



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

**TRABAJO DE TITULACIÓN COMO REQUISITO PREVIO PARA
LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

**INHIBICIÓN QUÍMICA DE *Lasiodiplodia theobromae* EN
CACAO (*Theobroma cacao* L.) A NIVEL *IN VITRO* E *IN
VIVO***

AUTOR

VILLALVA TORRES CAMILO SEBASTIAN

TUTOR

ING. AMAYA MÁRQUEZ DARLYN JOSÉ M.Sc.

GUAYAQUIL-ECUADOR

2025



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
"DR. JACOBO BUCARAM ORTIZ"
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: **INHIBICIÓN QUÍMICA DE *Lasiodiplodia theobromae* EN CACAO (*Theobroma cacao* L.) A NIVEL *IN VITRO* E *IN VIVO***, realizado por el estudiante **VILLALVA TORRES CAMILO SEBASTIAN**; con cédula de identidad **N°0953474202** de la carrera **AGRONOMIA**, 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, M.Sc.

Guayaquil, 14 de febrero del 2025



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

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

Los abajo firmantes, docentes designados por el H. Consejo Directivo como miembros del Tribunal de Sustentación, aprobamos la defensa del trabajo de titulación: **"INHIBICIÓN QUÍMICA DE *Lasiodiplodia theobromae* EN CACAO (*Theobroma cacao L.*) A NIVEL *IN VITRO* E *IN VIVO*"**, realizado por el estudiante VILLALVA TORRES CAMILO SEBASTIAN, el mismo que cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador.

Atentamente,

ESPINOZA MORÁN WINSTON, M.Sc.
PRESIDENTE

MORÁN BAJAÑA JOAQUIN, M.Sc.
EXAMINADOR PRINCIPAL

ILEER SANTOS VÍCTOR, M.Sc.
EXAMINADOR PRINCIPAL

AMAYA MÁRQUEZ DARLYN, M.Sc.
EXAMINADOR SUPLENTE

Guayaquil, 12 de febrero del 2025

DEDICATORIA

Este proyecto está dedicado a las personas que me ayudaron a alcanzar esta meta. En primer lugar, a mis padres, por estar siempre motivándome a perseguir mis sueños y brindarme su constante apoyo. A mi abuelito Segundo, quien hace mucho dejó este mundo, pero tuvo la dicha de verme iniciar mi etapa universitaria. Este logro también es para él.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por brindarme sabiduría en cada proyecto emprendido y acompañarme en mi diario vivir.

A quienes han sido mis docentes, por compartir su conocimiento y dedicación en cada clase, fomentando en mí el deseo de aprender y crecer profesionalmente.

A mi tutor de tesis, quien ha sido una pieza fundamental en esta investigación. Su apoyo constante y el espíritu de la investigación científica que me ha transmitido han sido clave en este proceso.

A mi primo, el Ing. Diego Ávila, por darme la oportunidad de acercarme al mundo del agro y por compartir conmigo su invaluable conocimiento y experiencia.

Autorización de Autoría Intelectual

Yo **CAMILO SEBASTIAN VILLALVA TORRES**, en calidad de autor(a) del proyecto realizado, sobre “**INHIBICIÓN QUÍMICA DE *Lasiodiplodia theobromae* EN CACAO (*Theobroma cacao L.*) A NIVEL *IN VITRO* E *IN VIVO*” para optar el título de **INGENIERO AGRÓNOMO**, por la presente autorizo a la UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.**

Los derechos que como 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, 14 de febrero del 2025

VILLALVA TORRES CAMILO SEBASTIAN
C.I. 0953474202

RESUMEN

El presente trabajo de titulación aborda la inhibición química de *Lasiodiplodia theobromae*, un patógeno responsable de la muerte regresiva en cultivos de cacao (*Theobroma cacao L.*). Su propósito radica en evaluar la eficacia del fungicida tebuconazole en distintas concentraciones para controlar el crecimiento del hongo tanto *in vitro* como *in vivo*. Los objetivos específicos incluyeron determinar la sensibilidad del patógeno a tres dosis del fungicida (10, 1 y 0.1 ppm) *in vitro*, probar su efectividad en frutos de cacao *in vivo* e identificar la dosis óptima mediante un modelo de regresión. La metodología consistió en el aislamiento, caracterización y multiplicación del hongo, seguido de pruebas de sensibilidad al fungicida durante cinco días. Los resultados *in vitro* indicaron que una concentración de 10 ppm inhibió cerca del 100 % del crecimiento fúngico, mientras que en los ensayos *in vivo*, la dosis de 10 ppm mostró una incidencia nula (0%) y una severidad media de 0.41%, siendo estadísticamente significativa ($p = 0.005$) frente al control. El modelo de regresión estimó que 11.72 ppm serían necesarias para lograr una inhibición total. Se concluye que el tebuconazole es altamente efectivo para controlar *Lasiodiplodia theobromae*, destacando su potencial para ser incorporado en programas de manejo integrado del cultivo. Además, el modelo predictivo utilizado permite optimizar la dosificación del fungicida, reduciendo costos y riesgos ambientales.

Palabras Clave: Cacao, fungicida, inhibición, *Lasiodiplodia theobromae*, tebuconazole.

ABSTRACT

The present titration work addresses the chemical inhibition of *Lasiodiplodia theobromae*, a pathogen responsible for dieback in cocoa (*Theobroma cacao* L.) crops. Its purpose is to evaluate the efficacy of the fungicide tebuconazole at different concentrations to control fungal growth both *in vitro* and *in vivo*. The specific objectives included determining the sensitivity of the pathogen to three doses of the fungicide (10, 1 and 0.1 ppm) *in vitro*, testing its effectiveness on cocoa fruits *in vivo* and identifying the optimum dose using a regression model. The methodology consisted of isolation, characterization and multiplication of the fungus, followed by five-day fungicide sensitivity tests. The *in vitro* results indicated that a concentration of 10 ppm inhibited nearly 100% of fungal growth, while in the *in vivo* tests, the 10 ppm dose showed zero incidence (0%) and a mean severity of 0.41%, being statistically significant ($p = 0.005$) against the control. The regression model estimated that 11.72 ppm would be necessary to achieve total inhibition. It is concluded that tebuconazole is highly effective in controlling *Lasiodiplodia theobromae*, highlighting its potential to be incorporated into integrated crop management programs. In addition, the predictive model used allows optimizing the dosage of the fungicide, reducing costs and environmental risks.

Keywords: Cocoa, fungicide, inhibition, *Lasiodiplodia theobromae*, tebuconazole.

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.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 Antecedentes del problema	14
1.2 Planteamiento y formulación del problema.....	15
1.2.1 Planteamiento del problema	15
1.2.2 Formulación del problema	15
1.3 Justificación de la investigación	15
1.4 Delimitación de la investigación.....	16
1.5 Objetivo general.....	16
1.6 Objetivos específicos	16
1.7 Hipótesis o idea a defender	16
2. MARCO TEÓRICO	17
2.1 Estado del arte	17
2.2 Bases científicas y teóricas de la temática.....	18
2.2.1 Origen.....	18
2.2.2 Taxonomía	18
2.2.3 Principales enfermedades fungosas en cacao.....	18
2.2.4 Estrategias de control antifúngico en cacao	20
2.2.5 Tipos de ensayos en áreas controladas	21
2.3 Marco legal	22
2.3.1 De la Ley Orgánica del Régimen de la Soberanía Alimentaria ..	22
2.3.2 Ley Orgánica de Sanidad Agropecuaria, Registro Oficial N.º 27 – Segundo Suplemento	23

3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1 Enfoque de la investigación.....	24
3.1.1 Tipo y alcance de la investigación.....	24
3.1.2 Diseño de investigación	24
3.2 Metodología.....	24
3.2.1 Variables	24
3.2.2 Tratamientos.....	26
3.2.3 Diseño experimental	27
3.2.4 Recolección de datos	27
3.2.5 Análisis estadístico.....	31
4. RESULTADOS	33
4.1 Estimación de la sensibilidad de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> como agente causal de la muerte regresiva frente a tres dosis de tebuconazole a nivel <i>in vitro</i>.	33
4.1.1 Área de crecimiento	33
4.1.2 Porcentaje de inhibición del crecimiento.....	33
4.1.3 IC50 de <i>L. theobromae</i> frente a los tratamientos.	34
4.2 Evaluación del efecto del agente causal de muerte regresiva en frutos de cacao incorporando los tratamientos antifúngicos a nivel <i>in vivo</i>.....	35
4.2.1 Incidencia entre los tratamientos <i>in vivo</i>	35
4.2.2 Severidad de <i>L. theobromae</i>	36
4.3 Identificación de la mejor dosis de inhibición fúngica <i>in vitro</i> mediante un modelo de regresión basado en el crecimiento del patógeno.....	37
5. DISCUSIÓN	39
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	41
6.1 Conclusiones	41
6.2 Recomendaciones	42
BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXOS	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dosis in vitro	26
Tabla 2. Dosis in vivo	27
Tabla 3. Presupuesto del ensayo	28
Tabla 4. Análisis de varianza in vitro	31
Tabla 5. Análisis de varianza in vivo	32
Tabla 6. Área de crecimiento (cm ²)	33
Tabla 7. Porcentaje de inhibición de crecimiento (%).....	34
Tabla 8. Severidad de <i>L. theobromae</i> (%).....	36
Tabla 9. Comparaciones entre los tratamientos	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. IC50 de los tratamientos	34
Figura 2. Incidencia de <i>L. theobromae</i> in vivo	35
Figura 3. Incidencia de <i>L. theobromae</i> (%)	36
Figura 4. Regresión no lineal.....	38
Figura 5. Croquis del campus Dr. Jacobo Bucaram Ortiz- Guayaquil	47
Figura 6. Laboratorio de Fitopatología	47
Figura 7. Tebuconazole.....	48
Figura 8. Ficha Técnica Tebuconazole	48
Figura 9. Identificación microscópica y macroscópica de <i>L. theobromae</i>	49
Figura 10. Agar envenenado con las distintas dosis de tebuconazole	49
Figura 11. Siembra de <i>L. theobromae</i> en las cajas Petri.....	50
Figura 12. Crecimiento de <i>L. theobromae</i> en cajas Petri bajo diferentes dosis (Control, 10 ppm, 1 ppm y 0.1 ppm), y días ordenados sucesivamente.....	50
Figura 13. Análisis de los datos obtenidos in vitro.....	51
Figura 14. Inoculación de <i>L. theobromae</i> en fragmentos de mazorcas de cacao	51
Figura 15. Estudio in vivo al 5to día (dosis 10ppm).....	52
Figura 16. Estudio in vivo al 5to día (dosis 1ppm).....	52
Figura 17. Estudio in vivo al 5to día (dosis 0,1ppm).....	53
Figura 18. Estudio in vivo al 5to día (dosis control)	53
Figura 19. Confirmación de presencia de estructuras de <i>L. theobromae</i> en ensayo in vivo	54
Figura 20. Medición del área en ensayo in vivo con ImageJ	54
Figura 21. Resultados de medias marginales en JASP	55
Figura 22. Comparaciones de Dunn en ensayo in vivo	55
Figura 23. Resultados del área de crecimiento (Día 1)	56
Figura 24. Resultados del área de crecimiento (Día 2)	56
Figura 25. Resultados del área de crecimiento (Día 3)	57
Figura 26. Resultados del área de crecimiento (Día 4)	57
Figura 27. Resultados del área de crecimiento (Día 5)	58
Figura 28. Resultados PIC (Día 1)	58
Figura 29. Resultados PIC (Día 2)	59
Figura 30. Resultados PIC (Día 3)	59
Figura 31. Resultados PIC (Día 4)	60

Figura 32. Resultados PIC (Día 5)	60
Figura 33. Elaboración del modelo de regresión	61
Figura 34. Revisión de parte del tutor de tesis	61

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes del problema

Se estima que entre cinco y seis millones de agricultores en todo el mundo se dedican al cultivo de cacao. En el año 2019-2020, la producción global de cacao fue de 4.7 millones de toneladas. Latinoamérica contribuyó con el 18.4% de esta producción, siendo Costa de Marfil, Ghana y Ecuador los principales productores. El precio por tonelada varió durante el año 2020, desde 2603 USD en enero hasta 2407 USD a finales de diciembre (García Briones et al., 2021).

El cacao ecuatoriano se cultiva con gran predominancia en la región costera, con las provincias de Guayas liderando la producción con 81.94 Mg, seguido por Los Ríos con 39.26 Mg, Cañar con 23.80 Mg y Manabí con 18.26 Mg. Análisis realizados en el Banco Nacional de Germoplasma revelan la presencia de genotipos que exhiben rasgos de alta productividad. Las variedades más comúnmente cultivadas son Fino de Aroma (35%) y CCN51 (65%) (Moreno-Miranda et al., 2020).

A lo largo de la historia, la industria del cacao ha sufrido graves problemas debido a enfermedades causadas por varios patógenos, algunos letales para los árboles. A pesar de ello, ha logrado mantenerse estable gracias al establecimiento de nuevas plantaciones. Las enfermedades más importantes incluyen la pudrición negra de la mazorca, la escoba de bruja, la Monialisis, la muerte vascular regresiva y la virosis de la hinchazón de los brotes del cacao. Se han identificado especies de hongos del género *Lasiodiplodia* que afectan al cacao, siendo *L. theobromae* la más destacada (Moreira-Morrillo et al., 2021a).

En la actualidad, las enfermedades causadas por hongos, como *Lasiodiplodia theobromae*, representan un desafío significativo para la calidad y la producción en diversos cultivos, incluyendo uva, papaya, rambután, zapote, cítricos y mango. Estas enfermedades causan pérdidas considerables durante y después de la cosecha, limitando la comercialización de los frutos. Además, se han observado síntomas similares en plantaciones de cacao en Filipinas en 2014 (Jiménez, 2021).

Aunque el uso de fungicidas en la agricultura del cacao en América Latina es mínimo, se emplean diversos fungicidas sintéticos para controlar las afectaciones causadas por *L. theobromae*, como la gomosis y la pudrición de frutos. Estas sustancias inhiben el crecimiento del patógeno. Algunos de estos fungicidas

son Azoxistrobina, Carbendazim, Clorotalonil, Difenconazol, entre otros, tanto en aplicaciones individuales como en combinaciones (Moreira-Morrillo et al. 2021b).

1.2 Planteamiento y formulación del problema

1.2.1 Planteamiento del problema

Las afectaciones por *Lasiodiplodia theobromae* corresponden en los últimos años una de las mayores problemáticas para el cultivo de cacao (*Theobroma Cacao L.*) ya que esta especie presenta alta agresividad y con ciclos morfológicos cortos lo que hace que muchos agricultores del país vean significativamente afectados sus cultivos, así como también sus ingresos haciendo insostenible su producción.

Lasiodiplodia theobromae pertenece a la familia *Botryosphaeriaceae* siendo cada una de sus especies altamente agresivas en los cultivos, y lo que resulta más difícil es su control debido que identificarlas es una tarea compleja ya que pueden ser confundidas con otras enfermedades.

Históricamente para visualizar su morfología se realizan estudios *in vitro*, así como también estudios *in vivo* para visualizar las afectaciones y agresividad de estos patógenos.

Estos aspectos constituyeron el punto de partida de esta investigación, respaldados por técnicas de estudio que permitieron obtener resultados significativos y relevantes.

1.2.2 Formulación del problema

¿Cuál fue la mejor dosis *in vitro* e *in vivo* para combatir *Lasiodiplodia theobromae*?

1.3 Justificación de la investigación

El propósito de esta investigación fue reducir el impacto causado por el hongo fitopatógeno *Lasiodiplodia theobromae* en el cultivo de cacao, ya que representa un problema cada vez más serio que conduce a severas pérdidas de producción.

Como parte de esta investigación fue conocer la virulencia que presenta este patógeno, ya que se podrán desarrollar estrategias de control más efectivas como por ejemplo el uso de nuevos fungicidas y dosificaciones, el uso de variedades de cacao resistentes y prácticas culturales que ayuden a reducir la incidencia de este hongo.

Se reveló las dosis del fungicida utilizadas en el estudio y su efectividad en el control de esta enfermedad. Esta investigación se realizó en el laboratorio de

Fitopatología de la Universidad Agraria del Ecuador, donde se evaluó las dosis y como este patógeno afecta a los frutos del cultivo de cacao. El objetivo fue realizar investigaciones que conduzcan a resultados que puedan ayudar a los agricultores cacaoteros, así como también sirvan de guía para futuras investigaciones.

1.4 Delimitación de la investigación

- **Espacio:** Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Agraria del Ecuador
- **Tiempo:** La investigación llevó un tiempo de seis meses, desde el mes de agosto del 2024 a enero del 2025
- **Población:** Este proyecto incluyó un estudio muestral del hongo *Lasiodiplodia theobromae* causal de la muerte regresiva en cacao y está dirigido y enfocado hacia personas interesadas, estudiantes, agricultores cacaoteros que buscan de ampliar sus conocimientos con respecto al tema.

1.5 Objetivo general

Evaluar el efecto inhibitorio de Tebuconazole en *Lasiodiplodia theobromae* en cacao (*Theobroma cacao L.*) a nivel *in vitro* e *in vivo*

1.6 Objetivos específicos

- Estimar la sensibilidad de *Lasiodiplodia theobromae* como agente causal de la muerte regresiva frente a tres dosis de tebuconazole a nivel *in vitro*.
- Evaluar el efecto del agente causal de muerte regresiva en frutos de cacao incorporando los tratamientos antifúngicos a nivel *in vivo*.
- Identificar la mejor dosis de inhibición fúngica *in vitro* mediante un modelo de regresión basado en el comportamiento del patógeno.

1.7 Hipótesis o idea a defender

Tebuconazole es un antifúngico capaz de inhibir a *L. theobromae* a nivel *in vivo* como *in vitro*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Estado del arte

En diversos sectores de la provincia de Los Ríos, en Ecuador, se detectaron microorganismos patógenos que forman parte del grupo *Botryosphaeriaceae*. Estos agentes dañinos fueron hallados en plantaciones de cacao que mostraban síntomas de una enfermedad conocida como muerte regresiva. La identificación de estos patógenos se confirmó al examinar las características morfológicas de sus esporas o conidios (Jiménez et al., 2022).

En el cacao, *L. theobromae* puede persistir en el suelo y en residuos de cultivos como picnidios y clamidosporas, propagándose a través de diversos factores hasta infectar los tejidos vegetales, donde puede mantenerse como endófito. Este hongo patógeno es capaz de causar la muerte de ramillas jóvenes (un síntoma comúnmente observado en el campo), así como pudrición y momificación de frutos, e incluso muerte regresiva. En general, el manejo de patógenos de la familia *Botryosphaeriaceae* es complejo, especialmente cuando el patógeno ya se encuentra en el área de cultivo (Moreira-Morrillo et al., 2021c).

Las especies de *Lasiodiplodia* son responsables de provocar numerosas enfermedades vegetales que afectan a diversas partes de las plantas, como frutos, raíces, tallos y hojas. En Malasia, han causado graves daños en cultivos como el kenaf, la Sansevieria trifasciata, el mango, la jatrofa, la acacia mangium y la guayaba. Estas especies fúngicas pueden actuar como patógenos secundarios o endófitos, y su virulencia puede verse potenciada por factores de estrés en las plantas hospedantes (Huda-Shakirah et al., 2022).

Lasiodiplodia theobromae ha sido identificado como patógeno del cacao en diversos países como Camerún, India, Malasia y Filipinas. Sin embargo, en Colombia, aunque Amortégui Novoa & Becerra Betancourt (2019) habían sugerido su potencial como patógeno de este cultivo, no aportaron pruebas concluyentes sobre su identificación, caracterización o capacidad patogénica. El presente estudio constituye el primer reporte confirmado de *L. theobromae* causando la enfermedad conocida como muerte regresiva en árboles de cacao en territorio colombiano (Pisco-Ortiz et al., 2024).

Según Yasna y Vergara (2021) sus estudios tuvieron como propósito evaluar la eficacia de distintos tipos de fungicidas y sus formulaciones para proteger las heridas de poda en los nogales. Estas heridas constituyen una de las principales

vías de entrada para el complejo fúngico de la familia *Botryosphaeriaceae*, que incluyen varias especies como *Diplodia mutila*, causantes de la grave enfermedad conocida como muerte regresiva de ramas y ramillas en este cultivo. La investigación busca determinar qué productos fungicidas ejercen un mejor control preventivo al ser aplicados en los cortes de poda, evitando así la infección por estos patógenos.

2.2 Bases científicas y teóricas de la temática

2.2.1 Origen

El cultivo del cacao se originó en América, aunque es difícil determinar exactamente dónde comenzó y cómo se distribuyó. Este tema sigue siendo motivo de debate. Algunos expertos sugieren que el cacao se empezó a cultivar en México y América Central. Además, mencionan que los españoles no observaron su cultivo en América del Sur al llegar, aunque sí se lo encontró creciendo de manera natural en numerosos bosques a lo largo de los ríos Amazonas y Orinoco, así como en sus afluentes. En estos lugares todavía se encuentran variedades genéticas muy valiosas (Batista Lépido, 2009).

2.2.2 Taxonomía

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Familia: Malvaceae
- Género: Theobroma
- Especie: Theobroma cacao L.

(AGROSAVIA, 2021)

2.2.3 Principales enfermedades fungosas en cacao

El cacao ha sido uno de los cultivos más importantes desde el inicio de la colonia en la Real Audiencia de Quito (RAE), debido a su relevancia en la generación de ingresos para las familias de los productores. Sin embargo, este cultivo enfrenta varios problemas fitosanitarios, como la moniliasis (*Moniliophthora roreri*), la mazorca negra (*Phytophthora sp.*), y la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*), que se han convertido en factores limitantes para la producción. La única estrategia efectiva para combatir estos problemas es el manejo integrado del cultivo (Pico et al., 2012).

2.2.3.1. Moniliasis (*Moniliophthora roreri*)

La moniliasis, una enfermedad fúngica que afecta al cultivo de cacao, es causada por el hongo basidiomiceto *Moniliophthora roreri*. Esta enfermedad se encuentra en la mayoría de los países de América Latina y se adapta a una variedad de ambientes. En Colombia, la moniliasis es particularmente devastadora, y las estrategias de control tradicionales han llevado a efectos secundarios, como el aumento de la resistencia genética de algunas cepas del hongo en ciertas regiones (Correa et al., 2014).

2.2.3.2. Escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*)

El hongo *Moniliophthora perniciosa*, responsable de la enfermedad conocida como escoba de bruja del cacao, es originario de las zonas tropicales de Sudamérica. Se propaga a través de tejido vegetal como semillas, varetas, frutos, brotes y ramas. Este hongo afecta a varias especies de los géneros *Theobroma* y *Herrania*, así como a miembros de las familias *Solanaceae*, *Bignoniaceae* y *Malpighiaceae*. Provoca crecimientos anormales y lesiones en brotes, ramas, cojines florales y frutos, causando pérdidas significativas en la producción de cacao a nivel mundial. En casos severos, puede incluso llevar a la muerte de la planta debido a los ciclos repetidos de infección (Secretaría de Agricultura Y Desarrollo Rural [SADER], 2019).

2.2.3.3. Mazorca Negra (*Phytophthora spp.*)

Se trata de una afección provocada por el hongo *Phytophthora sp.*, que afecta diversas partes del cacao, como las raíces, hojas, tallos, frutos y ramas. En el cacao, se han identificado siete especies patógenas: *P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. nicotianae* var. *parasitica*, *P. megasperma* y *P. arecae*. El género *Phytophthora* tiene una distribución global, con diferentes especies predominantes según la región geográfica y el huésped (Instituto Colombiano Agropecuario [ICA], 2012).

2.2.3.4. Podredumbre del fruto (*Lasiodiplodia theobromae*)

El hongo *Lasiodiplodia theobromae* es responsable de diversas enfermedades en plantas y afecta a una amplia gama de huéspedes. Especialmente, los cultivos hortofrutícolas son altamente susceptibles a esta infección. Aunque en México se ha observado que *L. theobromae* provoca la muerte descendente y la pudrición de frutas como mango, uva, papaya, rambután,

zapote y cítricos, hay pocos informes disponibles sobre enfermedades causadas en otras especies vegetales (Picos et al., 2014).

2.2.4 Estrategias de control antifúngico en cacao

El control se utiliza para disminuir, eliminar o mantener en niveles aceptables diversos organismos vivos que pueden provocar enfermedades en los cultivos. Por lo tanto, una estrategia de control implica la combinación de varias medidas de intervención. En esta estrategia, se emplean diversas técnicas metodológicas con el objetivo de preservar la salud de las plantas cultivadas y prevenir la propagación de enfermedades (Tirado-Gallego et al., 2016).

2.2.4.1. Control biológico

Este enfoque de control se fundamenta en el empleo de organismos vivos, como microorganismos o insectos beneficiosos, que actúan contra aquellos que causan plagas. Por ejemplo, el hongo beneficioso *Trichoderma* actúa como antagonista del hongo *Monilia*, responsable de la mancha chocolate en las mazorcas. La utilización de este método es compatible con el control químico, siempre y cuando se cumpla con el período de espera después de la aplicación de pesticidas (Colonia, 2012).

2.2.4.2. Control cultural

El manejo de la moniliasis en el cacao se considera relativamente sencillo, ya que se sabe que esta enfermedad se beneficia de condiciones húmedas en las plantaciones, así como de la sombra densa en los cacaotales y el entrecruzamiento excesivo de ramas tanto dentro de un mismo árbol como entre árboles vecinos y entre árboles de cacao y árboles de sombra. Por lo tanto, se deduce que el control debe enfocarse en medidas preventivas, lo que requiere una atención eficiente y cuidadosa de la plantación (Procacaho, 2017).

2.2.4.3. Control químico

Los agentes antimicóticos abarcan una amplia gama de sustancias con diversas estructuras químicas y mecanismos de acción. Su clasificación se basa en criterios convencionales que consideran su estructura, como los polienos, azoles, alilaminas, entre otros; su origen, ya sea sustancias producidas por organismos vivos o derivadas de síntesis química; su espectro de acción, que puede ser amplio o restringido; y el sitio de acción (Gregorí, 2005).

2.2.4.3.1. Fungicidas.

Es fundamental que el uso de fungicidas sea recomendado por un profesional o un técnico capacitado. Siempre es necesario leer detenidamente la etiqueta del producto, donde se encuentran las recomendaciones de uso, las dosis recomendadas y los momentos adecuados de aplicación. Además, es crucial prestar atención al color de la banda en la etiqueta, ya que esto nos indica el nivel de peligro para la salud humana (Cámara de Industrias y Producción [CIP], 2007).

Los fungicidas se emplean ampliamente en la industria, la agricultura, el hogar y el jardín con diversos propósitos. Entre estos, se incluyen la protección de las semillas de granos durante su almacenamiento, transporte y germinación; la preservación de cultivos maduros, fresas, plántulas, flores y hierbas silvestres durante su almacenamiento y transporte; la eliminación de mohos que afectan las superficies pintadas; el control del limo en la pasta de papel para empapelar; y la protección de alfombras y tejidos en el hogar (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos [EPA], 2011).

- **Tebuconazole**

El Tebuconazole es un fungicida sistémico con acción preventiva, curativa y erradicante, que pertenece al grupo químico de los triazoles. Los fungicidas son esenciales en la agricultura moderna y su uso sigue aumentando. El Tebuconazole se utiliza comúnmente para tratar enfermedades fúngicas como el tizón temprano, la cenicilla, entre otras, en cultivos como la berenjena, el maíz, el tomate, la calabaza, el melón, el pepino, la sandía, el trigo, los espárragos, entre otros (Guerrero, 2023).

El Tebuconazole es un fungicida sistémico con propiedades preventivas y curativas. Se absorbe rápidamente en las partes vegetativas de la planta y se transloca principalmente de forma acropétala. Actúa inhibiendo la síntesis del ergosterol en el hongo parásito de la planta huésped, lo que impide la multiplicación de los hongos (De Soto, 2018).

2.2.5 Tipos de ensayos en áreas controladas

2.2.5.1. In vitro

Por lo general, para calcular la actividad biológica de un producto farmacéutico, se utilizan métodos de ensayo *in vitro* que se basan en líneas celulares establecidas. Estos métodos son preferidos sobre los ensayos *in vivo* debido a su ventaja y menor variabilidad. Los resultados de los ensayos *in vitro* se

cuantifican utilizando diversos métodos de revelado, siendo el método colorimétrico el más recomendable por su simplicidad y bajo costo (Carrodegua-González et al., 2022).

La propagación *in vitro* de plantas se ha convertido en una alternativa valiosa para la reproducción de especies con interés económico y ornamental. Permite producir grandes cantidades de plantas en un tiempo relativamente corto y es una herramienta eficaz para la preservación y recuperación de especies cuyas poblaciones han disminuido considerablemente, así como para la mejora genética (Espinosa-Reyes et al., 2019).

2.2.5.2. In vivo

Los ensayos *in vivo* son aquellos en los que se lleva a cabo el estudio en condiciones que se asemejan lo más posible al fenómeno observado. Por ejemplo, un ensayo clínico se considera un tipo de ensayo *in vivo*. Sin embargo, en ocasiones, el modelo *in vivo* utilizado puede no ser idéntico al entorno donde se observó inicialmente el fenómeno (Fina et al., 2013).

Estos estudios permiten determinar con precisión cómo reaccionará un organismo a una sustancia específica. Todos los seres vivos utilizados en este tipo de investigaciones generan un entorno en constante cambio, influido por numerosas variables diferentes, lo que facilita la obtención de información valiosa y exacta. Los estudios *in vivo* son muy útiles para evaluar los efectos terapéuticos o tóxicos de un fármaco en desarrollo (Mora, 2023).

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.

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.

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.

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, pp. 4-8).

2.3.2 Ley Orgánica de Sanidad Agropecuaria, Registro Oficial N.º 27 –

Segundo Suplemento

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.

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.

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 Zoonosanitario, 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.

Artículo 23. De los centros de propagación de especies vegetales.- La Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario 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, pp. 4-9).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Enfoque de la investigación

El enfoque de este proyecto fue de carácter investigativo en laboratorio donde se utilizó técnicas *in vitro* e *in vivo* para observar la afectación del hongo fitopatógeno *L. theobromae* causante de la muerte regresiva en cacao.

Este estudio evaluó dosis de eficacia del fungicida tebuconazole frente a este patógeno.

3.1.1 Tipo y alcance de la investigación

3.1.1.1. Investigación experimental

Se manejó variables dependientes e independientes para observar los resultados del comportamiento del patógeno durante el proceso de inoculación.

3.1.1.2. Investigación aplicada

Se llevó a cabo la aplicación de fungicida para evaluar tanto la resistencia como la afectación del hongo.

3.1.2 Diseño de investigación

Este proyecto se centró en la investigación experimental, cuyo objetivo fue identificar cuál dosis del fungicida proporciona mayores resultados frente al hongo causante de la muerte regresiva del cacao.

3.2 Metodología

3.2.1 Variables

Las variables se distribuyeron en dependientes e independientes donde fueron los puntos de interés para la investigación y donde se obtuvieron los datos.

3.2.1.1. Variable independiente

Fungicida tebuconazole en dosis de 10ppm, 1ppm y 0.1 ppm , cajas Petri con PDA envenenado para los ensayos *in vitro* y fragmentos de mazorcas de cacao para los ensayos *in vivo*.

3.2.1.2. Variable dependiente

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

3.2.1.2.1. Variables del ensayo fase *in vitro* del Objetivo 1.

Se tomó como parte de las variables *in vitro* el área de crecimiento (cm²), porcentaje de inhibición de crecimiento (%) y la dosis máxima media (IC50).

3.2.1.2.2. Área de crecimiento (cm^2).

Se midió el área ocupada por parte del crecimiento del micelio en los ensayos, donde se medirá primero el radio del micelio y luego se procederá a utilizar la fórmula (Yang, 2011):

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

Donde A: Área de crecimiento del hongo (cm^2).

π : Es una constante matemática (aproximadamente 3.1416).

r: Radio de la colonia fúngica (cm), medido desde el centro hasta el borde del crecimiento micelial.

3.2.1.2.3. Porcentaje de inhibición de crecimiento (%).

Se utilizó la fórmula de Ezziyyani(2004):

$$PICR\%=\left(\frac{R1-R2}{R1}\right) * 100 \quad (2)$$

Donde PICR%: Porcentaje de inhibición de crecimiento.

R1: Es el radio del patógeno testigo.

R2: Representa el radio del patógeno en enfrentamiento.

3.2.1.2.4. Concentración inhibitoria máxima media (IC50).

Se obtuvo a partir del porcentaje de inhibición de crecimiento bajo la fórmula (Benitez, 2023):

$$Y=\frac{A}{1+\left(\frac{X}{IC50}\right)^S} \quad (3)$$

Donde Y: Es la respuesta (porcentaje de inhibición).

X: Es la concentración del inhibidor (10, 1, 0.1 ppm).

A: Es la respuesta máxima (habitualmente 100% de inhibición).

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

S: Es el coeficiente de Hill(1910), que describe la pendiente de la curva.

3.2.1.2.5. Variables del ensayo fase in vivo del Objetivo 2.

Se tomó como parte de las variables *in vivo* la incidencia (%), severidad (%).

3.2.1.2.6. Incidencia.(%).

Se evaluó los signos de la infección fúngica ya siendo tratadas con las dosis del fungicida y se expresó en porcentaje. (Martínez de la Parte y Pérez, 2015)

$$\text{Incidencia (\%)}=\frac{\text{Número de fragmentos infectados durante el ensayo}}{\text{Total de muestras analizadas en el ensayo}} *100 \quad (4)$$

Donde "Incidencia": Es el porcentaje de fragmentos infectados con *Lasiodiplodia theobromae* respecto al total de muestras analizadas en el ensayo.

"Número de fragmentos infectados durante el ensayo": Cantidad de muestras que presentó crecimiento de *L. theobromae* después del tratamiento con fungicida.

"Total de muestras analizadas en el ensayo": Cantidad total de fragmentos de mazorcas evaluados en el experimento.

3.2.1.2.7. Severidad (%).

Se obtuvo el porcentaje de daño visible en las unidades experimentales tratadas con el fungicida (Nutter et al., 2006)

$$\text{Severidad}(\%) = \left[\frac{\text{Área afectada}}{\text{Área total}} \right] * 100 \quad (5)$$

Donde "Severidad (%)": Es el porcentaje de daño o afectación en una muestra con respecto a su área total.

Área afectada (cm²): Superficie colonizada o dañada por *L. theobromae* en la muestra.

Área total (cm²): Superficie total de la muestra.

3.2.1.2.8. Variables del ensayo in vitro en base al Objetivo 3.

Recaudada la información acerca del porcentaje de inhibición se pudo aplicar un modelo de regresión siendo: Y el: % de inhibición y X la concentración del fungicida en ppm, Donde β_0 es la intersección, β_1 es la pendiente, y ε es el error.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \varepsilon \quad (6)$$

3.2.2 Tratamientos

El tratamiento consistió en la inoculación en cajas Petri y aparte la inoculación de los fragmentos de mazorcas, en donde se utilizó *Lasiodiplodia theobromae* en distintas dosis de la molécula tebuconazole.

Tabla 1.
Dosis in vitro

Tratamientos	Descripción	Dosis (ppm)
D1	PDA + Tebuconazole	0.1
D2	PDA + Tebuconazole	1
D3	PDA + Tebuconazole	10
D4	PDA	Control

Elaborado por: El autor, 2025

Tabla 2.
Dosis *in vivo*

Tratamientos	Descripción	Dosis (ppm)
D1	Tebuconazole	0.1
D2	Tebuconazole	1
D3	Tebuconazole	10
D4	Agua destilada	Control

Elaborado por: El autor, 2025

3.2.3 Diseño experimental

Se aplicó un diseño completo al azar en la cual se probó 3 dosis de fungicida tebuconazole. La unidad experimental fue una caja Petri con medio envenenado PDA con diez repeticiones, para el caso del experimento *in vivo* se utilizó fragmentos de mazorcas como unidad experimental.

Los datos a nivel *in vitro* fueron acordes con los supuestos de independencia, normalidad y homogeneidad, por lo que se realizó un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey para evaluar el área de crecimiento (cm²) y el porcentaje de inhibición del crecimiento (%). En el ensayo *in vivo*, la severidad (%) de *L. theobromae* presentó una distribución no paramétrica, por lo que se aplicó un análisis mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguido de una prueba de Dunn para la comparación entre tratamientos.

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, fichas técnicas, libros digitales, sitios web entre otros...

3.2.4.1.2. Recursos económicos.

Fueron financiados con recursos propios.

Tabla 3.
Presupuesto del ensayo

Material	Cantidad	Precio unitario (USD)	Total (USD)
Placas Petri (Pack de 20 unidades)	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
			133.34

Elaborado por: El Autor, 2025

3.2.4.1.3. Materiales y equipos.

Esta investigación al ser de carácter experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología de la Universidad Agraria del Ecuador, en donde se utilizaron placas Petri, 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 dio un razonamiento que a partir de las observaciones específicas para poder llegar a conclusiones generales.

Método deductivo

Bajo este método se pudo tener un razonamiento que parte de las premisas generales para llegar a conclusiones específicas.

Método sintético

Este método permitió llegar a conclusiones más claras y sintetizadas sobre la investigación así dando énfasis a lo más esencial.

Método analítico

Este método ayudó para la búsqueda de información de diferentes fuentes y demás recursos que sirvió de apoyo para la investigación estando relacionados a los resultados.

3.2.4.2.2. Técnicas de investigación.

- **Activación del hongo**

En este paso se realizó una desinfección del área y materiales de trabajo en donde se tomó un fragmento de un aislado de *L. theobromae* de un tubo estéril que fue facilitada por el laboratorio de Biotecnología y que previamente se encontraba secuenciado. Este fragmento fue transferido a unas nuevas placas Petri con medio de cultivo estéril. Se realizó la incubación en condiciones controladas en una caja de plástico donde crecieron de manera aislada cada una de las placas.

- **Caracterización macroscópica y microscópica**

Consistió en observar las características visibles de las colonias como por ejemplo el color, la textura, el diámetro de crecimiento de las colonias en la placa. La caracterización microscópica se efectuó mediante observaciones bajo microscopio, donde se examinaron las estructuras células como hifas, esporas y otros elementos distintivos que permitió la identificación precisa, entre el análisis sus características, se confirmó por medio de su crecimiento micelial debido que siempre presentaban un rápido crecimiento y en todas sus estructuras presentaban semejanzas a *L. theobromae*

- **Multiplicación del fitopatógeno**

Una vez identificadas y aisladas nuestro hongo base con anterioridad, se procedió a la propagación de varias placas Petri con PDA para obtener una cantidad suficiente de inóculo.

- **Obtención de disoluciones y PDA envenenado**

En una hoja de cálculo se realizaron los cálculos respectivos para la obtención de las soluciones madres y disoluciones finales en donde primero se prepararon cuatro soluciones madre para las disoluciones utilizadas en el ensayo *in vitro*: la primera, de 3500 ppm, se obtuvo mezclando 72 mL de agua destilada con 1 mL de tebuconazole puro; la segunda, de 117 ppm, se elaboró diluyendo 1 mL de la solución madre de 3500 ppm en 30 mL de agua destilada; la tercera, de 10 ppm, se preparó combinando 0.5 mL de la solución madre de 3500 ppm con 176 mL de agua destilada; y la cuarta, de 1 ppm, se obtuvo mezclando 10 mL de la solución madre de 10 ppm con 100 mL de agua destilada.

Para la preparación de las disoluciones de Agar envenenado utilizadas en el ensayo *in vitro*, la dosis de 10 ppm se obtuvo mezclando 6 mL de la solución madre de 117 ppm con 63.7 mL de agua destilada y 2.71 g de PDA; la dosis de 1

ppm se preparó combinando 0.5 mL de la solución madre de 117 ppm con 58.5 mL de agua destilada y 2.3 g de PDA; para la dosis de 0.1 ppm, se mezclaron 7.2 mL de la solución madre de 1 ppm con 64.8 mL de agua destilada y 2,8 g de PDA; finalmente, la disolución control se obtuvo mezclando 72 mL de agua destilada con 2.8 g de PDA.

- **Pruebas de sensibilidad de fungicida**

Se colocó fragmentos de *L. theobromae* en placas Petri que contenían agar envenenado con tebuconazole en dosis de 10 ppm, 1 ppm y 0.1 ppm. En la parte inferior de cada caja se trazaron dos líneas perpendiculares para facilitar la medición diaria del crecimiento del hongo. Las placas fueron encubadas bajo condiciones controladas, y se registró los datos de crecimiento diariamente durante cinco días. Estos datos permitieron evaluar la sensibilidad del hongo al fungicida, y poder llegar a la dosis más efectiva.

- **Inoculación del patógeno en cacao**

Para las pruebas *in vivo* se tomó de referencia la metodología de Ochoa-Fonseca, Ramírez-González, & López-Báez, 2017.

Se utilizó fragmentos de mazorcas como base experimental. Se recolectó frutos de cacao inmaduros, libres de enfermedades o daños visibles, los cuales fueron lavados, esterilizados y cortados en fragmentos de tamaño aproximado. Posteriormente, se aplicó tebuconazole en diferentes atomizadores en dosis de 10 ppm, 1 ppm, 0.1 ppm, junto con un tratamiento control usando solo agua destilada.

Se realizó heridas en el centro de cada fragmento con un bisturí, el cual fue desinfectado después de cada corte. A continuación, se inocularon los fragmentos con muestras de *L. theobromae* previamente obtenidas de cajas Petri. Las zonas del corte fueron cubiertas con algodón humedecido en agua destilada, envueltas en servilletas y selladas en bolsas plásticas para crear un microclima adecuado.

Cada fragmento se colocó en un espacio con iluminación parcial y fueron revisados en el tercer y quinto día para observar los cambios ocurridos, al quinto día se realizaron cortes para observar de manera clara toda el área afectada.

- **Evaluación de variables**

Con la información recolectada se confirmó que las variables propuestas, como el área de crecimiento, el porcentaje de inhibición, la IC50, la incidencia y la

severidad, eran adecuadas para los diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo*, lo que permitió obtener resultados significativos y de valor.

- **Tabulación de datos**

En esta fase se recopiló, organizó y analizó de los datos obtenidos durante los experimentos. Se registró la información en tablas para poder dar una visualización más clara de los resultados.

Se utilizó la ayuda de herramientas informáticas como Infostat, Excel, JASP, ImageJ y GraphPad Prism 10 para el análisis estadístico y la interpretación de los efectos de distintos tratamientos sobre la patogenicidad del hongo.

3.2.5 Análisis estadístico

A partir de datos del ensayo *in vitro* e *in vivo* se determinó el cumplimiento de normalidad y homocedasticidad para el uso de herramientas paramétricas o no paramétricas utilizando el paquete de Microsoft Excel , Infostat versión 2020, GraphPad Prism 10, JASP y de dicha manera realizar las inferencias respectivas según variables evaluadas.

3.2.5.1. Hipótesis

3.2.5.1.1. *In vitro*.

Hipótesis Nula: Ninguna de las dosis influyeron de forma significativa en inhibición *in vitro* del patógeno.

Hipótesis Alternativa: Al menos una de las dosis influyó de forma significativa en la inhibición *in vitro* del patógeno.

3.2.5.1.2. *In vivo*.

Hipótesis Nula: Ninguna de las dosis influyó de forma significativa en disminución de incidencia del patógeno en frutos de cacao.

Hipótesis Alternativa: Al menos una de las dosis influyó de forma significativa en disminución de incidencia del patógeno en frutos de cacao.

3.2.5.2. Análisis de la varianza ANDEVA

Tabla 4.
Análisis de varianza in vitro

Fuente de variación	Fórmula	GL
Tratamientos	t-1	3
Error experimental	(n-1)-(t-1)	27
TOTAL	(n*t)-1	39

Elaborado por: El Autor, 2025

Tabla 5.
Análisis de varianza in vivo

Fuente de variación	Fórmula	GL
Tratamientos	$t-1$	3
Error experimental	$(n-1)-(t-1)$	27
TOTAL	$(n*t)-1$	39

Elaborado por: El Autor, 2025

4. RESULTADOS

4.1 Estimación de la sensibilidad de *Lasiodiplodia theobromae* como agente causal de la muerte regresiva frente a tres dosis de tebuconazole a nivel *in vitro*.

4.1.1 Área de crecimiento

La tabla 6 muestra el efecto de diferentes concentraciones de tebuconazole (10, 1 y 0.1 ppm) midiendo el área de crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* en un periodo de cinco días. El día uno, el tratamiento control presentó la mayor área de crecimiento (16.59), mientras que las dosis de 0.1, 1 y 10 ppm registró valores significativamente menores (4.95, 1.74 y 0.68, respectivamente), con un p-valor <0.0001 que evidencia diferencias estadísticas.

El segundo día, el control alcanzó el crecimiento micelial total (63.62), mientras que las dosis de tebuconazole mantuvieron una tendencia decreciente, destacando la dosis de 10 ppm con valores de 0.69 en el día dos y 2.49 en el día cinco. El análisis estadístico indicó un p-valor <0.0001 y un coeficiente de variación de 11.26, confirmando una reducción consistente en el crecimiento fúngico con dosis mayores del fungicida.

Tabla 6.
Área de crecimiento (cm²)

Dosis (ppm)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Control	16.59 a	63.62 a	63.62 a	63.62 a	63.62 a
0.1	4.95 b	11.95 b	19.87 b	27.79 b	36.21 b
1	1.74 c	5.4 c	10.41 c	14.72 c	21.21 c
10	0.68 c	0.69 d	0.85 d	1.28 d	2.49 d
p-valor	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Coef. Variación (%)	27.95	6.27	7.85	8.72	11.26

P<0.01 señala alta significancia estadística entre dosis de tebuconazole.

Elaborado por: El Autor, 2025

4.1.2 Porcentaje de inhibición del crecimiento.

En la tabla 7 se puede observar que en el periodo de cinco días de evaluación el tratamiento con 10 ppm de tebuconazole mostró la mayor efectividad en la inhibición de *Lasiodiplodia theobromae*, alcanzando un máximo de 98.67% el

día tres y manteniendo altos niveles (>96%) hasta el día cinco. La dosis de 1 ppm también fue significativa, pero con una inhibición decreciente de 89.61% (día uno) a 66.66% (día cinco). La menor efectividad se observó en 0.1 ppm, con una inhibición inicial del 68.73% reduciéndose a 43.07%. Los p-valores (<0.05) confirmaron diferencias significativas entre tratamientos, y el coeficiente de variación (2.57–9.2) indicó una variabilidad moderada en los datos.

Tabla 7.
Porcentaje de inhibición de crecimiento (%)

Dosis (ppm)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
10	95.79 a	98.91 a	98.67 a	97.99 a	96.08 a
1	89.61 a	91.51 b	83.64 b	76.85 b	66.66 b
0.1	68.73 b	81.21 c	68.77 c	56.32 c	43.07 c
p-valor	0.0002	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Coef. Variación (%)	8.49	2.57	4.03	5.52	9.2

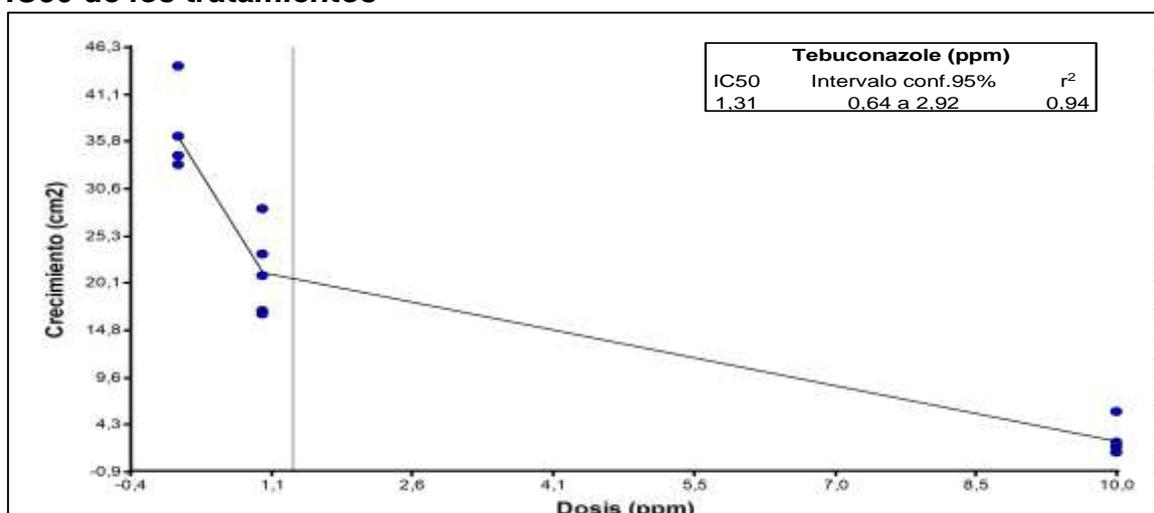
P<0.01 señala alta significancia estadística entre dosis de tebuconazole.

Elaborado por: El Autor, 2025

4.1.3 IC50 de *L. theobromae* frente a los tratamientos.

La concentración inhibitoria máxima media para inhibir el 50% de *L. theobromae* bajo condiciones *in vitro* fue de 1.31ppm, con un intervalo de confianza del 95% entre 0.64ppm a 2.92ppm. Los datos fueron ajustados a un modelo adecuado, validado por el coeficiente de determinación que respalda la fiabilidad de los resultados.

Figura 1.
IC50 de los tratamientos



Elaborado por: El Autor, 2025

4.2 Evaluación del efecto del agente causal de muerte regresiva en frutos de cacao incorporando los tratamientos antifúngicos a nivel *in vivo*.

4.2.1 Incidencia entre los tratamientos *in vivo*

La incidencia de *L. theobromae* frente a los tratamientos, basada en todas las muestras, fue del 65%, lo que demuestra su alta severidad en los estudios *in vivo*.

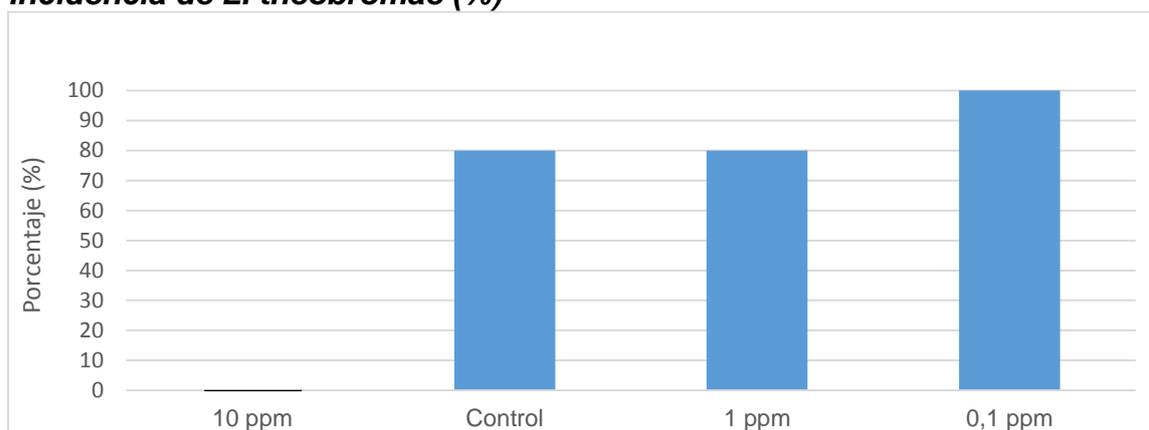
En el siguiente gráfico se determinó la incidencia en cada uno de los tratamientos. Se observó una incidencia del 80% en el grupo control, en comparación con la dosis de 10 ppm, que presentó una incidencia nula. Por otro lado, la dosis de 1 ppm mostró una incidencia del 80%, mientras que la dosis de 0.1 ppm fue la que alcanzó una incidencia del 100%.

Figura 2.
Incidencia de L. theobromae in vivo



Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 3.
Incidencia de L. theobromae (%)



Elaborado por: El Autor, 2025

4.2.2 Severidad de *L. theobromae*

El tratamiento control presentó una severidad media del 79.30%, lo que indica una alta afectación por *L. theobromae*. En contraste, la dosis de 10 ppm de tebuconazole mostró una severidad media de 0.41%, lo que demuestra la alta eficacia de este tratamiento, al estar casi no afectado por *L. theobromae*. La dosis de 1 ppm de tebuconazole presentó una severidad media de 48.61%, lo que sugiere una afección moderada. La dosis de 0.1ppm de tebuconazole presentó menor control con una severidad media del 83.24%. Con diferencias altamente significativas entre tratamientos ($p < 0.01$).

Tabla 8.
Severidad de L. theobromae (%)

Dosis (ppm)	Media
Control	79.30 b
10	0.41 a
1	48.61 ab
0.1	83.24 b
p-valor	0.001

$P < 0.05$ señala significancia estadística según prueba de Kruskal-Wallis

Elaborado por: El Autor, 2025

Se comparó los diferentes tratamientos para determinar cuáles eran estadísticamente significativos. Entre el tratamiento control (sin fungicida) y el tratamiento con 10 ppm, se obtuvo un valor de p de 0.005, lo que indica una alta significancia estadística entre ambos. Por otro lado, al comparar el tratamiento control con la dosis de 1 ppm, el valor de p fue de 0.134, lo que sugiere que no hay diferencia significativa. La comparación entre el tratamiento control y la dosis de

0.1 ppm arrojó un valor de p de 0.630, lo que también indica que no existe significancia.

Al comparar la dosis de 10 ppm con la de 1 ppm, el valor de p fue de 0.181, lo que sugiere que no hay una diferencia significativa entre estos dos tratamientos. Sin embargo, la comparación entre las dosis de 10 ppm y 0.1 ppm presentó una alta significancia, con un valor de p de 0.019. Finalmente, la comparación entre las dosis de 1 ppm y 0.1 ppm no mostró significancia, con un valor de p de 0.310.

Tabla 9.
Comparaciones entre los tratamientos

Comparaciones	p-valor
Control vs 10ppm	0.005
Control vs 1ppm	0.134
Control vs 0.1ppm	0.630
10ppm vs 1ppm	0.181
10ppm vs 0.1ppm	0.019
1ppm vs 0.1ppm	0.310

Comparación múltiple de Dunn $p < 0.05$ señala significancia estadística

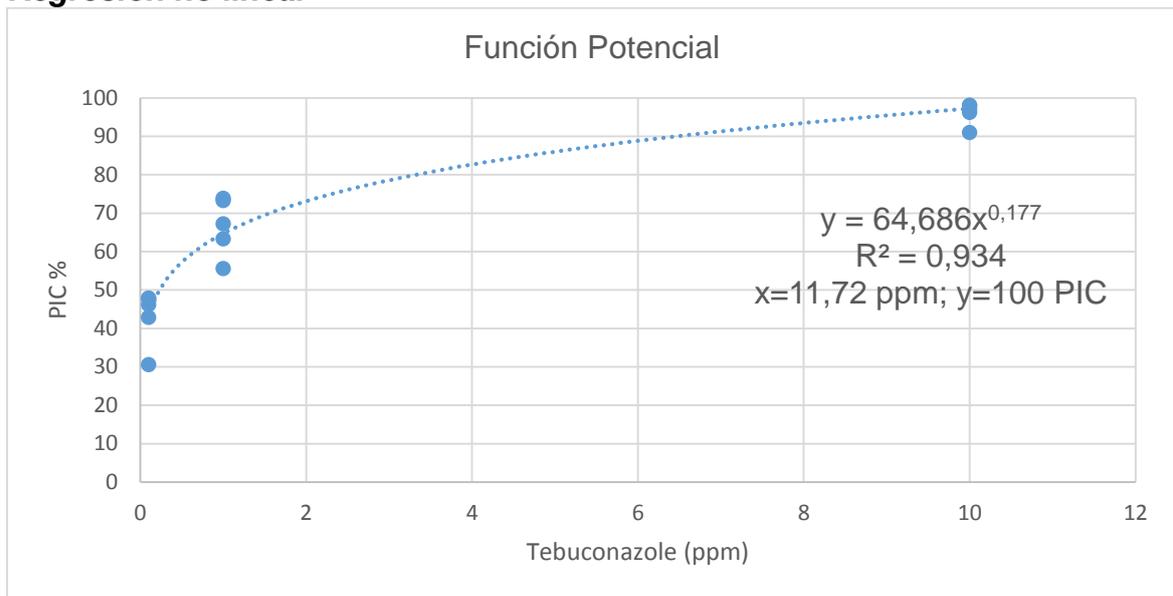
Elaborado por: El Autor, 2025

4.3 Identificación de la mejor dosis de inhibición fúngica *in vitro* mediante un modelo de regresión basado en el crecimiento del patógeno.

Los datos obtenidos siguieron una distribución potencial, lo que justificó el uso de una regresión no lineal. El coeficiente de determinación (r^2) fue de 0.934 el cual fue un valor muy cercano a uno; estableciendo el modelo adecuado de ajuste. A partir de la ecuación obtenida se procedió a calcular el valor de equis (x), correspondiente a la dosis de Tebuconazole.

La ecuación predijo que valor de x debe ser al menos de 11.72 ppm de tebuconazole para poder inhibir el 100% del crecimiento *L. theobromae*. Este valor fue consistente con los ensayos realizados ya que al utilizar la dosis de 10 ppm los valores de inhibición fueron muy cercanos al 100%.

Figura 4.
Regresión no lineal



Elaborado por: El Autor, 2025

5. DISCUSIÓN

La identificación y caracterización de *Lasiodiplodia theobromae* como agente causal de la muerte regresiva en plantaciones de cacao en la provincia de Los Ríos destaca la importancia de este patógeno dentro del grupo *Botryosphaeriaceae*. Estudios previos demuestran que este grupo fúngico tiene una amplia distribución y capacidad de adaptación, lo que dificulta su manejo en cultivos perennes como el cacao como lo menciona (Jiménez et al., 2022; Moreira-Morrillo et al., 2021c). Este escenario coincide con las observaciones del presente trabajo, donde los ensayos *in vitro* e *in vivo* evidencia la capacidad de *L. theobromae* para desarrollarse en condiciones favorables y causar daños significativos.

Los resultados obtenidos confirman que *L. theobromae* persiste como endófito en los tejidos del cacao y puede mantenerse en el suelo o en residuos de cultivos en forma de picnidios y clamidosporas. Este comportamiento coincide con reportes previos, como en Malasia, donde se observa un impacto similar en cultivos de alto valor económico como el mango y la guayaba como lo expone (Huda-Shakirah et al., 2022). Esta capacidad de persistencia y propagación subraya la importancia de implementar estrategias efectivas de control, como la propuesta en la presente investigación.

La eficacia del tebuconazole, evaluada como fungicida en este estudio, confirma su utilidad como herramienta para el control de enfermedades causadas por *Botryosphaeriaceae*. La sensibilidad de *L. theobromae* al tebuconazole es alta, con dosis cercanas a 10 ppm que muestran inhibiciones significativas del crecimiento micelial. Estos resultados coinciden con los obtenidos en cultivos frutícolas y cereales según lo confirma Moreira et al. (2021), quienes reportan su eficacia como agente químico preventivo contra patógenos de esta familia. Sin embargo, es importante considerar que, aunque el tebuconazole puede proporcionar un control efectivo *in vitro*, su aplicación *in vivo* debe complementarse con prácticas culturales que limiten la diseminación del patógeno, como la adecuada eliminación de residuos de cultivos y el manejo de podas tal y como indica (Yasna & Vergara, 2021).

Por otro lado, la identificación de *L. theobromae* como patógeno del cacao en Colombia por Pisco-Ortiz et al. (2024) representa un avance significativo en la comprensión de su distribución y capacidad patogénica en América Latina.

Aunque su incidencia en países como Camerún, India y Filipinas está documentada, este estudio aporta evidencia regional que puede utilizarse para desarrollar estrategias específicas de manejo en áreas tropicales con condiciones.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

Los resultados indican que tebuconazole en concentraciones de 0.1, 1 y 10ppm tiene un efecto significativo en la inhibición del crecimiento de *L. theobromae* durante cinco días, con un p-valor <0.0001 que respalda las diferencias estadísticas. La dosis de 10 ppm muestra la mayor efectividad, con porcentajes de inhibición del 95.79% al 98.67% en los primeros tres días y manteniendo niveles superiores al 96% en los días posteriores. La dosis de 1 ppm presenta inhibiciones iniciales del 89.61%, y una disminución al 66.66% al día cinco, mientras que la de 0.1 ppm es la menos efectiva, con una inhibición inicial del 68.73% y una reducción progresiva al 43.07%. El coeficiente de variación oscila entre 2.57 y 9.2, la cual expresa una variabilidad moderada, y el análisis de regresión identifica una concentración inhibitoria media (IC50) de 1.31 ppm, validada por un coeficiente de determinación confiable. Estos resultados destacan la efectividad del tebuconazole en dosis altas para inhibir casi completamente el crecimiento fúngico bajo condiciones *in vitro*.

En el ensayo *in vivo*, *L. theobromae* muestra una alta incidencia general del 65% en mazorcas de cacao. La dosis de 10 ppm de tebuconazole es la más eficaz, con una incidencia del 0% y una severidad mínima del 0.41%, resultados estadísticamente significativos ($p = 0.005$) frente al grupo control. En contraste, las dosis de 1 ppm y 0.1 ppm dan a revelar limitaciones notables, con incidencias del 80% y 100%, y severidades medias de 48.61% y 83.24%, respectivamente. Las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn confirman la superioridad de la dosis de 10 ppm, evidenciando la necesidad de concentraciones más altas para un control eficaz del patógeno.

Mediante un modelo de regresión ajustado a una distribución potencial con un coeficiente de determinación (r^2) de 0.93, se determina que la dosis óptima de tebuconazole para inhibir completamente el crecimiento de *L. theobromae* es de 11.72 ppm. Este valor es consistente con los resultados experimentales, donde la dosis de 10 ppm muestra una inhibición casi total del crecimiento fúngico, lo que valida la eficacia del modelo predictivo empleado en esta investigación.

Se confirma la hipótesis de que tebuconazole es un antifúngico capaz de inhibir a *L. theobromae* a nivel *in vivo* como *in vitro*

6.2 Recomendaciones

Se recomienda utilizar concentraciones cercanas a 10 ppm de tebuconazole para el control efectivo de *Lasiodiplodia theobromae*, especialmente en sistemas agrícolas donde la aplicación del fungicida es necesaria para prevenir la muerte regresiva en el cultivo de cacao. Estas concentraciones demuestran ser altamente eficaces bajo condiciones *in vitro*, logrando inhibiciones casi completas del patógeno.

Es importante realizar estudios adicionales en condiciones de campo para validar la efectividad del tebuconazole en ambientes reales. Factores como la interacción con el suelo, otros microorganismos y las condiciones climáticas influyen en la eficacia del fungicida. Por tanto, estos ensayos pueden permitir una mejor extrapolación de los resultados obtenidos en laboratorio.

Asimismo, se recomienda implementar un monitoreo constante de la sensibilidad de *L. theobromae* al tebuconazole en plantaciones de cacao. Este seguimiento es esencial para prevenir la aparición de resistencia al fungicida, lo cual puede surgir por un uso prolongado o inapropiado de este compuesto.

En el marco del manejo integrado de plagas y enfermedades, se sugiere optimizar el uso de tebuconazole mediante su integración con prácticas culturales y biológicas que promuevan la sostenibilidad del cultivo. Esto incluye la aplicación estratégica de la dosis óptima (11.72 ppm) junto con otras herramientas de control que reducen la dependencia exclusiva de los fungicidas químicos.

Finalmente, se recomienda explorar la combinación de tebuconazole con otros fungicidas o agentes biológicos para determinar si existen efectos sinérgicos que mejoren la inhibición de *L. theobromae*. Estos estudios ofrecen alternativas más eficientes y sostenibles para el manejo del patógeno. Además, es fundamental socializar estos resultados con productores y técnicos agrícolas para fomentar el uso adecuado del tebuconazole, apoyando decisiones basadas en evidencia científica.

BIBLIOGRAFÍA

- AGROSAVIA. (2021). *Modelo productivo de cacao* [Infografía]. <https://www.agrosavia.co/>
- Asamblea Nacional del Ecuador. (2009, 17 de febrero). *Ley Orgánica del Régimen de la Soberanía Alimentaria*. Registro Oficial del Gobierno del Ecuador N.º R.O. 583 Año 2009. <https://www.gob.ec/>
- Asamblea Nacional del Ecuador. (2017, 03 de julio). *Ley Orgánica de Sanidad Agropecuaria*. Registro Oficial Suplemento N.º 27. <https://www.gob.ec/>
- Batista Lévido. (2009). *Guía técnica el cultivo de cacao*. <http://www.cedaf.org.do>
- Carrodegas, A., Zúñiga, A., y Ortíz, M. V. (2022). *Ensayos in vitro para cuantificar la actividad biológica de citocinas*. *Tecnología en Marcha*, 35(2), 152–163. <https://doi.org/10.18845/tm.v35i2.5638>
- Benitez, J. (2023). *¿Qué es la concentración inhibitoria media (IC50) y cómo se calcula?* *Capcot*. <https://www.capcot.com.mx/>
- Cámara de Industrias y Producción. (2007). *Manejo integrado de tizón tardío*. <https://cipotato.org/>
- Colonia, L. M. (2012). *Manejo integrado de plagas y enfermedades en el cultivo de cacao*. <https://www.agrobanco.com.pe/>
- Correa, J., Castro, S., y Coy J. (2014). *Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia*. *Acta Agronómica*, 63(4), 388–399. <https://doi.org/10.15446/acag.v63n4.42747>
- De Soto, A. (2018). *Tebuconazole 25 W Ficha Técnica*. <https://www.sag.gob.cl/>
- Espinosa, A., Silva, J., Bahi, M., y Romero, D. (2019). *Influencia del tamaño de las plantas in vitro y tipo de sustrato en la aclimatación de *Morus alba* L. Pastos y Forrajes*, 42(1), 23-29. <http://scielo.sld.cu/>
- Fina, B. L., Lombarte, M., y Rigalli, A. (2013). *Investigación de un fenómeno natural: ¿estudios in vivo, in vitro o in silico?* *Actualidad Osteológica* 9(3). <https://ri.conicet.gov.ar/>
- García, A., Pico, B., y Jaimez, R. (2021). *La cadena de producción del Cacao en Ecuador: Resiliencia en los diferentes actores de la producción*. *Novasinergia revista digital de ciencia, ingeniería y tecnología*, 4(2), 152-172. <https://doi.org/10.37135/ns.01.08.10>

- Gregorí, B. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(2), 1. <http://scielo.sld.cu/>
- Guerrero, K. Y. (2023). *Estudio cinético de la liberación de tebuconazol en encapsulados de materiales biohíbridos*. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de San Luis Potosí]. Repositorio Institucional. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/>
- Huda, A. R., Mohamed, N. M. I., Zakaria, L., Leong, Y., y Mohd, M. H. (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/s41598-022-13057-9>
- Instituto Colombiano Agropecuario [ICA]. (2012). *Manejo fitosanitario del cultivo del cacao Medidas para la temporada invernal*. <https://www.ica.gov.co/>
- Jiménez, W. (2021). *Análisis filogenético de aislamientos patogénicos de la familia botryosphaeriaceae en cacao (Theobroma cacao L.) En la zona de Los Ríos*. [Tesis de maestría, Universidad Agraria del Ecuador] Repositorio Institucional. <https://cia.uagraria.edu.ec/>
- Jiménez, W., Ramírez, A., López, J., y Álvarez, A. (2022). Análisis filogenético de aislamientos patogénicos de la familia *Botryosphaeriaceae* en cacao (*Theobroma cacao L.*) en la zona de Los Ríos. *Ciencia y Tecnología*, 15(2), 45-54. <https://doi.org/10.18779/cyt.v15i2.583>
- Martínez de la Parte, E., y Pérez, L. (2015). Incidencia de enfermedades fúngicas en plantaciones de cacao de las provincias orientales de Cuba. *Revista de Protección Vegetal*. Mora, L. (2023). *¿Qué significa in vivo o in vitro en los estudios científicos? Mejor Con Salud*. <https://mejorconsalud.as.com/>
- Moreira, A. A., Cedeño, Á. V., Canchignia, F., y Garcés, F. R. (2021a). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl [(syn.) *Botryodiplodia theobromae* Pat] in the cocoa crop: Symptoms, biological cycle, and strategies management. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 653-662. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.068>
- Moreira, A. A., Cedeño, Á. V., Canchignia, F., y Garcés, F. R. (2021b). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl [(syn.) *Botryodiplodia theobromae* Pat] in the cocoa crop: Symptoms, biological cycle, and strategies management. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 653-662. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.068>

- Moreira, A. A., Cedeño, Á. V., Canchignia, F., y Garcés, F. R. (2021c). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl [(syn.) *Botryodiplodia theobromae* Pat] in the cocoa crop: symptoms, biological cycle, and strategies management. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 653-662. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.068>
- Moreno, C., Molina, I., Miranda, Z., Moreno, R., y Moreno, P. (2020). La cadena de valor de cacao en Ecuador: una propuesta de estrategias para coadyuvar a la sostenibilidad. En *Bioagro*, 32(3). <https://dialnet.unirioja.es/>
- Natalie, Y., y Vergara, V. (2020). *Eficacia de protección de fungicidas comerciales formulados en pasta y líquido sobre heridas de poda en nogales var. Chandler contra diploidía mutila causante de la muerte regresiva*. <http://dspace.utalca.cl/>
- Nutter, F., Esker, P., y Coelho, R. (2006). Disease Assessment Concepts and the Advancements Made in Improving the Accuracy and Precision of Plant Disease Data. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-1230-z>
- Pico, J., Calderón, D., Fernández, F., y Díaz, A. (2012). *Guía del manejo integrado de enfermedades del cultivo de cacao (Theobroma cacao L) en la Amazonía*. <https://repositorio.iniap.gob.ec/>
- Picos, P., García, R., León, J., Sañudo, A., y Allende, R. (2014). *Lasiodiplodia theobromae en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control*. <https://www.scielo.org.mx/>
- Pisco, C., Rodríguez, E., Dávila, L., Villabona, A., y Zuluaga, P. (2024). First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback on *Theobroma cacao* in Colombia. *New Disease Reports*, 49(2). <https://doi.org/10.1002/ndr2.12266>
- PROCACAO. (2017). *Control de la moniliasis del cacao a través de prácticas culturales*. Infocacao No. 12, julio 2017. <http://www.fhia.org.hn/>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural [SADER]. (2019). *Escoba de bruja del cacao Moniliophthora perniciosa (Stahel) Aime y Phillips-Mora*. <https://www.gob.mx/>
- Tirado, P. A., Lopera, A., & Ríos, L. A. (2016). Estrategias de control de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao* L.: Revisión sistemática. En *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 17(3), pp. 417-430. Corporación colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica. https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num3_art:517

- United States Environmental Protection Agency [EPA]. (2011). *Reconocimiento y Manejo de Los Envenenamientos por Pesticidas*. <https://espanol.epa.gov/>
- Yang, J., Zhao, J., Guo, Q., Wang, Y., y Wang, R. (2011). *Data acquisition method for measuring mycelium growth of microorganism with GIS*. *IFIP Advances in Information and Communication Technology* (pp. 374–380). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-1230-z>

ANEXOS

Figura 5.
Croquis del campus Dr. Jacobo Bucaram Ortiz- Guayaquil



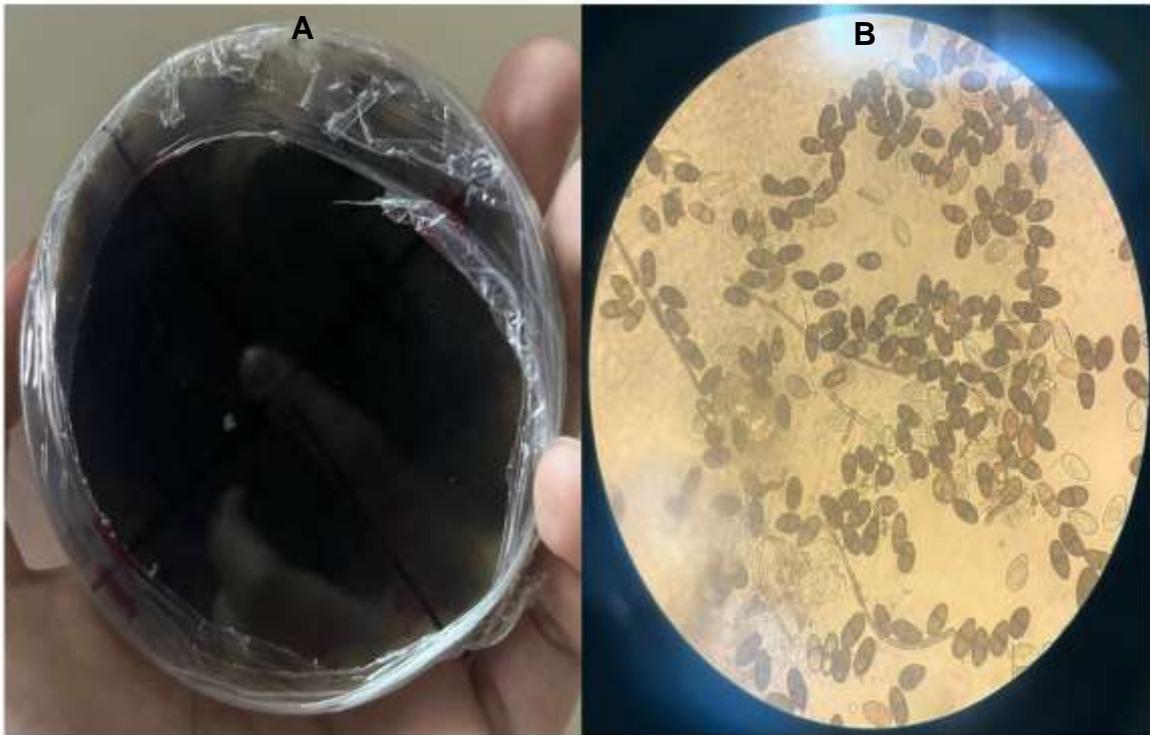
Fuente: Universidad Agraria del Ecuador Elaborado por: El autor, 2025

Figura 6.
Laboratorio de Fitopatología



Fuente: Universidad Agraria del Ecuador
Elaborado por: GPS Map Camera, 2025

Figura 9.
Identificación microscópica y macroscópica de *L. theobromae*
A. Caja Petri con el patógeno. B. Conidios del patógeno



Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 10.
Agar envenenado con las distintas dosis de tebuconazole



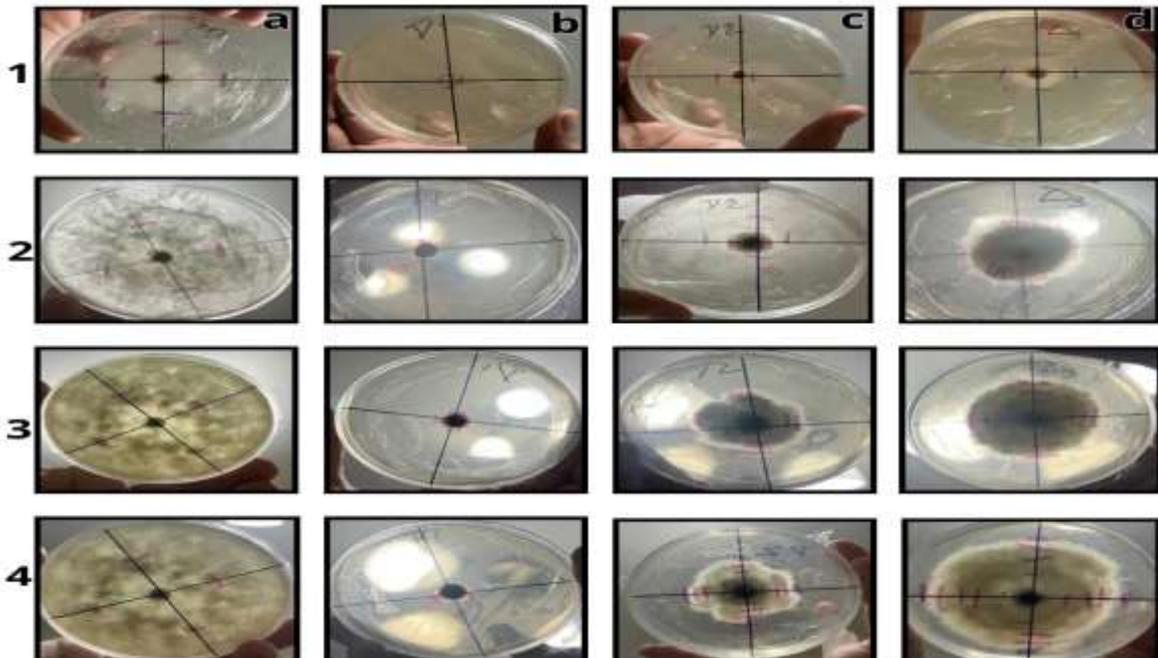
Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 11.
Siembra de *L. theobromae* en las cajas Petri



Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 12.
Crecimiento de *L. theobromae* en cajas Petri bajo diferentes dosis y días.
a. Dosis control. b. Dosis 10ppm. c. Dosis 1ppm y d. Dosis 0.1 ppm.
1. Día uno. 2. Día dos. 3. Día tres. 4. Día cuatro



Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 13.
Análisis de los datos obtenidos in vitro



Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 14.
Inoculación de *L. theobromae* en fragmentos de mazorcas de cacao



Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 15.
Estudio in vivo al 5to día (dosis 10ppm)



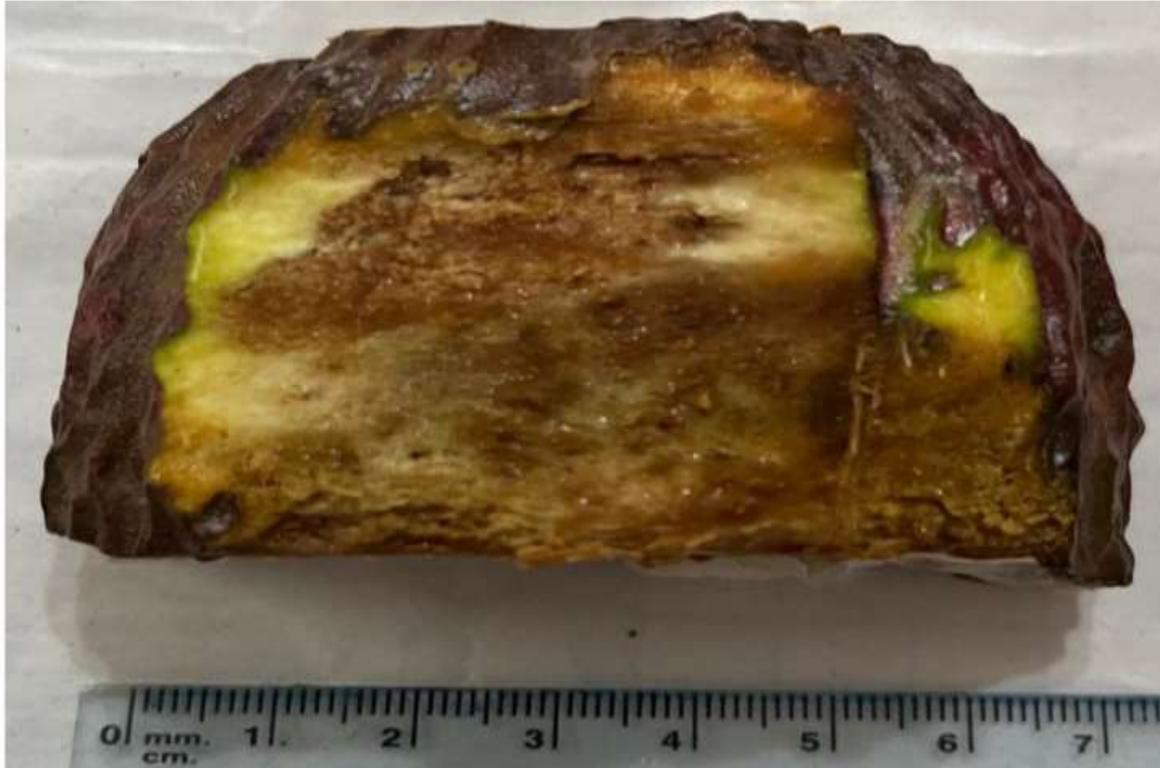
Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 16.
Estudio in vivo al 5to día (dosis 1ppm)



Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 17.
Estudio in vivo al 5to día (dosis 0,1ppm)



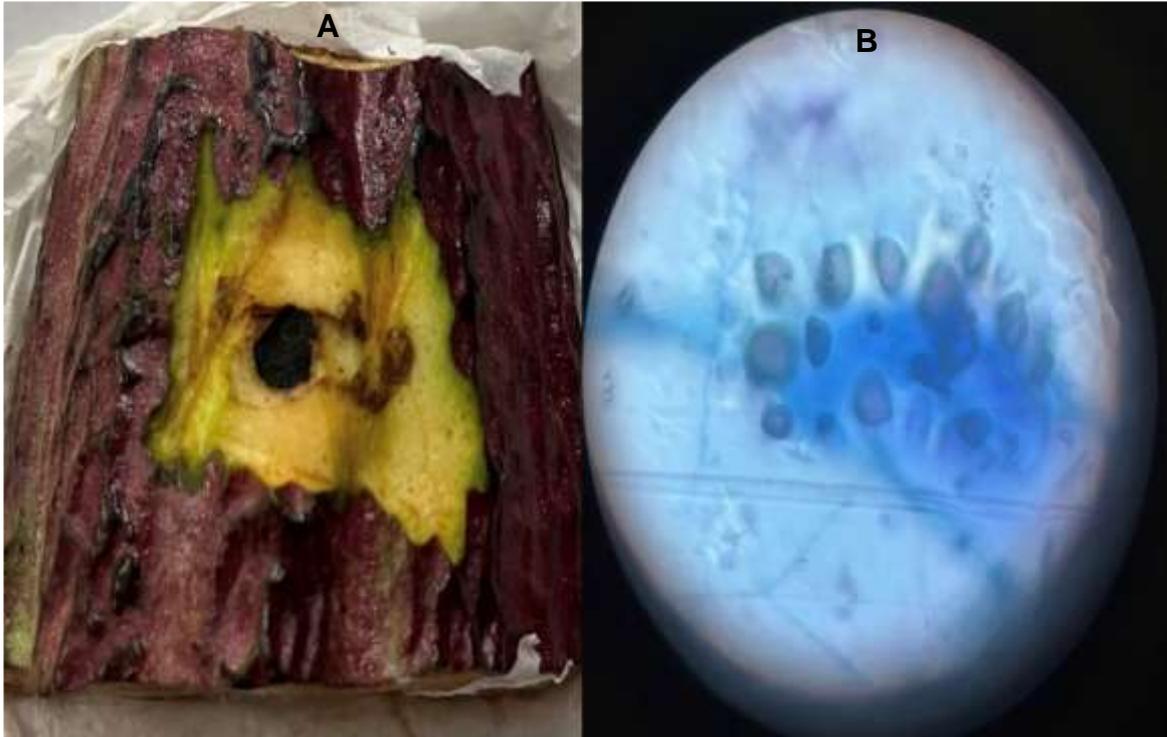
Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 18.
Estudio in vivo al 5to día (dosis control)



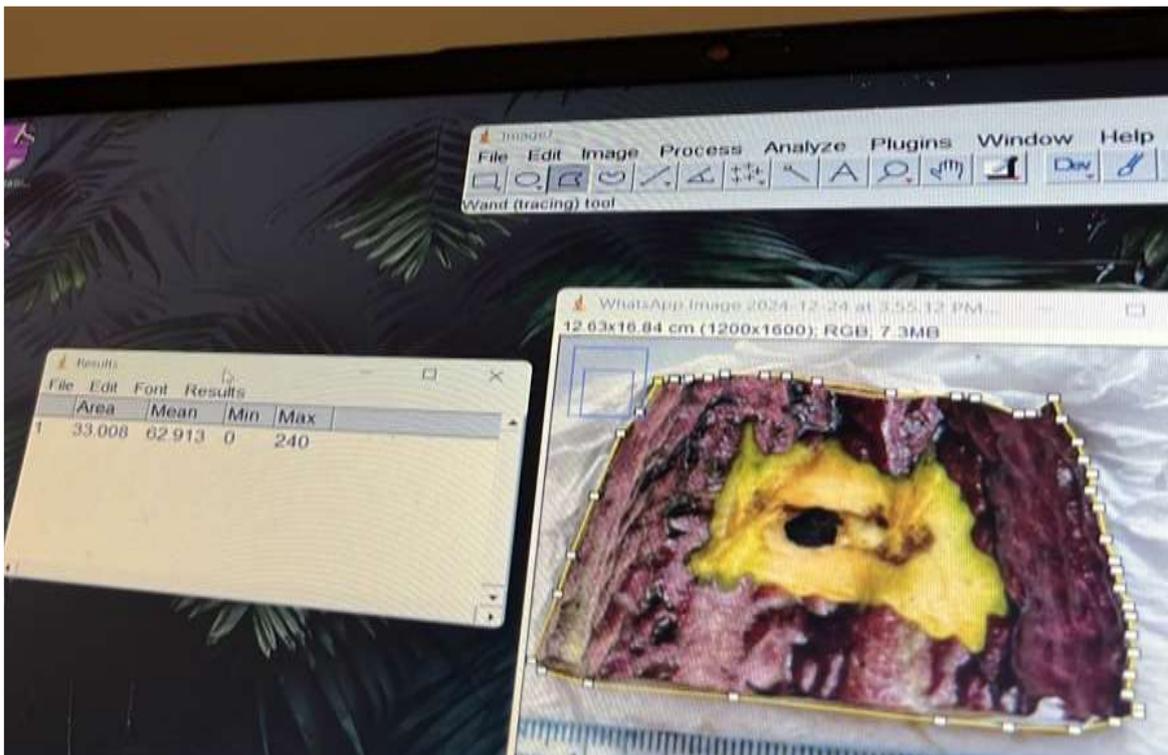
Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 19.
Confirmación de presencia de estructuras de *L. theobromae* en ensayo in vivo
A. Observación general. B. Observación microscópica



Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 20.
Medición del área en ensayo in vivo con ImageJ



Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 21.
Resultados de medias marginales en JASP

Medias Marginales

Medias Marginales - Trat.

Trat.	Media Marginal	IC del 95% para la Diferencia de Medias		ET
		Inferior	Superior	
Testigo	79.304	52.688	105.920	12.555
10ppm	0.412	-26.204	27.028	12.555
1ppm	48.616	22.000	75.232	12.555
0,1ppm	83.242	56.626	109.858	12.555

Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 22.
Comparaciones de Dunn en ensayo in vivo

Dunn

Comparaciones Post-hoc de Dunn - Trat.

Comparación	z	W_i	W_j	r_{rb}	p	p_{Bonf}	p_{Holm}
Testigo - 10ppm	2.833	15.000	4.400	0.600	0.005	0.028	0.028
Testigo - 1ppm	1.497	15.000	9.400	0.600	0.134	0.807	0.538
Testigo - 0,1ppm	0.481	15.000	13.200	0.600	0.630	1.000	0.630
10ppm - 1ppm	-1.336	4.400	9.400	0.840	0.181	1.000	0.544
10ppm - 0,1ppm	-2.352	4.400	13.200	1.000	0.019	0.112	0.093
1ppm - 0,1ppm	-1.016	9.400	13.200	0.680	0.310	1.000	0.620

Nota. Correlación de rango biserial basada en contrastes de Mann-Whitney individuales.

Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 23.
Resultados del área de crecimiento (Día 1)

Día	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
1	Area (cm2)	20	0,95	0,94	27,95

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	798,96	3	266,32	95,04	<0,0001
Dosis (ppm)	798,96	3	266,32	95,04	<0,0001
Error	44,84	16	2,80		
Total	843,79	19			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,02906

Error: 2,8023 gl: 16

Dosis (ppm)	Medias	n	E.E.	
Control	16,59	5	0,75	A
0,1	4,95	5	0,75	B
1	1,74	5	0,75	C

Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 24.
Resultados del área de crecimiento (Día 2)

Día	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
2	Area (cm2)	20	1,00	1,00	6,27

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	12761,88	3	4253,96	2597,06	<0,0001
Dosis (ppm)	12761,88	3	4253,96	2597,06	<0,0001
Error	26,21	16	1,64		
Total	12788,09	19			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,31583

Error: 1,6380 gl: 16

Dosis (ppm)	Medias	n	E.E.	
Control	63,62	5	0,57	A
0,1	11,95	5	0,57	B
1	5,40	5	0,57	C
10	0,69	5	0,57	D

Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 25.
Resultados del área de crecimiento (Día 3)

Día	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
3	Area (cm2)	20	1,00	0,99	7,85

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11534,61	3	3844,87	1111,51	<0,0001
Dosis (ppm)	11534,61	3	3844,87	1111,51	<0,0001
Error	55,35	16	3,46		
Total	11589,96	19			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,36539

Error: 3,4591 gl: 16

Dosis (ppm)	Medias	n	E.E.	
Control	63,62	5	0,83	A
0,1	19,87	5	0,83	B
1	10,41	5	0,83	C
10	0,85	5	0,83	D

Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 26.
Resultados del área de crecimiento (Día 4)

Día	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
4	Area (cm2)	20	0,99	0,99	8,72

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	10768,76	3	3589,59	654,31	<0,0001
Dosis (ppm)	10768,76	3	3589,59	654,31	<0,0001
Error	87,78	16	5,49		
Total	10856,54	19			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,23819

Error: 5,4860 gl: 16

Dosis (ppm)	Medias	n	E.E.	
Control	63,62	5	1,05	A
0,1	27,79	5	1,05	B
1	14,72	5	1,05	C
10	1,28	5	1,05	D

Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 27.
Resultados del área de crecimiento (Día 5)

Día	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
5	Area (cm2)	20	0,98	0,98	11,26

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9997,53	3	3332,51	275,78	<0,0001
Dosis (ppm)	9997,53	3	3332,51	275,78	<0,0001
Error	193,34	16	12,08		
Total	10190,87	19			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=6,29008

Error: 12,0840 gl: 16

Dosis (ppm)	Medias	n	E.E.	
Control	63,62	5	1,55	A
0,1	36,21	5	1,55	B
1	21,21	5	1,55	C
10	2,49	5	1,55	D

Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 28.
Resultados PIC (Día 1)

Día	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
1	PIC %	15	0,76	0,72	8,49

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2010,90	2	1005,45	19,45	0,0002
Dosis (ppm)	2010,90	2	1005,45	19,45	0,0002
Error	620,22	12	51,69		
Total	2631,12	14			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=12,13044

Error: 51,6851 gl: 12

Dosis (ppm)	Medias	n	E.E.	
10,00	95,79	5	3,22	A
1,00	89,61	5	3,22	A
0,10	68,73	5	3,22	B

Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 29.
Resultados PIC (Día 2)

Día	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
2	PIC %	15	0,92	0,91	2,57

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	790,20	2	395,10	73,22	<0,0001
Dosis (ppm)	790,20	2	395,10	73,22	<0,0001
Error	64,76	12	5,40		
Total	854,96	14			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,91961

Error: 5,3963 gl: 12

Dosis (ppm)	Medias	n	E.E.	
10,00	98,91	5	1,04	A
1,00	91,51	5	1,04	B
0,10	81,21	5	1,04	C

Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 30.
Resultados PIC (Día 3)

Día	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
3	PIC %	15	0,94	0,93	4,03

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2233,85	2	1116,92	98,01	<0,0001
Dosis (ppm)	2233,85	2	1116,92	98,01	<0,0001
Error	136,75	12	11,40		
Total	2370,60	14			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,69602

Error: 11,3961 gl: 12

Dosis (ppm)	Medias	n	E.E.	
10,00	98,67	5	1,51	A
1,00	83,64	5	1,51	B
0,10	68,77	5	1,51	C

Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 31.

Resultados PIC (Día 4)

Día	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
4	PIC %	15	0,95	0,94	5,52

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4342,25	2	2171,13	120,13	<0,0001
Dosis (ppm)	4342,25	2	2171,13	120,13	<0,0001
Error	216,88	12	18,07		
Total	4559,14	14			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=7,17326

Error: 18,0736 gl: 12

Dosis (ppm)	Medias	n	E.E.	
10,00	97,99	5	1,90	A
1,00	76,85	5	1,90	B
0,10	56,32	5	1,90	C

Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 32.

Resultados PIC (Día 5)

Día	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
5	PIC %	15	0,94	0,93	9,20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7052,07	2	3526,03	88,57	<0,0001
Dosis (ppm)	7052,07	2	3526,03	88,57	<0,0001
Error	477,73	12	39,81		
Total	7529,79	14			

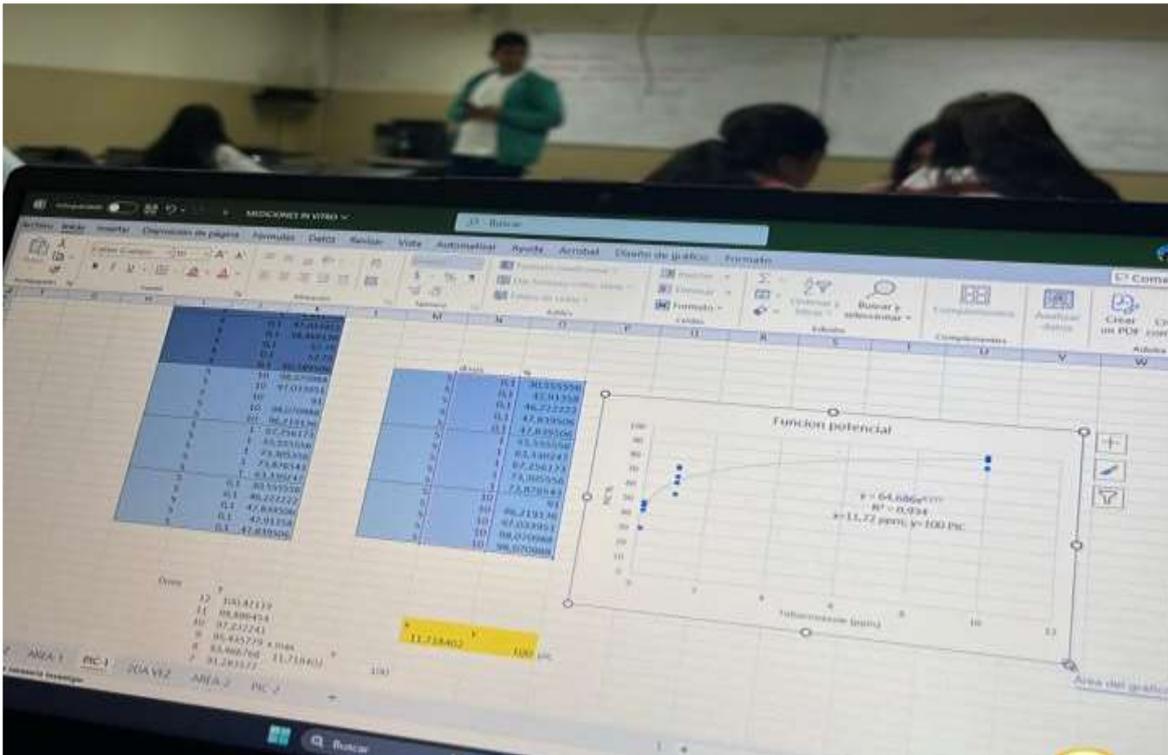
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=10,64614

Error: 39,8105 gl: 12

Dosis (ppm)	Medias	n	E.E.	
10,00	96,08	5	2,82	A
1,00	66,66	5	2,82	B
0,10	43,07	5	2,82	C

Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 33.
Elaboración del modelo de regresión



Elaborado por: El Autor, 2025

Figura 34.
Revisión de parte del tutor de tesis



Elaborado por: El Autor, 2025