de comprender la diversidad microbiana asociada al cacao y promover prácticas integradas de manejo de enfermedades que promuevan la sanidad vegetal y la productividad agrícola (Bini, Pellegrini y Quattrucci, 2021).

Puri, Padda y Chanway (2020) indican que actualmente, varios estudios fúngicos basados en el control biológico como estrategia para combatir enfermedades de gran importancia en los cultivos de cacao, tales como: *Cladobotryum amazonense*, *Hypomyces* spp., *Verticillium lecanii*, *Penicillium* spp., *Clonostachys* spp. (*Gliocladium*), *Trichoderma* spp., *Aspergillus niger*, *Acremonium* spp., *Didymella* spp., *Nectria* spp. y *Didymostilbe* spp. *Trichoderma stromaticum* y *T. koningiopsis* son antagonistas que previenen la formación de basidiocarpos y parasitan las hifas.

## **Caracterización del tema.**

El cultivo de cacao en Ecuador requiere una reducción en uso de químicos e intervenir con nuevas estrategias biológicas que nos permitan cuidar los ecosistemas y la salud humana, sustentado en este estudio para identificar si tiene un efecto antagonico sobre *Phytophthora sp.* por hongos endófitos, se supone que representan una mejor opción en las interacciones de enfermedades.

## **Planteamiento de la Situación Problemática.**

El objeto de estudio del presente trabajo es la falta de identificación de hongos endófitos como antagonista de *Phytophthora sp.* en cacao para mejorar su eficacia. Aunque algunos pueden ser efectivos en el control, no siempre es el caso y puede variar según la especie de hongo, la cepa, el ambiente y las condiciones de crecimiento.

El principal problema es la competencia con otros microorganismos endófitos en las plantas de cacao; estas pueden albergar una amplia variedad, lo que puede dificultar la identificación y selección de los hongos más efectivos para el control de *Phytophthora sp.* Además, algunos hongos pueden tener interacciones negativas con otros microorganismos presentes en las plantas, lo que podría disminuir su eficacia en el control del patógeno.

## **Justificación de la investigación**

En la zona agrícola de la provincia del Guayas por sus condiciones climáticas y edáficas, los pequeños, medianos y grandes productores presentan ataques de enfermedades que influyen en la reducción de su producción. Lo que expone la presente investigación de controlar el ataque de *Phytophthora sp.* bajo un control biológico de hongos endófitos que no causará daños al medio ambiente y abaratará costos para el agricultor.

La realización de este proyecto puede llegar a ser una eficiente alternativa para el manejo de la incidencia de enfermedades debido a los mecanismos que estos poseen, con la finalidad de controlar la mazorca negra que afecta al cacao y reducen su producción lo que merma su costo. Dicha acción se logrará mediante el antagonismo basado en los hongos endófitos.

## **Delimitación de la investigación**

La presente investigación se realizó bajo cubierta en una finca cacaotera ubicada en el cantón El Empalme - provincia del Guayas, con las siguientes coordenadas geográficas: latitud -1°02'30.7"S, longitud -79°39'10.7"W. La investigación tuvo una duración de 6 meses entre la fase de laboratorio y vivero.

## **Formulación del problema**

¿Cuál será el efecto de los hongos endófitos para controlar la *Phytophthora sp.* en la hoja del cultivo de cacao (*Theobroma cacao L.*)?

## **Objetivo general**

**Identificar los hongos endófitos como antagonista de *Phytophthora sp.* en hojas de cacao (*Theobroma cacao L.*) en condiciones controladas, Guayas.**

## **Objetivos específicos**

- **Analizar el crecimiento micelial y características morfológicas de hongos endófitos mediante crecimiento en caja Petri.**
- **Evaluar el nivel de antagonismo de las cepas de hongo endófito contra *Phytophthora sp.***
- **Determinar la susceptibilidad del cacao Nacional y CCN-51 mediante inoculación de hojas contra *Phytophthora sp.***

## **Hipótesis o idea a Defender**

Con la aplicación de hongos endófitos en hojas de cacao permitirá reducir la incidencia de la enfermedad causada por *Phytophthora sp.* en tejidos vasculares.

## **Aporte Teórico o Conceptual**

Una vez finalizada la investigación, se espera que surja una nueva forma de controlar *Phytophthora sp.* en cultivos de cacao utilizando organismos antagonistas como control biológico.

## **Aplicación Práctica**

Una vez obtenidos los resultados de este estudio, los productores de cacao, docentes e investigadores del Cantón El Empalme y otras organizaciones dedicadas a este cultivo conocerán el potencial de los hongos endófitos para controlar *Phytophthora sp.*

# CAPÍTULO 1

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 Estado de arte

Villavicencio (2019) en su estudio menciona que el uso de hongos endófitos antagonistas es una opción viable para el control de enfermedades debido a los diversos mecanismos que poseen. El trabajo se centró en evaluar la capacidad de hongos endófitos del cacao Nacional como posibles agentes de control biológico contra dos patógenos en condiciones controladas. Todos los aislados fueron enfrentados en cultivos duales contra *M. royeri* y *M. pernicioso*, y se evaluó su capacidad antagónica y la patogenicidad del endófito en hojas y frutos sanos de cacao. No hubo una especie o cepa que cumpliera con todos los indicadores estudiados: *Lasiodiplodia theobromae* obtuvo los mayores PICs y niveles de micoparasitismo frente a ambos patógenos; *Colletotrichum spp.* mostró una mayor inhibición de *M. royeri* debido a la acción de sus metabolitos; y *Xylaria spp.* demostró una mayor capacidad para colonizar las hojas sanas de cacao tras la inoculación. Las cepas destacadas como prometedoras para el control de ambos patógenos después de estos ensayos fueron Ec035 (*L. theobromae*), Ec107 (*Colletotrichum spp.*) y Ec059 (*Xylaria feejeensis*).

En el estudio para probar la patogenicidad de un hongo endófito asociado a hojas asintomáticas de cacao; el endófito se recuperó de tejidos inoculados artificialmente a los 14 y 26 días después de la inoculación (DDI) (plántulas UF18), y a los 10 (plántulas K9) y 14 DAI de vainas de cacao. El endófito fue identificado como *Colletotrichum siamense* en base a sus características culturales, morfológicas y moleculares. Los ensayos antipatógenos *in vitro* mostraron que *C. siamense* tenía el potencial de limitar el crecimiento de patógenos por antibiosis. A los 3, 5 y 7 días después del período de incubación (DAIP), el crecimiento del patógeno en cocultivo con el endófito midió 60.0, 70.0 y 71.0 mm, respectivamente, que fue considerablemente menor que el crecimiento del patógeno solo (Sadoral y Cumagun, 2021).

Mejía *et al.* (2021) indican que los endófitos fúngicos aislados de tejidos sanos de *Theobroma cacao* se analizaron *in vitro* para detectar antagonismo contra

los principales patógenos del cacao. De las morfoespecies endófitas probadas, el 40 % (21/52), el 65 % (28/43) y el 27 % (4/15) mostraron antagonismo *in vitro* contra *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora palmivora* y *Moniliophthora perniciosa*, respectivamente. El mecanismo antagónico más común fue la simple competencia por el sustrato. No obstante, el 13 %, 21 % y 0 % de las morfoespecies analizadas mostraron una clara antibiosis contra *M. roreri*, *P. palmivora* y *M. perniciosa*, respectivamente. Se observó que un aislado de *Trichoderma* era parásito de *M. roreri*. Finalmente, los ensayos de campo que evaluaron los efectos de tres hongos endófitos (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Clonostachys rosea* y *Botryosphaeria ribis*) sobre la pérdida de vainas debida a *M. roreri* y *Phytophthora sp.* se realizaron en 4 fincas en Panamá. Aunque la incidencia general de *P. palmivora* fue muy baja durante las pruebas, el tratamiento con *C. gloeosporioides* disminuyó significativamente la pérdida de vaina debida a esa enfermedad. No se observó una disminución en *P. palmivora* debido a *M. perniciosa*, pero el tratamiento con *C. rosea* redujo la incidencia de vainas de cacao con lesiones esporulantes de *M. roreri* en un 10 %. La reducción observada en la pérdida de vainas debido a *Phytophthora sp.* y la esporulación por *M. roreri*, apoya el potencial de los hongos endófitos como agentes de control biológico. Además, estos estudios sugieren que la información combinada de censos de campo de hongos endófitos, estudios *in vitro* y experimentos de invernadero pueden proporcionar criterios útiles a priori para identificar atributos deseables para posibles agentes de biocontrol.

Baralt *et al.* (2020) indican que la infección de plantas con microorganismos endófitos les permite adaptarse a estreses bióticos y abióticos. Al mismo tiempo, se sabe que algunos tipos de hongos pueden comportarse como microorganismos y endófitos en diferentes etapas de su ciclo de vida. El objetivo fue identificar preliminarmente hongos de cacao endófitos cultivados en busca de agentes biológicos candidatos para el control de enfermedades de las plantas. Los hongos se aislaron de tejidos sanos de vainas y hojas de cacao y se caracterizaron en PDA (13 caracteres de cultivo, observaciones microscópicas). Luego, los aislados se dividieron en grupos morfológicos (GM). Algunas plantas modificadas genéticamente se identifican por género y especie. Aquellos que no formaron estructuras reproductivas en las colonias se implementaron más como genética. Para los 98 aislados, la abundancia (número de individuos) fue de 55 para frutos y

43 para hojas, dando una riqueza total (número de especies o diferentes unidades taxonómicas) de 17 muestras, un total de 10 para cada miembro del género. Se han identificado un total de 9 géneros (*Colletotrichum sp.*, *Cladosporium sp.*, *Curvularia sp.*, *Penicillium sp.*, *Pestalotiopsis sp.*, *Lasiodiplodia sp.*, *Glomerella sp.*, *Nigrospora sp.* y *Phomopsis sp.*), una especie (*Fusarium decemcellulare*) y siete GM. De los 17 GM identificados originalmente, 10 correspondían a al menos 10 especies diferentes. En esta diversidad de micobiotas endófitas encontramos aislados con actividad antipatogénica, así como potenciales patógenos de cultivos.

En su trabajo de detectar actividad antagónica de estos endófitos contra 6 patógenos del cultivo (*Monilliophthora roreri*, *Crinipellis roreri*, *Fusarium decemcellulare*, *Phytophthora megasperma*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Colletotrichum gloeosporioides*). A partir de tejido sano de frutos y hojas se obtuvieron 105 aislados de hongos cultivables, de los cuales 78 se caracterizaron en PDA y, posteriormente, separados en grupos morfológicos (GM). Algunos aislados se identificaron hasta especie o género, ya sea por secuenciación del ITS del ADN ribosomal y/o morfología. Del total de aislamientos obtenidos, 96 aislamientos fueron sometidos a cultivo dual endófito-patogénico. La abundancia de 78 aislamientos contenía una gran cantidad de 20 unidades taxonómicas funcionales (especies GM). Se identificaron 18 GM, 10 géneros (*Phomopsis spp.*, *Colletotrichum spp.*, *Pestalotiopsis spp.*, *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*, *Lasiodiplodia sp.*, *Nigrospora sp.*, *Cladosporium sp.*, *Curvularia sp.*, *Glomerella sp.*). Se identificaron 5 aislamientos como *Albonectria rigidiuscula*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium citreonigrum* y *Diaporthe Phaseolorum*. En general, los dos primeros son patógenos del cacao, a diferencia del segundo, que no ha sido reportado en este hospedero. Entre 96 aislamientos endófitos, se encontraron cepas con actividad antagónica contra todos los patógenos excepto *L. teobroma*, la respuesta de los endófitos osciló entre un antagonismo significativo frente a otros microorganismos, sin efecto aparente hasta que algunos de ellos fueron inhibidos por los microorganismos (Pérez, Sosa, María y Reneé, 2019).

En este trabajo se identificaron y caracterizaron hongos endófitos presentes en mazorcas sanas de *Theobroma cacao* de los municipios de Maceo y San Pedro de Urabá mediante descripción macroscópica, microscópica y estandarización de

medios de cultivo, evaluando PDA, SB, MC y Cacao. Se aislaron 5 morfotipos pertenecientes a los géneros *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis* y *Phomopsis*, donde el medio PDA favoreció el crecimiento de los hongos aislados, presentando los mayores valores de área bajo la curva (endófito 1: 387 cm<sup>2</sup>, endófito 2: 456,67 cm<sup>2</sup>, endófito 3: 338,92 cm<sup>2</sup>, endófito 4: 536,96 cm<sup>2</sup>, endófito 5: 459,24 cm<sup>2</sup>). Debido al alcance planteado en este estudio no se puede asegurar que los hongos identificados representan la diversidad de las mazorcas de cacao de los municipios muestreados. Sin embargo, los resultados de este estudio contribuyen al conocimiento de los linajes endófitos de los hongos del cacao y brindan información para futuros estudios dirigidos contra el manejo de especies fúngicas, con potencial uso en el desarrollo de alternativas agroforestales (Triana, Jiménez y Osorio, 2021).

Amin *et al.* (2019) indican que una nueva área futura de la agricultura y la silvicultura es el uso de microorganismos para promover el crecimiento de las plantas y proteger a la planta huésped de plagas y enfermedades. Un grupo de microorganismos son los hongos endófitos. El objetivo del estudio es aislar e identificar hongos endófitos de clones resistentes a cacao VSDM.05 y clones sensibles a cacao VSDM.01. Se aislaron un total de 10 aislados de hongos endófitos de los clones VSDM.05 resistentes al cacao. Los aislados pertenecieron a 6 géneros: *Curvularia Sp.*, *Fusarium Sp.*, *Geotrichum Sp.*, *Aspergillus Sp.*, *Gliocladium Sp.*, *Colletotrichum Sp.* y 4 aislamientos que no fueron identificados por no presentar conidios en medio PDA. Se aislaron hongos endófitos de clones susceptibles de cacao M.01, los cuales se identificaron en 4 géneros como *Aspergillus Sp.* y *Gliocladium Sp.*, y de 2 aislamientos que no estaban libres de conidios en medios PDA.

La investigación realizada en la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador se tomaron un total de 96 muestras de biodiversidad fúngica endófito y epífita (hojas sanas, frutos sanos y frutos con presencia de lesiones superficiales), se aislaron y para la identificación molecular, se realizaron extracciones de ADN y secuenciaciones de la región ITS de los genes ribosomales. Mediante la herramienta BLAST se comparó las secuencias del estudio con las del Banco de Genes del NCBI, de esta forma se identificaron 33 hongos a nivel de género y se obtuvieron 18 especies distintas. *Epicoccum sp.* fue

el género más abundante. *E. nigrum* fue la especie epífita más aislada; mientras que *Fusarium sp.* fue el segundo género endófito más frecuente. La diversidad de hongos endófitos y epífitos fue determinada utilizando los índices ecológicos: Riqueza de especies, Margalef, Shannon-Viewer, Simpson y Jaccard. Únicamente 3 especies fueron compartidas por las 2 localidades *Epicoccum nigrum*, *Epicoccum sp.* y *Leptosphaerulina chartarum* (Ij=0,38). Este estudio demuestra que, *Citrus sinensis* está constituido por micobiota endófito y epífita variada (Moya, 2019).

Uno de los principales problemas fitosanitarios en el cultivo de mora (*Rubus glaucus Benth*) en Ecuador es el hongo *Botrytis cinerea*, causante del moho gris. El propósito de este estudio fue determinar la capacidad antagónica de cuatro hongos contra el patógeno *B. cinerea*. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron dos microorganismos endófitos de frijol negro (*Clonostachys sp.* y *Alternaria sp.*) y aislados de *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma sp.* apartado de la colección INIAP. La técnica se utilizó dos veces. Se utilizó la escala de Bell para evaluar el antagonismo y se calculó la tasa de inhibición del crecimiento micelial para el efecto antagonista *T. asperellum* y *Trichoderma sp.* alcanzaron el grado según la escala de Bell, en el que el antagonista inhibió el crecimiento de *B. cinerea* en un 75,1 % y 73,7 %, respectivamente; mientras que *Clonostachys sp.* alcanzó el nivel II y sus esporas se observaron en los esclerocios de *B. cinerea* son parásitos. Por otro lado, *Alternaria sp.* Estaba en la clase III, que no se consideró eficaz para prevenir el crecimiento de hongos patógenos (Pincay *et al.*, 2021).

Flores (2019) utilizó 5 hongos endófitos y seis hongos patógenos desafiados en medio total de (PDA) en condiciones de oscuridad a 25 °C durante 7 días. Durante este período se midieron los ejes central y lateral de la colonia. Con estos datos se determinó el factor de forma del hongo y se calculó el crecimiento directo y el factor de forma del hongo patógeno con respecto al endófito correspondiente, el porcentaje de inhibición del crecimiento radial y el de inhibición del crecimiento zonal. Se hicieron placas con solo hongos patógenos como grupo de control; los datos se analizaron mediante análisis de varianza y se aplicó la prueba de diferencia mínima significativa para los casos estadísticamente significativos. Los resultados muestran que los endófitos son aún más fuertes contra los hongos patógenos. De esta forma se determina el efecto de control de al menos un endófito

sobre uno o más microorganismos. Esto indica su potencial utilidad como agente de control biológico (ACB) contra enfermedades forestales. La disminución del crecimiento de hongos patógenos en presencia de endófitos puede deberse a los mecanismos de acción de estos (competencia y liberación de micotoxinas) contra el patógeno. Se deben realizar pruebas in vivo para inocular endófitos de acuerdo con su ecología y con el tiempo adecuado para la colonización de la planta.

## **1.2 Bases Científicas y Teóricas de la temática**

### **1.2.1 Origen e importancia del cacao**

Arce (2019) informa que “El cacao (*Theobroma cacao L.*) cuyo significado es Alimento de los dioses, crece con temperaturas húmedas y calientes, ubicándose en las cuencas de las regiones amazónicas a 20° de latitud” (p.13).

En las décadas de los 80 y 90 el cacao en el Ecuador fue un producto económico y social al convertirse en una importante fuente de ingresos para el sustento económico de gran parte de la población costera, directa e indirectamente como generador de empleo. En la actualidad es constituido una especie primordial de los sistemas productivos de los campesinos de muchas regiones (Torres, 2018).

El cacao originario de las selvas de América Central y del Sur; mantiene una buena evolución en los climas ecuatoriales por las notables precipitaciones y las temperaturas. Inicia a ser productivo luego de 4 o 5 años; sin embargo, es entre los 8 y 10 años que se encuentra en su máxima producción, dependiendo de la variedad, así como las condiciones edafoclimáticas (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, 2019).

### **1.2.2 Producción de cacao**

En el Ecuador, el sector cacaotero exportó, en el año 2020, USD 815.5 millones y entre enero y mayo 2021, las exportaciones de la fruta alcanzan los USD 266,4 millones, montos que se aspiran superar durante este año con la contribución de las 161 citas comerciales que ha programado en el marco Aromas del Ecuador. Los principales países de destino del cacao ecuatoriano del año 2020 fueron Estados Unidos con compras por USD 198 millones, Indonesia con USD 193 millones, Malasia con USD 125 millones y Países Bajos con USD 69 millones, cifras logradas gracias a su calidad y a la promoción que hace el país a través de la triple

diversificación del comercio internacional: producto, destino y actores. (ANECACAO, 2021).

Este cultivo favorece en la economía del Ecuador, posee alta demanda en los mercados nacionales e internacionales. La exportación es considerada la mayor fuente de ingreso económico en el país, puesto que brinda fuentes de trabajo a las familias ecuatorianas en distintas áreas, mejorando sus condiciones de vida (Ártica M, 2019).

El cacao es uno de los principales cultivos del país, es uno de los que presenta una alta demanda tanto a nivel nacional como internacional. Este grano es utilizado para la producción de chocolate, generando fuentes de trabajo tanto en campo como en industrias (Anecacao, 2019).

A pesar de lo anterior planteado, en los últimos años, los problemas que se presentan en el cultivo han ido en aumento, en gran parte, por la aparición de plagas y enfermedades que atacan con más intensidad en campo. La demanda existente ha buscado alternativas para el control de dichos patógenos de forma eficaz y sin causar daños al medio ambiente, como se presenta con el caso de los controles biológicos (Gutiérrez, 2019).

### 1.2.3 Descripción taxonómica

Ramírez (2021) explica la siguiente clasificación taxonómica:

**Tabla N° 1. Taxonomía *Theobroma cacao*.**

<b>Reino</b>	Plantas (1 PLAK)
<b>Filo</b>	Magnoliophita (1MAGP)
<b>Clase</b>	Angiospermas (1ANGC)
<b>Categoría</b>	Malvides (1MAVD)
<b>Orden</b>	Malvales (1MAVO)
<b>Familia</b>	Malváceas (1MAVF)
<b>Subfamilia</b>	Byttnerioideae (1BYTS)
<b>Genero</b>	Teobroma (1THOG)
<b>Especies</b>	<i>Theobroma cacao</i> (THOCA)

Fuente: EPPO, 2001. Elaborado por: Mendoza 2023

### 1.2.4 Requerimientos edafoclimáticos del cacao

Las condiciones ambientales existentes en el lugar donde se va a implementar una plantación de cacao influyen en el desarrollo de la planta, por ende, en la producción, razón por la cual deben ser óptimas las condiciones.

Además, el clima regula el ciclo de floración, brotación y cosecha, siendo recomendable para un excelente desarrollo de las plantas (Ministerio de Agricultura del Perú, 2021).

#### **1.2.4.1. Temperatura**

La temperatura para un óptimo desarrollo fluctúa entre 23 y 25°C; si la temperatura es más baja de 21°C menor es la floración, mientras que a los 25°C es cuantiosa. De igual manera la actividad radicular se ve afectada con temperaturas menores a 15°C, así como a los 30°C limitan la capacidad de absorción de agua y nutrientes lo que disminuye la producción (Quiroz y Agama, 2022).

#### **1.2.4.2. Altitud**

La altitud se relaciona con la temperatura, de tal manera que por cada 300 m. de altura la temperatura disminuye 2 °C por ende el rango óptimo para la producción es entre los 250 a 900 m.s.n.m., reuniendo la zona ecuatorial favorables condiciones climatológicas, por lo que se puede producir hasta los 1400 m.s.n.m (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria, 2019).

#### **1.2.4.3. Precipitación**

Debe fluctuar entre 2500 mm al año de forma distribuida, considerando que esta planta es muy sensible tanto al encharcamiento como a la escasez de agua, siendo esencial un adecuado manejo del suministro para que los procesos metabólicos se efectúen y se obtenga un buen desarrollo. Como la lluvia es variante en el año, así como difiere entre las regiones, es importante determinar el manejo del cultivo más conveniente (Rimache, 2019).

#### **1.2.4.4. Viento**

Golberg (2021) explica “Que se ha observado que el viento contribuye a disminuir la temperatura foliar, produciendo un descenso del déficit de presión de vapor en la capa límite de la hoja, y consecuentemente reduciendo la tasa transpiratoria” (p.23).

#### **1.2.4.5. Humedad relativa**

La humedad óptima para el cacao es del 80%, crece bien en zonas con humedad relativa superior al 70%, sin embargo, los suelos con vientos fuertes constantes no son aptos para el cultivo del cacao, por lo que se deben incluir árboles y hojas aéreas (Ávila y Campos, 2020).

#### **1.2.4.6. Suelos**

El cacao necesita suelos profundos, ricos en materia orgánica, topografía regular y buen drenaje, que permitan un vasto desarrollo radicular; la textura adecuada para este cultivo son suelos arcillosos hasta los franco-arenosos. Se puede desarrollar en suelos con pH menores a 5,0 (ácidos), inclusive superiores a 8,0 (alcalinos); siendo óptimo que el pH esté entre 6,0 y 7,0 (Tigre, 2020).

### **1.2.5 Manejo agronómico del cacao**

#### **1.2.5.1. Primera etapa**

##### *1.2.5.1.1. Preparación del suelo*

Para el desarrollo de cacaotales es importante el suelo, debiéndose proteger de los rayos solares directos ya que degradan velozmente la capa de humus existente, siendo recomendable las sombras y mantenimiento de la hojarasca para mantener la humedad, sobre todo en los meses de sequía. Además, es importante un buen drenaje para que no existan encharcamientos (Anacafé, 2019).

##### *1.2.5.1.2. Propagación vegetativa*

El injerto de cacao debe realizarse en un árbol fuerte y sano, obtenido de semilla y cultivado en contenedores o en el campo. Es posible injertar en árboles viejos si el injerto se realiza en brotes nuevos o después de cortar la planta a una altura de 30-50 cm (ABC Agro, 2019).

##### *1.2.5.1.3. Propagación por semilla*

Actualmente, se recomienda plantar semillas certificadas para un buen rendimiento del árbol y semillas resistentes a la humedad utilizando semillas seleccionadas. Estos muestran un fuerte crecimiento de frutos y vigoroso de las

plantas. Las semillas se producen manipulando flores de clones seleccionadas para congelarlas de forma controlada durante la fertilización (Bredi, 2021).

#### **1.2.5.2. Segunda etapa**

Las prácticas de manejo que se deben desarrollar desde que el cultivo queda instalado hasta que inicia su producción son:

- El combate de malezas, la cual depende de la intensidad de luz que exista en el cacaotal, cultivo anterior y sustrato.
- El aporque se realiza con el fin de ayudar a un mejor anclaje de los árboles después de dos años de sembrada la planta.
- La fertilización varía de acuerdo con las condiciones de suelo y que a su vez depende de la etapa fenológica del cultivo.

Otra práctica fundamental son las podas periódicas, las cuales permiten modificar la conformación del árbol y a su vez facilita el control de plagas y enfermedades. Cuando esta práctica no se realiza los árboles alcanzan un gran desarrollo (10 - 20 m), con abundantes chupones y ramas con crecimientos en diferentes. Al iniciar esta etapa desaparece el cultivo de ciclo (Arciniegas, 2019).

#### **1.2.5.3. Tercera etapa**

Pinzón y Rojas (2022) afirman que “Las actividades propias del sostenimiento y manejo del cultivo en producción son las labores de poda, control de plagas, enfermedades y malezas, fertilización y finalmente la cosecha y beneficio del grano” (p.23).

#### **1.2.5.4. Cuarta etapa**

Dado que las plantaciones viejas de cacao declinan en su producción, requieren de una rehabilitación para reponer en forma total todas las plantas de cacao. Aunque el rendimiento de la plantación está influenciado por factores intrínsecos de la planta, éstos pueden ser modificados por el ambiente; por lo tanto, el propósito es rejuvenecerlas e incrementar su productividad. Un programa de rehabilitación debe hacer énfasis en la corrección de todos los factores que afecten

negativamente el rendimiento y es condición obligatoria bajarles altura a los árboles y disminuir su copa (Palencia *et al.*, 2019).

### **1.2.6 Enfermedades causadas por *Phytophthora sp***

#### **1.2.6.1. Mazorca negra**

En Ecuador se ha identificado como agente causal a la especie *Phytophthora palmivora* Butler. Sin embargo, a diferencia de la escoba de bruja o la monilla, no se considera una enfermedad económicamente importante porque suele ocurrir de forma aleatoria y depende de las condiciones ambientales y la susceptibilidad del huésped. Por esta razón, la intensidad de la enfermedad no alcanzó antes, y la lluvia y la temperatura de 18 - 20 °C son los factores más importantes en el desarrollo de la enfermedad (Aranzazu y Jaimes, 2020).

El ciclo de vida de *Phytophthora sp.* es rápido en ambientes húmedos y dura de 1 a 2 semanas. La enfermedad se presenta en todas las etapas del desarrollo del fruto y afecta a todos los tejidos de la planta, provocando canchales en el cuello, el tallo y las ramas. Las mazorcas infectadas producen esporangios que liberan zoosporas que se dispersan con el viento o el agua. Las mazorcas y los restos de tejido muerto que quedan en el suelo sirven como fuente de inóculo. Estos patógenos pueden sobrevivir durante años, completando su ciclo y resistiendo a los antibióticos y la competencia microbiana. Las zoosporas producidas en el suelo se diseminan por el agua a través del salpique durante la lluvia o el riego (Alarcon *et al.*, 2021).

Los primeros síntomas se observan en las mazorcas unas 30 horas después de la infección (entrada de *Phytophthora*), aparecen pequeñas manchas acuosas en la superficie del fruto, que oscurecen y tapan la mazorca. Entre tres y cinco días después de que aparecen los primeros síntomas, las mazorcas afectadas se vuelven blandas y necróticas por dentro, oliendo a mariscos o pescado. En el exterior, hay un micelio superficial blanco, poco compacto, que los recubre y produce esporangios. Si la infección ocurre en mazorcas casi maduras, sus granos pueden estar intactos (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), 2019).

### 1.2.7 Hongos endófitos

Son microorganismos que viven y crecen en los tejidos internos de las plantas que no presentan síntomas de enfermedad. Diversos estudios han demostrado que los HE cubren todos los grupos taxonómicos de plantas cuando viven en diferentes ambientes. Por lo tanto, los hongos endófitos constituyen una parte importante de la diversidad de hongos en la Tierra (García *et al.*, 2022).

Existen algunos hongos que actúan como patógenos en algunas especies de plantas y como endófitos en otras especies. A veces se presentan como saprofitos y también como hongos patógenos latentes y causan síntomas cuando la planta se debilita o entra en la etapa de senescencia (Arnold, 2022).

La clasificación actual de los HE, es en Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos, con base en su filogenia e historia de vida. Los de tipo Clavicipitáceos son mutualistas que defienden a su hospedero del ataque de herbívoros y colonizan los pastos y su transmisión es vertical. Mientras que los no Clavicipitáceos, colonizan las plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas; su transmisión es horizontal (Partida, 2021).

Los HE establecen una relación simbiótica; se alimentan de los nutrientes sintetizados por las plantas, y las plantas a su vez se benefician de los metabolitos bioactivos que producen (alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides, glucósidos, lignanos, lactonas, etc.) con una amplia gama de actividades biológicas (antifúngica, antibiótica e insecticida) (Chowdhary y Kaushik, 2015). De esta forma, el desarrollo de la planta hospedera y los productos naturales contribuyen a la protección contra la tolerancia al estrés, cambios de temperatura y salinidad, así como resistencia a enfermedades causadas por herbívoros, insectos, nemátodos, bacterias y hongos patógenos (Kaul *et al.*, 2019).

Las asociaciones simbióticas de los hongos endófitos con sus hospederos son variables desde mutualismo, parasitismo o saprofismo. Durante el mutualismo y el parasitismo, existe una relación simbiótica entre grupos de endófitos y su hospedero, durante el parasitismo puede ocasionar daños en cualquier momento de la simbiosis. Durante el saprofismo, ninguno de los socios que interactúan salen afectados y los beneficios dependen de ambos, de esta manera se da un equilibrio

antagónico. El endofitismo se manifiesta de manera discreta, transitoria, asintomática dentro de la planta, con el establecimiento completo de los endófitos al interior de los órganos y tejidos (Kusari y Spiteller, 2019).

### 1.3 Fundamentación legal

#### **Constitución de la República del Ecuador (2008)**

**Art.13.-** Las personas y colectividades tienen derecho al acceso seguro y permanente a alimentos sanos, suficientes y nutritivos; preferentemente producidos a nivel local y en correspondencia con sus diversas identidades y tradiciones culturales. El Estado ecuatoriano promoverá la soberanía alimentaria (p.13).

**Art. 74.-** Las personas, comunidades, pueblos y nacionalidades tendrán derecho a beneficiarse del ambiente y de las riquezas naturales que les permitan el buen vivir. Los servicios ambientales no serán susceptibles de apropiación; su producción, prestación, uso y aprovechamiento serán regulados por el Estado (p.52).

**Art. 396.-** El Estado adoptará las políticas y medidas oportunas que eviten los impactos ambientales negativos, cuando exista certidumbre de daño. En caso de duda sobre el impacto ambiental de alguna acción u omisión, aunque no exista evidencia científica del daño, el Estado adoptará medidas protectoras eficaces y oportunas. La responsabilidad por daños ambientales es objetiva. Todo daño al ambiente, además de las sanciones correspondientes, implicará también la obligación de restaurar integralmente los ecosistemas e indemnizar a las personas y comunidades afectadas. Cada uno de los actores de los procesos de producción, distribución, comercialización y uso de bienes o servicios asumirá la responsabilidad directa de prevenir cualquier impacto ambiental, de mitigar y reparar los daños que ha causado, y de mantener un sistema de control ambiental permanente. Las acciones legales para perseguir y sancionar por daños ambientales serán imprescriptibles (p.178).

**Art. 401.-** Se declara al Ecuador libre de cultivos y semillas transgénicas. Excepcionalmente, y sólo en caso de interés nacional debidamente fundamentado por la Presidencia de la República y aprobado por la Asamblea Nacional, se podrán introducir semillas y cultivos genéticamente modificados. El Estado regulará bajo estrictas normas de bioseguridad, el uso y el desarrollo de la biotecnología moderna y sus productos, así como su experimentación, uso y comercialización. Se prohíbe la aplicación de biotecnologías riesgosas o experimentales (p. 179).

#### **Ley Orgánica De Sanidad Agropecuaria**

**Art. 4.-** De los fines.- La presente Ley tiene las siguientes finalidades: a) Garantizar el ejercicio de los derechos ciudadanos a la producción permanente de alimentos sanos, de calidad, inocuos y de alto valor nutritivo para alcanzar la soberanía alimentaria; b) Impulsar procesos de investigación e innovación tecnológica en la producción de alimentos de origen vegetal y animal que cumplan las normas y desarrollo de estándares de bienestar animal, que mejoren el acceso a los mercados nacionales e internacionales; c) Fortalecer el vínculo

entre la producción agropecuaria y el consumo local mediante la tecnificación de los procesos fito y zoonosanitarios de control y aseguramiento de la calidad de los productos agropecuarios; d) Garantizar que la cadena de producción pecuaria cumpla con los estándares de bienestar animal que se establezcan en el reglamento de esta Ley y buenas prácticas zoonosanitarias.

**Art. 5.- Derechos garantizados.** - Esta Ley garantiza y procura a las personas, comunidades, pueblos, nacionalidades y colectivos el ejercicio de los derechos a la salud, a la alimentación, a un ambiente sano, equilibrado ecológicamente y los derechos de la naturaleza de conformidad con la Constitución y la Ley (Agrocalidad, 2022).

## CAPÍTULO 2

### ASPECTOS METODOLÓGICOS

#### 2.1 Métodos

Método inductivo: Se pudo observar los resultados que se podrían alcanzar con los objetivos e hipótesis establecidos.

Método deductivo: Se logró visualizar los casos particulares de la investigación; es decir, las variaciones que ocurrían en los procesos de laboratorio y vivero del manejo de los hongos endófitos y el patógeno.

Método analítico: Se uso para conocer la relación entre los tratamientos y el efecto sobre el fitopatógeno en estudio.

#### 2.2 Modalidad y Tipo de Investigación

Se realizó de tipo experimental, con un enfoque investigativo de laboratorio y vivero en la cual se describió el desarrollo del efecto de los hongos endófitos encontrados como alternativa de control de *Phytophthora sp.* en hojas del cultivo de cacao (*Theobroma cacao L.*).

#### 2.3 Variables

##### 2.3.1 Variable independiente.

Hongos endófitos en laboratorio para la inhibición del fitopatógeno *Phytophthora sp.*

##### 2.3.2 Variable dependiente

##### **Variables por medir en laboratorio**

**Caracterización del hongo:** Se realizó comparando las características morfológicas de la colonia (textura, tipo de micelio, color, tipo de hifas) y se tomaron medidas de forma y tamaño de estructuras, las cuales se compararon con claves taxonómicas de identificación en un sistema de micro cultivo utilizando un microscopio óptico Olympus a diferentes magnificaciones.

**Crecimiento micelial del hongo patógeno (mm):** A los 6 días se realizó la medición del crecimiento del micelio del hongo en la caja Petri con medio AGAR AGAR POWDER en combinación con medio V8 con reajuste de ph con ácido clorhídrico utilizando 10 ml por cada 100 ml de medio.

**Crecimiento micelial de los hongos endófitos (mm):** A los 6 días se realizó la medición del crecimiento del micelio del hongo en la caja Petri con medio PDA.

**Porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC):** A las 24, 48 y 72 horas, se midieron los radios de las colonias de los hongos endófitos con las interacciones con el patógeno dando la media obtenida de las muestras a las 72 horas y se estableció el PIC usando la siguiente fórmula utilizada por (Skidmore & Dickinson, 1976):  $PIC = [(crecimiento\ del\ testigo - crecimiento\ del\ tratamiento) / crecimiento\ del\ testigo] \times 100$ . Los datos obtenidos se analizaron mediante prueba de Tukey.

### **Variables en vivero**

**Evaluación de los hongos:** En hojas sueltas del cacao se asperjo con los microorganismos en estudio, se observó la reacción del tejido y posteriormente se verificó en campo.

**Prueba de eficacia:** 20 plantas de cacao de 4 meses de edad, 10 variedad nacional y 10 CCN-51 se trataron con los endófitos y el hongo *Phytophthora sp.*

**Severidad de enfermedad:** Se realizaron evaluaciones de las hojas a los 4 días después de la inoculación utilizando una escala de 0-5:

**Tabla N°2. Escala de evaluación según el tamaño e intensidad de síntomas**

<b>Escala</b>	<b>Síntomas</b>
0	Ausencia de síntomas
1	Manchas necróticas muy pequeñas
2	Mayor número y tamaño de manchas marrones o necróticas
3	Coalescencia de las manchas marrones dentro del tamaño de las lesiones de la gota de inóculo
4	Lesiones marrones uniformemente grandes
5	Lesiones marrones muy grandes, frecuentemente se expande fuera del área cubierta por la gota de inoculación.

**Fuente: Nyasse, 1995. Elaborado por: Mendoza, 2023.**

### 2.3.3 Operacionalización de las variables

TIPO DE VARIABLE		DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	TIPO DE MEDICIÓN	INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN
<b>INDEPENDIENTE</b>	Identificación de especies	Evaluación en laboratorio y vivero de los diferentes hongos endófitos seleccionados en la inhibición del fitopatógeno <i>Phytophthora sp.</i>	Identificar los hongos endófitos de las hojas del cacao	Crecimiento micelial	Cuantitativa	Mediante la observación microscópica para identificar su morfología
<b>DEPENDIENTE</b>	Control de fitopatógeno		Crecimiento micelial del hongo en mm Evaluación de los hongos endófitos Eficacia de microorganismos	Porcentaje de inhibición del hongo  Presencia de daños en hojas Presencia de síntomas en hojas	Cuantitativa	Registros de laboratorio y vivero  Escala de severidad

## **2.4 Población y Muestra**

### **2.4.1 Población**

La población considerada para la realización del presente estudio estuvo conformada por plántulas de cacao de variedades Nacional y CCN-51 en el cantón El Empalme, provincia del Guayas, Ecuador.

### **2.4.2 Muestra**

Para la investigación en vivero con la prueba de patogenicidad, se usó 80 hojas de cacao de 4 meses de edad; 40 de cacao nacional y las restantes de CCN-51 escogiendo las hojas que presentaban mejor característica y no evidenciaba algún problema.

## **2.5 Técnica de Recolección de Datos**

La técnica que se empleó en esta investigación es la observación directa en el laboratorio y vivero, con el uso de equipos y herramientas para la medición de las variables que permitan establecer la eficiencia de los hongos endófitos sobre el patógeno *Phytophthora sp.*

## **2.6 Estadística Descriptiva e Inferencial.**

Se analizaron los datos recolectados para verificar la normalidad de los datos con la prueba de Shapiro-Wilks. Para establecer las diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos se aplicó la prueba de Kruskal Wallis, para la comparación de medias de resultados de los tratamientos, usando el Software estadístico Infostat.

### **Manejo del ensayo en vivero**

Se lo realizó con la extracción de semillas de las mazorcas de cacao tanto Nacional como CCN-51.

Preparación de la semilla: Las mazorcas se seleccionaron en madurez fisiológica para obtener mejores semillas; se cortaron con machete, luego se realizó la limpieza del mucilago en cada semilla con agua y se secaron al sol para quitar residuos de cada mazorca.

Germinación: Después de terminar el proceso de secado se procedió a introducirlas a una profundidad aproximado de 1 cm de forma vertical en las fundas de polietileno de 15 x 20 cm con contenido de sustrato de tierra negra y turba equivalente al total de 1.5 kg, estas se colocaron en condiciones de 50% de sombra con humedades y temperaturas óptimas para su germinación.

## **Manejo del ensayo en laboratorio**

### **Patógeno:**

Toma de muestra: En campo se tomó muestras del fitopatógeno en el cultivo con síntomas correspondientes a la enfermedad.

Manipulación de muestra: La muestra se trasladó al laboratorio, donde se realizó su respectiva identificación.

Caracterización del fitopatógeno: Se realizó mediante observación de microscopio y revisión de literatura. Posteriormente se realizará el aislamiento en caja Petri con sus respectivos repiques, constatando la presencia de fitopatógeno. Se tomo en cuenta para la identificación las características del micelio, color de la colonia, forma, tamaño y color de los conidios con observaciones microscópicas realizando montajes en portaobjetos (Volcy, 2008).

Cultivo del fitopatógeno: En cajas Petri con medio AGAR AGAR POWDER y medio V8, con un periodo de incubación de 3 a 7 días. *Phytophthora sp.* se aisló y conservo en el medio establecido a 25°C.

### **Hongos endófitos:**

Aislamiento de hongos endófitos: Se escogió hojas de las plántulas y se lavaron con agua destilada, luego se cortaron la lámina foliar en fragmentos de 1 cm<sup>2</sup> de cada lado de la nervadura central, se desinfectaron de manera consecutiva con etanol (70 % / 2 min), hipoclorito de sodio (0.5 % / 2 min) y enjuagados con agua destilada estéril por 3 veces.

Purificación de hongos endófitos: Se secaron los fragmentos sobre papel toalla estéril, se sembrarán en medio de cultivos PDA.

Preservación de hongos endófitos: En cada caja de Petri se sembraron 4 fragmentos de hoja y se incubaron a 26°C en oscuridad. Se aislaron todas las colonias con morfología diferente durante 10 días y se purificaron en PDA.

Identificación morfológica: Se realizó mediante observación de microscopio y revisión de literatura. Posteriormente; el aislamiento en caja Petri con sus respectivos repiques, constatando la presencia del hongo endófito. Se tomó en cuenta para la identificación las características del micelio, color de la colonia, forma, tamaño y color de los conidios con observaciones microscópicas realizando montajes en portaobjetos

## **Ensayo de antagonismo y patogenicidad con el total de aislados**

### **Antagonismo in vitro mediante cultivos duales**

Inhibición de crecimiento del patógeno: Cada endófito se enfrentó con el patógeno por la técnica de cultivos duales, las placas se incubaron en la oscuridad a 26°C y se tomarán medidas por 3 días consecutivos del crecimiento micelial de cada uno. Se repitió 3 veces para cada tratamiento teniendo en cuenta la cantidad de hongos endófitos encontrados para la evaluación; incluyendo el respectivo control. Como control se sembrará el patógeno en la caja separada.

### **Patogenicidad en hojas de plántulas**

Empleo de actividad: Las hojas se lavaron con agua destilada y se realizó 1 punto de inoculación (heridas) en la nervadura central de la hoja. Después, se asperjó cada cepa endófito por cada tratamiento. Luego se inoculó cada hoja con discos de 3,5 mm de diámetro del patógeno sobre la herida ya realizada. Se realizó 10 réplicas por cada tratamiento. Las hojas fueron colocadas en bolsas plásticas conteniendo papel filtro húmedo para mantener 100% de humedad y se incubaron a 26°C en oscuridad.

## **2.7 Diseño Experimental.**

La investigación se implementó en condiciones controladas con un diseño completamente al azar (DCA Factorial) para los experimentos en hojas de cacao,

los experimentos serán compuesto por 8 tratamientos y 10 repeticiones de cada uno para un total de 80 unidades experimentales.

**Tabla N°3. Esquema ANDEVA**

Fuentes de Variación	Fórmula	Grados de Libertad
Factor A (Microorganismos benéficos)	$A - 1$	2
Factor B (Variedad de cacao)	$B - 1$	1
Interacción A x B	$(A-1) (B-1)$	2
Error experimental	$(N-1) -(A-1) -(B-1) - (A-1) (B-1) -(r-1)$	7
Total	$N - 1$	79

Elaborado por: Mendoza, 2023

### 2.7.1 Tratamientos

Los tratamientos están basados en el control de *Phytophthora sp* a base de hongos endófitos encontrados.

**Tabla N°4. Tratamientos de ensayo como antagonista de microorganismos benéficos contra *Phytophthora sp.* en caja Petri**

N°	Descripción	Repetición
T1	Endófito ( <i>Trichoderma sp.</i> )	3
T2	Endófito ( <i>Fusarium sp.</i> )	3
T3	Endófito ( <i>Lasiodiplodia sp.</i> )	3
T4	Control (patogeno aislado)	3

Elaborado por: Mendoza, 2023

**Tabla N°5. Tratamientos de ensayo con microorganismos benéficos en hojas de cacao**

N°	Factor A	Factor B	Código	Repeticiones
T1	<i>Trichoderma sp.</i>	Nacional	A1 B1	10
T2	<i>Fusarium sp.</i>	Nacional	A2 B1	10
T3	<i>Lasiodiplodia sp.</i>	Nacional	A3 B1	10
T4	Testigo (agua destilada)	Nacional	A4 B1	10
T5	<i>Trichoderma</i>	CCN-51	A1 B2	10
T6	<i>Fusarium sp.</i>	CCN-51	A2 B2	10
T7	<i>Lasiodiplodia sp.</i>	CCN-51	A3 B2	10
T8	Testigo (agua destilada)	CCN-51	A4 B2	10

Elaborado por: Mendoza, 2023

## 2.8 Cronograma de actividades

Actividades	Mayo 2023	Mayo 2023	Julio 2023	Agosto 2023	Septiembre 2023	Octubre 2023	Noviembre 2023	Enero 2024	Enero 2024
Elaboración del anteproyecto	■	■	■						
Revisiones tutor y estadística			■						
Sustentación y aprobación del anteproyecto			■	■					
Recolección de muestras					■				
Experimento en Laboratorio					■	■			
Experimento en vivero						■	■		
Experimento en campo						■	■		
Recolección de datos							■	■	
Análisis de datos								■	
Culminación de tesis								■	
Revisiones tutor y estadística									■
Sustentación de tesis									■

Elaborado por: Mendoza, 2023

## RESULTADOS

### Análisis del crecimiento micelial y características morfológicas de hongos endófitos mediante crecimiento en caja Petri.

#### Crecimiento micelial del hongo (mm)

Las colonias de los hongos tanto el patógeno como los endófitos seleccionados fueron evaluadas a los 6 días con el vernier, registrando los valores del crecimiento del halo micelial correspondiente. Las medias del crecimiento micelial están indicadas en milímetros como se indica en la tabla 6.

Tabla N°6. Crecimiento micelial de hongos (mm)

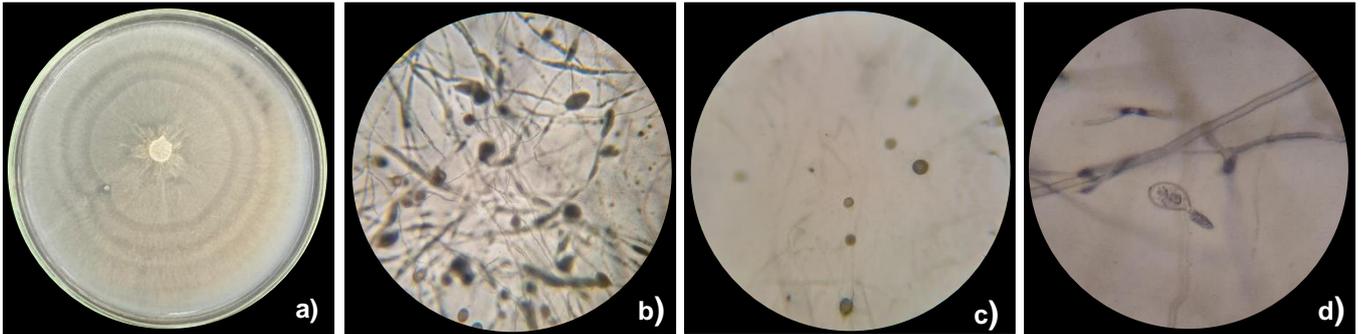
N°	Descripción	Medias
T1	Endófito 1 ( <i>Trichoderma sp.</i> )	55,58
T4	Control ( <i>Phytophthora sp.</i> )	54,20
T2	Endófito 2 ( <i>Fusarium sp.</i> )	42,02
T3	Endófito 3 ( <i>Lasiodiplodia sp.</i> )	40,20
Coef. Variación %		N/A

Promedios no difieren significativamente, según la prueba de Kruskall Wallis al 5% de significancia  
Elaborado por: Mendoza, 2023

No hay una diferencia significativa en el crecimiento micelial entre los diferentes tipos de hongos teniendo en cuenta que el T1, T2 y T3 fueron preparados en medio PDA a diferencia del Patógeno T4 en medio V8, se observó que el T1 presentó resultados similares al T4 con cubrimiento total de la caja Petri constituyen a un desarrollo ágil en sus respectivos medios, que comparados con el T2 y T3 registraron un crecimiento menor en el desarrollo *in vitro*. Esto sugiere que el crecimiento no difiere entre estos tipos de hongos en las condiciones y muestras evaluadas.

#### Características morfológicas

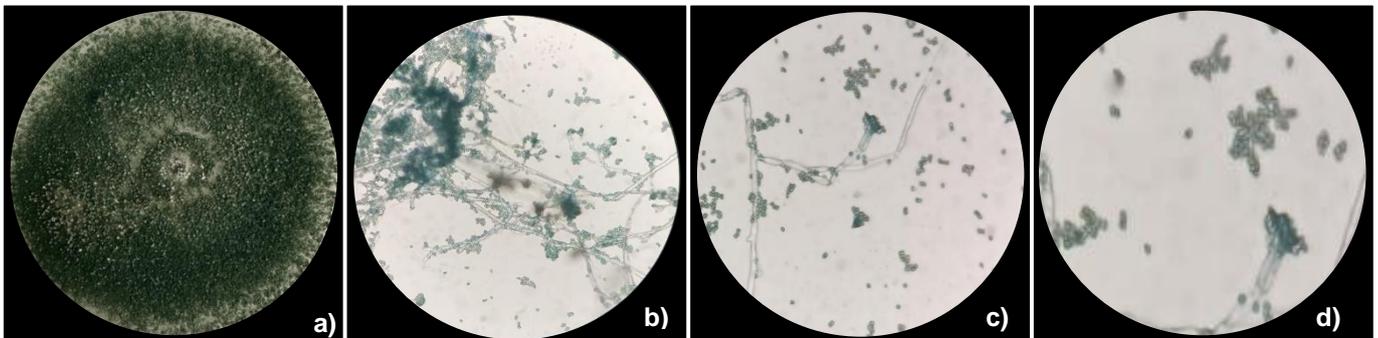
Para la obtención de la cepa monospórica del fitopatógeno (Ver Anexo 1), *Phytophthora palmivora* morfológicamente presentó una colonia en desarrollo radial con aspecto algodonoso, de color blanco y grisáceo con cubrimiento total de la caja Petri en el medio V8. Los esporangios presentaron una forma alargada esférica, con un ligero parecido a una pera, presentan color translucido u oscuro. Las hifas son septadas y una apariencia torcida.



Anexo N° 1. Cepa monospórica de *Phytophthora palmivora* aislada de mazorca de cacao.  
 a) Forma y color de colonia. b) Hifas septadas. c) Esporangios. d) Clamidospora.  
 Elaborado por: Mendoza, 2023

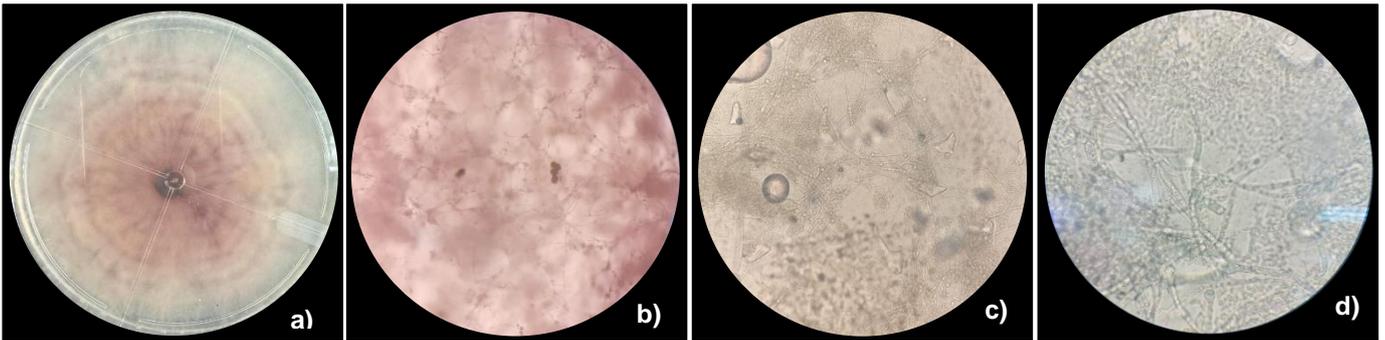
Las observaciones realizadas en microscopio en los medios de cultivo PDA obtenidos a partir de los hongos endófitos purificados de las hojas sanas mostraron que las plántulas de cacao morfológicamente presentan los siguientes:

*Trichoderma sp.* presentó una colonia en crecimiento radial rápido con aspecto al inicio de color blanco después de unos días se tornó verde con cubrimiento total de la caja Petri por su rápida esporulación. Los conidióforos se presentaron de una forma alargada ramificada, las fiálides presentaron una forma alargada estrecha. Los conidios se presentaron en grandes cantidades con tamaños pequeños y ya maduros (Ver Anexo 2).



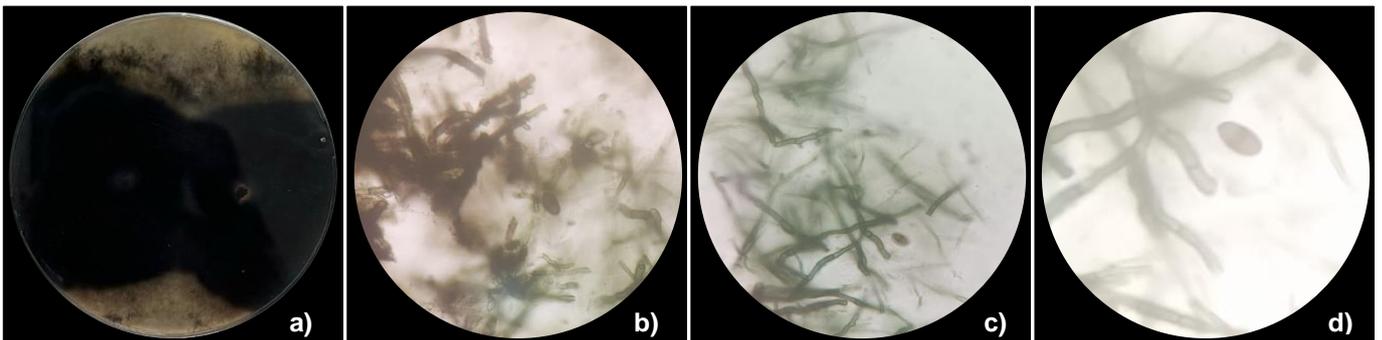
Anexo N° 2. Cepa monospórica de *Trichoderma sp.* aislada de hojas de cacao.  
 a) Forma y color de colonia. b) Conidióforos. c) Fiálides. d) Conidios.  
 Elaborado por: Mendoza, 2023

*Fusarium sp.* Presentó una colonia de color violeta con anillos radiales a medida que crecía. Las clamidosporas se presentaron de una forma globosa de forma intercalada, las macroconidias presentaron una forma curvada con varios septos. Los microconidios se presentaron en grupos con tamaños pequeños y producidos en cadenas con aspecto a un riñón (Ver Anexo 3).



Anexo N°3. Cepa monospórica de *Fusarium sp.* aislada de hojas de cacao.  
a) Forma y color de colonia. b) Clamidosporas. c) Macroconidias. d) Microconidias.  
Elaborado por: Mendoza, 2023

*Lasiodiplodia sp.* (Ver Anexo 4) se caracterizó por un desarrollo micelial de color blanco, tornándose cenizo oscuro, hasta volverse negro. Los picnidios agrupados son de color negro. Las hifas se mostraron septadas, formando conidióforos cortos y simples, que a la postre generan conidios. Las conidias se presentaron en estado maduro de forma septadas con estrías longitudinales de color marrón oscuro.

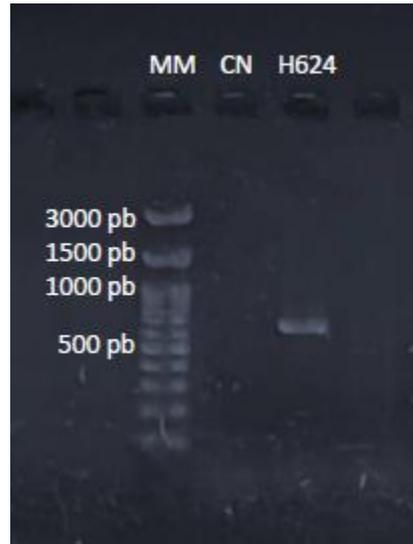


Anexo N°4. Cepa monospórica de *Lasiodiplodia sp.* aislada de hojas de cacao.  
a) Forma y color de colonia. b) Picnidios. c) Hifas septadas. d) Conidias.  
Elaborado por: Mendoza, 2023

### Evaluación del nivel de antagonismo de las cepas de hongo endófito contra

#### *Phytophthora sp.*

Se obtuvo ADN de alta calidad para el proceso de amplificación, visualizándose una banda de aproximadamente 600 pb correspondientes al marcador ITS: ITS1/ITS4. La secuencia de la región ITS del hongo aislado de *Phytophthora sp.* resultó en un 100% similar a la del hongo *Phytophthora palmivora*. Por esta razón, el hongo de micelio estéril se clasificó en categoría de especie. La secuencia se envió al GenBank y presentó el número de acceso MG865559.1 (Ver Anexo 5).



**Anexo N°5. Identificación molecular *Phytophthora palmivora* mediante PCR por tamaño de fragmento de Internal Transcribed Region (ITS).**  
Elaborado por: Mendoza, 2023

Las colonias de *Phytophthora palmivora* con los tratamientos endófitos a través del agar con medio V8 preparado fueron evaluadas a las 24, 48, 72 horas mediante la técnica de cultivo dual de acuerdo con la prueba de inhibición, registrando los valores del crecimiento del halo micelial correspondiente al fitopatógeno en estudio. Las medias del crecimiento micelial están indicadas en milímetros como se indica en la tabla 7.

**Tabla N°7. Prueba de antagonismo de hongos endófitos de cacao contra patógeno *Phytophthora palmivora*.**

N°	Descripción	<sup>1</sup> Crecimiento (mm)			% de inhibición
		24 h	48 h	72 h	
T1	Endófito ( <i>Trichoderma sp.</i> )	65,00 a	53,33 a	18,33 a	18,4
T2	Endófito ( <i>Fusarium sp.</i> )	28,33 b	13,67 c	5,33 b	3,3
T3	Endófito ( <i>Lasiodiplodia sp.</i> )	37,00 b	29,00 b	21,67 a	21,5
	Significancia MLMG	**	**	**	
	<b>Desviación</b>	0,3	0,24	0,26	

\*\* Diferencias altamente significativas

<sup>1</sup>Medias en cada columna con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Elaborado por: Mendoza, 2023

Las características morfológicas del patógeno en los 3 tratamientos fueron distintas. En el T1, el hongo endófito presentó la mayor biomasa y crecimiento algodonoso en comparación con los otros dos tratamientos, además de tener un crecimiento mucho más acelerado. El T2, el hongo endófito creció más lentamente en comparación con lo observado en el T3. Al cabo de las 72 horas en el medio V8, *P. palmivora* se inhibió en un 18,4% el T1, mientras que el T3 la inhibición en su

crecimiento fue de un 21,5%. En el T2 la mayoría de las pruebas duales no se inhibió el crecimiento de *P. palmivora* dando como inhibición un 3,3 %. La prueba obtenida para *P. palmivora* en los medios jugo V8 mostró diferencias altamente significativas entre las pruebas duales ( $p > 0,05$ ). En el anexo 13 se pueden observar las diferencias entre los microorganismos y el patógeno, aunque no se evidenciaron diferencias marcadas entre los tratamientos debido al jugo V8 siendo este un medio con características que agiliza la esporulación del patógeno.

### **Determinación de la susceptibilidad del cacao Nacional y CCN-51 mediante inoculación de hojas contra *Phytophthora sp.***

El tratamiento antagonista utilizado contra el patógeno se evaluó la inhibición del crecimiento fúngico mediante lesión a las 96 horas de inoculación para determinar la susceptibilidad del hongo *P. palmivora* y el grado de influencia para el cultivo de las plantas en ensayo, teniendo en cuenta que las plantas en estudio se encuentran en etapa vegetativa puede influir este patógeno tanto en etapa reproductiva como productiva de la planta al intervenir en la calidad de la fruta. Los niveles de daño causado por fitopatógenos se muestran en la tabla 8.

**Tabla N°8. Susceptibilidad de hojas de cacao con aplicación de hongos endófitos**

Nº	Factor A	Factor B	<sup>1</sup> Crecimiento lesión (mm)			
			24 h	48 h	72 h	96 h
T1	<i>Trichoderma sp.</i>	Nacional	08,00 cd	12,50 c	15,60 b	15,60 d
T2	<i>Fusarium sp.</i>	Nacional	08,70 bcd	13,80 bc	19,20 b	27,40 c
T3	<i>Lasiodiplodia sp.</i>	Nacional	11,50 abc	17,80 ab	25,50 a	31,20 bc
T4	Testigo (agua destilada)	Nacional	12,66 ab	20,69 a	28,60 a	35,80 ab
T5	<i>Trichoderma sp.</i>	CCN-51	06,80 d	10,30 c	15,90 b	15,90 d
T6	<i>Fusarium sp.</i>	CCN-51	09,00 bcd	14,20 bc	19,70 b	28,00 c
T7	<i>Lasiodiplodia sp.</i>	CCN-51	11,40 abc	17,80 ab	25,50 a	31,20 bc
T8	Testigo (agua destilada)	CCN-51	13,08 a	20,19 a	27,80 a	37,90 a
Significancia ANOVA Factor A:		**				
Significancia ANOVA Factor B:		ns				
Significancia ANOVA Factor AB:		*				
Coef. Variación %:		N/A				

\*\* Diferencias altamente significativas. ns Diferencias no significativo. \*Diferencias significativas  
N/A coeficiente no disponible

<sup>1</sup>Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Elaborado por: Mendoza, 2023**

Al finalizar la aplicación de los endófitos por tratamiento luego de las 96 horas de aplicación mostraron lo siguiente: Los tratamientos T1 y T5 presentaron menor grado de severidad en la infección de *P. palmivora*; de tal forma que es el tratamiento con el mejor resultado para controlar la enfermedad, produciéndose el

menor daño en comparación de los otros. En cuanto a los tratamientos T2, T3, T6 y T7, los resultados mostraron medias entre el 2 y el 4 en la escala de área foliar afectada, con necrosis visibles tanto en el haz como en el envés de las hojas. Finalmente, los tratamientos T4 y T8 alcanzaron el grado 5 en la escala, con un área foliar afectada, presentando un aumento en el grosor y la longitud de la lesión de necrosis. El tipo de hongo tiene un efecto significativo en el crecimiento observado en los diferentes tiempos, mientras que la variedad del cultivo no muestra un efecto significativo. Sin embargo, la interacción entre el tipo de hongo y la variabilidad del cultivo es significativa, indicando que el crecimiento de los hongos depende de la combinación específica de estos dos factores.

## DISCUSIÓN

En este estudio, se evaluó la eficiencia de los hongos endófitos contra *Phytophthora palmivora* en condiciones controladas; además se realizó pruebas de susceptibilidad para establecer la inhibición de la enfermedad. Las pruebas establecieron los siguientes hechos:

De acuerdo con las observaciones empleadas en este el fitopatógeno *P. palmivora* cultivado en cajas Petri con medio AGAR AGAR POWDER y jugo V8; las características mencionadas sobre el aspecto y coloración del micelio son similares a las encontradas por Arce (2019), estos cambios, desde un color blanquecino hasta una apariencia algodonosa, están relacionados con la humedad y temperatura en la que crece el hongo. Los conidios obtenidos de *P. palmivora* fueron claros, alargados, cilíndricos, ligeramente curvados, con ápice y septos más delgados como describe Chavez (2016), los cuales también muestran variabilidad en el tamaño de las hifas y la ramificación debido a las condiciones ambientales y al origen del material vegetal.

Bajo condiciones *in vitro*, los tratamientos experimentales mostraron variaciones significativas en las variables de crecimiento micelial al ser analizados mediante pruebas estadísticas. Estas diferencias significativas indicaron que los hongos endófitos afectaron el desarrollo del fitopatógeno. Se observó que los tratamientos con endófitos inhibieron el crecimiento del hongo, mientras que, en ausencia de endófitos, el medio resultó adecuado para la formación de colonias. Esto concuerda con Mejía et al. (2021), quien señala que los hongos endófitos contienen metabolitos secundarios con propiedades biológicas que actúan como defensa contra patógenos. Por lo tanto, se acepta la hipótesis de que la aplicación de hongos endófitos permitirá controlar a *P. palmivora*.

Al analizar el nivel de daño causado por *P. palmivora* en las plantas después de los tratamientos, se evidenciaron diferencias en el experimento y en el impacto del fitopatógeno sobre las hojas estudiadas. Los datos obtenidos demuestran el efecto positivo del tratamiento con hongos endófitos en el control del patógeno, ya que no se observaron lesiones graves en las hojas de las plantas. Estos resultados son consistentes con los estudios de Moya (2019) y Partida (2021), quienes afirman que el uso de hongos endófitos como agentes de control biológico fortalece las plantas y les proporciona protección durante un período más prolongado.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

Con los datos obtenidos en el ensayo experimental realizado en vivero y laboratorio, se concluyó lo siguiente:

Se encontró una diversidad de hongos endófitos foliares en las plantas de cacao de las variedades muestreadas, de los cuales han sido reportados como patógenos.

En condiciones *in vitro*, las características morfológicas del hongo son claramente visibles mediante cambios en el tamaño del micelio, influenciados por variaciones de temperatura y los principios activos utilizados para su control.

Las cepas de *Trichoderma sp.* fueron las más destacadas, presentando altos porcentajes de inhibición y micoparasitismo, siendo especialmente efectivas contra *Phytophthora palmivora*.

Las especies con mayor capacidad de colonización fueron *Trichoderma sp.*, *Fusarium sp.* y *Lasiodiplodia sp.* Estas especies son más abundantes en el cacao como endófitos, lo que demuestra su capacidad para colonizar rápidamente las hojas evaluadas.

### Recomendaciones

Considerando los resultados de este estudio, se pueden hacer las siguientes recomendaciones:

En ensayos futuros con las cepas de *Trichoderma sp.*, se puede investigar la obtención de compuestos bioactivos útiles para reducir las principales enfermedades causadas por *Phytophthora palmivora*.

Es importante evaluar el micoparasitismo presentado por los hongos endófitos y los patógenos para comprender las diferentes interacciones de las hifas, como el enrollamiento o la penetración.

También es esencial investigar cómo los metabolitos secundarios inhiben el crecimiento de los patógenos, ya que esto podría deberse a la inhibición del desarrollo de los conidios y el crecimiento de los tubos germinativos de los hongos patógenos.

Analizar el comportamiento de la enfermedad con la aplicación de hongos endófitos en comparación con tratamientos convencionales.

Es necesario confirmar con más estudios la patogenicidad y el endofitismo de los aislados endófitos seleccionados mediante ensayos en invernadero y campo.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- ABC Agro. (2019). *El cultivo de cacao*. Obtenido de <http://www.abcagro.com/herbaceos/industriales/cacao2.asp>
- Agrocalidad. (6 de mayo de 2022). *Normativa para promover y regular la producción orgánica en el Ecuador*. Obtenido de <https://n9.cl/4nacb>
- Alarcon, J., Arévalo, E., Díaz, A., Galindo, R., & Rosero, A. (2021). *Manejo Fitosanitario del Cultivo de Cacao (Theobroma cacao L.) Medidas para el Temporal Invernal*. Bogota: Produmedios.
- Amin, N., Salam, M., Junaid, M., & Said, M. (2019). Isolation and identification of endophytic fungi from cocoa plant resistente VSD M.05 and cocoa plant Susceptible VSD M.01 in South Sulawesi, Indonesia. *Current Microbiology and Applied Sciences*, 459-467.
- Anacafé. (2019). *Cultivo del cacao*. Guatemala.
- ANECACAO. (2021). *Estadísticas de exportación de cacao del Ecuador*. Obtenido de <http://www.anecacao.com/es/estadisticas/estadisticas-actuales.html>
- ANECACAO, A. N. (2019). *Cacao CNN-51*. Obtenido de <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/cacaoccn51.html>
- Aranzazu, F., y Jaimes, Y. (2020). *Manejo de enfermedades del cacao (Theobroma cacao L) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)*. CORPOICA. Obtenido de <https://n9.cl/mpwia9>
- Arce, M. (2019). *Manual del cultivo de cacao*. Perú.
- Arciniegas, L. (2019). *Caracterización de árboles superiores de cacao (Theobroma cacao L.) seleccionados por el programa de mejoramiento genético del CAITE*. Turrialba, Costa Rica: CATIE.
- Arnold, E. (2022). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 51-66. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.003>
- Ártica, M. (2019). *Cultivo de cacao*. Perú: Manual técnico Macro S.A.
- Ávila, A., y Campos, M. (2020). *Diseño y Establecimiento de Cacao Bajo Sistemas Agroforestales*. Nicaragua.
- Baralt, A., Fernández, R., Sosa, D., Iztúriz, M., Parra, D., & Pérez, S. (2020). *Identificación preliminar de hongos endófitos cultivables presentes en hojas*

- y frutos de cacao. Miranda: Instituto de Estudios Avanzados (IDEA=). Obtenido de <https://n9.cl/qgz6a>
- Bini, F., Pellegrini, A., y Quattrucci, A. (2021). Hongos endófitos del cacao (*Theobroma cacao* L.) y su potencial para el control biológico de fitopatógenos. *Agricultura*, 8(5), 67.
- Bredi. (2021). *Cultivo de cacao*. Obtenido de [http://www.bedri.es/Comer\\_y\\_beber/Chocolate/Cultivo\\_del\\_cacao.htm](http://www.bedri.es/Comer_y_beber/Chocolate/Cultivo_del_cacao.htm)
- Chávez, J. (2020). *Caracterización cultural, patogénica y sensibilidad in vitro de Phytophthora spp. asociado a enfermedades de mazorca de cacao (Theobroma cacao L.)*. Calceta: ESPAMMFL. Obtenido de <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1337/1/TTA10D.pdf>
- Flores, J. (2019). Antagonismo in vitro de hongos endófitos para su uso en el biocontrol de enfermedades forestales. *FAREM-Estelí*, 58-71.
- Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA). (2019). *Guía Técnica Cultivo de Cacao Bajo Sombra de Maderables o Frutales*. FHIA. Obtenido de <https://n9.cl/jasca>
- García , S., Torres, M., y López, J. (2022). Diversidad de hongos endofíticos en plantas tropicales: una revisión. *Micología Tropical*, 45-60.
- Golberg A. (2021). *El viento y la Vida de las Plantas*. Argentina: Artículo Científico Universidad Nacional de La Pampa.
- Gutiérrez, M. (2019). *Comportamiento Del Crecimiento De Plántulas De Cacao (Theobroma cacao L) en Vivero, Sembradas En Diferentes Volúmenes De Sustrato*. Colombia: Manual Técnico Corpoica.
- Instituto Nicaraguense de Tecnología Agropecuaria. (2019). *Guía tecnológica del cultivo de cacao. Cuarta edición*. Nicaragua.: INTA.
- Kaul, S., Gupta, S., Ahmed , M., y Dhar, M. (2019). Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochem Rev* 11, 487–505. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9260-6>
- Kusari, S., y Spiteller, M. (2019). M. Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. *Metabolomics*, 241-266. doi: 10.5772/31596
- MAG (Ministerio de agricultura y ganadería). (2019). *Rendimientos de cacao almendra seca (Theobroma cacao) en el Ecuador 2017*. Obtenido de <http://sipa.agricultura.gob.ec/descargas/estudios/rendimientos/cacao/rendi>

- Mejía, L., Rojas, E., Maynard, Z., Van, S., Arnold, E., Hebbar, P., y Allen, E. (2021). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, 4-14. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.012>
- Ministerio de Agricultura del Perú. (2021). *Condiciones agroclimáticas del cultivo de cacao*. Obtenido de Boletín Informático.: [http://www.minag.gob.pe/portal/download/pdf/bibliotecavirtual/estadosfenologicos/cacao\\_condiciones\\_agroclimaticas.pdf](http://www.minag.gob.pe/portal/download/pdf/bibliotecavirtual/estadosfenologicos/cacao_condiciones_agroclimaticas.pdf).
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2019). *Guía técnica del cultivo de cacao*. Ecuador.
- Moya , A. (2019). *Biodiversidad fúngica endófito y epífita de Citrus sinensis, naranjo dulce, de dos localidades de la Región Litoral del Ecuador*. Quito: PUCE. Obtenido de <https://n9.cl/b45nx>
- Palencia, C., Gómez, S., Díaz, A., Contreras, M., y Tolosa, O. (2019). *Rehabilitación de plantaciones de cacao*. Bucaramanga, Colombia: Corpoica.
- Partida, L. (2021). The Microbe-Free Plant: Fact or Artifact? *Frontiers in Plant Science*, 1-16.
- Peréz , S., Sosa, D., María , I., y Reneé, P. (2019). Identificación de hongos endófitos cultivables de cacao y su antagonismo contra seis patógenos del mismo hospedante. *Protección Vegetal*, 34-65.
- Pincay, A., Noboa, M., Viera, W., Herrera, K., León, A., y Jackson, T. (2021). Evaluación in vitro del potencial antagonista de *Trichoderma* sp. y hongos endófitos de mora (*Rubus glaucus* Benth) para el control de *Botrytis cinerea*. *UTB*, 109-124. doi:<https://doi.org/10.5281/zenodo.4917695>
- Pinzón , U., y Rojas, A. (2022). *Guía técnica para el cultivo de cacao. Tercera edición*. Bogotá, Colombia.: Fedecacao.
- Puri, A., Padda, K., y Chanway, C. (2020). Identificación y caracterización de hongos endófitos de *Theobroma cacao* L. con potencial para el control biológico de *Phytophthora palmivora*. *Bosques*, 11(3), 316.
- Quiroz, J., & Agama, J. (2022). *Programa de capacitación en la cadena de cacao. Módulo producción*. Quito, Ecuador.
- Ramírez, A. (2021). *Los secretos para el cultivo de cacao*. Santo Domingo, Ecuador: TM Gráficos Editoriales primera edición.
- Rimache, M. (2019). *Cultivo del cacao*. Perú: Editora Macro.

- Sadoral, J., y Cumagun, C. (2021). Observations on the Potential of an Endophytic Fungus Associated with Cacao Leaves against *Phytophthora palmivora*. *Microbiol. Res*, 12 (3), 528-538. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/microbiolres12030037>
- Tigre, L. (2020). *Agricultura: Suelos alcalinos - Suelos calcáreos en zonas tropicales*.
- Triana, A., Jiménez, L., y Osorio, A. (2021). *Identificación de hongos endófitos presentes en mazorcas de Theobroma cacao de los municipios de Maceo y San Pedro de Urabá, Antioquia*. Antioquia: UDEA.
- Villavicencio, M. (2019). *Identificación y evaluación de hongos endófitos de Theobroma cacao L. como candidatos a agentes de control biológico de la moniliasis (Moniliophthora roreri) y la escoba de bruja (Moniliophthora perniciosa) del cacao*. Guayaquil: ESPOL. Obtenido de <https://n9.cl/nywre>

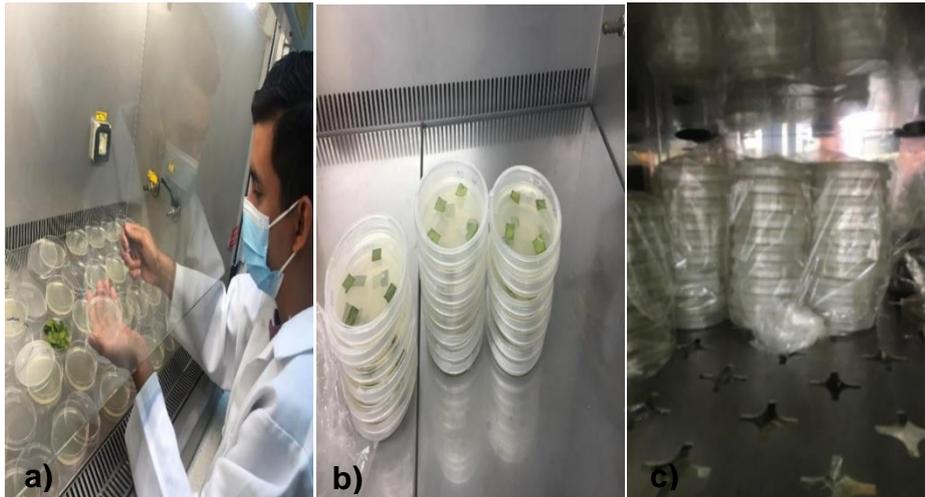
## ANEXOS



Anexo N°6. Preparación de vivero.  
Elaborado por: Mendoza, 2023



Anexo N°7. Preparación de material vegetal y PDA.  
a) Corte de lámina foliar en fragmentos. b) Desinfección de fragmentos.  
c y d) Preparación de medio PDA.  
Elaborado por: Mendoza, 2023



**Anexo N° 8. Siembra de material vegetal en PDA.**

- a) Colocación de hojas en caja Petri. b) Material foliar en cajas Petri.  
c) Muestras en incubadora.

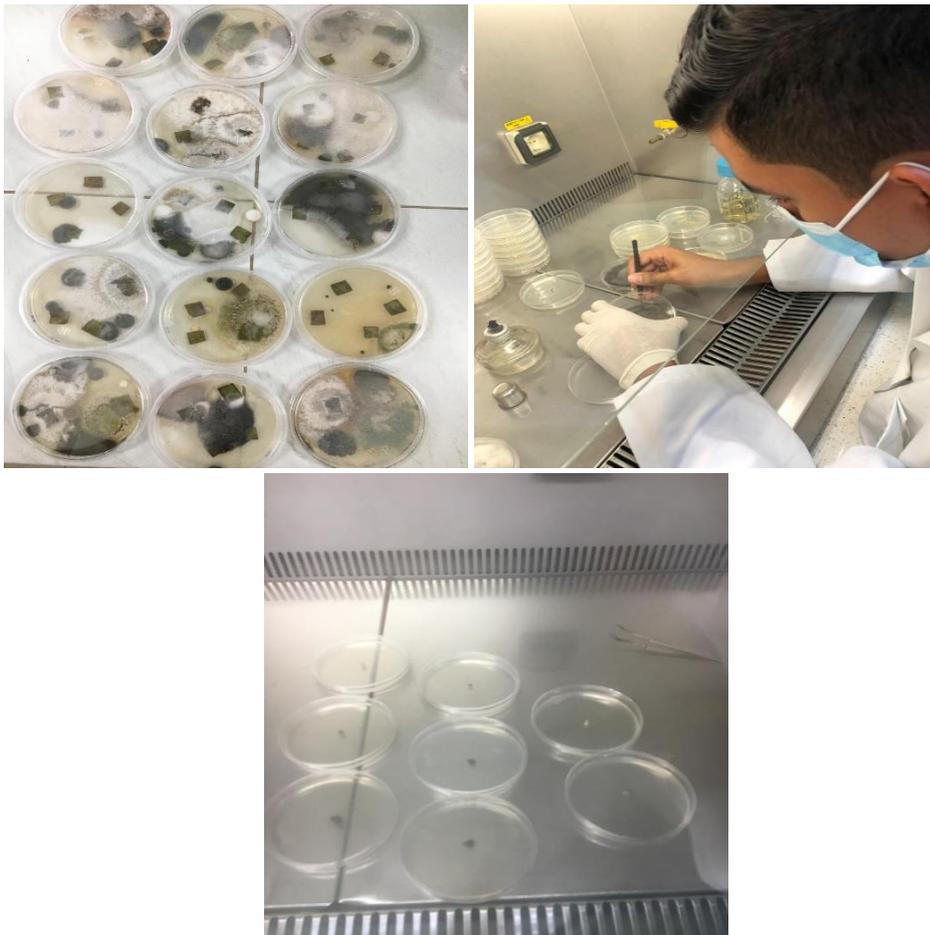
Elaborado por: Mendoza, 2023



**Anexo N° 9. Inoculación de tejido infectado en mazorcas para posterior purificación.**

- a) Mazorcas con presencia de patógeno. b) Humectación de funda.  
c) Colocación de mazorcas inoculadas. d) Embolsamiento de mazorcas.

Elaborado por: Mendoza, 2023



**Anexo N° 10. Purificación de hongos del tejido vegetal cultivado para posterior identificación.**

**Elaborado por: Mendoza, 2023**



**Anexo N° 11. Identificación microscópica de hongos endófitos aislados.**

**Elaborado por: Mendoza, 2023**



**Anexo N° 12. Realización de prueba de cultivo dual patógeno vs endófitos.**  
**Elaborado por: Mendoza, 2023**



**Anexo N° 13. Aspersión de hongos endófitos en hojas de cacao.**  
**Elaborado por: Mendoza, 2023**



**Anexo N° 14. Colocación de patógeno en hojas de cacao inoculadas con endófitos seleccionados.  
Elaborado por: Mendoza, 2023**



Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro  
Teléfono: 0998982450  
e-mail: [ldgen.ecuador@gmail.com](mailto:ldgen.ecuador@gmail.com)  
R.U.C. 1713443479001

### Informe de Resultados

**Nombre del Proyecto:** Identificación molecular de hongos – Javier Mendoza.  
**Informe No.:** A-500  
**Técnico Responsable:** Sofia Garrido, Ing.  
**Fecha:** 07/02/2024

### Resumen de Resultados

Código IDgen	Muestra	Longitud	Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	Nº Acceión
H624	PB	713	99.00	<i>Phytophthora palmivora</i>	ITS	100.00	<a href="#">MG865559.1</a>

Firma autorizada

Francisco Javier Flores Flor, PhD.

Propietario IDgen

**Anexo N° 15. Resultados de secuencia realizada de patogeno.  
Elaborado por: Mendoza, 2023**



**Anexo N° 16. Seguimiento del tutor  
Elaborado por: Mendoza, 2023**

## APÉNDICES

### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Hongos	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	C	H	p
Crecimiento	Fusarium	6	42,02	20,87	42,35	3	1,00	1,64	0,6504
Crecimiento	Lasiodiplodia	6	40,20	17,81	40,70				
Crecimiento	Phytophthora	6	55,58	26,00	52,05				
Crecimiento	Trichoderma	6	54,20	24,31	53,20				

### Apéndice N° 1. Análisis de varianza no paramétrica del crecimiento micelial Elaborado por: Mendoza, 2023

#### General

Familia	Enlace	Convergencia	Escala
poisson	log	Alcanzada	1,00

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
27	357,19	361,07	-175,59	216,19

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			26	352,39	
Tratamientos	2	136,20	24	216,19	<0,0001

#### Efectos fijos

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z )
(Intercept)	2,76	0,08	32,87	<0,0001
TratamientosLP	0,62	0,10	5,92	<0,0001
TratamientosTP	1,06	0,10	10,89	<0,0001

#### PIC - Medias ajustadas y errores estándares para Tratamientos

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Tratamientos	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
TP	3,82	0,05	45,56	2,25	A
LP	3,37	0,06	29,22	1,80	B
FP	2,76	0,08	15,78	1,32	C

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

### Apéndice N° 2. Análisis de varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento. Elaborado por: Mendoza, 2023

## 24 h

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
24 h	80	0,39	0,33	28,07

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

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	375,40	7	53,63	6,62	<0,0001
Factor A	366,81	3	122,27	15,09	<0,0001
Factor B	0,42	1	0,42	0,05	0,8205
Factor A*Factor B	8,16	3	2,72	0,34	0,7996
Error	583,50	72	8,10		
Total	958,90	79			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,36766

Error: 8,1042 gl: 72

Factor A	Medias	n	E.E.	
A4	12,87	20	0,64	A
A3	11,45	20	0,64	A
A2	8,85	20	0,64	B
A1	7,40	20	0,64	B

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

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,26896

Error: 8,1042 gl: 72

Factor B	Medias	n	E.E.	
B1	10,22	40	0,45	A
B2	10,07	40	0,45	A

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

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,97444

Error: 8,1042 gl: 72

Factor A	Factor B	Medias	n	E.E.				
A4	B2	13,08	10	0,90	A			
A4	B1	12,66	10	0,90	A	B		
A3	B1	11,50	10	0,90	A	B	C	
A3	B2	11,40	10	0,90	A	B	C	
A2	B2	9,00	10	0,90		B	C	D
A2	B1	8,70	10	0,90		B	C	D
A1	B1	8,00	10	0,90			C	D
A1	B2	6,80	10	0,90				D

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

## 48 h

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
48 h	80	0,51	0,46	22,90

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

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	987,87	7	141,12	10,63	<0,0001
Factor A	961,62	3	320,54	24,15	<0,0001
Factor B	6,61	1	6,61	0,50	0,4825
Factor A*Factor B	19,64	3	6,55	0,49	0,6881
Error	955,54	72	13,27		
Total	1943,41	79			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,02987

Error: 13,2714 gl: 72

Factor A	Medias	n	E.E.
----------	--------	---	------

A4	20,44	20	0,81	A
A3	17,80	20	0,81	A
A2	14,00	20	0,81	B
A1	11,40	20	0,81	B

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

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,62387**

Error: 13,2714 gl: 72

Factor B	Medias	n	E.E.	
B1	16,20	40	0,58	A
B2	15,62	40	0,58	A

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

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,08603**

Error: 13,2714 gl: 72

Factor A	Factor B	Medias	n	E.E.		
A4	B1	20,69	10	1,15	A	
A4	B2	20,19	10	1,15	A	
A3	B1	17,80	10	1,15	A	B
A3	B2	17,80	10	1,15	A	B
A2	B2	14,20	10	1,15		B C
A2	B1	13,80	10	1,15		B C
A1	B1	12,50	10	1,15		C
A1	B2	10,30	10	1,15		C

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

**72 h**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
72 h	80	0,66	0,63	16,65

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

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1925,95	7	275,14	20,09	<0,0001
Factor A	1921,05	3	640,35	46,76	<0,0001
Factor B	0,00	1	0,00	0,00	>0,9999
Factor A*Factor B	4,90	3	1,63	0,12	0,9485
Error	986,00	72	13,69		
Total	2911,95	79			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,07778**

Error: 13,6944 gl: 72

Factor A	Medias	n	E.E.	
A4	28,20	20	0,83	A
A3	25,50	20	0,83	A
A2	19,45	20	0,83	B
A1	15,75	20	0,83	C

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

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,64955**

Error: 13,6944 gl: 72

Factor B	Medias	n	E.E.	
B1	22,23	40	0,59	A
B2	22,23	40	0,59	A

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

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,16646**

Error: 13,6944 gl: 72

Factor A	Factor B	Medias	n	E.E.	
A4	B1	28,60	10	1,17	A
A4	B2	27,80	10	1,17	A
A3	B1	25,50	10	1,17	A
A3	B2	25,50	10	1,17	A
A2	B2	19,70	10	1,17	B
A2	B1	19,20	10	1,17	B
A1	B2	15,90	10	1,17	B
A1	B1	15,60	10	1,17	B

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

### 96 h

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
96 h	80	0,86	0,84	11,94

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

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4797,35	7	685,34	61,88	<0,0001
Factor A	4773,05	3	1591,02	143,66	<0,0001
Factor B	11,25	1	11,25	1,02	0,3169
Factor A*Factor B	13,05	3	4,35	0,39	0,7586
Error	797,40	72	11,08		
Total	5594,75	79			

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,76782

Error: 11,0750 gl: 72

Factor A	Medias	n	E.E.	
A4	36,85	20	0,74	A
A3	31,20	20	0,74	B
A2	27,70	20	0,74	C
A1	15,75	20	0,74	D

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

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,48342

Error: 11,0750 gl: 72

Factor B	Medias	n	E.E.	
B2	28,25	40	0,53	A
B1	27,50	40	0,53	A

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

### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,64615

Error: 11,0750 gl: 72

Factor A	Factor B	Medias	n	E.E.			
A4	B2	37,90	10	1,05	A		
A4	B1	35,80	10	1,05	A	B	
A3	B2	31,20	10	1,05		B	C
A3	B1	31,20	10	1,05		B	C
A2	B2	28,00	10	1,05			C
A2	B1	27,40	10	1,05			C
A1	B2	15,90	10	1,05			D
A1	B1	15,60	10	1,05			D

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

### Apéndice N° 3. Análisis de varianza de variables en estudio.

Elaborado por: Mendoza, 2023