

Evaluación del efecto antagonista de *Trichoderma ghanense* y *Trichoderma reesei* sobre hongos patógenos que afectan a las plantaciones de cacao (*Theobroma cacao*) en Guatemala.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Evaluación del efecto antagonista de *Trichoderma ghanense* y *Trichoderma reesei* sobre hongos patógenos que afectan a las plantaciones de cacao (*Theobroma cacao*) en Guatemala.

Trabajo de investigación presentado
por José Julian Meléndez López
para optar al grado de Licenciado en Biología.

Guatemala

2020

Vo. Bo.



Msc. Ana Lucía Dubón

Tribunal examinador



Msc. Ana Lucía Dubón



Lic. Margarita Palmieri



Msc. Gabriela Alfaro

Fecha de aprobación del examen de graduación:

Guatemala, 10 de diciembre de 2020.

Prefacio

Agradezco al Centro de Estudios Agrícolas y Alimentos del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala por permitir el uso de las instalaciones y equipo de laboratorio. Asimismo, a la coordinadora técnica MSc. Ana Lucía Dubón, las técnicas de laboratorio Leyda Harnández y Maritza De León y a la directora del Laboratorio de Protección vegetal, Licda. Margarita Palmieri por su asesoramiento, apoyo, dedicación y tiempo durante el desarrollo de éste.

A mi familia por el apoyo incondicional, amor, comprensión y ánimos que me brindaron a lo largo del proceso universitario. También por ser inspiración y la motivación para que culminara la licenciatura en Biología.

A mis compañeros y amigos de la universidad por las experiencias compartidas y por hacer el proceso más alegre durante estos años en el campus universitario

A cada miembro del Departamento de Biología de la Universidad del Valle de Guatemala, en especial a los maestros por los conocimientos compartidos, su apoyo, servicio y comprensión durante esta etapa de mi vida.

Índice

Prefacio	v
Lista de cuadros.....	viii
Lista de figuras	ix
Resumen	x
Abstract	xi
I. Introducción.....	1
II. Marco teórico.....	3
1. Cultivo de cacao y descripción del hábitat.....	3
2. Importancia cultural y económica.....	4
3. Producción de cacao en Guatemala y cuellos de botella en los eslabones de la cadena de valor	5
4. Enfermedades del cacao asociadas a hongos fitopatógenos	7
a. Moniliasis del cacao.....	7
b. Antracnosis del cacao.....	9
c. Mancha por <i>Curvularia</i>	10
5. Métodos de manejo integrado de plagas y enfermedades.....	11
a. Prácticas de manejo cultural.....	11
b. Uso de variedades genéticas resistentes.....	12
c. Controles químicos	12
d. Controles biológicos	12
6. Pruebas de antagonismo.....	13
7. Hongos anagonistas efetivos para control de hongos fitopatógenos del cacao.....	13
8. Descripción de hongos antagonistas	14
III. Justificación.....	15
IV. Objetivos.....	17
V. Hipótesis	18
VI. Métodos	19
A. Procedimientos.....	19
1. Cepas de hongos.....	19
2. Preparación de medio agar papa dextrosa (PDA).....	19
3. Preparación de medio V8 enriquecido.....	20

4. Siembra de cepas.....	20
5. Ensayos de confrontación	21
6. Porcentajes de inhibición	21
7. Métodos estadísticos	22
8. Observación de micelios de los ensayos de confrontación	22
VII. Resultados	23
A. Efectividad de los hongos antagonistas para inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos	23
B. Comparación entre la efectividad de inhibición de crecimiento de las especies de <i>Trichoderma</i> respecto a los hongos fitopatógenos	25
C. Tipos de interacción en los ensayos de confrontación	27
VIII. Discusión	30
IX. Conclusiones	33
X. Recomendaciones	34
XI. Literatura citada	35
XII. Anexos	40
A. Áreas de inhibición de los hongos antagonistas sobre los patógenos.....	40

Lista de cuadros

Cuadro	Página
1. Cuellos de botella en los eslabones de la cadena de valor	6
2. Áreas de ocupación de <i>T. ghanense</i> y los hongos fitopatógenos	23
3. Áreas de ocupación de <i>T. reesei</i> y los hongos fitopatógenos.....	24
4. Áreas promedio de inhibición <i>T. ghanense</i> contra <i>M. roreri</i>	40
5. Áreas promedio de inhibición <i>T. ghanense</i> contra <i>C. gloeosporioides</i>	41
6. Áreas promedio de inhibición <i>T. ghanense</i> contra <i>C. lunata</i>	42
7. Áreas promedio de inhibición <i>T. reesei</i> contra <i>M. roreri</i>	43
8. Áreas promedio de inhibición <i>T. reesei</i> contra <i>C. gloeosporioides</i>	44
9. Áreas promedio de inhibición <i>T. reesei</i> contra <i>C. lunata</i>	45
10. Hoja para toma de datos de las cajas Petri de los estudios de antagonismo	46
11. Cronograma.....	47
12. Presupuesto	48

Lista de figuras

Figura	Página
1. Distribución de la producción de cacao en Guatemala	5
2. Estructuras fúngicas de <i>Moniliophthora roreri</i> y síntomas de moniliasis del cacao	8
3. Estructuras fúngicas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y síntomas de antracnosis de cacao	10
4. Estructuras fúngicas de <i>Curvularia lunata</i> y síntomas de mancha por <i>Curvularia</i>	11
5. Diagrama de la distancia estándar para la colocación de los inóculos para los ensayos de confrontación	21
6. Índice de biocontrol (IBC) de <i>T. ghanense</i> sobre las tres especies de hongos fitopatógenos	24
7. Índice de biocontrol (IBC) de <i>T. reesei</i> sobre las tres especies de hongos fitopatógenos	24
8. Índices de biocontrol (IBC) de los hongos antagonista sobre <i>M. roreri</i>	25
9. Índices de biocontrol (IBC) de los hongos antagonista sobre <i>C. gloeosporioides</i>	26
10. Índices de biocontrol (IBC) de los hongos antagonista sobre <i>C. lunata</i>	26
11. Ensayos de confrontación de los hongos antagonistas contra <i>M. roreri</i>	27
12. Ensayos de confrontación de los hongos antagonistas contra <i>C. gloeosporioides</i>	28
13. Ensayos de confrontación de los hongos antagonistas contra <i>C. lunata</i>	29

Resumen

Las plantaciones de cacao son de importancia cultural y económica en Guatemala debido a la utilización y comercialización de sus semillas. A partir del 2009, la producción de cacao disminuyó considerablemente por la aparición de cuellos de botella en los procesos de la cadena de valor de este cultivo. Una de las causas más representativas es la incidencia de enfermedades en las plantas, producidas por hongos patógenos. Para proponer un potencial control biológico como parte del sistema de manejo integrado de plagas y enfermedades, se realizaron pruebas de antagonismo contra tres especies patógenas que afectan las plantaciones de Alta Verapaz y Suchitepéquez, utilizando *Trichoderma ghanense* y *Trichoderma reesei*, como agentes antagonistas. Ambas especies antagonistas colonizaron a las especies patógenas a través de un mecanismo de microparasitismo, con un efecto de inhibición en el crecimiento de *Moniliophthora roreri*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Curvularia lunata*. El hongo *T. ghanense* fue más efectivo para inhibir el desarrollo de *C. gloeosporioides*, mientras que *T. reesei* fue más efectivo para inhibir el desarrollo de *M. roreri*. Para futuras investigaciones se recomienda hacer pruebas controladas en plantas de cacao dentro de cultivos o a nivel de invernadero para comprobar la eficacia de estas especies como control biológico.

Abstract

Cocoa plantations have a cultural and economic importance in Guatemala due to the use and commercialization of its seeds. Since 2009, cocoa production decreased considerably due to the appearance of bottlenecks in the processes of the value chain of this crop. One of the main causes of its declining is the incidence of diseases in plants produced by pathogenic fungi. In order to propose a potential biological control as part of the integrated pest and disease management system, antagonism tests were carried out against three pathogenic species that affect Alta Verapaz and Suchitepéquez plantations using *Trichoderma ghanense* and *Trichoderma reesei*, as antagonist agents. Both antagonist species colonized the pathogenic species through a mechanism of parasitism, with an inhibiting effect on the growth of *Moniliophthora roreri*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Curvularia lunata*. The fungus *T. ghanense* had a greater effect in inhibiting the development of *C. gloeosporioides*, while *T. reesei* had a greater effect in inhibiting the development of *M. roreri*. For future research, it is recommended to make controlled tests on cocoa plantations or greenhouse to verify the effectiveness of these species as biological controls.

I. Introducción

El cacao es un cultivo que se produce en África, Asia y América por que su grano, se utiliza principalmente para la elaboración de chocolate y productos cosmetológicos. En Guatemala contribuye en un 0.14% al PIB agrícola, que ha posicionado al país como uno de los mayores exportadores de esta semilla en la región, durante la década pasada. Sin embargo, a partir del 2009, su producción ha disminuido considerablemente debido a la aparición de infecciones causadas por hongos patógenos que dañan al fruto o afectan su productividad debido a alteraciones del tejido foliar y vascular de la planta. Ante la reducida eficiencia de la aplicación de buenas prácticas culturales y la utilización de agroquímicos, se plantea el uso de controles biológicos para contrarrestar a las especies patógenas y los efectos negativos que tienen sobre las plantaciones de cacao en Guatemala.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto antagonista que presentan *Trichoderma ghanense* y *Trichoderma reesei* sobre el crecimiento de tres especies de hongos patógenos más frecuentes en las plantaciones de cacao en Alta Verapaz y Suchitepéquez. Se realizaron ensayos de confrontación *in vitro* en cajas Petri con las especies aisladas e identificadas por análisis genético PCR y morfología, para identificar la efectividad y el tipo de interacción. Se hicieron 30 réplicas de cada tratamiento. Se incubaron a 28°C con ausencia de luz y se guardó un registro fotográfico del crecimiento y la actividad antagonista de las colonias de hongos durante 5 días de incubación. Posteriormente se analizaron las fotografías de manera digital para identificar el índice de biocontrol de cada especie de *Trichoderma*.

Se identificó que ambas especies antagonistas tienen un efecto inhibitor en el crecimiento de las especies patógenas *Moniliophthora roreri*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Curvularia lunata* con una interacción de microparasitismo. También que *T. reesei* tiene un mayor efecto inhibitor en el crecimiento de *M. roreri*, mientras que

T. ghanense tiene un mayor efecto inhibitor en el crecimiento de *C. gloeosporioides*. No existió una diferencia significativa en el efecto de *T. ghanense* y *T. reesei* para inhibir el crecimiento de *C. lunata*, por lo que ambos hongos son potenciales candidatos para utilizarse en campo como control biológico.

II. Marco teórico

A. Cultivo de cacao y descripción del hábitat

La especie *Theobroma cacao* L. pertenece a la familia Malvaceae y la subfamilia Sterculioideae. Es un árbol relativamente pequeño con una altura de seis a ocho metros, generalmente con una corteza oscura gris-café y las ramas extendidas. Las ramas laterales están dispuestas en grupos de cinco y rara vez de cuatro o seis. Las hojas son coriáceas simples y por su forma pueden ser cortas pecioladas, obovadas oblongas o elípticas oblongas, con un largo de 15-30cm y un ancho entre 7-10cm. Mientras que la base puede ser acuminada abruptamente, redondeada u obtusa. El peciolo de la hoja mide de 10-20mm de diámetro y un pedúnculo floral de 1-3cm de largo. Posee inflorescencias pequeñas que nacen en diferentes partes del tronco y en las ramas principales. Las inflorescencias son amarillentas, tienen el pedicelo largo con un cáliz rosa y lóbulos lancea-acuminados que miden 5-7mm de longitud. El fruto es una baya grande, glabra con forma ovoide-oblongado, atenuado de manera gradual hasta el ápice. Tiene una cresta irregularmente rugosa-tuberculada y diez surcos de los cuales cinco son más conspicuos que los demás. Las semillas tienen forma ovoide de color rosa o blanco amarillento en la sección transversal, sin sabor (Standley & Steyermark, 1946).

T. cacao L. tiene una distribución que se extiende desde la Cuenca del Amazonas en América del Sur hasta la región meridional de México (Motamayor *et al.*, 2002). El desarrollo ideal de especie ocurre topografías planas u onduladas entre los 400-1,000 msnm con inclinación menor a 16°, temperaturas que van de 20° a 30°C y humedad relativamente alta entre 60-80%. La precipitación óptima para esta especie es de 1600-2500mm contemplados durante todo el año, con estaciones secas moderadas y sombra moderada a densa. Los suelos aluviales profundos, francos y negros rocosos son los más apropiados

para el cultivo debido a que estos permiten la retención de la humedad y mantienen un pH ligeramente ácido entre 4 y 7 (Arvelo *et al.*, 2017). Los factores climatológicos más determinantes en el desarrollo de la planta son la temperatura, precipitación y humedad. En caso de que estas condiciones no estén dentro del rango adecuado, es posible que se presente una frecuente inhibición de flores, susceptibilidad a enfermedades por agentes patógenos y un retraso en la maduración del fruto, así como una reducción en la cantidad de éste (Arvelo *et al.*, 2017; CONCYT, 2010).

B. Importancia cultural y económica

Esta especie posee gran importancia cultural que se remonta desde las civilizaciones antiguas. Los historiadores de las ciencias naturales del Nuevo Mundo calificaron a esta especie como el árbol más precioso y altamente calificado de los indígenas (Standley & Steyermark, 1946). Se cree que los Olmecas (1500-400 A.E.C.) fueron los primeros en utilizar sus semillas para preparar bebidas mezcladas con agua, especias y hierbas. Estas bebidas que se reservaban para las personas de las clases más altas. Posteriormente se extendieron hacia las civilizaciones Maya (600 A.E.C.) y Azteca (1400 D.E.C.) en donde esta especie fue cultivada durante varios años. Sin embargo, la semilla del fruto se utilizaba como unidad monetaria y de medida (Powis *et al.*, 2008). En la cosmovisión Maya, representa uno de los cuatro árboles cósmicos, e incluso se empleaba en algunos rituales. Se consideraba que tenía un sabor preciado para el paladar, así como algunas propiedades medicinales. En Guatemala se registraron por primera vez en la región de Jocotán, Chiquimula, en donde utilizaban las semillas como medio de intercambio (Standley & Steyermark, 1946; Powis *et al.*, 2008).

El cacao se cultiva con fines comerciales en 50 países en América, Asia, África y Oceanía, de los cuales 23 pertenecen al continente americano, siendo utilizado principalmente para la producción de chocolate y grasas en la industria alimentaria y cosmetológica. Esta especie tiene una importancia social, ambiental y económica en los países latinoamericanos en los cuales es cultivado, siendo los principales Venezuela, Trinidad y Tobago, Ecuador, México y Centro América. Mundialmente, los cultivos

cacaoteros abarcan 1,700,000 hectáreas aproximadamente y generan alrededor de 1,500,000 empleos en diferentes etapas de la producción, procesamiento y la venta de los productos derivados de este, con un valor de \$900 millones anuales en exportación (Lumpur, 2007; Arvelo *et al.*, 2017).

C. Producción de cacao en Guatemala y cuellos de botella en los eslabones de la cadena de valor

Actualmente en Guatemala existen alrededor de 159,419.08 hectáreas potenciales para cultivo de cacao. Sin embargo, en 2014 el Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación -MAGA- registró que solamente 4,410 hectáreas fueron utilizadas para este cultivo en el país en Alta Verapaz, Suchitepéquez, San Marcos, Quiché, Retalhuleu, Izabal y Petén, como se muestra en la Figura 1.

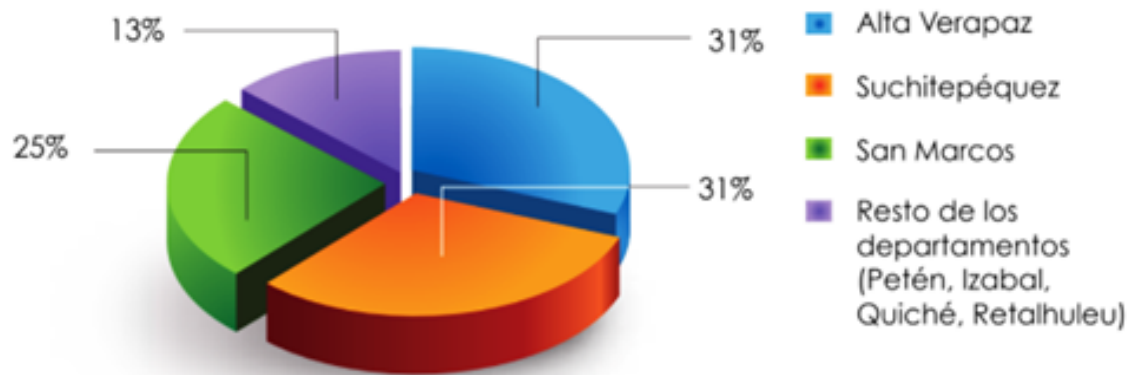


Figura 1. Distribución de la producción de cacao en Guatemala (MAGA-ENAC, 2016).

La cosecha de esta especie es realizada por pequeños y medianos productores que utilizan el modelo de cultivo natural y pocos emplean un manejo orgánico. El 95% de la producción del grano de cacao es destinada hacia la industria de bebidas artesanales y la industria de chocolate nacional, mientras que el otro 5% es exportado al extranjero (MAGA, 2016). Este sector en 2006 generó 216,757 jornales, lo que equivale a 803 empleos permanentes. El 46.04% de estos empleos fueron parte de actividades de

producción agrícola y el otro 53.96% en actividades industriales. En el año 2013 la cantidad de jornales aumentó a 272,800, equivalentes a 974 empleos permanentes. Estas actividades generan anualmente 9.34 millones de quetzales, de los cuales 4.24 millones (45.36%) se distribuyen en área rural. La producción de cacao contribuye con 0.14%, al 0.99% del producto interno bruto (PIB) agrícola del país, generando 8.6 millones de quetzales aproximadamente en el año (MAGA, 2016).

Durante el periodo de 2009 al 2014 se registraron cantidades insuficientes para cubrir la demanda del grano de cacao, aumentando las importaciones de éste para satisfacer dicha demanda (MINECO, 2015). Adicionalmente, el -MAGA- hace referencia a que el -BANGUAT- reportó en el 2015 una brecha sobre 700,000 USD entre las importaciones y las exportaciones en el país, con una razón de 4:1 respectivamente. La mayoría de los productores de cacao producen 0.3Tm/Ha y algunos de ellos no conocen los estándares mínimos que deben cumplir. El principal problema en los eslabones de la cadena de valor de cacao es el cuello de botella que se genera en la producción del grano, debido a la poca integración del sistema productivo, baja adaptación de tecnología y la presencia de plagas y enfermedades que amenazan el cultivo (MAGA, 2016). Estas deficiencias impiden un crecimiento en la productividad y a la vez impide la rentabilidad del cacao a nivel internacional. El -MAGA- recomienda el apoyo a investigación y técnicas innovadoras en el cultivo bajo un enfoque rentable, sostenible y que sea amigable con el ambiente. En el Cuadro 1 se presentan los cuellos de botella que presenta la producción de cacao.

Cuadro 1. Cuellos de botella en los eslabones de la cadena de valor.

Eslabón de la cadena de valor	Cuellos de botella
Insumos	Falta de material genético certificado.
	No existe identificación de materiales criollos y poco conocimiento de enfermedades.
Producción	Material genético no caracterizado, de baja calidad y productividad.
	Incidencia de plagas y enfermedades.

Eslabón de la cadena de valor	Cuellos de botella
Transformación primaria	No se aplican estándares uniformes de calidad y procesamiento.
Transformación secundaria	Pérdida de calidad en el proceso de beneficiado.

(MINECO, 2015)

D. Enfermedades del cacao asociadas a hongos fitopatógenos

Las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos representan la principal causa de pérdidas en la producción mundial de cacao. Por esta razón es que su control resulta clave en la gestión y manejo eficiente de las fincas cacaoteras. Cada año a nivel mundial, cerca del 40% de las pérdidas en producción de cacao ocurren por la presencia de plagas y enfermedades (Lumpur, 2007). En Latinoamérica los principales agentes patógenos que causan mayor daño en las plantaciones son *Ceratocystis cacaofunesta* que causa el mal del machete y su infección puede llegar a matar a la planta; *Moniliophthora perniciosa* y *Moniliophthora roreri* causantes de la escoba de bruja y la moniliasis del cacao, respectivamente, que infectan el fruto y las semillas, causando pérdidas importantes en la producción; *Phytophthora* spp, agente causal de la mazorca negra, afecta el fruto y causa pudrición en las semillas. Además, puede permanecer por largos periodos en el suelo e infectar a otras plantas cuando se desarrollan las condiciones óptimas. Especies de los géneros *Curvularia*, *Colletotrichum*, *Nigrospora* y *Alternaria* que reducen la productividad por daños en el tejido foliar de la planta (Arvelo *et al.*, 2017). En Guatemala las plantaciones de cacao de Alta Verapaz se han visto afectadas en años recientes por las especies patógenas *Moniliophthora roreri*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Curvularia lunata*.

E. Moniliasis del cacao

Esta infección es causada por *Moniliophthora roreri*, hongo fitopatógeno se distribuye desde México hasta Bolivia, apareciendo en Guatemala por primera vez en 1998 (Phillips-Mora & Wilkinson, 2007). Ataca los frutos en cualquier etapa del desarrollo de manera

interna y externa. Los primeros síntomas son visibles de 15 a 30 días después de que se infectó la planta, presentando deformaciones en las gibas, decoloraciones acuosas, manchas pardas, necrosis interna, micelio blanco en el exterior y generalmente causa la pérdida de todo el grano (Evans, 1981; Pérez-Vicente, 2018). Pertenece al orden Agaricales, microscópicamente presenta un micelio septado con doliporos típicos, un tubo germinativo con las hifas infectivas en el extremo distal y esporas esféricas a ovaladas con un diámetro promedio de $7\mu\text{m} * 10.5\mu\text{m}$ y $7.5\mu\text{m} * 11.6\mu\text{m}$ respectivamente. Puede germinar a través del poro germinativo o por su pared y las esporas pueden desarrollar paredes gruesas y oscuras que dan inicio a la fase de dormancia. Crece en ambientes húmedos, oscuros y con poca circulación de aire (Correa-Álvarez *et al.*, 2014; Villacencio & Jiménez, 2010).

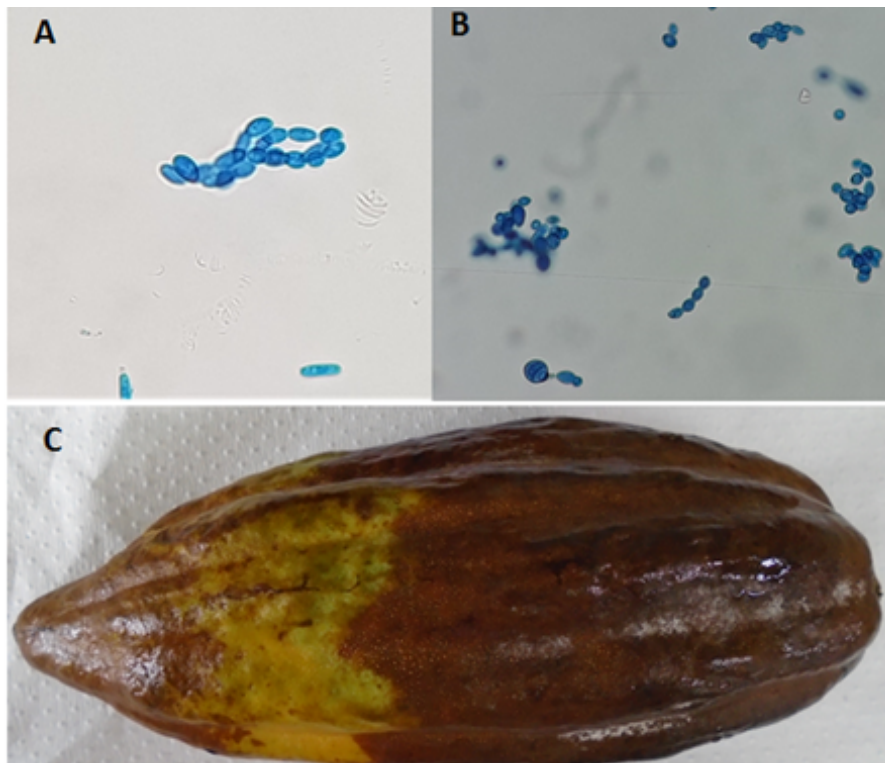


Figura 2. Estructuras fúngicas de *Moniliophthora roreri* y síntomas de moniliasis del cacao. A y B) esporas en cadena, C) fruto con necrosis iniciando desde la base (LPV-UVG, 2019).

F. Antracnosis del cacao

Esta enfermedad es producida por *Colletotrichum gloeosporioides*, se distribuye desde Venezuela hasta México y el Caribe, con una alta presencia en Guatemala (Martínez-De La Parte & Pérez, 2015). La infección comienza con lesiones necróticas en las hojas que hacen que se enrollen, se sequen y vuelvan quebradizas. Posteriormente se infecta el peciolo y las ramas que mueren de manera regresiva desde de la punta hacia abajo. En el fruto genera antracnosis, produciendo lesiones profundas y oscuras en la cáscara que se puede expandir hacia las semillas. Las manchas pardas comienzan en las puntas y se expanden por las nervaduras hacia el resto de la giba, tornándose rugosa en el exterior hasta formar micelio blanco o rosado. No causa la muerte de la planta, pero afecta su productividad porque daña el tejido foliar de la parte apical del árbol (Phillips-Mora & Cerda, 2009, Arvelo *et al.*, 2017). Pertenece al orden Melanconiales, microscópicamente presenta micelio con hifas septadas con accesorios claviformes, triangulares o irregulares. También posee conidios cilíndricos, rectos con ápices obtusos y sin septos con un tamaño aproximado de $6\mu\text{m} * 24\mu\text{m}$. Crece en ambientes expuestos con o sin presencia de luz, húmedos y con circulación de aire (Sharma & Kulshrestha, 2015).

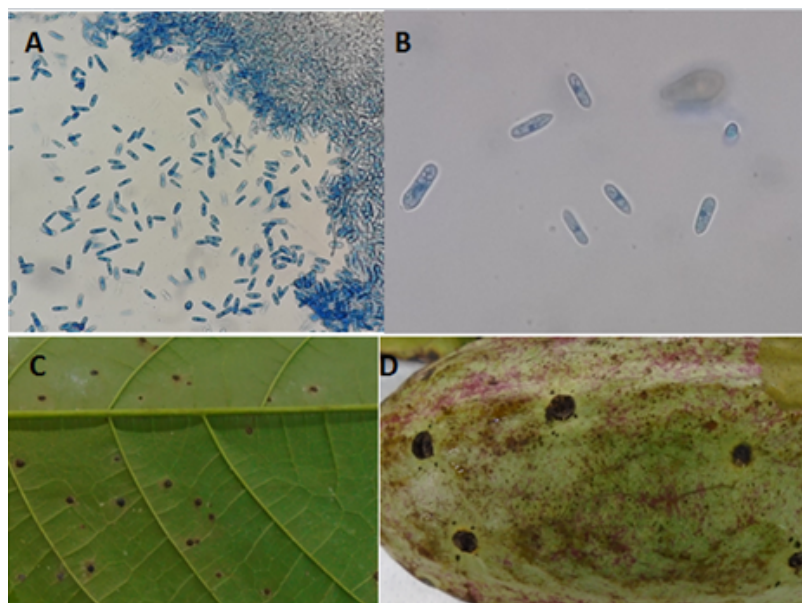


Figura 3. Estructuras fúngicas de *Colletotrichum gloeosporioides* y síntomas de antracnosis de cacao. A y B) Conidios (esporas asexuales), C) puntos necróticos foliares, D) lesiones necróticas en frutos (LPV-UVG, 2019).

G. Mancha por *Curvularia*

Esta infección es causada por *Curvularia lunata*, que tiene una distribución pantropical, con presencia en varios de los países latinoamericanos (Mena, 2010). Aunque en Latino América no se ha reportado como un hongo que afecta directamente al fruto y semilla del cacao o que diezme sus plantaciones, se ha encontrado una alta incidencia en las plantaciones del cacao de la agrocadena norte y sur de Guatemala. La infección por este hongo genera manchas cloróticas y necróticas en las hojas que pueden aparecer en bordes o en el haz de la hoja. En los frutos produce puntos necróticos en toda la superficie y en etapas avanzadas puede afectar la parte interna del fruto (Arvelo *et al.*, 2017). Pertenece al orden Pleosporales, microscópicamente presenta hifas septadas color pardo con conidióforos simples o ramificados y conidios pardos elipsoides con un tamaño aproximado de $8\mu\text{m} \times 24\mu\text{m}$. Los conidios pueden ser rectos, poriformes con múltiples tabiques que se unen a protuberancias basales (Santos *et al.*, 2018). Este hongo prolifera en la ausencia de

luz, con altos niveles de humedad y poca circulación del aire (Phillips-Mora & Cerda, 2009).

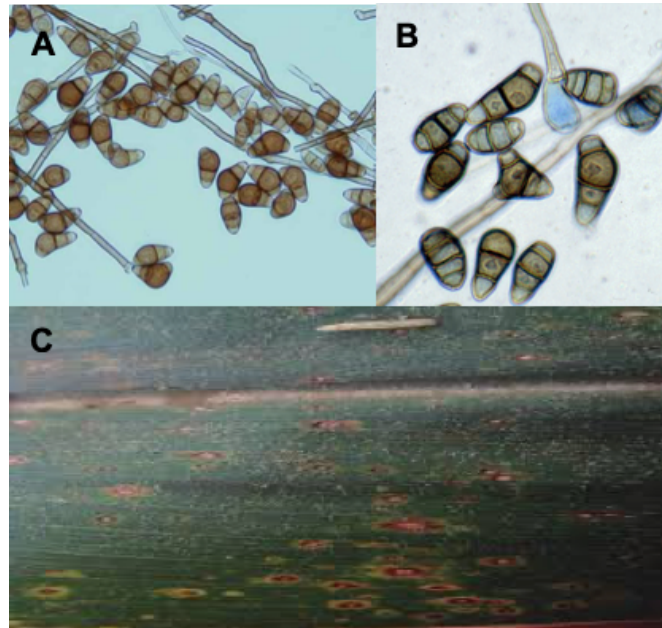


Figura 4. Estructuras fúngicas de *Curvularia lunata* y síntomas de mancha por *Curvularia*. A y B) Conidios (esporas asexuales), C) lesiones necróticas foliares (LPV-UVG, 2019; Mena, 2010).

H. Métodos de manejo integrado de plagas y enfermedades en cacao

Para combatir las enfermedades del cacao, existen cuatro métodos utilizados por los productores para prevenir y controlar efectos perjudiciales por hongos: prácticas de manejo cultural, uso de variedades genéticas resistentes, controles químicos y controles biológicos (Bailey *et al.*, 2008; Krauss & Soberanis, 2001; Suárez & Cabrales, 2008).

I. Prácticas de manejo cultural

Las prácticas de manejo cultural consisten en establecer condiciones no aptas para la propagación y multiplicación de los agentes patógenos, con el fin de prevenir el contacto con los árboles y los frutos en las áreas de cultivo. Incluyen la desinfección de todos los instrumentos utilizados en las plantaciones, poda de hojas y ramas de las plantas infectadas por los hongos, quema de frutos infectados, regulación de sombra y la remoción de frutos

semanal para evitar que los patógenos sigan expandiéndose en los cultivos (Krauss & Soberanis, 2002).

J. Uso de variedades genéticas resistentes

El uso de variedades genéticas resistentes se basa en la siembra de semillas de variedades a las cuales se les ha caracterizado como resistentes en los cultivos de cacao de acuerdo con estudios de inoculación contra patógenos específicos y que se conoce el mecanismo de defensa por el cual son capaces de detener el proceso infeccioso. De manera que, durante su desarrollo, no se vean afectados por estos agentes dañinos (Muñoz *et al.*, 2017). De acuerdo con los registros del -MAGA- (2016), en Guatemala no existe un listado detallado de las variedades resistentes utilizadas en los cultivos de cacao en los siete departamentos productores.

K. Controles químicos

Los controles químicos se implementan para eliminar las enfermedades por medio de la aplicación de productos químicos que son tóxicos para los hongos patógenos. Son aplicados directamente al cacao o a los árboles de sombra para impedir el daño y/o para mitigar la infección cuando se está desarrollando. Sin embargo, la aplicación continua de fungicidas químicos genera problemas severos de contaminación al ambiente, problemas de salud en los agricultores, altos costos de producción y puede generar resistencia de plagas y hongos fitopatógenos (Bravo *et al.*, 2006).

L. Controles biológicos

Finalmente, la otra manera efectiva de combatir a los agentes patógenos es por la aplicación de controles biológicos. Estos se basan en la utilización de organismos antagonistas que son capaces de inhibir el crecimiento y desarrollo de los hongos dañinos o en algunos casos destruirlos. Esto a la vez favorece el crecimiento de la planta puesto que la protege contra las enfermedades causadas por dichos agentes, y en la mayoría de los casos producen

elicitores, moléculas que interactúan con la planta y potencian sus mecanismos de defensa. Las especies por utilizar como control biológico se identifican mediante pruebas de antagonismo *in vitro* (Whipps & Lumsden, 2001).

M. Pruebas de antagonismo

Las pruebas de antagonismo permiten identificar tipos de interacciones por las cuales diversos microorganismos como bacterias, levaduras y hongos pueden detener el crecimiento de agentes patógenos. Estos desarrollan distintos mecanismos para inhibir el crecimiento de microorganismos dañinos como la segregación de sustancias antibióticas, producción de enzimas líticas, competencia por nutrientes y la colonización sobre estos (Janisiewicz & Korsten, 2002; De Costa & Erabadupitiya, 2005). Para seleccionar organismos como antagonistas idóneos, deben tener la capacidad para colonizar rápidamente la superficie vegetal, tener una mayor habilidad para adquirir nutrientes en comparación al patógeno y la facultad de sobrevivir en diferentes condiciones ambientales (Wisniewski & Wilson, 1992).

N. Hongos antagonistas efectivos para control biológico de hongos fitopatógenos del cacao

Los tipos de hongos más utilizados como especies antagonistas son los de crecimiento rápido en medios de cultivo, por tener una alta adaptabilidad y por su capacidad de microparasitar otros hongos (Howell & Stipanovic, 1995; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007). Algunas de las especies fúngicas utilizadas como control biológico en cultivos de cacao están: *Cladobotryum amazonense*, *Hypomyces* spp, *Lecanicillium lecanii*, *Penicillium* spp, *Clonostachys* spp., *Trichoderma* spp, *Aspergillus niger*, *Acremonium* spp, *Didymella* spp, *Nectria* spp, y *Didymostilbe* spp (Bateman *et al.*, 2005; Krauss *et al.*, 2013).

Las especies del género *Trichoderma* son ascomicetos de suelo que tienen una distribución cosmopolita, pueden colonizar diferentes tipos de hábitats combatiendo contra sus competidores de manera eficiente (Schuster & Schmoll, 2010). Presentan una actividad

hiperparasitaria competitiva por la producción de metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas que generan un cambio a nivel celular en los hongos patógenos, sin atacar a las plantas (Ezziyyani *et al.*, 2004). Tienen la capacidad de activar el mecanismo de resistencia sistemática inducida (RSI) en las plantas de cacao que permite no solo reforzar su sistema inmune contra enfermedades, sino que también favorece su crecimiento y desarrollo de raíces (Shoresh *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2013). Se ha comprobado que estas especies son efectivas para combatir estos patógenos: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporium*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cactorum*, *Botrytis cinerea*, *Rosellinia bunodes*, *Armillaria mellea* y *Cryptonectria parasitica* (Schuster & Schmoll, 2010).

O. Descripción de hongos antagonistas

Trichoderma ghanense: Esta especie presenta hifas incoloras, septadas y lisas de 2-7µm de ancho. Los conidióforos surgen en la superficie de la colonia, son ramificados largos y compactos con una longitud de 350µm que se dividen con ramas laterales cortas de 7-15µm. Los conidióforos se forman de 3 a 4 en la punta de las ramas. Las clamidosporas son abundantes, con una forma globosa o elipsoides unicelulares lisas y raramente rugosas, que surgen de hifas sumergidas terminales o intercalares (Doi *et al.*, 1987). Pertenece al orden Hypocreales, sus colonias se expanden rápidamente con luz de día y una temperatura entre 22-26°C (Schuster & Schmoll, 2010).

Trichoderma reesei: Esta especie presenta hifas septadas lisas de 2-6µm de ancho. Los conidióforos están ramificados con una longitud de 100µm que se dividen en ramas laterales cortas de 10-15µm. Las clamidoesporas tienen una forma elipsoide que surgen en posición terminal de las hifas, con un tamaño de 3µm (Lecault *et al.*, 2008). Pertenece al orden Hypocreales, sus colonias crecen rápidamente con luz directa o indirecta de día y una temperatura entre 22-26°C (Schuster & Schmoll, 2010).

III. Justificación

El cacao es un cultivo que tiene relevancia cultural y económica en Guatemala, en especial para los productores del Norte y Sur del país, ubicados en los departamentos de Alta Verapaz, Suchitepéquez y San Marcos. Las fincas cacaoteras en estos departamentos producen la mayor parte del grano utilizado para la elaboración de chocolates y productos cosméticos en el país. El 95% del total producido está destinado para consumo interno y solamente el 5% se exporta hacia otros países. Esta actividad genera empleos en el área rural, beneficiando a cientos de familias residentes de estos departamentos. Desde los años 90, Guatemala ha sido uno de los más grandes productores a nivel centroamericano. Sin embargo, a partir del 2009, la producción de cacao ha disminuido considerablemente debido a cuellos de botella generados por la falta de adaptación tecnológica ante la presencia de enfermedades causadas por distintas especies de hongos patógenos.

Estos agentes dañinos han extendido su distribución en toda América Latina y actualmente perjudican esta actividad agrícola en el país. Algunas infecciones causadas por estas especies fitopatógenas pueden causar daños directos al fruto, mientras que otras afectan su productividad debido a alteraciones del tejido foliar y vascular de la planta. Los síntomas de estas enfermedades incluyen manchas cloróticas, puntos necróticos y debilitamiento en hojas y ramas; así como decoloración, deformación y lesiones necróticas externas e internas en el fruto, que puede ocasionar la pérdida total del grano. El deterioro puede ocurrir en cualquier etapa de desarrollo de la planta, generando pérdidas potenciales en estos cultivos. Actualmente no existen datos en términos monetarios de las pérdidas generadas por estos hongos en el país, pero se ha registrado gastos extras de hasta \$700,000 en importaciones, por parte de los productores de cacao para cubrir la demanda.

Para contrarrestar estas infecciones se requiere la implementación de métodos de manejo integrado de plagas y enfermedades. Las buenas prácticas culturales en el manejo de las plantaciones son fundamentales para el control, pero se requiere de la utilización adicional de otros productos. El uso de fungicidas químicos se ha reportado como una práctica de alto costo, poco efectiva, además de tener impactos negativos en el medio ambiente y no puede ser utilizada en plantaciones con certificación orgánica. Por esta razón es necesario implementar otras alternativas como el uso de productos biológicos. El desarrollo de estos requiere de investigación en la que se identifiquen y caractericen microorganismos benéficos, se evalúe su efectividad contra especies fitopatógenas y el tipo de interacción entre ambos.

Especies del género *Trichoderma* han demostrado ser efectivas para este propósito a través de mecanismos de competencia por espacio, nutrientes y producción de proteínas inhibitoras que son capaces de detener su crecimiento de los fitopatógenos y de activar una respuesta inmune en la planta que contribuye también a su desarrollo. De esta manera, las investigaciones con especies de *Trichoderma* no estudiadas son sumamente importantes para establecer métodos de control biológico como parte del manejo integrado de las plantaciones de cacao. Este estudio forma parte del “Programa integral para el incremento de la calidad, productividad y sostenibilidad del sistema de cacao en el norte de Guatemala” ejecutado en el CEEA del instituto de investigaciones de la UVG y financiado por el programa CRIA del IICA-USDA, para enfermedades de cacao y sienta las bases para la posible elaboración de un producto biológico comercial en el mercado nacional.

IV. Objetivos

A. General:

Evaluar el efecto de *Trichoderma ghanense* y *Trichoderma reesei* sobre el crecimiento de tres hongos fitopatógenos que afectan las plantas de cacao.

B. Específicos:

- Comparar la efectividad de los hongos benéficos para inhibir el crecimiento de los hongos patógenos para proponerlos como controles biológicos.
- Identificar el tipo de interacción antagónica que presenta *Trichoderma ghanense* y *Trichoderma reesei* con los hongos *Moniliophthora roreri*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Curvularia lunata*.

V. Hipótesis

A. Hipótesis nula:

Hipótesis nula: *Trichoderma ghanense* y *Trichoderma reesei* no tienen ningún efecto inhibitorio en el crecimiento de los hongos patógenos estudiados (*Moniliophthora roreri*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Curvularia lunata*) que afectan al cacao.

B. Hipótesis alternativa:

Hipótesis alternativa: *Trichoderma ghanense* y *Trichoderma reesei* tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de los hongos patógenos estudiados (*Moniliophthora roreri*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Curvularia lunata*) que afectan al cacao.

VI. Métodos

A. Procedimientos

1. Cepas de hongos

Las cepas utilizadas en este estudio corresponden a los hongos patógenos *Moniliophthora roreri*, *Colletotrichum gloesporioides* y *Curvularia lunata*. Todas estas cepas fueron aisladas de frutos de cacao que presentaron signos y síntomas de infección y que fueron colectados en plantaciones ubicadas en Alta Verapaz y Suchitepéquez. Los hongos antagonistas *Trichoderma ghanense* y *Trichoderma reesei* se aislaron del suelo de plantaciones de cacao de Lachuá, Alta Verapaz. Todos los hongos fueron identificados por morfología y análisis genético por PCR y secuenciación, usando los marcadores moleculares ITS1 e ITS4. Las cepas caracterizadas se encuentran almacenadas en el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios del Instituto de Investigaciones de la UVG.

2. Preparación de medio agar papa Dextrosa (PDA)

Se midió 1000mL de agua destilada con una probeta. Se agregó un poco de agua destilada a un frasco autoclaveable con un agitador magnético. Se pesó 39g de agar PDA utilizando una espátula limpia, se agregó al frasco autoclaveable y se añadió los 1000mL de agua destilada medidos anteriormente. Se colocó sobre una estufa para agitarlo y calentarlo hasta llegar a una temperatura de 100°C. Posteriormente se retiró y se midió el pH con un potenciómetro, de ser necesario se agregó 1N NaOH o 1N de HCl. Se ingresó a la autoclave durante 15 min para esterilizarlo. Después se sacó de la autoclave, se añadió

otro agitador magnético y se agitó en una estufa dentro de una campana de flujo laminar hasta que la temperatura descendió a los 50°C. Se colocó en baño María y se vertió el medio PDA en las cajas Petri asegurándose de cubrir la mitad de cada una. Se dejaron destapadas por 15min o hasta que el medio solidificó y se identificaron con el medio y la fecha para almacenarlas de manera invertida a 4°C para su posterior utilización (Tortora *et al.*, 2007).

3. Preparación de medio V8 enriquecido

Se midió 200mL de jugo V8 y 800mL de agua destilada en diferentes probetas. Se agregó un poco de agua destilada a un frasco autoclaveable con un agitador magnético. Se pesó 3g de CaCO₃ y 18g de agar agar utilizando una espátula limpia, se agregó al frasco autoclaveable y se añadió los volúmenes de jugo V8 y agua destilada para obtener un volumen total de 1000mL. Se colocó sobre una estufa para agitarlo y se calentó hasta llegar a una temperatura de 100°C. Posteriormente se retiró y se midió el pH con un potenciómetro, de ser necesario se agregó 1N NaOH o 1N de HCl. Se ingresó a la autoclave durante 15 min. Después se sacó de la autoclave, se añadió otro agitador magnético y se agitó en una estufa dentro de una campana de flujo laminar hasta que la temperatura descendió a los 50°C. Se pesó 0.05g de cloranfenicol, 0.1g de estreptomicina y 0.1g de carbendazim y se añadió al frasco autoclaveable después de que la temperatura descendió. Se agitó en la estufa dentro de la campana de flujo laminar hasta que los antibióticos y el fungicida se disolvieron. Se colocó en baño María y se vertió el medio PDA en las cajas Petri asegurándose de cubrir la mitad de cada una. Se dejaron destapadas por 15min o hasta que el medio solidificó y se identificaron con el medio y la fecha para almacenarlas de manera invertida a 4°C para su posterior utilización (Tortora *et al.*, 2007).

4. Siembra de cepas

Los hongos patógenos *C. gloesporioides* y *C. lunata* se sembraron en cajas Petri con medio PDA y *M. royeri* se sembró en cajas Petri con medio de agar enriquecido con jugo V8, antibióticos y fungicida. Los hongos antagonistas *T. ghanense* y *T. reesei* se sembraron en cajas con medio PDA. Se tomó un inóculo de cada cepa de antagonistas y patógenos con un asa estéril y se sembraron en una caja Petri de acuerdo con los medios establecidos. Los

cultivos se incubaron a 28°C en oscuridad por un periodo de tres a cinco días, de acuerdo con las necesidades del crecimiento de cada especie de hongo.

5. Ensayos de confrontación

Se inoculó una caja Petri con PDA utilizando un disco de 5mm de diámetro de los micelios provenientes de colonias que se incubaron previamente, tanto de los hongos patógenos, como de los antagonistas para cada ensayo. Se colocaron los discos en puntos equidistantes a 1.5cm del centro de la caja Petri y a 3cm de distancia uno del otro, como se muestra en la Figura 5 y se incubaron a 28°C en la oscuridad. Se hicieron 30 réplicas de cada combinación de cepas de antagonista con patógeno. Se registró la actividad antagonista después de tres a cinco días de incubación con fotografías que se tomaron con una cámara Nikon Coolpix p510 a 18cm de distancia de las cajas Petri en todos los casos, se utilizó un fondo negro y una regla para analizar el área ocupada por el micelio de los hongos (Szekeres *et al.*, 2006).

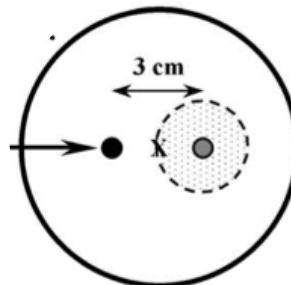


Figura 5. Diagrama de la distancia estándar para la colocación de los inóculos para los ensayos de confrontación

(Cuervo-Parra *et al.*, 2011).

6. Porcentajes de inhibición

Se utilizó el programa ImageJ para medir el área que ocupa el micelio de cada colonia de hongos. Posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento de los hongos patógenos con el índice de biocontrol (IBC) de acuerdo con la fórmula:

- Índice de biocontrol:

$$IBC = \left(\frac{A}{B}\right) * 100$$

En esa fórmula, A presenta el área de la colonia de cada hongo antagonista y B el área total ocupada por colonias de cada hongo antagonista y cada hongo patógeno. (Szekeres *et al.*, 2006)

7. Métodos estadísticos

Se realizó un ANOVA para comparar las áreas de inhibición de los hongos antagonistas sobre los hongos patógenos. Se hizo una prueba Tukey utilizando intervalos de confianza del 95% para identificar si existe una diferencia significativa entre el potencial de inhibición de cada hongo antagonista respecto los hongos patógenos. También se hizo una prueba “T student” para identificar si existe una diferencia significativa en la efectividad de ambos hongos antagonistas para inhibir el crecimiento de los hongos patógenos en el programa R y R studio en su versión 4.0.3 (Cuervo-Parra *et al.*, 2011).

8. Observación de micelios de los ensayos de confrontación

Se colocó la caja Petri con los ensayos de confrontación en el estereoscopio durante los primeros dos días de incubación, utilizando una magnificación 10x para verificar la interacción entre ambas especies.

VII. Resultados

A. Efectividad de los hongos antagonistas para inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos

T. ghanense tuvo un efecto de inhibición significativo contra las tres especies de hongos fitopatógenos ($p = 7.44e-26$). Presentó un IBC mayor a 85% en las tres pruebas de antagonismo (Cuadro 2) y tuvo un porcentaje de inhibición más alto contra *C. gloeosporioides*, seguido por *M. roreri* y *C. lunata*. La prueba de Tukey ($p = 3.95e-14$) mostró que existe una diferencia significativa entre los tres tratamientos de *T. ghanense* (Figura 6), por lo que la capacidad de inhibición contra los tres patógenos varía de acuerdo a la especie.

T. reesei tuvo un efecto de inhibición significativo contra las tres especies de hongos fitopatógenos ($p = 2.7e-50$). Presentó un IBC mayor a 80% en las tres pruebas de antagonismo (Cuadro 3) y tuvo un porcentaje de inhibición más alto contra *M. roreri*, seguido por *C. gloeosporioides* y *C. lunata*. La prueba de Tukey ($p = 3.93e-14$) mostró que existe una diferencia significativa entre los tres tratamientos de *T. reesei* (Figura 7), por lo que la capacidad de inhibición contra los tres patógenos varía según la especie.

Cuadro 2. Áreas de ocupación e IBC promedio de *T. ghanense* y los hongos fitopatógenos.

Hongo fitopatógeno	Área _T (mm ²) ± DE	Área _{T+P} (mm ²) ± DE	IBC (%)
<i>M. roreri</i>	6753.19 ± 0.83	7133.17 ± 0.86	94.69
<i>C. gloeosporioides</i>	8475.11 ± 0.71	8555.47 ± 0.50	99.05
<i>C. lunata</i>	5705.99 ± 1.22	6993.52 ± 0.78	85.20

Área_T es el área ocupada por *T. ghanense*; Área_{T+P} es el área total ocupada por *T. ghanense* y cada uno de los hongos fitopatógenos; IBC es el índice de biocontrol.

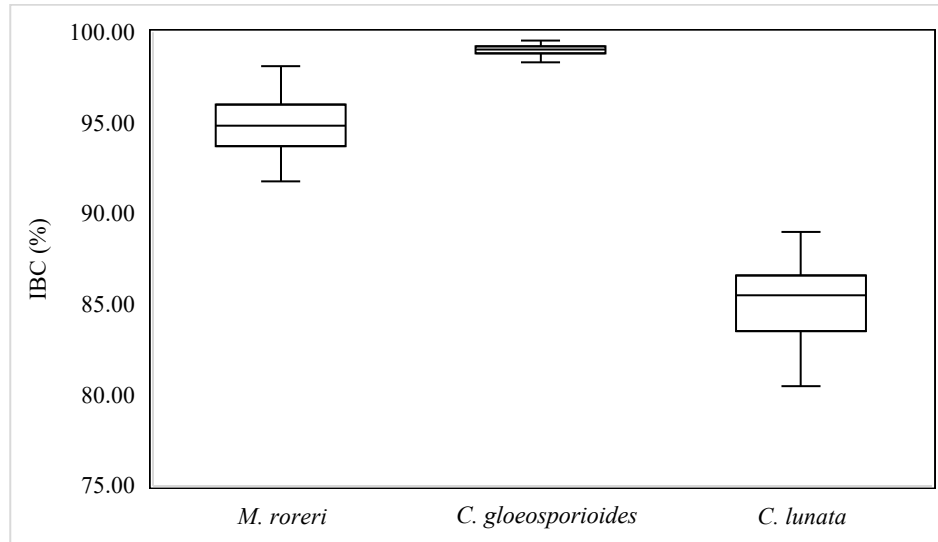


Figura 6. Índice de biocontrol (IBC) de *T. ghanense* sobre las tres especies de hongos fitopatógenos.

Cuadro 3. Área de ocupación e IBC promedio de *T. reesei* y los hongos fitopatógenos.

Hongo fitopatógeno	Área _T (mm ²) ± DE	Área _{T+P} (mm ²) ± DE	IBC (%)
<i>M. roleri</i>	6301.83 ± 0.59	6434.54 ± 0.68	97.91
<i>C. gloeosporioides</i>	5150.31 ± 1.27	5719.43 ± 1.41	90.01
<i>C. lunata</i>	5492.11 ± 0.76	6601.62 ± 1.02	83.19

Área_T es el área ocupada por *T. reesei*; Área_{T+P} es el área total ocupada por *T. reesei* y cada uno de los hongos fitopatógenos; IBC es el índice de biocontrol.

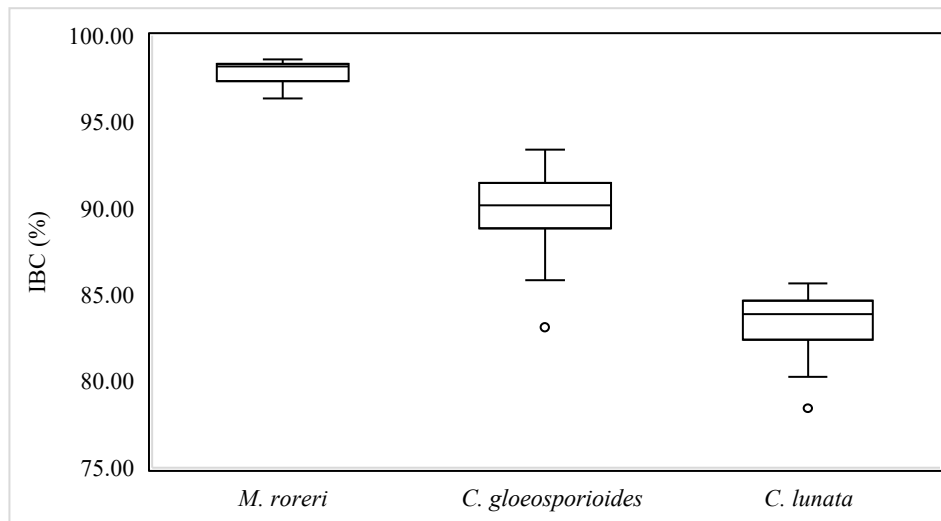


Figura 7. Índice de biocontrol (IBC) de *T. reesei* sobre las tres especies de hongos fitopatógenos.

B. Comparación entre la efectividad de inhibición de crecimiento de las especies de *Trichoderma* respecto a los hongos fitopatógenos

Al comparar el nivel de efectividad de inhibición de las especies antagonistas sobre las especies patógenas, se identificó con la prueba “T student” que existe un efecto de inhibición significativamente mayor de *T. reesei* sobre *M. royeri* con un $p = 5.95e-15$ (Figura 8).

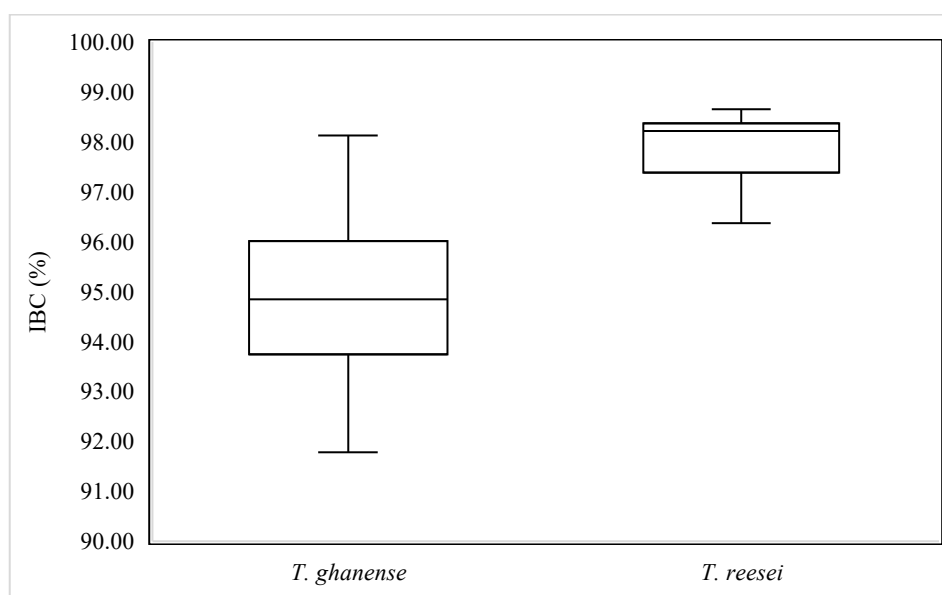


Figura 8. Índices de biocontrol (IBC) de los hongos antagonista sobre *M. royeri*. Existe una efectividad mayor y significativa de *T. reesei* sobre *M. royeri*, en comparación con *T. ghanense*.

Al comparar el nivel de efectividad de inhibición de las especies antagonistas sobre las especies patógenas, se identificó con la prueba “T student” que existe un efecto de inhibición significativamente mayor de *T. ghanense* sobre *C. gloeosporioides* con un $p = 5.65e-30$ (Figura 9).

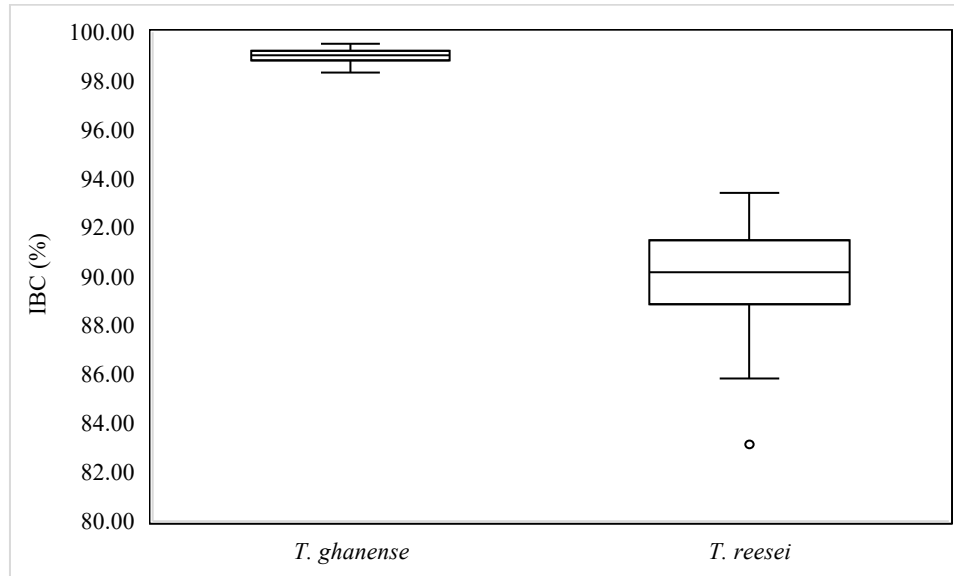


Figura 9. Índices de biocontrol (IBC) de los hongos antagonista sobre *C. gloeosporioides*. Existe una efectividad mayor y significativa de *T. ghanense* sobre *C. gloeosporioides*, en comparación con *T. reesei*.

Al comparar el nivel de efectividad de inhibición de las especies antagonistas sobre las especies patógenas, se identificó con la prueba “T student” que no existe una diferencia significativa en el efecto de inhibición entre *T. ghanense* y *T. reesei* sobre *C. lunata* con un $p = 0.0014$, debido a la poca diferencia en los datos (Figura 10).

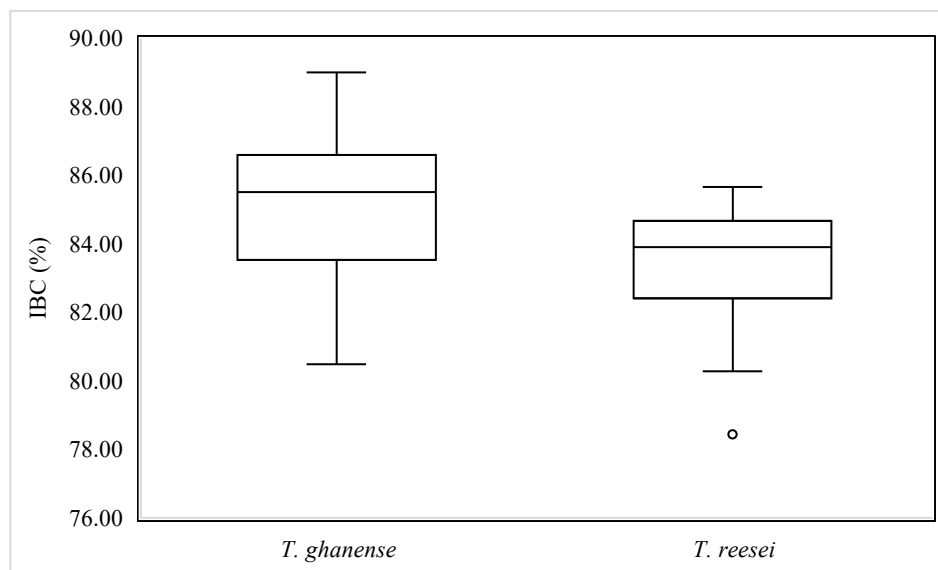


Figura 10. Índices de biocontrol (IBC) de los hongos antagonista sobre *C. lunata*. No existe una diferencia en la efectividad de inhibición por *T. ghanense* y *T. reesei* sobre *C. lunata*.

C. Tipos de interacción en los ensayos de confrontación

T. ghanense y *T. roreri* tuvieron una interacción de microparasitismo con *M. roreri*, en la cual lograron colonizar el micelio del hongo fitopatógeno y crecer sobre éste, a pesar de su mecanismo de defensa por antibiosis (Figura 11). *T. ghanense* tuvo un crecimiento más lento para ocupar un área mayor en la caja Petri en comparación con *T. reesei*.

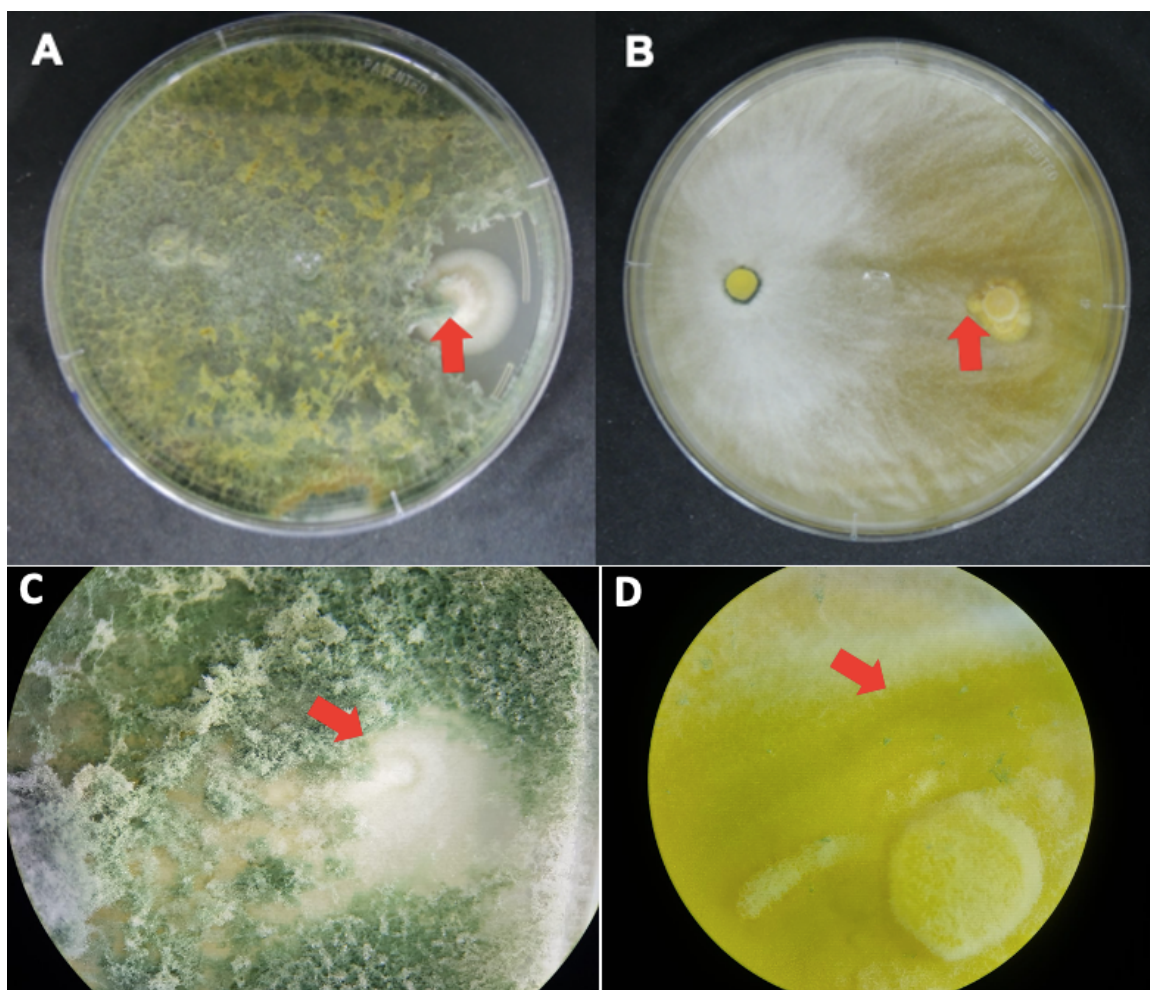


Figura 11. Ensayos de confrontación de los hongos antagonistas contra *M. roreri*. A) *T. ghanense* (izquierda) contra *M. roreri* (derecha); B) *T. reesei* (izquierda) contra *M. roreri* (derecha); C) Interacción de microparasitismo de *T. ghanense* contra *M. roreri*; D) Interacción de microparasitismo de *T. reesei* contra *M. roreri*. La flecha roja indica el punto donde los hongos antagonistas comienza a colonizar al hongo fitopatógeno.

T. ghanense y *T. reesei* tuvieron una interacción de microparasitismo con *C. gloeosporioides*, en la cual lograron colonizar el micelio del hongo fitopatógono y crecer sobre este (Figura 12). *T. ghanense* tuvo un crecimiento más acelerado para ocupar un área mayor en la caja Petri en comparación con con *T. reesei*.

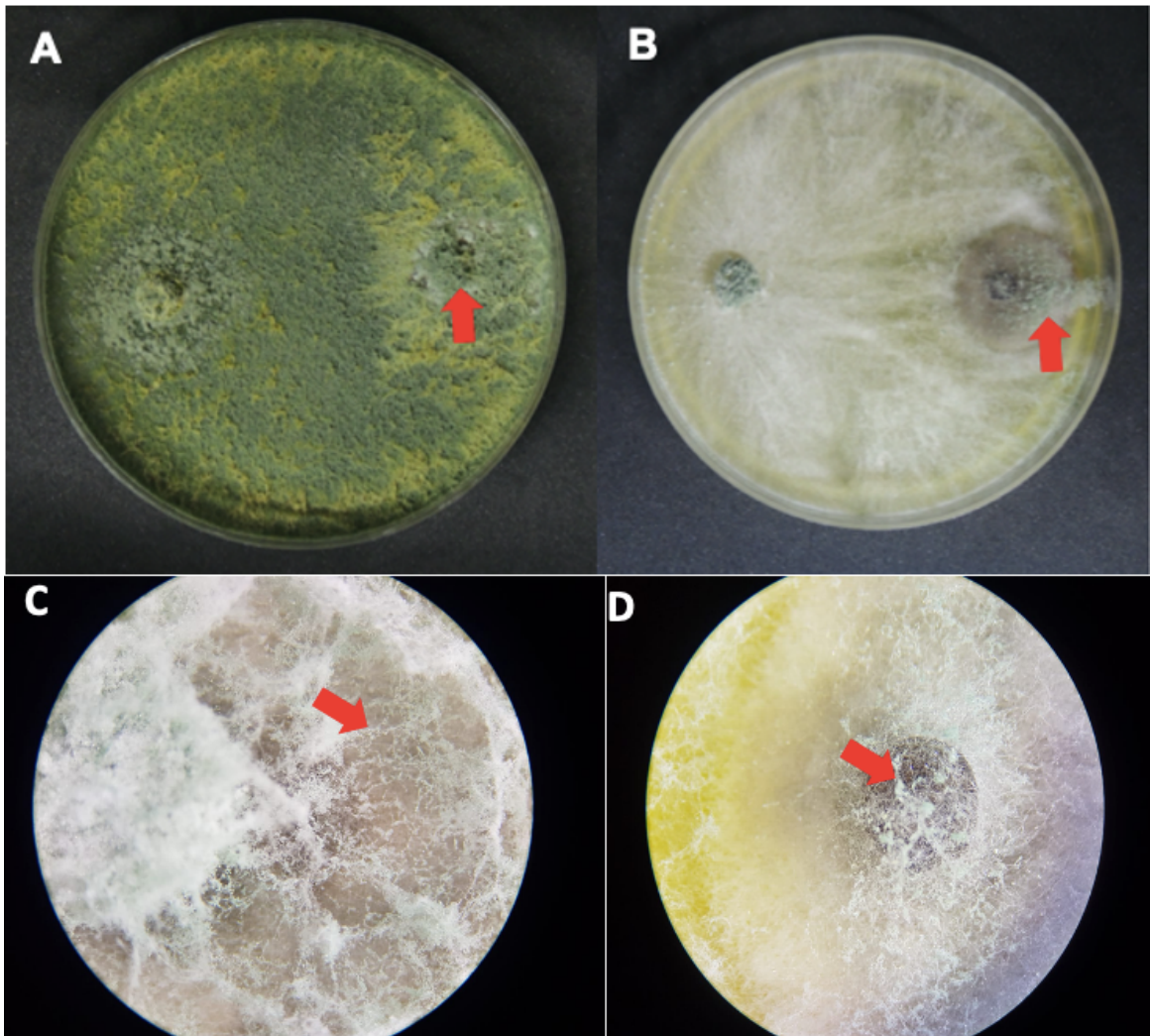


Figura 12. Ensayos de confrontación de los hongos antagonistas contra *C. gloeosporioides*. A) *T. ghanense* (izquierda) contra *C. gloeosporioides* (derecha); B) *T. reesei* (izquierda) contra *C. gloeosporioides* (derecha); C) Interacción de microparasitismo de *T. ghanense* contra *C. gloeosporioides*; D) Interacción de microparasitismo de *T. reesei* contra *C. gloeosporioides*. La flecha roja indica el punto donde los hongos antagonistas comienza a colonizar al hongo fitopatógono.

T. ghanense y *T. roreri* tuvieron una interacción de microparasitismo con *C. lunata*, en la cual lograron colonizar el micelio del hongo fitopatógono y crecer sobre este, a pesar de

su mecanismo de defensa por antibiosis (Figura 13). *T. reesei* tuvo un crecimiento más lento para ocupar un área mayor en la caja Petri en comparación con con *T. ghanense*.

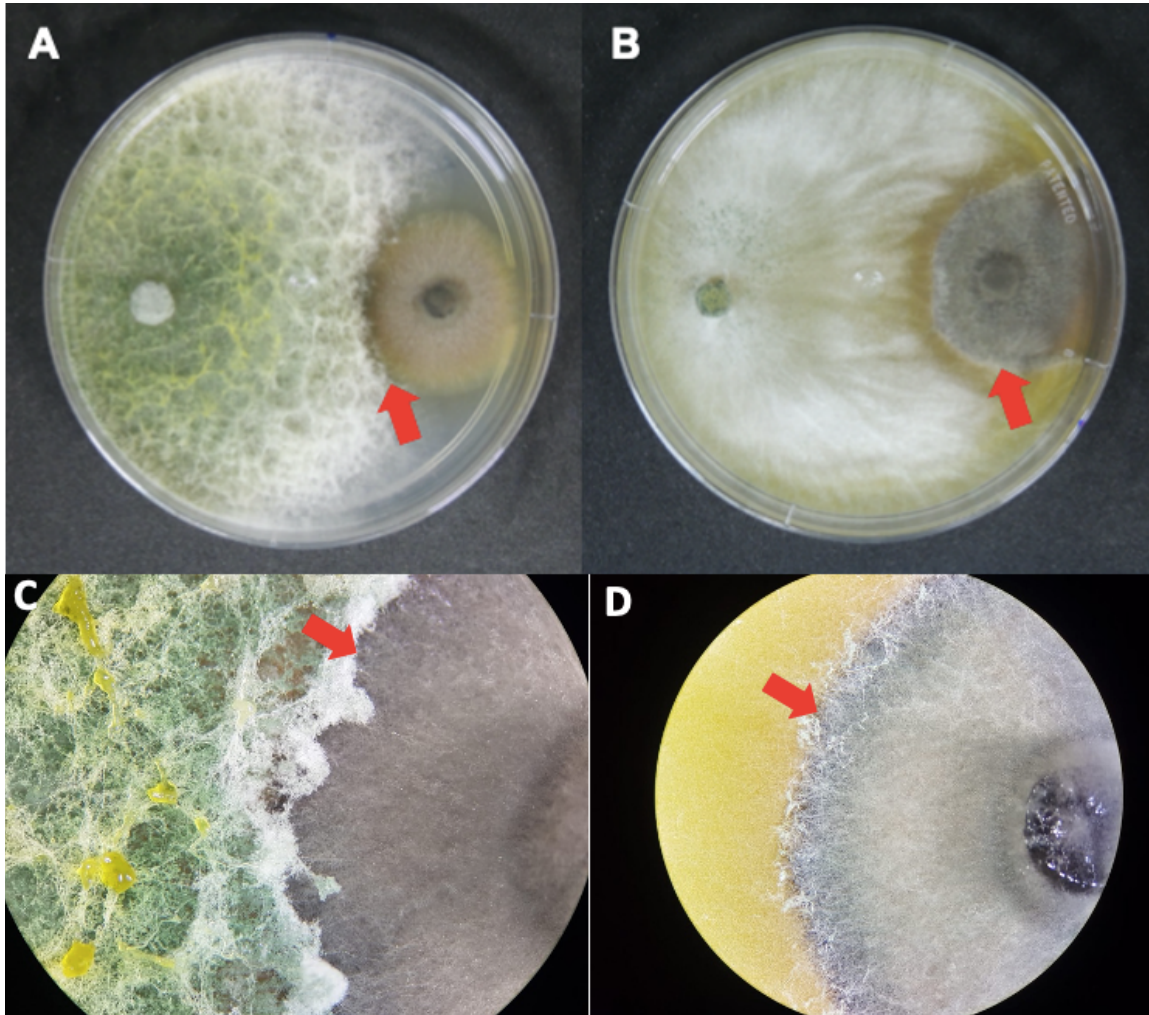


Figura 13. Ensayos de confrontación de los hongos antagonistas contra *C. lunata*. A) *T. ghanense* (izquierda) contra *C. lunata* (derecha); B) *T. reesei* (izquierda) contra *C. lunata* (derecha); C) Interacción de microparasitismo de *T. ghanense* contra *C. lunata*; D) Interacción de microparasitismo de *T. reesei* contra *C. lunata*. La flecha roja indica el punto donde los hongos antagonistas comienzan a colonizar al hongo fitopatógeno.

VIII. Discusión

En los ensayos de antagonismo las colonias *T. ghanense* y *T. reesei* tuvieron un rápido crecimiento durante los primeros 2 y 3 días de incubación. Mientras que las colonias de los tres hongos patógenos tuvieron un crecimiento más lento y ocuparon un área más reducida en la caja Petri durante los 5 días de incubación, permaneciendo aproximadamente igual. Esto se debe al rápido crecimiento de las especies del género *Trichoderma* puesto que son colonizadoras ubicuas de celulosa y biomasa, lo que les ha permitido desarrollar resistencias sistémicas contra agentes patógenos (Harman, 2000; Kubicek *et al.*, 2008).

Las especies antagonistas demostraron un control efectivo contra todas las cepas patógenas, al colonizar los micelios por mecanismos de microparasitismo. El microparasitismo ocurrió por un crecimiento paralelo de la cepa antagonista con las hifas del hongo patógeno y en ciertas áreas se conectó para extraer los nutrientes de este y continuar con el crecimiento de su micelio (Kredics *et al.* 2005; Suarez *et al.* 2007), de esta manera contuvo el desarrollo y expansión del micelio patógeno en el medio. También pudo causar alteraciones en las hifas mediante lisis celular. Estos efectos son generados por la expulsión de enzimas y metabolitos producidos por los *Trichoderma*. Se ha comprobado que ambas especies secretan enzimas líticas, proteolíticas (quinasa A), metabolitos volátiles o difusibles y bombas de membrana transportadora ABC como medidas de defensa contra otras especies de hongos (Kubicek *et al.* 2001; Viterbo *et al.* 2002; Kredics *et al.* 2005; Suarez *et al.* 2007; Ruocco *et al.*

A pesar de la antibiosis producida por *M. roreri* y *C. lunata*, *T. reesei* y *T. ghanense* lograron colonizar los micelios y crecer sobre éstos. Solamente *T. ghanense* esporuló en áreas más extensas del medio en comparación con *T. reesei*, que desarrolló micelio

vegetativo en un área mayor del medio y esporuló solo alrededor del disco de inoculación (Figura 11 y 13). No se identificó un mecanismo de defensa desarrollado por *C. gloeosporioides*, por lo que los hongos antagonistas cubrieron la colonia por completo, esporulando sobre el micelio de la cepa patógena y en su propio disco de inoculación (Figura 12).

Los IBC obtenidos para la especie *M. roleri* en ambos tratamientos (Cuadro 2 y 3) fueron mayores al 72.72% reportado por (Cuervo-Parra *et al.*, 2011) utilizando a *T. harzianum* como especie antagonista. Al igual que los IBC de *C. gloeosporioides* en ambos tratamientos (Cuadro 2 y 3) fueron mayores al 81.49% reportado por (Cuervo-Parra *et al.*, 2011) utilizando también *T. harzianum* como agente antagonista. Para *C. lunata* se obtuvo resultados de microparasitismo similares reportados para *T. harzianum* y *T. viride* presentados por Aktar *et al.*, (2014), en los cuales la inhibición causada por el hongo antagonista supera los 2mm de distancia sobre las colonias del hongo dañino.

Los datos de los índices de biocontrol cumplieron con los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia en las réplicas para todas las pruebas estadísticas. Se comprobó la hipótesis alternativa, por lo que se afirma que *T. ghanense* y *T. reesei* tienen un efecto de inhibición en el crecimiento de *M. roleri*, *C. gloeosporioides* y *C. lunata*. Se identificó que existen diferencias en el efecto que tiene cada cepa antagonista de manera individual sobre las tres especies patógenas, por lo que su efectividad en la inhibición del crecimiento presentó variación (Figura 6 y 7). Asimismo, se identificó que sí existe una diferencia significativa en el efecto de inhibición para cepas específicas; *T. ghanense* es más efectivo para inhibir el crecimiento de *C. gloeosporioides* y *T. reesei* es más efectivo para inhibir el crecimiento de *M. roleri*. Mientras que para *C. lunata*, ninguno de los agentes antagonistas presentó una diferencia significativa en la efectividad de inhibición, por lo que ambas especies son candidatas para ser usadas en un producto biológico contra este patógeno.

Según los resultados se puede proponer la utilización de cada cepa antagonista como un control biológico de acuerdo con la efectividad de inhibición para cada tipo de hongo

fitopatógeno. Para futuras investigaciones se recomienda realizar pruebas de antagonismo *in vitro* utilizando una combinación de ambas especies del género *Trichoderma* para evaluar si la interacción entre ambas produce un aumento en el potencial inhibitorio del crecimiento de los hongos patógenos. También realizar pruebas controladas directamente en el tallo, hojas y frutos de plantas de cacao con esporas suspendidas en solución a diferentes concentraciones, para evaluar el efecto que tienen las especies sobre la planta y comprobar su efectividad como control biológico. Ya que se conoce que además de controlar a los agentes fitopatógenos, *Trichoderma* spp., generan elicitors que estimulan los mecanismos de defensa de la planta por lo que se podría obtener resultados positivos al implementarlos en campo.

IX. Conclusiones

Trichoderma ghanense y *Trichoderma reesei* tienen un efecto inhibitor en el crecimiento de las especies patógenas *Moniliophthora roreri*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Curvularia lunata*, que afectan las plantaciones de cacao en Guatemala.

T. reesei tiene un mayor efecto inhibitor en el crecimiento de *M. roreri*, mostrando alta efectividad para contrarrestar su antibiosis, por lo que es un potencial candidato para utilizarse control biológico contra este patógeno en plantaciones de cacao.

T. ghanense tiene un mayor efecto inhibitor en el crecimiento de *C. gloeosporioides*, mostrando alta efectividad para colonizar su micelio y crecer sobre este, por lo que es un potencial candidato para utilizarse como control biológico contra este patógeno en las plantaciones de cacao.

No existió una diferencia significativa en el efecto de *T. ghanense* y *T. reesei* para inhibir el crecimiento de *C. lunata*, por lo que ambos hongos son potenciales candidatos para utilizarse en campo como control biológico.

Trichoderma ghanense y *Trichoderma reesei* mostraron una interacción de microparasitismo con la cual colonizaron a los hongos fitopatógenos a pesar de sus mecanismos de defensa.

X. Recomendaciones

Se recomienda realizar ensayos de antagonismo *in vitro* utilizando una combinación de las dos especies del género *Trichoderma*, con el fin de evaluar si la interacción entre ambos aumenta el potencial inhibitorio del crecimiento de los hongos patógenos. Asimismo, realizar pruebas controladas en plantas de cacao, previamente inoculadas con un patógeno en cultivos o invernadero, para aplicar esporas suspendidas en solución a diferentes concentraciones sobre las hojas, tallos y frutos y evaluar el efecto que tienen los hongos antagonistas sobre la planta, con el fin de comprobar su efectividad como control biológico y determinar la mejor forma de aplicación.

XI. Literatura citada

- Aktar, M., Hossain, K., & Bashar, M. (2015). *Antagonistic potential of rhizosphere fungi against leaf spot and fruit rot pathogens of brinjal*. Bangladesh Journal of Botany, 43(2). doi:10.3329/bjb.v43i2.21675
- Arvelo, M.A., González-León, D., Delgado, T., Maroto, S. & Montoya-López, P. (2017). *Manual técnico del cultivo de cacao, prácticas latinoamericanas*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA] San José; Costa Rica. ISBN: 978-92-9248-732-4.
- Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Crozier, J., Thomas, S. E., Samuels, G. J. & Holmes, K. A. (2008). *Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic Trichoderma isolates with biological control potential in Theobroma cacao*. Biological Control, 46(1), 24–35.
- Bateman, R. P., Hidalgo, E., Garcia, J., Arroyo, C., ten Hoopen, G. M., Adonijah, V. & Krauss, U. (2005). *Application of chemical and biological agents for the management of frosty pod rot (Moniliophthora roreri) in Costa Rican cocoa (Theobroma cacao)*. Annals of Applied Biology, 147(2), 129–138.
- Bravo, A., Ibarra, J. E., Del Rincón-Castro, C., Galindo, M., Patiño, E., Serrano, M. & Soberón, M. (2006). *Los microorganismos en el control de insectos y patógenos*. Revista, Latinoamericana de Microbiología., 48(2), 113–120.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [CONCYT]. (2010). *Estudio de los Insectos Polinizadores de Cacao de la zona del Suroccidente de Guatemala*. Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología.
- Correa-Álvarez, J., Castro-Martínez, S. & Coy, J. (2014). *Estado de la moniliasis del cacao causada por Moniliophthora roreri en Colombia*. Acta Agronómica, 63(4), 388-399. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.15446/acag.v63n4.42747>
- Cuervo-Parra, J., Parra, C., Ramirez-Suero, M., Sánchez, V. & Ramirez-Lepe, M. (2011). *Antagonistic effect of Trichoderma harzianum VSL291 on phytopathogenic fungi isolated from cocoa (Theobroma cacao L.) fruits*. African Journal of Biotechnology. 10.

- De Costa, D.M., and Erabadupitiya, H.R.U.T. (2005). *An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the Burkholderia cepacia complex*. *Postharvest Biology and Technology* 36:31-39.
- Doi, Y., Abe, Y., Sugiyama, J. (1987). *Trichoderma sect. Saturnisporum, sect. nov. and Trichoderma ghanense, sp. nov.* *Bulletin of the National Science Museum Tokyo*. 13:1-9.
- Evans, H.C. (1981). *Pod rot of cacao by Moniliophthora roreri*. *Phytopathological Paper*. 24:1-44.
- Ezziyyani, M., Pérez, C., Sid Ahmed, A., Requena, M. & Candela, M. (2004). *Trichoderma harzianum como biofungicida para el biocontrol de Phytophthora capsici en plantas de pimiento (Capsicum annum L)*. *Anales de Biología* 26: 35-45.
- Hernández-Lauzardo, A.N., Bautista-Banos, S., Velázquez-Del valle, M.G. & Hernández-Rodríguez, A. (2007). *Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos*. *Rev. mex. Fitopatol.* Vol.25, n.1, pp.66-74. ISSN: 2007-8080.
- Howell, C.R., & Stipanovic, R.D. (1995). *Mechanisms in the biocontrol of Rhizoctonia solani induced cotton seedling diseases by Gliocladium virens: Antibiosis*. *Phytopathology* 85 :469–472.
- Janisiewicz, W.J., and Korsten, L. (2002). *Biological control of postharvest diseases of fruits*. *Annual Review of Phytopathology* 40:411-441.
- Kredics, L., Antal, Z., Szekeres, A., Hatvani, L., Manczinger, L., Vagvolgyi, C., Nagy, E. (2005). *Extracellular proteases of Trichoderma species. A review*. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 52:169–184.
- Kubicek, C.P., Mach, R.L., Peterbauer, C.K., Lorito, M. (2001). *Trichoderma: from genes to biocontrol*. *J Plant Pathology*. 83:11–23.
- Krauss, U. & Soberanis, W. (2001). *Biocontrol of Cocoa Pod Diseases with Mycoparasite Mixtures*. *Biological Control*, 22(2), 149–158.
- Krauss, U. & Soberanis, W. (2002). *Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases*. *Biological Control*, 24(1), 82–89.
- Krauss, U., ten Hoopen, M., Rees, R., Stirrup, T., Argyle, T., George, A. & Casanoves, F. (2013). *Mycoparasitism by Clonostachys byssicola and Clonostachys rosea on Trichoderma spp. from cocoa (Theobroma cacao) and implication for the design of mixed biocontrol agents*. *Biological Control*, 67(3), 317–327.

- Kubicek, C.P., Komon-Zelazowska, M., Druzhinina, I.S. (2008). *Fungal genus Hypocrea/Trichoderma: from barcodes to biodiversity*. J Zhejiang Univ Sci B.;9:753–763.
- Lecault, V., Patel, N. & Thibault, J. (2008). *Morphological Characterization and Viability Assessment of Trichoderma reesei by Image Analysis*. Biotechnology Progress, 23(3), 734–740. doi:10.1021/bp0602956
- Lumpur, K. (2007). *Sustainable cocoa economy: a comprehensive and participatory approach*. International Cocoa Organization [ICCO]. Disponible en: https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related-documents/32-consultative-board-on-the-world-cocoa-economy.html
- Martínez-De la parte, E. & Pérez-vicente, L. (2015). *Incidencia de enfermedades fúngicas en plantaciones de cacao de las provincias orientales de Cuba*. Rev. Protección Veg. 30(2):87-96.
- Mena, J. (2010). *Taxonomía del complejo Bipolaris, Curvularia, Drechslera y Exserohilum en Cuba*. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. La Habana. Instituto de Ecología y Sistemática.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación [MAGA]. (2014). *S, f. Perfil Comercial Cacao. Proyecto AdA-Integración*.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación [MAGA]. (2016). *Estrategia Nacional de la Agrocadena de Cacao -ENAC- en Guatemala*. Plan estratégico de la agrocadena de cacao de Guatemala 2016-2025 -PEDAC-.
- Ministerio de Economía de Guatemala [MINECO] (2015). *Análisis de la situación actual de la cadena de cacao e identificación de posibles acciones*. Proyecto de Fortalecimiento de la productividad de las MIP y MES.
- Motamayor JC, Risterucci A, López, P, Ortiz C, Moreno A, Lanaud C. (2002). *La domesticación de cacao I: el origen del cacao cultivado por los mayas*. En Heredity 89, 380–386.
- Muñoz, M., Acuña, I., Tejeda, P., Bravo, R., France, R., Orena, S., & Folch, C. (2017). *Uso de Variedades Resistentes*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias [INIA]. Chile. Consultado el 8 de septiembre de 2020 de: <http://www.inia.cl/nematododorado/contenido.php?page=13>

- Pérez-Vicente, Luis. (2018). *Moniliophthora roreri* (Evans) y *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime: impacto, síntomas, diagnóstico, epidemiología y manejo. *Revista de Protección Vegetal*, 33(1), 00.
- Phillips-Mora W, Wilkinson MJ. (2007). *Frosty pod, a disease of limited geographic distribution but unlimited potential for damage*. *Phytopathology*. 97:1644–1647.
- Phillips-Mora, W., y Cerda B., R. (2009). *Catálogo: Enfermedades del Cacao en América*. Central CATIE. Turrialba, Costa Rica. 24p.
- Powis, T., Hurst, W., Del Carmen Rodríguez, M., Ponciano, O., Blake, M., Cheetham, D., Coe, M. & Hodgson, J. (2008). *The Origins of Cacao Use in Mesoamerica*. *Mexicon*, 30 (2), 35-38. Consultado el 31 de agosto de: <http://www.jstor.org/stable/23759545>
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turra, D., Woo, S.L., Lorito, M. (2009). *Identification of a new biocontrol gene in Trichoderma atroviride: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi*. *Mol Plant Microbe Interact*. 22:291–301.
- Santos, P.R., Leão, E.U., Aguiar, R.W., Melo, M. P. & Santos, G.R. (2018). *Morphological and molecular characterization of Curvularia lunata pathogenic to andropogon grass*. *Bragantia*, 77(2), 326–332. doi:10.1590/1678-4499.2017258
- Schuster, A. & Schmoll, M. (2010). *Biology and biotechnology of Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(3), 787–799. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>
- Sharma, M. & Kulshrestha, S. (2015). *Colletotrichum gloeosporioides: An anthracnose causing pathogen of fruits and vegetables*. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. DOI: 10.13005/bbra/1776
- Shoresh, M. (2010). *Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents*. *Phytopathology* 48: 21-43.
- Standley, P.C. & Steyermark, J.A. (1946). *Flora of Guatemala*. Chicago Natural History Museum. Chicago; United States of America.
- Suárez, L. & Cabrales, C. (2008). *Identificación de las especies de cepas nativas de Trichoderma sp. y Bacillus sp. y evaluación de su potencial antagonista in vitro frente al hongo fitopatógeno nativo M. roreri en el departamento de Norte de Santander*. *Respuestas*, 13(1), 45–56.

- Suarez, M.B., Vizcaino, J.A., Llobell, A., Monte, E. (2007). *Characterization of genes encoding novel peptidases in the biocontrol fungus Trichoderma harzianum CECT 2413 using the TrichoEST functional genomics approach*. *Curr Genet*. 51:331–342.
- Szekeres, A., Leitgeb, B., Kredics, L., Manczinger, L. & Vágvölgyi, C. (2006). *A novel, image analysis based method for the evaluation of in vitro antagonism*. *J. Microbiol. Method*, 65(3): 619-622.
- Tortora, G. J.; Funke, B. R. y Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Ed. Médica Panamericana. 959 pp.
- Villacencio, M. & Jiménez, M. (2010). *Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de Moniliophthora roreri aislados de cinco provincias de la Costa Ecuatoriana*. Centro de Investigación Científica y Tecnología ESPOL. Disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/10957>
- Viterbo, A., Ramot, O., Chemin, L., Chet, I. (2002). *Significance of lytic enzymes from Trichoderma spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens*. *Antonie Leeuwenhoek*. 81:549–556.
- Whipps, J. M. & Lumsden, J. (2001). *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Wallingford: CABI.
- Wisniewski, M.E., and Wilson, C.L. (1992). *Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Recent advances*. *HortScience* 27:94-98.

XII. Anexos

A. Áreas de inhibición de los hongos antagonistas sobre los patógenos.

Cuadro 4. Áreas promedio de inhibición de *T. ghanense* contra *M. royeri*.

Área _P (mm ²) ± SD	Área _T (mm ²) ± SD	Área _{T+P} (mm ²) ± SD	IBC (%)
314.10±0.17	7202.95±0.56	7517.04 ±0.55	95.82
461.83±0.51	6944.72±0.33	7406.55 ±0.79	93.76
570.70±0.31	6564.36±0.67	7135.07±0.65	92.00
268.07±0.32	5466.00±0.8	5734.07±0.48	95.32
295.75±0.5	5574.87±0.09	5870.62±0.59	94.96
344.46±0.96	5462.75±0.62	5807.21±0.38	94.07
362.43±1.06	6635.97±1.41	6998.40±0.64	94.82
435.29±0.82	6728.57±0.76	7163.86±1.39	93.92
128.78±1.64	6759.71±0.79	6888.49±0.85	98.13
430.68±6.29	6903.78±5.88	7334.46±0.9	94.13
251.14±0.7	6878.92±0.06	7130.06±0.74	96.48
269.46±0.96	7089.11±0.94	7358.57±1.37	96.34
447.53±0.57	6596.26±1.24	7043.79±1.79	93.65
605.27±1.09	7037.88±0.19	7643.15±1.09	92.08
357.38±0.88	6952.87±0.4	7310.25±0.7	95.11
417.47±1.12	6290.04±1.68	6707.51±0.9	93.78
393.69±0.89	7283.97±1.18	7677.65±0.76	94.87
349.52±0.88	7054.00±0.3	7403.52±0.79	95.28
355.66±1.26	7023.64±0.46	7379.30±0.87	95.18
608.37±1.01	6817.12±0.1	7425.49±0.93	91.81
268.56±1.04	6583.87±0.38	6852.43±0.88	96.08
456.29±0.78	6769.61±0.68	7225.90±0.51	93.69
489.83±0.5	6936.60±0.6	7426.43±0.55	93.40
263.32±0.47	6660.21±0.64	6923.53±1.06	96.20
308.69±1.38	7389.59±0.99	7698.28±0.39	95.99
648.47±0.64	7243.16±0.18	7891.63±0.75	91.78
412.72±1.78	7205.00±0.36	7617.72±1.42	94.58
266.35±0.34	7046.50±0.71	7312.85±0.98	96.36
230.01±1.33	6861.61±1.55	7091.62±0.83	96.76
387.51±1.04	6632.20±0.24	7019.71±1.2	94.48

Área_P es el área ocupada por *M. roreri*; Área_T es el área ocupada por *T. ghanense*; Área_{T+P} es el área total ocupada por *T. ghanense* y *M. roreri*; IBC es el índice de biocontrol.

Cuadro 5. Áreas promedio de inhibición de *T. ghanense* contra *C. gloeosporioides*.

Área _P (mm ²) ± SD	Área _T (mm ²) ± SD	Área _{T+P} (mm ²) ± SD	IBC (%)
79.06± 0.84	6119.62± 1.42	6198.68± 0.62	98.72
106.53± 0.55	6411.62± 0.17	6518.16± 0.4	98.37
83.02± 0.97	7353.91± 0.89	7436.93± 0.09	98.88
64.16± 0.86	7441.15± 0.84	7505.31± 0.45	99.15
73.16± 0.89	7824.69± 0.79	7897.85± 0.15	99.07
104.16± 0.81	8301.77± 0.77	8405.93± 0.08	98.76
86.01± 0.81	8933.95± 1.36	9019.97± 0.56	99.05
64.66± 0.83	8253.61± 1.03	8318.28± 0.33	99.22
65.42± 0.47	9050.74± 0.5	9116.16± 0.21	99.28
62.55± 0.66	8804.40± 0.5	8866.95± 0.24	99.29
55.25± 0.7	8298.48± 0.72	8353.73± 0.25	99.34
84.49± 0.58	9009.87± 0.86	9094.36± 0.38	99.07
56.40± 0.61	9056.37± 0.96	9112.78± 0.37	99.38
100.20± 0.67	8598.60± 0.9	8698.81± 0.37	98.85
87.36± 0.67	8776.7± 0.18	8864.06± 0.66	99.01
73.65± 0.43	9291.86± 0.56	9365.51± 0.68	99.21
93.19± 0.87	8789.15± 0.17	8882.35± 0.98	98.95
94.71± 0.36	8126.91± 0.69	8221.62± 1.06	98.85
82.41± 1.42	8699.00± 0.92	8781.42± 0.52	99.06
59.71± 0.74	9031.42± 0.55	9091.14± 0.26	99.34
41.06± 0.74	8913.17± 1.2	8954.23± 0.85	99.54
100.11± 0.53	8686.02± 0.45	8786.14± 0.97	98.86
82.96± 0.76	9315.90± 0.64	9398.86± 0.24	99.12
57.16± 0.75	8083.74± 0.25	8140.9± 0.64	99.30
82.25± 0.29	9232.73± 0.37	9314.99± 0.45	99.12
144.40± 1.15	8720.73± 0.94	8865.14± 0.28	98.37
107.47± 1.03	9211.69± 0.57	9319.16± 0.47	98.85
73.18± 0.37	8670.30± 0.87	8743.48± 0.95	99.16
67.9± 0.71	8864.00± 0.68	8931.90± 0.59	99.24
78.17± 0.31	8381.01± 0.34	8459.18± 0.64	99.08

Área_P es el área ocupada por *C. gloeosporioides*; Área_T es el área ocupada por *T. ghanense*; Área_{T+P} es el área total ocupada por *T. ghanense* y *C. gloeosporioides*; IBC es el índice de biocontrol.

Cuadro 6. Áreas promedio de inhibición de *T. ghanense* contra *C. lunata*.

Área _P (mm ²) ± SD	Área _T (mm ²) ± SD	Área _{T+P} (mm ²) ± SD	IBC (%)
780.34±0.61	4550.44±1.4	5330.70±1.07	85.36
976.59±1.75	4552.71±2.09	5529.36±0.74	82.34
1049.29±1.13	5395.73±1.11	6444.61±0.67	83.72
749.40±0.92	5585.19±1.17	6334.51±0.53	88.17
998.81±1.09	5661.07±1.4	6659.87±0.32	85.00
902.49±1.2	5723.65±0.95	6626.48±0.72	86.38
1097.67±1.59	5458.17±1.72	6555.31±0.72	83.26
919.00±0.19	5544.04±1.5	6462.46±0.57	85.79
1036.86±0.76	5069.80±1.57	6106.47±0.83	83.02
1074.38±1.06	5489.06±0.64	6563.20±1.07	83.63
850.33±0.3	5880.78±0.97	6730.83±0.94	87.37
1180.04±1.17	5115.94±1.42	6295.79±1.22	81.26
1045.09±1.1	5189.44±0.86	6234.44±1.4	83.24
1037.38±0.97	5715.73±0.71	6753.08±1.23	84.64
1119.39±0.87	6156.92±1.38	7276.13±0.54	84.62
818.56±0.07	6460.81±0.84	7279.10±0.46	88.76
938.14±0.48	5587.16±0.95	6525.24±0.97	85.62
932.64±0.28	5924.88±1.07	6857.38±0.85	86.40
912.87±1.03	5892.90±1.69	6805.66±0.63	86.59
800.71±0.63	5886.75±1.17	6687.27±0.81	88.03
953.35±0.65	6170.16±0.9	7123.41±0.41	86.62
942.63±0.56	5934.17±1.07	6876.68±0.6	86.29
801.51±0.95	6488.97±1.36	7290.23±0.27	89.01
1370.16±0.9	5654.35±1.51	7024.36±0.57	80.50
951.13±0.51	6039.28±1.05	6990.26±0.97	86.40
937.32±1.15	6246.27±1.07	7183.40±1.52	86.95
1057.54±0.72	5672.06±1.29	6729.45±0.77	84.29
1346.43±1.11	5929.69±0.99	7276.01±0.16	81.50
1020.06±1.2	6177.52±1.3	7197.41±1.07	85.83
1030.58±1.49	6026.11±1.32	7056.48±0.71	85.40

Área_P es el área ocupada por *C. lunata*; Área_T es el área ocupada por *T. ghanense*; Área_{T+P} es el área total ocupada por *T. ghanense* y *C. lunata*; IBC es el índice de biocontrol.

Cuadro 7. Áreas promedio de inhibición de *T. reesei* contra *M. royeri*.

Área _P (mm ²) ± SD	Área _T (mm ²) ± SD	Área _{T+P} (mm ²) ± SD	IBC (%)
117.23±0.37	6218.43± 0.76	6335.66± 0.42	98.15
114.89±0.42	6293.90± 0.3	6408.79± 0.69	98.21
114.59±0.91	6682.81± 0.38	6797.41± 0.53	98.31
144.51±1.27	6381.30± 1.48	6525.81± 1.09	97.79
179.53±0.89	6205.95± 0.09	6385.49± 0.83	97.19
188.72±0.81	6341.64± 0.49	6530.36± 1.26	97.11
104.59±0.74	6392.20± 0.17	6496.80± 0.59	98.39
105.42±0.55	5916.05± 0.59	6021.48± 1.15	98.25
119.45±0.99	6666.43± 0.77	6785.88± 0.57	98.24
147.58±0.7	6680.89± 0.18	6828.47± 0.88	97.84
113.18±0.53	6823.12± 0.51	6936.30± 0.52	98.37
99.59±0.69	6840.62± 1.03	6940.22± 0.64	98.56
100.39±0.77	6755.49± 0.68	6855.88± 0.47	98.54
95.28±0.35	7001.53± 0.53	7096.82± 0.3	98.66
183.04±0.76	6058.80± 1.31	6241.84± 1.54	97.07
159.39±1.13	6729.13± 1.43	6888.53± 0.6	97.69
112.82±0.75	6699.37± 0.6	6812.19± 0.83	98.34
110.47±0.77	7286.31± 1.23	7396.78± 0.55	98.51
176.79±0.33	5145.48± 1.06	5322.27± 0.78	96.68
101.56±0.83	5935.75± 0.65	6037.31± 0.69	98.32
184.35±0.67	5960.35± 0.51	6144.70± 1.17	97.00
92.31±0.84	5620.73± 0.71	5713.04± 0.54	98.38
150.02±0.46	5431.25± 0.23	5581.27± 0.65	97.31
174.74±0.61	6583.96± 0.2	6758.70± 0.41	97.41
155.14±0.66	5876.06± 0.21	6031.20± 0.47	97.43
184.24±0.35	4904.85± 0.27	5089.10± 0.36	96.38
111.04±0.64	6616.40± 0.24	6727.44± 0.79	98.35
120.19±0.53	6036.36± 0.08	6156.56± 0.56	98.05
99.91±0.3	6273.04± 0.36	6372.95± 0.09	98.43
120.23±0.73	6696.73± 0.57	6816.96± 0.17	98.24

Área_P es el área ocupada por *M. royeri*; Área_T es el área ocupada por *T. reesei*; Área_{T+P} es el área total ocupada por *T. reesei* y *M. royeri*; IBC es el índice de biocontrol.

Cuadro 8. Áreas promedio de inhibición de *T. reesei* contra *C. gloeosporioides*.

Área _P (mm ²) ± SD	Área _T (mm ²) ± SD	Área _{T+P} (mm ²) ± SD	IBC (%)
454.20±1.62	4876.11±0.11	5330.31±1.63	91.48
486.76±0.25	5036.61±1.07	5523.37±1	91.19
530.17±2.4	5026.98±0.93	5557.15±1.67	90.46
482.61±0.69	4550.75±1.76	5033.36±1.91	90.41
490.56±0.84	5182.93±0.68	5673.49±1.44	91.35
476.97±0.71	5157.33±1.05	5634.31±0.6	91.53
500.77±0.86	5074.70±0.64	5575.47±0.7	91.02
554.32±0.84	5103.20±1.58	5657.53±1.21	90.20
611.49±1.09	4986.53±1.73	5598.02±0.82	89.08
520.54±0.74	4739.86±1.52	5260.41±0.83	90.10
781.36±0.72	4739.47±0.82	5520.83±1.48	85.85
430.17±0.55	6109.77±1.35	6539.94±1.62	93.42
428.02±0.92	5436.79±0.4	5864.81±1.14	92.70
672.79±0.24	4892.63±1.34	5565.42±1.16	87.91
470.34±0.77	5717.58±1.31	6187.92±0.54	92.40
760.44±0.82	5236.20±1.24	5996.64±1.86	87.32
537.25±0.61	4933.65±1.44	5470.91±1.99	90.18
615.54±2.21	5145.13±0.48	5760.67±2.52	89.31
613.30±0.64	5204.60±0.79	5817.89±0.95	89.46
419.79±2.1	5639.99±1.81	6059.78±1.3	93.07
681.80±1.93	5110.30±1.59	5792.10±2.4	88.23
659.82±1.18	5133.82±1	5793.64±2.12	88.61
423.57±1.77	5533.34±1.83	5956.91±1.2	92.89
659.45±3.23	5314.09±1.41	5973.54±1.9	88.96
579.66±2.38	5057.22±1.36	5636.88±1.61	89.72
913.60±1.46	4504.89±2.15	5418.49±0.69	83.14
616.97±1.9	5305.90±1.28	5922.87±1.81	89.58
524.15±1.13	5272.10±2.28	5796.25±1.27	90.96
492.32±2.79	5403.84±1.25	5896.16±1.61	91.65
685.02±0.81	5082.96±1.78	5767.98±1.26	88.12

Área_P es el área ocupada por *C. gloeosporioides*; Área_T es el área ocupada por *T. reesei*; Área_{T+P} es el área total ocupada por *T. reesei* y *C. gloeosporioides*; IBC es el índice de biocontrol.

Cuadro 9. Áreas promedio de inhibición de *T. reesei* contra *C. lunata*.

Área _P (mm ²) ± SD	Área _T (mm ²) ± SD	Área _{T+P} (mm ²) ± SD	IBC (%)
1045.69±0.95	4631.41±1.11	5677.10±0.44	81.58
1010.48±1.08	5043.47±0.72	6053.94±1.59	83.31
1034.64±0.14	5323.52±0.7	6358.16±0.66	83.73
1099.22±0.29	5478.10±0.76	6577.32±0.48	83.29
1192.96±1.76	5453.67±0.66	6646.63±1.14	82.05
1187.30±0.35	5583.24±0.35	6770.54±0.67	82.46
1173.64±1.13	5703.18±1.08	6876.82±0.28	82.93
1342.72±0.98	5464.57±1.16	6807.28±2.09	80.28
1174.97±0.19	5398.44±0.61	6573.42±0.49	82.13
1178.15±0.97	5559.68±0.95	6737.83±0.6	82.51
967.35±0.3	5261.35±0.89	6228.70±0.64	84.47
1452.03±1.96	5282.64±0.81	6734.67±1.43	78.44
989.20±0.5	5319.50±1.16	6308.71±0.95	84.32
1003.73±0.69	5526.23±0.8	6529.96±1.17	84.63
993.54±0.43	5504.62±0.84	6498.17±0.4	84.71
1104.32±0.54	6002.92±0.6	7107.24±1.14	84.46
1060.26±0.67	6103.54±1.03	7163.80±1.47	85.20
1072.06±1.19	5815.24±0.53	6887.30±1.22	84.43
1054.11±0.08	6257.36±1.05	7311.47±0.97	85.58
953.26±0.81	5345.21±0.34	6298.47±1.14	84.87
1726.61±0.57	5111.08±0.78	6837.69±0.85	74.75
1125.41±1.19	5254.12±0.78	6379.54±1.82	82.36
1058.65±0.55	5731.46±0.92	6790.12±1.43	84.41
917.72±1.1	5487.23±0.23	6404.95±1.33	85.67
1072.19±0.71	5831.45±0.72	6903.64±1.4	84.47
1050.32±1.22	5352.29±0.41	6402.60±1.16	83.60
1004.52±1	5655.89±0.35	6660.42±0.92	84.92
983.43±0.51	5581.52±0.57	6564.95±0.78	85.02
1060.41±1.09	5530.09±0.88	6590.51±0.74	83.91
1196.28±1.56	5170.26±1.02	6366.54±0.98	81.21

Área_P es el área ocupada por *C. lunata*; Área_T es el área ocupada por *T. reesei*; Área_{T+P} es el área total ocupada por *T. reesei* y *C. lunata*; IBC es el índice de biocontrol.

Cuadro 10. Hoja para toma de datos de los estudios de antagonismo.

No.	Hongo antagonista	Hongo patógeno	Parasitario (micelio crece sobre micelio)	Inhibitorio (micelio crece alrededor o paralelo a otro)	Observación de réplicas

Cuadro 11. Cronograma de trabajo

Actividad	Junio			Julio				Agosto			Septiembre			Octubre			Noviembre				
Aislamiento	■	■																			
Purificación de cepas		■	■	■																	
Extracción de ADN				■																	
PCR				■																	
Identificación por secuenciación					■	■	■														
Conservación en cepario							■														
Reaislamiento								■	■												
Preparación de medios de cultivo							■	■	■	■	■										
Pruebas de antagonismo												■	■	■	■	■					
Análisis digital												■	■	■	■	■	■				
Análisis estadístico																	■	■			
Redacción de manuscrito																	■	■			

Cuadro 12. Presupuesto

Descripción	UVG			Proyecto Cacao IICA 57801			Contraparte			Total (Q)
	Cant.	Precio (Q)	Subtotal (Q)	Cant.	Precio (Q)	Subtotal (Q)	Cant.	Precio (Q)	Subtotal (Q)	
Equipo	-	-	19,812.00	-	-	-	-	-	12,200.00	32,012.00
Incubadora	1	15600	15600	-	-	-	-	-	-	
Microscopio	1	412	412	-	-	-	-	-	-	
Refrigeradora	1	3800	3800	-	-	-	-	-	-	
Cámara fotográfica	-	-	-	-	-	-	1	2350	2350	
Equipo fotográfico	-	-	-	-	-	-	1	850	850	
Computadora portatil	-	-	-	-	-	-	1	9000	9000	
Reactivos	-	-	3,256.00	-	-	2,052.00	-	-	-	5,308.00
Agar Papa Dextrosa (PDA)	-	-	-	1	1502	1502	-	-	-	
Agar Agar	1	1945	1945	-	-	-	-	-	-	
Estreptomina	1	677	677	-	-	-	-	-	-	
Cloranfenicol	1	482	482	-	-	-	-	-	-	
Carbendazim	-	-	-	1	350	350	-	-	-	
Azul de lactofenol	1	152	152	-	-	-	-	-	-	
Etanol 95% (galón)	-	-	-	2	45	90	-	-	-	
Metanol (galón)	-	-	-	2	55	110	-	-	-	
Materiales y suministros	-	-	9,627.00	-	-	1,788.00	-	-	56.00	11,471.00
Jugo V8	-	-	-	-	-	-	8	7	56	
Asa micológica	6	55	330	-	-	-	-	-	-	
Perforador para inocular	1	895	895	-	-	-	-	-	-	
Marcador Sharpie	-	-	-	2	7	14	-	-	-	
Paquetes cajas Petri	-	-	-	2	887	1774	-	-	-	
Mechero de alcohol	2	156	312	-	-	-	-	-	-	
Frascos de vidrio autoclavables	2	4045	8090	-	-	-	-	-	-	
Análisis de laboratorio	-	-	-	-	-	3,510.00	-	-	-	3,510.00
Extracción de ADN	-	-	-	6	125	750	-	-	-	
PCR	-	-	-	6	175	1050	-	-	-	
Secuenciación	-	-	-	6	285	1710	-	-	-	
TOTAL (Q)			32,695.00			7,350.00			12,256.00	52,301.00