



**UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA AGRONOMÍA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN COMO REQUISITO
PREVIO PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA AGRÓNOMA**

**CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DEL AGENTE QUE CAUSA
MUERTE REGRESIVA EN CACAO MEDIANTE MARCADORES
MORFOLÓGICOS Y FENOTÍPICOS DE SENSIBILIDAD,
VIRULENCIA, GUAYAS**

AUTORA

MONTERO FLORES ANDREA BELEN

TUTOR

ING. AMAYA MÁRQUEZ DARLYN JOSÉ, MSc.

GUAYAQUIL – ECUADOR

2026



**UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA AGRONOMÍA**

APROBACIÓN DEL TUTOR

El suscrito, docente de la Universidad Agraria del Ecuador, en mi calidad de Tutor, certifico que el presente trabajo de titulación: **CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DEL AGENTE QUE CAUSA MUERTE REGRESIVA EN CACAO MEDIANTE MARCADORES MORFOLÓGICOS Y FENOTÍPICOS DE SENSIBILIDAD, VIRULENCIA, GUAYAS**, realizado por el estudiante **MONTERO FLORES ANDREA BELEN** con cédula de identidad **N°0952664456** de la carrera **AGRONOMÍA**, Unidad Académica Guayaquil, ha sido orientado y revisado durante su ejecución; y cumple con los requisitos técnicos y legales exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador; por lo tanto, se aprueba la presentación del mismo.

Atentamente,

Ing. Darlyn Amaya Márquez, MSc.
Firma del tutor

Guayaquil, 15 de Junio del 2026



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
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: **“CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DEL AGENTE QUE CAUSA MUERTE REGRESIVA EN CACAO MEDIANTE MARCADORES MORFOLÓGICOS Y FENOTÍPICOS DE SENSIBILIDAD, VIRULENCIA, GUAYAS”**, realizado por el estudiante **MONTERO FLORES ANDREA BELEN**, el mismo que cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador.

Atentamente,

Ing. Antonio Álava Murillo, MSc.
PRESIDENTE

Ing. Winston Espinoza Morán, MSc.
EXAMINADOR PRINCIPAL

Ing. Simon Farah Asang, MSc.
EXAMINADOR PRINCIPAL

Ing. Darlyn Amaya Márquez, Msc.
EXAMINADOR SUPLENTE

Guayaquil, 15 de junio del 2026

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo de investigación, en primer lugar, a Dios, por ser mi guía y fortaleza en cada etapa de mi vida, por concederme la sabiduría, la paciencia y la perseverancia necesaria para culminar con éxito este logro académico.

A mis queridos padres, Marcos Montero y Esthela Flores, quienes con su amor y apoyo incondicional han sido el pilar fundamental de mi formación personal y profesional. Gracias por creer en mí, por impulsarme a seguir adelante aun en los momentos de mayor dificultad y por enseñarme, con su ejemplo, el valor del esfuerzo, la responsabilidad y la honestidad.

A mi familia, por su acompañamiento, comprensión y palabras de aliento a lo largo de este proceso, que han sido una fuente de motivación constante para no rendirme y continuar persiguiendo mis metas.

Finalmente, dedico este trabajo a todas aquellas personas que, de manera directa o indirecta, contribuyeron a la realización de esta tesis, brindarme su apoyo, confianza y ánimo para alcanzar uno de los objetivos más importantes de mi vida académica.

AGRADECIMIENTO

A Dios, gracias por acompañarme en cada paso de este camino, por darme la fortaleza para no rendirme en los momentos difíciles y por iluminarme con la sabiduría necesaria para culminarlo.

A la Universidad Agraria del Ecuador, por brindarme la oportunidad de prepararme y formarme académicamente.

A los docentes de la Facultad Ciencias Agrarias, especialmente al Ing. Freddy Veliz, MSc., Ing. Antonio Alava, MSc., Ing. Kleber Medina, MSc., por su orientación, disposición y conocimientos compartidos. Gracias por su acompañamiento académico, sus consejos y su compromiso, los cuales aportaron de manera significativa a mi formación.

A mi tutor de tesis el Ing. Darlyn Amaya, MSc., cuyo conocimiento, paciencia y guía fueron clave para esta investigación. Su apoyo incondicional y valiosas observaciones enriquecieron cada etapa del estudio.

A mi compañero y amigo Aaron Mestanza, gracias por el apoyo académico, por las palabras de ánimo y por la amistad sincera que hizo más llevadera esta etapa. Tu colaboración fue fundamental para alcanzar este objetivo.

La ayuda y el apoyo brindado por todos ustedes han sido de gran valor para mi crecimiento académico y profesional. Estoy sinceramente agradecida por la oportunidad de aprender de personas tan dedicadas y expertas en su campo.

Autorización de Autoría Intelectual

Yo **MONTERO FLORES ANDREA BELEN**, en calidad de autor(a) del proyecto realizado, sobre "**CARACTERIZACIÓN IN VITRO DEL AGENTE QUE CAUSA MUERTE REGRESIVA EN CACAO MEDIANTE MARCADORES MORFOLÓGICOS Y FENOTÍPICOS DE SENSIBILIDAD, VIRULENCIA, GUAYAS**" para optar el título de **INGENIERA AGRÓNOMA**, 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 autor(a) 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, 15 de junio del 2026

MONTERO FLORES ANDREA BELEN

C.I. 0952664456

RESUMEN

La muerte regresiva del cacao constituye una de las principales limitantes para la producción cacaotera en la provincia del Guayas, debido a los daños que ocasiona en brotes, ramas y frutos, afectando negativamente el rendimiento y la calidad del cultivo. En esta investigación se realizó la identificación morfológica del agente causal, así como la evaluación de su sensibilidad frente a tratamientos químicos y biológicos, además del análisis de su virulencia en frutos de cacao bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*. Los aislados obtenidos de Balzar, Marcelino Maridueña y Cerecita presentaron crecimiento micelial circunferencial, micelio septado y coloración oscura, características compatibles con *Lasiodiplodia theobromae*, evidenciando variaciones en su desarrollo entre zonas productivas. Los ensayos de sensibilidad demostraron que el fungicida tebuconazole presentó un efecto inhibitorio significativo y dependiente de la dosis, alcanzando valores cercanos al 100% de inhibición a 10 ppm y concentraciones IC50 inferiores a 1 ppm en la mayoría de los aislados. En los tratamientos biológicos, *Bacillus subtilis* mostró una alta capacidad de inhibición del crecimiento micelial, superando el 80%, mientras que *Trichoderma harzianum* evidenció baja eficiencia antagonista frente al patógeno. En condiciones *in vivo*, la severidad de la enfermedad varió entre cepas y tratamientos, confirmando diferencias en la virulencia y en la respuesta al control antifúngico. En conjunto, los resultados indican que la enfermedad es compleja y está influenciada por la variabilidad del patógeno y la eficacia de las estrategias de control, siendo necesario fortalecer investigaciones a nivel *in situ* y molecular.

Palabras clave: Morfológica, agente, sensibilidad, virulencia, *in vitro*, *in vivo*

ABSTRACT

Cacao dieback represents one of the main constraints affecting cacao production in the province of Guayas due to the damage it causes to shoots, branches, and fruits, negatively impacting crop yield and quality. The present study included the morphological identification of the causal agent, as well as the evaluation of its sensitivity to chemical and biological treatments, in addition to the assessment of its virulence in cacao fruits under both *in vitro* and *in vivo* conditions. Isolates obtained from Balzar, Marcelino Maridueña, and Cerecita exhibited circumferential mycelial growth, septate mycelium, and dark pigmentation, characteristics consistent with *Lasiodiplodia theobromae*, revealing variations in growth among production areas. Sensitivity assays demonstrated that the fungicide tebuconazole showed a significant dose-dependent inhibitory effect, reaching values close to 100% inhibition at 10 ppm and IC50 values below 1 ppm in most isolates. In biological treatments, *Bacillus subtilis* showed a high capacity to inhibit mycelial growth, exceeding 80%, whereas *Trichoderma harzianum* exhibited low antagonistic efficiency against the pathogen. Under *in vivo* conditions, disease severity varied among strains and treatments, confirming differences in virulence and response to antifungal control. These findings indicate that this disease is complex and influenced by pathogen variability and the effectiveness of control strategies, highlighting the need to strengthen research at both *in situ* and molecular levels.

Keywords: *agent, in vitro, in vivo, morphological, sensitivity, virulence.*

ÍNDICE GENERAL

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
Autorización de Autoría Intelectual	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT.....	viii
ÍNDICE GENERAL.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
INDICE DE FIGURAS.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1 Antecedentes del problema.....	15
1.2 Planteamiento y formulación del problema	16
1.2.1 Planteamiento del problema.....	16
1.2.2 Formulación del problema.....	16
1.3 Justificación de la investigación	16
1.4 Delimitación de la investigación	17
1.5 Objetivo general	17
1.6 Objetivos específicos.....	17
1.7 Hipótesis o idea a defender.....	17
2. MARCO TEÓRICO	18
2.1 Estado del arte.....	18
2.2 Bases científicas y teóricas de la temática	20
2.2.1 Origen	20
2.2.2 Taxonomía del cacao	20
2.2.3 Principales enfermedades fungosas en cacao	20
2.2.3.1. Escoba de bruja (Moniliophthora perniciosa).....	21
2.2.3.2. Moniliasis (Moniliophthora roreri).....	21
2.2.3.3. Mazorca Negra (Phytophthora spp.)	21
2.2.3.4. Podredumbre del fruto (Lasiodiplodia theobromae)	21
2.2.4 Agente causal de la muerte regresiva en cacao	22

2.2.4.1. Lasiodiplodia theobromae	22
2.2.4.2. Phytophthora palmivora.....	22
2.2.5 Estrategias de control antifúngico en cacao.....	22
2.2.5.1. Control biológico	22
2.2.5.1.1. Trichoderma harzianum.	23
2.2.5.1.2. Bacillus subtilis.	23
2.2.5.2. Control químico	23
2.2.5.2.1. Fungicidas.....	23
2.2.6 Tipo de ensayo en áreas controladas.....	24
2.5.6.1. In vitro.....	24
2.5.6.1.1 Virulencia en el cacao.	24
2.5.6.2. In vivo	24
2.3 Marco legal.....	25
2.3.1 De la Ley Orgánica del Régimen de la Soberanía Alimentaria ...	25
2.3.2 Ley Orgánica de Sanidad Agropecuaria.....	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1 Enfoque de la investigación	27
3.1.1 Tipo y alcance de la investigación	27
3.1.1.1. Investigación experimental.....	27
3.1.1.2. Investigación aplicada	27
3.1.2 Diseño de investigación.....	27
3.2 Metodología	27
3.2.1 Variables.....	27
3.2.1.1. Variable independiente	¡Error! Marcador no definido.
3.2.1.2. Variables dependientes.....	28
3.2.1.2.1. Características macroscópicas.....	28
3.2.1.2.2. Características microscópicas.....	28
3.2.1.2.3. Área de crecimiento (cm ²).....	28
3.2.1.2.4. Porcentaje de inhibición de crecimiento (%).....	28
3.2.1.2.5. Dosis máxima media (IC50).	28
3.2.1.2.6. Severidad externa (%).	29
3.2.1.2.7. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad.....	29
3.2.1.2.8. Incidencia (%).....	29
3.2.2 Tratamientos	29

3.2.3	Diseño experimental.....	30
3.2.4	Recolección de datos.....	31
3.2.4.1	Recursos	31
3.2.4.1.1.	Recursos bibliográficos.....	31
3.2.4.1.2.	Recursos económicos.	31
3.2.4.1.3.	Materiales y equipos.	31
3.2.4.2.	Métodos y técnicas.....	32
3.2.4.2.1.	Métodos de investigación.....	32
3.2.4.2.2.	Técnicas de investigación.	32
3.2.5	Análisis estadístico	35
3.2.5.1.	Hipótesis	35
3.2.5.1.1.	In vitro.....	35
3.2.5.1.2.	In vivo.	35
4.	RESULTADOS.....	36
4.1	Identificación a nivel morfológico el agente que causa la muerte regresiva del cacao	36
4.1.1	Radio de colonia	36
4.1.2	Esquema de crecimiento	36
4.1.3	Carácter de pertenencia.....	36
4.2	Evaluación de la sensibilidad de los aislados fúngicos a tebuconazole, los agentes biocontroladores <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Bacillus subtilis</i> ...	37
4.2.1	Área de crecimiento	37
4.1.2	Porcentaje de inhibición de crecimiento	39
4.1.3	IC50 de <i>Lasidiplodia theobromae</i> en los tratamientos.....	40
4.3	Determinación del nivel de virulencia del agente causal de muerte regresiva en frutos de cacao donde se incorpora los siguientes tratamientos antifúngicos a nivel in vitro e in vivo.....	41
4.3.1	Severidad de <i>Lasidiplodia theobromae</i> en los tratamientos químicos.....	41
4.3.2	Severidad de <i>Lasidiplodia theobromae</i> en los tratamientos biológicos	42
5.	DISCUSIÓN	44
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
6.1	Conclusiones.....	46

6.2 Recomendaciones.....	47
BIBLIOGRAFÍA	49
ANEXOS	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dosis <i>in vitro</i>	30
Tabla 2. Dosis en tejido vivo.....	30
Tabla 3. Análisis de varianza <i>in vitro</i>	30
Tabla 4. Análisis de varianza en tejido vivo.....	31
Tabla 5. Presupuestos del ensayo	31
Tabla 6. Radio de dominio morfológico de los agentes aislados.....	36
Tabla 7. Área de crecimiento de tratamientos (cm ²).....	38
Tabla 8. Inhibición de crecimiento del aislado con tratamiento químico	40
Tabla 9. Porcentaje de crecimiento del aislado con tratamiento biológico	41
Tabla 10. IC50 de <i>L. theobromae</i> (T20, T21 y T22) durante 3 días	42
Tabla 11. Severidad química <i>en tejido vivo</i> de <i>L. theobromae</i> (factorial)	43
Tabla 12. Severidad biológica de <i>L. theobromae</i> en tejido vivo (factorial)	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Observación macroscópica de los aislados <i>L. theobromae</i>	37
Figura 2. Observación de conidios en el microscopio M.Maridueña	37
Figura 3. Recolección de muestras en Balzar, Cerecita y M.Maridueña	54
Figura 4. Aislamiento a partir de las muestras recolectadas en campo	54
Figura 5. Resiembra de aislamientos obtenidos.....	55
Figura 6. Visualización de aislados	55
Figura 7. LOGIC-Tebuconazole	56
Figura 8. Ficha Técnica Tebuconazole	56
Figura 9. Evaluación de crecimiento <i>L. theobromae</i> en diferentes dosis	57
Figura 10. Confrontación <i>in vitro</i> Trichoderma spp. y hongo fitopatógeno	57
Figura 11. Confrontación <i>in vitro</i> entre <i>B. Subtilis</i> y hongo fitopatógeno	58
Figura 12. Tabla de resultados de los aislados	58
Figura 13. Productos PCR del ITS en gel de agarosa al 1%.....	59
Figura 14. Inoculación del patógeno en mazorca por dosis	59
Figura 15. Tratamiento con Trichoderma en diferentes cepas	60
Figura 16. Tratamiento con Bacillus sp. en diferentes cepas	60
Figura 17. Medias significativas de crecimiento de los aislados del día 1	61
Figura 18. Medias significativas de crecimiento de los aislados del día 2.....	61
Figura 19. Medias significativas de dosis químicas en el día 1	62
Figura 20. Medias significativas de dosis químicas en el día 2	62
Figura 21. Medias significativas de dosis químicas en el día 3.....	63
Figura 22. Medias de crecimiento al día 3 con fungicidas biológicos	63
Figura 23. PIC de dosis químicas del día 1	64
Figura 24. PIC de dosis químicas del día 2.....	64
Figura 25. PIC de dosis químicas del día 3.....	65
Figura 26. PIC de dosis biológicas del día 3	65

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes del problema

El cacao (*Theobroma cacao L.*), es un cultivo que se desarrolla en climas cálidos, proveniente de la región amazónica de Sudamérica y que se cultiva, distribuye desde tiempos prehispánicos por sociedades antiguas como los Aztecas, Mayas, Olmecas. Es considerado como uno de los cultivos de mayor importancia en el ámbito internacional, sobre todo para los productores a pequeña escala (Ruiz Flores, 2021).

Con el paso del tiempo, la producción de cacao presenta diversas enfermedades, que son producidas por *Lasiodiplodia theobromae*. Aunque se identifica tres especies de *Lasiodiplodia* que afectan a las plantas por esta razón ha recibido mayor atención científica tanto en cacao y en diferentes especies vegetales. En los últimos años, este patógeno adquiere mayor relevancia, por lo tanto tiene la capacidad de permanecer en el suelo debido a ello tiene en estructuras como picnidios y clamidósporas, se propaga a través de diversos factores hasta llegar a los tejidos vegetales, el control fitosanitario de la familia *Botryosphaeriaceae* es complejo, en especial el patógeno que ya ha colonizado el área productiva (Moreira Morrilo , 2021).

Una investigación evidencia por primera vez la identificación de *Lasiodiplodia theobromae* como el organismo que origina la muerte regresiva en el cacao (*Theobroma cacao*) en territorio colombiano. Los investigadores obtienen la muestra del agente fúngico de ramas con síntomas visibles y lo determina a través de análisis morfológico (Pisco Ortiz, 2024).

En Camerún se aísla *L. theobromae*, a partir de diversos tejidos (ramitas, corteza, tejido vascular y frutos) de plantas afectadas y se identifica con base en caracteres morfológicos. Estos incluyen una colonia de color verde oscuro o negro de rápida propagación y conidios de color marrón oscuro, estriados, elipsoidales, uniseptados y producidos en picnidios ascostromáticos en agar papa dextrosa (PDA). Se inoculo por separado tapones miceliales de los aislados CBS 120395 y 120396 en PDA en tallos dañados de veinte plántulas de cacao de seis meses de edad en un invernadero para evaluar su patogenicidad. Tras 4 semanas de riego regular, seguidas de tres semanas de estrés hídrico, el 60% de las plantas de pruebas inoculadas se marchita y se secan irreversible; el 30% se recupera al

reanudarse el riego, pero su rendimiento disminuye unas semanas después (Mbenouna et al., 2021).

Desde 2014, se reportan síntomas relacionados con *Lasiodiplodia* en cultivos de cacao en Filipinas. Aunque estudios previos indica la presencia de este hongo en plantaciones de Ecuador desde 1890, aún no se realizan investigaciones que confirmen su identidad mediante métodos moleculares. En este contexto, se identifican vínculos filogenéticos entre el género y la especie a través del análisis de ADN, en especial en las regiones espaciadoras internas (ITS), los fragmentos de beta-tubulina (BT2a y BT2b), y el factor de elongación uno alfa (EF-1 α). Este enfoque permite ubicar con mayor precisión los aislamientos en relación con especímenes similares relacionados (Jiménez et al., 2022).

1.2 Planteamiento y formulación del problema

1.2.1 Planteamiento del problema

En la provincia del Guayas, uno de los principales territorios productores de cacao en el Ecuador en donde la muerte regresiva del cacao es una enfermedad de importancia creciente que afecta la sostenibilidad y productividad. A pesar de su relevancia económica y social, aún no se identifica de manera precisa el agente causal de esta enfermedad, ya que no se cuenta con una caracterización *in vitro* que permita entender sus mecanismos de sensibilidad y virulencia mediante marcadores morfológicos y fenotípicos.

La falta de datos científicos restringe la aplicación de métodos de control de plagas que sean eficaces y ajustados a las condiciones de la región. Por esta razón, es fundamental llevar a cabo una investigación que facilite la identificación y descripción del organismo patógeno, crea una información técnica que ayude al control de la enfermedad y salvaguardar el cultivo de cacao en esta área productora del país.

1.2.2 Formulación del problema

¿Cuál será el efecto del tebuconazole, *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en la sensibilidad y virulencia del agente causal?

1.3 Justificación de la investigación

La ejecución de este análisis sobre la identificación *in vitro* e *in vivo* del agente que provoca la muerte regresiva en el cacao a través de marcadores morfológicos y fenotípicos de virulencia y sensibilidad en la provincia del Guayas

ya que se basará en la necesidad urgente de abordar un problema fitosanitario que impactara de manera directa la producción y la sostenibilidad del cultivo. Existe carencia de información local sobre las características morfológicas de los patógenos que en la actualidad afecta. Por ello, se debe evaluar la efectividad de tebuconazole, un fungicida de amplio espectro, y *T. harzianum*, un antagonista biológico de uso frecuente, se usa mazorcas de cacao como sustrato experimental. De esta manera, esta investigación representará una contribución valiosa tanto para el progreso científico el campo de la biotecnología para el fortalecimiento del sector agrícola en la provincia del Guayas.

1.4 Delimitación de la investigación

- **Espacio:** Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Agraria del Ecuador
- **Tiempo:** El estudio se desarrolló durante un período de seis meses.
- **Población:** Esta investigación estuvo dirigida y enfocada a personas interesadas en la temática, así como a estudiantes y agricultores de los cantones de Balzar, Cerecita y Marcelino Maridueña, pertenecientes a la provincia del Guayas.

1.5 Objetivo general

Evaluar la caracterización *in vitro* del agente que causa muerte regresiva en cacao mediante marcadores morfológicos y fenotípicos de sensibilidad, virulencia, Guayas.

1.6 Objetivos específicos

- Identificar a nivel morfológico el agente que causa la muerte regresiva del cacao.
- Evaluación de la sensibilidad de los aislados fúngicos a Tebuconazole, los agentes biocontroladores *T. harzianum* y *B. subtilis*
- Determinar el nivel de virulencia del agente causal de muerte regresiva en frutos de cacao donde se incorpora los siguientes tratamientos antifúngicos a nivel *in vitro* y en tejido vivo.

1.7 Hipótesis o idea a defender

Las características morfológicas permitirán una identificación adecuada del agente de la muerte regresiva en el cacao, y tanto el tebuconazole como el *T. harzianum* reducen su desarrollo con sustrato y tejido vivo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Estado del arte

La muerte regresiva del cacao es un problema fitosanitario que incide de forma persistente los brotes y mazorcas del género en cuestión y se posiciona como una de las mayores problemáticas en cuanto a la capacidad productiva en la provincia del Guayas. Existe investigaciones en México, Panamá, Perú y Brasil donde se ha evidenciado que se presenta una interacción entre *Trichoderma* y *Moniliophthora*. En territorio ecuatoriano, se ha confirmado que algunas especies de *Trichoderma*, provenientes de climas y regiones distintas, logran inhibir el crecimiento de agentes patogénicos que afectan tanto al banano como al cacao. Sin embargo, existe información limitada sobre los compuestos específicos que generan esta actividad antagónica (Choez et al., 2023).

Entre septiembre de 2018 y marzo de 2019, se detecta síntomas de tizón en hojas, chancros en tallos y pudrición en mazorcas de cacao en varias zonas de Malasia. Para identificar al hongo responsable, se usa observaciones morfológicas, análisis de ADN y estudios filogenéticos basados en cuatro genes. Se obtuvo 57 muestras de distintas partes de la planta (hojas, tallos y frutos), las cuales mostraban características similares a *Lasiodiplodia*. En los análisis se confirmó que todos los aislados correspondían a *L. theobromae*, con un respaldo genético del 97%. Además, las pruebas de patogenicidad demuestran que este hongo era el causante de las enfermedades observadas en el cacao (Shakirah et al., 2022).

La complejidad de patógenos de mayor alteración, como *Moniliophthora perniciosa*, *Monilia roreri* y *Ceratocystis cacaofunesta*, son comparecientes en varias islas del caribe y logran penetrarse con el desplazamiento de componentes contaminados o tornados, la visualización de muerte regresiva se pudo observar por medio de mazorcas con laceraciones necróticas en las plantas de cacao en la mayor zona de estudio determinada para la inspección fúngica en la isla de Puerto Rico, la exclusión fue de una extensión boscosa con plantas de cacao silvestre, lugar donde no existía la presencia de mazorcas, tres áreas poseían limitada o nada de sombra, los especímenes de soportes afectados se obtiene del marco ensanchado de las neoplasias e incluía tegumento salubre y vestigio, por causa de influencia de saprofitos y endófitos en la unión vascular de las plantas de cacao (Puig, 2023).

Según Martínez y Pérez (2020), se analizó un total de 124 muestras en Cuba. En ellas los hongos detectados más frecuentes son la *L. theobromae* (90%), *Phytophthora palmivora* (85%). El patógeno *L. theobromae* fue la especie que con mayor frecuencia se detectó, asociada a muerte regresiva, necrosis de la madera y pudrición parda de la mazorca, quienes, al estudiar las principales enfermedades del cacao en la región de Baracoa, se encontró a este patógeno asociado a la pudrición de mazorcas en nueve de las once fincas estudiadas.

Este estudio evidencia que *T. harzianum* actúa como un eficaz agente de biocontrol contra *P. palmivora* en plántulas de cacao. La cepa TCH-01, en particular, mostró un desempeño destacado, posicionándose como una alternativa prometedora para mitigar la aparición y gravedad de esta enfermedad. Las diferencias en la capacidad de inhibición entre las cepas, tanto en el crecimiento como en la esporulación del patógeno, sugieren que los componentes genéticos y metabólicos juegan un papel determinante en su eficacia. TCH-01 sobresalió por reducir los síntomas en las plantas tratadas (Cedeño et al., 2025).

En la provincia de Orellana se evaluó dos fungicidas con diferentes mecanismos, se tomó datos en el área experimental para medir la incidencia de la enfermedad. En los resultados se mostró que la moniliasis ya estaba presente en niveles preocupantes, con valores que iban del 49.52% al 51.72%, lo que indica que casi la mitad de la producción estaba afectada, representa una pérdida considerable para el productor. Durante las distintas evaluaciones, tanto el tratamiento con tebuconazol (T1) como el de Azoxystrobin (T2) se logró reducir de forma constante la incidencia de la enfermedad. Sin embargo, la combinación de ambos productos (T3) fue la más efectiva, se registra el porcentaje más bajo de incidencia a los 60 días de evaluación (Chipantiza et al., 2024).

En este estudio se examinó con dos aislados de *Phytophthora*, identificados como PP8 y PPAGR, que fueron obtenidos de mazorcas de cacao con síntomas evidentes de mazorca negra en la provincia de Los Ríos, Ecuador. Para conocer con exactitud la especie a la que pertenecían, se realizó un análisis molecular a partir de la región ITS (ITS1, 5.8S e ITS2) y su posterior secuenciación. En los resultados se confirmó que ambos aislados corresponden a *P. palmivora*. Con el fin de evaluar su capacidad de causar enfermedad, los aislados se inocularon en brotes de cacao de las variedades nacional fino de aroma y CCN-51. El ensayo se desarrolló bajo un diseño completo al azar con

siete repeticiones, considerando cada brote como una unidad experimental independiente. Se observó que el aislado PP8 provocó una incidencia y severidad del 100% en los brotes de nacional fino de aroma, lo que evidencia la alta susceptibilidad de esta variedad frente al patógeno. En cambio, la variedad CCN-51 no presentó síntomas cuando fue inoculada con ninguno de los dos aislados. Estos resultados ponen de manifiesto que el efecto de *Phytophthora* en el cultivo de cacao no solo depende de la agresividad del aislado, sino también de la respuesta propia de cada variedad (Amaya et al., 2025).

2.2 Bases científicas y teóricas de la temática

2.2.1 Origen

El cacao (*Theobroma cacao* L.) tuvo su origen en las zonas tropicales de América del Sur, en un área determinada de la cuenca amazónica. Evidencias arqueológicas encontradas en el sureste de Ecuador indican que la adaptación al cultivo se dio hace más de 5000 años, mucho antes de lo estimado. Culturas milenarias como los mayas y olmecas lo destinaban en actos ceremoniales y como medio de intercambio. Análisis actuales corroboran que Ecuador es una de las zonas más antiguas en el consumo del cacao, lo que resalta su trascendencia histórica como cuna de este cultivo (Zarrillo et al., 2018).

2.2.2 Taxonomía del cacao

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Familia: Malvaceae

Género: *Theobroma*

Especie: *Theobroma cacao* L. (Báez et al., 2022).

2.2.3 Principales enfermedades fúngicas en cacao

El cultivo de *Theobroma cacao* L. simboliza un recurso fundamental de base de ingresos y bienestar para diversas naciones tropicales, de manera destacada América Latina. Sin embargo, las enfermedades fúngicas impactan de manera significativa a su producción, un deterioro directo a órganos vegetativos y reproductivos, esto puede reducir el volumen de cosecha en niveles que alcanzan el 70%, compromete las características del grano y genera vulnerabilidad económica de los productores (Hernández et al., 2010).

2.2.3.1. Escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*)

Fue detectada por primera vez en Ecuador en 1918 y, hoy en día, puede desencadenar reducciones en la producción de hasta el 80%⁴ en las plantaciones de cacao. Esta enfermedad suele presentarse junto con otras como la moniliasis y la pudrición negra, especial impacta a las mazorcas. El hongo que la causa produce una estructura reproductiva conocida como basidiocarpo, la cual se desarrolla sobre las escobas secas y tiene forma de sombrillas con tonalidades rosadas o violetas (Tenesaca, 2023).

2.2.3.2. Moniliasis (*Moniliophthora roreri*)

Es un hongo que se considera uno de los principales problemas fitosanitarios del cacao (*Theobroma cacao*) en Ecuador, distribuido en todas las zonas productoras. Esta alteración fitopatológica incide directo a los frutos, provoca diversos síntomas: desde mazorcas infectadas de forma evidente hasta que otras presentan apariencia externa saludable, pero daño interno, identificables por su peso atípico. Su efecto en la producción puede ser severo, con disminuciones que van desde el 16% hasta más del 80%, y promedios anuales que oscilan entre el 20% y 22% (Parrales et al., 2020).

2.2.3.3. Mazorca Negra (*Phytophthora spp.*)

Esta enfermedad es causada por diferentes especies del género *Phytophthora*, aunque el agente principal identificado en cacao es *P. palmivora*. Está distribuida en África, Asia y América, y se considera uno de los factores más limitan para la producción de cacao. Su desarrollo depende en gran medida de las condiciones del entorno; ambientes con lluvias frecuentes, alta humedad relativa y temperaturas frescas favorecen la aparición y propagación del patógeno. Las principales fuentes de infección se encuentran en el suelo y en tejidos de la planta que se encuentra afectado, como raíces, hojas, cojines florales, flores y frutos enfermos, lo que facilita su diseminación en el cultivo (Guamán et al., 2022).

2.2.3.4. Podredumbre del fruto (*Lasiodiplodia theobromae*)

Es un grupo de organismos patógenos que provoca diversas enfermedades en las plantas y puede afectar a una gran variedad de especies vegetales. Se trata de agentes agresivos que han sido relacionados con daños en casi 500 tipos de plantas. Entre los cultivos más perjudicados se encuentran el cacao, los cítricos, el coco, la vid, el mango, la fresa, el maní, el arroz, el melón, el

almendro, el ricino, el arándano, la yuca, el almez chino, el olivo y especies del género *Pinus*. Las enfermedades causadas por este patógeno incluyen pudriciones en tallos y raíces, así como canchales, lo que conlleva pérdidas importantes en la producción agrícola y forestal (Belaghihalli et al., 2022).

2.2.4 Agente causal de la muerte regresiva en cacao

La muerte regresiva del cacao (*Theobroma cacao* L.) es una enfermedad severa que afecta a las plantaciones en zonas tropicales, manifestándose con necrosis en las ramas más jóvenes, pérdida gradual de vigor y un deterioro progresivo del tejido vegetal (Rumbo et al., 2005).

2.2.4.1. *Lasiodiplodia theobromae*

Es un hongo fitopatógeno de carácter oportunista que infecta tejidos del cacao durante todo el año, mediante heridas generadas en prácticas como la injertación. La infección se manifiesta como necrosis negra en mazorcas, progresa de una manera rápida hasta cubrirlas con masas de conidios melanizados. Las estructuras momificadas actúan como reservorios del inóculo primario, desde donde los conidios se diseminan por agentes bióticos y abióticos. El ingreso del patógeno a través de lesiones provoca necrosis tisular y muerte regresiva de ramas o plantas completas en un lapso aproximado de tres meses, condicionado por el nivel de susceptibilidad del hospedero y el sitio de infección (Pérez et al., 2017).

2.2.4.2. *Phytophthora palmivora*

Es uno de los principales responsables de pérdidas económicas en el cultivo de cacao a nivel mundial. Su síntoma más común es la podredumbre de mazorca, que comienza como manchas negras en el fruto y se extiende rápido hasta dañar por completo la cáscara y los granos (Merga , 2022).

2.2.5 Estrategias de control antifúngico en cacao

El control de enfermedades en los cultivos busca reducir, eliminar o mantener bajo control a los organismos que pueden causar daños. Para lograrlo, existe diferentes estrategias de control para reducir los efectos de dichas enfermedades, entre las cuales se destacan la producción de enzimas líticas por hongos, bacterias y el mejoramiento genético de variedades (Tirado et al., 2016).

2.2.5.1. Control biológico

Esta técnica avanza y demuestra ser muy efectiva. Además, es una de las soluciones más sostenibles que existen, ya que utiliza hongos parásitos para

controlar de manera eficiente las enfermedades que afectan al cacao (Vera et al., 2018).

2.2.5.1.1. *Trichoderma harzianum*.

Es un hongo beneficioso muy usado como agente biológico para proteger el cultivo de cacao. Actúa como un enemigo natural de varios hongos que causan enfermedades en las plantas, como *Phytophthora* o *Moniliophthora*. Este hongo inhibe a los patógenos, ayuda a controlar enfermedades de manera sostenible, sin necesidad de usar tantos agroquímicos. Además, puede mejorar el crecimiento para favorecer la producción de cacao de mejor calidad (Cuervo et al., 2011).

2.2.5.1.2. *Bacillus subtilis*.

Es un microorganismo benéfico que se ha manifestado de forma manejable para la ejecución genética, por lo tanto, es patrocinado como un cuerpo ejemplar para investigaciones de laboratorio, sobre todo producción de esporas, ya que es un modelo minimizado de la particularidad celular. En vocablos de notoriedad como un cuerpo ejemplar de laboratorio *B. subtilis* con frecuencia constante es empleado como el correspondiente gran positivo de *Escherichia coli*, un bacilo gran negativo investigado de forma amplia.

2.2.5.2. Control químico

Se basa en el uso de fungicidas, con el objetivo de reducir la incidencia de enfermedades, estos productos actúan directos sobre los hongos causantes, evita que se desarrollen y ayuda a mantener sanas las plantas. Además, su uso excesivo puede hacer que los hongos se vuelvan resistentes, por lo que es mejor combinarlos con otras prácticas como la poda y la eliminación de frutos enfermos (Gamboa et al., 2003).

2.2.5.2.1. Fungicidas.

No se trata solo de un producto que elimina hongos, sino que también incluye compuestos que ayudan a la planta a volverse más resistente o que hacen que el entorno sea poco favorable para que los organismos que causan enfermedades crezcan y se desarrollen. De esta forma, los fungicidas pueden actuar tal como se aplican o pueden ser transformados por los tejidos de la planta para ejercer su efecto protector (Melgarejo , 2011).

- **Tebuconazole**

Este fungicida actúa de forma interna en las plantas y se aplica en el

ámbito agrícola para enfrentar diferentes tipos de enfermedades causadas por hongos en varios cultivos. Forma parte de la familia de los triazoles, un grupo de compuestos químicos que interfieren en la producción de ergosterol, una sustancia esencial para mantener la estructura de las membranas celulares de los hongos. Al impedir esta producción, el hongo pierde estabilidad en sus células, lo que frena su desarrollo y su capacidad de multiplicarse (Guillén et al., 2023).

2.2.6 Tipo de ensayo en áreas controladas

2.5.6.1. *In vitro*

Los estudios *in vitro* aplicados al cacao permiten analizar el comportamiento de enfermedades y tratamientos en un entorno controlado, sin la necesidad de usar plantas completas o hacer pruebas directas en el campo. Este tipo de ensayo ofrece varias ventajas: son más económicos, rápidos y fáciles de manejar, ya que presentan menos factores externos que puedan alterar los resultados. En el caso del cacao, se usan para probar la eficacia de productos como fungicidas o hongos benéficos, por ejemplo, *Trichoderma* (Vega et al., 2022).

2.5.6.1.1 Virulencia en el cacao.

Es el nivel de agresividad que presenta un patógeno para invadir los tejidos de la planta, desarrollarse dentro de ella y provocar daños severos que limitan su productividad. Esta propiedad depende de diversos factores, como la acción de enzimas que destruyen las paredes celulares, compuestos tóxicos y proteínas capaces de debilitar las defensas naturales del hospedero. Aunque las estrategias varían según el microorganismo, todas terminan por reducir tanto la calidad como la cantidad del cultivo. Estudiar estos mecanismos resulta clave para diseñar medidas que fortalezcan la resistencia del cacao y favorezcan su manejo en condiciones agrícolas controladas (Silva et al., 2023).

2.5.6.2. *In vivo*

Los ensayos *in vivo* en laboratorio emplean organismos vivos, como frutos, plantas o tejidos, dentro de espacios controlados. A diferencia de los ensayos *in vitro*, este enfoque permite observar cómo reacciona el organismo al tratamiento, ya que conserva las interacciones biológicas que ocurren de forma natural. En el caso del cultivo de cacao, este tipo de evaluación permite aplicar hongos antagonistas directo sobre frutos infectados por patógenos. Así, es posible

verificar con mayor exactitud si estos agentes logran reducir el avance o la intensidad de las enfermedades (Ouattara et al., 2020).

2.3 Marco legal

2.3.1 De la Ley Orgánica del Régimen de la Soberanía Alimentaria

Artículo 7. Protección de la agrobiodiversidad. - El Estado, así como las personas y las colectividades protegerán, conservarán los ecosistemas y promoverán la recuperación, uso, conservación y desarrollo de la agrobiodiversidad y de los saberes ancestrales vinculados a ella. Las leyes que regulen el desarrollo agropecuario y la agrobiodiversidad crearán las medidas legales e institucionales necesarias para asegurar la agrobiodiversidad, mediante la asociatividad de cultivos, la investigación y sostenimiento de especies, la creación de bancos de semillas y plantas y otras medidas similares, así como el apoyo mediante incentivos financieros a quienes promuevan y protejan la agrobiodiversidad. (p.4)

Artículo 9. Investigación y extensión para la soberanía alimentaria. - El Estado asegurará y desarrollará la investigación científica y tecnológica en materia agroalimentaria, que tendrá por objeto mejorar la calidad nutricional de los alimentos, la productividad, la sanidad alimentaria, así como proteger y enriquecer la agrobiodiversidad. (p.5)

Artículo 10. Institucionalidad de la investigación y la extensión. - La ley que regule el desarrollo agropecuario creará la institucionalidad necesaria encargada de la investigación científica, tecnológica y de extensión, sobre los sistemas alimentarios, para orientar las decisiones y las políticas públicas y alcanzar los objetivos señalados en el artículo anterior; y establecerá la asignación presupuestaria progresiva anual para su financiamiento. (p.5)

Artículo 24. Finalidad de la sanidad. - La sanidad e inocuidad alimentarias tienen por objeto promover una adecuada nutrición y protección de la salud de las personas; y prevenir, eliminar o reducir la incidencia de enfermedades que se puedan causar o agravar por el consumo de alimentos contaminados.

Artículo 25. Sanidad animal y vegetal. - El Estado prevendrá y controlará la introducción y ocurrencia de enfermedades de animales y vegetales; asimismo promoverá prácticas y tecnologías de producción, industrialización, conservación y comercialización que permitan alcanzar y afianzar la inocuidad de los productos. Para lo cual, el Estado mantendrá campañas de erradicación de plagas y enfermedades en animales y cultivos, fomentando el uso de productos veterinarios y fitosanitarios amigables con el medio ambiente. (Asamblea Nacional del Ecuador, 2009, p.8)

2.3.2 Ley Orgánica de Sanidad Agropecuaria

Artículo 6. De la Autoridad Rectora. - La Autoridad Agraria Nacional ejerce las competencias en materia de sanidad agropecuaria y es la responsable de prevenir, preservar, mejorar y fortalecer el estatus fito y zoonosanitario de los vegetales, animales y productos agropecuarios en el territorio nacional. (p.4)

Artículo 9. De los incentivos. - La Autoridad Agraria Nacional, establecerá estímulos e incentivos a los productores o unidades de producción animal o vegetal destinados al mejoramiento, tecnificación, capacitación e innovación tecnológica y al fomento de buenas prácticas agropecuarias. (p.5)

Artículo 21. Del control fitosanitario. - El control fitosanitario en los términos de esta Ley, es responsabilidad de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario, tiene por finalidad prevenir y controlar el ingreso, establecimiento y la diseminación de plagas que afecten a los vegetales, productos vegetales y artículos reglamentados que representen riesgo fitosanitario. El control fitosanitario y sus medidas son de aplicación inmediata y obligatoria para las personas naturales o jurídicas, públicas o privadas, dedicadas a la producción, comercialización, importación y exportación de tales plantas y productos. (p.8)

Artículo 23. De los centros de propagación de especies vegetales. - La Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario realizará el control fitosanitario de los centros de propagación de especies vegetales y establecerá la aplicación de las medidas fitosanitarias de conformidad con esta Ley y su reglamento.

Artículo 26. De la declaratoria de emergencia fitosanitaria. - La Autoridad Agraria Nacional, previo informe motivado de la Agencia cuando detecte en un área, lugar o sitio la presencia de una plaga que ponga en riesgo fitosanitario una o varias especies vegetales, en forma inmediata, declarará la emergencia fitosanitaria, con la finalidad de impedir su diseminación. (Asamblea Nacional del Ecuador, 2017, p. 9)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Enfoque de la investigación

La investigación se enfocó en un estudio experimental con fines aplicados. Se buscó realizar la caracterización de hongos aislados a partir de mazorcas de cacao que muestren signos de enfermedad, dado que sus aspectos morfológicos como sus características fenotípicas relacionadas con la sensibilidad y la virulencia. Para ello, se desarrolló ensayos *in vitro* e *in vivo* que permitió analizar su comportamiento y, a su vez, se evaluó la efectividad del fungicida tebuconazole y del hongo *T. harzianum* como posibles opciones para su control.

3.1.1 Tipo y alcance de la investigación

3.1.1.1. Investigación experimental

A lo largo del estudio se aplicó diferentes variables, clasificadas como independientes y dependientes, con el propósito de observar cómo actúo el patógeno desde su entrada hasta su establecimiento en el organismo que lo hospeda.

3.1.1.2. Investigación aplicada

Se analizó la respuesta del hongo frente al uso de un fungicida de origen químico y otro de tipo biológico, con el fin de determinar su grado de resistencia y el efecto que produjo.

3.1.2 Diseño de investigación

La investigación tuvo un enfoque experimental, ya que se llevó a cabo pruebas bajo condiciones controladas para observar cómo responden los hongos causantes de la muerte regresiva del cacao ante diferentes concentraciones del fungicida. El objetivo fue comparar los resultados y establecer cuál de las dosis aplicadas logro una mayor efectividad en la disminución de la infección.

3.2 Metodología

3.2.1 Variables

Las variables se clasificó en dos grupos: independientes y dependientes, ya que estas reflejaron los elementos claves del análisis y permitió estructurar el proceso de recopilación de datos.

3.2.1.1. Variable independiente

Las variables independientes fueron los tratamientos aplicados, que incluyo

el fungicida químico tebuconazole y los agentes biológicos *T. harzianum*, *B. subtilis*.

3.2.1.2. Variables dependientes

Estas se subdividen para los ensayos *in vitro* y los ensayos *in vivo*.

3.2.1.2.1. Características macroscópicas.

El organismo causante de la enfermedad exhibió rasgos morfológicos observables que permitió una identificación inicial. Las colonias formadas mostraron variaciones en su coloración y morfología según la fase de desarrollo, se adaptó formas circulares o irregulares, con bordes definidos o difusos. Su tamaño cambio con el tiempo y según las condiciones utilizadas durante el proceso de incubación.

3.2.1.2.2. Características microscópicas.

Se realizó un estudio detallado de las estructuras microscópicas del agente causal, con énfasis en el micelio y las esporas. A través de un microscopio, se observó la forma, el tamaño y la disposición de las hifas y esporas, lo que permitió lograr una identificación más precisa del microorganismo.

3.2.1.2.3. Área de crecimiento (cm^2).

Para ello, se aplicó una fórmula matemática que permitió obtener con precisión el tamaño del crecimiento fúngico (Hafner et al., 2016).

$$A = \pi \cdot r^2 \quad (1)$$

3.2.1.2.4. Porcentaje de inhibición de crecimiento (%).

Se utilizó la fórmula de (Lipsa et al., 2020).

$$(C - T/C) \times 100$$

Donde C: Representa el valor inicial o el valor original.

T: Representa el valor final o el valor después de un cambio.

3.2.1.2.5. Dosis máxima media (IC50).

Se obtuvo a partir del porcentaje de inhibición de crecimiento (Baldiga et al., 2013).

$$Y = A/1 + (X/IC50)^s$$

Donde Y es la respuesta (porcentaje de inhibición).

X es la concentración del inhibidor.

A es la respuesta máxima (habitual al 100% de inhibición).

IC50: es la concentración del inhibidor que produce un 50% de inhibición.

S: Coeficiente que describe la pendiente de la curva

3.2.1.2.6. Severidad externa (%).

Se estimó el nivel de daño en las unidades tratadas con el fungicida mediante una inspección visual de los síntomas presentes en los tejidos afectados; se utilizaron protocolos establecidos para medir la severidad de enfermedades en mazorcas (Forrest et al., 2006).

$$\text{Severidad: } \left[\frac{\text{area afectada}}{\text{area total}} \right] * 100$$

3.2.1.2.7. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad.

Se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para observar la evolución de la severidad de la infección a lo largo del tiempo. Esta herramienta permitió comparar la efectividad de los diferentes tratamientos aplicados, tanto químicos como biológicos, en la reducción del patógeno que afecta al cultivo de cacao (Simko & Piepho, 2012).

$$AUC = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(Y_i + Y_{i+1})}{2} \times (t_{i+1} - t_i)$$

n: Es el número total de evaluaciones realizadas.

Y_i: Es la proporción de la enfermedad en la evaluación i-ésima (expresada como un valor entre 0 y 1, o en porcentaje).

t_i: Es el tiempo de la evaluación i-ésima (general en días).

Y_{i+1}: Es la proporción de la enfermedad en la siguiente evaluación.

t_{i+1}: Es el tiempo de la siguiente evaluación.

∑: Representa la suma de todas las áreas de los trapecios formados entre las evaluaciones consecutivas.

3.2.1.2.8. Incidencia (%).

Se evaluó los síntomas de la infección fúngica en las muestras que sean tratadas con las distintas dosis del fungicida, y los resultados se expresan en porcentaje (Cadena et al., 2022).

$$\text{Tasa de incidencia: } \frac{\text{Numero de fragmentos infectados durante el ensayo}}{\text{Total de muestras analizadas en el ensayo}} * 100$$

3.2.2 Tratamientos

En esta etapa se aplicó el patógeno tanto en medios de cultivo como en tejidos de mazorca de cacao, para luego tratarlo con distintas concentraciones del fungicida Tebuconazole y con agentes biológicos como *T. harzianum* y *Bacillus* spp. Estos tratamientos permiten evaluar la sensibilidad del hongo frente a cada

agente aplicado y detectar posibles cambios en su virulencia, a través de la respuesta observada en las pruebas *in vitro* y en tejido vivo.

Tabla 1.
Dosis *in vitro*

Tratamientos	Descripción	Dosis (ppm)
1	PDA + tebuconazole	0.1
2	PDA + tebuconazole	1
3	PDA + tebuconazole	10
4	PDA + <i>T. harzianum</i>	Disco de colonia
5	PDA + <i>B. subtilis</i>	Pase de ASA
6	PDA	Control

Elaborado por: La Autora, 2026

Tabla 2.
Dosis en tejido vivo

Tratamientos	Descripción	Dosis (ppm)
1	Tebuconazole	0.1
2	Tebuconazole	1
3	Tebuconazole	10
	<i>T. harzianum</i>	1 * 10 ⁶ UFC/ml
	<i>B. subtilis</i>	1 * 10 ⁶ UFC/ml
4	Agua destilada	Control

Elaborado por: La Autora, 2026

3.2.3 Diseño experimental

Se aplicó un diseño completo al azar (DCA) en la cual se probó tres dosis de fungicida tebuconazole. La unidad experimental fue una caja Petri con medio envenenado PDA con diez repeticiones, para el caso del experimento en tejido vivo se utilizó fragmentos de mazorcas como unidad experimental.

Tabla 3.
Análisis de varianza *in vitro*

Fuente de variación	Fórmula	GL
Tratamientos	t-1	5
Error experimental	(n-1) -(t-1)	54
Total	(n*t)-1	59

Elaborado por: La Autora, 2026

Tabla 4.
Análisis de varianza en tejido vivo

Fuente de variación	Fórmula	GL
Tratamientos	t-1	5
Error experimental	(n-1) -(t-1)	54
Total	(n*t) -1	59

Elaborado por: La Autora, 2026

3.2.4 Recolección de datos

3.2.4.1 Recursos

3.2.4.1.1. Recursos bibliográficos.

Se utilizó la información dada por tesis, artículos, informes técnicos, libros digitales, sitios web entre otros...

3.2.4.1.2. Recursos económicos.

Se financió con recursos propios.

Tabla 5.
Presupuestos del ensayo

Material	Cantidad	Precio unitario (USD)	Total (USD)
Placas petri (Pack de 20 u)	2	9.17	18.34
Fungicida	1	10	10
Pinzas	1	5	5
Envases dosificadores	3	5	15
Mechero	1	10	10
Lápices y plumas	2	1	2
PDA	1	70	70
Agua destilada	1	3	3
Total			133.34

Elaborado por: La Autora, 2026

3.2.4.1.3. Materiales y equipos.

Esta investigación al ser de carácter experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Agraria del Ecuador, en donde se utilizó varios materiales tales como placas petri, medio de cultivo PDA, fungicida, pinzas, envases dosificadores, microscopio, mechero, lápices, plumas, cuaderno, celular, laptop.

3.2.4.2. Métodos y técnicas

3.2.4.2.1. Métodos de investigación.

- **Método inductivo**

Este método ofreció una forma de razonar que partió de hechos concretos que alcanzó conclusiones de tipo general.

- **Método deductivo**

Con este método se partió de principios generales con el fin de alcanzar conclusiones particulares.

- **Método sintético**

Este método facilitó la obtención de conclusiones claras y resumidas sobre la investigación, con foco en los aspectos más relevantes.

- **Método analítico**

Este recurso sirvió para explorar distintas fuentes y otros materiales que aportó respaldo a la investigación, en relación con los resultados obtenidos.

- **Método experimental**

Este método fue clave para llevar a cabo ensayos en condiciones controladas, donde se modificó variables determinadas con el propósito de analizar sus efectos. Esto facilitó la identificación de relaciones causa-efecto entre las bacterias empleadas y los resultados que se obtuvo de tal manera que aseguro la validez de las conclusiones.

3.2.4.2.2. Técnicas de investigación.

- **Población**

Fue constituido por los agricultores de diferentes lugares de la provincia del Guayas, por ejemplo: Cerecita, Balzar y Marcelino Maridueña como área de muestreo de la enfermedad, debido a que es una de las zonas con mayor producción cacaotera y factores que facilitan la presencia de enfermedades fúngicas entre ellas *L. theobromae*.

- **Muestreo**

El muestreo fue no probabilístico a conveniencia, el número de productores fueron tres, de las cuales se obtuvo tres muestras por cada finca aledaña. En total se tomó nueve muestras con la implementación de tijeras podadoras y se las colocó dentro de una funda kraft, de las cuales tres fueron utilizadas para el experimento *in vitro* en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Agraria

del Ecuador, campus Guayaquil.

- **Cultivo dual**

Se aplicó como un método que combinó dos tipos de análisis para estudiar de forma más completa al agente responsable de la muerte regresiva. Se integró la evaluación morfológica, enfocada en la descripción y medición de las estructuras fúngicas, con la evaluación fenotípica, orientada a determinar su respuesta frente a distintos niveles de sensibilidad y virulencia. Esta combinación permitió obtener una caracterización detallada del patógeno, favoreciendo la identificación de diferencias entre aislados y la estimación de su capacidad de causar daño bajo condiciones controladas *in vitro*.

- **Activación del hongo**

En esta etapa se llevó a cabo la desinfección del área y de los materiales de trabajo. Luego, se tomó un fragmento de un aislado de *L. theobromae*, proveniente de un tubo estéril proporcionado por el laboratorio de biotecnología, el cual ya está secuenciado. Dicho fragmento se transfirió a placas petri con medio de cultivo estéril. En lo posterior, se colocó en una caja plástica bajo condiciones controladas, donde cada placa desarrolló el crecimiento fúngico por separado.

- **Caracterización macroscópica y microscópica**

Se llevó a cabo la observación de las características visibles de las colonias, como el color, la textura y el tamaño que alcanzó en las placas. La caracterización microscópica se realizó con la ayuda de un microscopio, a través del cual se examinó estructuras celulares como hifas, esporas y otros rasgos propios del hongo. Esta observación permitió una identificación precisa. Además, el análisis confirmó la presencia de *L. theobromae*, debido a que el micelio mostró un crecimiento veloz y estructuras con rasgos similares en todos los casos.

- **Multiplicación del fitopatógeno**

Luego que se identificó y aisló con anterioridad el hongo base, se llevó a cabo la propagación en varias placas petri con medio PDA, con el objetivo de obtener una cantidad adecuada de inóculo.

- **Pruebas de sensibilidad de fungicida**

Para obtener las dosis, se preparó disoluciones bases que permitió alcanzar concentraciones de 10 ppm, 1 ppm y 0.1 ppm. En este paso se realizó los cálculos en excel, y se colocó agua destilada estéril, fiolas, fungicida y

jeringas. Se ubicó fragmentos del hongo en distintas placas petri con agar mezclado con tebuconazole en las dosis antes mencionadas. En la parte inferior de cada caja se trazó dos líneas en forma de cruz, lo que facilitó la medición del crecimiento diario. Las placas están en condiciones controladas y se tomó registros cada día para observar su desarrollo. Con estos datos se pudo determinar la sensibilidad del hongo frente al fungicida y se identificó la dosis más efectiva.

- **Inoculación del patógeno en cacao**

Para las pruebas en tejido vivo, se adquirió fragmentos de mazorcas como elemento experimental. Se cosecho frutos de cacao en madurez fisiológica, libres de enfermedades o lesiones visibles; luego se lavó, esterilizó y cortó en cuatro segmentos. Posterior a esto, se aplicó tebuconazole por medio de atomizadores en dosis de 10 ppm, 1 ppm y 0.1 ppm, junto con un tratamiento que se utilizó agua destilada. Después se realizó laceraciones con el bisturí en el centro de cada porción, el cual se desinfectó después de cada corte. Los fragmentos se inocularon con estructuras del patógeno obtenidas de las placas petri. Se ubicó los fragmentos en una zona con claridad y se examinó después de tres a cinco días para observar los cambios. En el quinto día se efectuó nuevas laceraciones para evaluar con precisión la extensión de la zona contaminada.

- **Evaluación de variables**

Una vez reunida la información correspondiente como al área de crecimiento, porcentaje de inhibición, IC50, niveles de incidencia y severidad, se permitió obtener resultados relevantes para el análisis final. Estas variables fueron evaluadas cada 24 horas durante un período de tres días, lo que permitió monitorear su comportamiento y evolución a lo largo del tiempo.

- **Tabulación de datos**

En esta fase se realizó la recopilación, organización y análisis de los datos obtenidos a lo largo de los experimentos. Se colocó la información en tablas para facilitar una comprensión clara de los resultados.

Se implementó herramientas informáticas como Project, infostat, excel, imageJ y graphpad prism 10 con el fin de llevar a cabo el análisis estadístico y evaluar los efectos de los distintos tratamientos sobre la capacidad patogénica del hongo.

3.2.5 Análisis estadístico

A partir de los datos obtenidos en los ensayos *in vitro* y tejido vivo, se verificó si las distribuciones cumplen con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Para ello, se utilizó las herramientas disponibles en microsoft excel 2016, infostat versión 2020 y graphpad prism 10. Con base en estos resultados, se eligió el tipo de análisis más adecuado, ya sea paramétrico o no paramétrico, según corresponda a cada variable evaluada.

3.2.5.1. Hipótesis

3.2.5.1.1. *In vitro*.

Hipótesis Nula (H_0): Ninguna de las concentraciones mostro un efecto notable sobre la inhibición del patógeno en condiciones *in vitro*.

Hipótesis Alternativa (H_1): Al menos una de las concentraciones genero un efecto importante sobre la inhibición del patógeno en condiciones *in vitro*.

3.2.5.1.2. *In vivo*.

Hipótesis Nula (H_0): Ninguna de las dosis causo una reducción clara en la presencia del patógeno en las mazorcas de cacao.

Hipótesis Alternativa (H_1): Al menos una de las dosis provoco una disminución marcada en la presencia del patógeno en las mazorcas de cacao.

4. RESULTADOS

4.1 Identificación a nivel morfológico el agente que causa la muerte regresiva del cacao.

4.1.1 Radio de colonia

En la tabla 6, posterior al primer día de siembra se esperó dos días para realizar la evaluación del desarrollo circunferencial de los agentes aislados en situaciones *in vitro*, las cepas de cacao CCN51 pertenecientes a los cantones T20 Balzar, T21 Marcelino Maridueña y T22 Cerecita de la provincia del Guayas, presentaron diferentes crecimientos miceliales en los cuatro lados de cada cepa.

Tabla 6.

Radio de dominio morfológico de los agentes aislados

Aislado	Lado	Día 1 cm ²	Día 2 cm ²
T20 Balzar	1	3.5	4.1
T20 Balzar	2	3.5	3.9
T20 Balzar	3	3.3	3.7
T20 Balzar	4	3.4	4.2
T21 Marcelino M	1	1.7	2.5
T21 Marcelino M	2	1.8	2.2
T21 Marcelino M	3	2.2	2.8
T21 Marcelino M	4	2.1	2.6
T22 Cerecita	1	2.1	2.9
T22 Cerecita	2	2.7	3.2
T22 Cerecita	3	2.5	3.1
T22 Cerecita	4	2.3	2.8
p-valor		<0.0001	<0.0001
Coef. Variación (%)		8.11%	6.94%

Nota. p-valor no es significativamente diferente ($p > 0.05$)

Elaborado por: La Autora, 2026

4.1.2 Esquema de crecimiento

A una cota macroscópica los agentes aislados expusieron un crecimiento esférico en un aspecto micelial septado con relieve (figura 1A, 1B, 1C).

4.1.3 Carácter de pertenencia

Los agentes inoculados manifiestan marcos filiformes en sus colonias, en referencia a T21 Marcelino Maridueña (figura 1C) obtuvo un crecimiento micelial alto, T20 Balzar (figura 1B) y T22 Cerecita (figura 1A) con un desarrollo micelial negro desde el punto de vista morfológico.

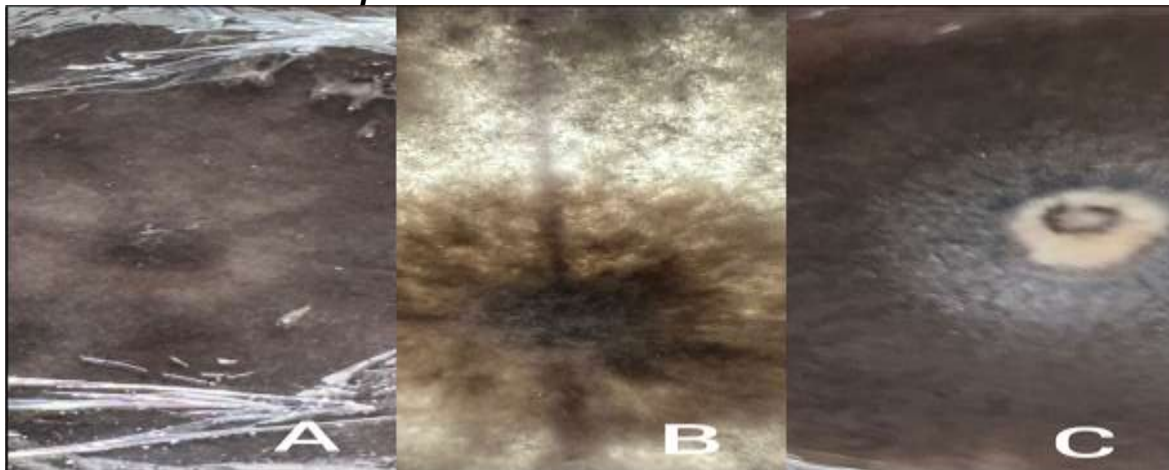
4.1.4 Tonalidad

Durante el transcurso de siete días después de la siembra, la tonalidad de

cada aislado fue negro en su totalidad en el aislado T22 Cerecita (figura 1A), T20 Balzar con un tono negro y una circunferencia micelial blanca en el centro (figura 1B) y T21 Marcelino Maridueña con una similitud a la cepa de T20 Balzar (figura 1A, 1B).

Figura 1.

Observación macroscópica de los aislados *L. theobromae*



(A) Cerecita, (B) Balzar, (C) Marcelino Maridueña.

Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 2.

Observación de conidios en el microscopio Marcelino Maridueña



Elaborado por: La Autora, 2026

4.2 Evaluación de la sensibilidad de los aislados fúngicos a tebuconazole, los agentes biocontroladores *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*

4.2.1 Área de crecimiento

En la tabla 7 mostro el efecto de diferentes concentraciones de tebuconazole 10, 1 y 0.1 ppm midiendo el área de crecimiento de *L. theobromae* en un periodo de tres días. El día uno, el tratamiento 10 ppm presentó la menor área de crecimiento con una media significativa de 0.24, la dosis 1 ppm con una

media significativa de 0.69, 0.1 ppm con una media significativa de 1.49 con un coeficiente de variación de 23.19%. El segundo día 10 ppm con una media significativa de 0.00, 1 ppm con 1.31 y 0.1 ppm con 3.39 con un coeficiente de variación de 13.40%. El tercer día 10 ppm con una media significativa de 0.06, 1 ppm con 2.01 y 0.1 ppm con 3.70 con un coeficiente de variación de 9.99%.

El crecimiento de los aislados de T21 *L. theobromae*, T20 *L. theobromae* y T22 *L. theobromae* sin tratamiento químicos o biológicos que inhiban el desarrollo micelial de *L. theobromae* en un periodo de dos días de medición. El día uno T21 *L. theobromae* con una media significativa de 1.03, T20 *L. theobromae* con 1.51, T22 *L. theobromae* con 1.54 y un coeficiente de variación de 23.19%.

El día dos T21 *L. theobromae* con una media significativa de 3.06, T20 *L. theobromae* con 3.29, T22 *L. theobromae* con 3.33 y un coeficiente de variación de 13.40%. El biofungicida *B. subtilis* obtuvo al tercer día de medición de *L. theobromae* una media significativa de 0.64 como biocontrolador considerado bajo, mientras que el biofungicida *T. harzianum* obtuvo al tercer de medición de *L. theobromae* una media significativa de 3.81 como biocontrolador considerado alto y un coeficiente de variación de 9.99%.

Tabla 7.
Área de crecimiento de tratamientos (cm²)

Tratamiento	Dosis	Día 1	Día 2	Día 3
Tebuconazole	10 ppm	0.24 a	0.10 a	0.06 a
Tebuconazole	1 ppm	0.69 b	1.31 b	2.01 b
Tebuconazole	0.1 ppm	1.49 c	3.39 c	3.70 c
<i>B. subtilis</i>				0.64 a
<i>T. harzianum</i>				3.81 b
T21 <i>L. theobromae</i> Sin tratamiento		1.03 b	3.06 a	
T20 <i>L. theobromae</i> Sin tratamiento		1.51 b	3.29 a	
T22 <i>L. theobromae</i> Sin tratamiento		1.54 b	3.33 a	
p-valor		<0.0001	<0.0001	<0.0001
Coef. Variación (%)		23.19%	13.40%	9.99%

Diferencias no significativas (p>0.05)

Nota. Medias con letras iguales no difieren significativamente de acuerdo con Tukey (p>0.05)

Elaborado por: La Autora, 2026

4.1.2 Porcentaje de inhibición de crecimiento

En la tabla 8 se observó que en el transcurso de tres días de examinación el tratamiento con 10 ppm de tebuconazole mostro la mayor efectividad en la inhibición de *L. theobromae*, alcanzó un máximo de 100.00% en T20 *L. theobromae*, T21 *L. theobromae* 100.00%, T22 *L. theobromae* 95.01%. La dosis de 1 ppm también fue significativa, pero con una inhibición decreciente de 51.08% en T20 *L. theobromae*, T21 *L. theobromae* 50.23%, T22 *L. theobromae* 35.59%. La menor efectividad se observó en 0.1 ppm con una inhibición final del 0.00% en T20 *L. theobromae*, T21 *L. theobromae* 0.22% y T22 *L. theobromae* con 0.00%. Los p-valores (<0.05) confirmaron diferencias significativas entre tratamientos, y el coeficiente de variación 29.11%, 11.13% y 9.01% indicó una variabilidad moderada en los datos.

En la tabla 9 se observó que en el transcurso de tres días de examinación el tratamiento con *B. subtilis* mostro la mayor efectividad en la inhibición de *L. theobromae*, alcanzo un máximo de 80.90% en T20 *L. theobromae*, T21 *L. theobromae* 83.15%, T22 *L. theobromae* 83.69%. La menor efectividad se observó en el tratamiento con *T. harzianum* con una inhibición final del 0.00% en T20 *L. theobromae*, T21 *L. theobromae* 0.00% y T22 *L. theobromae* 0.00%. El coeficiente de variación 16.10% indicó una variabilidad moderada en los datos.

Tabla 8.
Inhibición de crecimiento del aislado con el tratamiento químico

Aislado	Dosis (ppm)	Día 1	Día 2	Día 3
T20 <i>L. theobromae</i>	0.1 ppm	0.00 b	0.00 a	0.00 a
T21 <i>L. theobromae</i>	0.1 ppm	0.00 a	0.00 b	0.22 a
T22 <i>L. theobromae</i>	0.1 ppm	0.00 a	0.00 a	0.00
T20 <i>L. theobromae</i>	1 ppm	49.44 cd	62.49 d	51.08 c
T21 <i>L. theobromae</i>	1 ppm	66.13 ef	59.56 cd	50.23 c
T22 <i>L. theobromae</i>	1 ppm	55.60 de	54.04 c	35.59 b
T20 <i>L. theobromae</i>	10 ppm	75.56 f	100.00 e	100.00 d
T21 <i>L. theobromae</i>	10 ppm	66.13 ef	100.00 e	100.00 d
T22 <i>L. theobromae</i>	10 ppm	97.98 g	100.00 e	95.01 d
Significancia				ns
ANOVA factor A				
Significancia				ns
ANOVA factor B				
Significancia				ns
ANOVA interacción				
AB				
p-valor		0.0002	0.0001	<0.0001
Coef. Variación (%)		29.11%	11.13%	9.01%

A: Aislado; **D:** Dosis (ppm); **ns:** diferencias no significativas ($p > 0.05$)

Nota. Medias con letras iguales no difieren significativamente de acuerdo con Tukey ($p > 0.05$)

Elaborado por: La Autora, 2026

Tabla 9.
Porcentaje de crecimiento del aislado con el tratamiento biológico (factorial)

Factor A (A)	Factor B (BF)	Día 3
T20 <i>L. theobromae</i>	<i>T. harzianum</i>	0.00 a
T21 <i>L. theobromae</i>	<i>T. harzianum</i>	0.00 a
T22 <i>L. theobromae</i>	<i>T. harzianum</i>	3.06 a
T20 <i>L. theobromae</i>	<i>B. subtilis</i>	80.90 b
T21 <i>L. theobromae</i>	<i>B. subtilis</i>	83.15 b
T22 <i>L. theobromae</i>	<i>B. subtilis</i>	83.69 b
Significancia ANOVA factor A		ns
Significancia ANOVA factor B		ns
Significancia ANOVA interacción AB		ns
p-valor		0.5354
Coef. Variación (%)		16.10%

A: Aislado; **BF:** Biofungicida

ns: diferencias no significativas ($p > 0.05$)

Nota. Medias con letras iguales no difieren significativamente de acuerdo con Tukey ($p > 0.05$)

Elaborado por: La Autora, 2026

4.1.3 IC₅₀ de *Lasidiplodia theobromae* en los tratamientos.

En la tabla 10 la concentración inhibitoria máxima media para inhibir el 50% de *L. theobromae* bajo condiciones *in vitro* al día uno de T20 *L. theobromae* fue de 0.4270 ppm, con un intervalo de confianza del 95% entre 0.2451 ppm a 0.6613 ppm, al día dos 0.9738 ppm, con un intervalo de confianza del 95% entre 0.7557 ppm a 1.253 ppm, al día tres 0.9485 ppm, con un intervalo de confianza del 95% entre 0.8665 ppm a 1.038 ppm. El aislado T21 *L. theobromae* al día uno fue de 0.3915 ppm, con un intervalo de confianza del 95% entre 0.1342 ppm a 0.7698 ppm, al día dos fue de 0.6211 ppm, con un intervalo de confianza del 95% entre 0.4463 ppm a 0.8400 ppm, al día tres fue de 0.9945 ppm, con un intervalo de confianza del 95% entre 0.8638 ppm a 1.145 ppm. El aislado T22 *L. theobromae* al día uno fue de 0.6040 ppm, con un intervalo de confianza del 95% entre 0.4788 ppm a 0.7507 ppm, al día dos fue de 0.6390 ppm, con un intervalo de confianza del 95% entre 0.5885 ppm a 0.6927 ppm, al día tres fue de 1.868 ppm, con un intervalo de confianza del 95% entre 1.487 ppm a 2.395 ppm.

Tabla 10.
IC50 de *L. theobromae* (T20, T21 y T22) durante 3 días

Día	Aislado	Dosis log10	Dosis IC50 (ppm)	IC 95%
1	T20 <i>L. theobromae</i>	1, 0, -1	0.4270	0.2451 a 0.6613
2	T20 <i>L. theobromae</i>	1, 0, -1	0.9738	0.7557 a 1.253
3	T20 <i>L. theobromae</i>	1, 0, -1	0.9485	0.8665 a 1.038
1	T21 <i>L. theobromae</i>	1, 0, -1	0.3915	0.1342 a 0.7698
2	T21 <i>L. theobromae</i>	1, 0, -1	0.6211	0.4463 a 0.8400
3	T21 <i>L. theobromae</i>	1, 0, -1	0.9945	0.8638 a 1.145
1	T22 <i>L. theobromae</i>	1, 0, -1	0.6040	0.4788 a 0.7507
2	T22 <i>L. theobromae</i>	1, 0, -1	0.6390	0.5885 a 0.6927
3	T22 <i>L. theobromae</i>	1, 0, -1	1.868	1.487 a 2.395

Elaborado por: La Autora, 2026

4.3 Determinación del nivel de virulencia del agente causal de muerte regresiva en frutos de cacao donde se incorpora los siguientes tratamientos antifúngicos a nivel *in vitro* e *in vivo*.

4.3.1 Severidad de *Lasidiplodia theobromae* en los tratamientos químicos

En la tabla 11 el tratamiento tebuconazole 0.1 ppm de la cepa T20 *L. theobromae*, 10 ppm del aislado T20 *L. theobromae* y 0.1 ppm del aislado T21 *L. theobromae* expuso una severidad media de 0.50, 0.75 y 0.81 lo que indica una baja contaminación de *L. theobromae*, 10 ppm de la cepa T22 *L. theobromae*, 10 ppm del aislado T21 *L. theobromae*, 1 ppm del aislado T22 *L. theobromae* y 1 ppm del aislado T20 *L. theobromae* con una severidad media de 1.06, 1.69, 1.82 y 1.90 lo que indica una contaminación leve de *L. theobromae*, 0.1 ppm del aislado T22 *L. theobromae* y 1 ppm del aislado T21 *L. theobromae* con una severidad media de 2.75 y 3.02 lo que indica una contaminación alta de *L. theobromae* con un p-valor de 0.1051 entre dosis y un coeficiente de variación de 32.76% de medias no significativas diferentes.

Tabla 11.
Severidad química en tejido vivo de *L. theobromae* (factorial)

Factor A (D)	Factor B (A)	Medias
0.1 ppm	T20 <i>L. theobromae</i>	0.50 a
10 ppm	T20 <i>L. theobromae</i>	0.75 a
0.1 ppm	T21 <i>L. theobromae</i>	0.81 a
10 ppm	T22 <i>L. theobromae</i>	1.06 a
10 ppm	T21 <i>L. theobromae</i>	1.69 a
1 ppm	T22 <i>L. theobromae</i>	1.82 a
1 ppm	T20 <i>L. theobromae</i>	1.90 a
0.1 ppm	T22 <i>L. theobromae</i>	2.75 a
1 ppm	T21 <i>L. theobromae</i>	3.02 a
Significancia ANOVA		
factor A		ns
Significancia ANOVA		
factor B		ns
Significancia ANOVA		
interacción AB		ns
p-valor		0.1051
Coef. Variación (%)		32.76%

A: Aislado; D: Dosis

ns: diferencias no significativas ($p > 0.05$)

Nota. Medias con letras iguales no difieren significativamente de acuerdo con Tukey ($p > 0.05$)

Elaborado por: La Autora, 2026

4.3.2 Severidad de *Lasidiplodia theobromae* en los tratamientos biológicos

En la tabla 12 el tratamiento *B. subtilis* del aislado T20 *L. theobromae* expuso una severidad media de 2.92 lo que indica una baja contaminación de *L. theobromae*, *T. harzianum* del aislado de T21 *L. theobromae* y *B. subtilis* del aislado T21 *L. theobromae* con una severidad media de 3.62 y 3.87 lo que indica una contaminación leve de *L. theobromae*, *B. subtilis* del aislado T22 *L. theobromae*, *T. harzianum* del aislado de T20 *L. theobromae* y *T. harzianum* del aislado de T22 *L. theobromae* con una severidad media de 5.06, 5.90 y 7.92 lo que indica una contaminación alta de *L. theobromae* con un p-valor de 0.7198 de la interacción biofungicida con cepa y un coeficiente de variación de 31.05% de medias no significativas diferentes.

Tabla 12.
Severidad biológica en tejido vivo de *L. theobromae* (factorial)

Factor A (BF)	Factor B (A)	Medias
<i>B. subtilis</i>	T20 <i>L. theobromae</i>	2.92 a
<i>T. harzianum</i>	T21 <i>L. theobromae</i>	3.62 a
<i>B. subtilis</i>	T21 <i>L. theobromae</i>	3.87 a
<i>B. subtilis</i>	T22 <i>L. theobromae</i>	5.06 a
<i>T. harzianum</i>	T20 <i>L. theobromae</i>	5.90 a
<i>T. harzianum</i>	T22 <i>L. theobromae</i>	7.92 a
Significancia ANOVA factor A		ns
Significancia ANOVA factor B		ns
Significancia ANOVA interacción AB		ns
p-valor		0.7198
Coef. Variación (%)		31.05%

A: Aislado; **BF:** Biofungicida

ns: diferencias no significativas ($p > 0.05$)

Nota. Medias con letras iguales no difieren significativamente de acuerdo con Tukey ($p > 0.05$)

Elaborado por: La Autora, 2026

4.3.3 Comprobación de hipótesis

Con base a los resultados obtenidos en la evaluación del crecimiento micelial, área de crecimiento y porcentaje de inhibición (%) de *L. theobromae*, se evidenció que las diferentes concentraciones de tebuconazole generó efectos diferenciados en el desarrollo del patógeno. En particular, la dosis de 10 ppm alcanzó valores de inhibición cercanos al 100% en los tres aislados evaluados, mientras que las concentraciones de 1 ppm y 0.1 ppm con una eficacia progresiva menor.

En función de estos resultados, se rechazó la hipótesis nula, que planteó ninguna de las concentraciones mostró un efecto notable sobre la inhibición patógeno, y se aceptó la hipótesis alternativa, de manera que confirma al menos una de las concentraciones generó un efecto importante en la inhibición de *L. theobromae* en condiciones in vitro.

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la caracterización morfológica evidencian que los aislados presentan un crecimiento radial, micelio septado y tonalidades oscuras, rasgos que en la actualidad se reconocen como distintivos del complejo asociado a *L. theobromae*. Esta aptitud coincide con lo descrito por Choez et al. (2023), quienes señalan que la variabilidad fenotípica en patógenos del cacao aún no se encuentra explicada a nivel metabólico. En este sentido, las diferencias observadas en el radio de colonia entre los aislados de T20 Balzar, T21 Marcelino Maridueña y T22 Cerecita no solo reflejan variabilidad fisiológica, sino que también sugieren la existencia de mecanismos adaptativos diferenciados, los cuales pueden influir en la respuesta a estrategias de control.

El patrón de crecimiento acelerado y la pigmentación oscura observada en el aislado de T20 Balzar, se interpreta como un indicador de alta capacidad colonizadora, lo cual se alinea con lo reportado por Shakirah et al. (2022), quienes identifican a *L. theobromae* como un patógeno agresivo responsable de múltiples afecciones en cacao en Malasia. La similitud morfológica entre los aislados evaluados refuerza la hipótesis de que este hongo constituye el agente predominante en la muerte regresiva en las zonas estudiadas con estabilidad fenotípica incluso bajo diferentes condiciones geográficas.

Del mismo modo, el crecimiento micelial significativo en los tratamientos sin control confirma el alto potencial competitivo del patógeno, lo cual es consistente con lo indicado por Martínez y Pérez (2020), quienes reportan una elevada frecuencia de *L. theobromae* en sistemas productivos de cacao en Cuba. En el presente estudio, esta capacidad de expansión en condiciones *in vitro* evidencia que el patógeno mantiene un comportamiento epidemiológico persistente, lo que explica su amplia distribución en regiones tropicales y su impacto directo en la productividad del cultivo.

En cuanto a los tratamientos biológicos, se observa que *T. harzianum* no presenta un efecto inhibitorio significativo frente a *L. theobromae*, lo cual contrasta con lo expuesto por Cedeño et al. (2025), quienes destacan su alta eficiencia contra *P. palmivora*. Esta discrepancia se interpreta como un fenómeno de especificidad biológica, donde la eficacia del antagonista depende de la interacción particular entre cepas y patógenos. En este contexto, los resultados sugieren que no todas las cepas de *Trichoderma* poseen el mismo potencial de

biocontrol, lo que resalta la necesidad de seleccionar aislamientos con compatibilidad funcional frente al patógeno objetivo. Por otro lado, el tratamiento con *B. subtilis* muestra un nivel de inhibición considerable, lo que indica que este agente posee mecanismos más efectivos frente a *L. theobromae* bajo las condiciones evaluadas. Este comportamiento sugiere que los metabolitos antibacterianos y antifúngicos producidos por esta bacteria pueden desempeñar un papel determinante en la supresión del crecimiento micelial, lo cual abre nuevas perspectivas en el manejo biológico del patógeno.

En relación con el control químico, el tebuconazole demuestra una alta eficacia con niveles de inhibición cercanos al 100% a concentraciones de 10 ppm y valores de IC50 inferiores a 1 ppm en la mayoría de los aislados. Este comportamiento coincide con lo reportado por Chipantiza et al. (2024), quienes destacan la efectividad de fungicidas sistémicos en la reducción de enfermedades del cacao. La respuesta dosis-dependiente observada en este estudio confirma que el fungicida actúa de manera eficiente sobre el desarrollo micelial, sin embargo, las variaciones en los valores de IC50 entre aislados indican diferencias en sensibilidad, lo que representa un riesgo potencial de generación de resistencia si no se implementan estrategias de rotación de ingredientes activos.

Por último, las variaciones en la severidad observadas en condiciones *in vivo* evidencian que la virulencia del patógeno no es homogénea entre aislados, lo cual coincide con lo planteado por Amaya et al. (2025), quienes destacan que la agresividad de los patógenos depende tanto del aislado como de la respuesta del hospedero. En este estudio, la presencia de niveles de severidad variables sugiere que la interacción patógena–huésped–tratamiento es dinámica y condiciona la manifestación de la enfermedad. Esto refuerza la necesidad de diseñar estrategias de manejo integradas que consideren la diversidad biológica del patógeno y su comportamiento en diferentes condiciones ambientales.

En conjunto, los resultados obtenidos permiten establecer que *L. theobromae* mantiene un comportamiento competitivo, con variabilidad fisiológica entre aislados, sensibilidad diferencial a tratamientos y una respuesta biológica compleja frente a agentes de control, lo que confirma la importancia de profundizar en estudios moleculares y metabólicos para optimizar las estrategias de manejo en el cultivo de cacao.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

A partir de la identificación morfológica realizada, se establece que los aislados evaluados presentan características consistentes con *L. theobromae*, que cumple con un nivel eficaz el primer objetivo específico. La uniformidad en rasgos como el crecimiento radial, la pigmentación oscura y la estructura micelial confirma que la caracterización macroscópica constituye una herramienta válida para una identificación preliminar del agente causal de la muerte regresiva del cacao, aunque su variabilidad sugiere la coexistencia de diferencias fisiológicas entre aislados.

En relación con la evaluación de sensibilidad, se determina que el tebuconazole ejerce un efecto alto inhibitorio en el crecimiento micelial del patógeno que muestra una respuesta clara dependiente de la dosis y valores de IC50 bajos, lo que evidencia su elevada eficacia como agente químico de control. En contraste, los tratamientos biológicos presentan comportamientos diferenciados, donde *B. subtilis* demuestra un efecto inhibitorio considerable, mientras que *T. harzianum* no logra establecer un antagonismo efectivo contra el patógeno e indica que su desempeño depende de la compatibilidad entre cepas y condiciones experimentales.

Respecto al nivel de virulencia, se concluye que los aislados de *L. theobromae* poseen una capacidad patogénica variable en frutos de cacao, evidenciada por diferencias en los niveles de severidad tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. Este comportamiento confirma que la agresividad del patógeno no es homogénea y está influenciada por la interacción entre el aislado, el tratamiento aplicado y el entorno de evaluación.

En conjunto, los resultados permiten inferir que el manejo de la muerte regresiva del cacao no puede basarse en una única estrategia de control, pero que requiere considerar la variabilidad del patógeno, su respuesta diferencial a tratamientos y su capacidad de adaptación, lo cual aporta evidencia sólida para la toma de decisiones en sistemas productivos.

Los resultados obtenidos establecen que las características morfológicas evaluadas constituyen una herramienta eficaz para la identificación preliminar del agente causal de la muerte regresiva del cacao que evidencian rasgos compatibles con *L. theobromae* de manera que cumple con lo planteado en la hipótesis. No obstante, la variabilidad observada entre los aislados sugiere la presencia de

diferencias fisiológicas que pueden influir en su comportamiento patogénico y respuesta a los tratamientos.

En relación con los métodos de control evaluados, se acepta la hipótesis propuesta, ya que el tebuconazole demuestra una alta capacidad para reducir el desarrollo del patógeno tanto en condiciones *in vitro* como en ciertos ensayos *in vivo* y evidencia una respuesta dependiente de la dosis y una elevada eficacia inhibitoria. En contraste, *T. harzianum* no presenta un efecto antagonista consistente frente a *L. theobromae*, lo que indica que su acción biocontroladora no es generalizable para este patógeno en las condiciones estudiadas.

6.2 Recomendaciones

En primera instancia se recomienda incorporar herramientas moleculares, como la amplificación y secuenciación de regiones ITS y otros marcadores genéticos, con el propósito de complementar la caracterización morfológica y confirmar con mayor precisión la identidad de *L. theobromae*. Esta integración permitirá diferenciar posibles variantes o complejos de especies que no pueden ser distinguidos por rasgos macroscópicos, de manera que, considera la variabilidad observada entre los aislados. Del mismo modo, se promoverá la creación de bancos de aislamientos caracterizados tanto a nivel morfológica como genético, lo que facilitará futuras investigaciones y permitirá establecer relaciones más claras entre la variabilidad fenotípica y el comportamiento patogénico del microorganismo.

Las estrategias deberán implementarse en el manejo integrado en las que el tebuconazole será utilizado de forma racional y rotativa con otros fungicidas de diferente modo de acción, con el fin de minimizar la presión de selección y reducir el riesgo de desarrollo de resistencia en las poblaciones del patógeno. Además, se ampliará la evaluación de agentes biocontroladores, priorizando la selección de cepas nativas de *T. harzianum* y otros microorganismos con potencial antagonista que estén adaptados a las condiciones agroecológicas locales. Este enfoque permitirá identificar combinaciones más efectivas de control, así como explorar posibles sinergias entre métodos químicos y biológicos con la eficiencia y sostenibilidad del manejo fitosanitario en el cultivo de cacao.

Se desarrollarán ensayos en condiciones de campo que permitirán evaluar la virulencia de los distintos aislados en diferentes variedades de cacao con factores ambientales como humedad, temperatura y manejo agronómico, los cuales influyen en la expresión de la enfermedad. Este tipo de estudios permitirá comprender de

manera más integral la interacción patógena–huésped–ambiente, así como identificar materiales vegetales con mayor tolerancia o resistencia. De igual forma, se impulsará la incorporación de evaluaciones epidemiológicas a largo plazo, que permitan determinar patrones de comportamiento del patógeno en sistemas productivos reales y contribuir al diseño de estrategias de manejo más específicas, preventivas y adaptadas a las condiciones de cada zona productora.

Se profundizará en la validación de la hipótesis mediante la incorporación de herramientas moleculares que complementen la identificación morfológica, con el fin de confirmar la identidad del patógeno y comprender la variabilidad genética entre aislados, lo cual fortalecerá la precisión en la determinación del agente causal de la muerte regresiva del cacao.

BIBLIOGRAFÍA

- Amaya, D., Villavicencio, M., Avilés, D., García, Y., & Espinoza, F. (2025). Morphological and molecular identification of Phytophthora and its virulence in vitro on cocoa shoots (*Theobroma cacao* L.). *Peruana de Biología*, 32(1), e28901. <http://dx.doi.org/10.15381>
- Asamblea Nacional del Ecuador. (2009, 5 de mayo). Ley Orgánica del Régimen de la Soberanía Alimentaria. *Registro Oficial del Gobierno del Ecuador*. N° R.O. 583 Año 2009. <https://www.gob.ec>
- Asamblea Nacional del Ecuador. (2017, 3 de julio). Ley Orgánica de Sanidad Agropecuaria. *Registro Oficial del Gobierno del Ecuador*. N° R.O. 27 Año 2017. <https://www.gob.ec>
- Báez, E., Jaimes, Y., Montealegre, F., Rengifo, G., & Rojas, J. (2022). *Modelo productivo para el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.) en el departamento de Santander* (2 ed.). Agrosavia. <https://doi.org/10.21930>
- Baldiga, R., Avozani, A., Durante, A., Melo, E., Zoldan, S., & Garcés, F. (2013). In vitro mycelial sensitivity of *Macrophomina phaseolina* to fungicides. *Pesquisa Agropecuaria Tropical*, 43(4), 460–466. <https://doi.org/10.1590>
- Belaghihalli, N., Gondi, S., Tejaswi, A., Supriya, M., Haniyambadi, B., & Devi, S. (2022). Characterization and Pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* Causing Black Root Rot and Identification of Novel Sources of Resistance in Mulberry Collections. *The Plant Pathology Journal*, 38(4), 272-286. <https://doi.org/10.5423>
- Cadena, F., & Poma, E. (2022). Manejo de la moniliasis del cacao (*Moniliophthora roreri*) con la aplicación de dos especies de *Trichoderma*. *Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 9(2), 37-43. <https://doi.org/10.53287>
- Cedeño, Á., Varas, C., Varas, I., Mestanza, C., Arellano, K., & Vilela, O. (2025). Potencial de *Trichoderma* spp como agente antagonista de *Phytophthora palmivora* en plántulas de cacao variedad CCN-51. *Horizon Nexus Journal*, 3(2), 18-35. <https://doi.org/10.70881>
- Chipantiza, J., Orejuela, J., & Chaglla, M. (2024). Evaluación de dos fungicidas para el control de moniliasis (*moniliophthora roreri*) en cultivo de cacao. *Ingenium et Potentia. Revista Electrónica Multidisciplinaria de Ciencias Básicas, Ingeniería y Arquitectura*, 6(11), 4-15. <https://doi.org/10.35381>

- Choez, I., Espinoza, F., Reyes, D., Romero, C., Manzano, P., & Galarza, L. (2023). Chemical Characterization of *Trichoderma* spp. Extracts with Antifungal Activity against Cocoa Pathogens. *Molecules*, *28*(7), 3208. <https://doi.org/10.3390>
- Cuervo, J., Ramírez, M., Sánchez, V., & Ramírez, M. (2011). Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* VSL291 on phytopathogenic fungi isolated from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *African Journal*, *10*(52), 10657-10663. <https://doi.org/10.5897>
- Evaluation of the Antifungal Activity of Gold–Chitosan and Carbon Nanoparticles on *Fusarium oxysporum*. (2020). *Agronomy*, *10*(8), 1143. <https://doi.org/10.3390>
- Forrest, N., Esker, P., & Coelho, R. (2006). Disease assessment concepts and the advancements made in improving the accuracy and precision of plant disease data. *European Journal of Plant Pathology*, *115*(1), 95-103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007>
- Gamboa, E., Sanchez, L., & Rincon, J. (2003). Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao* L) en el estado Barinas. *Facultad de Agronomía*, *20*(2). <https://ve.scielo.org>
- Guamán, M., Jaramillo, E., & Bernal, J. (2022). Control biológico de la mazorca negra (*phytophthora palmivora* I.) En el cultivo de cacao (*theobroma cacao* I.). *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, *5*(3), 149-154. <https://www.redalyc.org>
- Guillén, M., Umaña, G., & Varela, I. (2023). *olletotrichum* species associated with anthracnose in orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) and its in vitro control with fungicides. *Agronomía Mesoamericana*, *34*(2). <https://doi.org/10.15517>
- Hafner, M., Niepel, M., Chung, M., & Sorger, P. (2016). Growth rate inhibition metrics correct for confounders in measuring sensitivity to cancer drugs. *National Institutes*, *13*(6), 521–527. <https://doi.org/10.1038>
- Hernández, F., & Suárez, Y. (2010). *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L.) en Colombia*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Agrosavia. <https://repository.agrosavia.co>
- Jiménez, W., Ramírez, A., López, J., & Alvarez, A. (2022). Análisis logenético de aislamientos patogénicos de la familia *Botryosphaeriaceae* en cacao

- (Theobroma cacao L.) en la zona de Los Ríos. *Ciencia y Tecnología*, 15(2), 43-52. <https://revistas.uteq.edu.ec>
- Lipsa, F., Ursu, E., Ursu, C., Ulea, E., & Cazacu, A. (2020). Evaluation of the Antifungal Activity of Gold–Chitosan and Carbon Nanoparticles on *Fusarium oxysporum*. *Agronomy*, 10(8), 1143. <https://doi.org/10.3390>
- Martínez, E., & Pérez, L. (2020). Incidencia de enfermedades fúngicas en plantaciones de cacao de las provincias orientales de Cuba. *Protección Vegetal*, 30(2), 32-40. <http://scielo.sld.cu>
- Mbenouna, Zeutsab, M., & Samuelsc. (2021). Dieback due to *Lasiodiplodia theobromae*, a new constraint to cocoa production in Cameroon. *Plant Pathology*, 57(2), 381. <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com>
- Melgarejo , J. (2011). Fungicidas: mecanismos de acción de los fungicidas. *Ventana al Campo Andino*, 15, 193–202. <https://repository.agrosavia.co>
- Merga , J. (2022). Epidemiology and Management Strategies of Cocoa black pod (*Phytophthora* spp.). *Plant Pathology & Quarantine*, 12(1), 34-39. <https://doi.org/10.5943>
- Moreira Morrilo , A. (2021). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maul [(sin.) *Botryodiplodia theobromae* Pat] en el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 653-662. <https://dialnet.unirioja.es>
- Ouattara, A., Coulibaly, K., Konate, I., & Kebe, B. (2020). Screening and Selection in vitro and in vivo of Cocoa Tree (*Theobroma Cacao* Linn) Endophytic Bacteria Having Antagonistic Effects against *Phytophthora* Spp. Fungal Agents Responsible of Black Pod Disease in Côte d'Ivoire. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 8(1), 25-31. <https://doi.org/10.12691>
- Parrales, Y., Crespo, S., & Arteaga, L. (2020). Manejo técnico de la Monilla "Moniliophthora roreri" en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) en el recinto cuatro esquinas. *Revista Pertinencia Académica*, 4(4), 2-12. <https://doi.org/10.5281>
- Pérez, S., Noceda, C., Zambrano, O., Parra, D., Córdoba, L., & Sosa, D. (2017). Descripción de plagas en viveros de cacao en el cantón Milagro. *Ciencia UNEMI*, 10(24), 19-38. <https://doi.org/10.29076>
- Pisco Ortiz. (2024). First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback on *Theobroma cacao* in Colombia. *New disease report*, 49(2), 49-52. <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002>

- Puig, A. (2023). Fungal Pathogens of Cacao in Puerto Rico. *Plants*, 12(22), 2–10. <https://doi.org/10.3390>
- Ruiz Flores, A. (2021). *Efecto de la fertilización edáfica complementada con aminoácidos fitohormonas y micronutrientes sobre la producción de cacao, (Theobroma cacao L.)*. [Tesis de pregrado, Universidad Agraria del Ecuador]. Centro de información Agraria. <https://cia.uagraria.edu.ec>
- Rumbo, R., Ramos, G., & Gómez, A. (2005). Muerte regresiva del cacao (*Theobroma cacao L.*). *Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas*.(6), 27. <http://sian.inia.gob.ve>
- Shakirah, R., Mohamed, N., Zakaria, L., Leong, Y.-H., & Hawa Mohd, M. (2022). *Lasiodiplodia theobromae* as a causal pathogen of leaf blight, stem canker, and pod rot of *Theobroma cacao* in Malaysia. *Scientific Reports*, 12(1), 8966. <https://doi.org/10.1038>
- Silva, D., Batista, T., Costa, E., & Pirovani, C. (2023). Genomic and pathogenicity mechanisms of the main *Theobroma cacao L.* eukaryotic pathogens: A systematic review. *Microorganisms*, 11(6), 1567. <https://doi.org/10.3390>
- Simko, I., & Piepho, H.-P. (2012). The area under the disease progress stairs: Calculation, advantage, and application. *Plant Pathology*, 102(4), 381. <https://doi.org/10.1094>
- Slippers, B., Boissin, E., Pereira, P., & Lombard, D. (2013). Phylogenetic lineages in the Botryosphaerales: a systematic and evolutionary framework. *Studies in Mycology*, 76(1), 31-49. <https://doi.org/10.3114>
- Tenesaca, Y. (2023). *Caracterización y antagonismo in vitro de bacterias asociadas a frutos de cacao (Theobroma cacao L.) en la provincia de Orellana*. [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. Repositorio Institucional. <https://dspace.esPOCH.edu.ec>
- Tirado, P., Lopera, A., & Ríos, L. (2016). Estrategias de control de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao L.*: revisión sistemática. *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 17(3), 417–430. <https://doi.org/10.21930>
- Vega, R., Jiménez, J., & Ortiz, M. (2022). Ensayos in vitro para cuantificar la actividad biológica de citocinas. *Tecnología en Marcha*, 35(2), 152–166. <http://dx.doi.org/10.18845>

- Vera , M., Bernal, A., Mora, M., Vera, D., Solis, K., & Terrero, P. (2018). Microorganismos endófitos asociados a Theobroma cacao como agentes de control biológico de Moniliophthora roreri. *Centro Agrícola*, 45(3), 81-92. <http://scielo.sld.cu>
- Zarrillo, S., Gaikwad, N., Lanaud, C., Viot, C., Lesur, I., Fouet, O., . . . Guichoux, E. (2018). The use and domestication of Theobroma cacao during the mid-Holocene in the upper Amazon. *Nature Ecology & Evolution*, 2, 1879–1888. <https://doi.org/10.1038>

ANEXOS

Figura 3.
Recolección de muestras en Balzar, Cerecita y M.Maridueña



Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 4.
Aislamiento a partir de las muestras recolectadas en campo



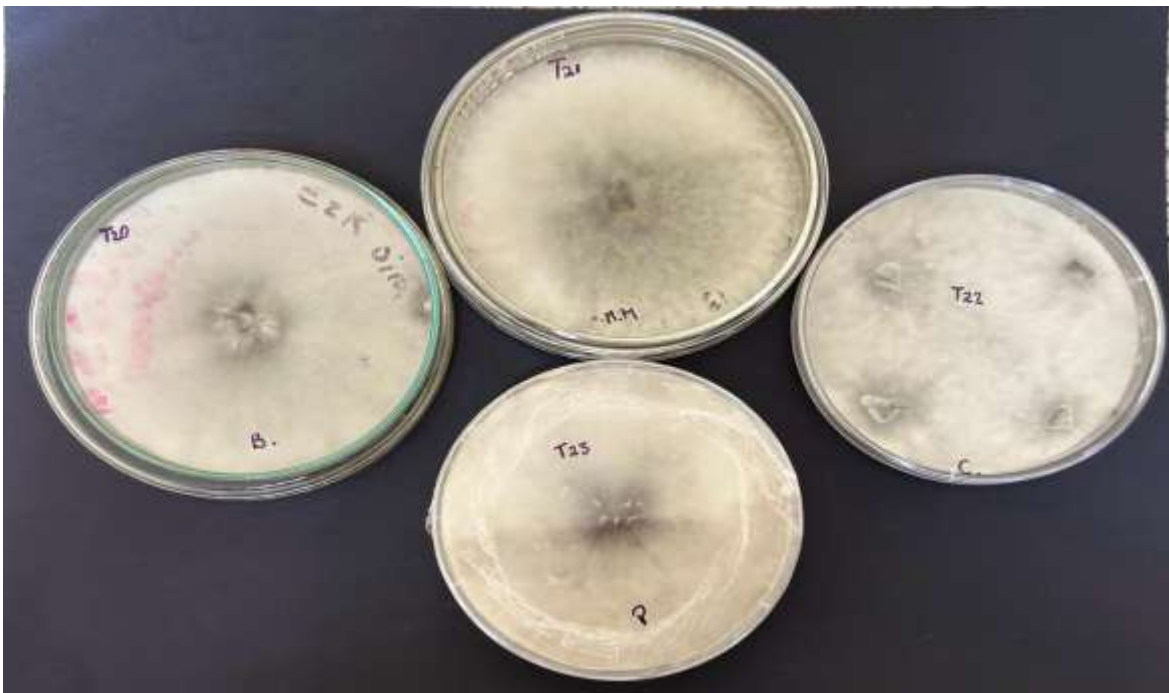
Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 5.
Resiembra de aislamientos obtenidos



Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 6.
Visualización de aislados



Elaborado por: La Autora, 2026



Figura 7.
LOGIC-Tebuconazole



Fuente: DEL MONTE AG

Elaborado por: La Autora, 2026

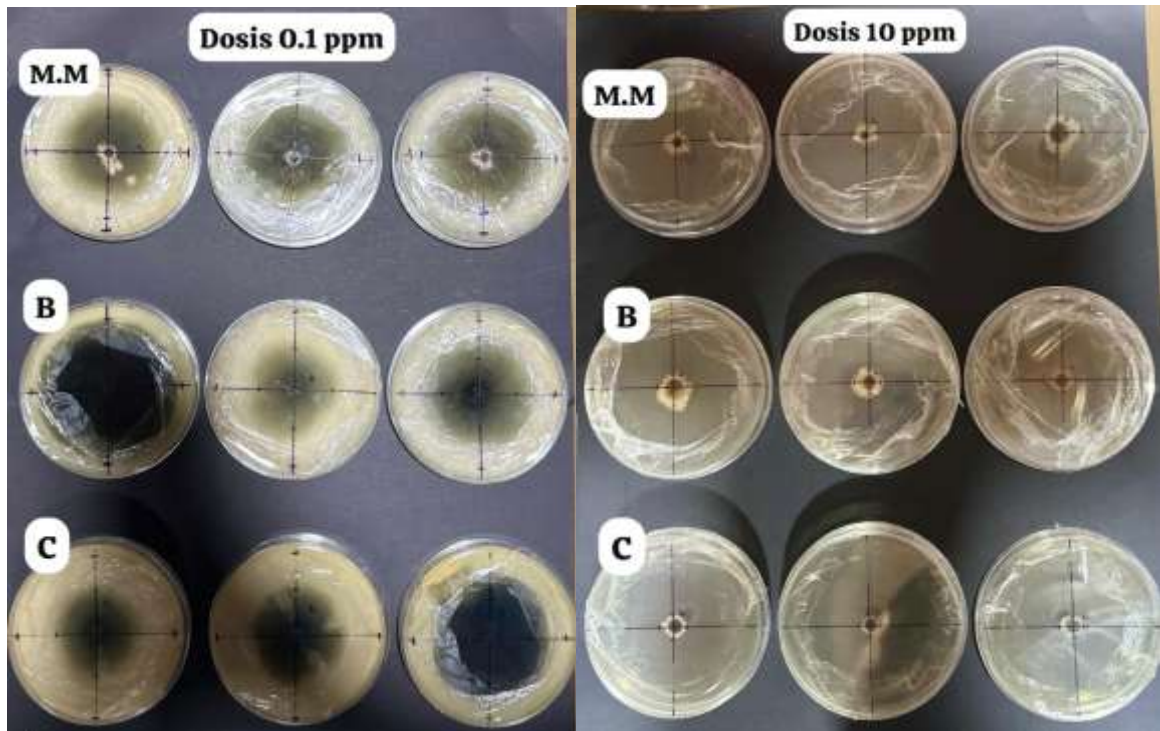
Figura 8.
Ficha Técnica Tebuconazole

FICHA TÉCNICA DEL PRODUCTO			FICHA TÉCNICA DEL PRODUCTO																					
																								
Código: FT.FUN.23 Actualización: 19-Ago-2022 Rev.Ant.: 13-Abr-2022 Versión: 00			Código: FT.FUN.23 Actualización: 19-Ago-2022 Rev.Ant.: 13-Abr-2022 Versión: 00																					
1. NOMBRE COMERCIAL			8. USOS																					
LOGIC			<table border="1"> <thead> <tr> <th>CULTIVOS</th> <th>PLAGA</th> <th>DOSIS</th> <th>Período de carencia</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Banano (Musa acuminata AAA)</td> <td>Sigatoka negra (Mycosphaerella fijiensis var. Difformis)</td> <td>0,4 l/ha*</td> <td>0 días</td> </tr> <tr> <td>Rosas (Rosa sp.)</td> <td>Mal de Pólvora (Oidium sp.)</td> <td>0,62 ml/l</td> <td>No aplica</td> </tr> <tr> <td>Arroz (Oryza sativa)</td> <td>Quemañón (Pyricularia oryzae)</td> <td>0,3 l/ha</td> <td>7 días</td> </tr> <tr> <td>Tomate riñón (Lycopersicon esculentum)</td> <td>Moho gris (Botrytis cinerea)</td> <td>0,5 l/ha</td> <td>7 días</td> </tr> </tbody> </table>		CULTIVOS	PLAGA	DOSIS	Período de carencia	Banano (Musa acuminata AAA)	Sigatoka negra (Mycosphaerella fijiensis var. Difformis)	0,4 l/ha*	0 días	Rosas (Rosa sp.)	Mal de Pólvora (Oidium sp.)	0,62 ml/l	No aplica	Arroz (Oryza sativa)	Quemañón (Pyricularia oryzae)	0,3 l/ha	7 días	Tomate riñón (Lycopersicon esculentum)	Moho gris (Botrytis cinerea)	0,5 l/ha	7 días
CULTIVOS	PLAGA	DOSIS	Período de carencia																					
Banano (Musa acuminata AAA)	Sigatoka negra (Mycosphaerella fijiensis var. Difformis)	0,4 l/ha*	0 días																					
Rosas (Rosa sp.)	Mal de Pólvora (Oidium sp.)	0,62 ml/l	No aplica																					
Arroz (Oryza sativa)	Quemañón (Pyricularia oryzae)	0,3 l/ha	7 días																					
Tomate riñón (Lycopersicon esculentum)	Moho gris (Botrytis cinerea)	0,5 l/ha	7 días																					
2. NUMERO DE REGISTRO			<p>*Aplicaciones aéreas 20-25 litros de agua/hectárea. Aplicación aérea: 400 litros de agua/hectárea.</p> <p>Volumen de agua: se recomienda calibrar el equipo de aspersión para conocer la cantidad de agua a utilizar para cubrir una hectárea de acuerdo a la fenología del cultivo.</p>																					
Registro Nacional: 71 - F 8/NA			9. ÉPOCA Y FRECUENCIA DE APLICACIÓN																					
3. COMPOSICIÓN			<p>Banano: Aplicar en un cultivo que tenga como máximo picas calificadas como grado dos. (Pequeña estría de color café rojizo visible en el haz y envés), según la escala Preaviso Biológico. El producto será aplicado en tres ocasiones. No exceder de 8 aplicaciones por ciclo de cultivo.</p> <p>Rosas: Aplicar cuando se verifique la presencia de la enfermedad (máximo 2% de ataque). Realizar dos aplicaciones con un intervalo de 7 días.</p> <p>Arroz: Aplicar cuando se verifique la presencia de la enfermedad (máximo 2% de ataque). Realizar dos aplicaciones con un intervalo de 14 días.</p> <p>Tomate riñón: aplicar cuando se verifique la presencia de la enfermedad (máximo 2% de ataque). Realizar dos aplicaciones con un intervalo de 7 días.</p>																					
INGREDIENTE ACTIVO	CONCENTRACIÓN	TIPO DE FORMULACIÓN	10. FITOTOXICIDAD																					
Tebuconazole	250 g/L	Concentrado Emulsionable (EC)	No es fitotóxico a los cultivos en las dosis recomendadas en la etiqueta.																					
4. MODO Y MECANISMO DE ACCIÓN																								
Fungicida sistémico acción preventiva, curativa y erradicante. De rápida absorción en las partes vegetativas de la planta, principalmente por translocación acropetal. Inhibe la biosíntesis del ergosterol y la permeabilidad de la pared celular de los patógenos, detiene el crecimiento del bazo germinativo, los haustorios y demás órganos de fijación.																								
5. MODO DE EMPLEO																								
Vierte en el tanque de preparación la dosis a utilizar de LOGIC en la mitad del volumen de agua, agite bien y complete el volumen de agua requerido. Mantenga en agitación constante. No guardar la mezcla, aplique el mismo día de su preparación, aplicando en las partes aéreas de las plantas cubriendo de forma homogénea todo el follaje.																								
6. COMPATIBILIDAD																								
LOGIC es compatible con otros plaguicidas de uso común. No mezclar el producto con ácidos o agentes oxidantes fuertes. Se recomienda realizar una prueba de compatibilidad a pequeña escala previa a la aplicación.																								
7. TOXICIDAD																								
Categoría toxicológica II - LIGERAMENTE PELIGROSO																								

Fuente: DEL MONTE AG

Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 9.
Evaluación de crecimiento *L. theobromae* en diferentes dosis



Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 10.
Confrontación *in vitro* entre *Trichoderma* spp. y hongo fitopatógeno



Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 11.
Confrontación *in vitro* entre *B. Subtilis* y hongo fitopatógico



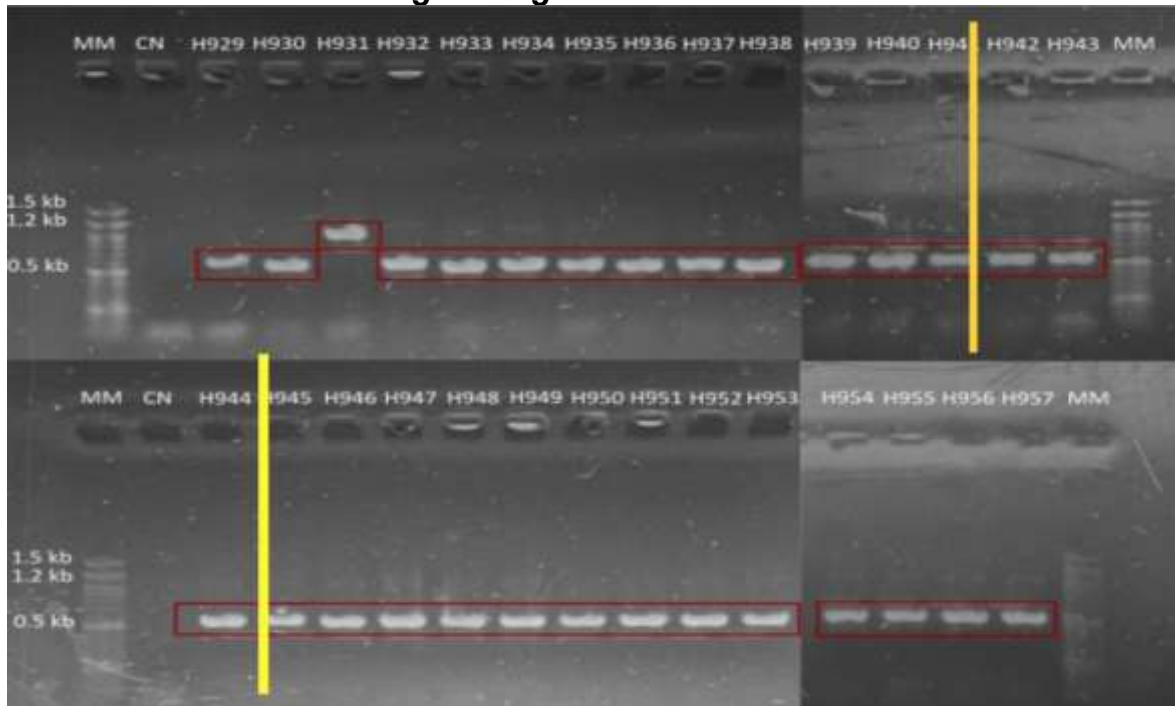
Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 12.
Tabla de resultados de los aislados

H942	T20	509	100.0	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	ITS	100.00	NR 111174.1
H943	T21	507	100.0	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	ITS	100.00	NR 111174.1
H944	T22	504	100.0	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	ITS	100.00	NR 111174.1

Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 13.
Productos PCR del ITS en gel de agarosa al 1%



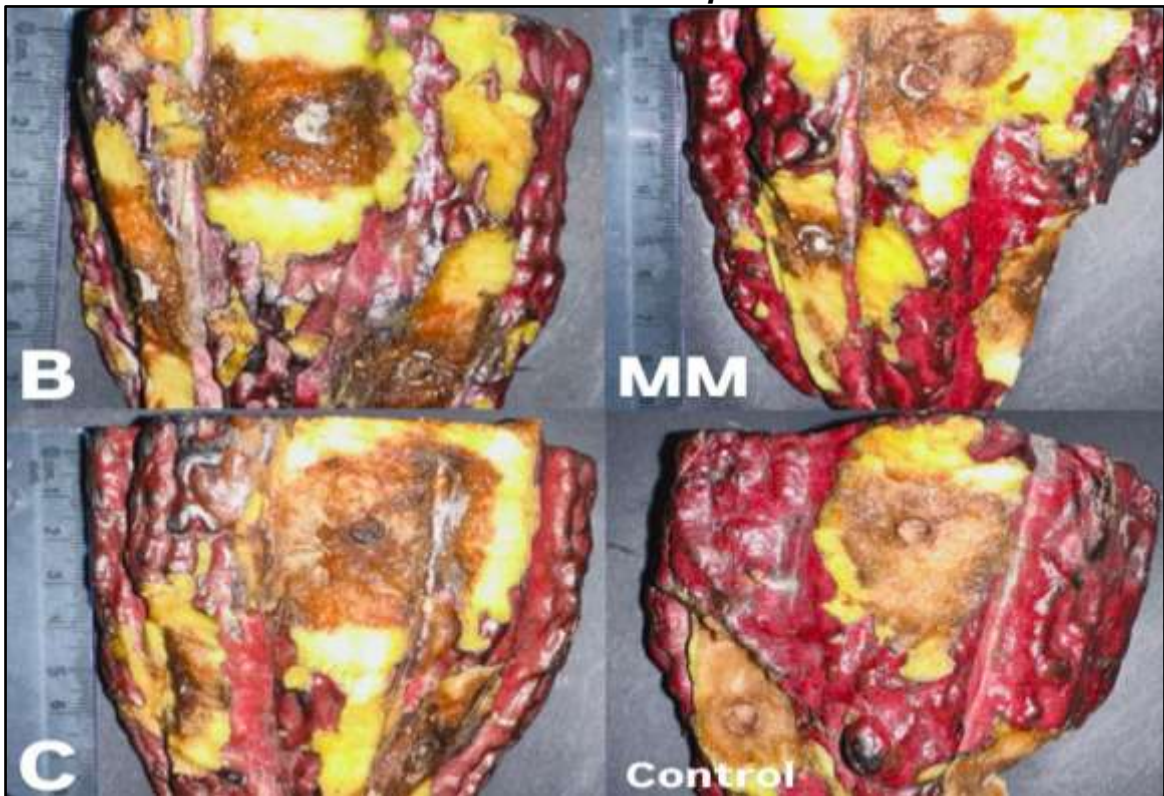
Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 14.
Inoculación del patógeno en mazorcas por dosis



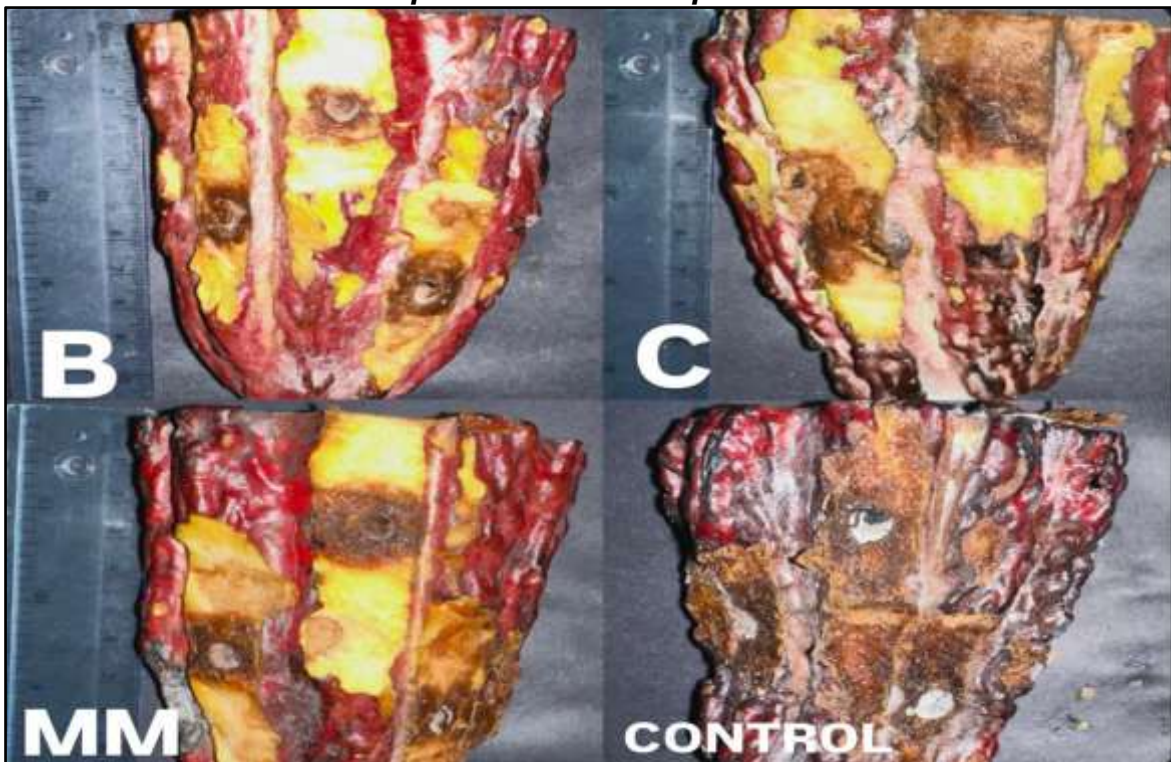
Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 15.
Tratamiento con *Trichoderma* en diferentes cepas



Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 16.
Tratamiento con *Bacillus sp.* en diferentes cepas



Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 17.

Medias significativas de crecimiento de los aislados del día 1

Día 1					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Día 1	12	0,92	0,90	8,11	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,57	2	2,29	51,75	<0,0001
Aislado	4,57	2	2,29	51,75	<0,0001
Error	0,40	9	0,04		
Total	4,97	11			
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,41490					
Error: 0,0442 gl: 9					
Aislado	Medias	n	E.E.		
Marcelino Maridueña	1,95	4	0,11	A	
Cerecita	2,40	4	0,11	B	
Balzar	3,43	4	0,11	C	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 18.

Medias significativas de crecimiento de los aislados del día 2

Día 2					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Día 2	12	0,91	0,89	6,94	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,37	2	2,19	45,22	<0,0001
Aislado	4,37	2	2,19	45,22	<0,0001
Error	0,43	9	0,05		
Total	4,81	11			
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,43403					
Error: 0,0483 gl: 9					
Aislado	Medias	n	E.E.		
Marcelino Maridueña	2,53	4	0,11	A	
Cerecita	3,00	4	0,11	B	
Balzar	3,98	4	0,11	C	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 19.
Medias significativas de dosis químicas en el día 1

Día 1					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Día 1	108	0,89	0,89	23,19	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	29,48	4	7,37	209,70	<0,0001
Aislados	0,37	2	0,19	5,29	0,0065
Dosis (ppm)	29,15	2	14,57	414,67	<0,0001
Error	3,62	103	0,04		
Total	33,10	107			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,10511
Error: 0,0351 gl: 103

Aislados	Medias	n	E.E.	
T21 Lasiodiploidia theobro..	0,74	35	0,03	A
T22 Lasiodiploidia theobro..	0,79	37	0,03	A B
T20 Lasiodiploidia theobro..	0,89	36	0,03	B

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

Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 20.
Medias significativas de dosis químicas en el día 2

Día 2					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Día 2	108	0,98	0,98	13,40	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	212,16	4	53,04	1206,91	<0,0001
Aislados	1,81	2	0,90	20,57	<0,0001
Dosis (ppm)	211,19	2	105,59	2402,77	<0,0001
Error	4,53	103	0,04		
Total	216,69	107			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,11753
Error: 0,0439 gl: 103

Aislados	Medias	n	E.E.	
T21 Lasiodiploidia theobro..	1,42	35	0,04	A
T20 Lasiodiploidia theobro..	1,53	36	0,03	A
T22 Lasiodiploidia theobro..	1,73	37	0,03	B

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

Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 21.

Medias significativas de dosis químicas en el día 3

Día 3

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Día 3	108	0,98	0,98	9,99

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	239,16	4	59,79	1616,36	<0,0001
Aislados	1,50	2	0,75	20,21	<0,0001
Dosis (ppm)	238,38	2	119,19	3222,19	<0,0001
Error	3,81	103	0,04		
Total	242,97	107			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,10783
Error: 0,0370 gl: 103

Aislados	Medias	n	E.E.	
T20 Lasiodiploidia theobro..	1,84	36	0,03	A
T21 Lasiodiploidia theobro..	1,84	35	0,03	A
T22 Lasiodiploidia theobro..	2,09	37	0,03	B

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,10780
Error: 0,0370 gl: 103

Dosis (ppm)	Medias	n	E.E.	
10 ppm	0,06	36	0,03	A
1 ppm	2,01	36	0,03	B
0.1 ppm	3,70	36	0,03	C

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

Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 22.

Medias de crecimiento al día 3 con fungicidas biológicos

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AREA cm	180	0,81	0,80	35,09

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	451,67	3	150,56	246,98	<0,0001
AISLADO	2,00	2	1,00	1,64	0,1965
FACTOR B (Antagonista)	449,67	1	449,67	737,66	<0,0001
Error	107,29	176	0,61		
Total	558,96	179			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,33459
Error: 0,6096 gl: 176

AISLADO	Medias	n	E.E.	
T22	2,10	60	0,10	A
T21	2,23	60	0,10	A
T20	2,35	60	0,10	A

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

Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 23.
PIC de dosis químicas del día 1

PIC DÍA 1					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
PIC DÍA 1	108	0,93	0,93	29,11	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	171405,53	8	21425,69	169,54	<0,0001
Aislados	8088,05	2	4044,02	32,00	<0,0001
Dosis (ppm)	157086,99	2	78543,49	621,51	<0,0001
Aislados*Dosis (ppm)	3167,15	4	791,79	6,27	0,0002
Error	12511,20	99	126,38		
Total	183916,73	107			
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=14,56663					
Error: 126,3757 gl: 99					
Aislados	Dosis (ppm)	Medias	n	E.E.	
T21 Lasiodiploidia theobro..	0.1 ppm	-23,37	12	3,25	A
T22 Lasiodiploidia theobro..	0.1 ppm	-11,29	12	3,25	A B
T20 Lasiodiploidia theobro..	0.1 ppm	-2,22	12	3,25	B
T21 Lasiodiploidia theobro..	1 ppm	37,09	12	3,25	C
T20 Lasiodiploidia theobro..	1 ppm	49,44	12	3,25	C D
T22 Lasiodiploidia theobro..	1 ppm	55,60	12	3,25	D E
T21 Lasiodiploidia theobro..	10 ppm	66,13	11	3,39	E F
T20 Lasiodiploidia theobro..	10 ppm	75,56	12	3,25	F
T22 Lasiodiploidia theobro..	10 ppm	97,98	13	3,12	G
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 24.
PIC de dosis químicas del día 2

PIC DÍA 2					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
PIC DÍA 2	108	0,99	0,98	11,13	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	212445,79	8	26555,72	842,55	<0,0001
Aislados	632,97	2	316,48	10,04	0,0001
Dosis (ppm)	210597,22	2	105298,61	3340,86	<0,0001
Aislados*Dosis (ppm)	807,46	4	201,86	6,40	0,0001
Error	3120,33	99	31,52		
Total	215566,12	107			
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,27461					
Error: 31,5184 gl: 99					
Aislados	Dosis (ppm)	Medias	n	E.E.	
T22 Lasiodiploidia theobro..	0.1 ppm	-12,12	12	1,62	A
T20 Lasiodiploidia theobro..	0.1 ppm	-9,86	12	1,62	A
T21 Lasiodiploidia theobro..	0.1 ppm	0,00	12	1,62	B
T22 Lasiodiploidia theobro..	1 ppm	54,04	12	1,62	C
T21 Lasiodiploidia theobro..	1 ppm	59,56	12	1,62	C D
T20 Lasiodiploidia theobro..	1 ppm	62,49	12	1,62	D
T22 Lasiodiploidia theobro..	10 ppm	100,00	13	1,56	E
T20 Lasiodiploidia theobro..	10 ppm	100,00	12	1,62	E
T21 Lasiodiploidia theobro..	10 ppm	100,00	11	1,69	E
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 25.
PIC de dosis químicas del día 3

PIC DÍA 3						
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV		
PIC DÍA 3	108	0,99	0,99	9,01		
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	175629,41	8	21953,68	1176,60	<0,0001	
Aislados	1099,53	2	549,76	29,46	<0,0001	
Dosis (ppm)	173679,53	2	86839,76	4654,15	<0,0001	
Aislados*Dosis (ppm)	935,64	4	233,91	12,54	<0,0001	
Error	1847,20	99	18,66			
Total	177476,61	107				
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,59714						
Error: 18,6586 gl: 99						
Aislados	Dosis (ppm)	Medias	n	E.E.		
T20 Lasiodiploidia theobro..	0.1 ppm	0,00	12	1,25	A	
T22 Lasiodiploidia theobro..	0.1 ppm	0,00	12	1,25	A	
T21 Lasiodiploidia theobro..	0.1 ppm	0,22	12	1,25	A	
T22 Lasiodiploidia theobro..	1 ppm	35,59	12	1,25	B	
T21 Lasiodiploidia theobro..	1 ppm	50,23	12	1,25	C	
T20 Lasiodiploidia theobro..	1 ppm	51,08	12	1,25	C	
T22 Lasiodiploidia theobro..	10 ppm	95,01	13	1,20	D	
T20 Lasiodiploidia theobro..	10 ppm	100,00	12	1,25	D	
T21 Lasiodiploidia theobro..	10 ppm	100,00	11	1,30	D	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)						

Elaborado por: La Autora, 2026

Figura 26.
PIC de dosis biológicas del día 3

Análisis de la varianza						
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV		
PIC DÍA 3	180	0,81	0,80	53,05		
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	330479,29	5	66095,86	147,81	<0,0001	
PATOGENO	1462,42	2	731,21	1,64	0,1979	
FACTOR B (Antagonista)	328456,14	1	328456,14	734,51	<0,0001	
PATOGENO*FACTOR B (Antagon..	560,73	2	280,36	0,63	0,5354	
Error	77808,52	174	447,18			
Total	408287,81	179				
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=15,58969						
Error: 447,1754 gl: 174						
PATOGENO	FACTOR B (Antagonista)	Medias	n	E.E.		
T20	TRICHODERMA HARZIANUM	-8,11	30	3,86	A	
T21	TRICHODERMA HARZIANUM	-3,51	30	3,86	A	
T22	TRICHODERMA HARZIANUM	3,06	30	3,86	A	
T20	BACILLUS SUBTILIS	80,90	30	3,86	B	
T21	BACILLUS SUBTILIS	83,15	30	3,86	B	
T22	BACILLUS SUBTILIS	83,69	30	3,86	B	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)						

Elaborado por: La Autora, 2026